

Diplomarbeit

**Osseointegration von resorbierbaren Implantaten aus
Poly(3-hydroxy)butyrat: Untersuchung am
Rattenmodell durch in-vivo Mikro-Computer-
Tomographie**

eingereicht von

Jan Weigel

Geb.Dat.: 26.06.1986

zur Erlangung des akademischen Grades

**Doktor der gesamten Heilkunde
(Dr. med. univ.)**

an der

Medizinischen Universität Graz

ausgeführt an der

Universitätsklinik für Kinderchirurgie, Graz

unter den Anleitungen von

**Assoz. Prof. Priv.-Doz. Dr. med. Annelie-Martina Weinberg
und
Dr. med. univ. Stefan Franz Fischerauer**

Eidesstattliche Erklärung

Ich erkläre ehrenwörtlich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und ohne fremde Hilfe verfasst habe, andere als die angegebenen Quellen nicht verwendet habe und die den benutzten Quellen wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht habe.

Graz, am 05.06.2013

Jan Weigel

Danksagungen

Mein besonderer Dank für die Unterstützung bei der Erstellung meiner
Diplomarbeit gilt:

Dr. med. univ. Stefan Fischerauer

Assoz. Prof. Priv.- Doz. Dr. med. Annelie-Martina Weinberg

Mag. Elisabeth Martinelli

Vielen Dank!

Zusammenfassung

Fragestellung

Resorbierbare Implantat-Materialien, wie Poly(-3-hydroxy)butyrat (PHB) oder Magnesiumlegierungen (MgL) werden im Körper abgebaut und müssen daher nicht durch einen „Zweiteingriff“ entfernt werden. Durch den Degradationsprozess wird außerdem die mechanische Last schrittweise auf den heilenden Knochen übertragen. Diese und weitere Vorteile gegenüber konventionellen metallischen Materialien, wie Titan oder Stahl begründen das Interesse an resorbierbaren Implantaten. Ziel dieser Arbeit ist es das osseointegrative Verhalten von PHB basierten Implantaten mit den Zusatzstoffen Herafill® und Zirkoniumdioxid (ZrO₂) anhand des relativen Knochenvolumens (BV/TV) zu untersuchen und mit der MgL WZ21 zu vergleichen. Zusätzlich soll die Methodik, also die Aussagekraft der in-vivo Erhebung des BV/TV mittels Mikro-Computer-Tomographie (μ CT) als Prädiktor mechanischer Stabilität, überprüft werden.

Methodik

Für die Beantwortung der Fragestellung wurden retrospektiv die Daten von insgesamt 84 Ratten ausgewertet. Allen Versuchstieren wurden am Tag 1 des Versuchs in beide Femora ein Implantat aus einer der sechs verschiedenen Materialgruppen in transkortikaler Lage implantiert (PHBnativ, PHB3%ZrO₂, PHB3%ZrO₂+10%Herafill®, PHB3%ZrO₂+30%Herafill®, PHB30%Herafill® und WZ21). Von je sechs Tieren pro Materialgruppe wurde nach drei, sechs und neun Monaten eine in-vivo μ CT mit einer Auflösung von 35 μ m pro Voxel angefertigt. Anschließend wurde das BV in einem Radius von 210 μ m um das Implantat gemessen, um das BV/TV zu errechnen. Mithilfe der Daten von 48 Versuchstieren aus einer Studie die die mechanische Stabilität der gleichen, transkortikal gelegenen, Implantate mit einem Push-Out-Test (POT) nach drei, sechs und neun Monaten überprüfte [65] wurde anschließend untersucht wie sich die, im POT gemessene, Ultimate-Shear-Strength (σ_u) zum BV/TV verhält.

Ergebnisse

Die Parameter BV und BV/TV zeigten für alle Materialgruppen eine kontinuierliche Abnahme im Verlauf der neun Monate. Sowohl ZrO₂, als auch der Knochenersatzstoff Herafill®, insbesondere aber deren Kombination, hatten einen positiven Einfluss auf die Knochenapposition. Im Vergleich zeigte sich sowohl zwischen PHB3%ZrO₂ und PHB3%ZrO₂+30%Herafill®, als auch zwischen PHB30%Herafill® und PHB3%ZrO₂+30%Herafill® ein signifikant höherer BV/TV-Wert zu Gunsten von

PHB3%ZrO₂+30%Heracore®. Der Vergleich der BV/TV-Werte von PHB basierten Implantate mit WZ21 erbrachte für die 3-Monats-Messwerte eine signifikant höhere Knochenanbaurrate für die Magnesiumlegierung. Im weiteren Verlauf war die Beurteilung aufgrund der Degradation von Magnesium nur mehr erschwert möglich. Ungleich den PHB-Implantaten wies WZ21 eine extrem hohe σ_u von 5,15 (3m) bzw. 5,74 (6m) N/mm² auf gegenüber 0,39(3m) und 0,24 (6m) N/mm² für PHB3%ZrO₂ und 0,41(3m) bzw. 0,52(6m) N/mm² für PHB3%ZrO₂+30%Heracore®. Die Mittelwerte von BV/TV korrelierten insgesamt kaum mit σ_u , zum 6-Monats-Zeitpunkt verhielten sich die Parameter teilweise gegenläufig.

Schlussfolgerung

Die Kombination aus 30% Heracore® und ZrO₂ zeigt innerhalb der PHB basierten Implantat-Gruppen die besten Ergebnisse für BV/TV und σ_u . Der Vergleich mit WZ21 war nicht möglich, da die Erfassung des BV im Falle von WZ21 aufgrund der, im Vergleich zu PHB, hohen Resorptionsgeschwindigkeit unvollständig war. Gleichzeitig hatten die mit der Resorption einhergehenden Oberflächenveränderungen starke Auswirkungen auf die gemessene σ_u . Dementsprechend ist der prädiktive Wert von BV/TV für die mechanische Stabilität des Bone-Implant-Interface (BII) in dieser Studie nicht gegeben. Weitere Ursachen für diesen fehlenden Zusammenhang liegen in der geringen Auflösung der in-vivo Bildgebung (35µm/Voxel) und der daraus resultierenden Dimension der „Region Of Interest“ von 210 µm sowie der transkortikalen unfixierten Einbringung der Pins.

Schlagwörter

Polyhydroxybutyrat; Osseointegration; Mikro-Computer-Tomographie; bioresorbierbare Implantate;

Abstract

Introduction

Resorbable implants like poly(-3-hydroxy)butyrate (PHB) or magnesium alloys (MA) are degraded in the body and thus do not need to be removed by additional surgery. Furthermore mechanical load is transferred gradually to the healing bone in the process of degradation. Along with other assets these advantages over conventionally used implants like titanium or steel are the reason for the special interest in resorbable implants. The purpose of this study is to investigate the osseointegrative potential of PHB-implants enhanced by the addition of Herafill® and/or zirconiumdioxide (ZrO₂). This is carried out by microcomputed tomography (μCT) based measurements of bone-volume per tissue-volume (BV/TV). Subsequently the obtained data is compared to MA WZ21. In addition the method of assessing BV/TV in-vivo and its predictive value for mechanical resilience shall be reviewed.

Methods

The investigation of these issues is done retrospectively using data of a total of 84 rats. On day one of the observation period all experimental animals underwent surgery receiving a transcortically placed implant in both femora which belonged to one of the six different implant groups in question: PHBnativ, PHB3%ZrO₂, PHB3%ZrO₂+10%Herafill®, PHB3%ZrO₂+30%Herafill®, PHB30%Herafill® and WZ21. In-vivo μCT scanning was carried out on six rodents per implant group after 3, 6 and 9 months with a resolution of 35μm per Voxel. Subsequently BV was measured in a zone of 210μm around the implant in order to calculate BV/TV. Data of 48 rodents originated from a study that investigated the mechanical properties of the same transcortically placed implants by means of push-out testing (POT) after 3, 6 and 9 months [65]. By Using this data this study sought to examine possible correlations between ultimate-shear-strength (σ_u) and BV/TV.

Results

BV and BV/TV exposed continual decline for all implant groups throughout the 9 months period. ZrO₂ and Herafill® both had a positive influence on bone apposition with most impact seen when using the combination of the two. Comparison of PHB3%ZrO₂ with PHB3%ZrO₂+30%Herafill® and PHB30%Herafill® with PHB3%ZrO₂+30%Herafill® showed significantly higher levels of BV/TV for PHB3%ZrO₂+30%Herafill®. Collating BV/TV of PHB based implants with WZ21 revealed significant differences only for 3-month-measurements. WZ21 achieves very high values for σ_u of 5,1 (3m) and 5,7 (6m)

N/mm² unlike PHB3%ZrO₂ (0,39 (3m); 0,24 (6m) N/mm²) and PHB3%ZrO₂+30%Herafill® (0,41 (3m); 0,52(6m) N/mm²). Means of BV/TV showed weak correlations with σ_u after 3 months and even divergent trends after 6 months.

Conclusion

The combination of 30% Herafill® and ZrO₂ produces the highest rates of BV/TV and σ_u within the group of PHB based implants. The comparison of PHB based implants with WZ21 was not possible due to high degradation rates of WZ21 that interfered with the assessment of BV. Moreover fast degradation of WZ21 modified its surface properties and thereby affected values obtained for σ_u . Accordingly results of this study could not detect any predictive value of BV/TV for mechanical resilience of the bone-implant-interface (BII). Further reasons for this unexpected outcome are related to low resolution of in-vivo μ CT (35 μ m/voxel) and resulting dimension of the region of interest (210 μ m) as well as to unfortified transcortical placement of implants.

Keywords

Polyhydroxybutyrate; osseointegration; microcomputed tomographie; bioresorbable implants;

Inhaltsverzeichnis

Inhalt

Danksagungen	iii
Zusammenfassung	iv
Abstract.....	vi
Inhaltsverzeichnis	viii
Glossar und Abkürzungen	x
Abbildungsverzeichnis	xii
Tabellenverzeichnis	xiii
1 Einleitung	1
1.1 Der menschliche Knochen	3
1.1.1 Makroskopische Betrachtung	3
1.1.2 Histologische Betrachtung	5
1.1.3 Regulationsmechanismen des Knochenstoffwechsels	7
1.2 Fraktur und Heilungsprozess	9
1.2.1 Direkte Knochenbruchheilung.....	9
1.2.2 Indirekte Knochenbruchheilung	10
1.2.3 Modifikatoren der indirekten Knochenbruchheilung	11
1.3 Osteosynthese-Materialien und Frakturversorgung.....	12
1.3.1 Konventionelle metallische OS-Materialien	12
1.3.2 Nachteile konventioneller metallischer OS-Materialien	13
1.3.3 Alternative Implantat-Materialien	14
1.3.4 Poly(3-hydroxy)butyrat	16
1.3.5 Herafill®.....	18
1.3.6 Zirkoniumdioxid	18
1.3.7 WZ21	19
1.4 Osseointegration	20
1.4.1 Modifikatoren der OI.....	20
1.4.2 OI und Oberflächenbeschaffenheit	20
2 Material.....	21
2.1 Tiere	21
2.2 Implantate	22
2.3 Mikro-Computer-Tomographie (μ CT)	24
2.4 Medikamente	24
3 Methoden.....	25
3.1 Versuchsanordnung	25
3.2 Operativer Eingriff.....	27
3.3 Schmerzmedikation	28
3.4 Euthanasie und Explantation	28
3.5 Push-Out-Test (POT).....	29
3.6 In-vivo μ CT	29
3.6.1 Bildverarbeitung	29
3.6.2 Messverfahren	30
3.7 Statistische Analyse	32
4 Ergebnisse.....	33
4.1 Durchmesser der ROI, absolutes BV und BV/TV in der Verlaufsbeobachtung ..	33
4.2 Auswirkungen von Herafill® auf BV/TV	34
4.3 Auswirkungen von ZrO ₂ auf BV/TV	35
4.4 Vergleich der PHB-Implantate mit WZ21	36

4.5	Vergleich von BV/TV mit den Ergebnissen aus einem POT	37
5	Diskussion	39
5.1	OI in der in-vivo μ CT	40
5.2	Rattenmodell	42
5.3	Interpretation der Resultate	43
5.3.1	Auswirkungen von Herafill® und ZrO ₂ auf BV/TV im Vergleich mit WZ21 und Implikationen des POT	43
5.3.2	Auswirkungen der Resorptionsgeschwindigkeit auf BV/TV und σ_u	44
5.4	Diskussion der Methodik	46
6	Konklusion	47
7	Literaturverzeichnis	49

Glossar und Abkürzungen

BIC	Bone Implant Contact = Kontaktfläche zwischen Implantat und Knochen
BII	Bone-Implant-Interface = Kontaktstelle zwischen Knochen und Implantat
BV	Bone Volume = absolutes Knochenvolumen
BV/TV	Bone Volume per Tissue Volume = relatives Knochenvolumen bzw. Knochenvolumen im Verhältnis zum Gewebsvolumen (siehe Formel 2)
Ca²⁺	Calcium-Ionen
CC	1 α ,25(OH) ₂ -Cholecalciferol
CLO	Calcitonin
EM	Elastizitätsmodul
EZM	Extrazellulärmatrix
GW1	Gewebszylinder 1
GW2	Gewebszylinder 2
HPO	Ca ²⁺ -Phosphat
MAK	Maximale Arbeitsplatz-Konzentration
MF	Maximum Push Out Force = im POT maximal applizierbare Kraft
Mg	Magnesium
MgL	Magnesiumlegierung
MWUT	Mann-Whitney-U-Test
OI	Osseointegration
OS	Osteosynthese
PDS	Polydioxanone
PHB	Poly(-3-hydroxy)butyrat
PLA	Polylactid
PLGA	Polylactid-co-Glycolid
POT	Push-Out-Test

PTH	Parathyrin bzw. Parathormon
ROI	Region Of Interest
TV	Tissue Volume = Gewebsvolumen (siehe Formel 2)
ZrO₂	Zirconiumdioxid
μCT	Mikro-Computer-Tomographie
σ_u	Ultimate-Shear-Strength
σ_M	Zugfestigkeit

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schematische Darstellung eines Röhrenknochens aus [10]	3
Abbildung 2: Poly(3-hydroxy)butyrat, aus [37]	17
Abbildung 3: PHB-Pin; links steril verpackt;	24
Abbildung 4: Schematische Darstellung der Versuchsgruppen	26
Abbildung 5: Gasnarkose mit Isofluran	27
Abbildung 6: Übermäßiger proximaler Knochenanbau	30
Abbildung 7: PHBnativ-Pin nach 6 Monaten	31
Abbildung 8: PHB30%Herafill-Pin nach 6 Monaten	32
Abbildung 9: Durchmesser der ROI in Millimetern (=h) im Verlauf	33
Abbildung 10: BV/TV im Verlauf	34
Abbildung 11: Absolutes BV in mm ³ im Verlauf	34
Abbildung 12: BV/TV im Verlauf (Mittelwerte mit Standardabweichung)	35
Abbildung 13: BV/TV im Verlauf (Mittelwerte mit Standardabweichung)	36
Abbildung 14: σ_u im Verlauf (Mittelwerte mit Standardabweichung)	37
Abbildung 15: BV/TV im Verlauf	38
Abbildung 16: WZ21-Pin nach 6 Monaten	46

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Verwendete Implantate.....	22
Tabelle 2: Mechanische Eigenschaften der Implantate	23
Tabelle 3: Verwendete Medikamente.....	25
Tabelle 4: Vergleich PHB3%ZrO2 mit PHB3%ZrO2+30%Herafill	35
Tabelle 5: Vergleich PHB3%ZrO2+30%Herafill® mit PHB30%Herafill®.....	35
Tabelle 6: Vergleich der PHB-Implantate mit WZ21	36
Tabelle 7: Vergleich BV/TV und σ_u	38

1 Einleitung

Im Rahmen dieser Diplomarbeit, sollen verschiedene Implantate, die auf dem Biopolymer Poly(-3-hydroxy)butyrat (PHB) basieren, hinsichtlich ihrer osseointegrativen Eigenschaften charakterisiert und mit einer biodegradierbaren Magnesium-Legierung (MgL) verglichen werden. Der Begriff der Osseointegration (OI) wurde von Brånemark et Al. (1977) geprägt und bezeichnet die Verankerung und Integration eines Implantates in den lebenden Knochen [1]. Aktuellere Definitionen beschreiben die OI als „Prozess durch den (...) eine rigide Fixierung alloplastischer Materialien im Knochen während funktioneller Belastung erreicht und aufrecht erhalten wird.“ [2]. Die rasche und nachhaltige OI ist also das Korrelat eines komplikationslosen Einheilungsverlaufes und guter mechanischer Stabilität.

Die in dieser Studie verwendeten Implantate unterscheiden sich von herkömmlichen metallischen Implantaten vor allem in einem Punkt: Sie können im menschlichen Organismus durch hydrolytische oder enzymatische Prozesse aufgelöst werden. Diese Eigenschaft eröffnet neue Dimensionen in der Behandlung von Knochenbrüchen, denn ein degradierbares Implantat löst zwei Probleme die dem chirurgischen Fach bei der Verwendung metallischer Materialien für die operative Osteosynthese von Knochenbrüchen seit eh und je Kopfzerbrechen bereiten:

1. Herkömmliche Metalle, mit Ausnahme von Magnesium- und Eisenlegierungen, sind nicht resorbierbar und verbleiben, deshalb solange im menschlichen Körper, bis sie im Rahmen eines Zweiteingriffs entfernt werden. Zwar gibt es Situationen, in denen eine Extraktion des metallischen Fremdkörpers nicht erforderlich ist, viel öfter ist der Zweiteingriff jedoch unumgänglich, vor allem bei Kindern, deren Bewegungsapparat sich noch im Wachstum befindet. Jede zusätzliche Operation ist mit vielerlei Risiken behaftet, die zum einen mit der Narkose, zum anderen mit Verwachsungen und Vernarbungen in der voroperierten Körperregion zusammen hängen [3]. Hinzu kommt die Gefahr einer Nachblutung und einer Refrakturierung [4]. Neben den gesundheitlichen Überlegungen, dürfen natürlich auch die sozialen und ökonomischen Implikationen eines weiteren Krankenhausaufenthaltes nicht außer Acht gelassen werden. Kosten entstehen durch die Operation, den stationären Aufenthalt, sowie durch Absenzen am Arbeitsplatz. Im Falle junger Patienten sind die Konsequenzen primär psychosozialer Natur: Fehlzeiten in der Schule und eine neuerliche psychische Belastung durch Operation und Krankenhausaufenthalt.

2. Ein wesentlicher Vorteil, den biologisch abbaubare Implantate mit sich bringen, liegt in deren revolutionären Biomechanik. Wenn es gelingt Implantate herzustellen, die eine zeitlich exakt steuerbare Degradation im menschlichen Körper unterlaufen, dann könnte die mechanische Belastung schrittweise auf den zu behandelnden Knochen übertragen werden und dieser würde sich unter der kontinuierlich zunehmenden Last optimal an die biomechanischen Anforderungen adaptieren. Zusätzlich, zum Vorteil des graduell zunehmenden mechanischen Reizes, haben Biopolymere und Magnesium-Legierungen einen, dem Knochen ähnlicheren, Elastizitätsmodul als die konventionellen metallische Werkstoffe Titan und Edelstahl, und fangen dadurch weniger mechanische Stimuli ab, welche einen Motor für das Knochenwachstum darstellen [5-7]. Diese Eigenschaften sind von besonderer Bedeutung bei der Behandlung kindlicher Knochenbrüche, da sie im Vergleich zu Erwachsenen eine schnellere Frakturheilung zeigen und so von dieser speziellen Biomechanik am meisten profitieren [3].

Die Trümpfe dieser neuartigen Werkstoffe sind also deren biologische Abbaubarkeit und physikalischen Eigenschaften. Sie eröffnen neue Perspektiven in der Therapie von Frakturen. Dabei würden aus oben genannten Gründen vor allem Patienten im Kindesalter durch die ein-zeitige Frakturversorgung profitieren. Jedoch ist die Datenlage zum PHB und zu MgL als Osteosynthesematerial vergleichsweise dünn. Es fehlt an empirischen Daten hinsichtlich deren Biokompatibilität. Wobei die Biokompatibilität in diesem Zusammenhang als Sammelbegriff fungieren soll: Einerseits für die funktionelle, mechanische Eignung des Materials als Osteosynthesematerial und andererseits für dessen Kompatibilität mit dem menschlichen Knochengewebe und die Verträglichkeit des Stoffes und seiner Abbauprodukte.

Die Hauptschwierigkeit bei der Evaluation dieser Eigenschaften ist, dass kein „Marker“ existiert der tatsächlich genau diese Merkmale messen könnte. Es musste deshalb ein Parameter gefunden werden der gut mit der Biokompatibilität, wie sie hier definiert wurde, korreliert und gleichzeitig gut zu objektivieren und reproduzieren ist. Im Lichte dieser Überlegungen fiel daher die Entscheidung die OI anhand von Mikro-Computertomographie(μ CT)-Schnittbildern zu beurteilen. Zwar ist die OI selbst wiederum ein abstrakter Begriff, der für sich genommen nicht quantifizierbar ist. Im Verlauf dieser Einleitung möchte ich jedoch erläutern wie es gelingen kann, diesen Prozess greifbar und in Zahlen fassbar zu machen. Zunächst möchte ich aber die anatomischen, histologischen und physiologischen Grundlagen des Knochens herausarbeiten und einen kurzen Überblick über die Frakturversorgung und den Stand der Dinge in der Implantat-Technologie geben.

