

# Gentamicin-RGD-Hydroxylapatit-Beschichtungen für zementfreie Endoprothesen

—

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

Inauguraldissertation  
Zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin  
des Fachbereiches Medizin  
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Vorgelegt von Felicitas Böhner  
aus Paderborn

Gießen 2012

**Aus der Klinik und Poliklinik  
für Unfallchirurgie  
der Universitätsklinikum Gießen und Marburg  
GmbH  
Standort Gießen**

**Direktor:  
Univ.-Prof. Prof. h.c.  
Dr. med. Dr. med. vet. Dr. h.c.  
Reinhard Schnettler**

Gutachter:  
Prof. Dr. Dr. V. Alt

Gutachter:  
Prof. Dr. E. Domann

Tag der Disputation:  
16.04.2013

# INHALTSVERZEICHNIS

<b>1 EINLEITUNG</b>	<b>1</b>
<b>1.1 ARTHROSE</b>	<b>2</b>
<b>1.2 HÜFTENDOPTHETIK</b>	<b>3</b>
1.2.1 Geschichte des künstlichen Gelenkersatzes	4
1.2.2 Prinzipien der Verankerung beim Gelenkersatz	4
1.2.2.1 Prinzipien der zementierten Verankerung	5
1.2.2.2 Prinzipien der zementfreien Verankerung	5
<b>1.3 KNÖCHERNE INTEGRATION VON IMPLANTATEN</b>	<b>6</b>
1.3.1 Physiologie der knöchernen Integration von Implantaten	7
1.3.2 Unterschiedliche Beschichtungen zur knöchernen Integration bei zementfreien Prothesen	8
1.3.2.1 Hydroxylapatit	8
1.3.2.2 Plasma-Spray-Coating	10
1.3.2.3 Die Aminosäuresequenz Arginin-Glycin-Asparagin (RGD)	12
<b>1.4 KOMPLIKATIONEN IN DER ENDOPROTHETIK</b>	<b>13</b>
1.4.1 Protheseninfektionen	13
1.4.2 Erregerspektrum und Pathogenese	14
1.4.3 Prophylaxe von Protheseninfektionen	17
1.4.3.1 Prophylaxe durch systemische Antibiose	17
1.4.3.2 Prophylaxe durch lokale Antibiose	18
1.4.3.2.1 Lokale Prophylaxe in der zementierten Endoprothetik (PMMA)	18
1.4.3.2.2 Lokale Prophylaxe in der zementfreien Endoprothetik	21
1.4.4 Gentamicin	22
1.4.4.1 Allgemeine Aspekte	22
1.4.4.2 Gentamicin als Antibiotikum für die lokale Infektionsprophylaxe in der Orthopädie und Unfallchirurgie	23
<b>1.5 SPEZIELLE ANFORDERUNGEN AN BESCHICHTUNGEN</b>	<b>24</b>
<b>1.6 PROBLEMSTELLUNG DER ARBEIT</b>	<b>25</b>

<b>2. MATERIAL UND METHODE</b>	<b>26</b>
<b>2.1 STUDIENDESIGN</b>	<b>26</b>
<b>2.2 VERSUCHSTIERE</b>	<b>27</b>
<b>2.3 IMPLANTATE UND BESCHICHTUNGEN</b>	<b>27</b>
2.3.1 K-Draht	27
2.3.2 Hydroxylapatit-Beschichtung	28
2.3.3 RGD-Beschichtung	28
2.3.4 Gentamicin-Beschichtung	29
<b>2.4 NARKOSE UND OPERATIONS DURCHFÜHRUNG</b>	<b>30</b>
<b>2.5 POSTOPERATIVE RÖNTGENKONTROLLE</b>	<b>32</b>
<b>2.6 POSTOPERATIVE BEOBACHTUNG</b>	<b>33</b>
<b>2.7 EUTHANASIE DER TIERE</b>	<b>34</b>
<b>2.8 ENTNAHME DER PRÄPARATE</b>	<b>34</b>
<b>2.9 HERSTELLUNG DER SCHNITTE</b>	<b>34</b>
<b>2.10. ANFÄRBUNG DER SCHNITTE</b>	<b>36</b>
<b>2.11 FLÄCHENMESSUNG DER KNOCHENNEUBILDUNG</b>	<b>37</b>
<b>2.12 DIREKTER KNOCHEN-IMPLANTAT-KONTAKT</b>	<b>42</b>
<b>2.13 SEMI-QUANTITATIVE BESTIMMUNG DER MEHRKERNIGEN         RIESENZELEN</b>	<b>44</b>
<b>2.14 STATISTIK</b>	<b>45</b>
<b>2.15 HISTOLOGISCHE AUSWERTUNG</b>	<b>45</b>
<b>3. ERGEBNISSE</b>	<b>46</b>
<b>3.1 4-WOCHEN IMPLANTATIONS DAUER</b>	<b>46</b>
3.1.1 Histomorphometrische Ergebnisse	46
3.1.1.1 Knochenneubildung	46
3.1.1.2 Knochen-Implantat-Kontakt	47
3.1.1.3 Anzahl der Riesenzellen	47
3.1.2 Histologische Ergebnisse	48
3.1.2.1 Hydroxylapatit-Beschichtung	48
3.1.2.2 Gentamicin- RGD-HA-Beschichtung	50
3.1.3 Zusammenfassung der 4-Wochen-Studie	51
<b>3.2 12-WOCHEN IMPLANTATIONS DAUER</b>	<b>52</b>
3.2.1 Histomorphometrische Ergebnisse	52
3.2.1.1 Knochenneubildung	52
3.2.1.2 Knochen-Implantat-Kontakt	53
3.2.1.3 Anzahl der Riesenzellen	54

3.2.2 Histologische Ergebnisse	55
3.2.2.1 Unbeschichteter K-Draht	55
3.2.2.2 Hydroxylapatit-Beschichtung	57
3.2.2.3 Gentamicin-RGD-HA-Beschichtung	59
3.2.3 Zusammenfassung der 12 Wochen-Studie	61
<b>3.3 VERGLEICH DER 4-WOCHEN MIT DEN 12-WOCHEN ERGEBNISSEN</b>	<b>62</b>
3.3.1 Histomorphometrische Ergebnisse	62
3.3.1.1 Knochenneubildung	62
3.3.1.2 Knochen-Implantat-Kontakt	63
3.3.1.3 Anzahl der Riesenzellen	63
3.3.2 Zusammenfassung der histomorphometrischen Ergebnisse im 4- zu 12-Wochen-Vergleich	64
<b>4. DISKUSSION</b>	<b>65</b>
<b>4.1 VOR- UND NACHTEILE LOKALER ANTIBIOTIKAPROPHYLAXE IN         DER ENDOPROTHETIK</b>	<b>66</b>
<b>4.2 ANTIMIKROBIELLE BESCHICHTUNGEN FÜR ZEMENTFREIE         ENDOPROTHESEN</b>	<b>68</b>
<b>4.3 LOKALE TOXIZITÄT VON GENTAMICIN – WIRKUNG VON         GENTAMICIN AUF DIEKNOCHENNEUBILDUNG</b>	<b>70</b>
<b>4.4 EFFEKT DER RGD-ZUSATZBESCHICHTUNG</b>	<b>71</b>
<b>4.5 AUSBLICK</b>	<b>73</b>
<b>5. ZUSAMMENFASSUNG</b>	<b>74</b>
<b>6. SUMMARY</b>	<b>75</b>
<b>7. LITERATURVERZEICHNIS</b>	<b>76</b>
<b>8. ABBILDUNGSVERZEICHNIS</b>	<b>93</b>
<b>9. TABELLENVERZEICHNIS</b>	<b>98</b>
<b>10. ERKLÄRUNG</b>	<b>100</b>
<b>11. DANKSAGUNG</b>	<b>101</b>
<b>12. LEBENSLAUF</b>	<b>102</b>



## **1. Einleitung**

Seit mehreren Jahrzehnten kommt es zu einem Anstieg der Lebenserwartung aufgrund besserer hygienischer Lebensbedingungen, Rückgang der Kindersterblichkeit und nicht zuletzt wegen weiterer Fortschritte in der Medizin. Wie den Statistiken des Bundesinstitutes für Bevölkerungsforschung bereits 2007 zu entnehmen war, sind in Deutschland seit 1990 ein Anstieg der Altersgruppe im Seniorenalter, ein relativ stabiler Anteil in der mittleren Altersgruppe bis 65 und ein Rückgang in der Bevölkerungsschicht bis 25 Jahre zu beobachten (Bundesinstitut für Bevölkerungsforschung, 2007). Dieser Trend wird sich in den nächsten Jahren fortsetzen und spiegelt sich auch in der Arbeitswelt wider, wo bereits jetzt eine Tendenz zu älteren Erwerbstätigen zu erkennen ist.

Somit geht auch die Entwicklung der zu behandelnden Krankheiten in der Medizin mit diesem demographischen Trend einher. Die Anzahl der Herz-Kreislaufkrankungen, Diabetes Mellitus und degenerative Gelenkerkrankungen von Hüfte und Knie aber auch des gesamten Bewegungs- und Stützapparates nehmen stetig zu. Hüft- und Kniegelenkarthrose können im fortgeschrittenen Stadium nur durch künstlichen Gelenkersatz, die sog. Endoprothetik, erfolgreich behandelt werden. Das Ziel dieser Therapie ist die Schmerzfreiheit und die Zurückerlangung von Beweglichkeit, Mobilität und Lebensqualität. Der Langzeit-Behandlungserfolg in der Endoprothetik ist vornehmlich von der knöchernen Verankerung des Implantates unter Vermeidung von Lockerungsprozessen und das Ausbleiben von Infektionen abhängig.

In Anbetracht dieser Tatsachen, sollte in der vorliegenden tierexperimentellen Studie untersucht werden, inwiefern sich unterschiedliche Beschichtungen von Endoprothesen auf die knöcherne Integration der Implantate und die Biokompatibilität auswirken. Dabei wurde eine Kombinationsbeschichtung aus Hydroxylapatit–RGD–Gentamicin, wobei RGD für die Aminosäuresequenz Arginin, Glycin und Asparagin steht, in einer 4-Wochen-Studie einer Hydroxylapatit-Beschichtung und in einer 12-Wochen-Studie einer Hydroxylapatit-Beschichtung und zusätzlich einem unbeschichteten Implantat gegenüber gestellt. Für die Auswertung wurden klinische, röntgenologische, histologische und histomorphometrische Methoden herangezogen.

## 1.1. Arthrose

Arthrose, auch als Arthronose oder Osteoarthritis (angelsächsisch) bezeichnet, (Debrunner, 2002) beschreibt ein Missverhältnis zwischen Leistungsfähigkeit des Gewebes und lokaler Beanspruchung in einem oder mehreren Gelenken, bei dem es primär zu ständigen, unphysiologischen Abbau- und Umbauvorgängen des Knorpels kommt, und sich sekundär Kapsel, Knochen und Muskeln ebenfalls pathologisch verändern (Rössler, 2000).

Dieses Missverhältnis zwischen Anspruch an das Gelenk und Belastung (Swoboda, 2001) und die dadurch resultierende Schädigung gilt als die häufigste Gelenkerkrankung weltweit (Felson, 1990) und stellt damit auch einen wichtigen volkswirtschaftlichen Kostenfaktor dar.

Prinzipiell kann man die Arthrose in eine primäre, ideopathische und sekundäre Form einteilen, wobei die sekundäre häufig durch Trauma, endokrinologische Grunderkrankungen oder metabolische Schädigungen verursacht ist (Altmann et al., 1986).

Zur Diagnosestellung dieser Erkrankung ist die Anamnese mit Auftreten von Schmerzen und Bewegungseinschränkungen, die körperliche Untersuchung mit Verifizierung dieser Angaben und die Röntgendiagnostik unerlässlich. Hierbei ist zu vermerken, dass das klinische Beschwerdebild nicht immer mit dem Röntgenbefund korreliert. Eine röntgenologische Stadieneinteilung haben Kellgren und Lawrence bereits 1952 und 1957 eingeführt, bei der Kriterien wie subchondrale Sklerosierung, Gelenkspaltverschmälerung, Osteophyten, Geröllzysten und „Malalignment“ beurteilt werden (Abb.1)



Abb. 1: Primäre Coxarthrose rechtsseitig mit Gelenkspaltverschmälerung, subchondraler Sklerosierung und Geröllzystenbildung auf einer Beckenübersichtsaufnahme bei Z.n. Hüft-TEP-Implantation links.

Das Hauptproblem der Arthrose ist die fehlende Regenerationsfähigkeit des Knorpels, was bedeutet, dass der bei Arthrose zerstörte Knorpelschaden sich nicht rückgängig machen lässt, was von Hunter bereits 1743 beschrieben wurde. Ähnlich wie bei anderen Gewebearten ist dies als Preis für den hohen Spezialisierungsgrad anzusehen (Ewing et al., 1990).

Doch auch wenn Fortschritte im Bereich der Diagnosefindung, Ätiologie und konservativen Therapie gemacht wurden, steht am Ende der therapeutischen Möglichkeiten generell der künstliche Gelenkersatz, vor allem in fortgeschrittenen Stadien der Arthrose. Ein räumlich begrenzter Knorpelschaden (3-10 cm<sup>2</sup> Fläche) kann zwar noch mit einer autologen Chondrozytentransplantation (ACT) oder Transplantation von autologen Knorpel-Knochenzylinder behandelt werden. Dies hat jedoch nur bei singulären und umschriebenen Defekten bei jüngeren Patienten Aussicht auf Erfolg (Vogt und Imhoff, 2007).

Auch arthroskopische Verfahren mit Knorpelabrasion, ausgiebiger Spülung des Gelenkes, Entfernung freier Gelenkkörper und Meniskusresektionen bessern die Beschwerden nur vorübergehend (Anders et al., 2001). Eine mittel- bis langfristige Lösung bei ausgeprägtem Gelenkverschleiß wird letztendlich nur durch die Endoprothetik erreicht.

## 1.2 Hüftendoprothetik

Wie oben bereits beschrieben, steht bei therapierefraktären Beschwerden und ausgeschöpften konservativen Maßnahmen bei fortgeschrittener Coxarthrose die Indikation zur Endoprothesen-Implantation. Allein in Europa werden jährlich ca. 500 000 Hüftgelenkersatzoperationen durchgeführt (Breusch et al., 2000a), rund 150 000 davon in Deutschland (Grundeis, 2006).

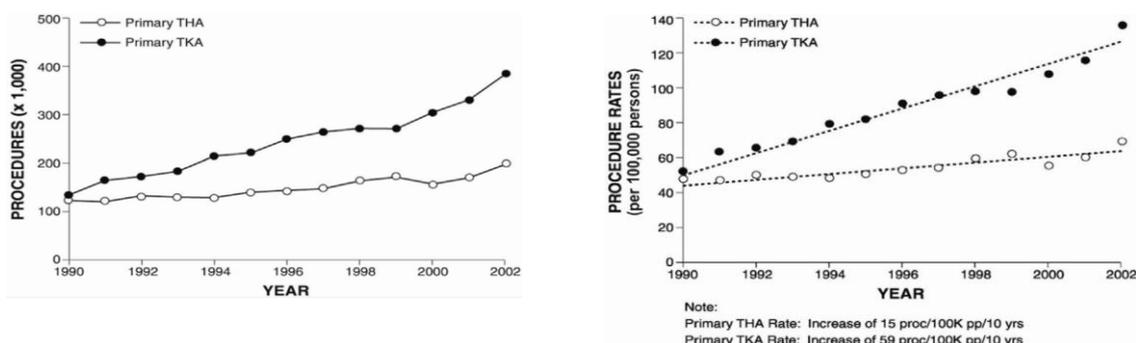


Abb. 2: A: Anzahl der insgesamt implantierten primären Hüft- und Knieprothesen in den USA zwischen 1990 und 2002. B: Anzahl der insgesamt implantierten primären Hüft- und Knieprothesen in den USA zwischen 1990 und 2002 pro 100.000 Einwohner. Aus: Kurz et al., 2005.

In den USA ist sie die am häufigsten durchgeführte Operation in der Orthopädie (Siopack et al., 1995). Hier wurde ein Anstieg für Hüft- und Knieprothesen von 119.000 aus dem Jahr 1990 auf 193.000 in 2002 beziehungsweise von 129.000 auf 381.000 verzeichnet (Kurtz et al., 2005) (Abb. 2a und b).

### **1.2.1 Geschichte des künstlichen Gelenkersatzes**

Erste Schritte auf dem Weg zur heutigen Endoprothetik wurden von T. Gluck bereits 1891 mit Elfenbeinimplantaten unternommen (Gluck, 1891; Wessinghage, 1995), welche jedoch vorwiegend aufgrund der mangelnden Hygiene scheiterten.

Einen anderen Ansatz wählte Smith-Petersen in den 1920ern mit einer Art Kappe für den Hüftkopf, der lediglich fest gesteckt wurde. Durch Abrieb und Resorptionsvorgänge kam es hierbei jedoch zu einer hohen Anzahl von Implantatlockerungen (Smith-Petersen, 1939). Schon ein Jahr später wurden zuerst in Norwich, England, Metall-Metall-Paarungen und diese dann auch von dem Gießener Professor H. Rettig verwendet (Rettig, 1952; McKee 1951).

Revolutionär waren die Gebrüder Judet 1950 mit ihrer Einführung von PMMA in der Orthopädie (Polymethylmetacrylat), welches damals allerdings noch zur Fertigung der Femurkopfprothese benutzt wurde (Judet und Judet, 1952). PMMA wurde dann von Haboush verwendet (Haboush, 1953). Weitergeführt wurde dieses Prinzip von Sir Charnley, der mit seinem „low-friction-Prinzip“ die moderne Endoprothetik begründete. Ihm gelang es, durch die Kombination einer Polyethylenpfanne und einer Metallschaftprothese durch niedrigen Abrieb gute Langzeitergebnisse zu erzielen. Außerdem trug er mit seinen Arbeiten zur Keimreduktion in Operationssälen entscheidend dazu bei, Infektionsraten bei Endoprothesenoperationen zu reduzieren (Charnley, 1961 und 1964).

### **1.2.2 Prinzipien der Verankerung beim Gelenkersatz**

Für den Erfolg einer Prothese ist neben dem regelrechten Einbringen der Komponenten der feste Sitz des Implantates im Knochen essentiell (Breusch et al, 2000a/b). Die knöcherne Integration des Implantates kann entweder durch das Prinzip der zementfreien oder der zementierten Verankerung erreicht werden.

### **1.2.2.1 Prinzipien der zementierten Verankerung**

Die in den 60er Jahren von Sir John Charnley entwickelte Variante des künstlichen Gelenkersatzes mit der Befestigung der Prothese durch Polymethylmetacrylat (PMMA) erzielte gute Ergebnisse und konnte den Abrieb der Gelenkkomponenten und damit auch die Lockerung des Implantates stark reduzieren (Siopack et al., 1995). Hierzu wird das Metacrylat-Monomer und das entsprechende Polymer erst kurz vor dem Einbringen der Prothese vermischt und in das Knochenlager eingebracht. So soll die Fixierung der Komponenten gewährleistet, aber auch eine optimale Kraftübertragung vom Prothesenstiel auf den proximalen Femuranteil erreicht werden (Breusch et al., 2000a). Für ein dauerhaft gutes Ergebnis ist das Interface zwischen Implantat und Knochen von großer Bedeutung. Besteht hier ein direkter Kontakt zwischen Implantat und Knochen ohne Bindegewebsbrücken, so kommt es seltener zu Lockerungen (Charnley, 1970; Jasty et al., 1990).

Jedoch scheint die hohe Temperatur von ca. 60 °C, die beim Aushärten des Zementes entsteht, teilweise zu Nekrosen am Interface zu führen, die eine spätere aseptische Prothesenlockerung begünstigen (Draenert, 1981).

Auch bei zementierten Endoprothesen kann es trotz der anfänglich hohen Primärstabilität im Verlauf zu Prothesenlockerungen kommen. Ein Grund dafür ist die Destruktion des Knochen-Zement-Interfaces und des knöchernen Implantatlagers (Amstutz, 1970; Mittelmeier und Heisel, 1989; Piltz, 1993), der durch den Partikelabrieb der Gleitflächen der Endoprothese herrührt. Es konnte gezeigt werden, dass bei der Artikulation der künstlichen Gelenkflächen Abriebpartikel entstehen, die zu einer Fremdkörperreaktion mit kontinuierlicher Schwächung des Knochen-Implantat-Interfaces führen (Willert und Puls, 1972). Dies lässt sich als „Zementkrankheit“ („cement disease“) bezeichnen und bestimmt heutzutage entscheidend die Überlebensrate bei zementierten Prothesen.

### **1.2.2.2 Prinzipien der zementfreien Verankerung**

Aufgrund weiterhin enttäuschender Raten an aseptischen Lockerungen erfolgten in den 70er und 80er Jahren des 20. Jahrhunderts zahlreiche Veränderungen am Material und Design der Prothesen, aber auch beim Knochenzement (Pavlov, 1987; Ritter und Campbell, 1987).

Bei der zementfreien Verankerung wird auf das Einbringen von Zement verzichtet und dafür eine Stabilität durch knöcherne Integration des Implantates erreicht.

Die Prothese wird durch eine „press fit“ Methode eingebracht, die das Implantat zunächst im Knochen verklemmt. Hieraus resultiert zu Beginn eine geringere Stabilität im Vergleich zur zementierten Technik, weshalb postoperativ in den allermeisten Fällen zunächst keine Vollbelastung möglich ist (Romagnoli, 2002). Im weiteren Verlauf wächst jedoch der umgebende Knochen in das Implantat ein und sorgt hiermit für eine volle Belastbarkeit.

Diese Art der Verankerung wird vorwiegend bei jüngeren Patienten angewandt, die höhere physikalische Ansprüche an das Gelenk haben, was die „Zementkrankheit“ durch höheren Abrieb bei zementierten Prothesen begünstigt (Chandler et al., 1981; Pellici et al., 1979).

Sowohl das Design der Prothese, die äußere Form als auch die Oberflächenstruktur haben Einfluss auf die spätere knöcherne Integration des Implantates (Breusch, 2000a).

Mit dem jeweiligen Design kann bestimmt werden, ob die Prothese diaphysär, metaphysär oder epiphysär, wie bei der Druckscheibenprothese nach Huggler und Jacob (1980, 1993), eingebracht wird (Eyb et al., 1993; Zweymüller 1986; Spotorno et al., 1987; Eingartner et al., 2000).

Durch den Wegfall der „Zementkrankheit“ sollte sich das Risiko für aseptische Lockerungen deutlich senken. Allerdings kam es auch in der unzementierten Endoprothetik zu Osteolysen und Instabilitäten, die man durch Debris, bedingt durch den generellen Abrieb der artikulierenden Komponenten, zu erklären versuchte (Siopack et al., 1995; Sun et al., 1999).

Ein anderer Erklärungsansatz für die Lockerungen lieferten Barrack 1992 und Phillips 1990 in ihren Untersuchungen, in denen sie periprothetische Lockerungen aufgrund von Saumbildungen beschreiben. Diese entstünden durch „stress shielding“ und dadurch hervorgerufenen Knochensubstanzverlust, welcher klinisch mit Schmerzen in den Oberschenkeln einherginge.

Außerdem werden an die Insertionstechnik höhere Ansprüche als in der zementierten Endoprothetik gestellt, da ansonsten nicht immer ausreichender Kontakt zwischen Knochen und Implantat besteht. Besonders jüngere Patienten unter 50 Jahren profitieren kurz und mittelfristig von einer zementfreien Prothese im Vergleich zu zementierten (Berger et al., 1997).

### **1.3 Knöcherne Integration von Implantaten**

Mit Hydroxylapatit-Beschichtungen (HA-Beschichtungen) für zementfreie Prothesen wurde oftmals über gute Ergebnisse in Bezug auf die Integration der Prothese berichtet (Gradinger und Gollwitzer, 2006; Havelin et al., 2000; Oosterbos et al., 2004). Dennoch wurde auch über frühzeitige Lockerungen berichtet, bei denen HA selbst für die Lockerung verantwortlich sein

soll, da es zu einer Fremdkörperreaktion mit Einkapselung von einzelnen Partikeln kommen könne (Bloebaum et al., 1994, Sun et al., 1999).

Ein Ansatz zur Verbesserung der knöchernen Integration ist die Verwendung des bioaktiven Peptides Arginin-Glycin-Asparagin (RGD) als Zusatzschicht für Hydroxylapatit-beschichtete zementfreie Endoprothesen.

### **1.3.1 Physiologie der knöchernen Integration von Implantaten**

Die Implantation von körperfremdem Material ruft im Organismus unterschiedliche Reaktionen hervor. An der Oberfläche des Implantates beginnt eine Art „Wettstreit“ zwischen körpereigenen Zellen, die eine knöcherne Integration des Implantates begünstigen, und bakteriellen Zellen, die zu einer Infektion des Implantates führen können. Diese Feststellung beschrieben Gristina et al. mit dem Terminus „race for the interface“ (Gristina, 1987; Gristina et al., 1990). Obsiegen hierbei die Bakterien gegenüber Fibroblasten und Osteoblasten, so kommt es zu einer Biofilmbildung mit Implantatinfektion, was in den meisten Fällen die Explantation aller Bestandteile zur Folge hat (Gristina und Costerton, 1985). Dies liegt vor allem in der Tatsache begründet, dass Bakterien einen sog. „Biofilm“ auf der Implantatoberfläche bilden können, der sich trotz ausgiebigem chirurgischen Debridement nicht entfernen lässt (Gristina et al., 1988-1989).

Ader et al. fanden in ihren Untersuchungen heraus, dass die Oberflächenbeschaffenheit des Implantates dabei als „Andockstelle“ für Bakterien und deren Adhäsionsmoleküle dient.

Das Protein-Interface des Implantates begünstigt die Bindung der Bakterien über deren Adhäsine. Außerdem können Mikropartikel, die sich vom Implantat lösen, eine chronische Entzündung um das Implantat herum unterhalten, die letztendlich zur aseptischen Lockerung führen kann (Ader et al., 2005).

Ob es einen Unterschied zwischen porösen und glatten Oberflächen von Implantaten bezüglich der Adhäsion von Bakterien gibt, untersuchten Karlan et al. (1981) in ihren Studien. Sie fanden heraus, dass Silikon im Vergleich zu Fluorcarbon und Bioglas eine höhere Infektionsrate aufwies und eine Biofilmentstehung begünstigte (Karlan et al., 1981).

In einer Untersuchung zu *Staphylococcus aureus* und koagulase-negativen Staphylokokken wurde eine Expression einer Fibronectin-Protein-Bindung zwischen Oberfläche und Bakterien gefunden, die eine Fähigkeit der Bakterien, mit Kollagen zu interagieren, darstellt (Waldstroem, 1989). Somit ergibt sich durch Einbringen eines Implantates nicht nur die Möglichkeit einer knöchernen Stabilität sondern auch die Gefahr einer Biofilmbildung. Um

die integrativen Eigenschaften eines Implantates zu verstärken, stehen gewisse Substanzen zur Verfügung, auf die im Folgenden näher eingegangen werden soll.

### **1.3.2 Unterschiedliche Beschichtung zur knöchernen Integration bei zementfreien Prothesen**

Die am häufigsten verwendeten Implantate bestehen aus Titan, Kobalt-Chrom-Molybdän-Legierungen oder ähnlichen Materialkombinationen. Diese erfüllen zwar die erwünschten mechanischen Anforderungen an das Implantat, bewirken jedoch keine zufriedenstellende knöcherne Integration. Versuche zur Verbesserung der knöchernen Integration beruhen zum einen auf der Veränderung der Oberfläche und Porosität und zum anderen auf verschiedene Beschichtungen. Beispielsweise hat eine Porengröße von 100-500µm bei bestrahlten Oberflächen einen positiven Einfluss auf die knöcherne Integration (Gradinger et al., 2007). Eine „Biologisierung“ oder „Biofunktionalisierung“ kann dagegen durch Aufbringen von Beschichtungen auf das Implantat erreicht werden (Raschke und Schmidmaier, 2004).

#### **1.3.2.1 Hydroxylapatit**

Es konnte in zahlreiche Studien gezeigt werden, dass Hydroxylapatit bei zementfreien Prothesen eine fördernde Wirkung auf die knöcherne Integration des Implantates hat (Gradinger und Gollwitzer, 2006; Havelin et al., 2000; Oosterbos et al., 2004). Das schwer lösliche Salz Hydroxylapatit (HA) ( $3 \text{ Ca}_3(\text{PO}_4)_2 \times \text{Ca}(\text{OH})_2$ ) ist physiologischer Bestandteil der Knochen- und Zahnhartsubstanz. Bereits 1788 bestand eine Verbindung zwischen dem Begriff Apatit und Mineralien und im selben Jahr berichten Proust und Klaproth, dass es sich dabei um Knochenmineralien handelt. 1920 stellten Albee und Morrison fest, dass es durch die Verwendung von Ca-P-Pulver zu einer vermehrten Kallusbildung kommt (Albee und Morrison; 1920).

Furlong und Osborn berichteten 1991 über den Zusatz von Hydroxylapatit auf Femurschäften und dessen osteokonduktive Wirkung (Furlong et Osborn, 1991). Zuvor hatten Geesink et al. bereits 1987 eine Arbeit über Hydroxylapatit-Beschichtungen für Prothesen veröffentlicht (Geesnik et al., 1987).

Das verwendete Material ist ein hoch kristallines, pures, stabiles Hydroxylapatit, das viel amorphes Calcium-Phosphat enthält, um für eine biologische Fixierung eines Implantates zu sorgen. Außerdem hat es keine oder nur geringe antigene, beziehungsweise toxische Wirkung auf das körpereigene Knochengewebe und weist eine gute Biokompatibilität auf (Chang, 1983; Klein et al., 1983; Rothstein, 1984; Harvey, 1985; Gumarer et al., 1986; Frame, 1987).

Aoki beschreibt Hydroxylapatit ebenfalls als ein „biokompatibles, osteophiles und osteokonduktives Material“, das förderlich auf die Knochenintegration von Implantaten wirkt (Aoki et al., 1981). Aus diesen Gründen ist Hydroxylapatit ein weit verbreitetes Knochenersatzmaterial (Bauer und Togowa, 2003; Giannoudis et al., 2005; Schnettler et al., 2003) und wird häufig in der Endoprothetik als Oberflächenbeschichtung benutzt (Shepperd und Apthorp, 2005).

Auch die Porengröße der Beschichtung hat einen Einfluss auf die Haltbarkeit und Verträglichkeit des Implantates. Eine Größe der Poren von 100µm mit definierter Poreninterkonnektivität favorisierten Holmes et al. und Klawitter et al. in ihren Arbeiten zur Verbesserung der knöchernen Integration (Holmes et al., 1984; Klawitter et al., 1976) (Abb. 3).

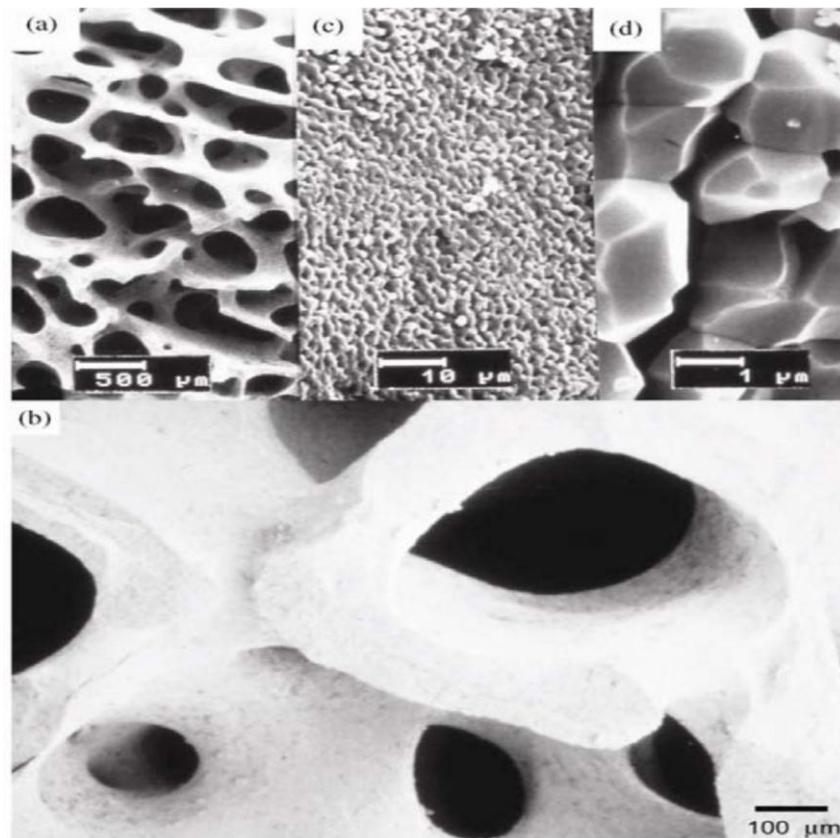


Abb. 3: Porenarchitektur eines HA-Knochenersatzmaterials (Endobon<sup>®</sup>, Biomet, Berlin) mit einer Porengröße von 100 – 300 µm und einer Porosität von 45-80% mit interkonnektierenden Makro- und Mikroporensystem bei unterschiedlicher Vergrößerung. Aus: Schnettler et al., 2003.

Als Methode der Beschichtung stehen folgende Verfahren zur Verfügung: dip-coating, elektrophoretische Deposition, Immersionsbeschichtung, Hitze-isostatische-

Druckbeschichtung, Solution Deposition, „sputter“-coating und Flammenbeschichtung. Vor allem die letzten drei kommen für orthopädische Implantate in Frage, da sie sowohl schonend für die Metalle sind, also ihre Eigenschaften nicht verändert und gleichzeitig auch das Hydroxylapatit nicht denaturiert wird. Besonders die Flammenbeschichtung ist einfach anzuwenden, schnell durchzuführen und resultiert in einer adhärennten Beschichtung mit einer Schichtdicke von bis zu 100µm. Sie lässt sich weiter unterteilen in das Air-plasma-spraying, Vacuum-plasma-spraying und in die High-velocity Oxygen-fuel-Methode. Dabei weist das Air-plasma-spraying die höchste Dichte auf (Jaffe et al., 1996).

### **1.3.2.2 Plasmaspray-Coating**

Das Plasmaspray-coating ist ein Verfahren, das dazu dient, die Oberflächen von Materialien derart zu verändern, dass sie vor Korrosion geschützt sind. Dies kommt zwar zu 90% für Metall, im besonderen Stahl, in Frage, aber auch andere Substanzen, wie Keramiken oder Plastikstoffe, können mit dieser Methode bearbeitet werden (Abb. 4).

