

# Untersuchungen über den klinischen Einsatz von Brushite- und Hydroxylapatit-Zement beim Schaf

A. Oberle<sup>1</sup>, F. Theiss<sup>1</sup>, M. Bohner<sup>3</sup>, J. Müller<sup>2</sup>, S. B. Kästner<sup>2</sup>, C. Frei<sup>4</sup>, I. Boecken<sup>4</sup>, K. Zlinszky<sup>1</sup>, S. Wunderlin<sup>1</sup>, J. A. Auer<sup>1</sup>, B. von Rechenberg<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Musculoskeletal Research Unit und <sup>2</sup>Veterinärnästhesiologie, Pferdeklīnik der Universität Zürich, <sup>3</sup>Dr. h.c. Robert Mathys Foundation, Bettlach, Schweiz, <sup>4</sup>Synthes Inc., Oberdorf, Schweiz

## Zusammenfassung

Für den klinischen Einsatz als synthetischer Knochenersatz wurde ein injizierbarer Brushite-(chronOS<sup>TM</sup>-Inject) und Hydroxylapatit-(Biobon<sup>®</sup>) Zement hinsichtlich ihrer praktischen Handhabung, Resorptionsfähigkeit, Knochenneubildung und Biokompatibilität in einem Bohrlochmodell bei 10 Schafen während eines Zeitraumes von 2, 4, 8, 16 und 24 Wochen miteinander verglichen. Die Zemente wurden in Bohrlöcher (Ø 8×13 mm) im proximalen und distalen Humerus sowie im Femur eingefüllt und die Proben anschliessend makroskopisch, radiologisch und mikroskopisch, inklusive histomorphometrisch ausgewertet. Die Zementfläche bei chronOS<sup>TM</sup>-Inject nahm nach 2 bis zu 24 Wochen kontinuierlich ab, gleich wie die Fläche der Granula. Umgekehrt nahm die Knochenneubildung von 2 bis zu 24 Wochen laufend zu. Bei Biobon<sup>®</sup> nahm die Zementfläche zwischen 2 und 24 Wochen deutlich weniger schnell ab und umgekehrt auch die Knochenneubildung weniger schnell zu. Beide Zemente wurden im Röhrenknochen integriert. chronOS<sup>TM</sup>-Inject zeigte gute Biokompatibilität und wurde innerhalb von 24 Wochen fast vollständig durch neuen Knochen ersetzt. Biobon<sup>®</sup> wurde weniger schnell abgebaut und anfänglich konnte eine leichte Entzündung und Knochenresorption im benachbarten Knochen beobachtet werden.

Schlüsselwörter: Brushite, Hydroxylapatit, Kalziumphosphat-Zemente

## Investigation about the clinical use of brushite- and hydroxylapatite-cement in sheep

For future clinical use as synthetic bone replacement, an injectable brushite-(chronOS<sup>TM</sup>-Inject) and hydroxylapatite-(Biobon<sup>®</sup>) cement were compared in a drill hole model in 10 sheep over time at 2, 4, 6, 8, 16 and 24 weeks. Results were compared regarding their practical use, biocompatibility, resorption mechanism and subsequent new bone formation. The cements were filled into drill holes (Ø 8×13mm) of the proximal and distal humerus, and femur and the samples evaluated macroscopically, radiologically and microscopically including histomorphometrical quantification of percentages of new bone, fibrous tissue and remnants of cements. The cement area decreased continuously from 2 to 24 weeks with chronOS<sup>TM</sup>-Inject, as well as the area of granules. Inversely, the subsequent new bone formation increased from 2–24 weeks accordingly. With Biobon<sup>®</sup> the cement area decreased slower between 2 and 24 weeks, and the new bone formation was less. Both cements were well integrated into the bone in long bones. chronOS<sup>TM</sup>-Inject demonstrated good biocompatibility and was almost completely replaced through bone within 24 weeks. Biobon<sup>®</sup> was resorbed considerably slower and initially a slight inflammatory reaction including bone resorption was observed within the adjacent host bone.

Keywords: brushite, hydroxylapatite, calciumphosphate-cements

## Einleitung

Nicht-keramische kalziumphosphathaltige, injizierbare Knochenzemente werden als attraktive Alternative zu vorgeformten Keramiken als synthetischen Knochenersatz für Röhrenknochen vorgeschlagen und wurden experimentell und klinisch bereits erfolgreich verwendet (Sarkar et al., 2001; Linhart et al.,

2003; Apelt et al., 2004). Sie werden eingeteilt in Apatit- und Brushite- Kalziumphosphat- Zemente (CPC) und entstehen durch Mischen eines Kalzium-Phosphat- Pulvers mit einer wässrigen Komponente (z.B. Natriumchlorid Lösung). Der Apatit-Zement hat entweder ein mikrokristallines Hydroxylapatit

(PHA) (z.B. Biobon®) oder ein Karbonatapatit (z.B. Norian SRS®) als Endprodukt zur Folge (Bohner, 2000), während das Ergebnis beim Brushite-Zement nach der Aushärtung aus einem Dikalziumphosphatdihydrat (DCPD) besteht. Dabei haben *in vivo* Studien beim Schaf gezeigt, dass sich DCPD über die Zeit entweder in PHA umwandelt oder abgebaut (Constantz et al., 1998; Bohner et al., 2003) und durch neuen Knochen ersetzt wird (Munting et al., 1993).

PHA weist eine relativ lange Abbindezeit auf, die jedoch durch weniger Flüssigkeitszugabe oder durch Zusätze wie z.B. Phosphorsäure oder PHA-Partikel verkürzt werden kann (Bohner, 2000). Der DCPD-Zement härtet innerhalb von 30–60 Sekunden aus. Allerdings kann die Aushärtungszeit durch Zusätze von Pyrophosphat oder Sulfationen beliebig verlängert werden (Mirtchi et al., 1989; Bohner, 1996). Der pH-Wert spielt beim Ausfällen und Härten eine bedeutende Rolle. Die DCPD-Zementpaste benötigt einen pH-Wert unter 6 (Bryant und Elliott, 1994), währenddessen die PHA-Zementpaste bei einem pH-Wert von 7 ausfällt (Bohner, 2000). Nach dem Aushärten stellt sich das Säure-Base-Gleichgewicht ein (Bohner et al., 1997). Beide Zemente sind biokompatibel, wobei der PHA-Zement, wenn er nicht richtig aushärtet (Miyamoto et al., 1995), und der DCPD-Zement bei Anwendung grosser Mengen Zementpaste (Flautre et al., 1999a) Entzündungsreaktionen hervorrufen kann. Dabei wandelt sich DCPD in PHA um und Säure wird freigesetzt. Die Umwandlung in PHA kann jedoch durch Zugabe von Magnesium-Ionen verzögert oder verhindert werden (Bohner und Matter, 1999).