1.1 Der menschliche Knochen

Neben seiner tragenden Rolle im Bewegungsapparat, ist der Knochen im menschlichen Körper außerdem ein wichtiger Bestandteil des Calcium- und Phosphor-Stoffwechsels, sowie die Bildungsstätte der Erythrozyten, Leukozyten und Thrombozyten [8,9].

1.1.1 Makroskopische Betrachtung

Grundsätzlich lassen sich die Knochen in vier verschiedene Typen einteilen [8]:

- *Lange Knochen* = Röhrenknochen
- *Kurze Knochen* = Handwurzelknochen und Fußwurzelknochen
- *Platte Knochen* = Schädeldach, Sternum, Scapula, Hüftbein
- *Unregelmäßige Knochen* = Knochen der Schädelbasis und des Gesichtsschädels; Wirbel und Rippen

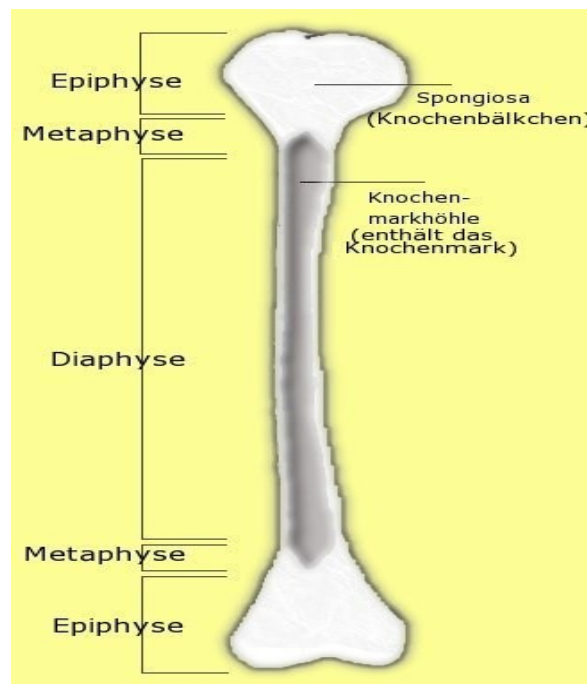


Abbildung 1: Schematische Darstellung eines Röhrenknochens aus [10]

Der Röhrenknochen selbst gliedert sich wiederum in 4 Abschnitte [8]:

1. *Die Epiphyse*, sie bildet die Gelenksfläche aus und trägt einen Überzug aus hyalinem Knorpel [8].
2. *Die Epiphysenfuge*. Ist an der Epiphysen-Diaphysen-Grenze gelegen und besteht aus einer enchondralen Verknöcherungszone. Sie ermöglicht das Längenwachstum des Röhrenknochens. Dabei wird Knorpelgewebe mineralisiert, durch Osteoklasten umgebaut und schließlich durch Anlagerung von Osteoblasten und der nachfolgenden Bildung von Osteoid zu hartem Knochen gewandelt [9].
3. *Die Diaphyse*, also der Schaft des Knochens. In seiner Markhöhle beherbergt er das Knochenmark [8].
4. *Die Apophyse*. Ist ein Muskelansatzhöcker, der beim kindlichen Knochen meist über eine eigene Wachstumsplatte vom Schaft getrennt ist (z.B. Trochanter major und minor des Femur) [8].

Mit bloßem Auge kann man am Knochen zwei unterschiedliche Bauprinzipien unterscheiden. Einerseits die Substantia Spongiosa, die aus Trabekeln aufgebaut ist, die trajektoriell, entsprechend der größten, auf den Knochen einwirkenden, Zug- oder Druckbelastung ausgerichtet sind. Diese Knochenarchitektur findet man vor allem in den Epiphysen der langen Röhrenknochen [8,11]. Andererseits die Substantia Corticalis, eine besonders dichte Schicht, die bei allen Knochen unterhalb des Periosts zu finden ist. Im Bereich der Diaphyse der langen Röhrenknochen findet man sie in einer mehrere Millimeter dicken Ausführung, dort bezeichnet man sie dann als Substantia Compacta [8,11].

Alle Knochen sind an ihrer äußeren Oberfläche von Periost umgeben. Das Periost besteht aus zwei Schichten [8,11]:

- *Dem Stratum osteogenicum*. Es liegt dem Knochen unmittelbar an und besitzt reichlich Osteoblasten. Von dieser Schicht gehen das Dickenwachstum des Knochens aus, sowie die Bruchheilung nach Frakturen der knöchernen Struktur [8,11].
- *Dem Stratum fibrosum*, welches aus einem Netz zugfester Fasern besteht und zur mechanischen Stabilität beiträgt [8,11].

1.1.2 Histologische Betrachtung

Das Knochengewebe setzt sich aus verschiedenen Zelltypen und einer, die Zellen umgebenden, Extrazellulärmatrix (EZM) zusammen.

1.1.2.1 Zellen und mikroskopische Struktur des Knochens

Zu den Zellen des Knochengewebes zählen [9,11]:

- *Die Osteoblasten.* Diese Zellen bilden Knochengrundsubstanz und Kollagenfibrillen. Sie entstehen, unter dem Einfluss lokaler Wachstumsfaktoren (BMP-2), aus Knochenstammzellen, welche dem Periost, Endost, sowie den Volkmann'schen und Haver'schen Kanälen anliegen [9,11].
- *Die Osteoklasten.* Sind große (50-100µm) mehrkernige Zellen, die für den Ab- bzw. Umbau mineralisierter Knochenmatrix zuständig sind. Beim Abbau des Knochens bilden die Osteoklasten große Buchten im Knochen aus, die sogenannten Howship'schen Lakunen. Im Zusammenspiel mit den Osteoblasten, sind sie für den permanenten Umbau des Knochens verantwortlich. Der Knochen ist während des Wachstums und auch im Erwachsenenalter kontinuierlichen Adaptationsvorgängen an aktuelle mechanische Belastung, Stoffwechselsituation und ähnlichen Anforderungen unterworfen. Dieser kontinuierliche Umbau wird auch als Remodeling bezeichnet [9,11].
- *Die Osteozyten.* Sie entstehen aus von EZM umschlossenen Osteoblasten und zeigen nur mehr geringe sekretorische und resorptive Aktivität. Ihre Aufgabe liegt vor allem in der Erhaltung des Gewebes. Die Osteozyten stehen durch ein Geflecht an Zellfortsätzen mit Gefäßen und anderen Osteozyten in Verbindung [9,11].

Die EZM besteht aus Kollagenfibrillen (v.a. Typ I), Hydroxylapatit-Kristallen und Proteoglykanen. Nach der Ausrichtung der Kollagenfibrillen kann man den Knochen in zwei Typen differenzieren [9,11]:

1. *Geflechtknochen:* beim Geflechtknochen sind die Kollagenfibrillen netzartig miteinander verflochten[9,11].
2. *Lamellenknochen:* der Lamellenknochen entwickelt sich aus der Vorstufe des Geflechtknochens. Hier sind die Kollagenfasern in Schichten organisiert. Innerhalb

einer Schicht ist das Kollagen gleichsinnig, parallel ausgerichtet. Die Schichten selbst sind hinsichtlich der Verlaufsrichtung ihrer kollagenen Fasern immer gegensinnig zueinander aufgebaut. So entsteht ein biomechanisch höherwertigeres Konstrukt. In der Substantia compacta ist der Lamellenknochen in Form von Osteonen organisiert. Ein Osteon besteht aus 5-20 Knochenlamellen, die konzentrisch um einen Havers-Kanal angeordnet sind. Der Kanal ist mit Endost ausgekleidet und steht in Verbindung mit der Markhöhle. Über ihn erfolgt die nervale und vaskuläre Versorgung des Gewebes [9,11].

Die Hydroxylapatit-Kristalle, bestehend vor allem aus Kalziumphosphat und Kalziumkarbonat, lagern sich an die Kollagenfibrillen an. So ergibt sich ein Verband aus druckresistenten Kristallen und zugfesten Fibrillen [11].

1.1.2.2 Knochenwachstum

Die Entstehung von Knochengewebe findet während des Wachstums, bei Verletzungen und während des ganzen Lebens im Rahmen von Adaptationsvorgängen statt [11]. Sie kann zwei Wege beschreiten. Einerseits den Weg der desmalen, direkten, Osteogenese. Hierbei geht die Ossifikation von einem primären Ossifikationszentrum aus. Dort liegen die Osteoblasten dem Periost an und sezernieren Osteoid, welches im weiteren Verlauf des Verknöcherungsprozesses mineralisiert wird. Dabei werden die Osteoblasten eingemauert und wandeln sich zu Osteozyten um. Der Peripherie des Ossifikationszentrums selbst sind wiederum zahlreiche Osteoblasten angelagert, die den gleichen Prozess durchlaufen. Es entsteht zunächst ein Geflechtknochen, der sich je nach Anforderung oder Lokalisation weiter in Lamellenknochen differenzieren kann. Die desmale Osteogenese findet vor allem bei Schädelknochen statt [9, 11, 12].

Auf makroskopischer Ebene betrachtet wächst der Schädelknochen also, indem Knochen am Periost der äußeren Oberflächen und Suturen angebaut wird, während gleichzeitig am Periost der inneren Oberfläche Resorption stattfindet. Auf diese Weise adaptiert er an Form und Größe des wachsenden Gehirns [12].

Andererseits kann die Osteogenese auch enchondral beziehungsweise indirekt vonstattengehen, was bei der Mehrzahl der Knochen der Fall ist. Dabei wird Knorpelgewebe durch Knochen ersetzt [9,11]. Bei der Umwandlung des Knorpelgewebes werden zwei parallel verlaufende Prozesse wirksam: perichondrale und enchondrale Ossifikation. Durch perichondrale Verknöcherung bildet sich etwa auf halber Höhe der Diaphyse langer Röhrenknochen eine Knochenmanschette. Dabei werden, ausgehend vom

Perichondrium, die gleichen Vorgänge wie bei der desmalen Osteogenese beobachtet [11]. Gleichzeitig findet im Zentrum des Knorpelgewebes der Vorgang der enchondralen Verknöcherung statt. Die Interzellulärsubstanz des Knorpels wird mineralisiert und anschließend von Osteoklasten teilweise abgebaut. Es bilden sich die sogenannten Eröffnungszonen. An die übergebliebenen Reste der mineralisierten Interzellulärsubstanz lagern sich nun Osteoblasten an, die im weiteren Verlauf Osteoid bilden, welches wiederum mineralisiert wird. Das so neugebildete Knochengewebe wird dann teils durch Osteoklasten abgebaut, was zur Entstehung des Markraums und der Spongiosabälkchen führt. Diese Verknöcherung des Knorpels schreitet im weiteren Verlauf in alle Richtungen voran und ermöglicht durch äußeren Anbau und innere Resorption von Knochen ein Dickenwachstum des Röhrenknochens [9,11,12].

Im Bereich der Epiphysen bildet sich ein enchondrales Verknöcherungszentrum aus, welches sich nach allen Richtungen fortbildet. In der Peripherie bleibt die Zone des hyalinen Gelenkknorpels ausgespart. In gleicher Weise bleibt auch an der Epiphysen-Diaphysen-Grenze ein Bereich ausgespart in dem weiterhin enchondrale Verknöcherung stattfindet und so ein Längenwachstum des Knochens möglich ist, die sogenannte Epiphysenfuge [9,11,12].

Die Epiphysenfuge oder Wachstumsplatte besteht aus einer Knorpelzone deren Zellen zunächst in beide Richtungen proliferieren, um dann nur noch in Richtung der Epiphyse voran zu wachsen. Dabei sind sie kontinuierlicher enchondraler Verknöcherung unterworfen. Wie bereits bei der Beschreibung der enchondralen Osteogenese geschildert wurde findet auch hier die gleiche Sequenz aus Proliferation, Hypertrophie, Mineralisation, Abräumung durch Osteoklasten bzw. Eröffnung und anschließender Ossifikation statt. Dadurch wächst der Knochen in die Länge. Dieser Prozess hält ungefähr bis zum 20. bis 23. Lebensjahr an. Danach stellen die Knorpelzellen die Proliferation ein und die Wachstumsfuge verknöchert zur Gänze [9,11,12]. Frakturen in diesem Bereich des Knochens sind gefährlich, da sie das Längenwachstum beeinträchtigen können [11].

1.1.3 Regulationsmechanismen des Knochenstoffwechsels

Der Auf- und Umbau des Knochens ist abhängig von mehreren Faktoren. Biomechanische Reize die auf den Knochen einwirken wie Zug, Druck, Bewegungen, Muskelkontraktionen, etc. induzieren Umbauprozesse, die zur optimalen Anpassung des Knochens an die Belastung führen [11,12]. Der Knochen ist ein hoch mechanosensitives Gewebe. Wird er in Bezug auf die Länge seiner belasteten Abschnitte um mehr als 0,1% verformt, so resultiert dies in einer vermehrten Knochenneubildung. In der Abwesenheit

mechanischer Stimuli hingegen, zum Beispiel bei Bettlägrigkeit, reagiert der Knochen um sich in Masse und Festigkeit an die abnehmende Beanspruchung anzupassen [13].

Neben den biomechanischen Reizen wird das Wachstum des Knochen, bzw. dessen Umstrukturierung, durch endokrine und parakrine Botenstoffe gesteuert [11,12].

Somatotropin ist für die lokale Ausschüttung von Wachstumsfaktoren, wie die Insulin Like Growth Factors, verantwortlich. Diese stimulieren über einen parakrinen Signalweg die Proliferation von Chondrozyten und Osteoblastenvorläufern. Zu den lokalen Mediatoren, mit regulatorischer Funktion für den Knochenstoffwechsel zählen außerdem: Bone Morphogenetic Protein, Tumor Growth Factor β , Platelet derived Growth Factor, Tumor Necrosis Factor und die Prostaglandine PGE1 und PGE2. [11-14].

Für die Mineralisierung des Knochens ist eine suffiziente Calcium-Ionen (Ca^{2+})-Konzentration im Extrazellulärraum unerlässlich, diese wird durch das Wechselspiel dreier Hormone sichergestellt [11-14]:

1. Parathyrin (PTH), auch Parathormon genannt, wird in den Nebenschilddrüsen gebildet. Der zur Ausschüttung notwendige Stimulus ist eine niedrige extrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration, wohingegen hohe Mengen an Ca^{2+} das Hormon supprimieren. PTH selbst bewirkt in geringen Mengen die Reifung von Osteoblasten. Hohe Konzentrationen hingegen, fördern über die Aktivierung von Osteoklasten die Freisetzung von Ca^{2+} -Phosphat (HPO) aus dem Knochen. Gleichzeitig wird die Rückresorption von Ca^{2+} in der Niere begünstigt und die Calcitriol-Synthese angeregt. Die Konzentration von Ca^{2+} im Extrazellulärraum steigt dadurch an [13,14].
2. $1\alpha,25(\text{OH})_2$ -Cholecalciferol (CC) ist das biologisch wirksame Substrat des Vitamin D3. Es wird in der Niere gebildet. Stimuli die zu seiner Bildung führen sind PTH, Calcitonin (CLO), Androgene sowie geringe extrazelluläre Konzentrationen von Ca^{2+} und HPO . CC hemmt die Sekretion von Parathormon, bewirkt eine vermehrte intestinale Aufnahme von Ca^{2+} und induziert am Knochengewebe die Bildung von Strukturproteinen, sowie die Expression von TGF- β , Osteocalcin und alkalischer Phosphatase. Durch die vermehrte Bereitstellung von Ca^{2+} wird die Mineralisation des Knochens positiv beeinflusst. Mangelzustände an CC führen vor allem in Wachstumsphasen zu gefährlichen Pathologien, wie der bei Kleinkindern gefürchteten Rachitis [13,14].
3. Calcitonin (CLO) ist ein Peptid, das vornehmlich in den C-Zellen der Schilddrüse produziert wird. Es wird beim Auftreten hoher Ca^{2+} -Spiegel, sowie bei Ausschüttung von Gastrin, Cholezystokinin, Glucagon und Östrogen sezerniert. Seine Wirkung entfaltet es durch die Hemmung der Osteoklastentätigkeit, Stimulation der CC-Neubildung und

Herabsetzung der renalen Ca^{2+} - und HPO -Rückresorption. Insgesamt spielt es im Vergleich zum PTH und CC aber eher eine untergeordnete Rolle im Turnover des Knochenstoffwechsels [13,14].

Weitere Hormone die in den Regelkreis der Knochengewebe eingreifen sind die Androgene, die eine fördernde Wirkung auf die Synthese des Protein-Gerüsts der Knochenmatrix haben, sowie die Östrogene, die das Knochenwachstum auf zellulärem Signalweg fördern und gleichzeitig die Bildung von 25-Hydroxycholecalciferol, der Vorstufe des CC bedingen [11,13,14]. Sinkt der Östrogenspiegel, wie das beispielsweise bei Frauen in der Postmenopause der Fall ist, so droht eine Entmineralisierung des Knochens, die sich in Osteoporose, erhöhter Frakturneigung und Größenverlust infolge von Sinterbrüchen der Wirbelkörper, äußert [13,14]. Darüber hinaus wird der Knochenumsatz auch durch die Hormone der Schilddrüse und der Nebennierenrinde beeinflusst [14].

1.2 Fraktur und Heilungsprozess

Eine Fraktur ist eine Kontinuitätsunterbrechung des Knochens infolge einer Belastung, die dessen Elastizitätsgrenze übersteigt [15]. Der Begriff der Osteotomie bezeichnet die kontrollierte chirurgische Durchtrennung eines Knochens [16], kann also prinzipiell als iatrogene „Fraktur“ betrachtet werden. Die Aussagen die im Folgenden bezüglich der Heilung von Frakturen getroffen werden gelten daher in ähnlicher Weise für die Osteotomie.

Dem Folgenden möchte ich den Hinweis voranstellen, dass die Knochendefekte, die unseren Versuchstieren beim Einbringen der transkortikal gelegenen Implantate zugefügt wurden, durchschnittlich ungefähr 60% der Querschnittsfläche der Tibia betrafen. Sie stellen, daher weder eine Osteotomie noch eine Fraktur im klassischen Sinne dar. Nichtsdestotrotz findet an diesen Knochen selbstverständlich eine Knochenheilung statt, für die prinzipiell dieselben pathophysiologischen Mechanismen gelten, die bei Frakturen oder kontrollierten Durchtrennungen wirksam werden.

1.2.1 Direkte Knochenbruchheilung

Im Idealfall heilt ein Knochenbruch unter stabiler Kompression und direkten Kontakt beider Knochenenden in anatomisch korrekter Position über das Einsprießen von Osteonen bzw. Havers-Kanälen. Es findet eine direkte Regeneration lamellären Knochens statt. Man nennt diesen Vorgang primäre Knochenbruchheilung. Dieser Verlauf kann in der Praxis bei Fissuren oder Kompressionsosteosynthese beobachtet werden [17]. Bei der direkten

Heilung der Fraktur kann man zwei Prozesse unterscheiden deren Auftreten im Zusammenhang mit der Größe des Frakturspalts steht.

Bei sehr geringem Abstand der beiden Knochenfragmente (Bruchspalt $< 0,01\text{mm}$) und minimaler interfragmentärer Belastung kann die primäre Knochenbruchheilung den Weg des sog. ‚Contact Healing‘ beschreiten [18]. Hierbei bilden die Osteone die unmittelbar am Frakturspalt gelegen sind sog. Cutting Cones aus, bestehend aus Osteoklasten. Diese Cutting Cones überbrücken den Frakturspalt und bilden dabei longitudinale Gänge, welche von Osteoblasten mit Knochen ausgefüllt werden. Im weiteren Verlauf werden die Brückenbildenden Osteone zu lamellären Knochen umgewandelt [17].

Bei einer größeren Distanz zwischen den Bruchstücken - die jedoch $0,8\text{-}1\text{mm}$ nicht überschreiten darf – treten Mechanismen in Kraft die unter dem Begriff des ‚Gap Healing‘ summiert werden [19]. Hier wächst lamellärer Knochen senkrecht zur Knochenachse in den Bruchspalt ein. In einem zweiten Schritt wird diese Knochenstruktur dann durch longitudinal ausgerichtete Osteone ersetzt [18].

1.2.2 Indirekte Knochenbruchheilung

Viel häufiger heilt ein Knochenbruch jedoch indirekt oder sekundär durch die Ausbildung eines Kallus, typischerweise im Rahmen der konservativen Frakturbehandlung, der Marknagelung oder bei Verwendung eines Fixateurs externe. Dieser Heilungsprozess zeigt einen stadienartigen Verlauf, wobei in Abhängigkeit der verwendeten Fachliteratur in vier, bzw. fünf Phasen unterteilt wird [15,16]:

- Verletzung: Phase der Krafteinwirkung, die zur Fraktur und zur Verletzung der, den Knochen umgebenden, Weichteile führt [15].
- Entzündung: sie beginnt unmittelbar nach der Frakturstehung. Es kommt zur Bildung eines Hämatoms und anschließender Einwanderung von Entzündungszellen. Durch vermehrte Ausschüttung von Zytokinen und Wachstumsfaktoren, wird die Phagozytose der nekrotischen Frakturenenden induziert und gleichzeitig die Ausbildung von Granulationsgewebe eingeleitet, sowie die Aktivierung von Fibroblasten und dem Periost anliegenden Osteoblasten bewerkstelligt [15,16].
- Granulation oder Phase des weichen Kallus: Nach circa 3 Wochen wird das Hämatom durch fibröses Gewebe ersetzt, Gefäße wachsen ein und die Schwellung bildet sich zurück. Jetzt entsteht bereits subperiostal neuer Knochen, während interfragmentär im Kallus Chondrozyten einwandern. In dieser Phase ist eine Biegung im Frakturspalt noch möglich [15,16].