Mit dem Begriff Plasma ist hierbei ein Gas gemeint, das auf sehr hohe Temperaturen gebracht wird, sodass es ionisiert und in der Lage ist, elektrisch zu leiten. Verwendet wird eine Art Pistole, in der sich eine Düse befindet, die durch einen Zündvorgang einen elektrischen Lichtbogen erzeugt. Dieser Lichtbogen wird dann zusammen mit dem Gas beim Austritt aus der Pistole zum Plasmastrahl (Abb. 5). Man hat zusätzlich die Möglichkeit, diesem Strahl Pulverpartikel beizumischen, die dann schmelzen und mit hoher Geschwindigkeit auf die zu beschichtende Oberfläche aufgebracht werden. Dieses führt zu einer festen Beschichtung, die es ermöglicht, bestimmte Stoffe, die beispielsweise antimikrobiell oder aber osteokonduktiv wirksam sind, auf Implantate zu applizieren. In der Endoprothetik wird hierbei keramisches HA-Pulver mittels einer Plasmaflamme geschmolzen und im Anschluss auf der zu beschichtenden Oberfläche kondensiert.



Abb. 4: Zementfreie Hüftprothesenschäfte mit Hydroxylapatit-Beschichtung im proximalen Schaftbereich. (Von oben nach unten: Mallory/Head<sup>®</sup> Porous Primary Femoral Component; Bi-Metric<sup>®</sup> Porous Primary Femoral Component; Taperloc<sup>®</sup> Hip System; Biomet, Berlin).

So können unfallchirurgische und orthopädische Implantate durch diese Methode mit einer Hydroxylapatit-Beschichtung überzogen werden, wobei gleichzeitig die exakte Porengröße eingestellt werden kann, die in vorhergehenden Studien als optimal für neues Knochenwachstum ermittelt worden war (Hulbert et al., 1972; Krämer und Spatz, 2004).

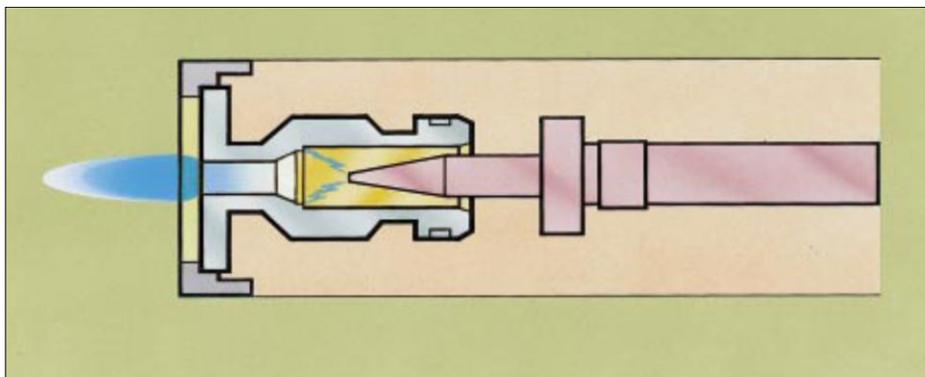


Abb. 5: Pistolenvorrichtung zum Beschichten beim Plasma-spray-coating, aus Metallisation Limited; [www.metallisation.com](http://www.metallisation.com).

Der Vorteil bei diesem Verfahren ist, dass das besprühte Material selbst kühl bleibt und lediglich eine Temperaturerhöhung in der Spritzvorrichtung erfolgt.

### 1.3.2.3 Die Aminosäuresequenz Arginin-Glycin-Asparagin (RGD)

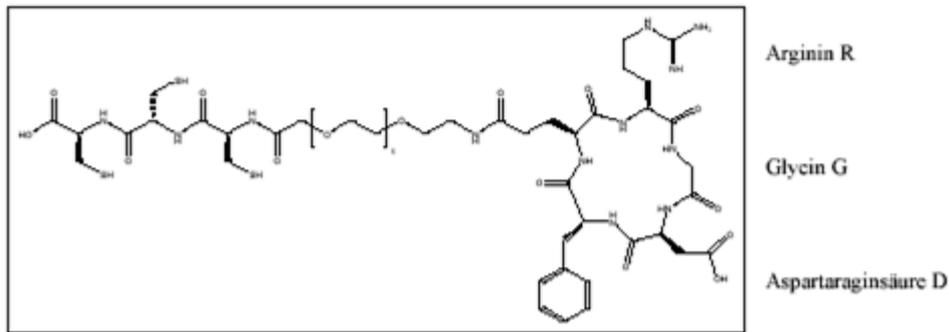


Abb. 6: Strukturformel eines RGD-Moleküls, aus: Kraemer & Spatz, 2004.

Die Abkürzung RGD steht für die Aminosäuresequenz Arginin-Glycin-Asparagin (Arg-Gly-Asp). Sie kommt vorwiegend in Proteinen der Extrazellulärsubstanz, des Bindegewebes und des Serums vor, wie zum Beispiel in Fibronectin, Vitronectin, Kollagen (Kantlehner, 2000).

Die Sequenz spielt eine erhebliche Rolle bei der Ausbildung von Zelladhäsionen und dem Generieren von Zellantworten (Kroese-Deutmann et al., 2005; Pierschbacher und Ruoslahti, 1984). Genauer gesagt, hat sie Einfluss auf Polarisierung von Zellen und Migration, das Ausbilden fokaler Adhäsionsmoleküle und die Einleitung der Apoptose.

Dabei ist entscheidend, ob RGD in gelöster oder ungelöster Form vorliegt. So soll lösliches RGD eher für die Einleitung der Apoptose verantwortlich sein und ungelöstes das intrazelluläre Zytoskelett von Zellen mit der Extrazellulärsubstanz verbinden. Das Ausbleiben dieser Interaktion wird in Verbindung mit dem programmierten Zelltod gebracht.

Zelladhäsion hat eine bessere mechanische Verankerung der Zellen zur Folge, was wiederum die knöcherne Integration von Implantaten begünstigen kann. Sie kommt durch eine Bindung zwischen Integrinen, Zelloberflächenrezeptoren, und RGD-Molekülen zu Stande (Pierschbacher und Ruoslahti, 1984; Puelo und Bizios, 1991; Rezanian et al., 1997).

Dabei wirken vor allem die Integrin-Selektive-Peptide  $\alpha\beta3$ - und  $\alpha\beta5$  positiv auf die Adhäsion von Osteoblasten (Pallu et al., 2003). Eine unterschiedliche Anzahl von Verzweigungen der RGD-Moleküle bedingt auch eine veränderte Zahl an fokalen Kontakten. Zunächst steigt beides linear an, bis eine Sättigung bei dem Oktamer eintritt (Kraemer und Spatz, 2004)

Sowohl in Studien zur orthopädischen Verwendung von RGD zum Knochenaufbau als auch in Dentalstudien konnte gezeigt werden, dass das Peptid im Vergleich zu nicht beschichteten Prothesen einen besseren knöchernen Halt bietet (Bernhardt et al., 2005; Ferris et al., 1999;

Kantlehner et al. 1999 und 2000; Elmengaard et al., 2005a und b; Rammelt et al., 2006; Kroese-Deutmann et al., 2005; Schliephake et al., 2005).

Nicht immer jedoch war in diesen Studien eine signifikant erhöhte Knochenneubildung im Vergleich zu nicht RGD-beschichteten Kontrollen auch mit einer signifikant verbesserten biomechanischen Verankerung verbunden. Lediglich im Tiermodell von Elmengaard (2005a) war dies der Fall.

Weiterhin ist es möglich, durch Modifikationen der Peptide, eine sozusagen maßgeschneiderte, an die Oberfläche des Materials angepasste, Beschichtung herzustellen, die günstig und vielfach einsetzbar ist. Zusätzlich kann diese Beschichtung mit anderen kombiniert werden, so zum Beispiel mit Hydroxylapatit und Gentamicin.

## **1.4 Komplikationen und Überlebenszeiten in der Endoprothetik**

Die „Überlebenszeit“ einer Prothese gibt Aussage darüber, wie lange die Prothese nach Implantation im Körper verbleiben kann, bevor sie aufgrund von Komplikationen entfernt werden muss. Eine ausführliche Übersicht über solche Überlebenszeiten bezogen auf spezielle Hüftprothesentypen liefert das Schwedische Hüftprothesenregister. Es wurde 1979 gegründet und umfasste 2005 bereits 256.298 primäre Hüftprothesen-Operationen und 30.052 Revisions-Operationen. Langzeitergebnisse aus diesem Register zeigen, dass bei Operationen, die seit den 1970ern durchgeführt wurden, von einer 10-Jahresüberlebensrate von 90% ausgegangen werden kann und dass die Überlebenszeit stetig verbessert wurde, unabhängig vom Prothesentyp. Der Hauptgrund für eine Revisionsoperation und ein Implantatversagen ist vornehmlich die aseptische Lockerung (Küsswetter und Rütt, 1985), die aufgrund von Abriebpartikeln und dadurch hervorgerufenen Abstoßungsreaktionen entstehen (Effenberger und Imhoff, 2003). Des Weiteren stellen Protheseninfektionen ebenfalls einen wichtigen Grund für Revisionsoperationen dar.

### **1.4.1 Protheseninfektion**

Trotz verbesserter Operationsbedingungen treten Protheseninfekte nach Primär-Hüftgelenkersatz zu 1,7% auf (Hanssen et al., 1997). Sie stellen nicht nur eine Herausforderung und Belastung an Patient und Arzt dar, sondern deren Behandlung ist zudem äußerst kostenintensiv (Lentino, 2003).

Auch eine hohe Mortalitätsrate von 0,4% - 1,2% bei bis 65-Jährigen und 2-7% bei den über 80-Jährigen ist bei Protheseninfektionen zu verzeichnen (Fisman et al., 2001). Als erschwerend müssen mutliresistente Keime angesehen werden. Bei Infektionen mit

multiresistenten Keimen ist das Behandlungsergebnis signifikant schlechter als bei Infektionen mit nicht multiresistenten Keimen (Kilgus et al., 2002).

### 1.4.2 Erregerspektrum und Pathogenese

Die häufigsten Erreger sind *Staphylococcus epidermidis* mit 30-43% und *Staphylococcus aureus* mit 12-23%. Aber auch Mischinfektionen (10-11%), Streptokokken (9-10%), Enterokokken (3-7%) und Anaerobier (2-4 %) können häufig isoliert werden (Pandey et al., 2000; Schierholz et al., 2004; Segawa et al., 1999; Steckelberg et al., 2000). In 11% der Fälle lassen sich trotz manifester klinischer Hinweise auf eine Infektion keine Keime nachweisen (Zimmerli et al., 2004).

Bei anderen Implantat-assoziierten Knocheninfektionen ohne Prothesenimplantate sind *Staphylococcus aureus*, auch bei Mischinfektionen, mit Abstand die am häufigsten nachgewiesenen Keime (Gentry, 1988; Lew und Waldvogel, 2004; Lowy, 1998, Perry et al., 1991; Schnettler et al., 1997). Aber auch koagulase-negative Bakterien, wie *Staphylococcus epidermidis*, die als apathogene Keime der physiologischen Hautflora gelten, scheinen in diesen Fällen durch eine ausgeprägte Ausbildung von Biofilmen begünstigend für Entstehung einer Implantat-assoziierten Knocheninfektionen zu sein (Lew und Waldvogel, 2004; Zeller et al., 2007).

Fördernd für die Entstehung einer Infektion wirken sich weiter ein geschwächtes Immunsystem des Patienten und Grunderkrankungen wie zum Beispiel Diabetes mellitus, Harnwegsinfekte, Nieren- und Leberfunktionsstörungen, Mangelernährung, hohes Alter und Immunsuppression (Lazzarini et al., 2004) aus. Auch lokale Gegebenheiten am Operationsgebiet wie Weichteildefekte oder Durchblutungsstörungen, Hämatome, sowie Hohlräume und avitales Gewebe fördern eine Infektion (Gustilo und Anderson, 1976; Lazzarini et al., 2004; Schnettler und Alt, 2004; Wichmann, 1998). Einen anderen Faktor stellt das Implantat als Fremdkörper an sich dar. Mit dem Einbringen ins Gewebe entsteht eine Konkurrenz zwischen körpereigenen Zellen, wie z.B. Fibroblasten und Osteoblasten aber eben auch Bakterien um die Oberfläche des Implantates, was auch als „*race of the surface*“ beschrieben wurde (Gristina, 1987; Gristina et al., 1990).

Natürlich bestimmt aber auch die Pathogenität des Bakteriums den Ausgang bei diesem Kampf. Eine schlechte Prognose besteht zumeist wenn sich ein Biofilm gebildet hat, da dieser weitgehend unzugänglich für Antibiotika und das Immunsystem ist und unter ihm optimale Bedingungen zur Keimverbreitung bestehen (Nickel et al., 1985) (Abb. 7 und 8).

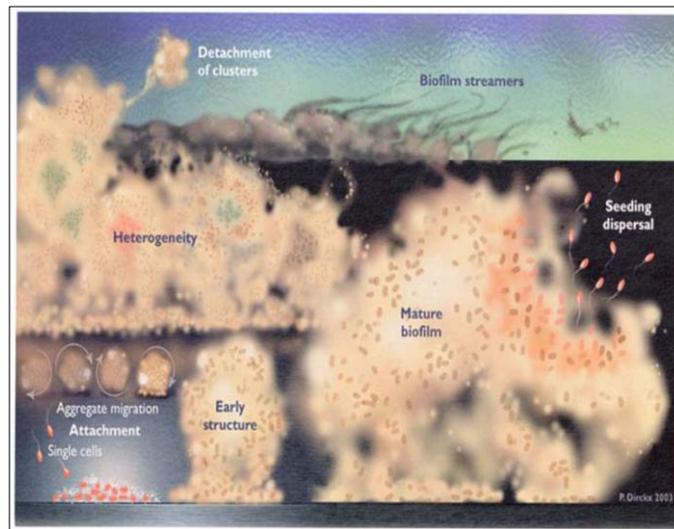


Abb. 7: Schematische Darstellung eines bakteriellen Biofilms. Polysaccharid-Glycocalix-Bildung, unter der sich im Schutz vor Antibiotika und dem wirtseigenen Immunsystem ein dynamischer Prozess der Bakterienproliferation abspielt. Vom Biofilm können Bakteriencluster abgetrennt werden, die dann als Planktonform in den systemischen Blutkreislauf gelangen können. Aus: Costerton, 2007.

Auch wirtsspezifische Adhäsine, wie sie zum Beispiel *Staphylococcus epidermidis* besitzt, begünstigen zunächst das Anlagern an der Implantatoberfläche und später auch das Zusammenlagern der einzelnen Bakterien untereinander (Galdbart et al., 2000). Dahin gegen bindet *Staphylococcus aureus* andererseits eher an wirtsspezifische extrazelluläre Proteine, wie etwa Fibrinogen, Kollagen, Laminin, Elastin und andere (Lew und Waldvogel, 2004; Vadaux et al., 2000) und kann über Endotoxin- und Hydrolasen-Produktion sowie über endozytotische Aufnahme in Osteoblasten und Endothel-/Epithelzellen eindringen (Ellington et al., 2003; Sinha et al., 1999).

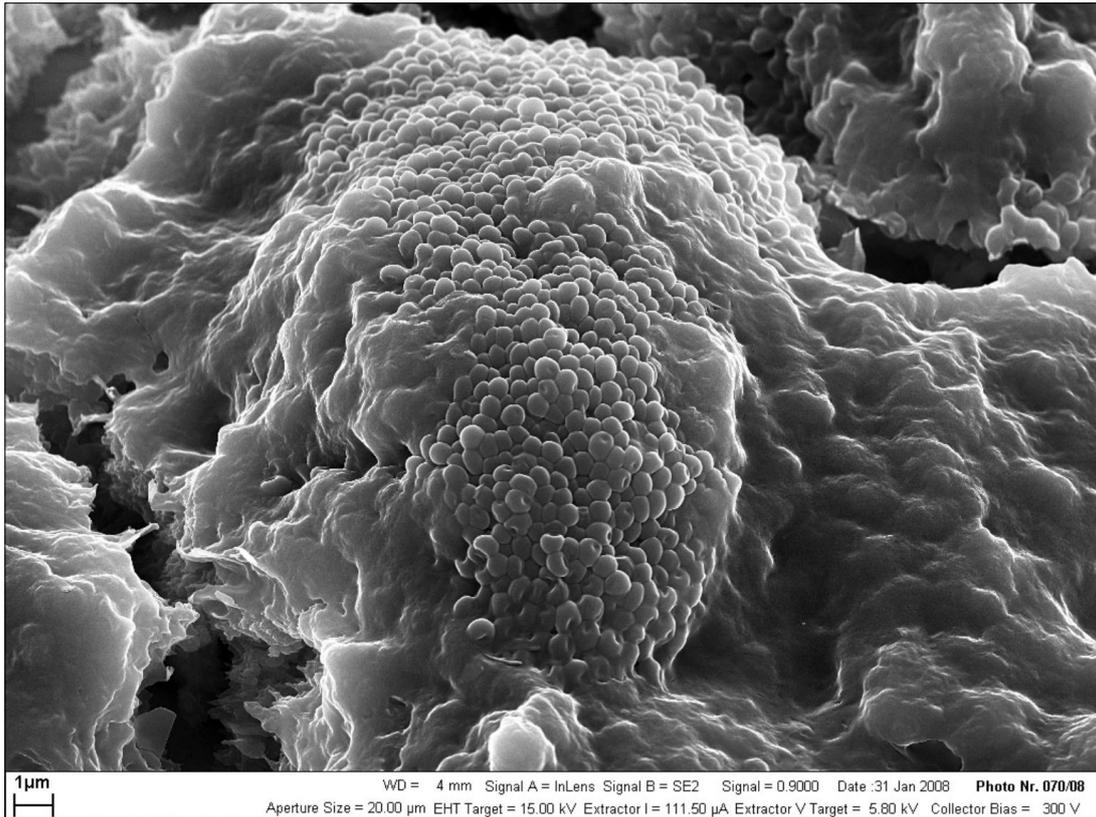


Abb. 8: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme einer Biofilmbildung durch *Staphylococcus aureus* (Labor für Experimentelle Unfallchirurgie, Justus-Liebig-Universität, Gießen).

Zusätzlich ist dieses Bakterium mit der sogenannten „small colony“ Variante (von Eiff et al., 1998) in der Lage, sich veränderten Gewebebedingungen anzupassen. Kommt es im Verlauf zur Exotoxin-Freisetzung, so folgt auf die daraus resultierende Immunantwort häufig die Entstehung von Mikroembolien und Bildung von Nekrosepartikeln. Daraufhin können sich bei schlechter Immunlage Sequester bilden, was eine Lockerung der Prothese und eine chronische Protheseninfektion bedeuten kann (Lew und Waldvogel, 2004).

Protheseninfektionen lassen sich von ihrer zeitlichen Genese her in Frühinfektionen, verzögerte Infektionen und Spätinfekten unterteilen. Frühinfektionen manifestieren sich innerhalb der ersten drei Monate nach Operation, verzögerte Infektionen zwischen 4 und 24 Monaten und Spätinfekte nach 24 Monaten.

Dabei ist die Ätiologie bei den ersten beiden Infektionsformen durch die Operation, im Sinne einer bakterielle Kontamination des Situs und Implantates begründet, wohin gegen bei der Spätinfektion zumeist eine hämatogene Streuung anderer Infektionsherde hauptverantwortlich zu sein scheint (Giulieri et al., 2004; Laffer et al., 2005).

### **1.4.3 Prophylaxe von Protheseninfektionen**

Zur Vermeidung von Infektionen in der Endoprothetik sind ein konsequent steriles Arbeiten während der Operation und die aseptischen Gegebenheiten im Operationssaal von großer Bedeutung. So müssen die generellen Asepsis-Vorschriften für die Operation eingehalten, das anwesende Personal im OP minimiert und geeignete Lüftungssysteme verwendet werden (Ayliffe, 1991; Charnley, 1964; Romney, 2001; Ritter, 1999).

Zusätzlich sollte bereits perioperativ eine Antibiotikaprofylaxe begonnen werden, um intraoperativ während des Zeitraumes der höchsten Kontaminationsgefahr von Weichteilen und Prothese das Infektionsrisiko zu minimieren. Hierfür stehen sowohl systemische, lokale als auch die Kombination aus lokaler und systemischer Antibiotikagabe zur Verfügung.

#### **1.4.3.1 Prophylaxe durch systemische Antibiose**

Mit der systemischen Applikation ist eine Penetration des Antibiotikums direkt in das Weichteilgewebe und in den Knochen erwünscht, um so einer Infektion entgegen zu wirken. Dabei muss das Antibiotikum einige Voraussetzungen erfüllen. Zum Beispiel muss es ein breites Wirkspektrum abdecken, geringe unerwünschte Nebenwirkungen, eine lange Halbwertszeit und gute Weichteil- und Knochengängigkeit aufweisen (Alt und Schnettler, 2007; de Lalla, 2001).

Der Vertreter der ersten Cephalosporingruppe, Cephazolin, wird heute am häufigsten zur intravenösen Antibiotikaprofylaxe verwendet (Marcelscu und Osmon, 2005) und zusammen mit Cefuroxim in den Leitlinien der USA bei Prothesenoperationen empfohlen (Bratzler und Houck, 2004).

Bei Infektionen mit Methicillin-resistenten *Staphylococcus aureus* (MRSA) sollte auf Vancomycin zurückgegriffen werden. Eine generelle Prophylaxe mit Vancomycin wird aber aufgrund einer schlechteren Wirksamkeit gegen Nicht-MRSA-Stämme (Cantoni et al., 1990; Fishman und Brennan, 1997) und wegen der Gefahr der Resistenzenbildung nicht empfohlen (Garvin und Urban, 2000; Perriti et al., 1998). Beim Auftreten von Allergien steht als Ausweichmöglichkeit Clindamycin oder ebenfalls Vancomycin zur Verfügung (Bratzler und Houck 2004; Breithaupt, 2004).

Die intravenöse Verabreichung von Antibiotika ist heute als wirksame Strategie zur Infektionsprohylaxe in der Orthopädie und Unfallchirurgie international anerkannt (Hanssen et al., 1997; Marcelscu und Osmon, 2005; Ruchholtz, 2004).

### **1.4.3.2 Prophylaxe durch lokale Antibiose**

Die Überlegung bei dieser Art der Applikation besteht darin, dass man das Antibiotikum direkt in den Operationssitus bzw. an das Implantat bringt, um somit durch das Erzielen einer hohen Wirkkonzentration des Antibiotikums vor Ort, prophylaktisch eine bakterielle Besiedelung des Implantates und der Weichteile zu verhindern.

Das Ziel ist es, mit geeigneten Trägersubstanzen, wie zum Beispiel Knochenzement, Kollagen etc. eine ausreichend hohe Menge an Antibiotikum an das Gewebe abzugeben, ohne dabei zytotoxische Bereiche zu erreichen. Somit können hohe lokale Wirkspiegel bei niedriger systemischer Konzentration des Antibiotikums erreicht werden.

#### **1.4.3.2.1 Lokale Prophylaxe in der zementierten Endoprothetik (PMMA)**

Buchholz und Engelbrecht beschrieben bereits 1970 in ihren Untersuchungen, dass PMMA selbst noch einige Zeit nach der Polymerisation einzelne Partikel und auch Antibiotika ins Gewebe freisetzt (Buchholz und Engelbrecht, 1970). Das hitzestabile Gentamicin erwies sich dabei als besonders geeignet, da es durch die hohen Temperaturen bei der Polymerisation und Aushärtung des Knochenzementes von über 60 ° C nicht inaktiviert wurde. Im Rahmen einer klinischen Studie konnte dann eine Reduktion der Prothesen-Infektionsraten um über 50% durch die Verwendung von Gentamicin-beladenem Knochenzement gezeigt werden (Buchholz und Engelbrecht, 1970).

Gentamicin hat sich in den Folgejahren als das Antibiotikum der Wahl für die Beimengung zum Knochenzement herauskristallisiert, vor allem weil es bessere *in vitro* Freisetzungskinetiken als Cefazedon, Erythromycin oder Clindamycin zeigte (Wahlig und Dingeldein, 1980; Wahlig, 1987), aber auch wegen der eingangs erwähnten Hitzestabilität, die andere Antibiotika nicht aufweisen konnten.

Ein weiterer Aspekt war, dass es noch nach 5,5 Jahren in hohen Konzentrationen im Gewebe zu messen war, ohne einen systemischen Wirkspiegel zu erzielen, der zu Nebenwirkungen führte. So konnten lokale Konzentrationen im Wundgebiet bis 150µg/ml erreicht werden mit einer durchschnittlichen Serumkonzentration von 1,8µg/ml (Wahlig und Dingeldein, 1980).

Klaus Klemm führte dieses Prinzip bei seiner Behandlung von Knocheninfekten mit Gentamicin-beladenen PMMA-Kugeln weiter (Klemm, 1979; Klemm und Schnettler, 1992).

Obwohl der Einsatz dieses beladenen Knochenzementes aufgrund guter Ergebnisse in einigen Studien in Europa anerkannt ist (Lidgren, 2001), lehnen Chirurgen in den USA die Beimengung von Antibiotika zum Knochenzement bei Primärimplantationen ab (Jiranek et

al., 2006). Offiziell sind in den USA nur Antibiotika-beladene Knochenzemente beim Prothesenwechsel zugelassen, nicht jedoch bei der Primärimplantation (Jiranek et al., 2006). Als Grund werden hierfür fehlende prospektive, randomisierte Studien angegeben (Jiranek et al., 2006). So zeigte z.B. eine große prospektive und randomisierte Multicenterstudie aus Schweden nach 5 Jahren zunächst einen signifikanten Unterschied zugunsten von Gentamicin (0,8 % Infektionen zu 1,9%), der jedoch nach insgesamt 10 Jahren nicht mehr vorhanden war (1,1% zu 1,6%) (Joseffson und Kolmert, 1993).

Malchau et al. konnten jedoch im selben Jahr in seiner retrospektiv angelegten Studie mit 92.675 Hüft- und Knieprothesen zeigen, dass eine Antibiotikabeladung bei PMMA-Knochenzement sowohl bei Primäroperationen als auch bei Revisionen zur Infektreduktion führte (Malchau et al., 1993). Ebenfalls statistisch überlegen waren die Ergebnisse des Norwegischen Hüftprothesenregisters, das an 22.000 Hüften ein bessere Überlebenszeit der Prothesen für 10 Jahre fand, wenn zur systemischen Prophylaxe zusätzlich mit Antibiotikum beladener Zement verwendet wurde, anstelle der systemischen Prophylaxe allein (Engesaeter et al., 2003) (Abb.9) .

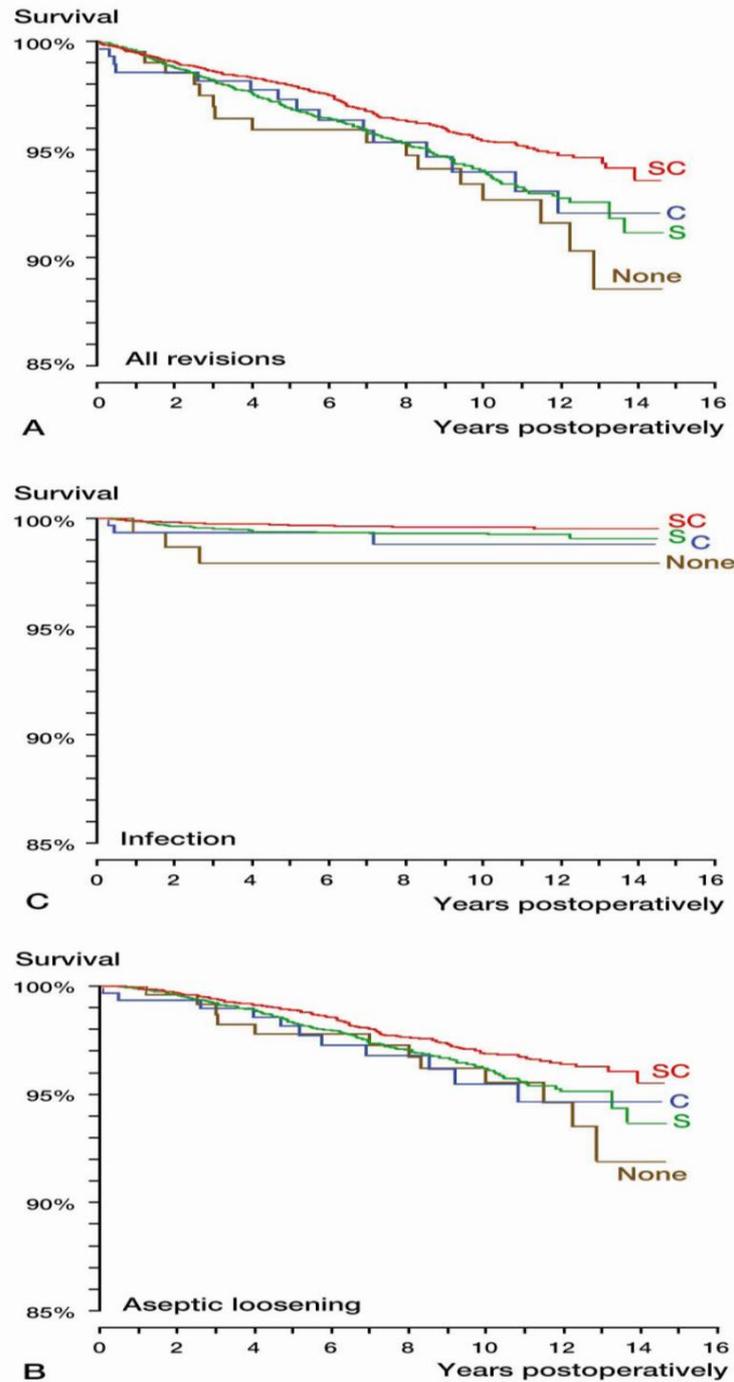


Abb. 9: Überlebensraten von Hüftprothesen aus dem Norwegischen Hüftprothesenregister, die ohne Antibiotikaprophylaxe (None), mit systemischer Antibiose (S), mit Antibiotika-beladenem Knochenzement (C) oder einer Kombination aus systemischer Antibiose und Antibiotika-beladenem Knochenzement (SC) eingebracht wurden. Überlebensraten wurden unabhängig des Revisionsgrundes (a), abhängig von Revisionen aufgrund von Protheseninfektionen (b) oder abhängig von aseptischer Lockerung erfasst (c). Aus: Engesaeter et al., 2003.

### 1.4.3.2 Lokale Prophylaxe in der zementfreien Endoprothetik

Bezüglich der Infektraten bei zementfreien Hüftprothesen untersuchten Engesaeter et al. (2006) in einer 12-Jahresuntersuchung das Outcome nach Protheseninfektionen bei zementfreien Endoprothesen und verglichen diese Ergebnisse mit den Resultaten der zementierten Endoprothetik mit und ohne Antibiotika-beladenen Knochenzement. Dabei fanden sie heraus, dass zementfreie Prothesen ähnliche Infektraten aufwiesen wie Prothesen, die mit Antibiotikum-beladenem Zement implantiert worden waren. Gegenüber Antibiotika-freiem Knochenzement waren die Revisionsraten aufgrund von Infektionen sowohl bei zementfreier Technik als auch bei zementierten Prothesen mit Antibiotika-Knochenzement statistisch signifikant niedriger (Engesaeter et al., 2006) (Abb. 10). Jedoch wurden auch hierbei schlechtere Überlebensraten für zementfreie Prothesen aufgrund aseptischer Lockerungen festgestellt.

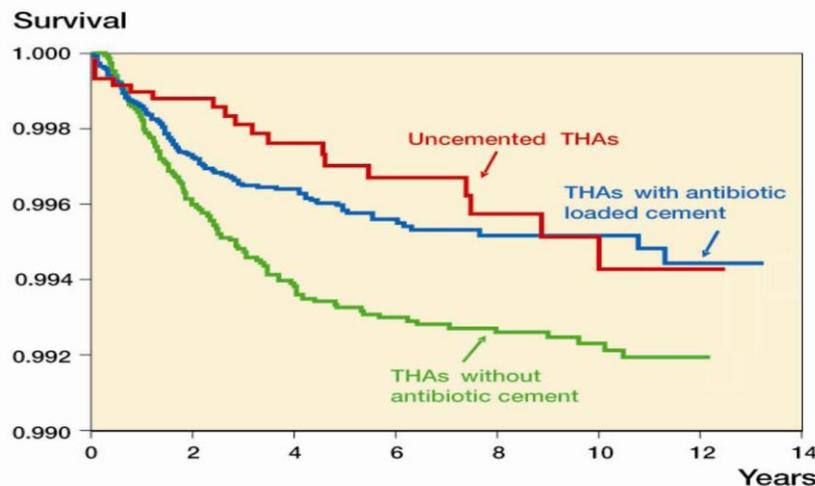


Abb. 10: 12-Jahres-Überlebensraten von Hüftprothesen hinsichtlich Infektkomplikationen aus dem Norwegischen Hüftprothesenregister im Vergleich zwischen zementfreier Implantation, zementierter Technik mit Antibiotika-Knochenzement oder zementierter Technik ohne den Zusatz von Antibiotika. Aus: Engesaeter et al., 2006.

Zur Zeit gibt es im klinischen Alltag bei zementfreien Prothesen keine Möglichkeit, eine lokale Antibiotika-Infektionsprophylaxe durchzuführen.

Ein neuer Aspekt, der eine lokale Anwendung von Antibiotika als Infektionsprophylaxe ermöglicht, ist die Antibiotika-Beschichtung von Prothesenoberflächen. Somit fungiert das

Implantat selbst als „Carrier“ für das Antibiotikum und kann dadurch das Prinzip der lokalen Antibiotika-Prophylaxe verwirklichen.

## 1.4.4 Gentamicin

### 1.4.4.1 Allgemeine Aspekte

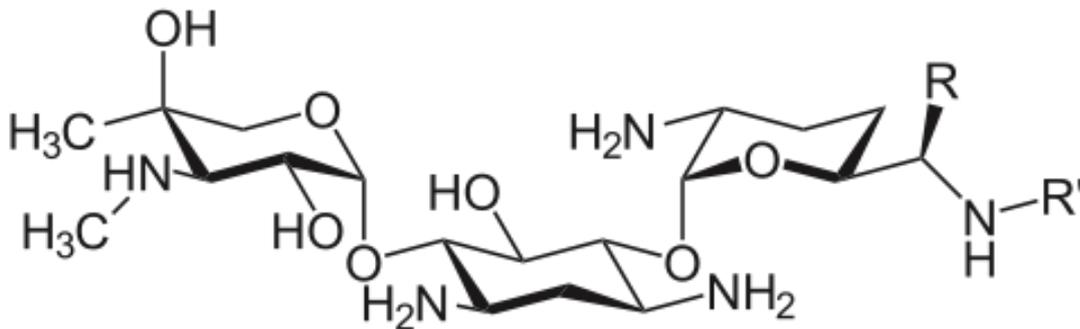


Abb. 11: Strukturformel des Antibiotikums Gentamicin. Aus: [www. www.arzneistoffe.net](http://www.arzneistoffe.net).