Die mechanischen Eigenschaften des PHA- und DCPD-Zementes nehmen mit dem Zeitpunkt des Aushärtens stetig zu (Miyamoto et al., 1995), wobei der DCPD-Zement eine geringere Zug- und Druckfestigkeit als der PHA-Zement besitzt (Charriere et al., 2001). Die Zug- und Druckfestigkeit des DCPD-Zementes nimmt vom Zeitpunkt des Aushärtens ab und erst mit dem Knochenwachstum wieder zu (Ikenaga et al., 1998). Wird DCPD alleine als Zementmatrix verwendet, kann die Abbaurate zu schnell sein. Die Bildung von hauptsächlich unreifem Geflechtknochen kann die Folge sein. Als Lösung für dieses Problem erwies sich die Zugabe von  $\beta$ -TCP-Granula als gutes Gerüst zur Knochenverankerung und Anregung zur Bildung von lamellärem Knochen (Ohura et al., 1996). Im Gegensatz dazu wird der PHA-Zement deutlich langsamer resorbiert (Charriere et al., 2001; Sarkar et al., 2001). Das Ziel dieser Studie war es einen DCPD-Zement durchsetzt mit  $\beta$ -TCP-Granula mit einem PHA-Knochenzement hinsichtlich der chirurgischen Handhabung, Resorptionsfähigkeit, sowie der Biokompatibilität und Knochenersatz

im Gewebe zu verschiedenen Zeitpunkten zu vergleichen.

## Tiere, Material und Methoden

### Tiere

Zehn ausgewachsene, weibliche Schafe im durchschnittlichen Alter von 4 Jahren (3–4 Jahre), mit einem Durchschnittsgewicht von 73 kg (55–91 kg) wurden als Versuchstiere verwendet. Die Verteilung der Zemente erfolgte randomisiert, indem in je 3 Bohrlöcher chronOs™-Inject und Biobon® eingefüllt wurden. Je 2 Leer-Löcher dienten zur Kontrolle (n = 8/Schaf). Alle Versuche wurden nach den gesetzlichen Bestimmungen des Tierschutzes durchgeführt (Appl. Nr. 81/2001).

### Zement

Als DCPC Zement wurde chronOS™-Inject (Synthes Inc.) und als PHA-Zement Biobon® (Biomet Merck) für die Versuche verwendet. chronOS™-Inject lag als Pulver in einer Mischkartusche vor (Abb. 1), bestehend aus Monokalziumphosphatmonohydrat (MCPM,  $\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ) und  $\beta$ -Trikalziumphosphat ( $\beta$ -TCP,  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ ). Zur Anwendung wurden 5 ml einer 0.5%-igen Hyaluronsäure [Vitrolife UK LTD, Herriot Watt Research Park, Edinburgh EH 14 4AP, Scotland] in die Kartusche injiziert, und mittels Rührteller 60 Sekunden lang gemischt. Die Mischkartusche wurde in eine Applikationspistole eingespannt und die fertige Zementmischung 3 Minuten nach Mischbeginn in das Bohrloch injiziert. Biobon®, bestehend aus Kalzium- und Phosphatsalzen wurde in einem elastischen Ballon geliefert. Das Anmischen des Knochenzementes erfolgte durch Injektion von Kochsalzlösung in den Ballon und 2-minütigem Kneten mit der Hand. Anschliessend

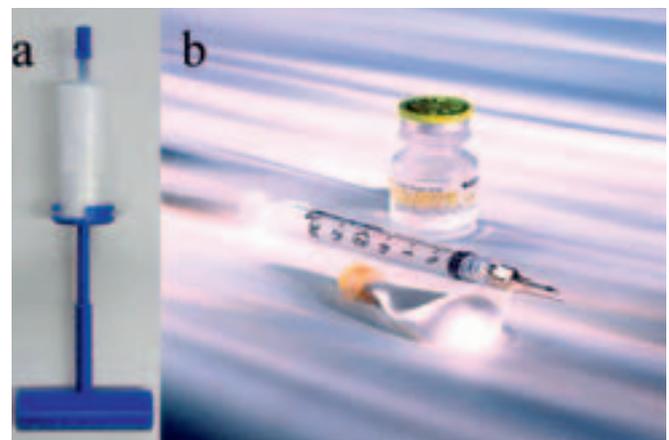


Abbildung 1: a) chronOs™Inject Kartusche mit Zementpulver und b) Biobon®-Ballon mit Zementpulver, Spritze und Kochsalzlösung. Beide Zemente werden unmittelbar vor dem Gebrauch angemischt und als Paste in den Knochendefekt gespritzt.

wurde das Gemisch entweder direkt, oder in eine Spritze umgefüllt und in den Defekt appliziert.

## Chirurgie

In Allgemeinaesthesia wurden den Schafen direkt über dem geplanten Defekt in der proximalen Metaphyse und distal in den Kondylen beider Humerus- und Femurknochen ca. 2–3 cm lange Hautinzisionen gesetzt. Die Bohrlöcher von 8 mm Durchmesser und 13 mm Länge wurden mit einem für diesen Versuch speziell angefertigten 8 mm Bohrer mit eingebauten Längen-Stopper standardisiert. Nach Applikation der Zemente und einem Aushärtungsvorgang von 12 Minuten für chronOs™-Inject und 3 Minuten für Biobon® wurde die Wunde routinemässig verschlossen.

## Verarbeitung der Proben

Je zwei Schafe wurden nach 2, 4, 8, 16 und 24 Wochen getötet und die Bohrlöcher makroskopisch nach Sichtbarkeit des Zementes und Reaktionen des umliegenden Gewebes bewertet und dokumentiert (Minolta Dimage 7; Minolta Europe GmbH, Langenhagen, Deutschland). Anschliessend wurden von den Knochen Röntgenbilder (Faxitron X-Ray Systems; Hewlett Packard, Mc Minnville Division, Oregon, USA) angefertigt, bevor mit der Säge kleinere Knochenstücke mit den Bohrlöchern und dem umliegenden Knochengewebe für die Histologie zugeschnitten wurden. Die Proben wurden nach Dehydrierung in einer Serie von Alkohol (50–100%) und Entfetten in Xylol, in Methylmetacrylat [Leica® HistoDur, Leica Instruments GmbH, Germany] eingebettet (Engelhardt und Gasser, 1995; Apelt et al., 2004). Schleif- (30–40 µm) und zusätzlich Dünnschnitte (5 µm) wurden hergestellt und entweder mit Toluidinblau Oberflächen-gefärbt (30–40 µm) oder mit von Kossa versilbert und mit McNeal eine Gegenfärbung vorgenommen.