- Kallushärtung oder Phase des harten Kallus: Durch enchondrale und intramembranöse Knochenneubildung wird der weiche Kallus nun mineralisiert und zu Geflechtknochen umgebaut. Die Neubildung des Knochengewebes nimmt ihren Ausgang immer in den bruchfernen Zonen, welche eine geringere mechanische Instabilität aufweisen. Dieser Prozess nimmt drei bis vier Monate in Anspruch. Der Geflechtknochen wird im Verlauf entsprechend der mechanischen Belastung weiter umgebaut [15,16].
- Umbauphase oder Remodeling: Der Umbau des neugebildeten Geflechtknochens in biomechanisch höherwertigen lamellären Knochen nimmt mehrere Monate bis Jahre in Anspruch [15,16]

1.2.3 Modifikatoren der indirekten Knochenbruchheilung

Es sind mehrere Faktoren bekannt die nachweislich den Heilungsverlauf einer Fraktur beeinflussen [15].

1.2.3.1 Biomechanische Modifikatoren

Bei der Heilung von Knochenbrüchen gilt es die mechanischen Einflüsse auf den Frakturspalt fein auszutariieren. So weiß man zum Beispiel, dass die Ruhigstellung durch stabile Fixierung des Bruchspaltes und die Kompression desselben zu Beginn der Bruchheilung einerseits unerlässlich ist um die Kallusbildung zu fördern [15,16]. Andererseits ist bekannt, dass auch durch Mikrobewegungen die Osteoblastenaktivität und die Bildung von Kallus stimuliert werden [20-22]. Bei sehr rigiden Fixierungen des Knochenspaltes und ausbleibender mechanischer Belastung, beobachtet man daher, vor allem in der Phase der Kallus-Mineralisierung und des Remodeling, eine Tendenz zu prolongierten Heilungsphasen und Osteopenie. Ausgehend von diesem Wissen ist klar, dass es einer gesunden Balance und richtigen zeitlichen Abfolge zwischen Belastung und Abschirmung mechanischer Reize bedarf, um den Heilungsprozess zu optimieren [15,16,20-22]. Daher stimmen auch alle klinischen Leitfäden, mehr oder weniger, in der Forderung überein, dass bei der Behandlung eine stufenweise zunehmende Belastungsintensität angewandt werden sollte [23].

Weitere mechanische Faktoren, die die Bruchheilung beeinflussen, sind die Größe und die Geometrie des Bruchspaltes, die Form der Fraktur (Quer- versus Trümmerfraktur), sowie das bereits angesprochene Ausmaß und die Richtung interfragmentärer Bewegungen [15,16,23].

1.2.3.2 Lokale Durchblutungssituation

Eine intakte Blutversorgung ist essentiell für die Knochenheilung [15]. Die Blutversorgung ist im Besonderen abhängig von den gefäßführenden Knochenhäuten, dem Endost und dem Periost, sowie von den umgebenden Weichteilen [9,10]. In der Praxis bedeutet dies, dass eine Schädigung des Endosts durch ausgiebiges Aufbohren im Rahmen einer Marknagelung mit einer verschlechterten Versorgungslage durch nutritive Gefäße einhergeht. In gleicher Weise sind freiliegende Knochenstücke deren Periost durch ein Trauma abgelöst oder zerstört wurde, viel häufiger von Knochennekrosen betroffen [15,16].

Das Einwachsen neuer Gefäße in den knorpeligen, avaskulären Kallus wird von Osteoblasten und Chondrozyten gleichermaßen vorangetrieben. Beide Zellarten schütten VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor) aus, einen Wachstumsfaktor der die Neoangiogenese stimuliert [24].

Die Durchblutung, in den genannten Strukturen selbst, steht in Wechselwirkung mit mechanischen Reizen. So hat es sich gezeigt, dass flexible Fixation eine bessere Durchblutung zeitigt als die starre Variante. Andererseits reagiert das Gewebe auf Dehnungsreize im Frakturspalt mit verringerter Durchblutung [16].

1.3 Osteosynthese-Materialien und Frakturversorgung

Bei der operativen Frakturbehandlung durch Osteosynthese (OS) befinden sich derzeit überwiegend metallische Stoffe in Verwendung. Dazu zählen im Wesentlichen: rostfreier Stahl, Reintitan und Titanlegierungen. Diese Materialien kommen vor allem in Form von Drähten, Schrauben, Platten, Fixateuren oder Marknägeln zur Anwendung [15,16].

1.3.1 Konventionelle metallische OS-Materialien

Die Verwendung von rostfreiem Stahl ist in der Osteosynthese weit verbreitet. Dies ist zum einen darin begründet, dass dieses Material vergleichsweise billig in der Herstellung, leicht verfügbar sowie gut zu verarbeiten ist [16]. Darüber hinaus weist der rostfreie Stahl eine hohe Steifigkeit auf. Die Steifigkeit bezeichnet die Fähigkeit eines Materials verformenden Kräften zu widerstehen. Sie hängt einerseits von der Dicke des Implantats und seiner Form ab, andererseits aber vom Elastizitätsmodul des Materials [16]. Im Falle von Stahl beträgt dieses 200 GPa, das ist in etwa das 10 fache des Knochens und etwa doppelt so viel wie Titan (110 GPa) [6,16]. Die Steifigkeit des Implantats sollte ausreichend hoch sein um den Frakturspalt von Deformationen abzuschirmen, die die Knochenbildung gefährden könnten. Gleichzeitig ist für die Heilung ein mechanischer Stimuli unerlässlich, das OS-

Material sollte deshalb nicht die Gesamtheit der mechanischen Reize absorbieren, wie das bei hoher Steifigkeit der Fall ist. Wird der Knochen durch zu rigide OS fixiert (= Stress Shielding) kommt es zur Resorption und Inaktivitätsatrophie des Knochengewebes [6,15,16,25].

Weitere wichtige Materialeigenschaften sind die Festigkeit, die Verformbarkeit, die Korrosionsbeständigkeit, die Oberflächenstruktur und die Bioverträglichkeit. Stahl, in seiner Rolle als meist verwendetes OS-Material, wurde in jüngster Zeit von Titan verdrängt [16]. Dies ist darin begründet, dass Titan zum einen ein hochgradig inertes Material ist und dadurch eine gute Korrosionsbeständigkeit aufweist. Darüber hinaus erweist sich Titan in der Praxis als sehr bioverträglich mit geringeren Infekt-Raten als Stahl. Das Auftreten lokal toxischer Reaktionen ist bei der Verwendung von Titan weniger wahrscheinlich. Außerdem enthält es im Unterschied zum Stahl keine Nickelionen, welche für den Großteil allergischer Reaktionen verantwortlich sind [6,16,26].

1.3.2 Nachteile konventioneller metallischer OS-Materialien

Allen konventionellen metallischen Materialien gemein ist, dass sie korrodieren, ermüden, früher oder später brechen und dass in vielen Fällen ein Zweiteingriff zur Entfernung des Metalls nötig wird [15,26]. Risiken die mit, im Körper verbleibenden, Metallimplantaten assoziiert werden sind: Infektionen, Allergische Reaktionen, Korrosion, Stress-Shielding-Osteopenie und ein vermuteter Zusammenhang mit Neoplasien [27].

Absolute, dringliche Indikationen zur Entfernung eines Implantats sind dessen Dislokation beziehungsweise die Dislokation der Fraktarenden, der Bruch eines Implantates oder die Infektion des Knochens beziehungsweise der ihn umgebenden Weichteile. Darüber hinaus führen auch Funktionseinschränkungen, ein dünner Weichteilmantel oder Schmerzen fast immer zur Entfernung der Implantates [15]. Bei Kindern wird immer ein Zweiteingriff nötig, da das proliferierende Skelett fest mit dem Implantat verwachsen oder in seiner Größenausdehnung behindert werden kann [15,25].

Ansonsten wird die Indikation zur Metallentfernung unter sorgfältiger Abwägung der Vor- und Nachteile gestellt. Denn es gibt viele Fälle in denen die Entfernung des Implantats nach Abheilung der Fraktur nicht zwingend erforderlich ist. Zumal die Implantate aus Titan nur eine geringe Gefahr für allergische oder toxische Reaktionen bergen. Zu diesen elektiven Indikationen zählen, zum Beispiel, kosmetisch beeinträchtigende Implantate, Implantate aus Stahl oder der Wunsch des Patienten [15].

In diesem Zusammenhang konnten Böstman et al. jedoch zeigen, dass der Großteil der Implantate tatsächlich entfernt wird. In deren Studie wurden über einen Zeitraum von 7

Jahren alle operativen Frakturfixationen an einer großen Abteilung für Orthopädie und Traumatologie registriert und der Anteil an Zweiteingriffen erhoben. Es zeigte sich, dass 81% aller Implantate wieder entfernt wurden (in absoluten Zahlen: 5095 Metallentfernungen) [27].

Die Metallentfernung ist ein Zweiteingriff und geht einher mit speziellen Risiken, die im Zusammenhang mit Verwachsungen und Vernarbungen infolge des Ersteingriffs stehen. Zusätzlich können die zu entfernenden Implantate gebrochen oder auf andere Weise defekt sein, wodurch deren Entfernung erschwert oder unmöglich sein kann. Neben dem Risiko der Operation selbst, wird der Patient auch den potentiellen Gefahren ausgesetzt die eine Anästhesie mit sich bringt. Nach der Operation ist das Risiko einer Refrakturierung kurzfristig erhöht und es wird für einen Zeitraum von vier Wochen von sportlichen Aktivitäten abgeraten [15,25]. Die Operation selbst und alle damit verbundenen medizinischen Leistungen stellen außerdem einen Kostenfaktor dar, der die Wirtschaftlichkeit metallischer Implantate mindert [27,28]. Die eventuelle Notwendigkeit eines Zweiteingriffes bei der Verwendung metallischer Implantat-Materialien ist daher als klarer Nachteil dieser Stoffklasse zu betrachten. Diese Sichtweise wird untermauert durch eine Studie von Mittal et Al., bei der 100 Patienten mit distaler Radiusfraktur umfassend über metallische und resorbierbare Implantat-Materialien informiert und anschließend zu ihrer Meinung befragt wurden. 95% der Studienteilnehmer favorisierten dabei eine Versorgung mit resorbierbaren Materialien und über 90% der Befragten sahen den Zweiteingriff als größten Nachteil metallischer Implantate an [29].

1.3.3 Alternative Implantat-Materialien

Nach Hench & Polak 2002, kann man die Entwicklung der Implantat-Materialien in 3 Generationen unterteilen [30]. Bei der Entwicklung der ersten Implantate lag das Augenmerk vor allem darauf, Stoffe zu verwenden die, „im hoch korrosiven Umfeld des Körperinneren“ [6] ein möglichst inertes Verhalten an den Tag legen, um die Gefahr toxischer und allergischer Gewebsreaktionen zu minimieren [6,30]. Zur ersten Generation zählen laut Navarro et Al. 2008 [6]:

- Metalle wie rostfreier Stahl, Titan und Titanlegierungen
- Oxid-Keramiken wie, zum Beispiel, Aluminium-Oxid oder Zirconium-Oxid. Beide Materialien kommen aufgrund ihrer hohen Steifigkeit und Festigkeit vor allem beim endoprothetischen Ersatz des Hüftgelenks zum Einsatz

- Polymere, wie der Acryl-Knochenzement aus Polymethylmethacrylaten (PMMA), Polyester, Polytetrafluoroethylen (Goretex®), Polyethylen (PE) und Andere. Den Polymeren der 1. Generation ist gemein, dass sie im Körper von einer fibrösen Gewebsschicht eingekapselt werden, die im Zusammenhang mit der Adsorption von Proteinen steht. Ein Nachteil, den man anstrebte mit einer zweiten Generation polymerer Implantate auszubessern.

Mit Entwicklung der zweiten Generation von Implantat-Materialien, veränderte sich die Zielsetzung. Anstelle maximal inerter Implantate galt es nun Stoffe zu finden, die ein bioaktives Verhalten zeigen [31]. Unter Bioaktivität versteht man dabei: „Jede Interaktion mit, beziehungsweise jeden Effekt eines Materials auf eine Zelle mit dem Ziel, eine bestimmte Antwort, ein bestimmtes Verhalten, auszulösen [6]“. Ein konkretes Beispiel für bioaktives Verhalten ist die Osteokonduktivität von synthetischem Hydroxyapatit oder „Bio-Glas“ (aus $\text{Na}_2\text{O}-\text{CaO}-\text{P}_2\text{O}_5-\text{SiO}_2$), das im Körper durch seine Resorption und die damit verbundene Freisetzung anorganischer Substanz Knochenähnliches Hydroxyapatit bildet und damit die Verankerung mit dem Implantat unterstützt [30,32]. Implantat-Materialien, welche die Mineralisation und Fixation des Bone-Implant-Interface (BII) - also der Kontaktstelle von Implantat und Knochen – in dieser Weise unterstützen, befinden sich schon seit Mitte der 1980er Jahre im klinischen Einsatz [30].

Zur zweiten Generation der Implantat-Materialien, zählen außerdem solche die sich im Körper im Rahmen einer kontrollierten chemischen Degradation auflösen [30].

Abgesehen von den Keramiken dieser zweiten Generation, wie zum Beispiel dem bioaktiven Glas oder dem Hydroxyapatit. Gibt es außerdem noch metallische Implantate mit einer Ummantelung aus Keramik oder einer chemisch behandelten Oberfläche [6].

Hinsichtlich der Biodegradierbarkeit, stechen aber vor allem die Polymere hervor. Hier kennt man eine ganze Reihe von Materialien die in vivo resorbierbar sind und sich teilweise in klinischer Anwendung als Nähte, Schrauben, Pins und Platten, beziehungsweise in Erforschung befinden [6]. Hierzu gehören: PLA (Polylactide), PLGA (Polylactid-co-Glycolid), Polydioxanone (PDS), Poly(ϵ -caprolactone) (PCL), Poly(3-hydroxy)butyrate (PHB), Polyorthoester, Chitosane, Poly(2-hydroxyethyl-methacrylate) (PHEMA) und Hyaluronsäure [6].

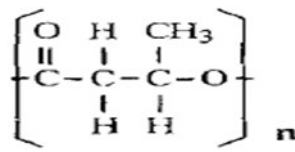
Die Degradation wird im wässrigen Milieu hauptsächlich durch Hydrolyse der Polymerketten vorangetrieben [6,30]. Die Abbaugeschwindigkeit ist dabei vor allem abhängig von der Kristallinität, dem molekularen Gewicht, der Porosität und der Monomer-Konzentration des Materials sowie von der Geometrie und Lokalisation des Implantats [6].

Diese Polymere zeichnen sich nicht nur dadurch aus, dass sich im Idealfall ein Zweiteingriff, wie bei den permanenten OS-Materialien erübrigt. Sie haben außerdem, dank ihrer dem Knochen ähnlichen Steifigkeit, eine geringe Tendenz zum Stress Shielding und übertragen im Verlauf ihrer Resorption graduell die mechanische Last auf den Knochen oder die Sehne [6,28]. Zusätzlich lösen sie keine Artefakte bei der postoperativen Bildgebung aus, wie das bei Metallen regelmäßig der Fall ist [6].

Erste Berichte über die erfolgreiche klinische Anwendung stammen aus dem Jahre 1984 [28]. Seitdem hat die praktische Nutzung dieser Materialklasse stetig zugenommen. Mittlerweile gibt es Platten, Schrauben, Zwickel, Drähte und andere Erscheinungsformen in denen Polymere zur Anwendung kommen [7]. Zu den in klinischer Anwendung befindlichen Polymeren zählen laut Amini et Al.: Derivate von PLA und PLGA, sowie PDS und Kollagene. Ihre Anwendungsgebiete sind vielseitig liegen vor allem in der Frakturversorgung der Arthrode und der rekonstruktiven Chirurgie [6,28].

1.3.4 Poly(3-hydroxy)butyrat

Die Polyhydroxybuttersäure ist eine granuläre Speicherform von Lipiden, die Bakterien im Zytoplasma als Reservestoffe deponieren [33]. Dieses natürlich vorkommende Biopolymer ist ein Polyhydroxyalkanoat mit hoher Biokompatibilität und der Eigenschaft im Körperinneren degradiert zu werden. Der Schmelzpunkt dieses kristallinen Thermoplasts liegt bei ca. 180° Celsius und sein molekulares Rückgrat besteht aus 3 Kohlenstoffatomen (siehe Abb. 1) [34,35]. Mikroorganismen können dieses Polymer vollständig zu Wasser und Kohlenstoffdioxid zerlegen. [36-38]. Die Degradation im menschlichen Körper wird als Zusammenspiel aus Hydrolyse der polymeren Ketten beschrieben mit gleichzeitiger enzymatischer Zersetzung des Materials, die jedoch vergleichsweise eine eher untergeordnete Rolle spielt (vgl. 4.2) [6].



PHB

Abbildung 2: Poly(3-hydroxy)butyrat, aus [37]

Studien mit subkutaner Implantation von PHB-Implantaten konnten eine sehr geringe Toxizität des Materials nachweisen, das lediglich milde Entzündungsreaktionen hervorrief. Im Gewebe um das Implantat wurden mononukleäre Makrophagen, Fibroblasten und Lymphozyten gefunden. Bei zwei voneinander unabhängigen Studien wurde eine fibröse Umkapselung des eingebrachten Fremdkörpers beobachtet, die sich allerdings im weiteren Verlauf wieder deutlich zurückbildete [37,38]. Diese unspezifische Fremdkörper-Reaktion ist ein typisches Phänomen, das bei allen bioresorbierbaren Implantaten beobachtet werden kann und steht vermutlich im Zusammenhang mit der Degradation und Adsorption der Monomere [39].

Die Geschwindigkeit der *in vivo* Degradation von PHB ist viel geringer als das bei PLA oder PLGA der Fall ist. Studien zu diesem Material zeigten auch, dass die Abbaugeschwindigkeit des Polymers vermutlich im Zusammenhang mit dessen Kristallinitätsgrad steht. Je weniger kristallin, desto schneller ging der Abbauprozess von Statten [35,38].

PHB verursacht in der Bildgebung mit Röntgenstrahlung keine Artefakte, ist jedoch aufgrund seiner Dichtewerte eher schlecht abbildbar [6].

PHB befindet sich derzeit nicht in klinischer Verwendung es zeigt eine im Vergleich zu anderen Polymeren zu geringe Degradationsrate und gilt daher in seiner reinen Form als eher ungeeignetes Material für die praktische Anwendung [7,35]. Nichtsdestotrotz ist das Interesse an PHB ungebremst. Aktuelle Forschungsansätze verwenden das Biopolymer als Bestandteil von Kompositen, die sowohl resorbierbar, als auch bioaktiv sind [6]. Gleichzeitig wird an der Weiterentwicklung des Materials durch Co-Polymerisation von 3-Hydroxyvalerat zu PHBV (Poly(3-Hydroxybutyrat-co-3-Hydroxyvalerat) gearbeitet. Dieses Polymer ist aufgrund seiner exzellenten Biokompatibilität, die allen Polyhydroxyalkanoaten gemein ist, von besonderem Interesse im Bereich des Tissue Engineering [35].

1.3.5 Herafill®

In dieser Studie wurden PHB-Implantate erprobt, denen unterschiedliche Zusatzstoffe beigemischt wurden. Bei drei Implantat-Typen wurde ein Knochenersatzmaterial (=Herafill®, Heraeus, Hanau, Deutschland) in unterschiedlicher Konzentration zugefügt (10% bzw. 30% Volumenanteil). Herafill® ist ein Komposit bestehend aus Calciumsulfat, Calciumcarbonat und Glyceroltripalmitat [40]. Dieses Komposit zählt damit zur Gruppe der bioaktiven keramischen Knochenersatzmaterialien [32,41]. Calciumsulfat ist ein erprobtes Agens beim Ersatz von Knochengewebe es zeigt eine gute Biokompatibilität und seine Osteokonduktivität, i.e. dessen Fähigkeit den Knochenaufbau zu unterstützen (vgl. 1.3.3), gilt als erwiesen [42,43].

Herafill® befindet sich derzeit in klinischer Anwendung als resorbierbares Knochenfüllmaterial, das zugleich Vehikel für die in-situ Applikation von Antibiotika ist [40]. Die in den verwendeten Implantaten enthaltenen Anteile an Herafill® sind keine sogenannten Beads mit 6mm Größe, wie die auf der offiziellen Website des Herstellers beschriebenen, sondern Partikel deren Größe vermutlich im Bereich von μm liegt. Hinsichtlich der Biokompatibilität des Herafill® – in der von uns verwendeten Form – liegen noch keine genaueren Erkenntnisse über Auswirkungen auf Zellen und Gewebe vor.