Das Antibiotikum Gentamicin gehört in die Gruppe der Aminoglykoside, welche in verschiedensten Bereichen der Medizin angewendet werden.

Zu seinen Eigenschaften zählt eine bakterizide Wirkung auf ruhende Erreger, wobei die Aminoglykoside an die 30-S-Untereinheit der 70-S-Ribosomen von Bakterien binden und somit die Proteinbiosynthese hemmen. Außerdem wird zusätzlich die Zellwand geschädigt.

Nach oraler Applikation wird das Antibiotikum kaum resorbiert und es kommt lediglich zu einer Darmsterilisation. Bei intravenöser Gabe jedoch verteilt es sich gut im Extrazellulärraum und hat eine durchschnittliche Halbwertszeit von etwa 2 Stunden.

Gentamicin ist plazentagängig, aber aufgrund seiner schlechten intrazellulären Durchdringung nur geringfügig ZNS- und knochengängig.

Das Ausscheidungsorgan ist die Niere, wo es zunächst glomerulär filtriert und anschließend tubulär rückresorbiert wird, was eine hohe antibakterielle Konzentration im Urin mit sich führt. Dabei ist zu bedenken, dass es zu einer Anreicherung in den Tubuluszellen kommen kann und somit zu einer unerwünschten, meist jedoch reversiblen, nephrotoxischen Wirkung. Des Weiteren sind Kumulationen in der Endo- und Perilymphe des Innenohres bekannt, Gentamicin kann also auch ototoxisch wirken und bei schwerer Schädigung irreversibel sein.

Dabei können sowohl Hör- als auch Gleichgewichtsstörungen, wie zum Beispiel Schwindel oder auch Nystagmus, auftreten.

Andere beschriebene Nebenwirkungen sind neuromuskuläre Blockade und Atemlähmung, die durch die erniedrigte Acetylcholin-Freisetzung an der motorischen Endplatte zu Stande kommen. Ferner kann es zu Allergien und Hämatoepoesestörungen kommen (Karow und Lang-Roth, 2006).

Das Wirkspektrum von Gentamicin erstreckt sich vorwiegend über gramnegative Stäbchen, wie Klebsiellen, *E. coli*, *Proteus vulgaris* und *Pseudomonas aeruginosa*. Aber auch gegen Staphylokokken (*S. aureus* und *S. epidermidis*) ist es wirksam.

Des Weiteren gilt es als Aminoglykosid als wichtiger Partner in der Kombinationstherapie mit  $\beta$ -Lactaminhibitoren bei lebensbedrohlichen Infekten.

Vor allem auch bei der Behandlung von Pneumonien, Harnwegsinfekten, Sepsis oder Endokarditis wird es gern zusammen mit Cephalosporinen der 3. Generation oder Acylaminopenicillin verabreicht. Infizierte Wunden und Augeninfektionen gelten dabei als spezielle Indikation für eine lokale Applikation (s.o.) (Karow und Lang-Roth, 2006).

Der Morbus Mènière, bei dem es durch ein Missverhältnis von Bildung und Resorption von Endolympe zu anfallsweisem Drehschwindel, Übelkeit und Erbrechen und Ohrschäden kommt gilt als Sonderindikation für Gentamicin. Hierbei wird es gegen körpereigenes Gewebe eingesetzt, um die Sinneszellen des Innenohres zu schädigen und die Schwindelsymptomatik zu verbessern.

Zu den Kontraindikationen zählen schwere Niereninsuffizienz und Innenohrschäden, sowie Gravidität und Stillzeit, außerdem Myasthenia gravis aus den bereits genannten Gründen.

Zusätzlich sollte man eine gleichzeitige Gabe von anderen nierenschädlichen Medikamenten, wie Furosemid, Amphotericin B oder auch Vancomycin, vermeiden.

Weiterhin sind Interaktionen mit Cephalosporinen (Nephrotoxizität), Ciclosporin A und Cisplatin bekannt, ebenso wie mit Halothan und nicht-depolarisierenden Muskelrelaxantien.

Aus diesen Gründen empfiehlt sich eine exakte Dosisanpassung und eventuell ein Drug-Monitoring. Es wird zu einer einmaligen täglichen Gabe der Tagesdosis als Kurzinfusion geraten (Karow und Lang-Roth, 2006).

#### **1.4.4.2 Gentamicin als Antibiotikum für die lokale Infektionsprophylaxe in der Orthopädie und Unfallchirurgie**

Wahlig und Dingeldein beschrieben 1980 die positive Freisetzungskinetik von Gentamicin und dass es dank seiner Hitzebeständigkeit keine Strukturveränderung oder Wirkungsverlust

bei der Aushärtung von Knochenzement erfährt (Wahlig und Dingeldein, 1980; Wahlig, 1987). Durch die lediglich lokale Anwendung als Zusatz in PMMA können systemische Konzentrationen vermieden werden, die die oben genannten typischen Nebenwirkungen mit sich bringen. Bis heute sind keine systemischen Komplikationen in der Beimengung von Gentamicin im Knochenzement in der internationalen Literatur bekannt.

Auch als infektionsprophylaktische Beschichtung von Kirschner-Drähten konnte Gentamicin als Gentamicin-Poly(D-L-Lactide) (PDLLA)-Beschichtung eine gute lokale Freisetzung des Wirkstoffes zeigen und im Vergleich zu nicht-beschichteten K-Drähten Infektraten in einem tierexperimentellen Infektionsprophylaxemodell mit *Staphylococcus aureus* statistisch signifikant verringern (Lucke et al., 2003; Lucke et al., 2005). Eine daraufhin weitergeführte Entwicklung eines mit Gentamicin beschichteten unaufgebohrten Tibianagels, der bei offenen Tibiafrakturen eingesetzt werden soll, befindet sich zur Zeit in klinischer Erprobung (UTN-Protect<sup>®</sup>, Synthes, Oberdorf, Schweiz; Schmidmaier et al., 2006).

Anhand eines Infektionsprophylaxemodells testeten Alt et al. eine Gentamicin-HA bzw. Gentamicin-RGD-HA-Beschichtung auf ihre antimikrobielle Wirksamkeit gegen eine durch *Staphylococcus aureus* induzierte K-Draht assoziierte Infektion im Tibiamarkkanal von Kaninchen (Alt et al., 2006). Nach 4 Wochen wurde bei keinem Tier, das mit einem Gentamicin-beschichteten Implantat versorgt war, eine Infektion festgestellt. Hingegen wiesen alle Tiere in der Negativkontrollgruppe, die ein Implantat ohne Gentamicin-Beschichtung (reine HA-Beschichtung) erhielten, Anzeichen einer Infektion auf, was einer statistischen signifikanten Infektreduktion durch die Gentamicin-Beschichtung entsprach ( $p < 0,001$ ) (Alt et al.; 2006).

## 1.5 Spezielle Anforderungen an Beschichtungen bei zementfreien Prothesen

Wie bereits angesprochen, hängt das Überleben einer zementfreien Prothese von der knöchernen Integration ab. Hierfür begünstigend sind eine Porengröße von 100-500µm von interkonnektierenden Poren und vor allem eine Beschichtung mit Hydroxylapatit, die das knöcherne Einwachsen fördern (Gradinger et al., 2007; Gradinger und Gollwitzer, 2006).

Von Bedeutung für die Infektionsprophylaxe können bei nicht zementierten Prothesen ebenfalls Beschichtungen mit Antibiotikum sein. Dabei sollte das Antibiotikum das komplexe zelluläre Zusammenspiel zwischen Lagerknochen und Prothesenoberflächen bei der knöchernen Integration der Prothese nicht behindern. Es existieren jedoch sowohl für Gentamicin als auch für Tobramicin Hinweise in der Literatur, die auf negative Effekte auf Osteoblasten schließen lassen (Düwelhenke et al., 2007; Miclau et al., 1995). Somit muss eine

potentielle Antibiotikabeschichtung mit Gentamicin für zementfreie Prothesen unbedingt auf ihre knöchernen Integrationseigenschaften untersucht werden, die durch Gentamicin nicht negativ beeinflusst werden darf.

## **1.6 Problemstellung der Arbeit**

Infektionen und Implantatlockerungen gehören nach wie vor zu den Hauptproblemen bei Endoprothesenoperationen. Eine langfristige feste, knöcherne Integration der Prothese ist wünschenswert genauso wie eine Verbesserung der Infektionsprophylaxe mit weiterer Minimierung der Infektraten.

Bei zementfreien Prothesen kann mit Hilfe von Beschichtungen versucht werden, sowohl die knöcherne Integration als auch die Infektionsprophylaxe zu verbessern.

Wie bereits oben erwähnt konnte für Gentamicin-RGD-HA-Beschichtungen bereits eine Reduktion der Infektionsrate gegenüber einer reinen HA-Beschichtung gezeigt werden (Alt et al., 2006). Bei antimikrobiellen Beschichtungen für zementfreie Prothesen ist der Nachweis der antimikrobiellen Wirksamkeit jedoch nicht ausreichend, da durch die Beschichtung die knöcherne Integration des Implantates nicht negativ beeinflusst werden darf. Deshalb ist hierfür eine dezidierte Untersuchung der Knochenneubildungsrate und der Biokompatibilität im Vergleich zu einer Gentamicin-freien Schicht notwendig. Genau dies ist die Fragestellung der vorliegenden Arbeit. Sie hat das Ziel, die Knochenneubildung und Biokompatibilität sowohl histomorphometrisch als auch detailhistologisch einer Gentamicin-RGD-HA-Beschichtung im Vergleich zu einer reinen HA-Beschichtung zu untersuchen.

Bei dieser Betrachtung ist das Augenmerk darauf gerichtet worden, ob Gentamicin eventuell eine zytotoxische und damit auf das Knochenwachstum inhibierende Wirkung hat und ob diese durch die Zusatzbeschichtung mit RGD ausgeglichen werden kann.

## 2 Material & Methode

Gemäß des Paragraphen §8, Absatz 1 und 2 des Tierschutzgesetzes vom 18.08.1996 wurde das Versuchsvorhaben beim zuständigen Regierungspräsidium Erfurt, Thüringen, dargelegt und in der vorgelegten Fassung genehmigt (Registrationsnummer 14-03/04).

Die Durchführung des Tierversuches erfolgte in der Tierklinik für Groß- und Kleintiere des Forschungszentrums für Medizintechnik und Biotechnologie e.V. (fzmb e.V.) in Bad Langensalza, Thüringen. Die Untersuchung der Proben und ihre Auswertung wurden im Labor für Experimentelle Unfallchirurgie der Justus-Liebig-Universität Gießen durchgeführt.

### 2.1 Studiendesign

Es wurden insgesamt zwei Studien an insgesamt 39 Kaninchen mit einer Beobachtungszeit von 4 bzw. 12 Wochen durchgeführt (Tab. 1). In der 4-Wochen-Studie wurden Gentamicin-RGD-HA-beschichtete und HA-beschichtete K-Drähte (jeweils 6 Tiere) getestet. Für den 12-Wochen-Untersuchungszeitraum wurden zusätzlich unbeschichtete K-Drähte als Kontrolle aufgenommen und jeweils 9 Tiere in jeder der drei Testgruppen verwendet.

Die Tiere wurden anhand einer Randomisierungsliste den einzelnen Implantatgruppen zugeteilt.

Gruppe	4 Wochen	12 Wochen	gesamt
Unbeschichtet	-	9	9
HA	6	9	15
HA+RGD+Genta	6	9	15
gesamt	12	27	39

Tab 1: Studiendesign mit Anzahl der Kaninchen pro Zeitraum und Gruppe.

Nach 4 und 12 Wochen wurden die Tiere euthanasiert, die operierten Unterschenkel entnommen und diese histologisch bzw. histomorphometrisch ausgewertet.

## 2.2 Versuchstiere

Für die Untersuchungen wurden 6-Monate alten New Zealand White Rabbits verwendet, da sich in der Literatur Kaninchen für ähnliche Fragestellungen bewährt haben (Smeltzer et al., 1997; Nijhof et al., 2001).

Die Tiere waren in der Kleintierzuchtanlage von R. Krieg in Wünsch unter artgerechten Bedingungen aufgezogen und bereits zwei Wochen vor Durchführung der Studie in der Tierklinik in Bad Langensalza eingestallt worden.

Bei der Ernährung der Tiere wurde ein Kaninchenstandardfutter verwendet und auf das Beifüttern von Antibiotika verzichtet. Wasser stand den Kaninchen nach Bedarf zur Verfügung. Die Jungtiere hatten im Schnitt ein Gewicht von 3600g (2840g-4200g). Nahrungsaufnahme, Körpertemperatur, -gewicht, die allgemeine Aktivität, sowie die Wundheilung wurden täglich überprüft. Zu Beginn der Studie konnte bei keinem Tier eine akute oder chronische Erkrankung festgestellt werden.

## 2.3 Implantate und Beschichtungen

Die Beschichtung mit RGD und Gentamicin wurde jeweils durch die Firma Biomet, Berlin, durchgeführt, ebenso wie die Bereitstellung aller Implantate durch die Firma Biomet erfolgte.

### 2.3.1 K-Drähte

Als Implantat wurden Kirschner Drähte aus rostfreiem Stahl (DIN 1.4441:X2CrNiMo18-15-3) mit einem Durchmesser von 2 mm und einer Länge von 11cm verwendet, die an einer Seite eine Trokarspitze aufweisen (Abb.12). Mittels Sandstrahlentechnik (EK45) wurde ihre Oberfläche aufgeraut und abhängig von der jeweiligen Gruppe wurden sie unterschiedlich beschichtet.



Abb.12: Nr. 1: Unbeschichteter K-Draht, Nr. 2: K-Draht mit Hydroxylapatit-Beschichtung, Nr. 3: K-Draht mit RGD-HA-Gentamicin-Beschichtung.

### 2.3.2 Hydroxylapatit-Beschichtung

Das für die HA-Beschichtung verwendete BoneMaster<sup>®</sup>-Verfahren basiert auf einem patentierten Prozess, bei dem Nanopartikel elektrochemisch unter kathodischer Polarisation auf das Implantat aufgebracht werden. Hierzu wurden Proben in einem Elektrolyt, welches  $\text{Ca}^{2+}/\text{H}_x\text{PO}_4^{(3-x)-}$  enthielt bei einer Temperatur von 37° C und einem pH von 6,4 inkubiert. Die Proben wurden nach der Verfahrensanweisung VA 7.5-04 hergestellt, wobei sich das Elektrolyt aus 0,033 M  $\text{CaCl}_2$ , 0,02 M  $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$  bei einer Verdünnung mit Wasser von 1:20 zusammensetzte. Galvanostatische Bedingungen bestimmten den weiteren Prozess, der sich über einen Zeitraum von bis zu 120 min erstreckte und bei dem es zu Stromdichten von bis zu  $-10\text{mA}/\text{cm}^2$  kam.

Die Morphologie der Beschichtung ließ sich als eine dichte und poröse Struktur, nadelartig, beschreiben und war charakterisiert durch so genannte Kristalliten mit spezifischen Längen von 300 nm und einem Durchmesser von 60 nm (Abb. 13). Hierdurch konnte eine HA-Schichtdicke von 5µm erzielt werden.

Die Veränderungen an der Oberfläche sollen laut Hersteller keinerlei Beeinträchtigungen der biomechanischen Eigenschaften der Implantate hervorrufen.

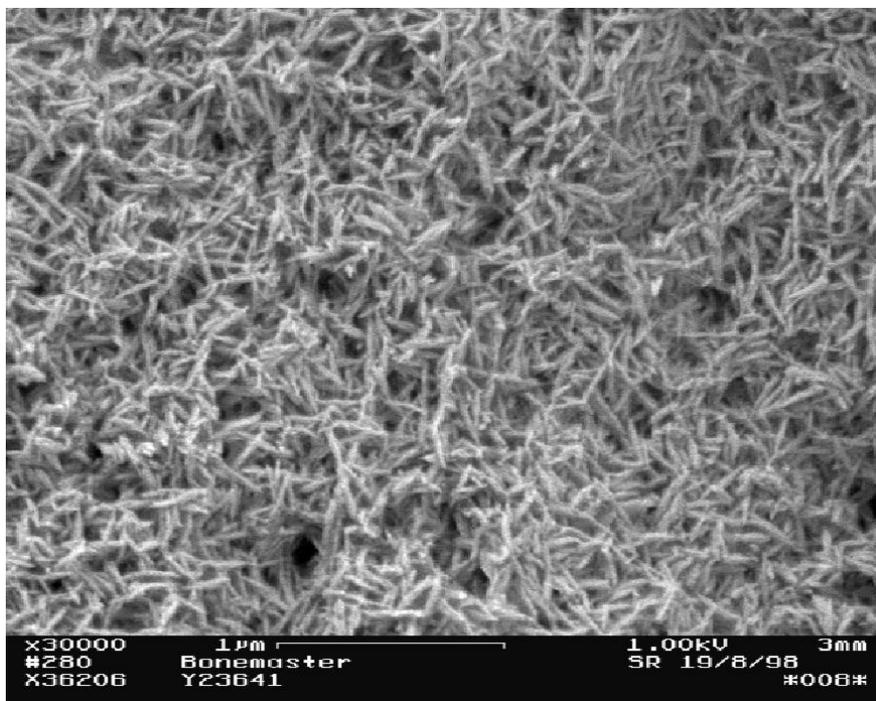


Abb. 13: Morphologie der verwendeten HA-Beschichtung mit nanokristalliner, nadelartiger Struktur der HA-Partikel.

### 2.3.3 RGD-Beschichtung

Das Cyclopeptid c(-RGDfK-) ist für den  $\alpha_v\beta_3$ - und den  $\alpha_v\beta_5$ -Rezeptor hoch selektiv und wurde hier als Integrinligand benutzt. Um die nötigen Verbindung an die beschichtete Oberflächen zu erzielen, wurde ein Spacer mit vier Phosphonatgruppen als Anker-moleküle gebraucht, der zuvor auf die jeweilige Länge optimiert worden war.

Anschließend wurden die Proben in einem Phosphonatpuffer mit einer Phosphonatpeptidkonzentration von 100 $\mu$ Mol über Nacht (12 Stunden) inkubiert. Bevor sie dann an der Luft getrocknet wurden, erfolgte eine Spülung mit Wasser, um ungebundenes Peptid zu lösen.

### 2.3.4 Gentamicin-Beschichtung

Aufgrund der Anwendung eines Ink-Jet-Verfahrens war es möglich, Gentamicin tropfenweise auf die Probenoberfläche zu applizieren (Abb. 14). Dabei konnte ein exaktes Tropfenvolumen eingestellt werden, sodass man die Belegungsdichte variieren konnte. In diesem Fall lag sie bei 250 $\mu$ g/cm<sup>2</sup>, in Anlehnung an die bereits aus PMMA-Knochenzement ermittelten Werten der Freisetzung.

Zur Verfügung standen ein leicht wasserlösliches Gentamicinsulfat (Fujian, Fukang Pharmaceutical, Fuzou, China) und ein schwer wasserlösliches Gentamicincrobeat (Merck KGaA, Darmstadt), die jeweils zu 50% die Gesamtmenge an verfügbarem Gentamicin der Beschichtung ausmachten. Bei der vorliegenden Beschichtungskombination kommt es in den ersten 2 Stunden zur Freisetzung von ca. 60% des gesamten Gentamicins und einer prolongierten Restfreisetzung in den folgenden 24 Stunden.

Für die anfängliche Lösung ist das wasserlöslichere Gentamicin verantwortlich und lediglich 10-15% des Gentamicin-Crobeat. Auch die erforderliche Sterilisation mittels Gamma-Strahlung mit 25kGy verändert dieses Verhalten nur geringfügig.



Abb. 14: Industrieroboter mit zum Aufbringen der Gentamicin-Beschichtung. Roboter mit Mehrgelenkarm und Spritzdüsenvorrichtungen zum Aufbringen der kombinierten Gentamicin-Sulphat-Crocefat-Beschichtung auf das Implantat durch InkJet-Verfahren (Firma Biomet, Berlin).

## 2.4 Narkose und Operationsdurchführung

Sowohl die Anästhesie als auch die postoperative Betreuung der Tiere wurde von einer Tierärztin durchgeführt.

Zur Anästhesie wurde Ketanest<sup>®</sup> (60mg/kg KG i.m., Pfizer, Karlsruhe), das Hypnotikum Xylazin<sup>®</sup> (6mg/kg KG i.m., Rompun<sup>®</sup>, Bayer, Leverkusen) und Atropin<sup>®</sup> (0,1mg/kg KG i.m., Braun, Melsungen) verwendet. Subcutan bekamen die Tiere nach der Operation Carprofen (0,4 mg/kg KG, Rimadyl<sup>®</sup>, Pfizer, Karlsruhe) zur Analgesie verabreicht.

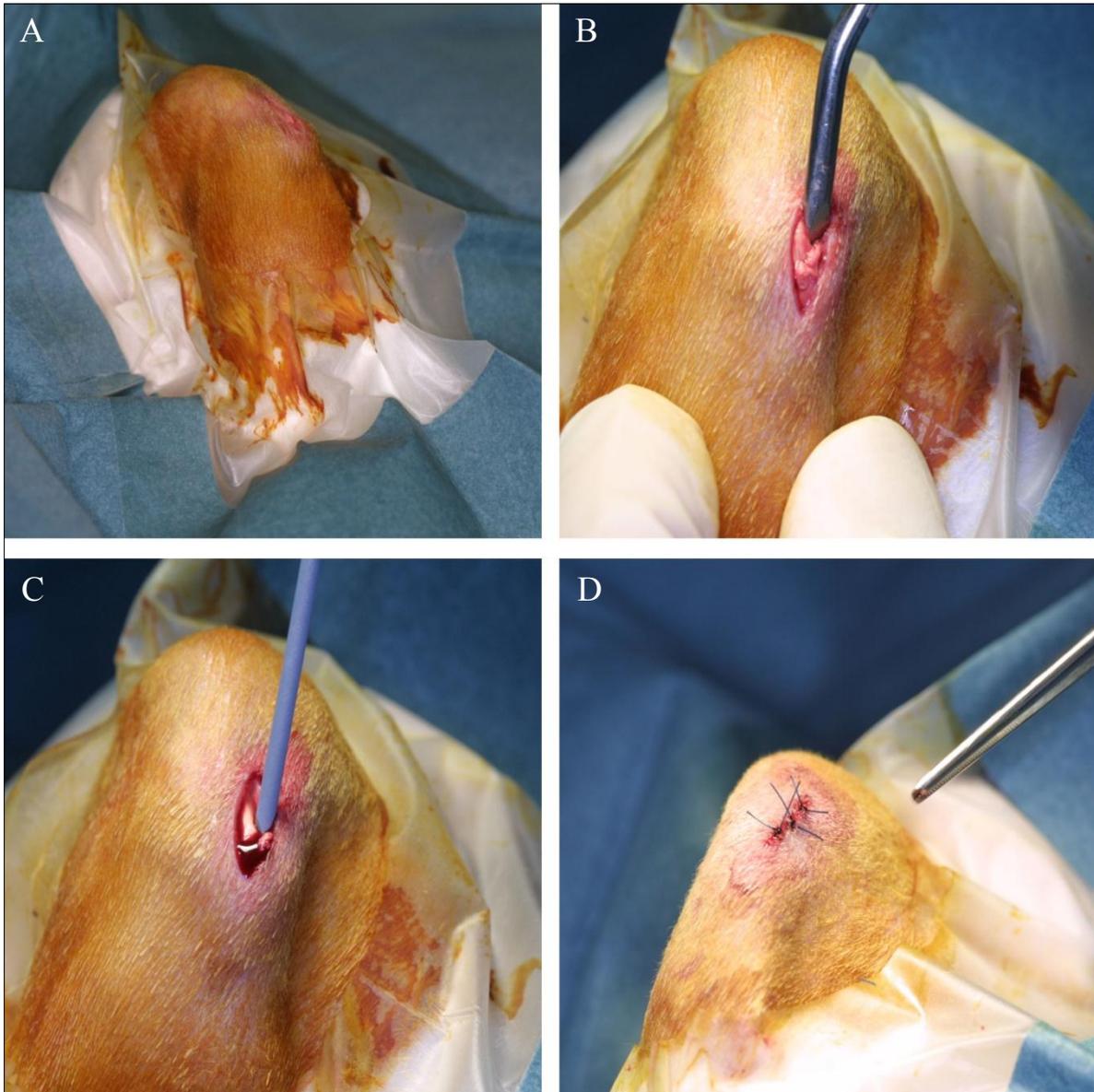


Abb. 15: OP-Technik. A: Steril abgedecktes Operationsfeld. B: Eröffnung der Markhöhle an der Tuberositas tibiae mit einem Pfriem. C: Einbringen des Kirschner-Drahtes in den Tibiamarkkanal. D: Verschluss der Wunde durch Einzelknopfnähte.

Während der 20- bis 30minütigen Operationen in einem tierklinischen OP-Saal im fzmb e.v. in Bad Langensalza, Thüringen, wurden aseptische Bedingungen eingehalten. Zu Beginn wurde jeweils der rechte Hinterlauf mit einer Schermaschine rasiert, mit Braunovidon® desinfiziert und schließlich steril abgedeckt (Abb. 15A).

Danach erfolgte unterhalb der Patella ein ca. 1 cm langer Hautschnitt, das Ligamentum patellae wurde dargestellt und längs gespalten (Abb. 15B). Dann wurde die Markhöhle unter Zuhilfenahme eines Pfriems auf Höhe der Tuberositas unter langsamer Druckausübung und Drehens eröffnet (Abb. 15B).

Im Anschluss daran wurde entsprechend der Randomisierungsliste das entsprechende Implantat in die Markhöhle eingebracht und bis in den distalen Teil der Tibia vorgeschoben (Abb. 15C). Der überstehende Teil des Implantates wurde auf Höhe der Tuberositas tibiae gekürzt.

Zum Schluss wurde die Wunde ausgespült und schichtweise verschlossen. Das Peritendineum der Patellarsehne wurde genäht, anschließend erfolgten die Subkutannaht und schließlich der Hautverschluss durch Naht. Die Wunde wurde mit Sprühpflaster verschlossen (Abb.15D).

Während der Operation kam es zu keinerlei Komplikationen, sodass postoperativ bei allen Tieren die operierte Extremität belastet werden konnten.

## **2.5 Postoperative Röntgenkontrolle**

Direkt postoperativ wurde noch in Narkose ein Röntgenbild im seitlichen Strahlengang angefertigt, um die korrekte Lage des K-Drahtes im Tibiamarkkanal zu kontrollieren (Abb. 16). Hierbei wurde eine Röntgengerät Gierth HF 300 (Gierth X-Ray, Riesa) verwendet und ein Abstand von 30 cm zwischen Gerät und Unterschenkel eingehalten. Die Durchleuchtung erfolgte mit 40kV und 60 mA.

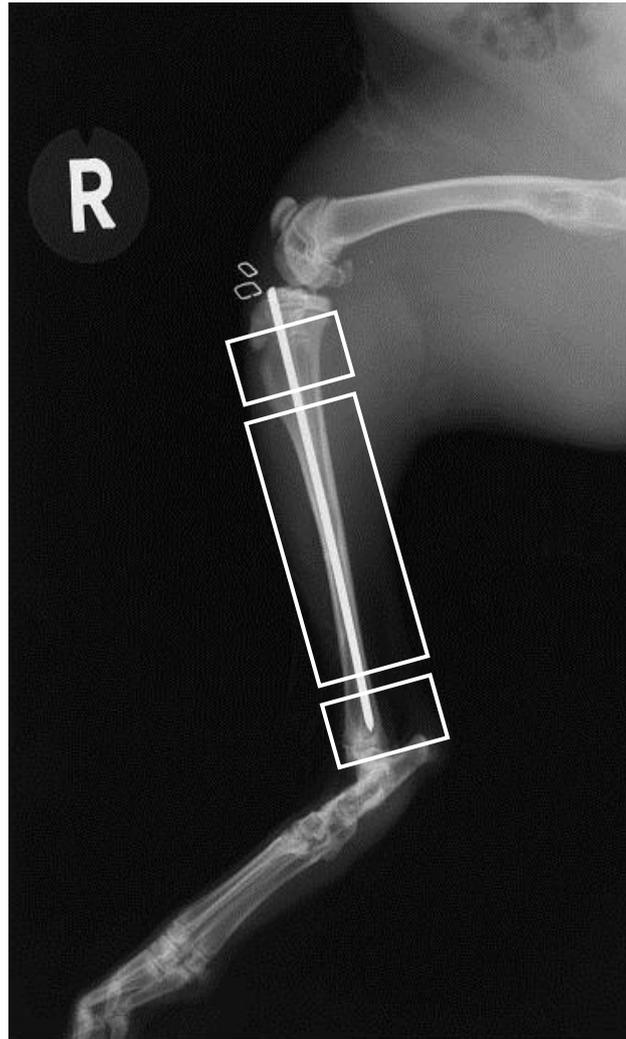


Abb. 16: Postoperatives Röntgenbild mit korrekter Lage des eingebrachten Implantates und Darstellung der Auftrennung der Tibiae zur Gewinnung von Transversalschnitten aus den beiden proximalen und distalen metaphysären Abschnitten sowie eines Längsschnitts aus dem diaphysären Abschnitt.

## 2.6 Postoperative Beobachtung

Im Anschluss an die Röntgenkontrolle wurden die Tiere in eine Aufwachbox gebracht, in der die Tiere mit einer Infrarotlampe warm gehalten wurden. Nach dem Aufwachen erfolgte die Einnistung in 2er Boxen. Hier verblieben sie bis zur Euthanasie.

Als Analgetikum wurde postoperativ Carprofen (0,4mg/kgKG s.c., Rimadyl<sup>®</sup>, Pfizer, Karlsruhe) eingesetzt.

Aspekte wie allgemeines Wohlbefinden, Futteraufnahme, Wundheilung und Gebrauch des Beines wurden täglich durch eine Tierärztin überprüft und dokumentiert. Hierbei wurde das Augenmerk besonders auf mögliche Infektzeichen gerichtet.

Zehn Tage nach Operation wurde das Nahtmaterial entfernt.

## 2.7 Euthanasie der Tiere

Zur Tötung der Tiere nach jeweils vier oder 12 Wochen verabreichte man eine intrakardiale Lösung T61 (4-5ml, Höchst, Veterinär), nachdem die Kaninchen zuvor die oben beschriebene Narkose erhalten hatten.

## 2.8 Entnahme der Präparate

Die operierten Tibiae wurden dann aus dem Weichteilverbund herausgelöst und das Implantat wurde intraossär belassen. Die Tibiae mit den einliegenden K-Drähten wurden somit direkt nach Explantation in 4%ige Paraformaldehyd (PFA) - Lösung gebracht und 4 Wochen dort zur Fixation im jeweiligen Medium belassen.

Die Tibiae wurden mitsamt des einliegenden K-Drahtes mit Hilfe einer Bandsäge in drei Bereiche geschnitten: jeweils ein proximaler und ein distaler metaphysärer Teil mit einem Abstand von 1,5 cm zum Knie- bzw. Sprunggelenk und ein diaphysärer Abschnitt mit einer Länge von ca. 6 cm Länge (Abb. 16). Aus den beiden metaphysären Abschnitten wurden im Folgenden Transversal- und aus dem diaphysären Teil Längsschnitte angefertigt.

## 2.9 Herstellung der Schnitte

Für die Anfertigung der Schnitte wurde die Trenn-Dünnschliff-Technik angewandt, um Hartgewebe bzw. -substanzen schneiden zu können, die mit den üblichen Methoden, wie Hartschnitt-, Paraffin-, Kryotechniken nicht zu trennen sind (Donath, 1989). Dieses Procedere erfolgte im Laboratorium für Experimentelle Unfallchirurgie des Universitätsklinikums Gießen. Der erste Schritt dabei bestand in der Einbettung der Proben im Methylmetacrylat-Hartkunststoff Technovit 7200 VLC<sup>®</sup> (Heraeus-Kulzer, Wehrheim).

Ohne vorherige Entkalkung wurden die Stücke dann in die aufsteigende Alkoholreihe gebracht und verweilten dort in unterschiedlichen Ethanolkonzentrationen (Tabelle 2).

Ethanolkonz. (%)	70%	80%	96%	100%	100%	100%
Zeit (d)	2	2	2	2	2	2

Tab. 2: Entwässerungsplan.

Je nach Schichtdicke wurde die einzelne Verweildauer auf jedes Präparat abgestimmt, da die Zeit zum Entwässern bei dickeren Präparaten höher sein muss.

Dies erfolgte in einem Entwässerungs- und Infiltrationsautomaten, (EXAKT Apparatebau Norderstedt). Die Proben verblieben für durchschnittlich 48 Stunden in Technovit<sup>®</sup> und reinem Ethanol, mit den Mischverhältnissen 30/70%, 50/50%, 70/30%. Eine weitere Infiltration fand mit Technovit 7200 VLC<sup>®</sup>, einem lichthärtenden Einkomponentenkunststoff auf Methacrylatbasis, in Kombination mit 1%igem Dibenzoylperoxid im Exakt-PBO Penetrationsbeschleuniger (Heraeus-Kulzer, Wehrheim) für 9 Tage statt.

Danach konnten die Präparate mit Fixationskleber Technovit 7230 VLC<sup>®</sup> (Heraeus-Kulzer, Wehrheim) in Einbettmulden fixiert und nochmals mit einer Schicht Technovit 7200 VLC<sup>®</sup> plus 1%iger BPO blasenfrei überzogen werden.

Mittels Gelblichtbestrahlung wurden die Proben für zwei Stunden mit dem Lichtpolymerisationsgerät Histolux (EXAKT Apparatebau, Norderstedt) vopolymerisiert. Anschließend erfolgte die gleiche Prozedur mit Blaulichtbestrahlung über vier Stunden.

Nachdem die Blockoberflächen im Wärmeschrank bei 40° C in einem Zeitraum von 16 Stunden ausgehärtet waren, konnten diese auf Plexiglasobjektträger aufgeklebt werden.

Um einen besseren Halt zu erzielen, wurden die Kunststoffblöcke mit einer Vakuum-Klebeeinrichtung (EXAKT Apparatebau, Norderstedt) an die Objektträger angepresst.

Als nächstes kam es zum vollständigen Entfernen des Technovit<sup>®</sup> 7200 unter Zuhilfenahme eines EXAKT-Mikroschleifsystem, mit dem die Oberflächen angeschliffen und poliert wurden. Auf eben diese angeschliffenen Präparatoberflächen wurde nun ein Glasobjektträger mit Technovit 7210 VLC Präzisionskleber (Heraeus-Kulzer, Wehrheim) und Vakuum-Klebeeinrichtung (EXAKT Apparatebau, Norderstedt) aufgeklebt.