## Auswertung

Abgesehen von einer qualitativen Beschreibung der beobachteten makroskopischen, radiologischen und histologischen Veränderungen wurde eine semi- und quantitative Auswertung der Proben vorgenommen. Dabei wurde für die semi-quantitative Auswertung ein Scoresystem erstellt (Tab. 1), bei dem anhand der Digitalbilder makroskopisch vergleichend die Entzündungsreaktion des Gewebes und die Sichtbarkeit des Zementes beurteilt sowie das Vorhandensein der Resorptionszone und des Zementes radiologisch bewertet wurde. Das Scoresystem diente ebenfalls zur mikroskopischen Erfassung der Entzündungsreaktion im Gewebe anhand des Vorhandenseins bestimmter

Zelltypen (Riesenzellen, Makrophagen), der Resorption des Zementes, Einlagerung von Bindegewebe und Art und Weise der Knochenneubildung. Die quantitative Auswertung innerhalb des ursprünglichen Knochendefektes wurde mittels histomorphometrischen Messungen an den Dickschnitten vorgenommen. Dafür wurden die digital erfassten Bilder (DC 200, Leica, Glattbrugg, Schweiz) zur besseren Unterscheidung der vorhandenen Zementmatrix, Granula im Falle von chronOs™-Inject, neu gebildetem Knochengewebe und Bindegewebe in der Resorptionszone in einem dafür geeigneten Computerprogramm bearbeitet (Adobe Photoshop® Elements, Version 2.0). Die einzelnen Phasen wurden eingefärbt und danach mittels einem Computerprogramm [Qwin®, Quips®, Leica, Glattbrugg, Schweiz] detektiert und deren Prozentanteil an der Gesamtfläche berechnet (Engelhardt und Gasser, 1995; Apelt et al., 2004). Jeder Dickschnitt wurde zweimal vermessen und der Mittelwert zur statistischen Analyse verwendet.

## Statistik

Die semi- und quantitativen Daten wurden mit einer faktoriellen Varianzanalyse [factorial ANOVA, Statview®, Abacus California, USA] analysiert, wobei die Zemente und die Kontrollen als unabhängige und die Versuchsdauer als abhängige Variablen gewählt wurde. Ein P-Wert von <0.05 wurde als statistisch signifikant erachtet.

## Ergebnisse

### Chirurgie

*Versuchstiere:* das Bohrlochmodell bewährte sich als Versuchsmodell in den meisten Fällen. Nur bei einem Schaf trat nach 2 Wochen eine Fraktur des rechten, distalen Humerus auf, worauf dieses Tier sofort getötet wurde. Bei dieser Operation wurde der Zugang zu weit kaudal gewählt. Nach Erwachen des Tieres und voller Belastung der Gliedmasse frakturierte der Knochen vom Bohrloch aus, wobei dieser Defekt eine Kontrolle ohne Zement darstellte. Um dies zu vermeiden entschieden sich die Operateure bei drei weiteren Tieren die Bohrung abzubrechen. Die Anzahl der Löcher mit Zementproben (n = 60) nahm dadurch nicht ab, sondern nur die Anzahl der Kontrollen, die jedoch immer noch der statistischen Mindestanzahl entsprachen (n = 16). Bei den sechs Schafen mit je zwei Kontrolllöchern ergaben sich in der Auswertung keine signifikanten Unterschiede.

*Verarbeitung des Zementes:* Das Mischen des chron-OST™-Inject in der Kartusche war zwar mit etwas Kraftaufwand verbunden, jedoch erfolgte das Ab-

brechen des Rührtellern und Einspannen der Mischkartusche in die Applikationspistole ohne Probleme. Die Konsistenz des Zementes war etwas klebrig, cremig-pastös und das Einfüllen in den Defekt gelang mühelos. Dabei mischte sich der Zement nicht mit dem Blut, sondern verdrängte es aus dem Loch. Durch die klebrig-pastöse Konsistenz verband sich der Zement sofort mit dem anliegenden Knochen. Das manuelle Kneten des Ballons beim Biobon® garantierte nicht in allen Fällen eine homogene Durchmischung des Zementpulvers und der flüssigen Komponente. Nach dem Abschneiden der Kappe des Ballons ergaben sich häufig Schwierigkeiten den Zement aus dem Ballon zu massieren, so dass entweder der Ballon vollständig eröffnet oder ein Spatel zur Hilfe genommen werden musste. Der Zement selbst hatte eine harte, krümelige Konsistenz, wodurch das Einfüllen in den Defekt, das Glattstreichen und die Verbindung mit dem umliegenden Knochen erschwert wurde. Im Gegensatz zu chronOS™-Inject führte das Vermischen von Biobon® mit Blut zu einer Erniedrigung der Viskosität, wodurch allerdings die Modellierbarkeit des Zementes verbessert wurde. Um alle Defekte zu füllen und der schnell erfolgenden Aushärtung zuvorzukommen, war eine rasche Applikation nötig.

### Makroskopische Auswertung (Tab. 1)

*Sichtbarkeit des Zementes:* Bis zu 2 Monaten waren alle Zemente, sowie auch die Kontrollen gut sichtbar. Danach wurden alle Proben mit Bindegewebe überwachsen und waren nicht mehr deutlich erkennbar, wobei dieser Vorgang bei den Proben mit chronOS™-Inject etwas schneller vonstatten ging.

*Reaktion des Gewebes:* Eine Rötung des umliegenden Gewebes, oder bei den Kontrollen innerhalb des ursprünglichen Defektes war anfänglich mit 2 Wochen bei allen Proben vorhanden. Bei chronOS™-Inject war die Rötung im Verhältnis zu Biobon® bereits nach 2 Wochen weniger ausgeprägt und nach 8 Wochen nicht mehr zu beobachten. Ein signifikanter Unterschied wurde zwischen der 4. und 16. ( $P = 0.048$ ) und der 4. und 24. Woche ( $P = 0.033$ ) gefunden. Demgegenüber wurde bei Biobon® eine mittelgradige Rötung in der Woche 2, mit abnehmender Tendenz bis zur 4. Woche und Vorhandensein noch im 6. Monat beobachtet. Im Laufe der Zeit ergaben sich keine signifikanten Veränderungen ( $P > 0.05$ ).

Radiologisch waren beide Zemente zu jeder Zeit sichtbar (Abb. 2). Der Durchmesser der Zementfläche von chronOS™-Inject nahm von der 8.–24. Woche ab und die Konturen wurden immer ungenauer. Eine Resorptionszone, welche innerhalb des Loches lag, war ab der 2. Woche teilweise sichtbar, nach dem ersten Monat deutlich ausgeprägt und ab der 16. Woche kaum vorhanden, was die signifikanten Unterschiede zwischen 2 und 4 ( $P = 0.003$ ) und 4 und 24 Wochen ( $P = 0.015$ ) verdeutlichen. Demgegenüber veränderte sich der Durchmesser der Zementfläche bei Biobon® weniger.