1.3.6 Zirconiumdioxid

Drei der Fünf PHB-Implantaten, die innerhalb dieser Studie zur Anwendung kamen, waren zu je 3% Volumenanteil mit Zirconiumdioxid (=ZrO₂) versetzt. ZrO₂ absorbiert aufgrund seiner hohen Ordnungszahl und Dichte in hohem Maße Röntgenstrahlung [44,45] und ist daher geeignet um den PHB-Implantaten in der Röntgenstrahlen-basierten Bildgebung einen wahrnehmbaren Kontrast zu verleihen.

ZrO₂ ist zudem sehr widerstandsfähig und korrosionsbeständig und verfügt über eine hohe mechanische Stabilität. Gegenwärtige Einsatzgebiete des Materials sind vor allem die Zahnmedizin und der endoprothetische Ersatz von Hüftgelenken. Dort findet es seine Anwendung bei der Herstellung von Gelenkköpfen, da ZrO₂-Keramiken aufgrund ihrer Härte besonders geeignet sind dem (frühzeitigen) Verschleiß durch Abrieb zu widerstehen [46].

ZrO₂ gilt als ungiftig mit einem allgemeinen MAK-Wert von 5 mg/m³ [44]. In-vitro Untersuchungen zur Bioverträglichkeit von ZrO₂ sind teilweise widersprüchlich. In einigen Fällen fand sich kein Anhalt für eine Toxizität des Materials. Andere Studien hingegen konnten nachweisen, dass Zirconium-Puder, im Vergleich zu aluminiumhaltigen Pudern, einen hemmenden Einfluss auf das Wachstum von Zellkulturen haben [46].

Untersuchungen bei denen die Biokompatibilität verschiedener ZrO₂-Keramiken in-vivo überprüft wurden, zeigten allerdings eine hervorragende lokale und systemische Verträglichkeit der Implantate. Im Körperinneren verhält sich dieses Material inert und es findet sich regelmäßig eine bindegewebige Kapsel an der Grenzfläche zwischen Implantat und Gewebe [46].

1.3.7 WZ21

WZ21 ist eine MgL mit Anteilen an Yttrium, Zink, Mangan und Calcium. Diese Komponenten betragen in Summe circa 0,036 Massenanteil (vgl. 8.2, Tabelle 1). Magnesium (Mg) selbst ist ein Leichtmetall mit einer Dichte von 1,74 g/cm³ [8]. Studien, die die Biokompatibilität von MgL in-vivo und in-vitro testeten, kamen gleichermaßen zu dem Schluss, dass diese Legierungen eine exzellente Verträglichkeit mit dem menschlichen Organismus zeigen [8,47].

Mg zeigt vor allem im wässrigen Milieu eine sehr geringe Korrosionsbeständigkeit, ein Merkmal, das es für viele technische Anwendungsgebiete als unbrauchbar erscheinen lässt, das es jedoch prädestiniert für die Verwendung als resorbierbares Implantat-Material [8,48].

Ein Problem im Zusammenhang mit der Verwendung von Mg stellt jedoch die Produktion von Wasserstoffgas als Substrat seiner Resorptionsvorgänge im lebenden Organismus dar [8,48,49]. Dieser Umstand hat dazu geführt, dass die Forschung an dem Material Mitte des letzten Jahrhunderts verlassen worden war, da die Gasproduktion sich negativ auf die Knochenheilung auswirkt [8,48]. Die anfallende Gasmenge ist hauptsächlich von der Zusammensetzung der MgL abhängig [8,48]. Studien zum Resorptionsverhalten des verwendeten WZ21 haben gezeigt, dass diese MgL bei einer adäquaten Resorptionsgeschwindigkeit und homogener Degradations-Dynamik lediglich zu moderater Gasentwicklung neigt, die die Knochenheilung nicht zu beeinträchtigen scheint [47,49].

Aufgrund der hohen Stabilität und Bruchfestigkeit von Mg sowie einem Elastizitätsmodul das mit Werten von 41GPa, dem menschlichen Knochen in biomechanischer Hinsicht sehr ähnlich ist. Eignet sich dieses Material hervorragend für die Versorgung von Frakturen in Last tragenden Bereichen des Bewegungsapparates [8,48].

Witte et al. untersuchten in ihrer Studie den Knochenanwuchs an verschiedene MgL, die in Form von zylindrischen Pins intramedullär in den Oberschenkelknochen von Meerschweinchen eingebracht worden waren. Die histomorphometrische und elektronenmikroskopische Auswertung zeigte signifikant höhere Mineralisierungsraten und

Knochenflächen für die MgL im Vergleich zur Kontrolle nach 6 und 18 Wochen (als Kontrollgruppe wurde ein degradierbares PLA basiertes Biopolymer verwendet) [48]. Ähnliche Ergebnisse brachte auch ein Vergleich zwischen einer MgL und einer Titanlegierung [50]. Diese Beobachtungen führt man unter anderem auf einen mutmaßlichen osteokonduktiven Effekt des Mg auf die Osteogenese zurück [8].

1.4 Osseointegration

Laut Albrektsson et al. (2003) bezeichnet der Begriff der OI die Verankerung und Integration eines Implantates in den lebenden Knochen [51]. OI ist also ein Maß für die mechanische Stabilität des BII. Der Vorgang der OI hängt aber außerdem, nach Albrektsson et al. (2001), von der Reaktion des Körpers auf ein Fremdkörper-Material ab [52] und ist damit nicht nur ein biomechanischer Parameter, sondern auch ein Indikator für die Biokompatibilität eines Materials mit dem menschlichen Organismus. Neben der biologischen Verträglichkeit des Implantates, wird das Ausmaß der Osseointegration hauptsächlich von der Biomechanik des verwendeten Materials und dessen Oberflächenbeschaffenheit beeinflusst [53].

1.4.1 Modifikatoren der OI

Wie schnell und nachhaltig die OI nach Einbringen eines Fremdkörpers von Statten geht, hängt einerseits von der Fertigkeit des Chirurgen, der Körperregion und der Qualität des Knochens ab und andererseits kommt es – wie bereits erwähnt - auf die Eigenschaften des verwendeten Implantates an [52,54]. Unter optimalen Bedingungen hinsichtlich mechanischer Stabilität und geringem Abstand zwischen Knochen und Fremdmaterial von weniger als 1mm, wird die OI, wie bereits angesprochen (siehe 1.2.1 Direkte Knochenbruchheilung), durch direkte Osteogenese vorangetrieben [19,55]. Dabei wird Knochen direkt an das Implantat angelagert.

1.4.2 OI und Oberflächenbeschaffenheit

Ausmaß und Geschwindigkeit der Knochen-Apposition am BII, durch die es zur OI des Implantates kommt, wird zusätzlich durch die Oberflächenbeschaffenheit Desselben wesentlich beeinflusst. Dabei müssen vor allem zwei Aspekte in Betracht gezogen werden: Die Topographie, bzw. Morphologie der Oberfläche und deren chemische Eigenschaften [6,53,61].

Die Rauigkeit der Oberfläche spielt eine wichtige Rolle beim Anbau neuen Knochens an einen Fremdkörper. Dabei geht man davon aus, dass eine Aufrauung der äußeren Schichten eine Vergrößerung der Oberfläche bewirkt, an der Knochenanbau stattfinden

kann [6,61,62]. Eine Oberfläche die Rauigkeiten kleiner als 1µm aufweist bezeichnet man als glatt. Die Oberflächen-Topographie nimmt darüber hinaus Einfluss auf die zelluläre Gewebeinteraktion, die bei der Einheilung des Fremdkörpers stattfindet, wie zum Beispiel die Adhäsion von Proteinen [63]. Zusätzlich wird die Orientierung und Migration von Zellen beeinflusst [61].

Jedes Implantat wird im Körper von einer Schicht aus Proteoglykanen und Kollagenen umgeben, an welche wiederum Zellen binden können. An diesem Zelladhäsionsprozess sind verschiedene Proteine beteiligt, die jeweils unterschiedliche Bindungseigenschaften aufweisen. Durch Modifikation des extrazellulären Glykoprotein-Mantels an der Implantatoberfläche kann es daher auch gelingen auf zellulärer Ebene Einfluss auf die OI zu nehmen [63].

Die Beschaffenheit einer Oberfläche kann durch verschiedene Bearbeitungstechniken modifiziert werden, dazu zählen die Plasma Sprüh-Beschichtung mit Hydroxyapatit, der Beschuss mit Aluminiumoxid oder Titaniumoxid, die Strukturierung durch chemisches Ätzen und weitere Methoden [6,61,63].

Die Benetzbarkeit des Materials ist in der Frühphase der OI ein weiterer wichtiger Einflussfaktor. Eine hydrophile Oberfläche begünstigt dabei die Adhäsion von Blutplättchen-reichem Plasma. Für die Adhäsion von Blutplättchen-reichem Plasma konnte experimentell eine Korrelation mit früher OI nachgewiesen werden [6,62].

Neben der Benetzbarkeit von Oberflächen, sind noch weitere chemische Eigenschaften bekannt, die nachweislich Einfluss nehmen auf die zelluläre Interaktion zwischen Gewebe und Implantat [61].

2 Material

2.1 Tiere

Alle Tierversuche wurden am Institut für biomedizinische Forschung der medizinischen Universität Graz durchgeführt. Die, ausschließlich, männlichen, 5 Wochen alten, Sprague-Dawley Ratten, mit einem Gewicht von 140-190 g wurden in Gruppen von jeweils 3 Ratten pro Käfig gehalten. Man gewährte ihnen eine einwöchige Akklimatisationsphase, bevor sie dem Stress der Operation ausgesetzt wurden. Für die gesamte Dauer des Experiments stand den Tieren Wasser und eine Futterquelle in Form von Pellets (Sniff Spezialdiäten GmbH, Soest, Deutschland), wie sie bei der Käfighaltung von Ratten üblich sind, zur freien Verfügung. Für diese Arbeit wurden µ-CT-Scans aus verschiedenen

Studien ausgewertet. Insgesamt wurden Scans von 36 verschiedenen Tieren in die Auswertung mitaufgenommen.

2.2 Implantate

In dieser Studie wurden die in Tabelle 1 aufgeführten Implantate aus den dort benannten sechs verschiedenen Gruppen verwendet.

Tabelle 1: Verwendete Implantate

Implantat-Gruppe	Bezeichnung	Massenanteile
1	PHBnativ	PHB 1
2	PHB3%ZrO2	PHB 0,97 ; ZrO2 0,03
3	PHB3%ZrO2+10%Heracoll®	PHB 0,87 ; ZrO2 0,03 ; Heracoll® 0,1
4	PHB3%ZrO2+30%Heracoll®	PHB 0,67 ; ZrO2 0,03 ; Heracoll® 0,3
5	PHB30%Heracoll®	PHB 0,7 ; Heracoll® 0,3
6	WZ21	Mg 0,966 ; Y 0,02 ; Zn 0,01 ; Ca 0,0025 ; Mn 0,0015

Das PHBnativ-Implantat besitzt eine Zugfestigkeit (σ_M) von 33 MPa, ein Elastizitätsmodul (EM) von 3-4 GPa und eine Bruchdehnung von 3-4%. Die Komposite der Gruppen 2 bis 4 haben eine, gegenüber dem PHBnativ, geringfügig niedrigere mechanische Stabilität. Genaue Daten zur Zugfestigkeit und Bruchdehnung liegen für die Implantat-Gruppe 5 nicht vor (siehe Tab. 2).

Tabelle 2: Mechanische Eigenschaften der Implantate

*k.D.v. = keine Daten verfügbar

Implantat-Gruppe (s. Tab 1)	1	2	3	4	5	6
Elastizitätsmodul (EM) in GPa	3-4	2,3	2,8	2,8	k.D.v.*	45
Zugfestigkeit (σ_M) in MPa	33	25	31	25	k.D.v.*	250
Bruchdehnung in %	3-4	3	3	2-3	k.D.v.*	28

Bei drei Implantat-Typen wurde das Knochenersatzmaterial Herafill® (Heraeus, Hanau, Deutschland) in unterschiedlicher Konzentration zu 0,1, beziehungsweise 0,3 Massenanteil zugefügt.

Die Implantate der Gruppen 2 bis 4 bestehen außerdem zu einem Massenanteil von 0,03 aus ZrO₂.

Die verwendete Magnesium-Legierung WZ21 setzt sich aus Magnesium (Mg), Yttrium (Y), Zink (Zn), Kalzium (Ca) und Mangan (Mn) in den in Tabelle 1 angegebenen Massenanteilen zusammen. WZ21 zeigt eine im Vergleich zu den PHB basierten Implantate sehr hohe mechanische Stabilität mit σ_M von 250MPa, einer Bruchdehnung von 28% und einem EM von 45 Gpa (siehe Tab. 2).

Alle Implantate, weisen dieselbe zylindrische Form auf und haben einen Durchmesser von 1,6mm sowie eine Länge von 8mm (siehe Abb. 3). Die Oberflächen aller verwendeten Implantate sind glatt und unbehandelt.



Abbildung 3: PHB-Pin; links steril verpackt;

2.3 Mirko-Computer-Tomographie (μ CT)

Die Tiere der Mikro-Computer-Tomographie-Gruppe wurden jeweils nach 12, 24 und 36 Wochen einer Mikro Computer-Tomographie (μ -CT) unterzogen. Dabei wurde ein Computer-Tomograph der Firma Siemens benutzt (Siemens Inveon Acquisition Workplace 1.2.2.2). Zur Auswertung der Bilder wurde die herstellereigene Software benutzt (Siemens Inveon Research Workplace 1.2.2.2).

2.4 Medikamente

In Tabelle 3 sind alle Medikamente aufgeführt die bei den Tierversuchen zur Anwendung kamen.

Handelsname		Wirkstoff		Herstellerfirma
Anexate®		Flumazenil		Roche Austria gmbH, Wien, Österreich
Antisedan®		Atipamazol		Pfizer Corp. Austria GmbH, Wien, Österreich
Betaisodonna® Lösung		Polyvidon-Jod		Mundipharma GmbH, Wien, Österreich
Dipidolor®		Piritramid		Janssen-Cilag GmbH, Neuss, Deutschland
Dormitor®		Medetomedin		Pfizer Corp. Austria GmbH, Wien, Österreich
Fentanyl®		Fentanyl		Janssen-Cilag GmbH, Neuss, Deutschland
Furane®		Isoflurane		Abbot AG, Baar, Schweiz
Midazolam Delta®		Midazolam		Deltaselect GmbH, Dreieich Deutschland
NaCl-Fresenius®		NaCl 0,9%		Fresenius Kabi Austria GmbH, Graz, Österreich

Rimadyl®		Caprofen		Pfizer Corp. Austria GmbH, Wien, Österreich
Thiopental-Natrium®		Thiopental		Sandoz GmbH, Kundl, Österreich

Tabelle 3: Verwendete Medikamente

3 Methoden

In dieser Arbeit wurde zur Evaluierung der OI das, in unmittelbarer Umgebung des Implantats gemessene, Knochenvolumen (=Bonevolume =BV) im Verhältnis zum absolut erfassten Gewebsvolumen (=Tissuevolume =TV) als objektivierbares Maß herangezogen. Die Messungen selbst wurden durch Auswertung von Schnittbildern einer Mikro-Computertomographie (μ CT) durchgeführt.

3.1 Versuchsanordnung

Ein in Teilen ähnlicher Versuchsaufbau, wie der hier vorliegende wurde bereits von Kraus T. et Al. 2012 beschrieben [49]. Alle Tierexperimente waren vorab durch das Österreichische Ministerium für Wissenschaft und Forschung genehmigt worden.

In dieser Studie wurden retrospektiv Daten aus mehreren Versuchsreihen verglichen, die alle den gleichen methodischen Aufbau hatten. Insgesamt wurden 84 Versuchstiere in die Studie miteinbezogen. Zur Veranschaulichung wurde in Abbildung 4 versucht alle einbezogenen Gruppen schematisch darzustellen. Die beiden Gruppen A und B wurden zum Zwecke einer anschaulichen Darstellbarkeit, ebenfalls retrospektiv, eingeführt.

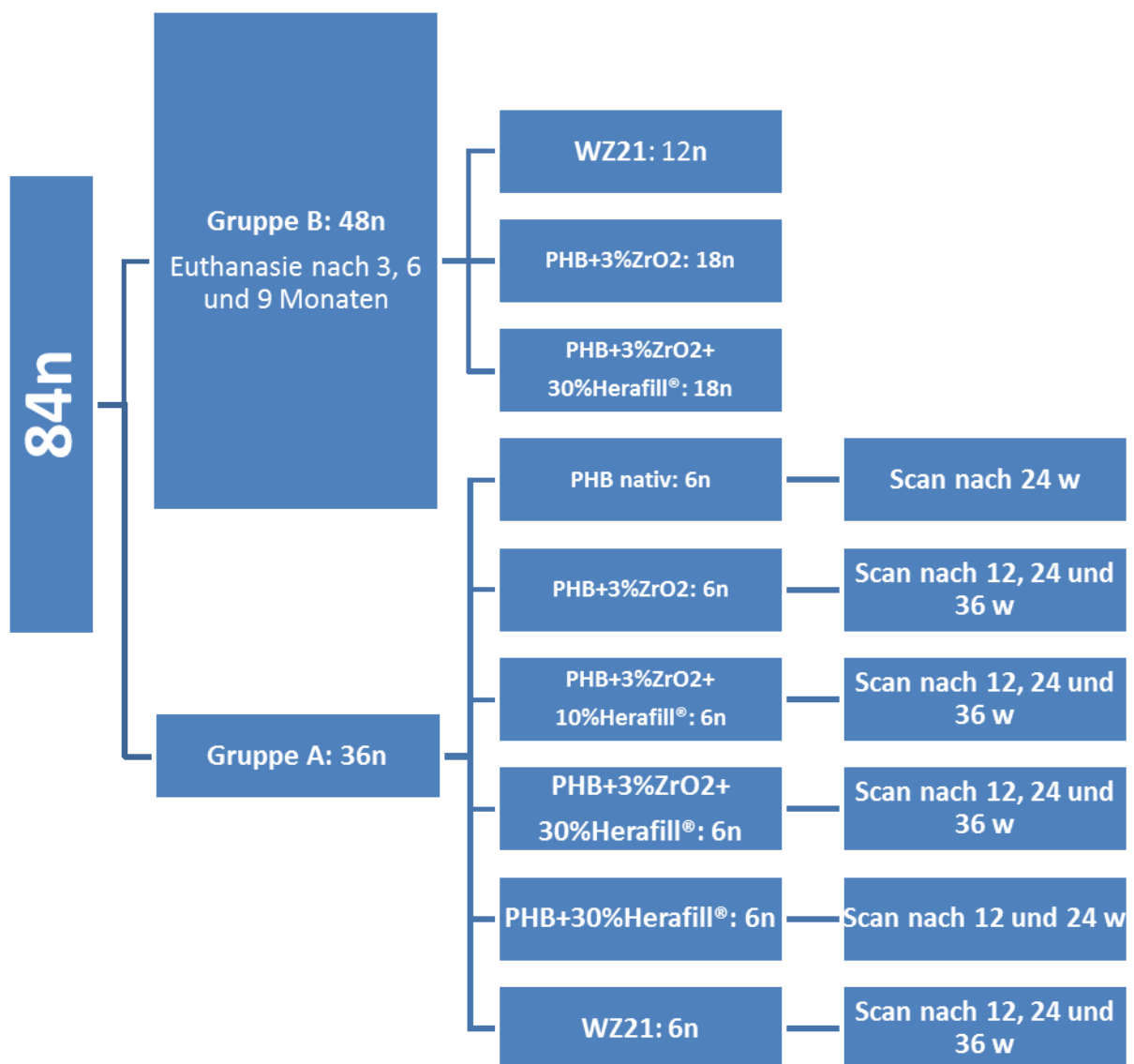


Abbildung 4: Schematische Darstellung der Versuchsgruppen

Gruppe A: Besteht aus insgesamt 36 Tieren, die entsprechend den sechs Implantat-Typen in sechs Untergruppen zu je sechs Tieren unterteilt werden können. Nachdem die Implantate am Tag 1 des Experiments im Rahmen der Operation in die Oberschenkelknochen der Ratten eingebracht worden waren, wurden die Tiere der Gruppe A in Abhängigkeit der verwendeten Implantat-Reihe zu den vorher festgelegten Zeitpunkten von 12, 24 und 36 Wochen einem μ -CT-Scan unterzogen. Die in diese Studie miteinbezogenen Ratten wurden im standardisierten Operationsverfahren (vgl. 3.2) alle beiderseits mit zwei Pins aus der jeweils gleichen Materialgruppe versorgt. Bei der Auswertung wurde prinzipiell immer die Aufnahme des linken Hinterlaufs verwendet. Wenn auf dieser jedoch der Pin beschädigt oder disloziert war oder durch die, im

Zusammenhang mit technischen Schwierigkeiten, manchmal auftretenden Artefakte überlagert, wurde die Aufnahme des rechten Hinterlaufes für die Erhebung herangezogen.

Gruppe B: Die Daten dieser Gruppe stammen aus einer Arbeit von Celarek et al., die die gleichen Materialgruppen und dasselbe experimentelle Modell verwendet [65]. Schematisch betrachtet besteht sie aus 48 Tieren. Am Tag 1 wurden beide Oberschenkelknochen jeder Ratte mit zwei gleichen Implantaten aus den drei Materialgruppen PHB3%ZrO₂, PHB3%ZrO₂+30%Heracoll® und WZ21 versorgt. In der Gruppe B erfolgte dann nach 12, 24 Wochen eine Euthanasie von 18 zufällig ausgewählten Tieren beziehungsweise 12 Tieren nach 36 Wochen. Im Anschluss an die Euthanasie wurden die Knochen explantiert und mithilfe eines POT auf ihre mechanische Stabilität untersucht.