In einem folgenden Schritt wurde dann das Präparat-Objektträger-Sandwich in dem EXAKT-Trennschleif-System (EXAKT Apparatebau, Norderstedt) eingespannt, mit welchem ca. 100 µm dünne Scheiben durch ein mit Wasser gekühltes, diamantbeschichtetes Band geschnitten wurden. Aufgrund der eingebauten Mikrometerschraube konnte eine Kontrolle der Dicken gewährleistet werden, da das Gerät nach Erreichen der eingestellten Zieldicke automatisch stoppt.

Um das endgültige Präparat auf die erwünschte Zieldicke zu bringen, wurden die Scheiben zum Schluss mit dem EXAKT-Mikro-Schleifsystem<sup>®</sup> erneut abgeschliffen und poliert.

Hierbei kam ein Schleifteller mit unterschiedlich gekörnten Sandpapierscheiben zum Einsatz.

## 2.10 Anfärbung der Schnitte

Da sich die glatten Schliffoberflächen nicht so gut anfärben lassen, wurden diese vorher mit 10%igem H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> angeätzt und danach mit destilliertem Wasser abgespült. Es wurden für jeden Schnitt, proximal, diaphysär und distal jeweils zwei Färbungen angefertigt, eine mit Toluidinblau (Dauer der Färbung 10min.) und eine mit Hämatoxylin/Eosin (H = 5 min, E = 30 sec) (Tab. 3).

Das Prinzip bei der Toluidinfärbung beruht darauf, dass es durch den basischen Thiazinfarbstoff zu einer elektropolaren Anlagerung an die sauren Gruppen der Nukleinsäuren kommt und so Knochenan- und -umbauvorgänge kenntlich gemacht werden können. Im Ergebnis stellt sich mineralisierte Hartgewebematrix ungefärbt bis blass-blau, Zellen und Weichgewebe blau, Knorpelsubstanz metachromatisch bis rotviolett und verkalkte Knochenmatrix dunkelblau dar. Metachromatisch heißt hierbei, dass sich die Anfärbung in einer Nuance vom eigentlich angewandten Farbton unterscheidet.

Bei der HE-Färbung, einer Übersichtsfärbung, muss die Substanz erst einmal durch Oxidation in den Farbstoff Hämatein überführt werden. Das saure Hämatoxylin enthält positive Ladungen, die sich an die negativ geladenen Phosphatgruppen des Chromatins anlagern.

Durch das Einstellen des pHs auf <3 lässt sich eine tiefblaue Markierung der Zellkerne hervorrufen. Eosin hingegen ist negativ geladen und bindet beispielsweise an positive Gruppen von Eiweißen. Somit lassen sich Zellkerne, Knorpelgrundsubstanz, grampositive Bakterien und Kalk blau anfärben und Zytoplasma, Bindegewebe, Erythrocyten und Kollagenfasern rot.

Toluidin-Färbung	HE-Färbung
Ansetzen des Schliffes mit 10% H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> für 10 min.	
Abspülen des Objektträgers mit Aqua dest.	
Färben mit Toluidin-Blau für 15min.	Färben mit Hämalan, 5-10min. Schwenken in Essigwasser, 1min.
Abspülen mit Leitungswasser	Bläuen in Leitungswasser, 10min.
Trocknen des Schliffes und Differenzieren mit Aceton-Alkohol	Färben in Eosin
Eindecken des Schliffes	Schliff abspülen, trocknen, eindecken

Tab. 3.: Übersicht zur Herstellung der Anfärbung der Schnitte.

Das Ergebnis waren jeweils drei 5 µm dicke Schnitte in zwei Färbungen aus den proximalen, den diaphysären und den distalen Abschnitten der Kaninchenknochen. Bei dem proximalen und dem distalen Bereich wurde ein Querschnitt ausgewählt und im distalen Teil ein Längsschnitt.

## **2.11 Flächenmessungen der Knochenneubildung**

Zur histomorphometrischen Analyse wurde jeder einzelne Schnitt, proximal, diaphysär und distal bei beiden Färbungen (Toluidin und HE) mit dem Softwareprogramm Image Pro<sup>®</sup> Plus, Version 4.5, (Media Cybernetics, Inc.; Silver Spring MD 20910) bearbeitet.

Zunächst wurde von jedem histologischen Schnitt ein Foto mit dem Stereomikroskop Stemi SV 11<sup>®</sup> (Carl Zeiss Mikroskopie, Jena) mit einer integrierten Kamera angefertigt und in den Computer eingescannt (Abb.17 und 18).

Das Single Lense Vario Mikroskop arbeitet nach dem Fernrohr-Prinzip, bei welchem zwei mikroskopische Teilsysteme parallel verlaufen und mit einem gemeinsamen Hauptobjektiv plastische Objekte naturgetreu und räumlich wiedergeben.

Da das Gerät mit einer Kaltlichtquelle ausgestattet ist, können Präparate schonend über einen längeren Zeitraum betrachtet werden.

Das Mikroskop verfügt über einen Zoombereich von 0,6x bis 6,6x (11:1) und einen verstellbaren Tisch, mit dem die exakte Lage des Schnittes immer wieder korrigiert werden kann. Ein installierter Grob- und Feintrieb verbessert zusätzlich die Genauigkeit beim Einstellen der Schärfenebene. Das Objektiv für die Flächenmessung, Achromat S, arbeitet mit einem Vergrößerungsfaktor von 0,4 und einem Arbeitsabstand von 250 mm. Die Bilder werden automatisch durch das Gerät farbkorrigiert. Bei der Längenmessung kam das Planchromat S Objektiv zum Einsatz, das mit einem Vergrößerungsfaktor von 1,0 gegebnete und kontrastreichere Bilder erstellt.

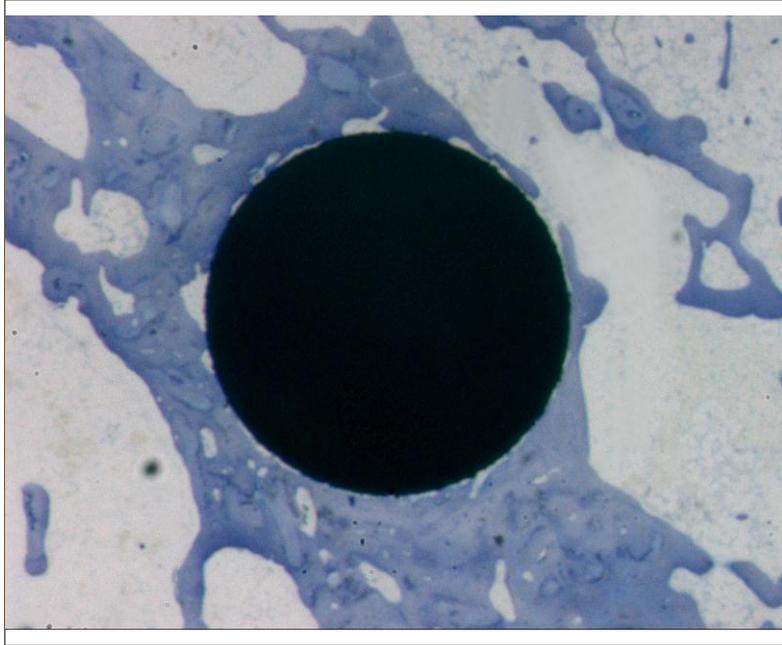


Abb. 17: Querschnitt durch die proximale Metaphyse der Tibia in Toluidinblau-Färbung mit zirkulärer Knochenneubildung um das Implantat .

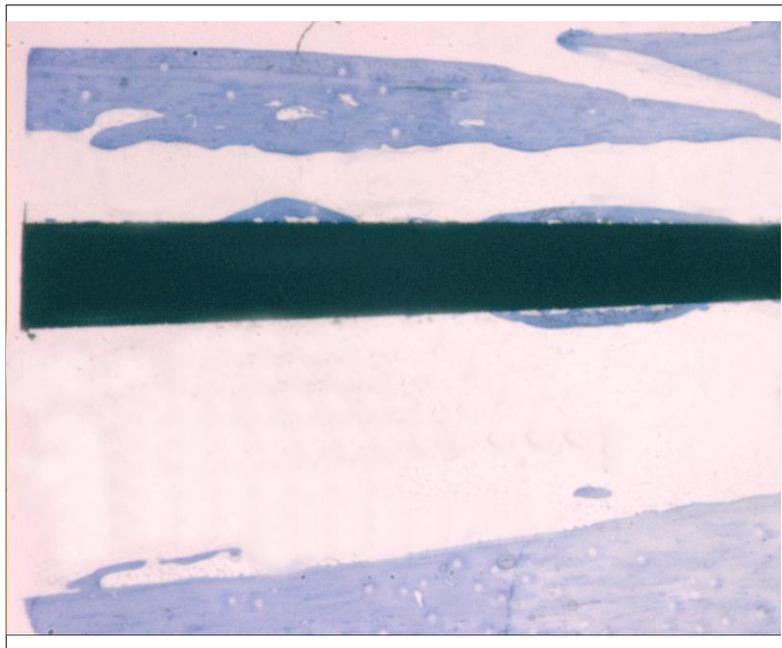


Abb. 18: Längsschnitt durch die Diaphyse in Toluidinblau-Färbung mit Knochenneubildung auf der Implantatoberfläche.

Je nachdem, welcher Zoombereich gewählt wurde, musste auch eine darauf abgestimmte Kalibrierung für die weiteren Schritte eingestellt werden, damit später die Werte in der gleichen Einheit errechnet werden konnten. Bei der Wahl des einzelnen Zoombereiches wurde darauf geachtet, dass das Implantat möglichst komplett abgebildet war und zusätzlich ein

gewisser Abschnitt von Knochenmarkhöhle und Endost mit eingesehen werden konnte. Deshalb mussten bei den Längsschnitten mehrere Fotos von einem Schnitt hintereinander gemacht werden.

Der Zoombereich am Mikroskop beträgt bei den proximalen Schnitten 5, ebenso die Kalibrierung. Ein Bereich von 2 mit entsprechender Kalibrierung wurde beim Längsschnitt gewählt und für den distalen Teil wurde mit jeweils 3,2 gearbeitet.

Das weitere Verfahren zur semi-quantitativen Messung des neu gebildeten Knochens beruht darauf, dass die unterschiedlichen Schattierungen der Präparate mit dem Computersystem Image Pro<sup>®</sup> Plus erfasst werden können, dass man Knochen von Bindegewebe, Gefäßen und anderen Substanzklassen unterscheiden und somit selektiv ausmessen kann (Abb. 19). Da aber proliferiertes Bindegewebe teilweise ähnliche Farbnuancen wie der Knochen aufwies, war das Programm nicht immer auf Anhieb in der Lage, lediglich die Knochenneubildung zu erfassen. Aus diesem Grund mussten einige Bilder zuvor im Adobe Photoshop<sup>®</sup>, Version 7.0, korrigiert werden, wobei ausschließlich irritierendes Bindegewebe retuschiert wurde.

Als nächstes musste eine einheitliche „area of interest“ (AOI) definiert und angelegt werden, in der die Erfassung des neugebildeten Knochens in einem festgelegten Abstand zum Implantat erfolgte.

Für den Querschnitt der proximalen Metaphyse wurde hierfür eine kreisförmige Fläche mit einem Radius von 1,5 mm um das Zentrum des Implantates festgelegt, die einen Flächeninhalt von 7,12 mm<sup>2</sup> bildete. Hiervon musste die Fläche des Implantates mit 3,1mm<sup>2</sup> abgezogen (Abb. 19) werden, sodass die Knochenneubildung innerhalb einer ringförmigen Fläche von 4,02 mm<sup>2</sup> erfasst wurde.

Bei den Betrachtungen des diaphysären Teils variierten die einzelnen Flächen etwas, da auch die Implantatlänge der Schnitte jeweils unterschiedlich war (Abb. 20). Auch die Markhöhlen waren nicht einheitlich. So betrug der Abstand zum Implantat 0,5 mm, jeweils ober- und unterhalb des Drahtes, und es wurde ein kastenförmiger AOI angewandt. Auch hier wurde in einem anschließenden Schritt die Fläche des Implantates von der Gesamtfläche subtrahiert (Abb. 20).

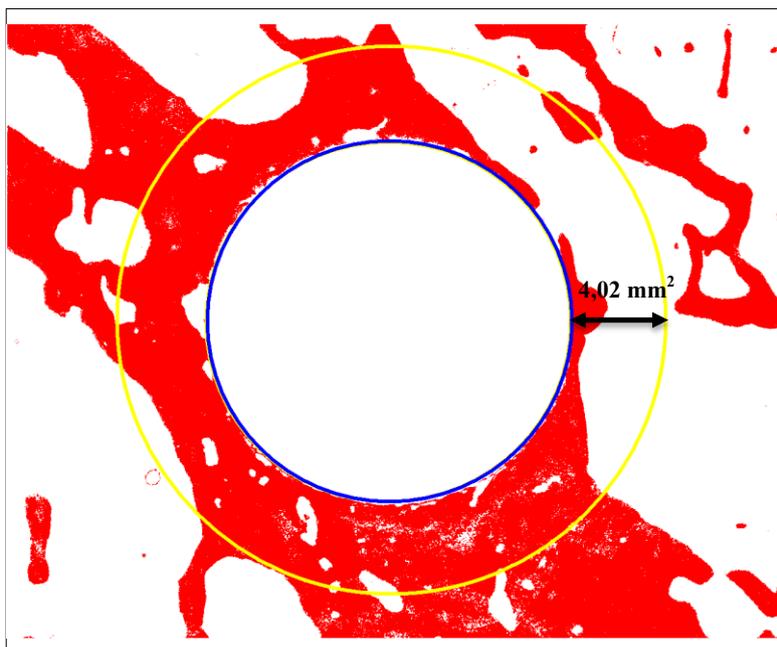
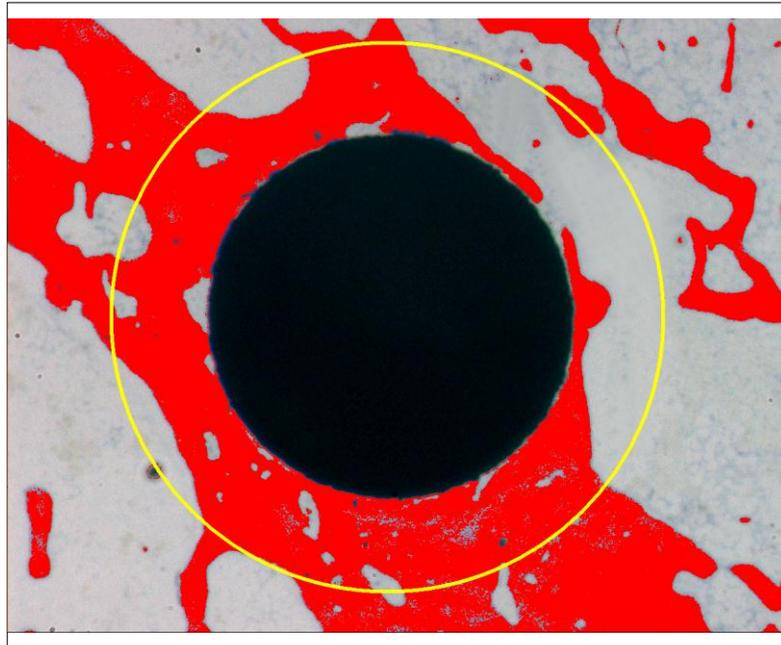


Abb. 19: Technik der semiquantitativen Histomorphometrie zur Bestimmung der Knochenneubildung bei den Querschnitten mit Bestimmung der AOI als ringförmige Fläche aus der Differenz zwischen eines 1,5 mm Abstandes zum Implantat (A) und Implantatgrenze. Der Flächeninhalt der AOI beträgt  $4,02 \text{ mm}^2$  (B).

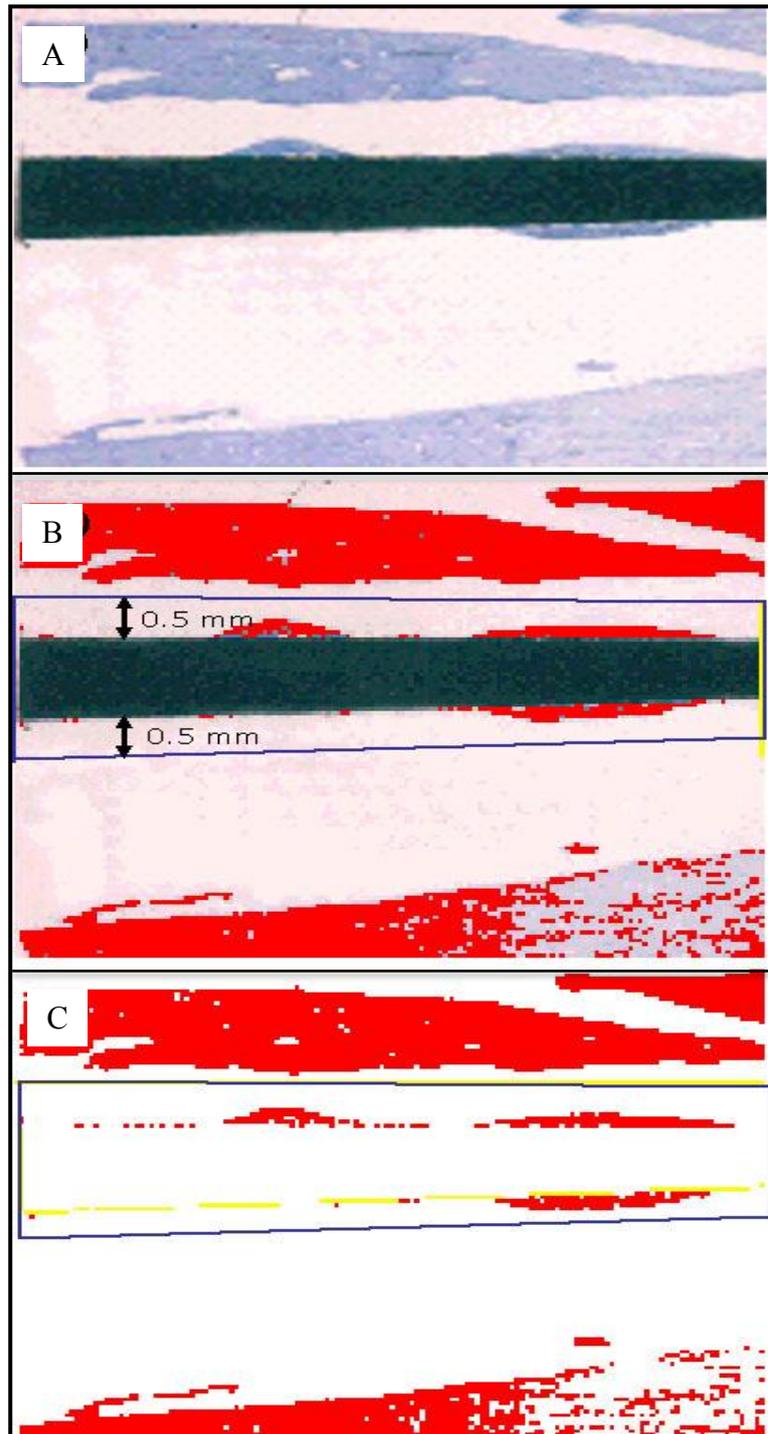


Abb. 20: Technik der Histomorphometrie zur Bestimmung der Knochenneubildung bei Längsschnitten aus dem Schaftbereich. Toluidin-Dünnschliff (a) mit Bestimmung der AOI als Fläche aus der Differenz zwischen eines 0,5 mm Abstandes zum Implantat (b) und Implantatfläche (c).

Ähnlich wie am proximalen Teil des Knochens erfolgte das Procedere auch am distalen Querschnitt, der Abstand hatte einen Radius von 1,2 mm und die ringförmige Fläche um den Draht betrug 1,49 mm<sup>2</sup>.

Die Abstände waren danach ausgerichtet, eine möglichst große Fläche um das Implantat herum zu erhalten und dennoch nicht mit dem genormten AOI in das Endost hinein zu gelangen, da nur der neu entstandene Knochen erfasst werden sollte.

Bei der Markierung des Knochens wurde so verfahren, dass der Knochen des Endosts im Softwareprogramm als Farbvorlage diente und durch Anklicken desselbigen mit der „Farbpipettenfunktion“ der neu gebildete Knochen vom Programm automatisch erkannt wurde. Um einen noch besseren Kontrast zu erhalten, wurde die Markierung auf weißen Hintergrund gebracht und alles für eventuelle Kontrollen in den Zwischenspeicher gelegt.

Durch eine weitere Funktion des Programms konnte abschließend die markierte Fläche vermessen und als Wert in mm<sup>2</sup> angegeben werden.

Nach Division des neu gebildeten Knochens durch die insgesamt betrachtete Fläche konnte somit ein Prozentwert errechnet werden.

## **2.12 Direkter Knochen-Implantat-Kontakt**

Das Prinzip der Erfassung des direkten Knochen-Implantat-Kontakts war dem der Flächenmessung sehr ähnlich. Allerdings wurde hierbei eine andere Vergrößerung und ein anderes Objektiv verwendet, um den direkt am Implantat sich befindlichen Knochen noch besser beurteilen zu können (Planchromate S; 1,0x). Abermals mussten mehrere Bilder pro Schnitt angefertigt werden.

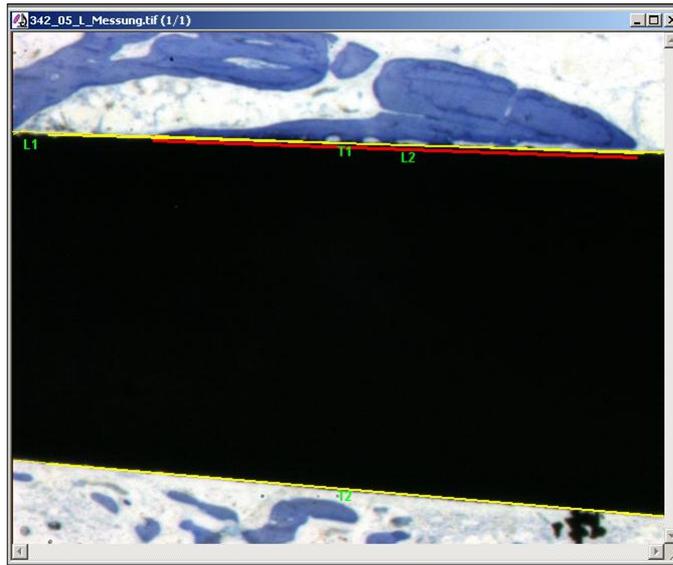


Abb.21: Messung des direkten Knochen-Implantat-Kontakts an einem Längsschliff der Diaphyse. Gelbe Linie: Länge des Implantates; rote Linie: direkter Knochen-Implantat-Kontakt.

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

Tabelle 4: Beispiel der Computer-basierten Messung des direkten Knochen-Implantat-Kontakts.

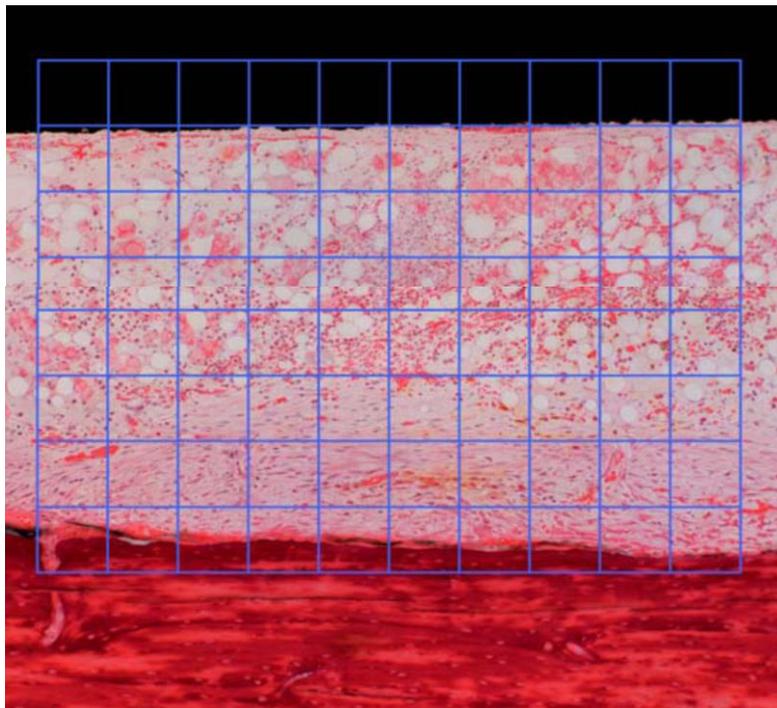
Als Kriterium wurde festgelegt, dass nur eine Distanz von weniger als 0,05 mm zwischen Knochen und Implantat als direkter Knochen-Implantat-Kontakt gewertet wurde. Die Bereiche, für die dieses Kriterium zutrifft, wurden mit einer zusätzlichen Funktion des Computerprogramms Image Pro<sup>®</sup> Plus der Länge nach vermessen und die Einzelabschnitte später addiert (Abb. 21, Tabelle 4).

Auch hier wurde ein Prozentwert aus dem Verhältnis von direktem Knochen-Implantat-Kontakt zur Gesamtimplantatlänge erstellt.

### 2.13 Semi-quantitative Bestimmung der mehrkernigen Riesenzellen

Die vermehrte Ausbildung von mehrkernigen Riesenzellen kann als Fremdkörperreaktion auf Implantate gewertet werden (Gottlander et al., 1997).

Aus diesem Grund wurde zur semi-quantitativen Auswertung die Anzahl der Fremdkörperriesenzellen bestimmt. Dies erfolgte mit den HE-gefärbten Schnitten des Schaftbereiches unter der netzförmigen Zählkammer eines Axioskop 2 Plus Mikroskopes (Carl Zeiss, Jena) (Abb. 22).



*Abb. 22: Technik zur Bestimmung der Anzahl der Fremdkörperriesenzellen bei Längsschnitten aus dem Schaftbereich. Innerhalb einer netzförmigen Zählkammerstruktur wurden zwischen der Implantatoberfläche und dem kortikalen Knochen alle Zellen mit mehr als drei Zellkernen erfasst. Nur Kästchen, die in Gänze innerhalb des Knochenmarkraums lagen und keinen Kontakt zur Implantatoberfläche oder kortikalem Knochen hatten, wurden berücksichtigt.*

Durch die netzförmige Zählkammer wurden unter 200-facher Vergrößerung alle Zellen mit mehr als drei Zellkernen, die innerhalb der Zählkammer lagen, gezählt. Berücksichtigt wurden lediglich Zellen, die gänzlich zwischen der Implantatoberfläche und dem kortikalen Knochen lagen. Durch Division der Gesamtzahl der Fremdkörperriesenzellen durch den jeweiligen Oberflächeninhalt konnte so für jedes Tier eine Durchschnittszahl von Fremdkörperriesenzellen/mm<sup>2</sup> Knochenmark errechnet werden.

## 2.14 Statistik

Die statistische Auswertung wurde mit dem Programm „SPSS for Windows“ (Version 12.0; SPSS Inc., Chicago, USA) durchgeführt, nachdem alle Daten in EXCEL erfasst worden waren. Die Datenanalysen haben einen explorativen Charakter.

Es erfolgte eine deskriptive Darstellung der Knochenneubildung und des direkten Knochen-Implantat-Kontaktes durch die Bestimmung von Standardabweichung und Mittelwert, getrennt nach Schnitthöhe, Beschichtung und Untersuchungszeitraum. Aufgrund nur kleiner Stichprobenumfänge gestaltete sich die Beurteilung der Verteilungsform dieser Messparameter schwierig. Um in Einklang mit anderen Studien ähnlicher Betrachtungen zu bleiben, wurde allerdings eine Normalverteilung angenommen (Rammelt et al., 2006).

Die jeweiligen Ergebnisse wurden mit einer einfaktoriellen Varianzanalyse und paarweisen Kontrasten nach Scheffe beurteilt. Die Irrtumswahrscheinlichkeiten für den Fehler 1. Art „p“ wurden im Ergebnisteil ausgewertet. Die Datenanalyse erfolgte explorativ. Ein p-Wert  $<0,05$  wurde als statistisch signifikant angenommen. Anschließend wurden die Daten mit SPSS für Windows (Version 12.0; SPSS Inc., Chicago, USA) ausgewertet.

## 2.15 Histologische Auswertung

Bei der histologischen Auswertung wurden die erstellten Schnitte unter einem Stereomikroskop der Firma Zeiss betrachtet (Stemi SV 11<sup>®</sup>; Carl Zeiss Mikroskopie, Jena).

Hierbei wurden die Schnitte der proximalen, distalen und diaphysären Bereiche auf Gewebeverträglichkeit und Knochenneubildung der einzelnen Beschichtungen untersucht.

Bezüglich der knöchernen Integration wurde die Qualität des neu entstandenen Knochens, die Menge bzw. Fläche aber auch die Verbindung zum Implantat analysiert. Es wurde erfasst, ob sich Lamellenknochen oder Geflechtknochen gebildet hatte, in welcher Position zum Implantat dieser sich befand und ob der Knochen Mineralisationsstörungen aufwies.

Besonders im Endost und Periost wurde auf reaktive Knochenneubildungsprozesse geachtet und im kortikalen Knochen wurde besonderes Augenmerk auf die Havers'schen Kanäle und die Mikrostruktur des Knochens gerichtet.

Als Hinweis auf eine Gewebeunverträglichkeit oder Fremdkörperreaktion wurden mehrkernige Riesenzellen im Knochenmark, Nekrosen im Fettmark mit ödematösen Arealen und im blutbildenden Bereich des Knochenmarks gewertet. Dabei konnte nicht unterschieden werden, ob es sich um eine Reaktion auf das Implantat oder die Operation selber handelte.

Nicht nur das Auftreten der Fremdkörperriesenzellen an sich sondern auch das Verhältnis selbiger zum ödematösen Knochenmark und den Nekrosen wurde genauer ausgewertet.

### 3. Ergebnisse

#### 3.1 4-Wochen-Implantationsdauer

Zur Auswertung bei den 4-Wochen-Tieren kamen insgesamt 11 von initial 12 operierten Tieren. Ein Tier aus der Gentamicin-RGD-HA-Gruppe verstarb an einem akuten gastrointestinalen Infekt. Es ließ sich hierbei kein Hinweis auf eine lokale Reaktion am Operationsgebiet oder sonstigen Zusammenhang mit der Operation oder dem Implantat erkennen.

##### 3.1.1 Histomorphometrische Ergebnisse

###### 3.1.1.1 Knochenneubildung

Tabelle 5 sind die Werte aus der histomorphometrischen Knochenneubildungsbestimmung nach 4 Wochen zu entnehmen.

Region	Gruppe	Knochenneubildung in % der AOI
Proximal	HA	0,79 ± 1,07
	HA-Gentamicin-RGD	0,12 ± 0,08
Diaphysär	HA	3,97 ± 3,73
	HA-Gentamicin-RGD	1,78 ± 1,64
Distal	HA	0,59 ± 0,68
	HA-Gentamicin-RGD	4,79 ± 4,2

Tab.5: Knochenneubildung in den drei unterschiedlichen Tibiaregionen an der proximalen Metaphyse bzw. distalen Metaphyse nach einer Implantationsdauer von 4 Wochen. Die Knochenneubildung wurde als prozentualer Anteil von neugebildeter Knochenfläche an der AOI von 4mm<sup>2</sup> bzw. 1,49mm<sup>2</sup> gemessen. Die AOI für den Schaftbereich wurde in Abhängigkeit der Länge des erfassten Implantates für jeden Schnitt individuell erfasst.

Nach Betrachtung der Mittelwerte in der 4 Wochengruppe konnte man feststellen, dass proximal und diaphysär bei der HA-Beschichtung tendenziell mehr neuer Knochen entstanden war als in der Gentamicin-RGD-HA-Gruppe, allerdings ohne statistische Signifikanz zu

erreichen. Im distalen Metaphysenabschnitt schnitt die Gentamicin-RGD-HA-Beschichtung besser als die Kontrollgruppe ab, allerdings auch ohne statistische Signifikanz.

Bei beiden Untersuchungsgruppen zeigten sich relativ große Standardabweichungen.

Somit ergaben sich nach 4 Wochen keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen den beiden und somit kein negativer Effekt durch die Gentamicin-RGD-Beschichtung.

### 3.1.1.2 Knochen-Implantat-Kontakt

Nach 4 Wochen zeigte sich bei der Kombinationsbeschichtung bzw. HA-Beschichtung ein direkter Knochen-Implantat-Kontakt von  $3,87 \pm 4,5\%$  bzw.  $7,89 \pm 6,8 \%$  ohne statistisch signifikante Differenz zwischen den beiden Gruppen (Tabelle 6). Auch hierbei waren hohe Standardabweichungen zu beobachten.

	Knochenneubildung auf der Implantatoberfläche in % der Implantatlänge
HA	$7,89 \pm 6,8$
HA+Gentamicin+RGD	$3,87 \pm 4,5$

Tab.6: Knochen-Implantat-Kontakt im Schaftbereich nach 4 Wochen als Ausdruck der knöchernen Integration des Implantates als prozentualer Anteil der Gesamtimplantatlänge.

### 3.1.1.3 Anzahl der Riesenzellen

In der HA-Gruppe wurden im Schnitt 3,33 Riesenzellen pro  $\text{mm}^2$  im Knochenmark gefunden, während in der Kombinationsbeschichtung 3,76 Riesenzellen pro  $\text{mm}^2$  zu sehen waren (Tabelle 7). Wiederum kam es nicht zu einem signifikanten Unterschied zwischen den beiden Gruppen jedoch erneut zu hohen Standardabweichungen.

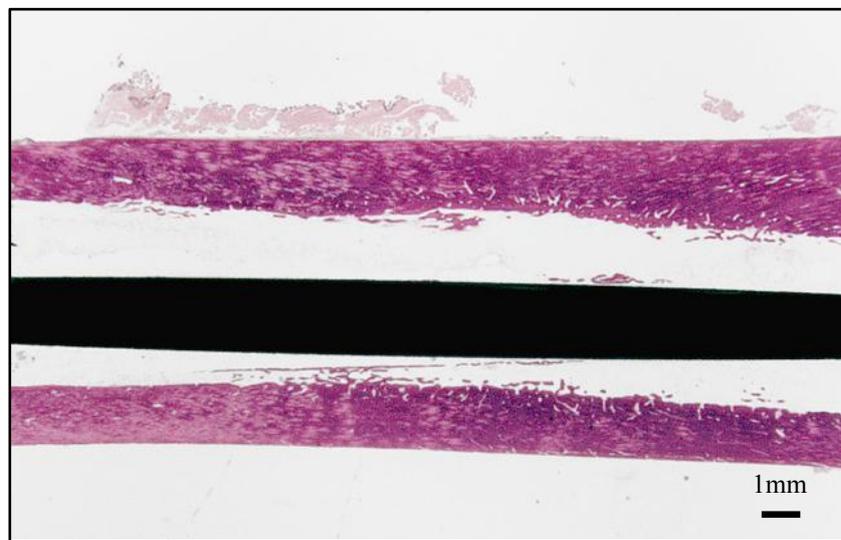
	Anzahl der Riesenzellen/ $\text{mm}^2$ im Schaftbereich
HA	$3,33 \pm 2,36$
HA+Gentamicin+RGD	$3,76 \pm 3,71$

Tab.7: Anzahl der Riesenzellen im Knochenmark des Tibiaschaftes nach 4 Wochen.