Eine *Resorptionszone*, welche sich im angrenzenden Knochengewebe um das ursprüngliche Loch bildete, war bis zu 8 Wochen radiologisch erkennbar. Signifikante Unterschiede wurden zwischen 8 und 16 ( $P = 0.007$ ) und 8 und 24 Wochen ( $P = 0.005$ ) gefunden.

Tabelle 1: Mittelwerte der semiquantitativen Beurteilung für die makroskopische Sichtbarkeit des Zementes, die Rötung des Gewebes, sowie die Sichtbarkeit des Zementes und die Resorptionszone im Röntgenbild (Scores: 0 = keine; 1 = geringgradig; 2 = mittelgradig; 3 = hochgradig; Radiologisch: 0 = nicht vorhanden; 1 = vorhanden).

Zementtyp	Zeit	Makroskopisch		Radiologisch	
		Sichtbarkeit Zement	Rötung	Sichtbarkeit Zement	Resorptionszone
C ch B	2 Wo	0	1	0	0
		1,2	0,6	1	0,16
		1,6	0,6	1	0,3
C ch B	4 Wo	0,25	1	0	0
		0,6	0,6	1	1
		1	1,3	0,6	0,3
C ch B	8 Wo	0	0,5	0	0
		0,5	0,5	1	0,6
		0,5	1,2	1	0,5
C ch B	16 Wo	0	0,3	0	0
		0,3	0,16	0,6	0,6
		0,5	0,5	0,83	0
C ch B	24 Wo	0	0,6	0	0
		0,6	0,16	0,6	0,3
		1	0,6	0,83	0

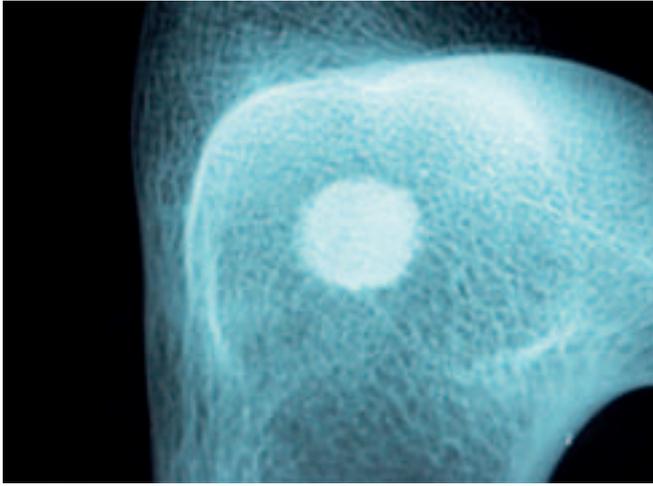


Abbildung 2: Röntgenbild proximaler Humerus: Biobon® nach 24 Wochen ist immer noch gut erkennbar.

### Histologie

**Qualitative und semi-quantitative Auswertung:** Die Kontrolllöcher waren zu keinem der Zeitpunkte vollständig mit neuem Knochen ausgefüllt. Vielmehr waren sie nach 2 Wochen zu zwei Dritteln mit Bindegewebe (bzw. spindelförmigen Zellen) gefüllt, was sich über den Lauf der Zeit nur wenig veränderte. Von der Peripherie her wurde in den meisten Fällen nach 8–16 Wochen ein Knochensaum beobachtet, der sich langsam und zum Teil auch unterschiedlich gegen das Zentrum des ursprünglichen Defektes vorschob.

Bei chronOSTM-Inject zeigte sich bereits 2 Wochen nach der Operation am Rand der Löcher ein schmaler Saum mit Osteoblastenaktivität, sowie eine

Resorptionszone an der Peripherie des Zementes, in der Bindegewebe und  $\beta$ -TCP-Granula vorherrschten (Abb. 3). Diese breitete sich gleichmässig mit 4–8 Wochen zum Zentrum hin aus, wobei der Abstand zwischen neuem Knochen und dem Zement sehr gering war. Resorbiert wurde vor allem die Brushite-Matrix, während die langsamer sich resorbierenden  $\beta$ -TCP-Granula von neuem Knochen umwachsen wurden und dabei als Kristallisationspunkte dienten. Nach 16–24 Wochen war der Zement zu zwei Dritteln resorbiert. In der Resorptionszone zwischen Zement und Knochenrand wurden zu allen Zeitpunkten vor allem Makrophagen beobachtet, deren Zytoplasma mit Zementmaterial gefüllt und Zellkerne an die Peripherie der Zelle gedrängt waren. Bereits nach 4 Wochen konnte an den Defekträndern, aber auch innerhalb der Resorptionszone, vor allem in der Nähe der  $\beta$ -TCP Granula, Gewebe mit einem hohen Differenzierungsgrad in Richtung Osteoblasten und viele neue Osteoidinseln, die bis an den Zement heranreichten, beobachtet werden (Abb. 4). Nach 16 und 24 Wochen wurde die Farbe des Zementes im Kern deutlich dunkler angefärbt. Neu war, vom Rande des «Bohrloches» in Richtung auf das Zentrum des Defektes zu, bei den 24 Wochen-Proben ein Remodeling des neugebildeten Geflechts- zu lamellärem Knochen zu erkennen. Während die Makrophagen bei allen Zeitpunkten deutlich dominierten, waren multinukleäre Riesenzellen vor allem in der 2. Woche vorhanden und nahmen im Laufe der Zeit deutlich ab. In Abhängigkeit von der Zeit traten signifikante Unterschiede zwischen 2 Wochen und allen anderen Zeitpunkten auf ( $P < 0.0001$ ).

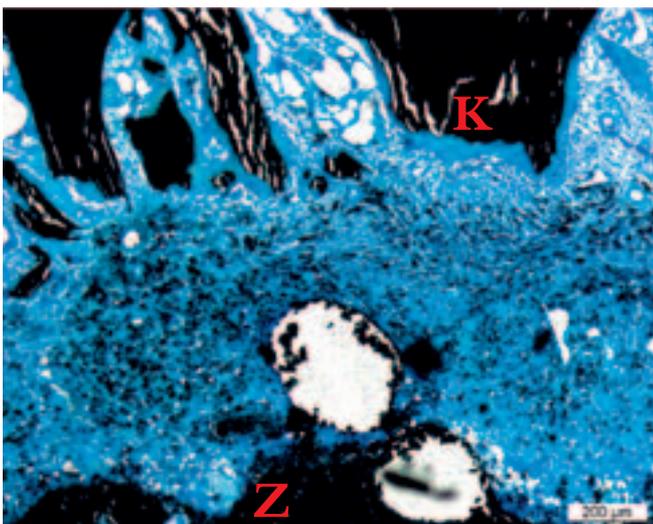


Abbildung 3: Resorptionszone (2 Wochen) bei chronOs™ Inject Applikation. Die leeren, kreisförmigen Defekte repräsentieren die  $\beta$ -TCP Granula, die beim Präparieren des Dünnschnittes (5  $\mu$ m, von Kossa/McNeal-Färbung) herausgelöst wurden. (K = Knochen, Z = Zement)