3.2 Operativer Eingriff

Die Versuchstiere erhielten nach Verabreichung einer Gasnarkose mit Isofluran (Furane®; vgl. Abb 5) eine Gewichtsangepasste Aufrechterhaltung der Anästhesie (0,1mL/100g KG) mit einem Gemisch aus 1mL Fentanyl®, 1mL Midazolam Delta® und 0,5mL Domitor®. Die Verabreichung der Narkose erfolgte mittels subkutaner Injektion in den Nacken und wurde bei Bedarf in 0,05er Schritten auf titriert.



Abbildung 5: Gasnarkose mit Isofluran

Nachdem die Tiere narkotisiert worden waren, wurde beidseits das Fell im Bereich des Oberschenkels mit Hilfe eines Einmalrasierers entfernt. Anschließend erfolgte eine großzügige Desinfektion des Operationsbereichs mit Betaisodona®-Lösung. Der OP-Situs

wurde steril abgedeckt und eine Hautinzision mit dem Skalpell vorgenommen. Nun wurden Subkutangewebe, Faszien und Muskeln stumpf präpariert, bis der Oberschenkelknochen frei lag. Mit der Bohrmaschine wurde ein im Querschnitt 1,6mm messendes, transkortikales Loch in der Schaftmitte des Knochens gebohrt, welches sodann mit einem Pin versorgt wurde. Die transkortikale Lage des Pins, wurde durch Ertasten des medialen Pin-Endes bestätigt und das Wundgebiet gereinigt. Abschließend erfolgten der schichtweise Verschluss der Wunde und die Hautnaht mit Einzelknopfnähten. Danach wurde auf der kontralateralen Seite mit einem Pin aus derselben Materialgruppe in gleicher Weise verfahren. Den Versuchstieren war es möglich unmittelbar postoperativ beidseits voll zu belasten, da der durch die Operation entstandene Defekt jeweils nur 60% des Knochenquerschnitts betrug.

Die Antagonisierung der Anästhesie erfolgte mit einem Antidot bestehend aus 4mL Anexate®, 0,5mL Antisedan® und 1,5mL NaCl-Fresenius®, welches intraperitoneal in einer Dosierung von 0,1mL/100g KG verabreicht wurde. Für die Überbrückung von Wartezeiten und die Zeit bis zum Ausklingen der Narkose wurden die Ratten auf einer Wärmematte gelagert um der Auskühlung vorzubeugen.

3.3 Schmerzmedikation

Postoperativ erhielten die Tiere 0,4mL einer Mischung aus 1mL Rimadyl® und 50mL NaCl-Fresenius® als subkutane Injektion in den Nacken. Anschließend erfolgte für die Dauer von mindestens einer Woche eine Schmerzstillung mit Dipidolor®, das den Tieren über das Trinkwasser zugeführt wurde. Hierbei wurde eine Mixtur aus zwei Ampullen Dipidolor® 20mL 5%-Glucose und 250mL Wasser hergestellt. Dann wurden pro Käfig (=4 Tiere) jeden Tag ca ¼ dieser Mixtur dem Trinkwasser-Reservoir beigemischt.

3.4 Euthanasie und Explantation

Für die Euthanasie wurden die Tiere in gleicher Weise wie zuvor unter 3.2 beschrieben mit einer Isofluran Gasnarkose betäubt. Die narkotisierten Tiere wurden dann mit einer intrakardialen Injektion von 2 mL Thiopental-Natrium® getötet. Direkt im Anschluss an die Injektion wurden über die intrakardial gelegene Kanüle 5 mL Blut aspiriert und das so gewonnene Blut auf Entzündungszeichen hin untersucht.

Anschließend an die Euthanasie wurden beide Oberschenkelknochen explantiert. Dabei wurde schonend vorgegangen um die mechanische Integrität der Proben zu gewährleisten.

Das gewonnene Material wurde dann mit flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zum Beginn der weiteren Testung im Gefrierschrank gelagert.

3.5 Push-Out-Test (POT)

Bei dieser Testmodalität wirkt eine Kraft parallel zur longitudinalen Achse des Implantates auf das BII ein. Zu diesem Zweck wird der explantierte Knochen in eine spezielle Testvorrichtung eingespannt. Wenn das zylindrische Implantat aus seiner knöchernen Verankerung herausbricht ist die „Maximum Push-Out Force“ (MF) (maximal applizierbare Kraft) erreicht. Die sogenannte „Ultimate Shear Strength“ (σ_u) wird in N/mm² angegeben. Sie wird ermittelt, indem man die MF durch die knöcherne Kontaktfläche (=Bone Implant Contact =BIC) teilt (siehe Formel 1) [58,59].

$$\sigma_u = \frac{MF}{BIC}$$

Formel 1: Ultimate-Shear-Strength

Die Datensätze für σ_u wurden retrospektiv akquiriert und stammen aus einer POT-Versuchsreihe, die die gleichen Materialgruppen und dasselbe experimentelle Modell verwendet [65]. Die errechneten Werte für BV/TV und deren Aussagekraft über die OI sollen mithilfe dieses Parameters objektiviert werden.

3.6 In-vivo μ CT

Für die μ CT-Scans wurden die Ratten mit Furane® narkotisiert. Die Aufnahmen wurden mit einer Spannung von 70kV, einer Stromstärke von 500 μ A und einer Expositionszeit von 1000ms durchgeführt. Jede Aufnahme besteht aus 180 Schnitten, bei einem Winkel von 210°. Die Auflösung betrug dabei 35 μ m pro Pixel.

3.6.1 Bildverarbeitung

Analysiert wurden die Bilder mit der herstellereigenen Software (Siemens Inveon Acquisition Workplace 1.2.2.2). Dabei stand die Erhebung der OI, also des Knochenanbaus an das Implantat, im Vordergrund. Zu diesem Zweck wurde das BV im Radius von 210 μ m um das Implantat gemessen und ins Verhältnis zum Gesamtvolumen (=Tissuevolume TV) gebracht.

Die μ CT-Scans wurden bei diesem Versuch alle in-vivo, also am lebenden Versuchstier durchgeführt. Dadurch war es uns möglich die Entwicklung des Knochenanbaus über die Zeit zu beobachten.

Der Einschluss der Kortikalis wurde nach lateral und medial begrenzt. Die Grenze wurde dabei immer dann gezogen, sobald im Schnittbild proximal oder distal des, transkortikal gelegenen, Implantates das Periost erreicht war (siehe Abb.6 und 7). Der variable übermäßige Knochenanbau ging nicht in die Messung mit ein.

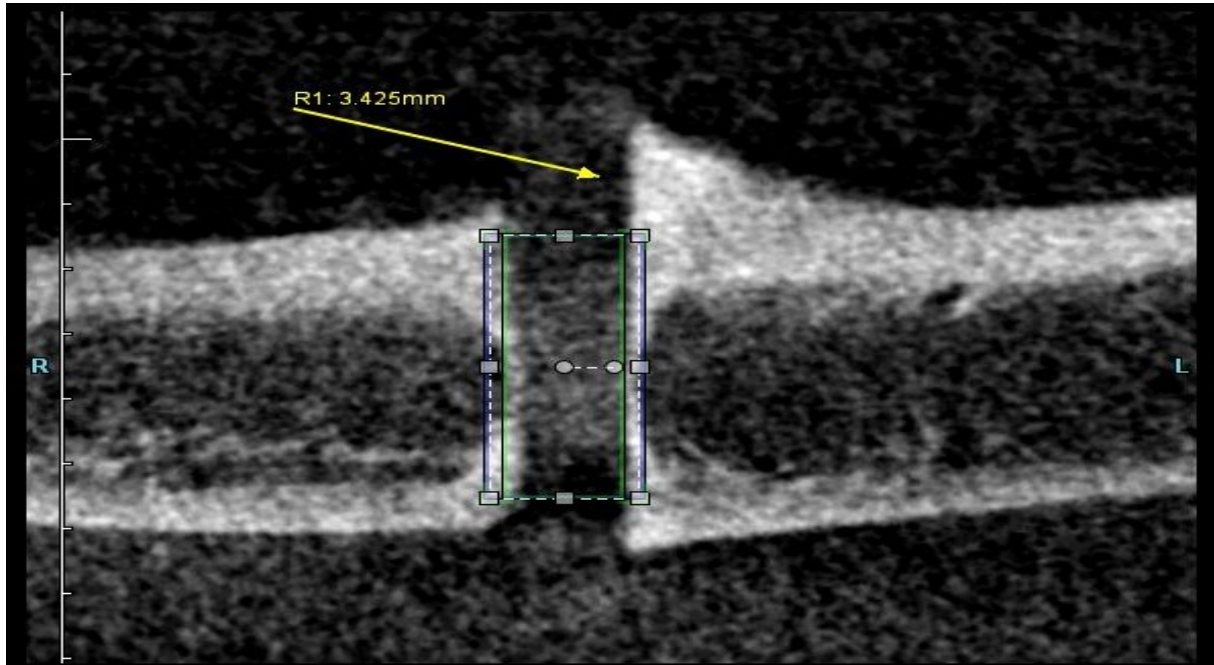


Abbildung 6: der übermäßige proximale Knochenanbau (gelber Pfeil) geht nicht in die Messung mit ein; grüne Umrandung = Pin; blaue Umrandung = ROI;

3.6.2 Messverfahren

Mithilfe der Inveon Software wurde der gesuchte Quotient aus BV/TV berechnet. Das TV errechnete sich dabei indem das Volumen des in die Messung eingegangenen Pin-Abschnitts (=Höhe =h), vom Gesamtvolumen des GW 1 (vgl. 3.6.2 Schritt 2) abgezogen wurde (siehe Formel 2).

$$\frac{BV}{TV} = \frac{BV}{(1,01mm^2 \times \pi \times h) - (0,8mm^2 \times \pi \times h)}$$

Formel 2: Berechnung von BV/TV

Bei der Ausmessung der μ -CT-Bilder wurde nach einem standardisierten Verfahren vorgegangen:

1. Zunächst wurde der Pin in den Schnittbildern aller 3 Ebenen aufgesucht und jeweils in einem medialen Anschnitt dargestellt.
2. Nun wurde in einem zweiten Bearbeitungsschritt Die Region Of Interest (ROI) eingegrenzt. Zu diesem Zweck wurde zunächst in allen 3 Ebenen ein Gewebszylinder

(GW1) mit einem Durchmesser von $2020\mu\text{m}$ segmentiert. Dieser Zylinder schließt den Pin ein und überlappt ihn in den drei zweidimensionalen Bildebenen um $210\mu\text{m}$.

3. Im nächsten Schritt wurde ein Gewebszylinder (GW2) eingezeichnet der genau den Abmessungen des im GW1 enthaltenen Pins entspricht mit einem Durchmesser von $1600\mu\text{m}$. Die Höhe der beiden Zylinder war dabei variabel und richtete sich nach der Ausdehnung der Kortikalis. Die Grenze wurde immer dann gezogen, sobald proximal oder distal des Pins das Periost (also die äußerste Kortikalis-Schicht) erreicht war (vgl. Abb7).

4. Durch Subtraktion des GW2 vom zuvor generierten GW1 wurde die definitive ROI errechnet, die sich nun in den Schnittbildern aller 3 Ebenen zu je $210\mu\text{m}$ beiderseits des Pins erstreckte.

5. Der absolute Anteil an Knochengewebe (BV) innerhalb der ROI wurde ermittelt durch die Anwendung eines Gewebes-Schwellenwertes der Gewebe nach seiner Dichte in Knochen und nicht-mineralisiertes Bindegewebe differenziert (vgl. Abb.8). Das so erhaltene BV wurde, wie in Formel 2 dargestellt, ins Verhältnis zum Gesamtvolumen der ROI (=TV) gebracht (=BV/TV).

Abbildung 7: PHBnativ-Pin nach 6 Monaten

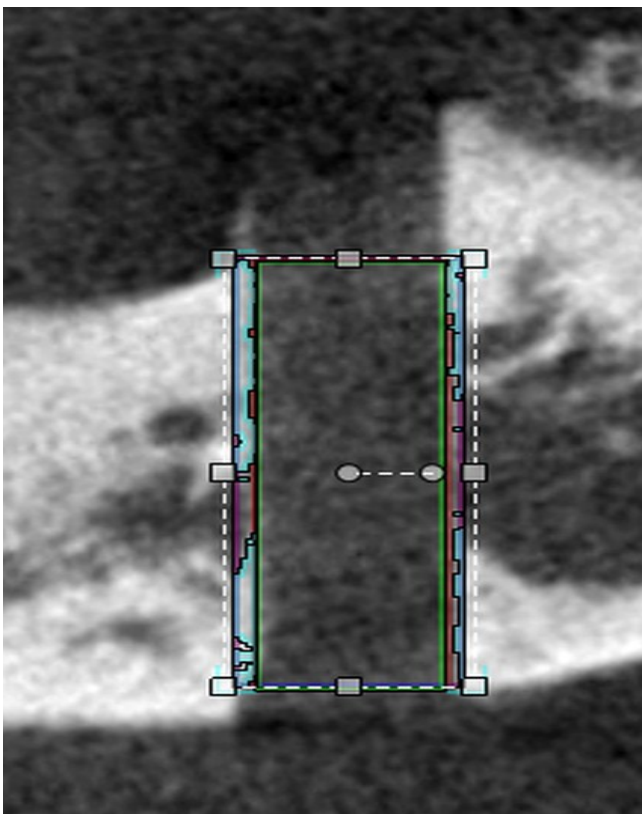
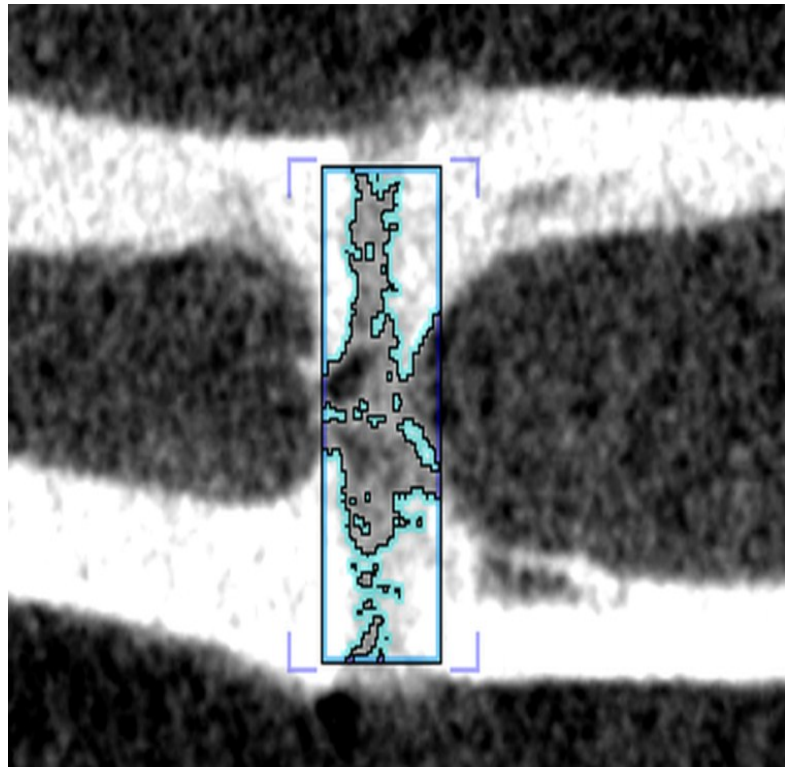


Abb. 7 zeigt den GW2 (grün umrandet), den GW1 (weiß strichliert bzw. äußere Umrandung) und die zwischen GW2 und GW1 gelegene ROI. Innerhalb der ROI ist das mineralisierte Knochengewebe türkis umrandet. Die im Bild rechts oben gelegene, mediale proximale Kortikalis weist eine deutliche Kallusartige Knochenmanschette auf, die – wie in Schritt 3 erläutert – nicht in die Messungen mit eingeht

Abbildung 8: PHB30%Herafill-Pin nach 6 Monaten

Abb. 8 zeigt den tangentialen Anschnitt der ROI; die türkis umrandeten Bereiche wurden durch Anwendung eines Gewebsschwellenwertes als mineralisiertes Knochengewebe erfasst;



3.7 Statistische Analyse

Für die Datenverwaltung und die Ermittlung von Mittelwerten sowie die Erstellung von Balkendiagrammen wurde Microsoft Excel® (Microsoft Corporation, Redmond, USA) verwendet. Die weitere statistische Auswertung erfolgte mithilfe von IBM SPSS® Statistics 20 (SPSS Inc., Chicago, USA).

Mittels des nichtparametrischen Kruskal-Wallis-Tests für k-unabhängige Stichproben wurde nach signifikanten Unterschieden zwischen den Ergebnissen für BV/TV der verschiedenen Materialgruppen zu den drei Zeitpunkten der μ CT-Bildgebung gesucht. Zum Ermitteln signifikanter Unterschiede zwischen zwei unabhängigen Stichproben wurde der Mann-Whitney-U-Test (MWUT) benutzt. Unterschiede wurden ab einem p-Wert kleiner 0,05 als signifikant angesehen. Zusätzlich wurde eine explorative Datenanalyse durchgeführt.

Um zu überprüfen ob die in-vivo- μ CT mit der mechanischen Stabilität des BII korreliert, wurden die Ergebnisse aus einem parallel durchgeführten Versuch herangezogen, bei dem die Biomechanik des BII am explantierten Knochen mittels eines POT untersucht wurde. Der dafür verwendete Datensatz der unter der Gruppe B subsummiert wurde (vgl. 3.1) wurde retrospektiv akquiriert und stammt aus einer Versuchsreihe die, die gleichen Materialien und Methoden verwendete [65].

4 Ergebnisse

4.1 Durchmesser der ROI, absolutes BV und BV/TV in der Verlaufsbeobachtung

Ausnahmslos alle Knochen aus der Gruppe A zeigten in den μ CT-Scans eine Größenzunahme der Markraumhöhle, die sich in einer Progression des gemessenen Durchmesser der ROI (=h) manifestierte. Abbildung 9 veranschaulicht die errechneten Mittelwerte der ROI-Durchmesser. Ein Kruskal-Wallis-Test zeigt, dass zwischen den PHB-basierten Implantaten, dabei kein signifikanter Unterschied für den mittleren ROI-Durchmesser gefunden werden kann. Die p-Werte betragen hier 0,659 für den 3-Monats-Vergleich, 0,905 für den 6-Monats-Vergleich und 0,257 zum 9-Monats-Zeitpunkt. Die mittleren ROI-Durchmesser der WZ21-Gruppe weichen für den 3-Monats-Zeitpunkt in statistisch signifikanter Weise von den Werten der PHB-Gruppen ab ($p=0,003$). Bei dieser Implantat-Gruppe ist nach drei Monaten der Durchmesser im Mittel kleiner. Hinsichtlich ihrer Tendenz zur Größenprogression verhalten sie sich jedoch analog zu den PHB-basierten Implantaten (vgl. Abb. 9).

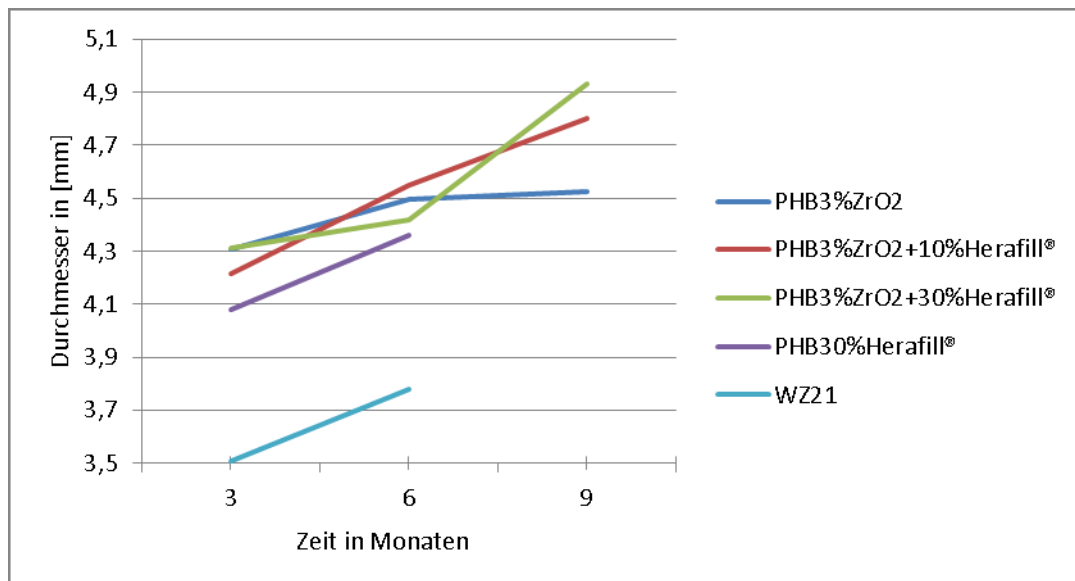


Abbildung 9: Durchmesser der ROI in Millimetern (=h) im Verlauf

Der Quotient BV/TV ist ein relativer Wert, der unter anderem von der Größe des Durchmessers und dem BV abhängig ist (vgl. Formel 2). Die beschriebene Größenprogression der Markraum-Höhle und die deutliche Abnahme des BV im Verlauf der 9 Monate (Abb. 11) bilden sich in BV/TV als kontinuierliche Abnahme des Quotienten ab (vgl. Abbildung 10). Dies gilt für alle Materialgruppen mit Ausnahme des PHB3%ZrO2+10%Heracore®.