## 3.1.2 Histologische Ergebnisse

### 3.1.2.1 Hydroxylapatit-Beschichtung

Bei der HA-Beschichtung zeigten sich fast ausschließlich im mittleren Schaftbereich Knochenneubildungen, während proximal und distal nur eine diskrete Knochenneubildung zu erkennen war; vorwiegend waren geflechtknochenartige Spangen hier anzutreffen. Der direkte Kontakt zwischen neuem Knochen und Implantat war insgesamt nur gering ausgeprägt, und somit von keiner knöchernen Integration gesprochen werden kann (Abb.23).



*Abb. 23: Mittlerer Schaftbereich 4 Wochen nach Implantation eines HA-beschichteten K-Drahtes. Es ist nur eine marginale Knochenneubildung am Unterrand und teilweise am Oberrand des Implantates zu erkennen. Die unregelmäßige Anfärbung resultiert aus der ungleichmäßigen Mineralisation der Kortikalis.*

Bei einzelnen Schnitten mit etwas stärkerer Knochenneubildung war zu erkennen, dass der neugebildete Knochen vom benachbarten Endost seinen Ursprung nahm. Es schien, als ob sich eine spangenartige Trabekelstruktur mit Ausrichtung auf das Implantat am Rande des Endostes gebildet hatte, wobei der Knochen hier aus Geflechtknochen bestand (Abb.24).

Im Knochenmark fanden sich vorwiegend morphologisch unauffällige Adipozyten und Zellen der Hämatopoese, jedoch auch Areale mit ödematöser Auftreibung und Nekroseherde im Fettmark sowie im blutbildenden Mark. In diesen Abschnitten waren vermehrt Riesenzellen zu sehen. Hier hatte es den Anschein, als würden diese sich an der Phagozytose nekrotischen Materials beteiligen (Abb.25).

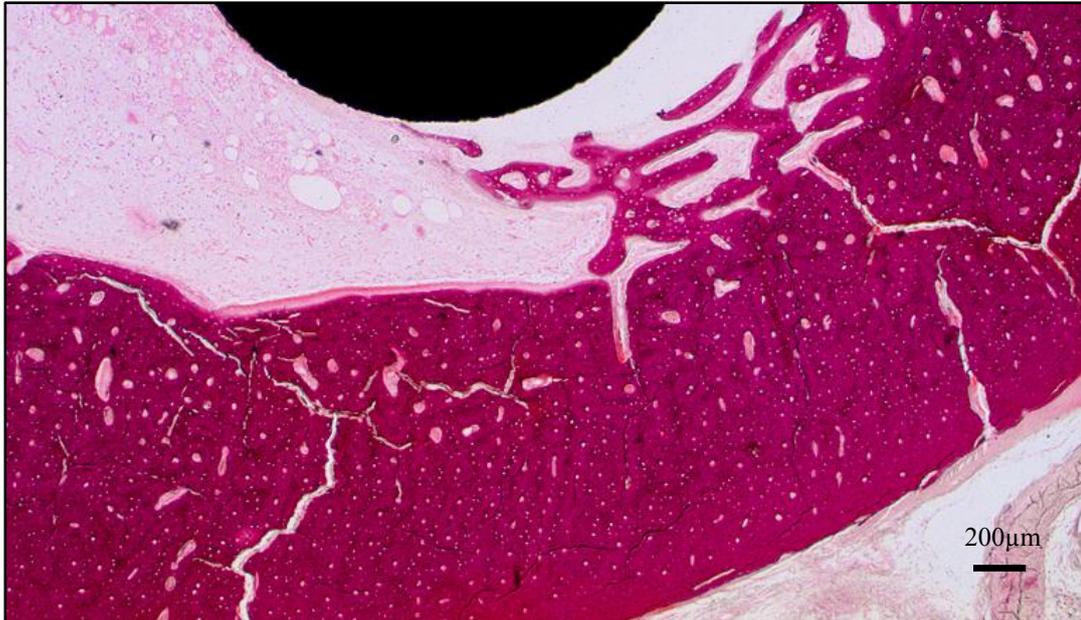


Abb.24: Distale Diaphyse 4 Wochen nach Implantation eines HA-beschichteten K-Drahtes. Der neugebildete Knochen entspringt vom Endost der Kortikalis. Die neugebildeten Bälkchen bestehen aus Lamellenknochen und Herden von Geflechtknochen. In der Kortikalis sind partiell Mineralisationsstörungen zu erkennen.

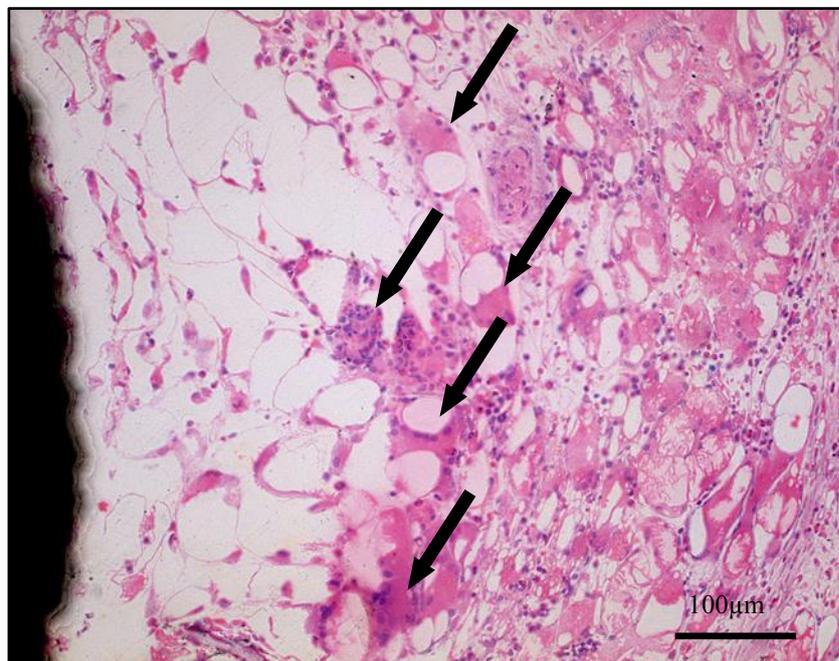


Abb. 25: Detailhistologie aus dem Knochenmark der proximalen Diaphyse mit Darstellung von mehrkernigen Riesenzellen 4 Wochen nach Implantation eines HA-beschichteten Implantates. Es zeigen sich mehrere benachbart liegende mehrkernige Riesenzellen.

Es kam in der benachbarten Kortikalis zu Erweiterungen der Havers'schen Kanäle mit davon ausgehenden Knochenneubildungen, wie es sich bei einem Remodelling finden lässt. Auch das angrenzende Periost zeigt stellenweise eine Mitreaktion.

### 3.1.2.2 Gentamicin-RGD-Hydroxylapatit-Beschichtung

Bei der Kombinationsbeschichtung kam es teilweise zu direktem Knochen-Implantat-Kontakt, besonders in der distalen Metaphyse (Abb. 26). Wie in der HA-Gruppe nahm die Knochenneubildung auch hier ihren Ursprung vom Endost aus und war vermehrt im mittleren Schaft anzutreffen .



Abb. 26: Distale Metaphyse 4 Wochen nach Implantation eines Gentamicin-RGD-HA-beschichteten K-Drahtes. Knochenneubildung zwischen 2 und 6 Uhr mit teilweise direktem Knochen-Implantat Kontakt.

Das Knochenmark wies unterschiedliche Abschnitte auf. Neben vitalem Knochenmark zeigten sich nekrotische und bereits fibrosierte Herde. Auch diesmal waren in den veränderten Arealen mehrkernige Riesenzellen zu finden. Zusätzlich war der kortikale Knochen hier durch Erweiterungen der Havers'schen Kanäle im Sinne von Mineralisationsstörungen charakterisiert (Abb.27)

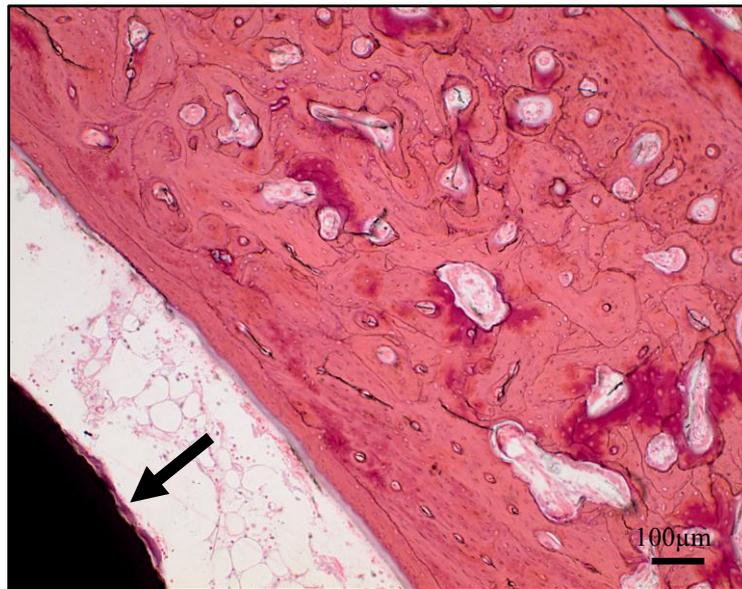


Abb.27: Detailhistologie der distalen Metaphyse 4 Wochen nach Implantation eines Gentamicin-RGD-HA-beschichteten K-Drahtes. Erweiterung der Havers'schen Kanäle in der Kortikalis mit schmalen Knochensaum (Pfeil) entlang der Implantatoberfläche.

### 3.1.3 Zusammenfassung der 4-Wochen-Studie

Generell fiel in allen Gruppen auf, dass die zellulären Strukturen dafür charakteristisch waren, dass sich der Knochen im Übergang von einer Entzündungsreaktion auf das Implantat zur knöchernen Regeneration befand. Das Bestreben, das Implantat knöchern zu integrieren, stellte sich durch mehrere Merkmale dar. So konnte man erkennen, dass von der Kambiumschicht des Periosts Knochenneubildungsvorgänge abliefen und dass die Mikrostruktur der Rinde für ein Remodelling sprach. Von den teilweise stark erweiterten Havers'schen Kanälen ging ebenfalls eine Neuentstehung von Knochengewebe aus. Mosaikartige Formationen der Kittlinien waren ein Indiz für die schubweise stattgefundene Knochenneubildung.

Auch vom Endost aus konnten osteokonduktive Prozesse ausgemacht werden. Neue Knochenbälkchen mit Osteoblasten-Layern waren stellenweise direkt am Implantat lokalisiert.

Andererseits wurden aber auch Mineralisationsstörungen, die vorwiegend in der Kortikalis auftraten, in beiden Gruppen beobachtet.

Das Knochenmark beinhaltete teilweise Markraumödeme, Nekrosen, vereinzelt zelluläre Infiltrate und Fremdkörperriesenzellen. Dabei war die Verteilung auf die einzelnen Gruppen jedoch ausgeglichen.

### **3.2 12 -Wochen-Implantationsdauer**

In diese Studie wurde zusätzlich eine Gruppe mit unbeschichtetem K-Draht integriert, um Reaktionen des Knochens zu beurteilen, die rein auf das Operationstrauma und Insertion des Implantates in den Markraumkanal und nicht auf die eigentliche Beschichtung der Implantate zurückzuführen sind. Für diese Studie wurden 21 Tiere verwendet. Während der 12-wöchigen Beobachtungszeit starben insgesamt drei Tiere, zwei in der HA-Gruppe und eins aus der Kombinationsbeschichtung. Es ließ sich jedoch abermals kein Hinweis auf eine Operationsfolge oder Komplikation durch das Implantat ausmachen.

#### **3.2.1 Histomorphometrische Ergebnisse**

##### **3.2.1.1 Knochenneubildung**

Zwischen der HA-Beschichtung und der Gentamicin-RGD-HA-Beschichtung kam es auf keiner Schnitthöhe zu einem statistisch signifikanten Unterschied. Es zeigte sich jedoch ein Trend bzgl. einer höheren Knochenneubildung in der HA-Gruppe (Tabelle 8).

In der Gruppe der HA-Beschichtung zeigte sich die höchste Rate an neu gebildetem Knochen. 35,8% ± 22,0% des AOIs an der proximalen Metaphyse, 12,18% ± 12,31% des diaphysären ROIs, und 25,5% ± 3,97% des AOIs an der distalen Metaphyse war mit neugebildetem Knochen ausgefüllt. Jedoch lag im Vergleich der HA-Beschichtung zum unbeschichteten K-Draht nur im distalen Metaphysenbereich eine statistisch signifikante Differenz vor ( $p=0.04$ ). Weitere statistisch signifikante Differenzen zwischen den drei Gruppen wurden nicht gefunden. Die Gruppe der unbeschichteten K-Drähte wies tendenziell die geringsten Raten an Knochenneubildung auf. Im Durchschnitt waren dies nur 9,31% ± 8,12% (proximal), 1,5% ± 2,51% (diaphysär), 4,03% ± 4,27% (distal) vom jeweiligen AOI.

Die Gentamicin-RGD-HA-Beschichtung zeigte Neubildungsraten des Knochens von 22,6% ± 15,81% des ROIs an der proximalen Metaphyse, 6,01% ± 6,23% des AOIs an der diaphysären und 11,8% ± 11,4% der distalen Metaphyse. Signifikante Unterschiede zur Knochenneubildung gegenüber den beiden anderen Gruppen bestanden nicht.

Region	Gruppe	Mittelwert (%)
Proximal	K-Draht	9,31 ± 8,12
	HA	35,8 ± 22,0
	HA-RGD-Gentamicin	22,6 ± 15,8
Diaphysär	K-Draht	1,5 ± 2,51
	HA	12,1 ± 12,3
	HA-RGD-Gentamicin	6,01 ± 6,23
Distal	K-Draht	4,03 ± 4,27
	HA	25,4 ± 3,97 *
	HA-RGD-Gentamicin	11,8 ± 11,4

\*  $p < 0,05$  gegenüber  
unbeschichtetem K-Draht

Tab. 8: Knochenneubildung in den drei unterschiedlichen Tibiaregionen nach einer Implantationsdauer von 12 Wochen. Die Knochenneubildung wurde als prozentualer Anteil von neugebildeter Knochenfläche an der AOI von  $4\text{mm}^2$  bzw.  $1,49\text{mm}^2$  an der proximalen Metaphyse bzw. distalen Metaphyse gemessen. Die AOI für den Schaftbereich wurde in Abhängigkeit der Länge des erfassten Implantates für jeden Schnitt individuell erfasst.

Im direkten Vergleich der 12 Wochen-Tiere der Gruppen HA mit HA+RGD+Gentamicin sind die berechneten p-Werte bei jedem Schnitt größer 0,05 und somit nicht signifikant.

Die Gentamicin-RGD-Beschichtung lag hinter der Hydroxylapatitbeschichtung zurück. Dieser Trend fiel am stärksten in der distalen Metaphyse im Vergleich der beiden Beschichtungen auf.

### 3.2.1.2 Knochen-Implantat-Kontakt

Nach 12 Wochen zeigten die Dreifachbeschichtung und die Hydroxylapatitbeschichtung im Vergleich zu reinem K-Draht eine statistisch höhere Knochenneubildung auf der Implantatoberfläche als Ausdruck eines verbesserten direkten Knochen-Implantat-Kontaktes. So erreichte die Knochenneubildung in der K-Draht-Gruppe lediglich einen Wert von  $5,28 \pm 9,2\%$  des AOIs, während  $25,1 \pm 19,3\%$  des AOIs bei der HA-RGD-Gentamicin -Gruppe und  $33,8 \pm 12,8\%$  des AOIs bei der HA-Gruppe mit neugebildetem Knochen ausgefüllt war. Dabei lag mit einem p-Wert von 0,03 bzw. 0,04 jeweils ein statistisch signifikanter Unterschied

zwischen der HA-RGD-Gentamicin bzw. der HA-Gruppe gegenüber der unbeschichteten K-Draht-Gruppe vor.

Auch hier mussten wie bei den vorherigen Untersuchungen hohe Standardabweichungen beobachtet werden (Tabelle 9).

	Knochenneubildung auf der Implantatoberfläche in % der Implantatlänge
K-Draht	5,2 ± 9,2
Hydroxylapatit	33,8 ± 12,8*
HA-RGD-Gentamicin	25,1 ± 19,3*

\*  $p < 0,05$  gegenüber  
unbeschichtetem K-Draht

Tab.9: Direkter Knochen-Implantat-Kontakt im Schaftbereich nach einer Implantationsdauer von 12 Wochen als Ausdruck der knöchernen Integration des Implantates. Der Knochen-Implantat-Kontakt wurde gemessen als prozentualer Anteil des direkten Knochenkontaktes zum Implantat an der gesamten Implantatlänge.

### 3.2.1.3 Anzahl der Riesenzellen

In allen Gruppen waren einzelne Riesenzellen zu finden ohne statistisch signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen. Tendenziell kam es bei den Tieren der unbeschichteten K-Draht-Gruppe mit  $1,25 \pm 1,59$  Zellen/mm<sup>2</sup> zu dem geringsten Auftreten von Riesenzellen im Vergleich zu  $2,93 \pm 1,52$  (Tabelle 10).

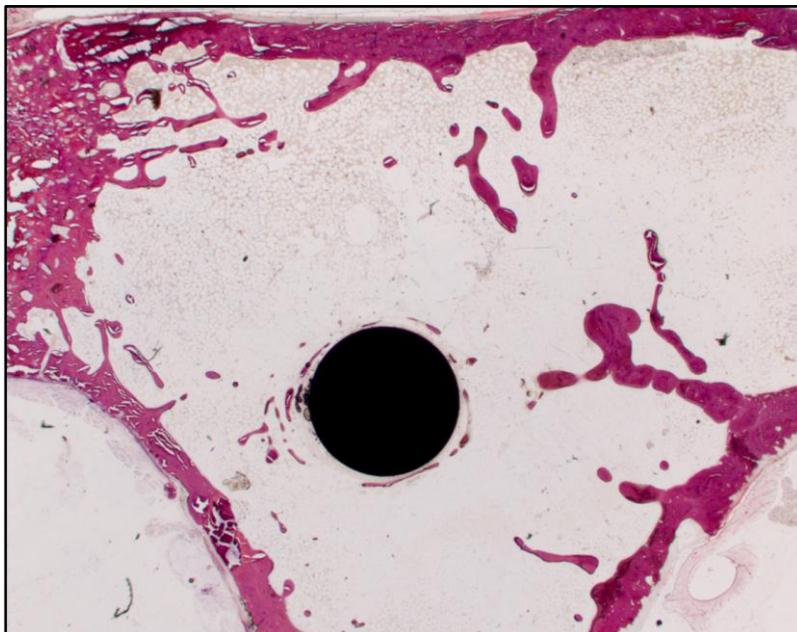
	Anzahl der Riesenzellen/mm <sup>2</sup> im Schaftbereich
Unbeschichteter K-Draht	1,25 ± 1,59
Hydroxylapatit	2,93 ± 1,52
HA-RGD-Gentamicin	3,88 ± 4,13

Tab. 10: Anzahl der Riesenzellen im Knochenmark des Tibiaschaftes nach 12 Wochen.

## 3.2.2. Histologische Ergebnisse

### 3.2.2.1 Unbeschichteter K-Draht

Besonders in der distalen Metaphyse traten Knochenneubildungsprozesse in Form von schmalen Trabekeln hervor. Diese waren jedoch insgesamt gering und breiteten sich von der endostalen Oberfläche aus und richteten sich auf das Implantat aus (Abb.28). Es kam zu keiner vollkommenen knöchernen Integration des Implantats durch den neugebildeten Knochen.



*Abb. 28: Querschnitt im Bereich der proximalen Metaphyse nach 12 Wochen mit unbeschichtetem K-Draht. Geringgradige Knochenneubildung um das Implantat herum mit zumeist fehlendem direkten Knochen-Implantat-Kontakt.*

In vielen Schnitten fand sich ein Bindegewebssaum, der die Implantatoberfläche vom neugebildeten Knochen trennte. Zu einem direkten „bone bonding“ kam es nur selten (Abb. 29).

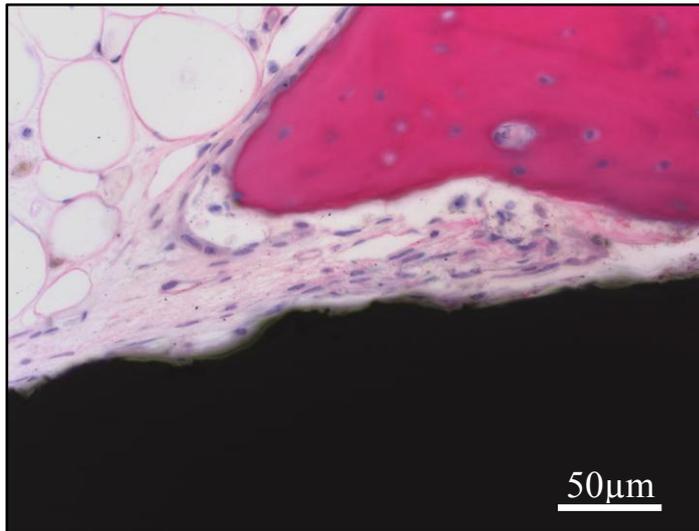


Abb.29: 12 Wochen nach Implantation eines unbeschichteten K-Drahtes Bindegewebeformation um das Implantat herum. Kein direktes „Bone-bonding“ erkennbar.

Das Knochenmark zeigte sich mit Nekroseherden und Fremdkörperriesenzellen, die ein Indiz darauf waren, dass eine Fremdkörperreaktion ablief. Zusätzlich zeigte sich in der Kortikalis eine vermehrte Aktivität von Osteoklasten, die eine Erweiterung der Lumina der Havers'schen Kanäle bewirkten. Für das Bild eines intensiven Remodellings sprachen schmale Osteoidsäume an den Oberflächen der Lankunen der Kanäle sowie deutliche Kittlinien (Abb. 30).

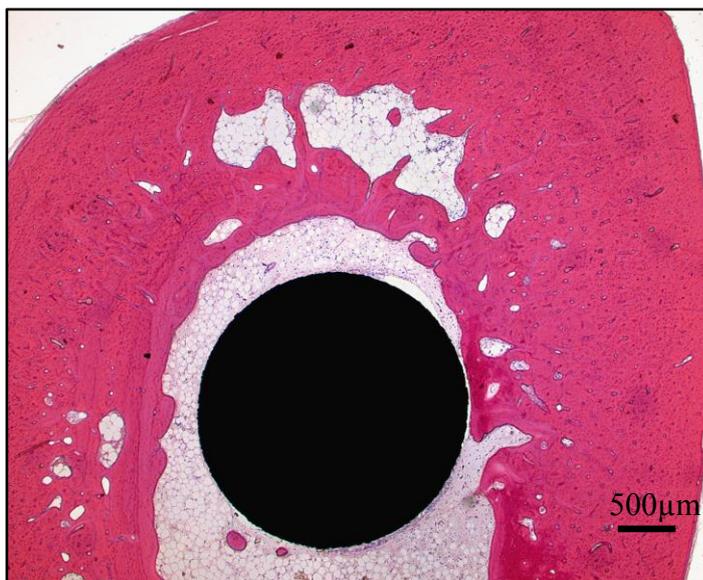


Abb. 30: Hohlräume in der Kortikalis der distalen Metaphyse 12 Wochen nach Implantation eines unbeschichteten K-Drahtes durch Erweiterung der Lumina der Havers'schen Kanäle.

### 3.2.2.2 Hydroxylapatit-Beschichtung

Bei den Schnitten der HA-Beschichtung fiel im direkten Vergleich zum unbeschichteten K-Draht ein deutliches Mehr an Knochenneubildung auf. Hier zeigten sich um das Implantat herum vor allem in den proximalen Schnitten dicke Knochenmanschetten (Abb. 31).

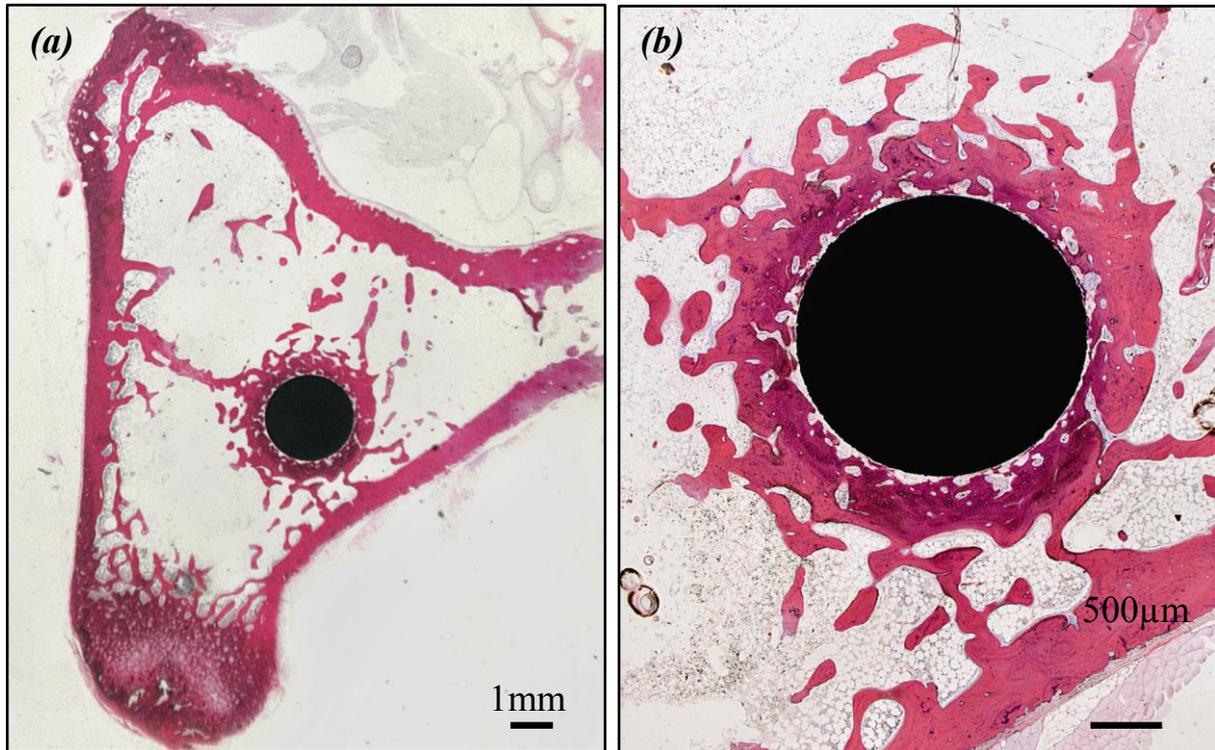
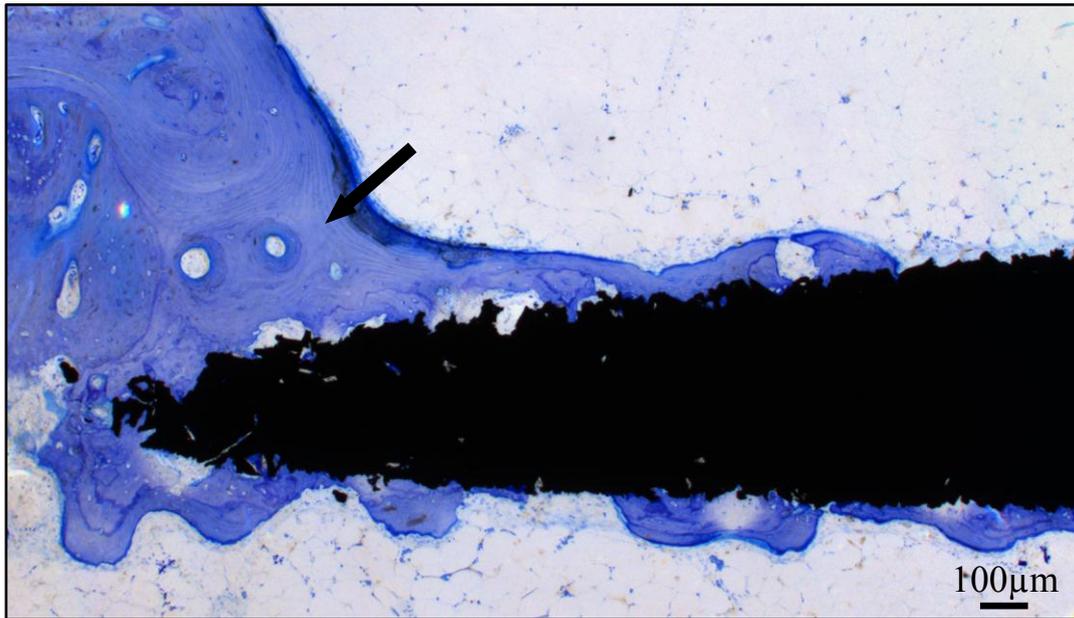


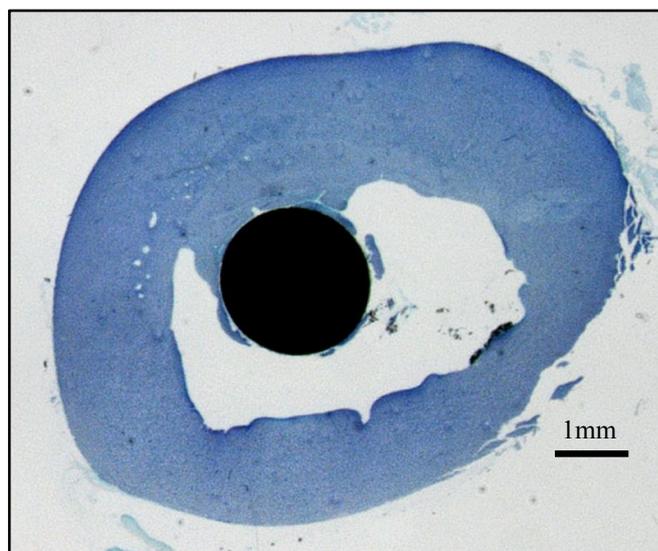
Abb. 31: Knochenneubildung eines HA-beschichteten K-Drahtes in der proximalen Metaphyse nach 12 Wochen. Es zeigt sich eine starke Knochenneubildung, die sich zirkulär um das ganze Implantat erstreckt. Die Knochenneubildung geht dabei vom Endost aus, von dem sich Knochenspannen durch das Knochenmark in Richtung des Implantates ausbreiten (a). In der höheren Vergrößerung lassen sich die intakten Knochentrabekel nachweisen, die vom Endost der Kortikalis ausgehen (b).

Schmalere Knochenbälkchen charakterisierten den diaphysären Abschnitt, die sich jedoch über eine weite Strecke und mit zum Teil direkten Knochen-Implantat-Kontakt präsentierten. Abermals nahm die Knochenneubildung ihren Ursprung von Endost und war auf das Implantat ausgerichtet. Eindrucksvoll war hier der oft zu beobachtende, weitläufige enge Kontakt zwischen neugebildetem Knochen und Implantatoberfläche (Abb. 32).



*Abb.32: Knochen-Implantat-Kontakt in der distalen Metaphyse 12 Wochen nach Implantation eines HA-Implantates. Es besteht bis auf wenige Ausnahmen ein direkter Knochen-Implantat-Kontakt über dem gesamten distalen Implantatanteil. Die aufgelagerten, neu gebildeten Knochen trabekel haben distal Anschluss an die vom Endost ausgehende Knochenneuf ormation.*

Lediglich in direkter Nachbarschaft des Implantates zeigten sich Fremdkörperreaktionen und somit war meistens ein intaktes Knochenmark zu erkennen.



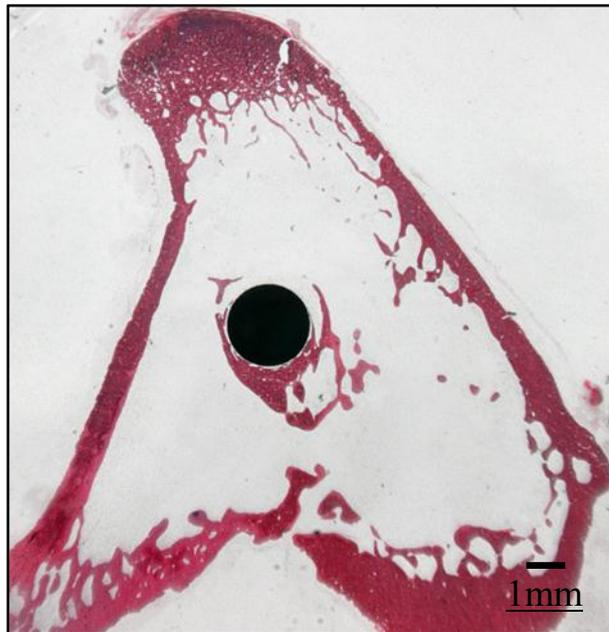
*Abb. 33: Struktur der Kortikalis und Knochenneubildung an der distalen Metaphyse bei einem HA-Implantat nach 12 Wochen. Fast vollständig intakte Kortikalis mit nur minimaler Erweiterung der Havers'schen Kanäle und guter Knochenneubildung in der distalen Metaphyse.*

Insgesamt ließen die Schnitte auf eine gute Biokompatibilität mit fortschreitender Knochenneubildung rückschließen (Abb. 33).

### 3.2.2.3 Gentamicin-RGD-HA-Beschichtung

Hier fielen die proximalen und distalen Schnitte durch Knochenneubildungsprozesse auf (Abb. 34).

An Knochen ließ sich reiferer Lamellenknochen von unreifem Geflechtknochen unterscheiden, die beide häufig nebeneinander lagen. Auch im mittleren Schaftbereich zeigte sich hier der neu gebildete Knochen mit fehlender Mineralisation, ebenso wie in den übrigen Gruppen. Dabei fiel auf, dass es sich hier fast ausschließlich um Bereiche handelte, die sich zwischen Endost und den endostfernen exzentrisch positionierten Implantaten befanden.