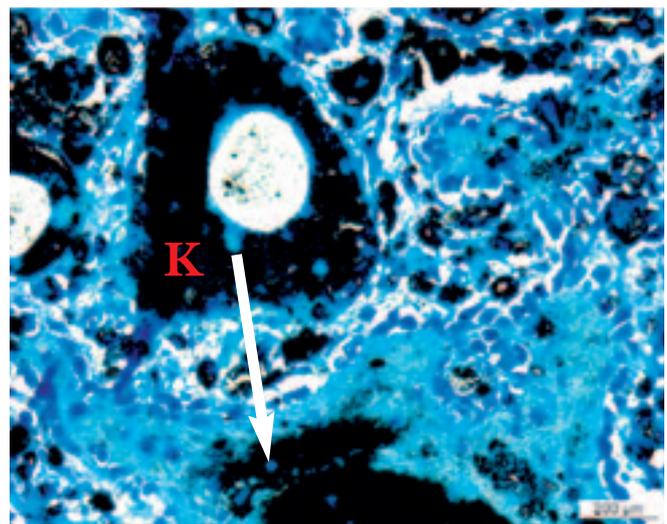


Abbildung 4: chronOs™ Inject nach 8 Wochen. Sichtbar sind neugebildetes, mineralisiertes Osteoid (weisser Pfeil) und neuer Knochen, der sich an ein  $\beta$ -TCP Granulum angelagert hat (weisse, runde Fläche). In der Resorptionszone sind Makrophagen und Osteoblasten Vorläuferzellen zu entdecken (K = Knochen, 5  $\mu$ m Dünnschnitt, von Kossa/McNeal Färbung).

Bei den Schafen, deren Löcher mit Biobon® aufgefüllt wurden, zeigte sich ein deutlich anderes Bild. Im Gegensatz zu chronOST™-Inject wurde vor allem in den frühen Gruppen keine Resorption des Zementes in der Peripherie beobachtet. Hingegen zeigte sich am Rand des ursprünglichen Knochendefektes im benachbarten Knochen zwischen 2 und 4 Wochen eine hohe Remodeling-Aktivität, die sich in Anwesenheit von einer Vielzahl von aktiven Osteoblastensäumen am ursprünglichen Defektrand manifestierte. Diese Remodeling-Aktivität an der alten Knochenmatrix war ab der 8. Woche wieder verschwunden. Der Abbau des Biobon® Zementes gestaltete sich ebenfalls unterschiedlich. Die Biobon® Matrix wurde nicht von der Peripherie zum Zentrum hin abgebaut, sondern es entstanden Zementspalten, in welche Bindegewebe einwuchs. Im weiteren Verlauf nahm die Zahl der Risse weiter zu, doch insgesamt wurde der Zement weiterhin nur langsam resorbiert (Abb. 5). Deutliche Unterschiede von Biobon® traten auch bei der Art des Zementabbaus und dem Auftreten der verschiedenen Zelltypen im Vergleich zu chronOST™-Inject zutage. Während bei chronOST™-Inject der Abbau eindeutig durch Makrophagen vorgenommen wurde, konnten bei Biobon® einzelne Osteoklasten im Gebiet des mineralisierten Knochens erstmals nach 4 Wochen beobachtet werden. Die Unterschiede zwischen den zwei Zementtypen hinsichtlich des Auftretens von Makrophagen waren zu jedem Zeitpunkt hoch signifikant ( $P < 0.05$ ). Osteoklasten wurden vor allem in den Rissen des Zementes direkt auf der mineralisierten Zementoberfläche, zusammen mit fibrösem Gewebe und vermehrt auch grossen

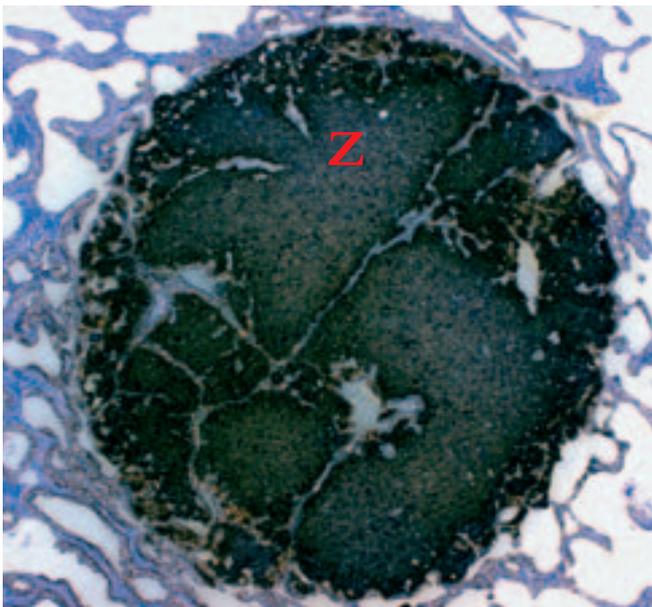


Abbildung 5: Dickschnitt (30–40 µm) eines Biobon® Zementes nach 16 Wochen (Toluidinblau-Färbung). Erkennbar sind die Zementspalten (Z = Zement), wo Bindegewebe eingewachsen und nur wenig neuer Knochen vorhanden ist. In der Peripherie wurde nur wenig Zement abgebaut. K = Knochen, Z = Zement.

Gefässen, gefunden. Einige Fremdkörperriesenzellen wurden bei den frühen Zeitpunkten, nach 2 und 4 Wochen vor allem in der Peripherie im benachbarten Knochen beobachtet. Nur bei der 16-Wochen Gruppe wurden vereinzelt lymphozytenartige Zellen gefunden.

Entsprechend der langsamen Zementresorption war bei Biobon® die Bildung von neuem Knochen und neuen Osteoidsäumen viel geringer als bei chronOST™-Inject. Signifikante Unterschiede der Knochenneubildung der verschiedenen Zeitpunkte von Biobon® waren nur bei 2 und 16 ( $P = 0.011$ ), bei 4 und 24 ( $P = 0.017$ ) und bei 8 und 24 Wochen ( $P = 0.017$ ) vorhanden. An den wenigen Osteoidsäumen waren kaum Osteoblastenvorläuferzellen und Osteoblasten, aber an der mineralisierten Zementoberfläche auch bei späteren Zeitpunkten (16 und 24 Wochen) noch immer Osteoklasten vorhanden (Abb. 6).