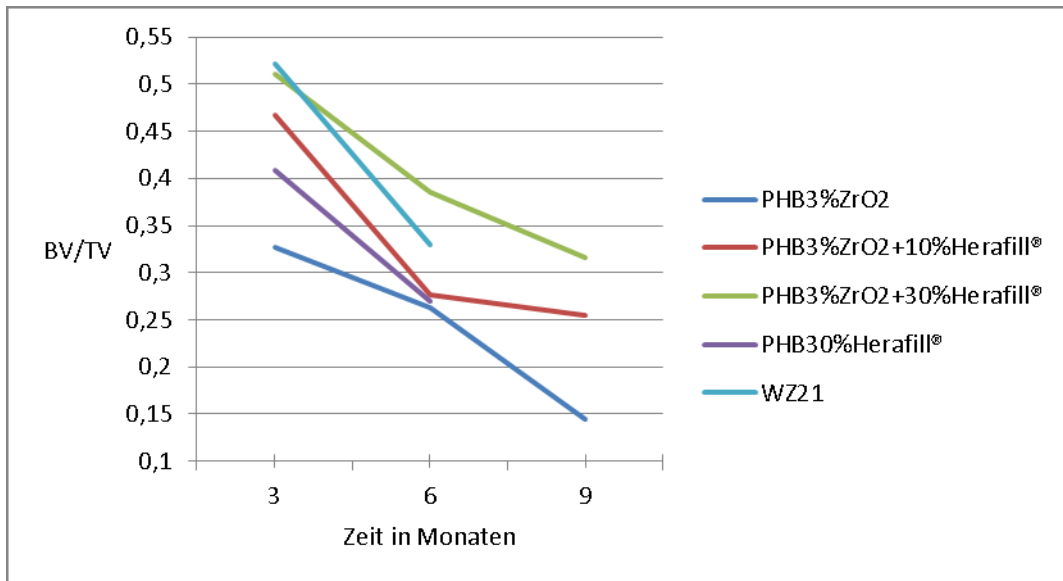


Abbildung 10: BV/TV im Verlauf

Der 6-Monats-Wert für das BV und das BV/TV von PHB3%ZrO2+10%Heracell® weicht vom erwarteten Spektrum deutlich ab. (Bemerkung: Dies ist aller Wahrscheinlichkeit technischen Problemen mit dem μ -CT geschuldet, die sich negativ auf die Bildqualität ausgewirkt haben (vgl. 10)).

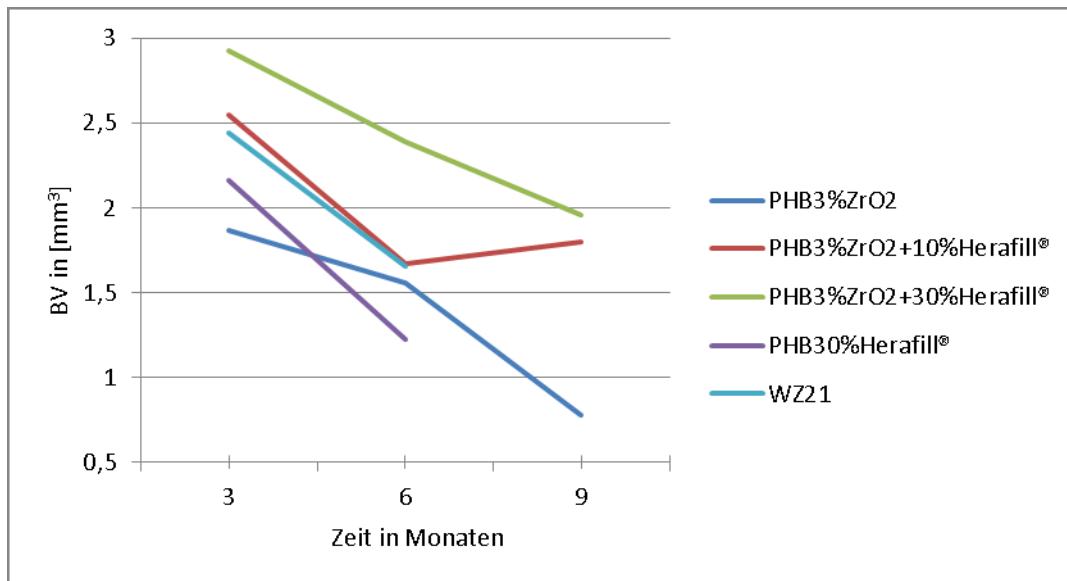


Abbildung 11: Absolutes BV in mm³ im Verlauf

4.2 Auswirkungen von Heracell® auf BV/TV

In einer vergleichenden Analyse wurde mithilfe des Mann-Whitney-U-Tests (MWUT) nach signifikanten Unterschieden zwischen PHB3%ZrO2 und PHB3%ZrO2+30%Heracell® gefahndet (vgl. Tabelle 4). Statistisch relevante Unterschiede fanden sich für den 3-Monats- und den 9-Monats-Zeitpunkt. Das errechnete BV/TV der PHB3%ZrO2+30%Heracell®-Versuchstiere war für diese Zeitpunkte signifikant höher, wie

sich an Δ BV/TV in Tabelle 3 ablesen lässt. In Abbildung 12 ist der Vergleich nochmals graphisch veranschaulicht.

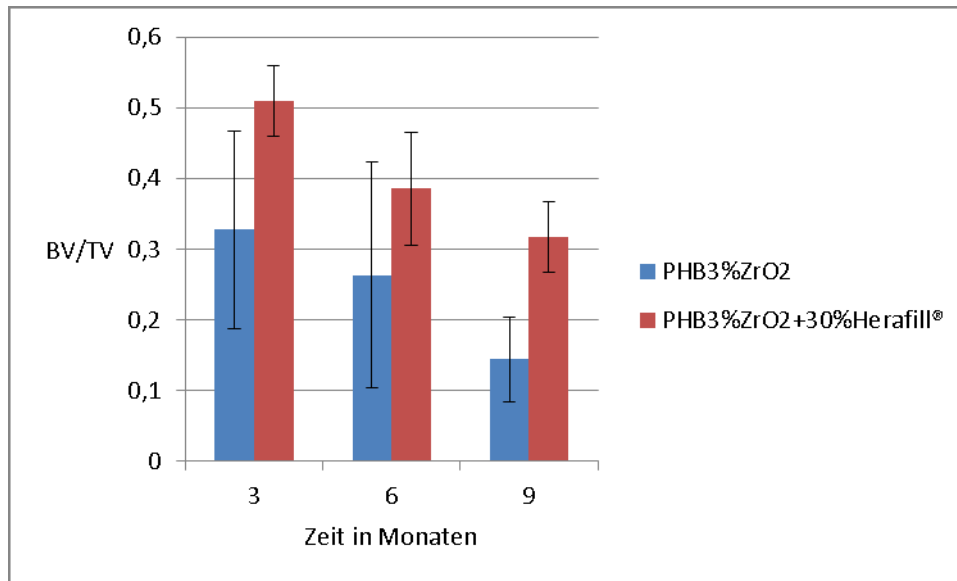


Abbildung 12: BV/TV im Verlauf (Mittelwerte mit Standardabweichung)

	Implantat	BV/TV	Δ BV/TV	MWUT
3 Monate	PHB3%ZrO2	0,3274 ± 0,14	-0,1828	p = 0,05
	PHB3%ZrO2+30%Heracell®	0,5102 ± 0,05		
6 Monate	PHB3%ZrO2	0,2633 ± 0,16	-0,1224	KSU*
	PHB3%ZrO2+30%Heracell®	0,3857 ± 0,08		
9 Monate	PHB3%ZrO2	0,1438 ± 0,06	-0,1724	p = 0,04
	PHB3%ZrO2+30%Heracell®	0,3162 ± 0,05		

Tabelle 4: Vergleich PHB3%ZrO2 mit PHB3%ZrO2+30%Heracell

4.3 Auswirkungen von ZrO2 auf BV/TV

In gleicher Weise wie unter 4.2, wurde untersucht ob der Zusatz von 3% ZrO2 Einfluss auf BV/TV hat. Zu diesem Zweck wurde PHB3%ZrO2+30%Heracell® mit PHB30%Heracell® verglichen (vgl. Tabelle 5). Da die Versuchsreihe PHB30%Heracell® nur über 6 Monate geführt wurde, war ein Vergleich für den 9-Monats-Zeitpunkt nicht möglich.

Tabelle 5: Vergleich PHB3%ZrO2+30%Heracell® mit PHB30%Heracell®

	Implantat	BV/TV	Δ BV/TV	MWUT
3 Monate	PHB3%ZrO2+30%Heracell®	0,5102 ± 0,05	0,1011	p = 0,017
	PHB30%Heracell®	0,4091 ± 0,1		
6 Monate	PHB3%ZrO2+30%Heracell®	0,3857 ± 0,08	0,1156	p = 0,009
	PHB30%Heracell®	0,2701 ± 0,09		

Signifikante Unterschiede ab $p < 0,05$;

In Tabelle 5 lässt sich ablesen, dass der MWUT für diesen Vergleich einen signifikanten Unterschied detektieren kann. Die Mittelwerte zeigen eine deutliche Differenz zwischen den BV/TV der Implantate für beide Zeitpunkte. Abbildung 13 veranschaulicht den tabellarischen Vergleich.

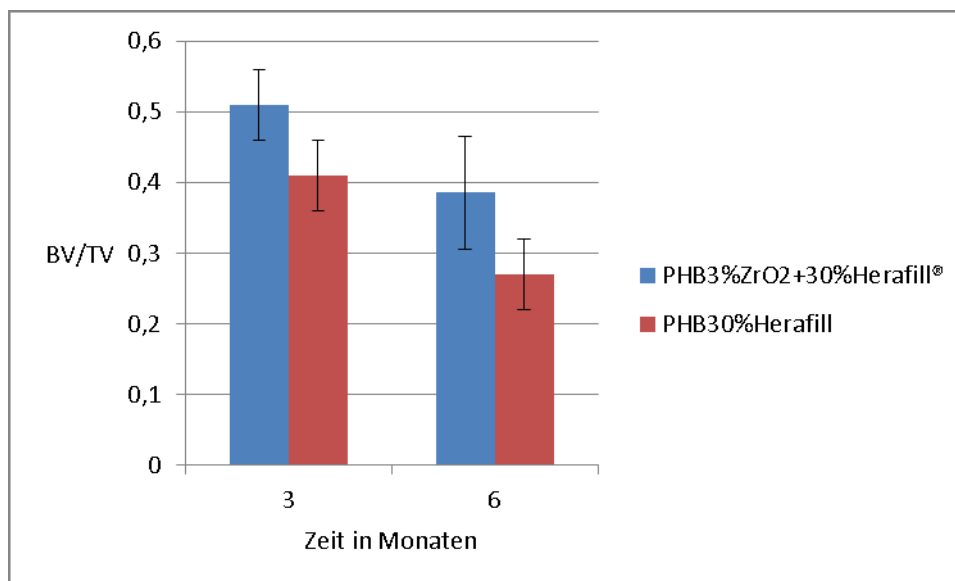


Abbildung 13: BV/TV im Verlauf (Mittelwerte mit Standardabweichung)

4.4 Vergleich der PHB-Implantate mit WZ21

Für die MgL WZ21 existiert wie unter 1.3.7 bereits angesprochen eine gesicherte Datenlage. Es zeigt regelmäßig einen hohen Knochenanwuchs und eine gute mechanische Stabilität im POT [48,50]. Deshalb wurden die Implantat-Reihen bei der statistischen Auswertung im direkten Vergleich zu WZ21 beurteilt (vgl. Tabelle 6).

Tabelle 6: Vergleich der PHB-Implantate mit WZ21

	Implantat	BV/TV	Δ BV/TV	MWUT
3 Monate	WZ21	$0,5219 \pm 0,1$	0,1945	$p = \mathbf{0,002}$
	PHB3%ZrO2	$0,3274 \pm 0,14$		
	WZ21	$0,5219 \pm 0,1$	0,0117	KSU*
	PHB3%ZrO2+30%Heracell®	$0,5102 \pm 0,05$		
	WZ21	$0,5219 \pm 0,1$	0,1128	$p = \mathbf{0,013}$
	PHB30%Heracell®	$0,4091 \pm 0,1$		
6 Monate	WZ21	$0,3299 \pm 0,11$	0,0666	KSU*
	PHB3%ZrO2	$0,2633 \pm 0,16$		
	WZ21	$0,3299 \pm 0,11$	-0,0558	KSU*
	PHB3%ZrO2+30%Heracell®	$0,3857 \pm 0,08$		
	WZ21	$0,3299 \pm 0,11$	0,0598	KSU*
	PHB30%Heracell®	$0,2701 \pm 0,09$		

Signifikante Unterschiede bei $p < 0,05$; *KSU = Kein signifikanter Unterschied;

Im direkten Vergleich mit PHB3%ZrO2 und PHB30%Heracell zeigen sich deutlich abweichende Mittelwerte für BV/TV, die auch statistische Signifikanz besitzen. Nimmt man den Vergleich mit PHB3%ZrO2+30%Heracell – der statistisch nicht signifikant ist – aus, lässt sich daher sagen, dass WZ21 zum 3-Monats-Zeitpunkt ein deutlich höheres relatives Knochenvolumen aufweist (um 11% bzw. 19%) als die PHB basierten Implantate.

Ein ganz anderes Bild zeigt sich zum 6-Monats-Zeitpunkt. Hier finden sich nur geringe Differenzen zwischen den Mittelwerten aller verglichenen Gruppen. Die Analyse der Daten mit dem MWUT ergibt jedoch ausschließlich p-Werte größer 0,05 und deutet damit daraufhin, dass diese Vergleiche keine statistische Relevanz besitzen.

4.5 Vergleich von BV/TV mit den Ergebnissen aus einem POT

Wie unter 3.5 angesprochen, sollte mithilfe der Daten aus einem POT, der von Celarek et al. durchgeführt wurde und dem wie bereits beschrieben die gleichen Methodik zugrunde liegt, überprüft werden, ob die gemessenen relativen Knochenvolumina mit der mechanischen Stabilität des BII korrelieren [65]. Verwertbare Daten aus diesem POT lagen für PHB3%ZrO₂ (3, 6 und 9m), PHB3%ZrO₂+30%Heracoll® (3, 6 und 9m) und für WZ21 (3 und 6m) vor. Da PHB3%ZrO₂+10%Heracoll® aufgrund der Artefakt überlagerten Bilder von der statistischen Analyse ausgeschlossen wurde, wurden auch die Daten aus dem POT nicht in die Auswertung miteinbezogen. Der POT-Datensatz für PHB30%Heracoll® war noch unvollständig und wurde deshalb ebenfalls nicht verwertet.

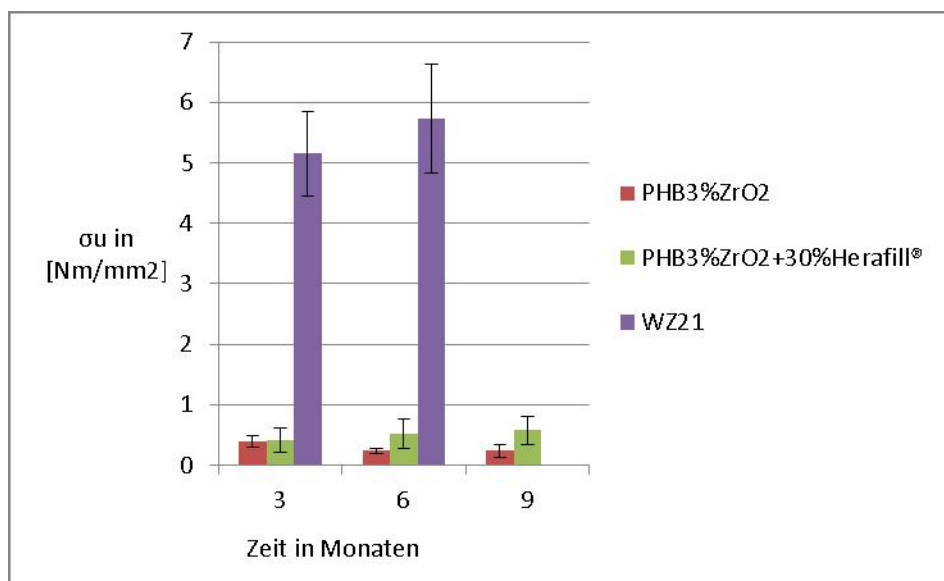


Abbildung 14: σ_u im Verlauf (Mittelwerte mit Standardabweichung)

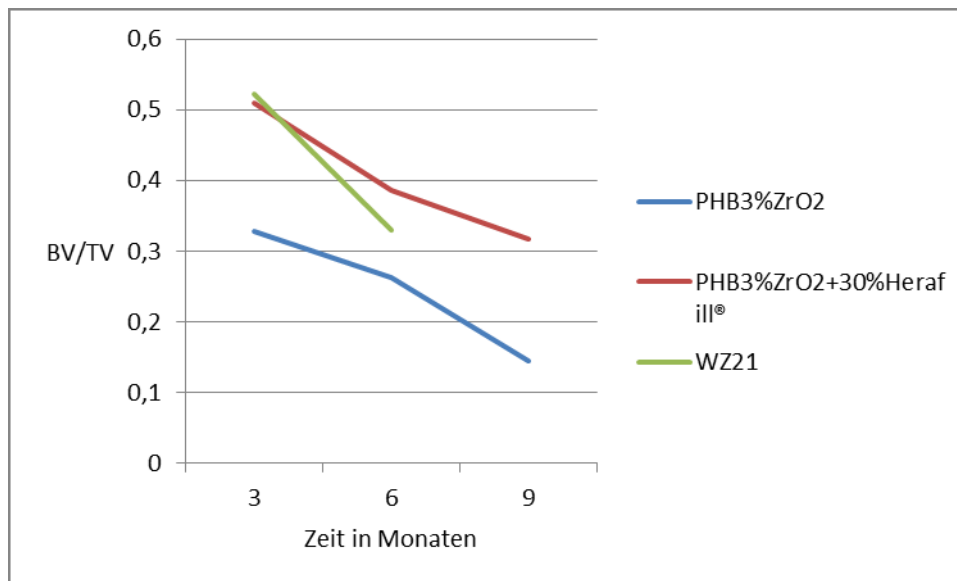


Abbildung 15: BV/TV im Verlauf

Die Gegenüberstellung der Abbildungen 14 und 15 lässt vermuten, dass es keinen Zusammenhang zwischen BV/TV und σ_u gibt. Während die Mittelwerte für BV/TV zwischen WZ21 und PHB3%ZrO2+30%Heracill graphisch nur geringfügig abweichen, zeigt sich für σ_u ein sehr ausgeprägter Unterschied. Die 6-Monats-Werte für BV/TV differieren bei Betrachtung der Mittelwerte wie unter 4.4 erläutert kaum, jedoch erwiesen sich die dort angestellten Vergleiche allesamt als nicht statistisch signifikant.

Die Tabelle 7 gibt die Gegenüberstellung der beiden Parameter in Zahlen wieder. Dabei sieht man, dass die Differenzen der Mittelwerte von σ_u bei allen Vergleichen von WZ21 mit PHB-Implantaten sehr groß sind. Der MWUT der für jeden Vergleich aufgeführt wurde bestätigt die statistische Signifikanz der erhobenen Daten. Die Tabelle 6 bestätigt damit den Eindruck aus der graphischen Gegenüberstellung. Die ermittelten Differenzen für BV/TV korrelieren (bis auf „WZ21 vs. PHB3%ZrO2-3m“) kaum mit $\Delta\sigma_u$. Zum 6-Monats-Zeitpunkt verhalten sich die beiden Differenzen teilweise gegenläufig.

	Implantat	Δ BV/TV	σ_u [N/mm ²]	Δ σ_u	MWUT
3m	WZ21	0,1945	5,15 ± 0,7	4,76	p = 0,005
	PHB3%ZrO2		0,39 ± 0,1		
	WZ21	0,0117	5,15 ± 0,7	4,74	p = 0,039
	PHB3%ZrO2+30%Heracill®		0,41 ± 0,2		
6m	WZ21	0,0666	5,74 ± 0,9	5,5	p = 0,007
	PHB3%ZrO2		0,24 ± 0,04		
	WZ21	-0,0558	5,74 ± 0,9	5,22	p = 0,011
	PHB3%ZrO2+30%Heracill®		0,52 ± 0,25		

Tabelle 7: Vergleich BV/TV und σ_u
Signifikante Unterschiede bei $p < 0,05$;

Darüber hinaus überrascht die Beobachtung, dass sich BV/TV auch im Verlauf nicht analog zu σ_u verhält. Während das BV/TV (vgl. Abb. 10) und das absolute BV (vgl. Abb. 11) gleichermaßen über den gesamten Beobachtungszeitraum eine kontinuierliche Abnahme zeigen, weist σ_u für die Gruppen WZ21 und PHB3%ZrO₂+30%Heracore eine dem entgegengesetzte Entwicklung auf. PHB3%ZrO₂ bildet hier eine unerwartete Ausnahme mit einer geringfügigen Regression von σ_u zum 6-Monats-Zeitpunkt.