*Abb. 34: Knochenneubildung in der proximalen Metaphyse bei RGD-Beschichtung nach 12 Wochen. Breite Knochenspannenbildung um das gesamte Implantat, am deutlichsten in dem Bereich, der dem Endost am nächsten liegt.*

Kürzere Distanzen zwischen Endost und nah gelegenen Implantat waren fast immer von Lamellenknochen umgeben.

Auffällig war weiterhin, dass die Mineralisationsstörungen bei einigen Tieren mit umschriebenen, osteolytischen Bereichen einher gingen (Abb. 35).

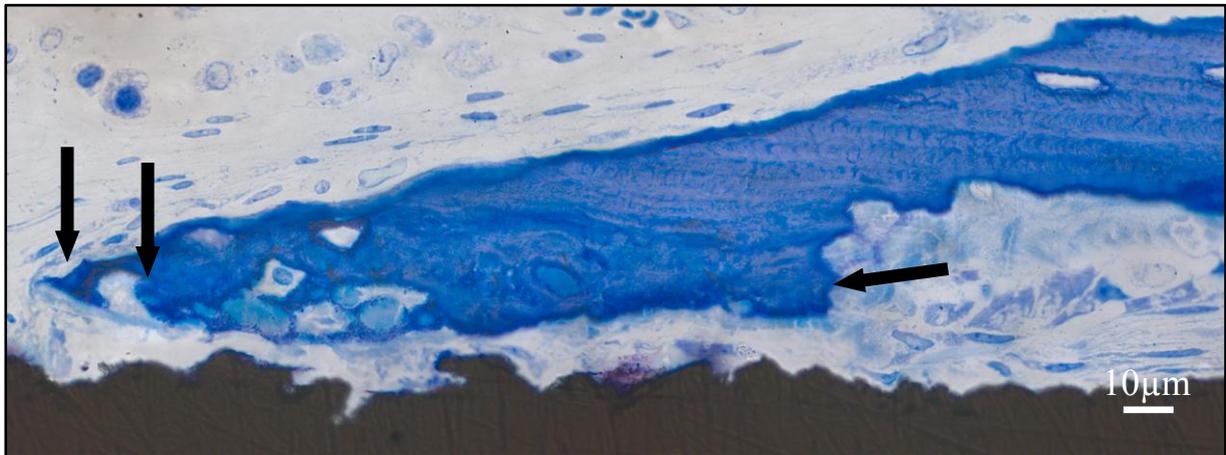


Abb. 35: Osteolytische Reaktion (Pfeile) nach Implantation eines Gentamicin-RGD-HA-beschichteten K-Drahtes am Interface nach 12 Wochen.

Diese lytischen Reaktionen traten sowohl an den Rändern des neugebildeten Knochens auf, als auch in der Interfaceregion zwischen Implantat und Knochen. Sie waren jedoch in ihrer Morphologie und Ausprägung nicht von denen der anderen Beschichtungsgruppen zu unterscheiden. Die Ursache für diese Osteolysen ist nicht bekannt. Es könnte jedoch sein, dass sie durch eine vaskuläre Minderversorgung bei andererseits recht schnellem Wachstum begründet ist.

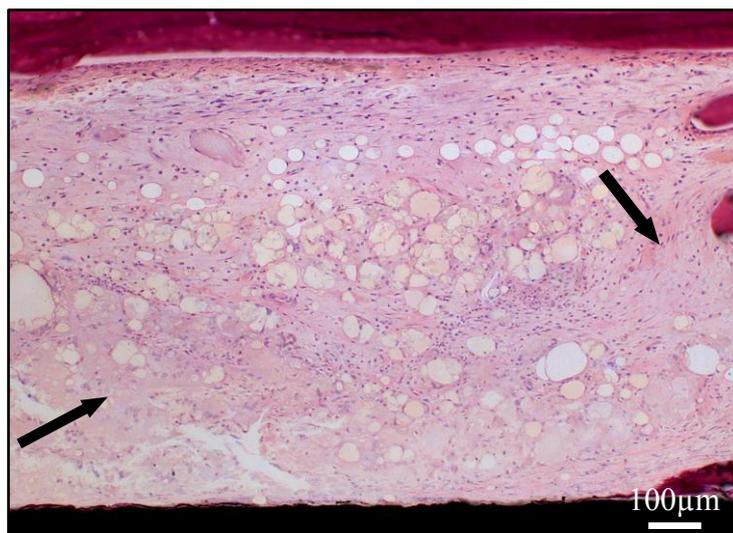


Abb. 36: Knochenmarkreaktion nach Implantation eines Gentamicin-RGD-HA-beschichteten K-Drahtes im mittleren Tibiaabschnitt nach 12 Wochen. Es zeigen sich mehrere Areale einer Knochenmarkfibrose, die mit deutlicher Bindegewebeformation und fehlendem poetischen Fettmarksgewebe einhergehen. Daneben sind einzelne Zonen mit intakter Markstruktur zu erkennen.

Das Knochenmark ist gekennzeichnet von sowohl intakten Strukturen als auch von nekrotischen und bindegewebig durchsetzten Bereichen. Sie sind als Knochenmarksfibrose zu werten und spiegeln die exsudative Myelitis wider, die sich vier Wochen nach Implantation zeigte (Abb. 36).

### **3.2.3 Zusammenfassung der Ergebnisse der 12-Wochen-Tiere**

Die Tiere der 12-Wochen-Langzeitstudie zeigten im Vergleich zu den 4-Wochen-Kaninchen einen Rückgang der Fremdkörper-assoziierten Entzündungsreaktion und auch die Anzeichen für eine Irritation des Periosts waren vollständig zurück gebildet. Die knöcherne Integration war hingegen noch weiter fortgeschritten und die weiterhin intakte Struktur des jungen Knochens, sowie die osteoblastäre Aktivität waren Hinweise darauf, dass die Knochenneubildung noch nicht abgeschlossen war. Es zeigte sich in allen Gruppen reifer Lamellenknochen neben unreifem Geflechtknochen, der meist vom Implantat-nahen Endost ausging. Mit Ausnahme der Gruppe der unbeschichteten K-Drähte fand sich bei den beiden anderen Gruppen oftmals ein direktes „bone bonding“ zwischen Implantat und neugebildetem Knochen.

Im Gegensatz zur Kurzzeitstudie waren Mineralisationsstörungen in der Kortikalis nicht mehr so häufig zu erkennen, wohl aber teilweise im neugebildeten Knochen zu finden. Zusätzlich konnten dort auch Osteolysen gefunden werden. Diese ließen sich in aller Regel dann beobachten, wenn die Strecke zwischen Endost und Implantat verhältnismäßig lang war. Gruppenübergreifend wurden vereinzelt Nekrosen im Markraum gefunden, allerdings präsentierte sich dieser nicht mehr als exsudative Myelitis, es überwiegen vielmehr die Areale an intaktem Knochenmark.

Die Betrachtung der Fremdkörperriesenzellen ergab keinen statistisch signifikanten Unterschied zwischen den Gruppen, sodass man sagen kann, dass keine der Beschichtungen eine verstärkte Fremdkörperreaktion im Vergleich zu unbeschichteten K-Drähten hervorruft. Dabei schienen die Fremdkörperriesenzellen in allen Gruppen vor allem im fibrotischen und nekrotischen Knochenmark aufzutreten und an der Phagozytose des abgestorbenen Knochenmarkgewebes beteiligt zu sein.

In Bezug auf die Knochenneubildung und den direkten Knochen-Implantat-Kontakt bestand zwischen den beiden Beschichtungen kein signifikanter Unterschied. Jedoch zeigte die Hydroxylapatit-Beschichtung im Vergleich zum unbeschichteten K-Draht einen statistisch signifikant höheren Knochen-Implantat-Kontakt im Schaftbereich und bei der Knochenneubildung im distalen Abschnitt.

Die Gentamicin-RGD-Schicht wies tendenziell generell etwas geringere Raten an Knochenneubildung und direktem Implantat-Knochen-Kontakt auf, jedoch ohne statistische Signifikanz zur HA-Beschichtung. Sie zeigte ebenso wie die reine HA-Beschichtung einen statistisch signifikant höheren direkten Knochen-Implantat-Kontakt im Vergleich zu unbeschichteten K-Drähten.

### 3.3 Vergleich der 4 -Wochen- mit den 12 -Wochen-Ergebnissen

#### 3.3.1 Histomorphometrische Ergebnisse

##### 3.3.1.1 Knochenneubildung

Zwischen der 5. und 13. Woche kam es zu einem erheblichen Anstieg der Knochenneubildung. Dies zeigt sich am deutlichsten in der proximalen Metaphyse, wo der Zuwachs an Knochen sowohl bei der HA- ( $p=0,003$ ) als auch bei der Gentamicin-RGD-HA-Gruppe ( $p=0,01$ ) nach 12 Wochen statistisch signifikant im Vergleich zu den 4 Wochen-Tieren war (Tab.11).

Im Schaftbereich war diese Zunahme zwar ebenfalls erkennbar, jedoch ohne statistische Signifikanz. Die Knochenneubildung im distalen Abschnitt war bei den HA-Tieren abermals statistisch signifikant höher als in der Kurzzeitstudie ( $p=0,003$ ). Für die Dreifachkombination bestand keine statistische Signifikanz ( $p=0,23$ ).

Lokalisation	Beschichtung	Knochenneubildung nach 4 Wochen	Knochenneubildung nach 12 Wochen
proximal	HA	0,79±1,07	35,8±22,0*
proximal	Gentamicin+RGD+HA	0,12±0,08	22,6±15,8*
diaphysär	HA	3,97±3,73	12,2±12,3
diaphysär	Gentamicin+RGD+HA	1,78±1,64	6,0±6,23
distal	HA	0,59±0,68	25,4±14,0*
distal	Gentamicin+RGD+HA	4,79±4,20	11,8±11,5

\* $p<0,05$  gegenüber 4-Wochen-Ergebnis innerhalb der Gruppe

Tab. 11: Knochenneubildung nach 4 und 12 Wochen in den drei unterschiedlichen Tibiaregionen. Die Knochenneubildung wurde als prozentualer Anteil von neugebildeter Knochenfläche an der AOI von  $4\text{mm}^2$  bzw.  $1,49\text{mm}^2$  an der proximalen Metaphyse bzw. distalen Metaphyse gemessen. Die AOI für den Schaftbereich wurde in Abhängigkeit der Länge des erfassten Implantates für jeden Schnitt individuell erfasst.

Zusammenfassend kann man festhalten, dass der meiste neue Knochen erst in der 5. bis 13. Woche nach Implantation entstanden ist, unabhängig von der Beschichtung.

### 3.3.1.2 Knochen-Implantat-Kontakt

Auch hier ließ sich nach 12 Wochen eine deutliche Zunahme des Knochen-Implantat-Kontaktes verzeichnen (Tab.12). Wiederum kam es bei der HA-Gruppe zu einer statistisch signifikanten Zunahme des Knochen-Implantat-Kontaktes zwischen der 5. und 13. Woche ( $p=0,001$ ). Auch bei der Gentamicin-RGD-HA-Beschichtung kam es zu einer statistisch signifikanten Zunahme ( $p=0,04$ ).

	Beschichtung	Knochenneubildung auf der Implantatoberfläche in % der Implantatlänge nach 4 Wochen	Knochenneubildung auf der Implantatoberfläche in % der Implantatlänge nach 12 Wochen
Schaftbereich	HA	7,89±6,8	33,8±12,8*
Schaftbereich	Gentamicin+ RGD+HA	3,87±4,5	25,1±19,3*

\* $p<0,05$  gegenüber 4-Wochen-Ergebnis innerhalb der Gruppe

Tab.12: Direkter Knochen-Implantat-Kontakt im Schaftbereich nach 4 und 12 Wochen als Ausdruck der knöchernen Integration des Implantates. Der Knochen-Implantat-Kontakt wurde als prozentualer Anteil des direkten Knochenkontaktes zum Implantat an der gesamten Implantatlänge gemessen.

### 3.3.1.3 Anzahl der Riesenzellen

Beim 4- zu 12-Wochen-Vergleich ließ sich kein statistisch signifikanter Unterschied bei der Anzahl der Riesenzellen in beiden Gruppen feststellen (Tab.13).

	Beschichtung	Anzahl der Riesenzellen/mm <sup>2</sup> nach 4 Wochen	Anzahl der Riesenzellen/mm <sup>2</sup> nach 12 Wochen
Schaftbereich	HA	3,33±2,36	2,93±1,52
Schaftbereich	Gentamicin+ RGD+HA	3,76±3,71	3,88±4,13

Tab.13: Anzahl der Riesenzellen im Schaftbereich nach 4 und 12 Wochen.

### **3.3.2 Zusammenfassung der histomorphometrischen Ergebnisse im 4- zu 12-Wochen-Vergleich**

Im direkten Vergleich der Standzeiten 4 und 12 Wochen fällt auf, dass sowohl in Bezug auf die Knochenneubildung als auch auf den direkten Knochen-Implantat-Kontakt deutlich höhere Werte nach 12 Wochen in beiden Gruppen erzielt werden konnten. In zwei von drei erfassten Schnitthöhen waren bei der Hydroxylapatit-Beschichtung statistisch signifikante Unterschiede zu beobachten, während im Schaftbereich nach 12 Wochen dies im Vergleich zu den 4-Wochen-Ergebnissen nicht der Fall war. Bei der Kombinationsbeschichtung Gentamicin-RGD-HA wurde lediglich im proximalen Metaphysenbereich eine statistische signifikante Zunahme bei der Knochenneubildung nach 12 Wochen im Vergleich zu den 4-Wochen-Ergebnissen erreicht. Beide Beschichtungen konnten eine statistisch signifikante Zunahme beim Knochen-Implantat-Kontakt erzielen.

Die Betrachtung der Anzahl der Fremdkörperriesenzellen ergab keinen Unterschied von der 5. bis 13. Wochen nach Implantation.

## 4. Diskussion

Die Notwendigkeit einer gelenkersetzenden Endoprothese tritt immer häufiger auf, sei es arthrosebedingt oder aus anderen Gründen. Die jährliche Zahl an Endoprothese-Operationen wird von Elmengaard weltweit pro Jahr auf 1 Million geschätzt (Elmengaard et al., 2005), etwa die Hälfte davon fallen nach Angaben von Breusch (Breusch et al., 2000) auf Europa, davon wiederum 150.000 allein auf Deutschland.

Kommt es im Verlauf dieses Therapieverfahrens zu den Komplikationen der Lockerung oder der Infektion, so stellt dies sowohl für den behandelnden Arzt als auch für den Patienten ein großes Problem dar.

Begünstigende Faktoren für die frühzeitige Lockerung von Endoprothesen sind technisch fehlerhaftes Einbringen der Gelenkkomponenten oder falsche Implantatgrößenwahl. Bei der Verwendung von zementierten Prothesen kann auch eine fehlerhafte Zementiertechnik zu Rissen mit nachfolgender Instabilität im Zement führen. Vergleichsweise dazu steht bei den nicht-zementierten Prothesen die ungenügende knöcherne Integration der Implantate, z.B. durch zu frühe Belastung oder nachteilhafte Oberflächenbeschichtung.

Protheseninfektionen, die mit einer Inzidenz zwischen 1-3 % bei Primäreingriffen bei Hüft- bzw. Knieprothesenoperationen auftreten, gehören zu den gefürchteten Komplikationen in der Endoprothetik (Ewald et al., 2006). Sie entstehen pathophysiologisch vornehmlich durch intraoperative bakterielle Kontamination des OP-Situs, durch sekundäre Wundheilungsstörungen, oder aber auch durch hämatogene Streuung von Bakterien aus gänzlich anderen Herden im Körper (Siopack et al, 1995., Ewald et al., 2006).

Die beiden häufigsten Erreger, die bei Protheseninfektion mikrobiell nachgewiesen werden, sind *Staphylococcus epidermidis* und *Staphylococcus aureus* (Ellington et al., 2003; Fitzgerald et al., 1973; Nielson et al., 1996; Nijhof et al. 2000).

Die Beschichtung von Endoprothesen-Implantaten mit biologisch aktiven Substanzen ist ein viel versprechender Ansatz, um zum einen die Infektionsprophylaxe und zum anderen die knöcherne Integration zu verbessern.

In der vorliegenden Studie wurde eine Gentamicin-RGD-HA-Beschichtung, für die bereits ein *in vivo* Nachweis der Verbesserung der Infektionsprophylaxe erbracht wurde (Alt et al., 2006), bezüglich ihrer Knochenneubildungseffekte und Biokompatibilität im Vergleich zu einer reinen HA-Standardbeschichtung untersucht. Die Hypothese der Arbeit war, dass ein

eventuell negativer Einfluss von Gentamicin der Kombinationsbeschichtung auf die Knochenneubildung durch die zusätzliche RGD-Beschichtung kompensiert werden kann, so dass es insgesamt zu keinen Unterschieden im Vergleich zur HA-Gruppe kommt.

#### **4.1 Vor- und Nachteile lokaler Antibiotikaprofylaxe in der Endoprothetik**

Heutzutage zählt die systemische Applikation von Antibiotika zur Infektionsprophylaxe bei Endoprothesen zum Goldstandard (Engesaeter et al., 2003; Hanssen et al., 1997; Marcellscu und Osmon, 2005; Ruchholtz et al., 2004). Das Antibiotikum Cephazolin erfüllt dabei die Anforderungen der guten Verträglichkeit, des breiten Wirkspektrums (v.a. gegen Staphylokokken), der langen Halbwertszeit und der guten Weichteil- und Knochengängigkeit (Marcellscu und Osmon, 2005) und wird deshalb häufig verwendet. Hierzu berichten Engesaeter et al., dass die beste Infektionsprophylaxe sich durch eine viermalige Gabe des Antibiotikums am Operationstage erzielen lässt (Engesaeter et al., 2003).

In Europa ist der Einsatz von Antibiotika-beladenem Knochenzement im Sinne der lokalen Antibiotikaprofylaxe ebenfalls Standard bei Endoprothesen-Implantationen (Lidgren, 2001). Wahlig und Dingeldein konnten in ihrer experimentellen Studie gute Ergebnisse für die Verwendung von Antibiotikum beladenem Zement plus einer i.v.-Antibiose ermitteln (Wahlig und Dingeldein, 1980; Wahlig, 1987), was auch Buchholz und Engelbrecht in ihrer klinischen Untersuchung bestätigten (Buchholz und Engelbrecht, 1970).

Bereits 85% der Operateure in Schweden verwenden in den Jahren vor 1993 Antibiotikazement als Infektionsprophylaxe bei Primärimplantationen von Hüftprothesen (Malchau et al., 1993).

Besonders in den USA wird jedoch auch heutzutage eine lokale Infektionsprophylaxe durch Antibiotikazement bei der Primärimplantation von Hüftprothesen abgelehnt (Jiranek et al., 2006; Hanssen und Osmon, 1999). Begründet wird dies durch das Fehlen eindeutiger, klinischer, randomisierter, prospektiver und kontrollierter Studien, die eine Überlegenheit von lokaler Antibiotikaprofylaxe einer systemischen Applikation gegenüber beweisen können.

Die hierzu existierenden Studien konstatieren beispielsweise nur eine zeitlich begrenzte Überlegenheit der lokalen Darreichungsform. So zeigte die Studie von Joseffson und Kolmert an 1688 primären Hüftimplantationen in der ersten 5 Jahren nach Implantation eine statistisch signifikante bessere Prophylaxe von Antibiotikazement im Vergleich zu Antibiotika freiem Zement, der nach weiteren 5 Jahren nicht mehr nachweisbar war (Joseffson und Kolmert, 1993).

Eine weitere Arbeit von McQueen et al. aus dem Jahre 1987 untersuchte an 295 Hüft- und Knieimplantationen die Wirkung von Cefuroxim im Zement. Hier konnte sich keine Überlegenheit gegenüber der rein systemischen Antibiose zeigen lassen, wobei die Gruppe mit der Cefuroxim-Zement-Kombination keine systemische Antibiose erhielt (McQueen et al., 1987). Anzumerken ist hierbei, dass die alleinige lokale Antibiose keine klinische Relevanz hat.

Eine dritte Studie hierzu mit 340 Primärknieprothesen konnte eine statistisch signifikante Infektreduktion von 3,1% ohne Antibiotikazement auf 0% in der Gruppe mit Cefuroxim-beladenem Zement feststellen. Beide Gruppen erhielten für 7 Tage die gleiche Kombination aus oraler und systemischer Antibiose mit Gentamicin und Cephazolin (Chiu et al., 2001).

Auch konnte aus dem Norwegischen Hüftprothesenregister aus einer retrospektiv angelegten Analyse von 22.000 Hüftprothesen entnommen werden, dass mit Antibiotikum beladener Knochenzement in Kombination zur systemischen Applikation signifikant besser zur Infektprophylaxe diene als die systemische Gabe allein (Engesaeter et al., 2003). Insgesamt konnte die Überlebensrate der Prothesen innerhalb der ersten 10 Jahre damit verbessert werden.

Ebenfalls retrospektiv beobachtete Malchau et al. 2003 an 92.675 Hüft- und Knieprothesen eine signifikante Infektreduktion durch Beimengen von Antibiotika zum Zement, sowohl bei Primär- als auch bei Revisionsoperationen (Malchau et al., 2003). Allerdings muss fest gehalten werden, dass auch in den Gruppen ohne Antibiotikazement eine Infektreduktion aufgrund von verbesserten anderen Infektionsprophylaxen in den Jahren 1987 bis 1990 zu verzeichnen war (Jiranek et al. 2006; Lidgren et al., 2001).

Unter Berücksichtigung dieser Datenlage ist eine Anwendung von Antibiotika beladenem Zement bei der Primärimplantation von Hüftprothesen, wie sie in Europa bereits geschieht, durchaus zu rechtfertigen.

Bei der lokalen Anwendung von Antibiotika in der zementfreien Endoprothetik müssen Vor- und Nachteile berücksichtigt werden.

Alt et al. konnten in ihrer tierexperimentellen Studie an Kaninchen eine signifikante Infektreduktion für Gentamicin-Beschichtungen auf K-Drähten im Vergleich zu unbeschichteten K-Drähten ermitteln (Alt et al., 2006). Hierbei wurde das Antibiotikum durch ein plasma-spray-Verfahren direkt auf das Implantat aufgebracht.

Auch Darouiche et al. konnten ähnliche Ergebnisse in ihrer tierexperimentellen Studie mit Rifampicin-Monocyclin auf Titanschrauben erzielen. Es zeigte sich eine statistische signifikante Infektreduktion bei Rifampicin-Monocyclin beschichteten Schrauben im Vergleich zu unbeschichteten Schrauben (Darouiche et al., 2007).

Die Nachteile von Antibiotikabeschichtungen oder Antibiotikazement werden unter anderem in einer möglichen Resistenzbildung gesehen, die vor allem durch subinhibitorische Konzentrationen begründet werden (Kendall et al., 1995; Kendall et al., 1996; Neut et al., 2003; Ramage et al., 2003; Thomes et al., 2002; van de Belt et al., 2001).

Das Auftreten von allergischen Reaktionen ist in der Literatur bislang nicht beschrieben, lediglich eine Reaktion auf PMMA, bei der auch Gentamicin mit beigemischt war, lässt sich in diesen Zusammenhang nennen (Richter-Hintz et al., 2004).

Einen weiteren Kritikpunkt beschreiben Arciola et al. in ihren Untersuchungen, bei denen sie zeigen konnten, dass die Empfänglichkeit von Bakterien für bestimmte Antibiotika nach der Adhäsion auf der Knochenzementoberfläche stark abnimmt. So erwies sich in ihrer *in vitro* Studie der PMMA-Zement als guter Substratboden für Keime, trotz der Antibiotikabeschichtung (Arciola et al., 2000).

Ein anderer Aspekt ist die mögliche schädigende Wirkung der verwendeten Substanzen auf einige Zellreihen, vor allem bei der Knochenneubildung und knöchernen Integration von Implantaten. Eine potentiell zytotoxische Wirkung einiger Antibiotika könnte z.B. der wichtigen und notwendigen knöchernen Integration von Implantaten entgegenwirken. Dies soll in einem anderen Abschnitt näher erläutert werden.

## **4.2 Antimikrobielle Beschichtungen für zementfreie Endoprothesen**

In der Endoprothetik werden bereits Beschichtungen, die die knöcherne Integration verbessern, wie zum Beispiel Hydroxylapatit, verwendet. Eine weitere Überlegung ist es, eine Antibiotikum-Schicht, die der Verbesserung der Infektionsprophylaxe dienen soll, zusätzlich auf das Implantat aufzubringen. Hierbei kann es jedoch zu Wechselwirkungen zwischen den einzelnen Beschichtungen kommen.

Von Bedeutung ist hier die Art und Weise, mit der die Schichten aufgebracht werden. Als gängiges Verfahren, z.B. bei der Hydroxylapatit-Beschichtung, dient das Plasma-Spray-Coating, mit dem die Beschichtungen auf das Implantat „aufgesprüht“ werden. Bei diesem Verfahren kommt es zu einer erheblichen Hitzebildung, welche beispielsweise Antibiotika deaktiviert (Stigter et al., 2002).

1997 versuchten Radin et al. Titan-Testkörper, die zuvor mit einer Keramik-Schicht überzogen worden waren, zusätzlich mit Vancomycin zu beschichten. Dazu wurden die Titan-Testkörper mit einer Schichtdicke von 50-80 µm in eine Vancomycin-Lösung mit unterschiedlichen Konzentrationen (1mg/ml bzw. 10mg/ml) bei 37° für 6-25 Stunden eingetaucht. Anschließend erfolgte in einem Agar-Platten-Test die Untersuchung der Freisetzungskinetik, die jedoch lediglich eine Wirksamkeit von 24 Stunden ergab. Auch eine zusätzliche Lipid-Beschichtung konnte dieses Ergebnis nur auf 72 Stunden ausdehnen (Radin et al., 1997). Dass eine solche Lipidschicht eine negative Auswirkung auf die osteoinduktiven Eigenschaften der Keramik-Beschichtung haben kann, stellten Stigter et al. fest (Stigter et al., 2004). Auch Alt et al. fanden heraus, dass die Osteoblasten durch die zusätzliche Lipidschicht nur erschwert in die interkonnektierenden Poren einwandern können, da diese eine Art Barriere darstellt (Alt et al., 2004c).

Stigter et al. selber untersuchten mit Calcium-Phosphat beschichtete Titanium-Implantate, die eine Zusatzbeschichtung mit Tobramicin-Calcium-Phosphat erhielten. Durch die verwendete Lösung von 0-800 mg/l bei 37° erhielten die Implantate eine Konzentration von 3µg/mg Tobramicin an der Oberfläche bei einer HA-Keramik-Schichtdicke von 40 µm. Dabei war durch eine Co-Präzipitation eine höhere Konzentration erreicht worden als dies mit einer Eintauch-Lösung möglich gewesen wäre. Weiterhin konnte für das abgegebene Tobramicin eine Wirksamkeit gegen *Staphylococcus aureus* nachgewiesen werden (Stigter et al., 2002).

Bei weiteren Untersuchungen dieses „biomimetischen“ Coatings fanden Stigter et al. heraus, dass Antibiotika mit einer Carboxyl-Gruppe wie etwa Cefamandol, Cephalothin und Carbenicillin eine längere und bessere Freisetzungskinetik aufwiesen und gegen *Staphylococcus aureus* wirksam waren (Stigter et al., 2002).

Zwei Studien zu Fixateure extern-Verfahren existieren von Campbell et al., und DeJong et al. mit Chlorhexidin. Dabei ist jedoch Chlorhexidin bekanntermaßen toxisch und die Modelle des Fixateure extern können nicht auf zementfreie Prothesenmodelle übertragen werden (Campbell et al., 2000; DeJong et al., 2001).

Darouiche et al. erzielten in ihrer tierexperimentellen Arbeit an Kniegelenken von Kaninchen mit Rifampicin-Monocyclin-beschichteten Implantaten eine statistische signifikante Infektreduktion gegenüber unbeschichteten Implantaten (Darouiche et al., 2007). Auch Moojen et al. konnten in ihrer Tierinfektionsstudie die Wirksamkeit einer Tobramycin-Periaptit-Beschichtung nachweisen (Moojen et al., 2007).

### 4.3 Lokale Toxizität von Gentamicin - Wirkung von Gentamicin auf die Knochenneubildung

Gentamicin weist eine gute antimikrobielle Wirksamkeit beim Einsatz als lokale Antibiotikaphylaxe auf. Jedoch sind die Auswirkungen auf Knochenneubildungsvorgänge nicht eindeutig geklärt. Zwar gibt es klinisch keine eindeutigen Anhalte für eine mögliche Toxizität auf Osteoblasten, jedoch beschreiben diverse Autoren – vornehmlich in *in vitro* Studien - eine schädigende Wirkung.

In ihren *in vitro* Untersuchungen fanden Düwelhenke et al. 2007, Edin et al. 1996, Isefuku et al. 2003 und Miclau et al. 1995 heraus, dass Cephazolin und Vancomycin (Edin et al., 1996) ab Konzentrationen  $>10.000\mu\text{g/ml}$  bei Osteoblastenzelllinien zum Zelltod führen konnten. Auch für Gentamicin fand Isefuku (Isefuku et al, 2003) bei Konzentrationen über  $100\mu\text{g/ml}$  und 4 Tage langer Inkubation eine Abnahme der Aktivität der alkalischen Phosphatase und der  $^3\text{H}$ -Thymidin-Aufnahme humaner Osteoblasten. Miclau et al. verwendete in seiner Studie Tobramicin und kam ab Konzentrationen  $> 400\mu\text{g/ml}$  zu dem Ergebnis, dass es anfangs zu Störungen in der Zellreplikation und in ansteigender Konzentration  $> 10.000\mu\text{g/ml}$  auch zum Zelltod kam (Miclau et al., 1995).

Lediglich Düwelhenke et al. stießen in ihren Studien mit Gentamicin, Streptomycin und Tobramicin bei Konzentration bis zu  $400\mu\text{g/ml}$  auf keinerlei negativen Effekt auf die metabolische Aktivität primärer humaner Osteoblasten.

*In vivo* Studien zu diesem Thema beschränken sich jedoch bislang auf die systemische Antibiotikagabe und deren Auswirkung auf Frakturheilungen (Haleem et al., 2004, Perry et al., 2003 und Huddleston et al., 2000), weshalb eine Übertragbarkeit auf die knöcherne Integration bei lokalen Antibiotikabeschichtungen nicht oder nur geringfügig gewährleistet ist.

Wodurch dieser Effekt des Gentamicins hervorgerufen wird, bleibt unklar. Mögliche Ursachen können lysosomale Akkumulation mit nachfolgenden Rupturen von Zellen oder auch eine Überladung der Zelle mit dem Antibiotikum sein, die zur Apoptose führt (Servais et al., 2005). Eine Erhöhung der Permeabilität an der Niere ist bereits von Silverblatt et al. beschrieben (Silverblatt und Kuehn, 1979).

Ein ähnlicher Pathomechanismus wie bei der Nephro- und Ototoxizität bei Gentamicin scheint eher unwahrscheinlich, da die spezifischen Megalin-Rezeptoren am Knochen nicht vorkommen (Moestrup et al., 1995; Schmitz et al., 2002).

Davey et al. und auch Ward et al. hingegen sprechen in ihren Arbeiten ebenfalls von einer induzierten Apoptose, die durch Ca-Rezeptoren oder auch Mitochondrien eingeleitet wird (Davey et al., 1970; Ward et al., 2005).

Nach Betrachtung der statistischen und histologischen Ergebnisse der zu Grunde liegenden Arbeit fand sich kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen der Gentamicin-RGD-HA Beschichtung und der reinen HA-Beschichtung bezüglich Knochenneubildung, Knochen-Implantat-Kontakt oder Auftreten von Fremdkörperriesenzellen. Somit kann von einer Nichtbeeinträchtigung der knöchernen Neubildung und bei der knöchernen Implantintegration durch die Gentamicin-RGD-HA ausgegangen werden.

Bei beiden Beschichtungen war detailhistologisch ein Nebeneinander unterschiedlich reifer Knochenstrukturen nachzuweisen. Dabei kam sowohl Geflechtknochen als auch Lamellenknochen vor. Auch formierte sich der neu gebildete Knochen gruppenübergreifend vom Endost nahe dem Implantat aus.

Auch die Betrachtung der Fremdkörperriesenzellen ergab zwischen den Beschichtungen keine statistisch signifikanten Unterschiede. Das Auftreten der Riesenzellen selbst, welches zumeist im nekrotischen und ödematösen Bereich des Knochenmarkes vorkam, lässt sich am ehesten als eine lokale Reaktion auf das Operationstrauma an sich erklären. So ist es auch bereits bei Willert und Buchhorn beschrieben (Willert und Buchhorn, 1999).

Andererseits sind auch Untersuchungen bekannt, in denen ein Abrieb vom HA zur Entstehung von Fremdkörperriesenzellen diskutiert wird (Gottlander et al., 2007). Es würde als Erklärung dafür dienen, dass auch in dieser Studie in den Gruppen, in denen HA verwendet wurde, eine größere Anzahl an Fremdkörperriesenzellen als im Vergleich des unbeschichteten K-Drahtes gefunden wurde. Die Unterschiede waren jedoch nicht statistisch signifikant.

#### **4.4 Effekt der RGD-Beschichtung**

In den meisten Studien zu RGD-Beschichtungen lässt sich eine vorteilhafte Wirkung durch RGD auf die knöcherne Integration von Implantaten finden (Bernhardt et al., 2005; Elmengaard et al., 2005a und b; Ferris et al., 1999; Kroese-Deutmann et al., 2005; Rammelt et al., 2006; Schliephake et al., 2005). Doch in der vorliegenden Arbeit konnte bei der Gentamicin-RGD-HA weder in der 4-Wochen noch in der 12-Wochen-Gruppe ein statistisch signifikant erhöhtes Knochenwachstum durch RGD gemessen werden.

In der Arbeit von Ferris et al. wurden bei Ratten intramedulläre Testkörper aus Titan jeweils mit und ohne RGD-Beschichtung implantiert und einmal nach 14 und nach 28 Tagen analysiert. Es zeigte sich eine statistisch signifikante Knochenneubildung jedoch ohne bessere biomechanische Ausreißfestigkeit in der Gruppe der RGD-Beschichtung.

In ihren beiden Versuchen an einem Kaninchen- und einem Hundemodell erhielt auch Elmengaard et al. eine statistisch signifikante höhere Knochenneubildung und verbesserte Schersteifigkeit mit der RGD-Beschichtung bei Titan-Implantaten im Vergleich zu unbeschichteten Implantaten (Elmengaard et al., 2005a und 2005b).

Rammelt et al. zeigten in ihrem Rattenmodell ebenfalls, dass eine RGD-Beschichtung von Titanium-K-Drähten nach 28 Tagen einen besseren direkten Knochen-Implantat-Kontakt aufwies als nicht beschichtete K-Drähte. Auch hier waren die Ergebnisse statistisch signifikant (Rammelt et al., 2006).