### Quantitative Auswertung

In der Histomorphometrie (Tab. 2a und b) wurden die Mittelwerte der verschiedenen Flächen in mm<sup>2</sup> angegeben. Zum Zeitpunkt der Operation hatte das gebohrte Loch eine standardisierte Gesamtfläche von 50 mm<sup>2</sup>. Anhand der gemessenen Werte wurden die Prozentanteile der restlichen Zementmatrix, der  $\beta$ -TCP Granula bei chronOST™-Inject, des fibrösen Bindegewebes und des neu gebildeten Knochens bei beiden Zementtypen kalkuliert.

**Zementmatrix:** Die Anteile der histomorphometrisch gemessenen Zementfläche bei chronOST™-Inject waren signifikant unterschiedlich bei 2 und 4 ( $P = 0.006$ ), 2 und 8 ( $P = 0.02$ ), 2 und 16 ( $P = 0.001$ ) und zwischen allen Zeitpunkten und 24 Wochen ( $P < 0.0001$ ). Signifikante Unterschiede zwischen der Fläche der  $\beta$ -TCP Granula waren zwischen der 2.

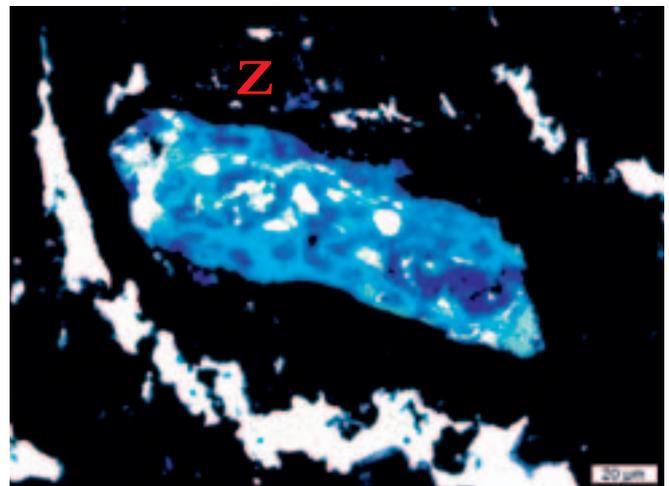
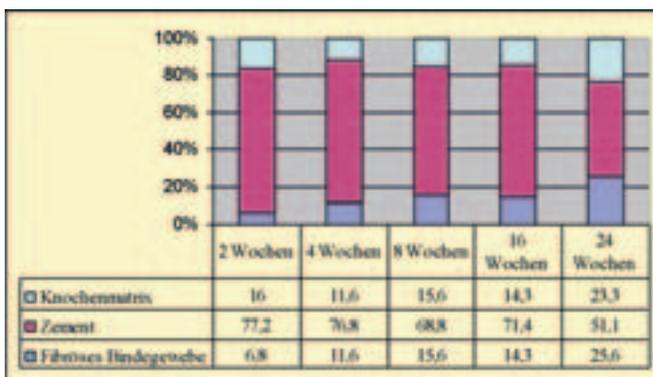
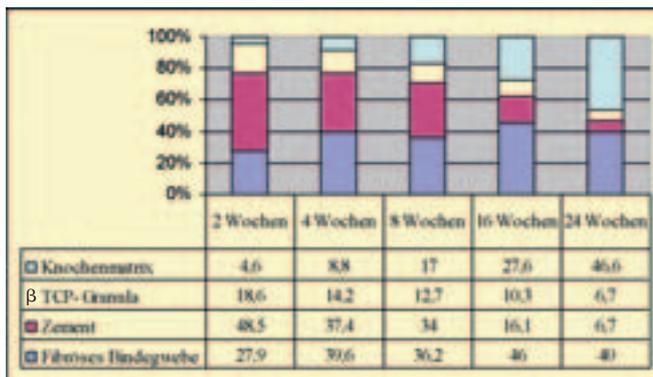


Abbildung 6: Osteoklasten an der Oberfläche des Zementes bei Biobon® nach 24 Wochen (weisser Pfeil) (Z = Zement, 5µm Dünnschnitt, von Kossa/McNeal Färbung).

Tabelle 2: Histomorphometrisch gemessene Flächen des verbliebenen Zementes, des neugebildeten Knochens und Bindegewebes im histologischen Schnitt in Prozenten von chronOST<sup>TM</sup>-Inject (2a) und Biobon<sup>®</sup>.



und 16. ( $P = 0.003$ ), 2. und 24. ( $P = 0.001$ ), 4. und 24. ( $P = 0.016$ ) und 8. und 24. Woche ( $P = 0.021$ ) zu verzeichnen. Die Zementfläche von Biobon<sup>®</sup> nahm während der Zeitdauer von 24 langsam aber stetig ab und variierte zwischen 77.2% bei 2 und 51.1% bei 24 Wochen. Daraus ergaben sich signifikante Unterschiede zu jedem Zeitpunkt zwischen den beiden Zementen ( $P < 0.05$ ).

**Fibröses Bindegewebe:** Der Anteil des fibrösen Bindegewebes bei chronOST<sup>TM</sup>-Inject schwankte stark innerhalb der einzelnen Zeitgruppen zwischen 27.9% bei 2 und 40% bei 24 Wochen, wobei die Unterschiede statistisch nicht signifikant waren. Bei Biobon<sup>®</sup> hingegen nahm diese Fläche kontinuierlich von der 2. (Mittelwert: 6.8%) bis zur 24. Woche (Mittelwert: 25%) zu, bei der zwischen der 2. und 24. Woche signifikante Unterschiede ( $P = 0.033$ ) gefunden wurden.

**Neue Knochenmatrix:** Bei chronOST<sup>TM</sup>-Inject nahm die neue Knochenmatrix stetig zu (4.6% bei 2, 8.8% bei 4, 17% bei 8, 27.6% bei 16 und 46% bei 24 Wochen). Die Knochenmatrix bei Biobon<sup>®</sup> stagnierte in ihrer Zunahme zwischen 16–23 % (16% bei 2, 11.6% bei 4, 15.6% bei 8, 14.3% bei 16 und 23.3% bei 24 Wochen).

Bei chronOST<sup>TM</sup>-Inject waren die Unterschiede mit Ausnahme der 2. und 4. Woche zwischen allen Zeit-

punkten signifikant, während bei Biobon<sup>®</sup> zwischen allen Zeitpunkten keine signifikanten Unterschiede vorhanden waren.

## Diskussion

In dieser Studie zeigte sich, dass sowohl chronOST<sup>TM</sup>-Inject wie auch Biobon<sup>®</sup> in Knochendefekte injiziert werden können, jedoch waren die Resorptionsrate, der Abbaumechanismus, wie auch die Biokompatibilität verschieden. chronOST<sup>TM</sup>-Inject wird deutlich schneller und vornehmlich durch Makrophagen abgebaut, während Biobon<sup>®</sup> nur langsam von Osteoklasten resorbiert wird. Eine leichte entzündliche Reaktion des umliegenden Gewebes war bei Biobon<sup>®</sup> etwas deutlicher ausgeprägt.