5 Diskussion

Bei dieser Studie wurden in-vivo μ CT-Schnittbilder von insgesamt 36 Tieren nach einem unter 3.6.2 erläuterten Algorithmus ausgewertet und die daraus errechneten Werte für BV/TV mit den Ergebnissen aus einem POT abgeglichen. Das Ziel der Studie lag einerseits in der Charakterisierung der verwendeten PHB basierten Implantate mit einem besonderen Augenmerk auf Effekten, die auf die Beimischungen von Heracore® bzw. ZrO₂ zurückzuführen sind. Andererseits sollte die Methodik der in-vivo μ CT zur Beurteilung der OI evaluiert werden (vgl. 1).

Im Titel der Diplomarbeit ist von einer „Charakterisierung“ die Rede und nicht etwa von „Beurteilung“ oder gar „Messung“. Daran lässt sich bereits eine gewisse Zurückhaltung erahnen, denn wenn man die Zielsetzung diskutiert muss man sich auch die Frage stellen, was die eigene Methode im Stande ist zu leisten. Da die Studie jedoch nicht prospektiv konzipiert ist, sondern retrospektiv verschiedene Datensätze akquiriert wurden, ergeben sich in diesem Zusammenhang einige Schwierigkeiten.

Ausgehend von dieser Überlegung kann man festhalten, dass aufgrund von Art und Aufbau des experimentellen Teiles (beziehungsweise der verfügbaren Daten) es das Ziel sein kann auf PHB basierende Komposite vergleichend zu „charakterisieren“ und signifikante Unterschiede innerhalb der PHB basierten Materialgruppen auf deren zusätzliche Bestandteile, ZrO₂ und Heracore® zurückzuführen. Eine Aussage über PHB selbst zu treffen gestaltet sich eher schwierig, da nur eine der Implantat-Reihen aus reinem PHB besteht, ohne Zusätze anderer Stoffe. Diese, sogenannte, „native“ PHB-Reihe wurde nur zum 6-Monats-Zeitpunkt ausgewertet. Sie hatte ursprünglich vornehmlich den Zweck als Kontrollgruppe zu dienen, zum Ausschluss toxischer Effekte durch das verwendete PHB. Deshalb wurde mit der MgL WZ21 eine sechste Implantat-Reihe in die Arbeit mitaufgenommen, um bei der Bewertung der Ergebnisse einen Anhaltspunkt zu haben und die gemessene BV-Werte einordnen zu können. WZ21 wurde gewählt, da verschiedene In-Vivo-Studien, die den Knochenanwuchs an MgL untersuchten, zeigen konnten, dass diese

Implantate, verglichen mit konventionellen Metallen oder Polymeren, tendenziell eine gute OI und hohe mechanische Stabilität am BII zeigen [48,50]. Als zusätzliche Kontrollinstanz wurden die Datensätze aus einem POT herangezogen, der die gleichen Materialgruppen und dasselbe experimentelle Modell verwendet [65]. Die errechneten Werte für BV/TV und ihre Aussagekraft über die OI sollten so objektiviert werden.

5.1 OI in der in-vivo μ CT

Die in-vivo μ CT ist eine nicht-destruktive Methode, die die Möglichkeit zur Verlaufsbeobachtung und zur Anwendung weiterer Test-Modalitäten (POT, histologischer Schnitt) am gleichen Versuchstier bietet. Butz et al. (2006), konnten in ihrer Arbeit nachweisen, dass das BV das mittels μ CT erhoben wurde signifikant mit der Erfassung von BV in histologischen Schnitten korreliert [56]. Die Lichtmikroskopie gilt seit Jahren als Gold-Standard für Untersuchungen der Quantität und Qualität von Knochen und der OI am BII [56] und ist daher als Indikator geeignet bei der Suche nach neuen Methoden für die Evaluation der OI. Der große Nachteil der histologischen Methode ist jedoch dessen destruktives Procedere und Beschränkung auf vergleichsweise wenige Schnittbilder. Der Nachweis von BV im μ CT kann hingegen am lebenden Versuchstier vorgenommen werden, gestattet eine Verlaufsbeobachtung und erfasst die ROI in allen drei räumlichen Dimensionen durch Interpolation von hunderten von Schnittbildern. Auch bei in-vitro Versuchen mit Präparaten von bereits geopfertem Versuchstieren, hat das non-destruktive Procedere den Vorteil, dass anschließend an die Erhebung des BV noch weitere Tests an dem gleichen Präparat durchgeführt werden können. Die μ CT scheint daher ein geeignetes Werkzeug für die Untersuchung der OI zu sein.

Die ROI wurde definiert als das Gewebe, das innerhalb einer Zone von $210\mu\text{m}$ (entspricht bei einer Auflösung von $35\mu\text{m}$ einem Radius von 6 Voxeln) um das Implantat gelegen war (vgl. 3.6.2). Diese im Vergleich zu aktuellen Studien relativ große ROI [57], ist der eher geringen Auflösung von $35\mu\text{m}$ pro Voxel geschuldet, die beim Scannen lebender Ratten möglich war.

Laut Butz et al., 2006 sowie Liu et al., 2012 ist die in-vitro Erhebung des Quotienten BV/TV im μ -CT, eine zuverlässige Methode, die allerdings die Schwäche aufweist, dass, bei Verwendung metallischer Implantat-Materialien regelmäßig Artefakte die ROI überlagern und dadurch die Messwerte verfälschen können [56,57]. Diese Fehlerquelle konnte im Rahmen dieser Arbeit außer Acht gelassen werden, da bei den μ -CT-Aufnahmen der verwendeten nicht-metallischen PHB-Implantate und der MgL aus

Leichtmetall fast keine Artefakte auftraten. Dies ist auch der Grund warum bei der Erhebung des BV/TV die, dem Implantat am nächsten gelegenen, Voxel mit in die Auswertung eingingen.

Die in-vivo μ CT ist jedoch wie bereits angesprochen in ihrer Aussagekraft generell den in-vitro Scans unterlegen. Stoppie et Al. überprüften in ihrer Studie die Korrelation zwischen Messungen des perimplantären Knochenvolumens mithilfe von in-vivo Scans und der Evaluierung des Knochenvolumens in histologischen Schnitten und fanden eine geringe Übereinstimmung für alle untersuchten Messbereiche (0 bis $500\mu\text{m}$; 500 bis $1000\mu\text{m}$; 1000 bis $1500\mu\text{m}$). Deren Arbeit kommt deshalb zu dem Schluss, dass die in-vivo μ CT nur geeignet ist um Tendenzen zu detektieren [58]. Die Aussagekraft dieses Ergebnisses ist zu einem gewissen Grad in Frage zu stellen, da die Studie lediglich an sechs Versuchstieren durchgeführt wurde. Nichtsdestotrotz ist davon auszugehen, dass aufgrund der, bereits angesprochenen, niedrigen Auflösung bei in-vivo Scans die Signifikanz der erhobenen Messwerte geringer ausfallen muss. Der eingangs erläuterte Begriff der „Charakterisierung“ gilt deshalb auch für die Methodik, denn die Ergebnisse haben nur den Anspruch Tendenzen wiederzugeben. Die in-vivo- μ CT kann eine „Charakterisierung“ der biomechanischen und biologischen Kompatibilität mit dem Knochen leisten, wie sie sich durch den Prozess der OI im Verlauf der Zeit am BII manifestieren. Eine genaue Messung absoluter Werte gelingt mit dieser Methodik jedoch nicht.

Diese Arbeit legt außerdem die Hypothese zugrunde, das Knochengewebe, welches in unmittelbarer Nähe zum Implantat liegt zur mechanischen Stabilität des BII beiträgt. Liu et Al. 2012 konnten nachweisen, dass der im μ CT gemessene Quotient BV/TV für einen Radius von $96\mu\text{m}$ um das Implantat, signifikant mit der Ultimate-Shear-Strength bei POTs korreliert (wobei, in deren Versuch, beide Tests an denselben Proben erhoben wurden) [57].

Push-Out- oder Pull-Out-Tests sind generell eine etablierte Methode zur Evaluation der mechanischen Stabilität des BII. Ihre Anwendung eignet sich vor allem für transkortikal gelegene Implantate mit zylindrischer Form und makroskopisch glatter Oberfläche [59,60].

Diese Arbeit geht also auch der Frage nach ob die in-vivo gemessenen Knochenvolumina in einem Radius von $210\mu\text{m}$ um das Implantat mit der σ_u korrelieren

5.2 Rattenmodell

Der mögliche Wissensgewinn wird bei dieser Studie erhöht durch die Verwendung lebender Versuchstiere die dem menschlichen Organismus, hinsichtlich dessen komplexer Funktionsweise, eher entsprechen, als ein in-vitro Versuch.

Für die Beurteilung der OI und Biokompatibilität der Implantate, war ein Tiermodell unerlässlich. Zwar existieren auch in-vitro Modelle, bestehend aus Zellkulturen, die ein humanes Knochengewebe simulieren [64], jedoch gehen sie mit einigen Nachteilen einher, wie zum Beispiel:

- Einer kurzen Lebensspanne die lediglich eine Aussage über akute Toxizität und kurzfristige Biokompatibilität zulässt. Langfristige Gewebsreaktionen sind dabei nicht beurteilbar [66].
- Der Abwesenheit mechanischer Stimuli, die einen Hauptantrieb für den Knochenstoffwechsel darstellen. Zwar gibt es bereits Ansätze, die mechanischen Reize in-vitro zu simulieren, diese Systeme können zum heutigen Zeitpunkt allerdings keinen gleichwertigen Ersatz zu den mechanischen Bedingungen im lebenden Tiermodell bieten [64]. Ohne den mechanischen Reiz neigt der Knochen zur Inaktivitätsatrophie.
- Die in-vitro Testung von Implantatmaterialien erlaubt es nicht, eventuelle systemische Folgen abzuschätzen, die durch toxische Abbauprodukte und deren Abtransport in andere Organe entstehen könnten [64].

Erstrebenswerte Eigenschaften eines Tiermodells sind die Ähnlichkeit zum Menschen in physiologischer und pathologischer Hinsicht, sowie die Möglichkeit viele Versuchstiere innerhalb einer relativ kurzen Zeitspanne zu beobachten [67]. Darüber hinaus spielen weitere pragmatischere Überlegungen, eine Rolle bei der Auswahl des richtigen Versuchstieres. Dazu zählen: Kosten und Verfügbarkeit, die gesellschaftliche Akzeptanz gegenüber dem Tiermodell, sowie die Frage ob die gewählte Spezies einfach in Handhabung und Haltung ist und das Gefangen sein gut tolerieren wird [67].

Die männliche Sprague-Dawley Ratte erfüllt alle diese Ansprüche. Bagi et Al. (2011) kamen in ihrer Studie über den Nutzen verschiedener Tiermodelle zu dem Schluss, dass das Rattenmodell sich zwar nicht ähnlich gut auf den Menschen übertragen lässt, wie das zum Beispiel bei Schafen oder Makaken der Fall ist, jedoch aber hervorragend für die grundlegende Forschungsarbeit, hinsichtlich ihres Knochengewebes, geeignet ist [68].

5.3 Interpretation der Resultate

Es zeigt sich eine kontinuierliche Abnahme des absoluten BV und des BV/TV über den gesamten Beobachtungszeitraum die fast alle Materialgruppen betrifft, mit Ausnahme der nicht validen Messungen für PHB3%ZrO₂+10%Herafill und der nur zum 6-Monats-Zeitpunkt untersuchten PHBnativ-Gruppe (vgl. Abb. 10). Die 3-Monats- und 6-Monats-Schnittbilder der PHB3%ZrO₂+10%Herafill®-Gruppe sowie die Schnittbilder der PHBnativ-Gruppe, wiesen infolge technischer Probleme mit dem μ CT Artefakte auf, die die Auswertung unmöglich machten. Folglich wurden diese Gruppen insgesamt von der vergleichenden statistischen Analyse ausgenommen.

5.3.1 Auswirkungen von Herafill® und ZrO₂ auf BV/TV im Vergleich mit WZ21 und Implikationen des POT

Die vergleichende Analyse von PHB3%ZrO₂ mit PHB3%ZrO₂+30%Herafill® und PHB30%Herafill® mit PHB3%ZrO₂+30%Herafill® (vgl. 4.2 und 4.3) zeigt, dass sich die Komponenten ZrO₂ beziehungsweise Herafill® beide gleichermaßen positiv auf den Knochenanwuchs auswirken. Die Kombination beider Stoffe scheint jedoch den günstigsten Effekt auf den Knochenanwuchs zu haben.

Die kontinuierlich abnehmenden relativen und absoluten Knochenvolumina und die gleichzeitig sukzessive zunehmenden Werte für σ_u und der somit mangelnde prädiktive Wert des Quotienten BV/TV hinsichtlich der mechanischen Stabilität werfen allerdings die Frage nach der Qualität des gemessenen Knochens und dessen osseointegrativer Funktion auf.

Nachdem bekannt ist, dass Mikrobewegungen einen Stimulus für die Ausbildung eines Kallus darstellen [20-22,69], wäre der geringe Elastizitätsmodul der PHB basierten Implantate von circa 8 GPa und die unfixierte Einbringung des transkortikalen Implantats die beide gleichermaßen Mikrobewegungen in der Knochenheilungs-Zone des BII zulassen eine denkbare Erklärung für die durchweg hohen BV/TV-Werte dieser Material-Gruppen im Sinne einer überschießenden Kallus-Bildung.

Wie unter 1.2 angesprochen betrug die für das Einbringen des Implantates durchgeführte Osteotomie durchschnittlich nur 60% des Knochenquerschnittes und bot damit prinzipiell eine ausreichende mechanische Stabilität um sofort unter Last gesetzt zu werden. Nichtsdestotrotz muss man aber davon ausgehen, dass im BII unmittelbar nach der Operation zunächst keine absolut stabilen Verhältnisse herrschten. Die Ratten standen postoperativ und in den ersten Tagen danach unter dem Einfluss einer Schmerzmittelmedikation, die Tatsache dass sie beide Hinterläufe belasteten hat deshalb

keine Aussagekraft über die Stabilität. Außerdem wurde der eingebrachte Pin nur in das gebohrte Loch hineingeschoben ohne jegliche zusätzliche Fixierung. Das BII kann man deshalb wohl als Frakturspalt ohne absolute mechanische Stabilität betrachten. Bei relativer mechanischer Stabilität heilt der Knochen über den Weg der indirekten Knochenbruchheilung aus und es kommt zur Ausbildung eines Kallus [15,16,69].

Bei der Auswertung der Bilder fiel auf, dass der Knochenanbau um das Implantat an der medialen Kortikalis deutlich überproportional ist. Dieses Phänomen könnte entweder auf die, durch das Implantat veränderten, Druckverhältnisse unter Belastung des Knochens zurückzuführen sein, oder eben eine vermehrte Kallusbildung darstellen, wie man sie bei instabiler Frakturfixation beobachtet [15] (vgl. Abb. 6 und 7).

Histomorphometrische Untersuchungen haben gezeigt, dass beim Tiermodell der Zenit der Kallushärtung normalerweise nach 14 Tagen erreicht ist [70]. Die sich anschließende Phase des Remodelling, in der der mineralisierte, harte Kallus durch Osteoklasten resorbiert wird und durch lamellaren Knochen ersetzt wird beginnt nach 3 bis 4 Wochen und nimmt Monate bis Jahre in Anspruch [71].

Es ist deshalb sehr wahrscheinlich, dass die in dieser Arbeit beobachtete kontinuierliche Abnahme des absoluten BV und des BV/TV Korrelat eines in Resorption befindlichen Kallus ist. Dafür spricht auch die Tatsache, dass BV/TV nicht mit σ_u korreliert. Der POT ist eine etablierte Methode für die Evaluation mechanischer Stabilität [59,60]. Die Tatsache, dass BV/TV und σ_u in der Verlaufsbeobachtung zwischen Monat 3 und 6 für WZ21 und PHB3%ZrO₂+30%Heracore® sogar gegenläufig sind (BV/TV nimmt ab; σ_u nimmt zu) unterstützt die Hypothese laut derer es sich bei den gemessenen Knochenvolumina zu Beginn des Beobachtungszeitraums größtenteils um mechanisch minderwertigeren harten Kallus handeln könnte, der vor allem aus Geflechtknochen besteht [15,16].

5.3.2 Auswirkungen der Resorptionsgeschwindigkeit auf BV/TV und σ_u

Eine weitere Erklärung warum die Parameter BV/TV und σ_u bei der vergleichenden Analyse der einzelnen Mess-Zeitpunkte kaum miteinander korrelierten, könnte in der Dichte der MgL und der angewandten Mess-Methode liegen. Knochengewebe, das innerhalb des Initialen Durchmessers des Pins von 1,6mm liegt, kann aus zwei Gründen von der angewandten Methode nicht detektiert werden: Zum einen, da Mg und Knochen annähernd gleiche Dichte-Werte aufweisen (vgl. Abb. 16) und durch Anwendung eines Thresholds damit schwer zu unterscheiden sind (vgl. 3.6.2). Zum anderen, da der

Algorithmus des Messverfahrens eine Erfassung von BV innerhalb der Abmessungen des Pins, der dem GW2 entspricht, nicht zulässt.

Die Schnittbilder der WZ21-Gruppe vom 9-Monatszeitpunkt zeigten der angewandten Methodik deshalb ihre Grenzen auf. Sie konnten mithilfe des unter 3.6.2 geschilderten Algorithmus nicht analysiert werden, da die Resorption oftmals schon so weit vorangeschritten war, dass sich der Pin im Schnittbild nicht mehr sicher abgrenzen ließ. Dieser Umstand wurde erschwert durch die dem Knochen ähnliche Dichte der MgL. Insgesamt musste also davon ausgegangen werden, dass die angewandte Mess-Methode bei diesen Aufnahmen, weder die ROI hätte erfassen können, noch in das poröse Implantat eingewachsene Osteone detektiert hätte. Die Schnittbilder vom 9-Monatszeitpunkt wurden daher allesamt von der Auswertung ausgeschlossen.

Es ist denkbar, dass sich diese Probleme auch schon auf die Scans des 3- bzw. 6-Monatszeitpunkts ausgewirkt haben. Nach Kraus et Al. zeigt der WZ21 Pin bereits 21,5 Wochen postoperativ eine 50% Degradation bezogen auf sein Ausgangsvolumen [49]. Man kann davon ausgehen, dass es im Rahmen einer 50%-Degradation zu einer ausgeprägten Porosität der Implantat-Oberfläche kommt (vgl. Abb. 16), die das Einwachsen von nicht erfassbarem Knochengewebe begünstigt und welche gleichzeitig Auswirkungen auf die Ergebnisse des POTs hat. Da in dieser Studie das Augenmerk auf den Materialien selbst und deren Dynamik im lebenden Knochengewebe lag, wurden ausschließlich Implantate mit glatten, unbehandelten Oberflächen verwendet, die sich hinsichtlich ihrer Topographie und chemischen Eigenschaften möglichst ähnlich sind. So sollte gewährleistet werden, dass die gemessenen Unterschiede hinsichtlich des Knochenanwachses, auch tatsächlich auf die verwendeten Materialien zurückzuführen sind, denn wie unter 1.4.2 erwähnt ist die Oberflächenbeschaffenheit eine Haupteinflussgröße auf die OI [53]. Im Gegensatz zu der MgL zeigen die PHB basierten Implantate eine sehr langsame Degradationsrate [6,35], was sich auch in unserer Versuchsreihe bestätigt. Dabei waren die PHB-Implantate nach 9 Monaten nur in sehr geringem Ausmaß resorbiert worden. Dementsprechend zeigten deren Oberflächen nur ein geringes Maß an Porosität. Der Vergleich der σ_u -Werte der kaum degradierten PHB-Pins mit dem WZ21-Pin ist deshalb hinfällig.

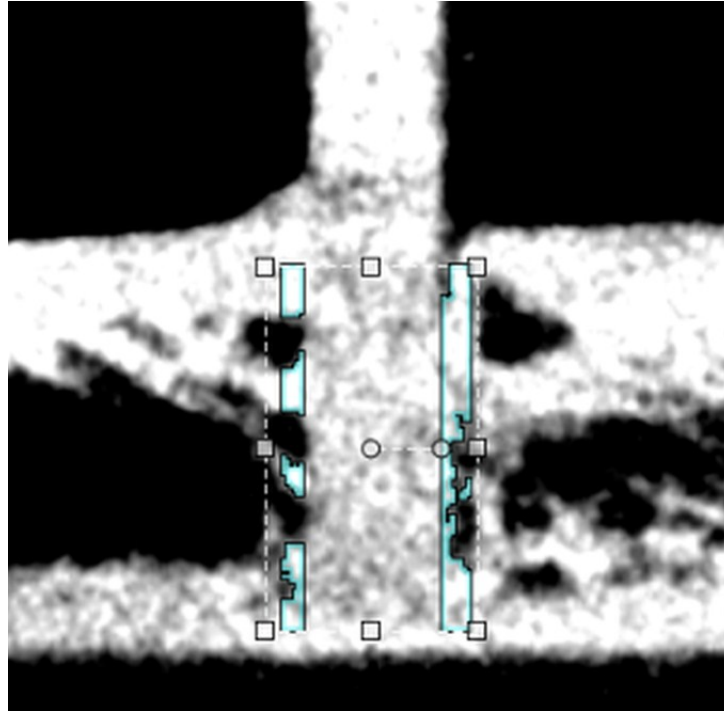


Abbildung 16: WZ21-Pin nach 6 Monaten

Abb. 16 zeigt einen WZ21-Pin der nach 6 Monaten bereits deutliche Inhomogenität aufweist.