An einem Ziegenmodell untersuchten Bernhardt et al. nach 5 und nach 12 Wochen die knöcherne Integration von unbeschichteten und mit RGD-beschichteten Titaniumimplantaten. Ihre Resultate wiesen ebenso eine statistisch signifikante Differenzen zugunsten der RGD-Beschichtung auf, genauso wie die zahnmedizinische Arbeit von Kroese-Deutmann et al. (Bernhardt et al., 2005; Kroese-Deutmann et al., 2005; Schliephake et al., 2005).

Der größte Unterschied dieser Studien liegt darin, dass in der vorliegenden Arbeit nicht eine Beschichtung mit RGD allein sondern eine Kombination aus Hydroxylapatit plus Gentamicin untersucht wurde. Das RGD wurde hier als Zusatzschicht auf eine HA-Grundierung aufgebracht und zusätzlich noch mit Gentamicin kombiniert. Dies könnte als Erklärung für eine fehlende Überlegenheit bei der Knochenneubildung der Gentamicin-RGD-HA-Beschichtung im Verhältnis zur reinen HA-Beschichtung dienen. Bereits Hydroxylapatit allein weist einen relativ starken Effekt der Knochenneubildung bei Implantaten auf. Verschiedene Studien haben gezeigt, dass HA zu einer frühzeitigen Adhäsion von Osteoblasten und direkter Knochenanlagerung auf Implantatoberflächen führt (Pazzaglia et al., 1998; Stephenson et al., 1991; Søballe et al., 1990; Søballe et al., 1991; Roessler et al., 2001).

## 4.5 Ausblick

Auch in den kommenden Jahren wird die Zahl an Prothesenimplantation weiter steigen. Grund dafür sind unter anderem die steigende Lebenserwartungen aber auch der höhere Gesamtanteil an älteren Personen an der Bevölkerung.

In der Endoprothetik ist dabei von Bedeutung, Infektionen zu verhindern und die knöchernen Integration zu verbessern. Dies lässt sich sowohl in der zementierten als auch in der zementfreien Endoprothetik mit systemischen und lokalen Antibiotikaapplikationen bewirken. Besonders bei den zementfreien Operationsverfahren bieten sich Antibiotikabeschichtungen an. In der vorliegenden Arbeit wurde eine Gentamicin-RGD-HA-Beschichtung untersucht, die bereits in einem *in vivo* Tiermodell eine Verbesserung der Infektionsprophylaxe zeigen konnte. Bei Antibiotikabeschichtungen muss jedoch ein negativer Einfluss auf die knöchernen Integration des Implantates durch das Antibiotikum ausgeschlossen werden.

Als Alternative zu Antibiotikabeschichtungen könnten zum Beispiel Substanzen wie Silber dienen, die ein noch breiteres Wirkspektrum als die meisten Antibiotika besitzen und bereits zur Wasserreinigung und als Crèdè-Prophylaxe eingesetzt werden (Leaper, 2006; Crede, 1894). In einer Arbeit über nanopartikuläres Silber und dessen gute antimikrobielle Wirksamkeit gegen MRSA und MRSE konnte ebenfalls bereits berichtet werden (Alt et al., 2004a und 2004b). Aufgrund dieser Resultate sind bereits einige Osteosynthesematerialien mit der Silbertechnologie in Erprobung (Alt et al., 2006b). Auch hier muss jedoch weiteres Augenmerk auf das knöchernen Integrationsverhalten gelegt werden.

Die Entwicklung und der klinische Einsatz von „biologisch aktiven Implantaten“, die nicht mehr nur als bloße, biomechanische Stabilisatoren wirken, sondern über ihre Beschichtungen zu einer Verbesserung der Infektionsprophylaxe und knöchernen Implantintegration führen, ist abzusehen.

## **5. Zusammenfassung**

Antimikrobielle Beschichtungen für zementfreie Endprothesen versprechen eine Verbesserung der Infektionsprophylaxe. Jedoch muss eine Störung der wichtigen knöchernen Integration der Prothese durch das freigesetzte Antibiotikum bei solchen Beschichtungen unbedingt ausgeschlossen werden. Für eine Gentamicin-RGD-HA-Beschichtung konnte vor kurzem eine statistisch verbesserte Infektprophylaxe in einem Kaninchenmodell im Vergleich zu einem Gentamicin-freien Implantat nachgewiesen werden. Das Ziel der vorliegenden Arbeit war, die Knochenneubildung, Implantatintegration und die Biokompatibilität dieser Gentamicin-RGD-HA-Beschichtung im Vergleich zu einer reinen HA-Beschichtung in einem Kaninchenmodell zu untersuchen. Für die Studie wurden 39 Tiere operiert, von denen jeweils 6 Tiere für die Gentamicin-RGD-HA-Beschichtung und die HA-Beschichtung für den 4-Wochen-Untersuchungszeitpunkt verwendet wurden. Bei der Langzeitstudie mit einer Beobachtungsdauer von 12 Wochen befanden sich jeweils 9 Tiere in den drei Untersuchungsgruppen: Gentamicin-RGD-HA-, HA- bzw. unbeschichteter K-Draht-Gruppe. Es wurde bei allen Tieren ein 2,0 mm durchmessender Stahl-K-Draht mit der entsprechenden Beschichtung bzw. unbeschichtet laut Vorgabe der Randomisierungsliste in den Tibiamarkkanal implantiert. Nach 4 und 12 Wochen wurden die Tiere euthanasiert und drei verschiedene anatomischen Regionen der Tibia (proximale Metaphyse, Schaftbereich, distale Metaphyse) wurden bezüglich Knochenneubildung, direktem Knochen-Implantat-Kontakt und Anzahl von multinukleären Riesenzellen quantitativ und qualitativ analysiert. Es kam zu keinen statistisch signifikanten Differenzen zwischen der Gentamicin-RGD-HA- und der HA-Beschichtung bei der Knochenneubildung, beim direktem Knochen-Implantat-Kontakt oder bei der Anzahl von multinukleären Riesenzellen nach 4 oder 12 Wochen. Sowohl die Gentamicin-RGD-HA-Beschichtung als auch die HA-Beschichtung zeigten einen signifikant höheren Knochen-Implantat-Kontakt nach 12 Wochen im Vergleich zu der Gruppe des unbeschichteten K-Drahts. Im detailhistologischen Vergleich zeigten sich sowohl in der Gentamicin-RGD-HA- als auch in der HA-Gruppe Knochenformationsprozesse, die vom Endost ihren Ausgang nahmen, ohne markante Differenzen zwischen den beiden Gruppen. Somit kam es zu keinen signifikanten Unterschieden zwischen der Gentamicin-RGD-HA- und der HA-Gruppe, sodass von einer guten Biokompatibilität der Gentamicin-RGD-HA-Beschichtung ausgegangen werden kann.

## 6. Summary

Antimicrobial coatings are interesting for the improvement of infection prophylaxis in cementless joint arthroplasty. However, those coatings must not interfere with the essential bony integration of the implants. Gentamicin-RGD-(Arginin-Glycin-Aspartat)-HA-coating could recently be shown to significantly reduce infection rates in a rabbit infection prophylaxis model compared to gentamicin-free implants. The purpose of the current study was to investigate *in vivo* effects of gentamicin-RGD-HA coatings on new bone formation, implant integration and biocompatibility in a rabbit model. There were 39 rabbits in total with 6 animals for the gentamicin-RGD-HA group and the pure HA-coating control group for the 4 week time period, respectively. For the 12 week observation period 9 animals were used for each of the three groups, respectively. A 2.0mm steel K-wire with the respective coating was placed into the intramedullary canal of the tibia. After 4 and 12 weeks the tibiae were harvested and three different areas of the tibia (proximal metaphysis, shaft area, distal metaphysis) were assessed for quantitative and qualitative histology for new bone formation, direct implant bone contact and formation of multinucleated giant cells. There was no statistically significant difference between the gentamicin-RGD-HA group and the pure HA-coating control group in new bone formation, direct implant contact or number of multinucleated giant cells after 4 or 12. Both the gentamicin-RGD-HA group and the pure HA-coating control showed statistically significant better direct bone-implant contact after 12 weeks compared to uncoated K-wires. Detail histology showed all phases of new bone formation processes which mainly starting from the surrounding endosteal bone without any remarkable differences between the gentamicin-RGD-HA group and the pure HA-coating control. In conclusion, there were no significant differences between the Gentamicin-RGD-HA and the HA group and good biocompatibility of the Gentamicin-RGD-HA can therefore be assumed.

## 7. Literaturverzeichnis:

1. Ader F, Bernard L (2005) Pathophysiology of infection on orthopedic biomaterials. *Presse medicine.*, Ap. 9; 34(7):533-536.
2. Albee F, Morrison H (1920) Studies in bone growths-triple calcium phosphate as a stimulus to osteogenesis. *Annals of Surgery*, 71: 33-37.
3. Alt V, Bechert T, Steinrücke P, Wagener M, Seidel P, Dingeldein E, Domann E, Schnettler R (2004a) In vitro testing of antimicrobial activity of bone cement. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 48: 4084-4088.
4. Alt V, Bechert T, Steinrücke P, Wagener M, Seidel P, Dingeldein E, Domann E, Schnettler R (2004b) An in vitro assessment of the antibacterial properties and cytotoxicity of nanoparticulate silver bone cement. *Biomaterials*, 25: 4383-4391.
5. Alt V, Wagener M, Salz D, Bechert T, Steinrücke P, Schnettler R (2006b) Plasma-Polymer-High-Porosity Silver Composite Coating for Infection Prophylaxis in Intramedullary Nailing. In: *Practice of Intramedullary Locked Nails. New Developments in Techniques and Applications*. Editors-in-chief: Leung KS, Taglang G, Schnettler R. (Hrsg.). Springer, Berlin, Heidelberg, New York, S. 297-304.
6. Alt V, Schnettler R (2007) Infektionen. In: *Wirth C, Mutschler W, Praxis der Orthopädie und Unfallchirurgie*. (Hrsg.). Thieme, Stuttgart, New York. S. 170-182.
7. Altmann R, Asch E, Bloch D, Bole G, Borenstein D, Brandt K, Christy W, Cooke TD, Greenwald R, Hochberg M (1986) Development of criteria for the classification and reporting of osteoarthritis. Classification of osteoarthritis of the knee. Diagnostic and Therapeutic Criteria Committee of the American Rheumatism Association. *Arthritis And Rheumatism*, 29: 1039-1049.
8. Amstutz HC (1970) Complications of hip replacement. *Clinical Orthopaedic and Related Research*, 72: 123-137.
9. Amstutz HC (1975) High Velosity Directional Air Flow Systems (HVDAS) – Status of „Clean Air Rooms“. *The Western Journal of Medicine*, 122(2): 154-155.
10. Anders S, Schaumburger J, Grifka J (2001) Intraartikuläre operative Maßnahmen bei Arthrose. *Der Orthopäde*, 32: 708-716.
11. Aoki H, Akao M, Kato K (1981) Mechanical Properties of sintered Hydroxyapatite for Prosthetic Application. *Journals Of Materials Sciences*, 809-812.
12. Arciola CR, Campoccia D, Montanaro L (2000) Effects on antibiotic resistance of *Staphylococcus epidermidis* following adhesion to polymethylmethacrylate and to silicone surfaces. *Biomaterials*, 23:1495-1502.

13. Ayliffe G (1991) Role of the environment of the operating suite in surgical wound infection. *Reviews of Infectious Diseases*, 13: 800-804.
14. Barrack RL, Mulroy RD, Harris WH (1992) Improved cementing techniques and femoral component loosening in young patients with hip arthroplasty. *Journal of Bone and Joint Surgery, British Volume*, 74: 385–389.
15. Bauer TW, Togawa D (2003) Bone graft substitutes: towards a more perfect union. *Orthopaedics*, 26: 925-926.
16. Berger RA, Jacobs JJ, Quigley LR, Rosenberg AG, Galante JO (1997) Primary cementless acetabular reconstruction in patients younger than 50 years old. 7- to 11-year results. *Clinical Orthopaedic and Related Research*, 344: 216-226.
17. Bernhardt R, van den Dolder J, Bierbaum S, Beutner R, Scharnweber D, Jansen J, Beckmann F, Worch H (2005) Osteoconductive modifications of Ti-Implants in a goat defect model: characterization of bone growth with SR muCT and histology. *Biomaterials*, 26: 3009-3019.
18. Bloebaum RD, Beeks D, Dorr LD, Savory CG, DuPont JA, Hofmann AA (1994) Complications with Hydroxyapatite Particulate Separation in total hip arthroplasty. *Clinical Orthopaedic and Related Research*, 298: 19-26.
19. Bödeker, R.-H. (2002) Einführung in die medizinische Statistik. Verlag der Ferber'schen Universitätsbuchhandlung, Linden.
20. Bratzler DW, Houck PM (2004) Antimicrobial prophylaxis for surgery. *Clinical Infectious Diseases*, 38: 1706-1715.
21. Breithaupt H (2004) Orale und parenterale Antibiotikatherapie. In: Schnettler R, Steinau U (Hrsg.). *Septische Knochenchirurgie*. Thieme, Stuttgart, Berlin, New York, S. 76-81.
22. Breusch SJ, Aldinger PR, Thomsen M, Ewerbeck V, Lukoschek M (2000a) Verankerungsprinzipien in der Hüftendoprothetik Teil I: Prothesenstiel. *Der Unfallchirurg*, 103: 918-931.
23. Breusch SJ, Aldinger PR, Thomsen M, Lukoschek M, Ewerbeck V (2000b) Verankerungsprinzipien in der Hüftendoprothetik Teil II: Pfannenkomponente. *Der Unfallchirurg*, 103: 1017-1031.
24. Buchholz HW, Engelbrecht H (1970) Über die Depotwirkung einiger Antibiotika bei Vermischung mit dem Kunstharz Palacos. *Der Chirurg*, 40: 511-515.
25. Buchholz HW, Elson RA, Engelbrecht E, Lodenkämper H, Röttger J, Siegel A (1981) Management of deep infection of total hip replacement. *Journal of Bone and Joint Surgery*, 63-B: 342-348.
26. Bundesinstitut für Bevölkerungsforschung: [www.bib-demographie.de/index2.html](http://www.bib-demographie.de/index2.html)

27. Campbell AA, Song L, Li XS, Nelson Bj, Bottoni C, Brooks DE, De Jong ES (2000) Development, characterization and anti-microbial efficacy of hydroxyapatite-chlorhexidine coatings produced by surface-induced mineralization. *Journal of Biomedical Material Research*, 53: 400-407.
28. Cantoni L, Glauser MP, Bille J (1990) Comparative efficacy of daptomycin, vancomycin and cloxacillin for the treatment of *Staphylococcus aureus* endocarditis in rats and pole of test conditions in this determination. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 34: 2348-2353.
29. Chandler HP, Reineck FT, Wixson RL, McCarthy JC (1981) Total hip replacement in patients younger than thirty years old: A 5 year follow up study. *Journal of Bone and Joint Surgery, American Volume*, 63: 1426–1434.
30. Chang CS (1983) Histologic study of hydroxyapatite as an implant material for mandibular Augmentation. *Journal of Oral Maxillofac Surgery*, 41:729-737.
31. Charnley J (1961) Arthroplasty of the hip: A new operation. *Lancet*, 27:1129-1132.
32. Charnley J (1964) Clean-air operating enclosure. *British Journal of Surgery*, 51:202-205.
33. Charnley J (1970) The reaction of bone to selfcuring acrylic cement. A longterm histological study in man. *Journal of Bone and Joint Surgery, British Volume*, 52: 340–353.
34. Charnley J (1974) Total Hip Replacement. *Journal of the American Medical Association*, 230: 1025-1028.
35. Chiu FY, Chen CM, Lin CF, Lo WH (2002) Cefuroxime-impregnated cement in primary total knee arthroplasty: a prospective, randomized study of three hundred and forty knees. *Journal of Bone and Joint Surgery, American Volume*, 84:759-762.
36. Credé KSF (1894) *Die Verhütung der Augenentzündung der Neugeborenen* Hirschwald, A.
37. Darouiche Mansouri MD, Zakarevicz D, Alsharif A, Landon GC (2007) In vivo efficacy of antimicrobial-coated devices. *Journal of Bone and Joint Surgery, American Volume*, 89: 792-797.
38. Davey PJ, Haslam JM, Linnane AW (1970) Biogenesis of mitochondria 12. The effects of aminoglycoside antibiotics on the mitochondrial and cytoplasmic protein-synthesizing systems of *saccharomyces cerevisiae*. *Archives of Biochemical and Biophysics*, 136:54-64.
39. Debrunner, A.-M. (2002) *Orthopädie/Orthopädische Chirurgie*. Hans Huber, 4. Auflage, Bern, Göttingen, Toronto, Seattle.

40. De Jong ES, De Berardino TM, Brooks DE, Nelson BJ, Campbell AA, Bottoni CR, Pusateri AE, Walton RS, Gymon CH, McMnuc At (2001) Antimicrobial efficacy of external fixateur pins coated with a lipid stabilized hydroxyapatit/chlorhexidine complex to prevent pin tract infection in a goat model. *Journal of Trauma: Injury Infection and Critical Care*, 50: 1008-1014.
41. De Lalla F (2001) Antibiotic prophylaxis in orthopedic prosthetic surgery. *Journal of Chemotherapy* , 13: 48-53.
42. Donath K (1989) Preparation of histological sections. Exakt Kulzer Publication.
43. Draenert K (1981) Histomorphology of the bone-to-cement interface: remodelling of the cortex and revascularization of the medullary canal in animal experiments. In: Salvati EA (ed) *The hip proceedings of the ninth open scientific meeting of the HIP Society. The John Charnley Award Paper*. CV Mosby, Saint Louis, Missouri, S. 71–110.
44. Düwelhenke N, Krut o, Eysel P (2007) Influence on mitochondria and cytotoxicity of different antibiotics administered in high concentrations on primary human osteoblasts and cell lines. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*.
45. Edin ML, Miclau T, Lester GE, Lindsey RW, Dahners LE (1996) Effect of cefazolin and vancomycin on osteoblasts in vitro. *Clinical Orthopaedics and Related Research*, 333:245-251.
46. Effenberger H, Imhof M (2003) Primäre Hüftendoprothetik. In: Wirth CJ und Zichner L (Hrsg.), *Orthopädie und Orthopädische Chirurgie. Becken, Hüfte*. Thieme, Stuttgart, New York. S. 330-381.
47. Eingartner C, Volkmann R, Winter E, Maurer F, Sauer G, Weller S, Weise K (2000) Results of an uncemented straight femoral shaft prosthesis after 9 years of follow-up. *Journal of Arthroplasty*, 15: 440–447.
48. Ellington JK, Harris M, Hudson MC, Vishin S, Webb LX, Sherertz R (2006) Intracellular staphylococcus aureus and antibiotic resistance: Implications for treatment of staphylococcal osteomyelitis. *Journal of Orthopaedic and Related Research*, 24:87-93.
49. Ellington JK, Harris M, Webb L, Smith B, Smith T, Tan K, Hudson M (2003) Intracellular staphylococcus aureus: A mechanism for the indolence of osteomeylitis. *Journal of Bone and Joint Surgery, British Volume*, 85-B: 918- 921.
50. Elmengaard B, Bechtold JE, Soballe K (2005a) In vivo effects of RGD-coated Titanium implants inserted in two bone-gap models. *Journal of Biomedical Materials Research A*, 75: 249- 255.
51. Elmengaard B, Bechtold JE, Soballe K (2005b) In vivo study of the effect of RGD treatment on bone ongrowth on press-fit Titanium alloy implants. *Biomaterials*, 26: 3521- 3526.

52. Engesaeter LB, Espehaug B, Lie SA, Furnes O, Havelin LI (2006) Does cement increase the risk of infection in primary total hip arthroplasty? Revision rates in 56,275 cemented and uncemented primary THAs followed for 0–16 years in the Norwegian Arthroplasty Register. *Acta Orthopaedica Scandinavica*, 77: 351-358.
53. Engesaeter LB, Lie SA, Espehaug B, Furnes O, Vollset SE, Havelin LI (2003) Antibiotic prophylaxis in total hip arthroplasty: effects of antibiotic prophylaxis systemically and in bone cement on the revision rate of 22,170 primary hip replacements followed 0-14 years in the Norwegian Arthroplasty Register. *Acta Orthopaedica Scandinavica* 74: 644-651.
54. Ewald A, Glückermann SK, Thull R, Gbureck U (2006) Antimicrobial Titanium/Silver PVD coatings on Titanium. *Biomedical Engineering online*, 5:22.
55. Ewing JW (1990) Arthroscopic treatment of degenerative meniscal lesions and early degenerative arthritis of the knee. In: Ewing JW (Hrsg.) *Articular Cartilage and Knee Joint Function. Basic Science and Arthroscopy*, Raven Press, New York, S. 137-145.
56. Eyb R, Kutschera HP, Schartelmueller T, Toma C, Zweymueller K (1993) Midterm experience with the cementless Zweymueller system. Results of a minimum five-year follow-up study. *Acta Orthopaedica Scandinavica*, 59: 138-143.
57. Felson DT (1990) Osteoarthritis. *Rheumatic Disease Clinic of North America*, 16:499-512.
58. Ferris DM, Moodie GD, Dimond PM, Gioranni CWD, Ehrlich MG, Valentini RF (1999) RGD-coated Titanium implants stimulate increased bone formation in vivo. *Biomaterials*, 20: 2323- 2331.
59. Fishman NO, Brennan PJ (1997) Optimizing use of antimicrobial agents: pitfalls and consequences of inappropriate therapy. *Journal of Clinical Outcome Management* 4: 25-33.
60. Fisman DN, Reilly DT, Karchmer AW, Goldie SJ (2001) Clinical effectiveness and cost-effectiveness of 2 management strategies for infected total hip arthroplasty in the elderly. *Clinical Infectious Diseases*, 32: 419–430.
61. Fitzgerald RH, MD, Peterson LFA, MD, Washington JA, MD, Van Scoy RE, MD, Coventry MB, MD (1973) Bacterial colonization of wounds and sepsis in total hip arthroplasty. *Journal of Bone and Joint Surgery*, 55-A: 1242- 1250.
62. Fitzgerald RH (1983) Experimental osteomyelitis: Description of a canine model and the role of depot administration of antibiotics in the prevention and treatment of sepsis. *Journal of Bone and Joint Surgery*, 65:371-380.
63. Frame JW, Browne RM, Rout PGJ (1987) Ridge augmentation using solid and porous hydroxyapatite particles with antigenous bone or plaster. *Journal of Oral Maxillofacial Surgery*, 45: 771-777.

64. Furlong RJ, Osborn JF (1991) Fixation of hip prostheses by hydroxyapatite ceramic coatings. *Journal of Bone and Joint Surgery*, 73B:741.
65. Galdbart JO, Allignet J, Tung HS, Ryden C, El Solh N (2000) Screening for *Staphylococcus epidermidis* markers discriminating between skin-flora strains and those responsible for infections of joint prostheses. *Journal of Infectious Diseases* 182: 351–355.
66. Garvin KL, Urban JA (2000) Emerging multiresistant strains: recommended precautions in the emergency room and surgical setting. *Instructional Course Lectures*, 49: 605-614.
67. Geesink R, De Groot K, Klein, C (1987) Chemical implant fixation using hydroxyl-apatite coatings: The development of a human total hip prosthesis for chemical fixation to bone using hydroxyl-apatite coatings on Titanium substrates. *Journal of Clinical Orthopaedics and Related Research*, 225:147.
68. Gentry LO (1988) Osteomyelitis: options for diagnosis and management. *J Antimicrobial Chemotherapy* 21 Suppl. C: 115-128.
69. Giannoudis PV, Dinopoulos H, Tsiridis E (2005) Bone substitutes: an update. *Injury* 36 Suppl, 3: 20-27.
70. Giulieri SG, Graber P, Ochsner PE, Zimmerli W (2004) Management of infection associated with total hip arthroplasty according to a treatment algorithm. *Infection*, 32: 222–228.
71. Gluck T (1891) Referat über die durch das moderne chirurgische Experiment gewonnenen positiven Resultate betreffend die Naht und den Ersatz von Defecten höherer Gewebe, sowie über die Verwerthung resorbirbarer und lebendiger Tampons in der Chirurgie. *Archiv für Klinische Chirurgie*, 41: 187.
72. Gottlander M, Johansson CB, Albrektsson T (1997) Short- and long-term animal studies with a plasma-sprayed calcium phosphate-coated implant. *Clinical Oral Implants Research*, 8:345-351.
73. Gradinger R, Gollwitzer H (2006) *Ossäre Integration*. Springer, Berlin, Heidelberg, New York.
74. Gradinger R, Hecht H, Gollwitzer H (2007) Degenerative Erkrankungen. Koxarthrose. In: Wirt CJ und Mutschler W. *Praxis der Orthopädie und Unfallchirurgie*. Thieme Stuttgart, New York, S. 601-606.
75. Gristina AG (1987) Biomaterial-centered infection: microbial adhesion versus tissue integration. *Science*, 237: 1588-1595.
76. Gristina AG, Costerton JW (1985) Bacterial adherence to biomaterials and tissue. The significance of its role in clinical sepsis. *Journal of Bone and Joint Surgery, American Volume*, 67:264-273.

77. Gristina AG, Naylor PT, Webb LX (1990) Molecular mechanisms in musculoskeletal sepsis: the race for the surface. *Instructional Course Lectures*, 39: 471-482.
78. Gristina AG, Naylor P, Myrvik Q (1988-1989) Infections from biomaterials and implants. *Medical Progress Through Technology*, 14(3-4): 205-24.
79. Gumarer KI, Sherer AD, Slighter RG, Rothstein SS, Drobeck HP (1986) Tissue response in dogs to dense hydroxyapatite implantation in the femur. *Journal of Oral Maxillofac Surgery*, 44: 618-627.
80. Grundei H (2006) "Geschichtliche Entwicklung der Endoprothetik und der Fixation durch Spongiosa-Metall"; In: Grading R, Gollwitzer H. *Ossäre Integration*. Springer, Berlin, Heidelberg, New York, S. 2-13.
81. Gustilo RB, Anderson TJ (1976) Prevention of infection in the treatment of one thousand and twenty-five open fractures of long bones: retrospective and prospective analyses. *Journal of Bone and Joint Surgery, American Volume*, 58: 453-458.
82. Haboush EJ (1953) A new operation for arthroplasty of the hip based on biomechanics, photoelasticity, fast setting dental acrylic, and other considerations. *Bulletin Hospital for Joint Diseases*, 14: 242-247.
83. Haleem AA, Rouse MS, Lewallen DG, Hanssen AD, Steckelberg JM, Patel R (2004) Gentamicin and vancomycin do not impair experimental fracture healing. *Clinical Orthopaedic and Related Research*, 427:22-24.
84. Hanssen AD, Osmon DR, Nelson CL (1997) Prevention of deep periprosthetic joint infection. *Instructional Course Lectures*, 46: 555-567.
85. Hanssen AD, Osmon DR (1999) The use of prophylactic antimicrobial agents during and after hip arthroplasty. *Clinical Orthopaedic and Related Research*, 369: 124-138.
86. Hanssen AD, Osmon DR, Nelson CL (1997) Prevention of deep periprosthetic joint infection. *Instructional Course Lectures*, 46: 555-567.
87. Harvey WK (1985) Evaluation of a subcutaneously implanted hydroxyapatite-avitene mixture in rabbits. *Journal of Oral Maxillofac Surgery*, 43: 277-280.
88. Havelin LI, Engesaeter LB, Espehaug B, Furnes O, Lie SA, Vollset SE (2000) The Norwegian Arthroplasty Register: 11 years and 73,000 arthroplasties. *Acta Orthopaedica Scandinavica*, 71: 337-353.
89. Holmes R, Mooney V, Bucholz R, Tencer A (1984) A coralline hydroxyapatite bone graft substitute. Preliminary report. *Clinical Orthopaedic and Related Research*, 188: 252-262.

90. Huddleston P, Steckelberg J, Hanssen A, Rouse MS, Patel R (2000) Ciprofloxazin inhibition of experimental fracture healing. *Journal of Bone and Joint Surgery, American Volume*, 82: 161-173.
91. Huggler AH, Jacob HA (1980) A new approach towards hip-prosthesis design. *Archives of Orthopaedic and Trauma Surgery*, 97: 141–144.
92. Huggler AH, Jacob HA, Bereiter H, Haferkorn M, Ryf C, Schenk R (1993) Longterm results with the uncemented thrust plate prosthesis (TPP). *Acta Orthopaedica Belgica*, 59: 215–223.
93. Hulbert SF, Morrison SJ, Klawitte JJ (1972) Gewebsreaktion auf 3 Keramiken von porösen und nicht porösen Strukturen. *Journal of Biomedical Materials Research*, 6:347-374.
94. Hunter W (1743) Of the structure and disease of articulating cartilage. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London*, 42: 514-521.
95. Isefuku S, Joyner CJ, Simpson AH (2003) Gentamicin may have an adverse effect on osteogenesis. *Journal of Orthopaedic Trauma*, 17(3): 212 -216.
96. Jaffe WL, Scott DF (1996) Current concepts review: Total hip arthroplasty with hydroxyapatite-coated prostheses. *Journal of Bone and Joint Surgery*, 78: 1918-1934.
97. Jasty M, Maloney WJ, Bragdon CR, Haire T, Harris WH (1990). Histomorphological studies of the long-term skeletal responses to well fixed cemented femoral components. *Journal of Bone and Joint Surgery, American Volume*, 72: 1220–1229.
98. Jiranek WA, Hanssen AD, Greenwald AS (2006) Antibiotic-loaded bone cement for infection prophylaxis in total joint replacement. *Journal of Bone and Joint Surgery, American Volume*, 88: 2487-2500.
99. Josefsson G, Kolmert L (1993) Prophylaxis with systemic antibiotics versus gentamicin-loaded bone cement in total hip arthroplasty: a ten-year survey of 1,668 hips. *Clinical Orthopaedic and Related Research*, 292: 210-214.
100. Judet R, Judet J (1952). Résection-reconstruction de la hanche: arthroplastie par prothèse acrylique. Expansion Scientifique Française, Paris.
101. Kantlehner M, Finsinger D, Meyer J, Schaffner P, Jonczyk A, Diefenbach B, Nies B, Kessler H (1999) Selective RGD-mediated adhesion of osteoblasts at surfaces of implants. *Angewandte Chemie International Edition*, 38 (4): 560-562.
102. Kantlehner M, Schaffner P, Finsinger D, Meyer J, Jonczyk A, Diefenbach B, Nies B, Hölzemann G, Goodman SL, Kessler H (2000) Surface coating with cyclic RGD peptides stimulates osteoblasts adhesion and proliferation as well as bone formation. *Chembiochem*, 1:107-114.

103. Karlan MS, ufon RA, Grizzard MB, Buscemi PA, Hench L, Goldberg EP; Potentiation Of In fections By Bion Materials; Archives of Otolaryngology- Head and Neck Surgery, 1981, 89(4): 528-534.
104. Karow, T., Lang-Roth, R. (2006) Pharmakologie und Toxikologie. Thomas Karoe.
105. Kellgren JH, Lawrence JS (1952) Rheumatism in miners. Part II: x-ray study. British Journal of Industrial Medicine, 9: 197-207.
106. Kellgren JH, Lawrence JS (1957) Radiological assessment of osteoarthritis. Annals of the Rheumatic Diseases, 16: 494-501.
107. Kendall RW, Duncan CP, Beauchamp CP (1995) Bacterial growth on antibioticloaded acrylic cement. A prospective in vivo retrieval study. Journal of Arthroplasty, 10: 817-822.
108. Kendall RW, Duncan CP, Smith JA, Ngui-Yen JH (1996) Persistence of bacteria on antibiotic loaded acrylic depots. A reason for caution. Clinical Orthopaedic and Related Research, 329: 273-280.
109. Kilgus DJ, Howe DJ, Strang A (2002) Results of periprosthetic hip and knee infections caused by resistant bacteria. Clinical Orthopaedic and Related Research, 404: 116-124.
110. Klawitter JJ, Bagwell JG, Weinstein AM, Sauer BW (1976) An evaluation of bone growth into porous high density polyethylene. Journal of Biomedical Materials Research, 10: 311-323.
111. Klemm K (1979) Gentamicin-PMMA-Kugeln in der Behandlung abszedierender Knochen- und Weichteilinfektionen. Zentralblatt Chirurgie, 104: 934-942.
112. Klemm K, Schnettler R (1992) The use of gentamicin-PMMA chains in the treatment of infected tibial non-union. Acta Orthopaedica Belgica, 58: 222-226.
113. Klein C, Driessen A, de Groot K, van den Hooff A (1983) Biodegradation behavior of various calcium phosphate materials in bone tissue. Journal of Biomedical Materials Research, 17: 769-784.
114. Kraemer S & Prof. Dr. J. Spatz (2004) Kontrolle der Integrin-Aggregation durch RGD substituierte Dendrimere. Im Rahmen des Physikalisch-Chemischen Fortgeschrittenen-Praktikums.
115. Kroese-Deutmann HC, Van Den Dolder J, Spauwen PHM, Jansen JA (2005) Influence of RGD-loaded Titanium implants on bone formation in vivo. Tissue Engineering, 11:1867-1875.
116. Kurtz S, Mowat F, Ong K, Chan N, Lau E, Halpern M (2005) Arthroplasty in the United States from 1990 Through 2002. Journal of Bone and Joint Surgery, American Volume, 87: 1487-1497.