Schafe als Versuchstiere einzusetzen sowie ein Bohrlochmodell an den Röhrenknochen zu verwenden hat sich schon bei früheren Studien als sinnvoll erwiesen (Flautre et al., 1999b; Apelt et al., 2004), da die Knochenneubildung mit dem Knochenaufbau des Menschen, der Remodeling-Rate, sowie dem Gewicht vergleichbar sind (Nunamaker, 1998). Der Biobon<sup>®</sup> Zement schnitt im Gegensatz zu chronOST<sup>TM</sup>-Inject beim Misch- und Applikationshergang etwas schlechter ab, indem die gleichmässige Durchmischung der flüssigen und festen Komponente nicht immer zufriedenstellend gelang. Dabei zeigte sich, dass die Aushärtungszeit des Biobon<sup>®</sup> häufig zu kurz war, so dass es schwierig war, alle Defekte zu füllen. Dagegen war die Aushärtungszeit des chronOST<sup>TM</sup>-Inject eher lang, was aber in der klinischen Praxis keinen Nachteil darstellen muss. Vielmehr kann es dem Operateur bei unvorhergesehenen Schwierigkeiten helfen, die Probleme zu lösen und in Ruhe mit dem Zement weiterzuarbeiten. Die Vermengung des Biobon<sup>®</sup> mit Blut wurde zusammen mit dem weniger standardisierten Mischungsvorgang eher als Nachteil gewertet. Bei früher durchgeführten Studien mit demselben Zement wurden über diese Nachteile nicht berichtet (Sarkar et al., 2001).

Der hauptsächlichste Unterschied der beiden Zemente ergab sich im Abbaumechanismus des Zementes, sowohl in der Resorptionsrate, wie auch der im Abbau beteiligten Zellarten. Während chronOST<sup>TM</sup>-Inject vor allem durch Makrophagen aufgenommen und im Zytoplasma abgebaut wurde (Flautre et al., 1999b; Apelt et al., 2004), erfolgte die Resorptionsvorgang bei Biobon<sup>®</sup> vor allem durch Osteoklasten. Diese bestätigt frühere Befunde aus der Literatur, wo Zementreste in Biopsien noch nach 8 Monaten Implantationszeit beim Menschen gefunden wurden (Sarkar et al., 2001). Allerdings unterschieden sich die in dieser Studie erhobenen Befunde von der vor-

liegenden dahingehend, dass in den menschlichen Biopsien keine entzündlichen Reaktionen beobachtet wurden. Riesenzellen wurden in der vorliegenden, wie auch in einer anderen Studie mit cranialen Knochendefekten in demselben Labor beim Auffüllen mit Biobon® gefunden (Kümmerle, 2003). Das mag an dem zum Teil etwas unvollständigen Mischvorgang, in der Folge veränderten Aushärtungsvorgang und Verteilung der verschiedenen Zementkomponenten liegen. Das Auftreten von Fremdkörper-Riesenzellen spricht zumindest für eine entzündliche Reaktion auf den Aushärtungsvorgang beider Zemente, da sie im zeitlichen Ablauf in beiden Fällen sehr früh aufgetreten waren. Da die Riesenzellen bei Biobon® insgesamt langsamer verschwanden als bei chronOS™-Inject, lässt diese Tatsache auf eine etwas ausgeprägtere Entzündungsreaktion schliessen. Makrophagen werden im Knochen zumindest nicht als Exponenten von Fremdkörperreaktionen, sondern eher für den Abbau von resorbierbaren Substanzen normal vorhandener Zellen angesehen (Lassus et al., 1998; Apelt et al., 2004). In beiden Zementen jedoch

war die anfängliche Reaktion des Gewebes sehr wenig ausgeprägt und dürfte für die klinische Applikation nur eine untergeordnete Rolle spielen.

Die Rate der Zementresorption, wie auch die mechanische Stabilität der Zemente wird für den Gebrauch in der Klinik jedoch eine grössere Bedeutung aufweisen. Die anfängliche, mechanische Stabilität wird vor allem in hoch belasteten Frakturen, je nach Lokalisation, von Wichtigkeit sein. Die mechanische Belastbarkeit der Zemente und des Knochens nach der Implantation wurde in der vorliegenden Studie nicht getestet. Die schnellere Resorption des chronOS™-Inject wird in situ jedoch durch den schnelleren Aufbau von neuem Knochen wahrscheinlich kompensiert werden können. Der klinische Erfolg beider Zemente dürfte nicht zuletzt von einem gut überdachten und gezielten Einsatz in klinischen Situationen abhängig sein. Zukünftige Studien sollten sich mit der mechanischen Belastbarkeit des Gewebes nach Einsatz dieser Art von Zementen und Lokalisation im Skelett beschäftigen.

#### **Etude sur l'emploi clinique de ciment au brushite et à l'hydroxylapatite chez le mouton**

On a comparé, en vue de leur utilisation clinique en tant que substitut synthétique de l'os, un ciment injectable au Brushite (chronOS™-Inject) et à l'Hydroxylapatite (Biobon®) quant à leur facilité d'utilisation, leur capacité de résorption, la formation d'os et la biocompatibilité, au moyen d'un modèle de forages osseux sur 10 moutons dans une période de 2, 4, 8, 16 et 24 semaines. Les ciments ont été injectés dans des trous ( $\varnothing 8 \times 13$  mm) forés dans l'humérus proximal et distal ainsi que dans le fémur et les échantillons ont ensuite été évalués macroscopiquement, radiologiquement et microscopiquement y compris histomorphométriquement. Avec le chronOS™-Inject, la surface du ciment diminuait continuellement à partir de 2 semaines jusqu'à 24 semaines de même que la surface des granules. Inversement la formation d'os augmentait constamment de la 2<sup>e</sup> à la 24<sup>e</sup> semaine. Avec le Biobon® la surface diminuait nettement plus lentement entre la 2<sup>e</sup> et la 24<sup>e</sup> semaine et, inversement, la formation d'os était moins rapide. Les deux ciments étaient intégrés dans l'os long, chronOS™-Inject montrait une bonne biocompatibilité et était presque entièrement remplacé en 24 semaines. Biobon® était résorbé plus lentement et on a pu constater une légère inflammation et une résorption osseuse dans l'os voisin.