Diese Beobachtungen lassen darauf schließen, dass die Erfassung des BV/TV im Falle von WZ21 unvollständig war und gleichzeitig σ_u im POT für WZ21 durch die im Vergleich zu PHB stark ausgeprägte Oberflächen-Aufrauhung im Zuge der Resorption beeinflusst worden ist. Die Vergleichbarkeit der σ_u der PHB-Pins mit WZ21 ist daher nicht gegeben und in gleicher Weise ist ausgehend von diesen Beobachtungen auch nicht mit einer Materialgruppen unabhängigen Korrelation der σ_u mit BV/TV zu rechnen.

5.4 Diskussion der Methodik

Angeichts der Resultate kann die eingangs zugrunde gelegte Hypothese - dass BV/TV bei in-vivo μ -CT-Messungen in einem Radius von $210\mu\text{m}$ um das Implantat mit der mechanischen Stabilität des BII korreliert – nicht bestätigt werden. Dieser unter 5.1 erwähnte Zusammenhang zwischen im μ CT gemessenen BV/TV und der σ_u in POTs ließ sich in dieser Arbeit, mit Ausnahme der 3-Monats-Messungen, nicht herstellen [57]. Als mögliche Erklärung für die mangelnde Korrelation ist neben der erwähnten überschießenden Kallus-Bildung und der mit der Resorption einhergehenden Oberflächenveränderung auch die in-vivo Bildgebung zu sehen. In dieser Hinsicht bestätigen sich in dieser Arbeit die Beobachtungen von Stoppie et al., die keinen Zusammenhang zwischen dem peri-implantärem Knochenvolumen aus in-vivo-Scans und histologischen Schnitten nachweisen konnten [58].

Darüber hinaus sind auch die Größe der ROI mit einem Radius von $210\mu\text{m}$ und die Auflösung von $35\mu\text{m}/\text{Voxel}$, die beide im Zusammenhang mit der in-vivo Bildgebung stehen, als problematisch anzusehen. Andere Studien zur μCT basierten Messung des BV/TV (alle in-vitro), die allesamt eine positive Korrelation zwischen mechanischer Stabilität und BV/TV nachweisen konnten verwendeten ROIs mit unterschiedlich großen Radien: $24\text{-}240\mu\text{m}$ (Auflösung: $8\mu\text{m}/\text{Voxel}$) [56]; $100\mu\text{m}$ (Auflösung: $20\mu\text{m}$) [50]; $96\mu\text{m}$ (Auflösung: $16\mu\text{m}/\text{Voxel}$) [57];

Die Frage ab welcher Nähe zum Implantat Knochengewebe tatsächlich mit Sicherheit in Kontakt zu diesem steht und deshalb zur OI und damit zur mechanischen Stabilität des BII beiträgt [1,2,51] ist ausgehend von den Ergebnissen dieser Arbeit und der aktuellen Studienlage zu diesem Thema nicht mit Sicherheit zu beantworten. So gibt es beispielsweise eine Studie die im Vergleich zu den oben genannten scheinbar konträre Zusammenhänge postuliert: Ratten wurden auf Höhe der proximalen Tibia mit Implantaten versorgt, nach einer sechswöchigen Einheilungsphase geopfert und mithilfe einer bildgestützten Bruchanalyse untersucht. Bei mechanischer Belastung des BII lag die Bruchstelle der knöchernen Verankerung in einer Distanz von $0,5$ bis 1mm zum Implantat [72]. Diese Beobachtungen gelten prinzipiell für die Spongiosa des Rattenknochens und es ist fraglich inwieweit sie sich auf die Kortikalis anwenden lassen. Aber auch andere Studienautoren haben ähnliche Beobachtungen gemacht, so berichten beispielsweise Liu et al., dass die, beim POT, aus dem BII herausgeschobenen Knochen oftmals noch in Teilen knöcherne Auflagerungen aufwiesen. Die Autoren schließen daraus, dass die eigentliche Bruchzone außerhalb des BII gelegen sein muss [57].

6 Konklusion

Die tendenzielle Entwicklung von BV/TV ist mittels in-vivo μCT gut in ihrem Verlauf zu beobachten. Es zeigte sich im Tierversuch, dass der Zusatz von ZrO_2 und Herafill® einen positiven Effekt auf die osteokonduktiven Eigenschaften von PHB-Kompositen hat.

Valide Aussagen über den prädiktiven Wert von BV/TV für die mechanische Stabilität des BII können mithilfe dieses Parameters bei einem Versuchsaufbau, wie dem hier vorliegenden (transkortikaler nicht fixierter Pin) und der angewandten Methodik (in-vivo μCT , Dimension der ROI) jedoch nicht gemacht werden.

Um weitere Einsichten in den möglichen Zusammenhang zwischen dem Knochenanwuchs und der mechanischen Stabilität zu erhalten müsste man einerseits die Größe der ROI deutlich reduzieren beziehungsweise die Auflösung der μCT erhöhen. Eine aktuelle Arbeit

spricht in diesem Zusammenhang von einer Auflösung im Bereich zwischen 1 bis 3 μm pro Voxel [57]. Andererseits wäre auch eine genauere Kenntnis über die Resorptions-Geschwindigkeit des PHB und der damit einhergehenden Oberflächenveränderung sowie eine Beurteilung des BII unter dem Lichtmikroskop wünschenswert, um präzisere Aussagen über die Qualität der gemessenen Knochenvolumina treffen zu können.

7 Literaturverzeichnis

- [1] Brånemark PI, Hansson BO, Adell R, Breine U, Lindström J, Hallén O, Ohman A. Osseointegrated implants in the treatment of the edentulous jaw. Experience from a 10-year period. *Scand J Plast Reconstr Surg Suppl.* 1977;16:1-132.
In: Albrektsson T, Johansson C. Osteoinduction, osteoconduction and osseointegration. *Eur Spine J.* 2001 Oct;10 Suppl 2:S96-101.
- [2] Zarb G, Albrektsson T. Osseointegration – a requiem for the periodontal ligament? – An editorial. *Int J Periodont Rest Dentistry* 1991;11:88–91
In: Albrektsson T, Johansson C. Osteoinduction, osteoconduction and osseointegration. *Eur Spine J.* 2001 Oct;10 Suppl 2:S96-101.
- [3] Slongo TF. The potential for bioresorbable implants in paediatric fractures. *Injury.* 2002 Aug;33 Suppl 2:B84-7.
- [5] Navarro M, Michiardi A, Castaño O, Planell JA. Biomaterials in orthopaedics. *J R Soc Interface.* 2008 Oct 6;5(27):1137-58.
- [6] Amini AR, Wallace JS, Nukavarapu SP. Short-term and long-term effects of orthopedic biodegradable implants. *J Long Term Eff Med Implants.* 2011;21(2):93-122.
- [7] Staiger MP, Pietak AM, Huadmai J, Dias G. Magnesium and its alloys as orthopedic biomaterials: a review. *Biomaterials.* 2006 Mar;27(9):1728-34.
- [8] Lippert H (Hrsg.). *Lehrbuch Anatomie, 6. Auflage*, München: Urban & Fischer; 2011.
- [9] Wachtler F (Hrsg.). *Histologie Lehrbuch der Zytologie, Histologie und mikroskopischen Anatomie der Menschen, 7. Auflage*, Wien: Facultas Universitätsverlag; 2005.
- [10] <http://commons.wikimedia.org/wiki/File:EpiMetaDiaphyse.jpg> (am 05.06.2013)
- [11] Lüllmann-Rauch R (Hrsg.). *Taschenlehrbuch Histologie, 2. Auflage*, Stuttgart: Georg Thieme Verlag; 2006.
- [12] Junqueira LCU, Carneiro J, Gratzl M. *Histologie, 6. Auflage*, Heidelberg: Springer Medizin Verlag; 2005.
- [13] Speckmann EJ, Hescheler J, Köhling R. *Physiologie, 5. Auflage*, München: Urban & Fischer Verlag; 2008.
- [14] Schmidt RF, Lang F. *Physiologie des Menschen, 30. Auflage*, Heidelberg: Springer Medizin Verlag; 2007.

- [15] Wirth CJ, Mutschler W. Praxis der Orthopädie und Unfallchirurgie, 2. Auflage, Stuttgart: Georg Thieme Verlag; 2009.
- [16] Rüedi TP, Buckley RE, Moran CG. AO Prinzipien des Frakturmanagements, 2.Auflage, Stuttgart: Georg Thieme Verlag; 2008.
- [17] Rahn BA. Bone healing: histologic and physiologic concepts.
In: Fackelman GE (Hrsg.). Bone in clinical orthopedics, Stuttgart: Georg Thieme Verlag; 2002.
- [18] Shapiro F. Cortical bone repair. The relationship of the lacunar-canalicular system and intercellular gap junctions to the repair process. *Journal of Bone & Joint Surgery - American Volume*. 1988;70(7):1067–81.
- [19] Kaderly RE. Primary bone healing. *Seminars in Veterinary Medicine & Surgery (Small Animal)* 1991;6(1):21–5.
- [20] Baggott DG, Goodship AE, Lanyon LE. A quantitative assessment of compression plate fixation in vivo: an experimental study using the sheep radius. *J Biomech*. 1981;14(10):701-11.
- [21] Terjesen T. Bone healing after metal plate fixation and external fixation of the osteotomized rabbit tibia. *Acta Orthop Scand*. 1984 Feb;55(1):69-77.
- [22] Frost HM. A 2003 update of bone physiology and Wolff's Law for clinicians. *Angle Orthod*. 2004 Feb;74(1):3-15. Review.
- [23] Varonen H, Jousimaa J, Helin-Salmivaara A, Kunnamo I. Electronic primary care guidelines with links to Cochrane reviews--EBM Guidelines. *Fam Pract*. 2005 Aug; 22(4):465-9.
- [24] Keramaris NC, Calori GM, Nikolaou VS, Schemitsch EH, Giannoudis PV. Fracture vascularity and bone healing: a systematic review of the role of VEGF. *Injury*. 2008 Sep;39 Suppl 2:S45-57.
- [25] Breusch S, Clarius M, Mau H, Sabo D. *Klinikleitfaden Orthopädie Unfallchirurgie*, 6. Auflage, München: Urban & Fischer; 2009.
- [26] Scharf HP, Rüter A, Pohlemann T, Marzi I, Kohn D, Günther KP. *Orthopädie und Unfallchirurgie*, 2. Auflage, München: Urban & Fischer Verlag; 2011.
- [27] Böstman O, Pihlajamäki H. Routine implant removal after fracture surgery: a potentially reducible consumer of hospital resources in trauma units. *J Trauma*. 1996 Nov;41(5):846-9.

- [28] Rokkanen PU, Böstman O, Hirvensalo E, Mäkelä EA, Partio EK, Pätäälä H, Vainionpää SI, Vihtonen K, Törmälä P. Bioabsorbable fixation in orthopaedic surgery and traumatology. *Biomaterials*. 2000 Dec;21(24):2607-13.
- [29] Mittal R, Morley J, Dinopoulos H, Drakoulakis EG, Vermani E, Giannoudis PV. Use of bio-resorbable implants for stabilisation of distal radius fractures: the United Kingdom patients' perspective. *Injury*. 2005 Feb;36(2):333-8.
- [30] Hench LL, Polak JM. Third-generation biomedical materials. *Science*. 2002 Feb 8;295(5557):1014-7.
- [31] Hench LL, Wilson J. Surface-active biomaterials. *Science*. 1984 Nov 9;226(4675):630-6.
- [32] Ohtsuki C, Kamitakahara M, Miyazaki T. Bioactive ceramic-based materials with designed reactivity for bone tissue regeneration. *J R Soc Interface*. 2009 June 6; 6(supp3): S349–S360.
- [33] Reuter P, Myers F. Springer Lexikon Medizin, Berlin Heidelberg New York: Springer-Verlag; 2004.
- [34] Rupp B, Ebner C, Rossegger E, Slugovc C, Stelzer F, Wiesbrock F. UV-induced crosslinking of the biopolyester poly(3-hydroxybutyrate)-*co*-(3-hydroxyvalerate). *Green Chem.*, 2010,12, 1796-1802.
- [35] Ulery BD, Nair LS, Laurencin CT. Biomedical Applications of Biodegradable Polymers. *J Polym Sci B Polym Phys*. 2011 June 15; 49(12): 832–864.
- [36] Wei YH, Chen WC, Wu HS, Janarthanan OM. Biodegradable and biocompatible biomaterial, polyhydroxybutyrate, produced by an indigenous *Vibrio* sp. BM-1 isolated from marine environment. *Mar Drugs*. 2011;9(4):615-24.
- [37] Gogolewski S, Jovanovic M, Perren SM, Dillon JG, Hughes MK. Tissue response and in vivo degradation of selected polyhydroxyacids: polylactides (PLA), poly(3-hydroxybutyrate) (PHB), and poly(3-hydroxybutyrate-*co*-3-hydroxyvalerate) (PHB/VA). *J Biomed Mater Res*. 1993 Sep;27(9):1135-48.
- [38] Qu XH, Wu Q, Zhang KY, Chen GQ. In vivo studies of poly(3-hydroxybutyrate-*co*-3-hydroxyhexanoate) based polymers: biodegradation and tissue reactions. *Biomaterials*. 2006 Jul;27(19):3540-8.
- [39] Rokkanen PU, Böstman O, Hirvensalo E, Mäkelä EA, Partio EK, Pätäälä H, Vainionpää SI, Vihtonen K, Törmälä P. Bioabsorbable fixation in orthopaedic surgery and traumatology. *Biomaterials*. 2000 Dec;21(24):2607-13.

- [40] Franceschini M, Di Matteo A, Bösebeck H, Büchner H, Vogt S. Treatment of a chronic recurrent fistulized tibial osteomyelitis: administration of a novel antibiotic-loaded bone substitute combined with a pedicular muscle flap sealing. *Eur J Orthop Surg Traumatol.* 2012 Nov;22(Suppl 1):245-249.
- [41] Nuss K, Rechenberg B. Biocompatibility Issues with Modern Implants in Bone - A Review for Clinical Orthopedics. *Open Orthop J.* 2008; 2: 66–78.
- [42] Beuerlein MJ, McKee MD. Calcium sulfates: what is the evidence? *J Orthop Trauma.* 2010 Mar;24 Suppl 1:S46-51.
- [43] Peltier LF, Bickley EY, Lillo R, Thein MS. The Use of Plaster of Paris to Fill Defects in Bone. *Ann Surg.* 1957 July; 146(1): 61–69.
- [44] Falbe J(Hrsg.), Regitz M(Hrsg.). *Basislexikon Chemie*, Stuttgart: Georg Thieme Verlag; 1999.
- [45] Okuda Y, Noda M, Kono H, Miyamoto M, Sato H, Ban S. Radio-opacity of core materials for all-ceramic restorations. *Dent Mater J.* 2010 Jan;29(1):35-40.
- [46] Piconi C, Maccauro G. Zirconia as a ceramic biomaterial. *Biomaterials.* 1999 Jan;20(1):1-25.
- [47] Hänzi AC, Gerber I, Schinhammer M, Löffler JF, Uggowitzer PJ. On the in vitro and in vivo degradation performance and biological response of new biodegradable Mg-Y-Zn alloys. *Acta Biomater.* 2010 May;6(5):1824-33.
- [48] Witte F, Kaese V, Haferkamp H, Switzer E, Meyer-Lindenberg A, Wirth CJ, Windhagen H. In vivo corrosion of four magnesium alloys and the associated bone response. *Biomaterials.* 2005 Jun;26(17):3557-63.
- [49] Kraus T, Fischerauer SF, Hänzi AC, Uggowitzer PJ, Löffler JF, Weinberg AM. Magnesium alloys for temporary implants in osteosynthesis: in vivo studies of their degradation and interaction with bone. *Acta Biomater.* 2012 Mar;8(3):1230-8.
- [50] Castellani C, Lindtner RA, Hausbrandt P, Tschegg E, Stanzl-Tschegg SE, Zanoni G, Beck S, Weinberg AM. Bone-implant interface strength and osseointegration: Biodegradable magnesium alloy versus standard titanium control. *Acta Biomater.* 2011 Jan;7(1):432-40.
- [51] Albrektsson T, Berglundh T, Lindhe J, Karring Th, Lang NP. *Clinical Periodontology and Implant Dentistry.* 4. Blackwell Munksgaard, a Blackwell Publishing Company; Oxford UK; 2003. pp. 809–820.
- [52] Albrektsson T, Johansson C. Osteoinduction, osteoconduction and osseointegration. *Eur Spine J.* 2001 Oct;10 Suppl 2:S96-101.

- [53] Giavaresi G, Fini M, Cigada A, Chiesa R, Rondelli G, Rimondini L, Torricelli P, Aldini NN, Giardino R. Mechanical and histomorphometric evaluations of titanium implants with different surface treatments inserted in sheep cortical bone. *Biomaterials*. 2003 Apr;24(9):1583-94.
- [54] LeGeros RZ, Craig RG. Strategies to affect bone remodeling: osteointegration. *J Bone Miner Res*. 1993 Dec;8 Suppl 2:S583-96.
- [55] Plecko M, Sievert C, Andermatt D, Frigg R. Osseointegration and biocompatibility of different metal implants - a comparative experimental investigation in sheep. *BMC Musculoskelet Disord*. 2012; 13: 32.
- [56] Butz F, Ogawa T, Chang TL, Nishimura I. Three-dimensional bone-implant integration profiling using micro-computed tomography. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 2006 Sep-Oct;21(5):687-95.
- [57] Liu S, Broucek J, Viridi AS, Sumner DR. Limitations of using micro-computed tomography to predict bone-implant contact and mechanical fixation. *J Microsc*. 2012 Jan;245(1):34-42.
- [58] Stoppie N, Wevers M, Naert I. Feasibility of detecting trabecular bone around percutaneous titanium implants in rabbits by in vivo microfocus computed tomography. *J Microsc*. 2007 Oct;228(Pt 1):55-61.
- [59] Po-Chun Chang, Niklaus P. Lang, William V. Giannobile. Evaluation of Functional Dynamics during Osseointegration and Regeneration Associated with Oral Implants: A Review. *Clin Oral Implants Res*. 2010 January; 21(1): 1–12.
- [60] Berzins A, Shah B, Weinans H, Sumner DR. Nondestructive measurements of implant-bone interface shear modulus and effects of implant geometry in pull-out tests. *J Biomed Mater Res*. 1997 Mar 5;34(3):337-40.
- [61] Gupta A, Dhanraj M, Sivagami G. Status of surface treatment in endosseous implant: a literary overview. *Indian J Dent Res*. 2010 Jul-Sep;21(3):433-8.
- [62] Lavenus S, Louarn G, Layrolle P. Nanotechnology and dental implants. *Int J Biomater*. 2010;2010:915327.
- [63] Sykaras N, Iacopino AM, Marker VA, Triplett RG, Woody RD. Implant materials, designs, and surface topographies: their effect on osseointegration. A literature review. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 2000 Sep-Oct;15(5):675-90.
- [64] Pearce AI, Richards RG, Milz S, Schneider E, Pearce SG. Animal models for implant biomaterial research in bone: a review. *Eur Cell Mater*. 2007 Mar 2;13:1-10.

- [65] Celarek A, Kraus T, Tschegg EK, Fischerauer SF, Stanzl-Tschegg S, Uggowitzer PJ, Weinberg AM. PHB, crystalline and amorphous magnesium alloys: Promising candidates for bioresorbable osteosynthesis implants? *Materials Science and Engineering: C*, Volume 32, Issue 6, 1 August 2012, Pages 1503-1510.
- [66] Pizzoferrato A, Ciapetti G, Stea S, Cenni E, Arciola CR, Granchi D, Savarino L. Cell culture methods for testing biocompatibility. *Clin Mater*. 1994;15(3):173-90.
- [67] Schimandle JH, Boden SD. Spine update. The use of animal models to study spinal fusion. *Spine (Phila Pa 1976)*. 1994 Sep 1;19(17):1998-2006.
- [68] Bagi CM, Berryman E, Moalli MR. Comparative bone anatomy of commonly used laboratory animals: implications for drug discovery. *Comp Med*. 2011 Feb;61(1):76-85.
- [69] Marsell R, Einhorn TA. The biology of fracture healing. *Injury*. 2011 June; 42(6): 551–555.
- [70] Einhorn TA. The cell and molecular biology of fracture healing. *Clin Orthop Relat Res*. 1998 Oct;(355 Suppl):S7-21.
In: Marsell R, Einhorn TA. The biology of fracture healing. *Injury*. 2011 June; 42(6): 551–555.
- [71] Wendeberg B. Mineral metabolism of fractures of the tibia in man studied with external counting of Sr85. *Acta Orthop Scand Suppl*. 1961;52:1-79.
In: Marsell R, Einhorn TA. The biology of fracture healing. *Injury*. 2011 June; 42(6): 551-555.
- [72] Gabet Y, Kohavi D, Voide R, Mueller TL, Müller R, Bab I. Endosseous implant anchorage is critically dependent on mechanostructural determinants of peri-implant bone trabeculae. *J Bone Miner Res*. 2010 Mar;25(3):575-83.