117. Küsswetter W, Rütt A (1985) Schwierigkeiten und Risiken bei zementfreien Hüftendoprothesen. Aktuelle Schwerpunkte in Chirurgie und Orthopädie, 29: 8-12.
118. Laffer R, Rued C (2006) Diagnose und Behandlung von Gelenkprotheseninfektionen. Zeitschrift für Rheumatologie, 65: 12-17.
119. Lazzarini L, Mader JT, Calhoun JH (2004) Osteomyelitis in Long Bones. Journal of Bone and Joint Surgery, American Volume, 86: 2305-2318.
120. Leaper DJ (2006) Silver dressings: their role in wound management. International Wound Journal, 3: 282-294.
121. Lentino JR (2003) Prosthetic joint infections: bane of orthopedists, challenge for infectious disease specialists. Clinical Infectious Diseases, 36: 1157-1161.
122. Lew DP, Waldvogel FA (2004) Osteomyelitis. Lancet, 364: 369-379.
123. Lidgren L (2001) Joint prosthetic infections: A success story. Acta Orthopaedica Scandinavica, 72: 553-556.
124. Lowy FD (1998) Staphylococcus aureus infections. New England Journal of Medicine, 339: 520-522.
125. Lucht U (2000) The danish hip arthroplasty register. Acta Orthopaedica Scandinavica, 71 (5): 433-439.
126. Lucke M, Schmidmaier G, Sadoni S, Wildemann B, Schiller R, Haas NP, Raschke M (2003) Gentamicin coating of metallic implants reduces implantrelated osteomyelitis in rats. Bone, 32: 521-531.
127. Lucke M, Wildemann B, Sadoni S, Surke C, Schiller R, Stemberger A, Raschke M, Haas NP, Schmidmaier G (2005) Systemic versus local application of gentamicin in prophylaxis of implant-related osteomyelitis in a rat model. Bone, 36: 770-778.
128. Malchau H, Herberts P, Ahnfelt L (1993) Prognosis of total hip replacement in Sweden. Follow-up of 92,675 operations performed 1978-1990. Acta Orthopaedica Scandinavica, 64: 497-506.
129. Marcescu CE, Osmon DR (2005) Antibiotic prophylaxis in orthopaedic surgery. Infectious Disease Clinics of North America, 19: 931-946.
130. McKee K (1951) Artificial hip joint. Journal of Bone and Joint Surgery, British Volume, 33: 465.
131. McQueen M, Littlejohn A, Hughes SP (1987) A comparison of systemic cefuroxime and cefuroxime loaded bone cement in the prevention of early infection after total joint replacement. International Orthopaedics, 11: 241-243.
132. Metallisation Limited®; www.metallisation.com; Pear Tree Lane, Dudley, West Midlands, DY2 OXH, England.

133. Miclau T, Dahners LE, Lindsey RW (1993) In vitro pharmacokinetics of antibiotic release from locally implantable materials. *Journal of Orthopaedic Research*, 11:627-632
134. Miclau T, Edin ML, Lester GE, Lindsey RW, Dahners LE (1995) Bone toxicity of locally applied aminoglycosides. *Journal of Bone Orthopaedic Trauma*, 9:401-406.
135. Mittelmeier H (1985) Report on the first decennium of clinical experience with a cementless ceramic total hip replacement. *Acta Orthopaedica Belgica*, 51: 367- 376.
136. Mittelmeier H, Heisel J (1989) Hüftgelenkersatz mit Endoprothesen. *Münchener Medizinische Wochenschrift*, 6: 81-85.
137. Moestrup SK, Ciu S, Vorum H, Bregengard C, Bjorn SE, Norris K, Gliemann J, Christensen EI (1995) Evidence that epithelial glycoprotein 330/megalyn mediates uptake of polybasic drugs. *Journal of Clinical Investigation*, 96: 1404-1413.
138. Moojen DJ, Vogely HC, Fleeer A, Nikkels PG, Higham PA, Verbout AJ, Castelein RM, Dhert (2009) Prophylaxis of infection and effects on osseointegration using a tobramycin-apatite coating on titanium implants-an experimental study in the rabbits. *Journal of Orthopaedic Related Research*, 27(6):710-6.
139. Neut D, van de Belt H, van Horn JR, van der Mei HC, Busscher HJ (2003) Residual gentamicin-release from antibiotic-loaded polymethylmethacrylate beads after 5 years of implantation. *Biomaterials*, 24: 1829-1831.
140. Nickel JC, Ruseska I, Wright JB, Costerton JW (1985) Tobramycin resistance of *Pseudomonas aeruginosa* cells growing as a biofilm on urinary catheter material. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 27: 619-624.
141. Nielsen NHS, Renneberg J, Meinecke Nürnberg B, Torholm C (1996) Experimental implant-related osteomyelitis induced with staphylococcus aureus. *European Journal of Orthopaedic Surgery and Traumatology*, 6: 97-100.
142. Nijhof MW, Dhert WJH, Fleeer A, Vogely HC, Verbout AJ (2000) Prophylaxis of implant-related staphylococcal infections using Tobramycin-containing bone cement. *Journal of Biomedical Materials Research*, 52: 754-761.
143. Oosterbos CJ, Rahmy AI, Tonino AJ, Witpeerd W (2004) High survival rate of hydroxyapatite-coated hip prostheses: 100 consecutive hips followed for 10 years. *Acta Orthopaedica Scandinavica*, 75: 127-133.
144. Pallu S, Bareille R, Dard M, Kessler H, Jonczyk A, Vernizeau M, Amedee-Vilamitjana JA (2003) A cyclopeptide activates signaling events and promotes growth and the production of the bone matrix. *Peptides*, 24: 1349-1357.
145. Pandey R, Berendt AR, Athanasou NA (2000) Histological and microbiological findings in non-infected and infected revision arthroplasty tissue. *Archives of Orthopaedic Trauma Surgery*, 120: 570-574.

146. Pavlov PW (1987) A 15-year follow-up study of 512 consecutive Charnley-Muller total hip replacements. *Journal of Arthroplasty*, 2: 151-156.
147. Pazzaglia UE, Brossa F, Zatti G, Chiesa R, Andrini L (1998) The relevance of hydroxylapatite and spongiuous Titanium coatings in fixation of cementless stems; An experimental comperative study in rat femur employing histological and microangiographic techniques. *Archives of Orthopaedic Trauma Surgery*, 117: 279-285.
148. Pellicci PM, Salvati EA, Robinson HJ (1979) Mechanical failures in total hip replacement requiring reoperation. *Journal of Bone and Joint Surgery, American Volume*, 61: 28-33.
149. Perriti P, Mini E, Mosconi G (1998) Antimicrobial prophylaxis in prosthetic joint implant surgery: the role of teicoplanin. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 41: 329-340.
150. Perry CR, Pearson G, Miller A (1991) Accuracy of cultures of material from swabbing of the superficial aspect of the wound and needle biopsy in the preoperative assessment of osteomyelitis. *Journal of Bone and Joint Surgery, American Volume*, 73: 745-749.
151. Perry AC, Prpa B, Rouse MS, Piper KE, Henssen AD, Steckelberg JM, Patel R (2003) Levofloxacin and Trovafloxacin inhibition of experimental fracture- healing. *Clinical Orthopaedic and Related Research*, 414: 95-100.
152. Phillips TW, Messieh SS, McDonald PD (1990) Femoral stem fixation in hip replacement. A biomechanical comparison of cementless and cemented prostheses. *Journal of Bone and Joint Surgery, British Volume*, 72: 431-434.
153. Pierschbacher MD, Ruoslathi E (1984) Cell attechment activity of fibronectin can be duplicated by small synthetic fragments of the molecule. *Nature*, 309: 30-33.
154. Pierschbacher MD, Ruoslathi E (19984) Variants of the cell recognition site of fibronectin that retain attachment-promoting activity. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 81: 5985-5988.
155. Piltz W (1993) Biomechanik zementfreier Endoprothetik. *Zeitschrift für Orthopädie und ihre Grenzgebiete*, 131: 483-487.
156. Puleo DA, Bizios R (1991) RGDS tetrapeptide binds to osteoblasts and inhibits fibronectin-mediated adhesion. *Bone*, 12: 271-276.
157. Pschyrembel (1985) *Klinisches Wörterbuch*. Walter de Gryter, 255. Auflage, Berlin, New York.
158. Radin S, Campbel JT, Ducheyne P, Cuckler JM (1997) Calcium Phosphate Ceramic Coatings As Carriers Of Vancomicin. *Biomaterials*, 18: 777-782.

159. Ramage G, Tunney MM, Patrick S, Gorman SP, Nixon JR (2003) Formation of *Propionibacterium acnes* biofilms on orthopaedic biomaterials and their susceptibility to antimicrobials. *Biomaterials*, 24:3221-3227.
160. Rammelt S, Illert T, Bierbaum S, Scharnweber D, Zwipp H, Schneiders W (2006) Coating of Titanium implants with collagen, RGD peptide and Chondroitin Sulfate. *Biomaterials*, 27: 5561- 5571.
161. Raschke MJ, Schmidmaier G (2004) Biologisierung von Implantaten in der Chirurgie des Stütz- und Bewegungsapparates. *Der Unfallchirurg*, 107: 653-663.
162. Rauschmann MA, Thomann KD, Schwetlick G, Zichner L (2004) Vom „feuchten Beinfraß“ zur beherrschbaren Komplikation. *Der Orthopäde*, 33: 389-396.
163. Rettig H (1952) Die Hüftarthroplastik mit Spezialprothese. *Zeitschrift für Orthopädie und ihre Grenzgebiete*, 82: 290-294.
164. Rezania A, Thomas CH, Branger AB, Waters CM, Healy KE (1997). The detachment strength and morphology of bone cells contacting materials modified with a peptide sequence found within bone sialoprotein. *Journal of Biomedical Materials Research*, 37: 9-19.
165. Richter-Hintz D, Rieker J, Rauch L, Horney B (2004). Prothesenunverträglichkeit bei Typ-IV-Sensibilisierung gegen Knochenzement. *Der Hautarzt*, 55: 987-999.
166. Ritter MA, Campell BS (1987) Long term comparison of the Charnley, Müller and trapeziodal-28 hip prosthesis. *Journal of Arthroplasty*, 2: 299–308.
167. Ritter M (1999) Operating room environment. *Clinical Orthopaedics and Related Research*, 369: 103-109.
168. Romagnoli S (2002) Press-fit hip arthroplasty: an European alternative. *Journal of Arthroplasty*, 17: 108-112.
169. Romney M (2001) Surgical face masks in the operating theatre: reexamining the evidence. *Journal of Hospital Infection*, 47: 251-256.
170. Rothstein SS (1984) Use of hydroxylapatit for the augmentation of deficient alveolar ridges. *Journal of Oral Maxillofac Surgery*, 42: 224-230.
171. Rössler, Rüttler (2000), Urban & Fischer, 18. Auflage, München, Jena.
172. Rössler S, Born R, Scharnweber D, Worch H, Sewing A, Dard M (2001) Biomimetic coatings functionalized with adhesion peptides for dental implants. *Journal of Materials Science. Materials in Medicine*, 12: 871-877.
173. Ruchholtz S, Täger G, Nast-Kolb D (2004) Die infizierte Hüftgelenksendoprothese. *Der Unfallchirurg*, 107: 307-317.

174. Schaffner P, Dard MM (2003) Structure and function of RGD peptides involved in bone biology. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 60:119-132.
175. Schierholz JM, Morszeck C, Brenner N, König DP, Yücel N, Korenkov M, Neugebauer E, Rump AF, Waalenkamp G, Beuth J, Pulverer G, Arens S (2004) Besonderheiten der implantatassoziierten Infektion in der orthopädischen Chirurgie. *Der Orthopäde*, 33: 397-404.
176. Schliephake H, Scharnweber D, Dard M, Sewing A, Aref A, Roessler S (2005) Functionalization of dental implant surfaces using adhesion molecules. *Journal of Biomedical Materials Research Part B*, 73: 88-96.
177. Schmidmaier G, Lucke M, Wildemann B, Haas NP, Raschke M (2006) Prophylaxis and treatment of implant-related infections by antibiotic-coated implants: a review. *Injury*, 37: 105-112.
178. Schmitz FJ, Hilpert J, Jacobsen C, Boensch C, Christensen EI, Luft FC, Willnow TE (2002) Megalin deficiency offers protection from renal aminoglycoside accumulation. *Journal of Biological Chemistry*, 277:618-622.
179. Schnettler R, Alt V (2004) Pathophysiologie und Klassifikation der Osteitis. In: Schnettler R, Steinau U (Hrsg.). *Septische Knochenchirurgie*. Thieme, Stuttgart, Berlin, New York, S. 5-14.
180. Schnettler R, Alt V, Dingeldein E, Pfefferle HJ, Kilian O, Meyer C, Heiss C, Wenisch S (2003) Bone ingrowth in bFGF-coated hydroxyapatite ceramic Implants. *Biomaterials*, 24: 4603-4608.
181. Schnettler R, Lieser H, Klemm K (1997) Chirurgische Behandlung der posttraumatischen und chronischen Osteomyelitis. *Aktuelle Chirurgie*, 32: 18-22.
182. Segawa H, Tsukayama DT, Kyle RF, Becker DA, Gustilo RB (1999) Infection after total knee arthroplasty: a retrospective study of the treatment of eighty-one infections. *Journal of Bone and Joint Surgery, American Volume*, 81: 1434-1445.
183. Servais H, Van Der Smissen P, Thirion G, Van Der Essen G, Van Bambeke F, Tulkens PM, Mingeot-Leclercq MP (2005) Gentamicin-induced apoptosis in LLC-PK1 cells: involvement of lysosomes and mitochondria. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 206:312-333.
184. Shepperd J, Apthorp H (2005) A contemporary snapshot of the use of hydroxyapatite coating in orthopaedic surgery. *Journal of Bone and Joint Surgery, British Volume*, 87: 1046-1049.
185. Silverblatt FJ, Kuehn C (1979) Autoradiography of Gentamicin uptake by the rat proximal tubule cell. *Kidney International*, 15:335-345.

186. Sinha B, François PP, Nüsse O, Foti M, Hartford OM, Vaudaux P, Foster TJ, Lew DP, Herrmann M, Krause KH (1999) Fibronectin-binding protein acts as Staphylococcus aureus invasion via fibronectin bridging to integrin alpha5beta1. Cellular Microbiology, 1: 101-117.
187. Siopack JS, Jergesen HE (1995) Total Hip Arthroplasty. Western Journal of Medicine, 162: 243- 249.
188. Smeltzer et al (1997) Characterization of a rabbit model of staphylococcal osteomyelitis. Journal of Orthopaedic Research, 15: 414-421.
189. Smith-Petersen MN (1939) Arthroplasty of the hip. A new method. Journal of Bone and Joint Surgery 105: 269-288.
190. Søballe K, Hansen ES, Brockstedt-Rasmussen H, Pedersen CM, Bunger C (1990) Hydroxyapatite coating enhances fixation of porous coated implants: a comparison in dogs between press fit and non interference fit. Acta Orthopaedica Scandinavica, 61: 299-306.
191. Søballe K, Hansen ES, Brockstedt-Rasmussen H, Hjortdal VE, Juhl GI, Pedersen CM, Hvid I, Bunger C (1991) Gap healing enhanced by hydroxyapatite coatings in dogs. Clinical Orthopaedics and Related Research, 272: 300-307.
192. Spotorno L, Schenk RK, Dietschi C, Romagnoli S, Mumenthaler A (1987) Unsere Erfahrungen mit nicht-zementierten Prothesen. Der Orthopäde, 16: 225-238.
193. Steckelberg JM, Osmon DR (2000) Prosthetic joint infections. In: Waldvogel FA, Bisno AL (eds.) Infections associated with indwelling medical devices. American Society for Microbiology Press, 173-209.
194. Stephenson PK, Freeman MAR, Revell PA, Germain J, Tuke M, Pirie CJ (1991) The effect of hydroxyapatite coating on ingrowth of bone into cavities in an implant. Journal of Arthroplasty, 6: 51-58.
195. Stigter M, Bezemer J, de Groot K, Layrolle P (2004) Incorporation of different antibiotics into carbonated hydroxyapatite coatings on titanium implants, release and antibiotic efficacy. Journal of Controlled Release, 99: 127-137.
196. Stigter M, de Groot K, Layrolle P (2002) Incorporation of tobramycin into biomimetic hydroxyapatite coating on titanium. Biomaterials, 23: 4143-4153.
197. Sun JS, Lin FH, Hung TY, Tsuang YH, Chang WH, Liu HC (1999) The influence of hydroxyapatite particles on osteoclast cell activities. Journal of Biomedical Materials Research, 45: 311-321.
198. Swoboda (2001) Aspekte der epidemiologischen Arthroreforschung. Der Orthopäde, 30:834-840.
199. Thomes B, Murray P, Bouchier-Hayes D (2002) Development of resistant strains of Staphylococcus epidermidis on gentamicin-loaded bone cement in vivo. Journal of Bone and Joint Surgery, British Volume, 84: 758-60.

200. Vadaux P, Francois P, Lew DP, Waldvogel PA (2000) Host factors predisposing to and influencing therapy of foreign body infections. In: Waldvogel FA, Bisno AL (eds) Infections associated with indwelling devices. American Society for Microbiology Press, 1-26.
201. van de Belt H, Neut D, Schenk W, van Horn JR, van der Mei HC, Busscher HJ (2001) Infection of orthopedic implants and the use of antibiotic-loaded bone cements. *Acta Orthopaedica Scandinavica*, 72: 557-571.
202. Vogt S, Imhoff AB (2007) Tissue-engineering am Kniegelenk. Was ist gesichert? *Deutsche Zeitschrift für Sportmedizin*, 58: 98-104.V.
203. von Eiff C, Lindner N, Proctor RA, Winkelmann W, Peters G (1998) Development of gentamicin-resistant small colony variants of *S. aureus* after implantation of gentamicin chains in osteomyelitis as a possible cause of recurrence. *Zeitschrift für Orthopädie und ihre Grenzgebiete*, 136: 268-271.
204. Wahlig H (1987) Über die Freisetzungskinetik von Antibiotika aus Knochenzementen – Ergebnisse vergleichender Untersuchungen in vitro und in vivo. In: Willert HG, Buchhorn G (Hrsg) Technical principles, design and safety of joint implants. Hogrefe & Huber, Göttingen, S. 221-226.
205. Wahlig H, Dingeldein E (1980) Antibiotics and bone cements. Experimental and clinical long-term observations. *Acta Orthopaedica Scandinavica*, 51: 49-56.
206. Waldström T (1989) Molecular aspects of bacterial adhesion, colonization and development of infections associated with biomaterials. *Journal of Investigative Surgery*, 2(4):353-360.
207. Ward DT, Maldonado-Perez D, Hollins L, Riccardi D (2005) Aminoglycosides induce acute cell signaling and chronic cell death in renal cells that express the calcium-sensing receptor. *Journal of the American Society of Nephrology*, 16:1236-1244.
208. Wessinghage D (1995) Themistocles Gluck: Von der Organexstirpation zum Gelenkersatz. *Deutsches Ärzteblatt*, 33: C-1443 - C-1447.
209. Wichmann MW, Remmers D, Ayala A, Chaudry IH (1998) Contribution of soft tissue trauma and/or bone fracture to immune suppression after hemorrhagic shock in the animal experiment. *Der Unfallchirurg*, 101: 37-41.
210. Willert H, Buchhorn G (1999) Osseointegration of cemented and Noncemented implants in artificial hip replacements: Long-term findings in man. *Journal of Long-Term Effects of Medical Implants*, 9:113-130.
211. Willert HG, Puls, P (1972) Die Reaktion des Knochens auf Knochenzement bei der Alloarthroplastik der Hüfte. *Archiv für orthopädische und Unfall-Chirurgie*, 72: 33-71.

212. Zeller V, Ghorbani A, Strady C, Leonard P, Mamoudy P, Desplaces N (2007) Propionibacterium acnes: an agent of prosthetic joint infection and colonization. The Journal of Infection, 55: 119-124.
213. Zimmerli W, Trampuz A, Ochsner PE (2004) Prosthetic joint infections. New England Journal of Medicine, 351: 1645-1654.
214. Zweymüller KA (1986) A cementless titanium hip endoprosthesis system based on press fit fixation: Basic research and clinical results. In: Anderson LD (eds.) AAOS Instructional Course Lectures, Mosby, St.Louis, S. 203.

## 8. Abbildungsverzeichnis:

Abb.1	Primäre Coxarthrose rechtsseitig mit Gelenkspaltverschmälerung, subchondraler Sklerosierung und Geröllzystenbildung auf einer Beckenübersichtsaufnahme bei Z.n. Hüft-TEP-Implantation links.	S.2
Abb. 2a	Anzahl der insgesamt implantierten Primärhüft- und Knieendoprothesen in den USA zwischen 1990 und 2002, Aus Kurz et al.,2005.	S.3
Abb. 2b	Anzahl der insgesamt implantierten Primärhüft- und Knieendoprothesen in den USA zwischen 1990 und 2002 pro 100.000 Einwohner, Aus Kurz et al.,2005.	S.3
Abb. 3	Porenarchitektur eines HA-Knochenersatzmaterials (Endobon®, Biomet,Berlin) mit einer Porengröße von 100 – 300µm und einer Porosität von 45-80% mit interkonnektierenden Makro- und Mikroporensystem bei unterschiedlicher Vergrößerung. Aus: Schnettler et al., 2003.	S.9
Abb. 4	Zementfreie Hüftprothesenschäfte mit Hydroxylapatit-Beschichtung Im proximalen Schaftbereich. (Von oben nach unten: Mallory/Head® Porous Primary Femoral Component; Bi-Metric® Porous Primary Femoral Component;Taperloc® Hip System; Biomet, Berlin).	S.11
Abb. 5	Pistolenvorrichtung zur Beschichtung beim plasma spray coating, aus Metallisation Limited; <a href="http://www.metallisation.com">www.metallisation.com</a> .	S.11
Abb. 6	Strukturformel eines RGD-Moleküls, aus Praktikum: Kraemer & Spatz,2004.	S.12
Abb. 7	Schematische Darstellung eines bakteriellen Biofilms. Polysaccharid-Glycocalix-Bildung, unter der sich im Schutz vor Antibiotika und dem wirtseigenem Immunsystem ein dynamischer Prozess der Bakterienproliferation abspielt. Vom Biofilm können Bakterienkluster abgetrennt werden, die dann als Planktonform in den systemischen Blutkreislauf gelangen können. Aus: Costeron, 2007.	S.15
Abb. 8	Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme einer Biofilmbildung durch Staphylococcus aureus (Labor für Experimentelle Unfallchirurgie, Justus-Liebig- Universität, Gießen).	S.16

- Abb. 9 Überlebensraten von Hüftprothesen aus dem Norwegischen Hüftprothesenregister, die ohne Antibiotikaprophylaxe (None), mit systemischer Antibiose (S), mit Antibiotika-beladenem Knochenzement (C) oder einer Kombination aus systemischer Antibiose und Antibiotika-beladenem Knochenzement (SC) eingebracht wurden. Überlebensraten wurden unabhängig des Revisionsgrundes (a), abhängig von Revisionen aufgrund von Protheseninfektionen (b) oder abhängig von aseptischer Lockerung erfasst (c). Aus: Engesaeter et al., 2003. S.20
- Abb. 10 12-Jahres-Überlebensraten von Hüftprothesen hinsichtlich Infektkomplikationen aus dem Norwegischen Hüftprothesenregister im Vergleich zwischen zementfreier Implantation, zementierter Technik mit Antibiotika-Knochenzement oder zementierter Technik ohne den Zusatz von Antibiotika. Aus: Engesaeter et al., 2006. S.21
- Abb. 11 Strukturformel des Antibiotikums Gentamicin. Aus: [www. www.arzneistoffe.net](http://www.arzneistoffe.net). S.22
- Abb. 12 Nr.1:K-Draht mit Hydroxylapatit, Nr.2: K-Draht mit Hydroxylapatit-Beschichtung, Nr.3: K-Draht mit RGD-HA-Gentamicin-Beschichtung S.27
- Abb. 13 Morphologie der verwendeten HA-Beschichtung mit nanokristalliner, nadelartiger Struktur der HA-Partikel. S.28
- Abb. 14 Industrieroboter zum Aufbringen der Gentamicin-Beschichtung. Roboter mit Mehrgelenkarm und Spritzdüsenvorrichtungen zum Aufbringen der kombinierten Gentamicin-Sulphaft-Crobofat-Beschichtung auf das Implantat durch InkJet-Verfahren (Firma Biomet, Berlin). S.30
- Abb. 15 Op-Technik. A: Steril abgedecktes Operationsfeld . B: Eröffnung der Markhöhle an der Tuberositas Tibiae mit einem Pfriem. C: Einbringen des Kirschner-Drahtes in den Tibiamarkkanal. D: Verschluss der Wunde durch Einzelknopfnähte. S.31
- Abb. 16 Postoperatives Röntgenbild mit korrekter Lage des eingebrachten Implantates und Darstellung der Auftrennung der Tibiae zur Gewinnung von Transversalschnitten aus den beiden proximalen und Distalen metaphysären Abschnitten sowie eines Längsschnitts aus dem diaphysären Abschnitt. S.33
- Abb. 17 Querschnitt durch die proximale Metaphyse der Tibia in Toluidin-Färbung mit zirkulärer Knochenneubildung um das Implantat. S.38
- Abb. 18 Längsschnitt durch die Diaphyse in Toluidin-Färbung mit Knochenneubildung auf der Implantatoberfläche. S.38

- Abb. 19 Technik der semiquantitativen Histomorphometrie zur Bestimmung der Knochenneubildung bei den Querschnitten mit Bestimmung der AOI als ringförmige Flächen aus der Differenz zwischen eines 1,5mm Abstandes zum Implantat (A) und Implantatgrenze. Der Flächeninhalt der AOI beträgt 4,02mm<sup>2</sup> (B). S.40
- Abb. 20 Technik der Histomorphometrie zur Bestimmung der Knochenneubildung bei Längsschnitten aus dem Schaftbereich. Toluidin-Dünnschliff (a) mit Bestimmung der AOI als Fläche aus der Differenz zwischen eines 0,5 mm Abstandes zum Implantat (b) und Implantatfläche (c). S.41
- Abb. 21 Messung des direkten Knochen-Implantat-Kontaktes an einem Längsschliff der Diaphyse. Gelbe Linie: Länge des Implantates; Rote Linie: Direkter Knochen-Implantat-Kontakt S.43
- Abb. 22 Technik zur Bestimmung der Anzahl der Fremdkörperriesenzellen bei Längsschnitten aus dem Schaftbereich. Innerhalb einer netzförmigen Zählkammerstruktur wurden zwischen der Implantatoberfläche und dem koritkale Knochen alle Zellen mit mehr als drei Zellkernen erfasst. Nur Kästchen, die in Gänze innerhalb des Knochenmarkraums lagen und keinen Kontakt zur Implantatoberfläche oder koritkalem Knochen hatten, wurden berücksichtigt. S.44
- Abb. 23 Mittlerer Schaftbereich 4 Wochen nach Implantation eines HA-Beschichteten K-Drahtes. Es ist nur eine marginale Knochenneubildung am Unterrand und teilweise am Oberrand des Implantates zu erkennen. Die unregelmäßige Anfärbung resultiert aus der ungleichmäßigen Mineralisation der Kortikalis. S.48
- Abb. 24 Distale Diaphyse 4 Wochen nach Implantation eines HA-beschichteten K-Drahtes. Der neu gebildete Knochen entspringt vom Endost der Kortikalis. Die neu gebildeten Bälkchen bestehen aus Lamellenknochen und Herden von Geflechtknochen. In der Kortikalis sind partiell Mineralisationsstörungen zu erkennen. S.49
- Abb. 25 Detailhistologie aus dem Knochenmark der proximalen Diaphyse mit Darstellung von mehrkernigen Riesenzellen 4 Wochen nach Implantation eines HA-beschichteten Implantates. Es zeigen sich mehrere benachbart liegende mehrkernige Riesenzellen. S.49
- Abb. 26 Distale Metaphyse 4 Wochen nach Implantation eines Gentamicin-RGD- HA- beschichteten K-Drahtes. Knochenneubildung zwischen 2 und 6 Uhr mit teilweise direktem Knochen-Implantat-Kontakt. S.50

Abb. 27	Detailhistologie der distalen Metaphyse 4 Wochen nach Implantation eines Gentamicin-RGD-HA-beschichteten K-Drahtes. Erweiterung der Haversschen Kanäle in der Kortikalis mit schmalem Knochensaum entlang der Implantatoberfläche.	S.51
Abb. 28	Querschnitt im Bereich der proximalen Metaphyse nach 12 Wochen mit unbeschichtetem K-Draht. Geringgradige Knochen-Neubildung um das Implantat herum mit zumeist fehlendem direkten Knochen-Implantat-Kontakt.	S.55
Abb. 29	12 Wochen nach Implantation eines unbeschichteten K-Drahtes Bindegewebsformation um das Implantat herum. Kein direktes „Bone-bonding“ erkennbar.	S.56
Abb. 30	Hohlräume in der Kortikalis der distalen Metaphyse 12 Wochen nach Implantation eines unbeschichteten K-Drahtes durch Erweiterung der Lumina der Havers'schen Kanäle.	S.56
Abb. 31	Knochenneubildung eines HA-beschichteten K-Drahtes in der Proximalen Metaphyse nach 12 Wochen. Es zeigt sich eine starke Knochenneubildung, die sich zirkulär um das ganze Implantat erstreckt. Die Knochenneubildung geht dabei vom Endost aus, von dem sich Knochenspannen durch das Knochenmark in Richtung des Implantates ausbreiten (a). In der höheren Vergrößerung lassen sich die intakten Knochen trabekel nachweisen, die vom Endost der Kortikalis ausgehen (b).	S.57
Abb. 32	Knochen-Implantat-Kontakt in der distalen Metaphyse 12 Wochen nach Implantation eines HA-Implantates. Es besteht bis auf wenige Ausnahmen ein direkter Knochen-Implantat-Kontakt über dem gesamten distalen Implantatanteil. Die aufgelagerten, neu gebildeten Knochen trabekel haben distal Anschluss an die vom Endost ausgehende Knochenneubildung.	S.58
Abb. 33	Struktur der Kortikalis und Knochenneubildung an der distalen Metaphyse bei einem HA-Implantat nach 12 Wochen. Fast vollständig intakte Kortikalis mit nur minimaler Erweiterung der Havers'schen Kanäle und guter Knochenneubildung in der distalen Metaphyse.	S.58
Abb. 34	Knochenneubildung in der proximalen Metaphyse bei RGD-Beschichtung nach 12 Wochen. Breite Knochenspannenbildung um das gesamte Implantat, am deutlichsten in dem Bereich, der dem Endost am nächsten liegt.	S.59
Abb. 35	Osteolytische Reaktion (Pfeile) nach Implantation eines Gentamicin-RGD-HA-beschichteten K-Drahtes am Interface nach 12 Wochen.	S.560

Abb. 36 Knochenmarkreaktion nach Implantation eines Gentamicin-RGD-HA-beschichteten K-Drahtes im mittleren Tibiaabschnitt nach 12 Wochen. Es zeigen sich mehrere Areale einer Knochenmarkfibrose, die mit deutlicher Bindegewebeformation und fehlendem poetischen Fettmarksgewebe einhergehen. Daneben sind einzelne Zonen mit intakter Markstruktur zu erkennen.

S.60

## 9. Tabellenverzeichnis:

Tab. 1	Studiendesign mit Anzahl der Kaninchen pro Woche und Gruppe.	S.26
Tab. 2	Entwässerungsplan.	S.34
Tab. 3	Übersicht zur Herstellung der Anfärbung der Schnitte.	S.36
Tab. 4	Beispiel der Computer-basierten Messung des direkten Knochen-Implantat-Kontakts.	S.43
Tab. 5	Knochenneubildung in den drei unterschiedlichen Tibiaregionen an der proximalen Metaphyse bzw. distalen Metaphyse nach einer Implantationsdauer von 4 Wochen. Die Knochenneubildung wurde als prozentualer Anteil von neugebildeter Knochenfläche an der AOI von 4mm <sup>2</sup> bzw. 1,49mm <sup>2</sup> gemessen. Die AOI für den Schaftbereich wurde in Abhängigkeit der Länge des erfassten Implantates für jeden Schnitt individuell erfasst.	S.46
Tab. 6	Knochen-Implantat-Kontakt im Schaftbereich nach 4 Wochen als Ausdruck der knöchernen Integration des Implantates als prozentualer Anteil der Gesamtknochenlänge.	S.47
Tab. 7	Anzahl der Riesenzellen im Knochenmark des Tibiaschaftes nach 4 Wochen.	S.47
Tab. 8	Knochenneubildung in den drei unterschiedlichen Tibiaregionen nach einer Implantationsdauer von 12 Wochen. Die Knochenneubildung wurde als prozentualer Anteil von neugebildeter Knochenfläche an der AOI von 4mm <sup>2</sup> bzw. 1,49mm <sup>2</sup> an der proximalen Metaphyse bzw. distalen Metaphyse gemessen. Die AOI für den Schaftbereich wurde in Abhängigkeit der Länge des erfassten Implantates für jeden Schnitt individuell erfasst.	S.53
Tab. 9	Direkter Knochen-Implantat-Kontakt im Schaftbereich nach einer Implantationsdauer von 12 Wochen als Ausdruck der knöchernen Integration des Implantates. Der Knochen-Implantat-Kontakt wurde gemessen als prozentualer Anteil des direkten Knochenkontaktes zum Implantat an der gesamten Implantatlänge.	S.54
Tab. 10	Anzahl der Riesenzellen im Knochenmark des Tibiaschaftes nach 12 Wochen.	S.54

Tab. 11	Knochenneubildung nach 4 und 12 Wochen in den drei unterschiedlichen Tibiaregionen. Die Knochenneubildung wurde als prozentualer Anteil von neugebildeter Knochenfläche an der AOI von 4mm <sup>2</sup> bzw. 1,49mm <sup>2</sup> an der proximalen Metaphyse bzw. distalen Metaphyse gemessen. Die AOI für den Schaftbereich wurde in Abhängigkeit der Länge des erfassten Implantates für jeden Schnitt individuell erfasst.	S.62
Tab. 12	Direkter Knochen-Implantat-Kontakt im Schaftbereich nach 4 und 12 Wochen als Ausdruck der knöchernen Integration des Implantates. Der Knochen-Implantat-Kontakt wurde als prozentualer Anteil des direkten Knochenkontaktes zum Implantat an der gesamten Implantatlänge gemessen.	S.63
Tab. 13	Anzahl der Riesenzellen im Schaftbereich nach 4 und 12 Wochen.	S.63

## **10. Erklärung:**

Ich erkläre: Ich habe die vorgelegte Dissertation selbstständig, ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig- Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten.

(Ort, Datum)

(Unterschrift)

## **11. Danksagung**

Für die Möglichkeit der Durchführung der Arbeit und die Bereitstellung von Labor und Klinik möchte ich Herrn Univ.-Prof. Prof. h.c. Dr. med. Dr. med. vet. Dr. h.c. R. Schnettler und Prof. Dr. med. Dr. biol. hom. V. Alt für seine Betreuung danken.

Neben dem üblichen Klinikalltag gelang es, mich bei meiner Arbeit zu unterstützen, zu beraten und zu motivieren.

Besonderer Dank gebührt auch meinem Lebenspartner, Florian Jaschko, der mich mit viel Geduld und Entbehrungen unterstützte.

Weiterhin möchte ich mich bei Frau A. Hild, MTA des Labors, für ihre Einarbeitung und Hilfestellung bei technischen Problemen bedanken.

Auch meinen Mitstreiterinnen, Katherina Heerich und Erika Margesin, möchte ich für deren Mitarbeit Danke sagen.

Schließlich bin ich ebenso der Tierärztin Frau S. Kussmann und Dr. W. Pabst aufgrund ihrer Teilhabe an dieser Arbeit zu Dank verpflichtet.