#### **Studio sull'impiego clinico di cemento brushite e idrossilapatite nella pecora**

Per l'impiego clinico come sostituto sintetico dell'osso sono stati paragonati in 10 pecore per un periodo di 2, 4, 8, 16 e 24 settimane cemento a iniezione brushite (chronOS™) e idrossilapatite (Biobon®) a causa della praticità, la facoltà di assorbimento, la nuova formazione di ossa e la biocompatibilità in un modello forato. I cementi sono stati introdotti in fori ( $\varnothing 8 \times 13$  mm) nell'omero prossimale e distale e nel femore. Infine i campioni sono stati valutati in modo macroscopico, radiologico e microscopico incluso istomorfometrico. La superficie del cemento nell'iniezione con chronOS™ è diminuita dopo 2 settimane di continuo fino a 24 settimane allo stesso modo come la superficie del granulato. Al contrario la nuova formazione delle ossa è aumentata da 2 fino a 24 settimane di continuo. Nel caso del Biobon® la superficie del cemento tra 2 e 24 settimane è diminuita chiaramente meno velocemente e all'opposto anche la nuova formazione di ossa è aumentata in modo meno rapido. Entrambi i cementi sono stati integrati nell'osso tubolare. ChronOS™ iniettato ha mostrato una buona biocompatibilità ed è stato sostituito dal nuova osso quasi completamente durante le 24 settimane. Biobon® è stato eliminato meno velocemente e inizialmente è stata osservata una leggera infiammazione e un assorbimento dell'osso nelle ossa circostanti.

## Literatur

- Apelt D., Theiss F., El-Warrak A. O., Zlinszky K., Bettschart-Wolfisberger R., Bohner M., Matter S., Auer J. A. and von Rechenberg B.: In vivo behavior of three different injectable hydraulic calcium phosphate cements. *Biomaterials* 2004, 25: 1439–1451.
- Bohner M.: Effects of sulfate, pyrophosphate, and citrate ions on the physicochemical properties of cements made of b-tricalcium phosphate – phosphoric acid – water mixtures. *Journal of Material Science: Material in Medicine*, 1996.
- Bohner M.: Calcium orthophosphates in medicine: from ceramics to calcium phosphate cements. *Injury* 2000, 31: S D37–47.
- Bohner M., Lemaitre J. and Ring T.A.: Kinetics of Dissolution of beta-Tricalcium Phosphate. *J. Colloid Interface Sci.* 1997, 190: 37–48.
- Bohner M. and Matter S.: Brushite hydraulic cement stabilized with a magnesium salt. 1999, Switzerland.
- Bohner M., Theiss F., Apelt D., Hirsiger W., Houriet R., Rizzoli G., Gnos E., Frei C., Auer J.A. and von Rechenberg B.: Compositional changes of a dicalcium phosphate dihydrate cement after implantation in sheep. *Biomaterials* 2003, 24: 3463–3474.
- Bryant C.E. and Elliott J.: Nitric Oxide: Friend or Foe? *Equine Vet. Educ.* 1994, 6: 59–64.
- Charriere E., Terrazzoni S., Pittet C., Mordasini P., Dutoit M., Lemaitre J. and Zysset P.: Mechanical characterization of brushite and hydroxyapatite cements. *Biomaterials* 2001, 22: 2937–2945.
- Constantz B. R., Barr B. M., Ison I. C., Fulmer M. T., Baker J., McKinney L., Goodman S. B., Gunasekaran S., Delaney D. C., Ross J. and Poser R. D.: Histological, chemical, and crystallographic analysis of four calcium phosphate cements in different rabbit osseous sites. *J. Biomed. Mater. Res.* 1998, 43: 451–61.
- Engelhardt P. and Gasser J.A. (1995). LEICA HistoDur: A Resin Specifically Designed for the Histology of Mineralized Tissues. Leica Applications Brief. Switzerland, Sandoz Pharma LTD, Osteoporosis Research, 4002 Basel.
- Flautre B., Delecourt C., Blary M.-C., v. Landhuyt P., Lemaitre J. and Hardouin P.: Volume Effect on Biological Properties of a Calcium Phosphate Hydraulic Cement: Experimental Study in Sheep. *Bone*. 1999a, 25 (Suppl. 2): 355–395.
- Flautre B., Delecourt C., Blary M. C., Van Landuyt P., Lemaitre J. and Hardouin P.: Volume effect on biological properties of a calcium phosphate hydraulic cement: experimental study in sheep. *Bone*. 1999b, 25(Suppl 2): 35S–39S.
- Ikenaga M., Hardouin P., Lemaitre J., Andrianjatovo H. and Flautre B.: Biomechanical characterization of a biodegradable calcium phosphate hydraulic cement: A comparison with porous biphasic calcium phosphate ceramics. *J. of Biomed. Mater. Res.* 1998, 40: 139–144.
- Kümmerle J. M.: Experimentelle Studie über die Eignung eines neuen Brushite Kalziumphosphatzements für die kraniofaziale Knochenchirurgie anhand eines ovinen Modells der parietalen Kranioplastik und maxillären Augmentation. MSRU, Equine Hospital. Zurich, University of Zurich, 2003: 69.
- Lassus J., Salo J., Jiranek W., Santavirta S., Nevalainen J., Mänttinen M., Horak P. and Konttinen Y.: Macrophages Activation Results in Bone Resorption. *Clin. Orthop. Rel. Res.* 1998, 352: 7–15.
- Linhart W., Briem D., Schmitz N. D., Priemel M., Lehmann W. and Rueger J. M.: [Treatment of metaphyseal bone defects after fractures of the distal radius. Medium-term results using a calcium-phosphate cement (BIOBON)]. *Unfallchirurg.* 2003, 106: 618–24.
- Mirtchi A., Lemaitre J. and Terao N.: Calcium phosphate cements: study of the beta-tricalcium phosphate-monocalcium phosphate system. *Biomaterials* 1989, 10: 475–80.
- Miyamoto Y., Ishikawa K. and Fukao H.: In vivo setting behavior of fast-setting calcium phosphate cements. *Biomaterials* 1995, 10: 855–860.
- Munting E., Mirtchi A. and Lemaitre J.: Bone repair of defects filled with a phosphocalcic hydraulic cement: an in vivo study. *J. Mater. Sci. Mater. Med.* 1993, 4: 337–344.
- Nunamaker D.M.: Experimental models of fracture repair, *Clinical orthopaedics and related research*, 1998.
- Ohura K., Bohner M., Hardouin P., Lemaitre J., Pasquier G. and Flautre B.: Resorption of, and bone formation from, new beta-tricalcium phosphate-monocalcium phosphate cements: an in vivo study. *J. Biomed. Mater. Res.* 1996, 30: 193–200.
- Sarkar M. R., Wachter N., Patka P. and Kinzl L.: First Histological Observations on the Incorporation of a Novel Calcium Phosphate Bone Substitute Material in Human Cancellous Bone. *J. Biomed. Mater. Res.* 2001, 58: 329–334.

## Korrespondenzadresse

PD Dr. Brigitte von Rechenberg, MSRU,  
Pferdeklinik, Universität Zürich,  
Winterthurerstrasse 260, 8057 Zürich

Manuskripteingang: 5. Juni 2005  
Angenommen: 7. Juli 2005