

# Forschung · Wissenschaft Recherche · Science

**Editor-in-chief**  
**Chefredaktor**  
**Rédacteur en chef**  
Jürg Meyer, Basel

**Editors**  
**Redaktoren**  
**Rédacteurs**  
Urs Belser, Genève  
Rudolf Gmür, Zürich  
Peter Hotz, Bern

**Assistant Editor**  
**Redaktions-Assistent**  
**Rédacteur assistant**  
Tuomas Waltimo, Basel

## **Advisory board / Gutachtergremium / Comité de lecture**

T. Attin, Zürich  
P. Baehni, Genève  
J.-P. Bernard, Genève  
C.E. Besimo, Basel  
M. Bornstein, Bern  
D. Bosshardt, Bern  
S. Bouillaguet, Genève  
U. Brägger, Bern  
W. Buchalla, Zürich  
D. Buser, Bern  
M. Cattani, Genève  
B. Ciucchi, Genève  
K. Dula, Bern  
D. Ettl, Zürich  
G. Eyrich, Zürich  
A. Filippi, Basel  
J. Fischer, Zürich  
L.M. Gallo, Zürich  
U. Gebauer, Bern  
R. Glauser, Zürich  
W. Gnoinski, Zürich  
T. Göhring, Zürich  
K.W. Grätz, Zürich  
Ch. Hämmerle, Zürich

N. Hardt, Luzern  
T. Imfeld, Zürich  
K.H. Jäger, Basel  
J.-P. Joho, Genève  
R. Jung, Zürich  
S. Kiliaridis, Genève  
I. Krejci, Genève  
J.Th. Lambrecht, Basel  
N.P. Lang, Bern  
T. Lombardi, Genève  
H.U. Luder, Zürich  
A. Lussi, Bern  
H. Lüthy, Basel  
C. Marinello, Basel  
G. Menghini, Zürich  
R. Mericske-Stern, Bern  
J.-M. Meyer, Chêne-Bougeries  
T. Mitsiadis, Zürich  
A. Mombelli, Genève  
W. Mörmann, Zürich  
F. Müller, Genève  
S. Palla, Zürich  
S. Paul, Zürich  
T. Peltomäki, Zürich

M. Perrier, Lausanne  
B. Pjetursson, Bern  
M. Ramseier, Bern  
M. Richter, Genève  
H.F. Sailer, Zürich  
G. Salvi, Bern  
J. Samson, Genève  
U.P. Saxer, Zürich  
J.-P. Schatz, Genève  
S. Scherrer, Genève  
P.R. Schmidlin, Zürich  
P. Schüpbach, Horgen  
J. Türp, Basel  
H. van Waas, Zürich  
P. Velvart, Zürich  
T. von Arx, Bern  
F. Weber, Zürich  
R. Weiger, Basel  
A. Wichelhaus, Basel  
A. Wiskott, Genève  
M. Zehnder, Zürich  
H.F. Zeilhofer, Basel  
N.U. Zitzmann, Basel

**Publisher**  
**Herausgeber**  
**Editeur**  
Schweizerische Zahnärzte-Gesellschaft SSO  
Société Suisse d'Odonto-Stomatologie  
CH-3000 Bern 7

**Adresse der wissenschaftlichen Redaktion**  
Prof. Jürg Meyer  
Universitätskliniken für Zahnmedizin  
Institut für Präventivzahnmedizin und Orale Mikrobiologie  
Hebelstr. 3  
4056 Basel

# Histologischer Vergleich unterschiedlicher Biopolymere im enossalen Defekt

## Zusammenfassung

Ziel der vorliegenden tierexperimentellen Untersuchung an Göttinger Miniaturschweinen war es, das resorbierbare Biopolymer Ethisorb vergleichend mit dessen hydrolytisch ange-dauter Modifikation Ethisorb Rapid hinsichtlich der Degradations- bzw. knöchernen Substitutionseigenschaften zu unter-suchen. Dazu wurden die beiden Biopolymere mit bzw. ohne Spongiosazusätze vergleichend mit Leerdefekten in Tibiameta-physen von Göttinger Miniaturschweinen implantiert. Nach Ablauf der postimplantären Einheilungszeiten von sechs, 12, 26 und 52 Wochen erfolgte die Tötung der Tiere mit nachfol-gender Anfertigung von unentkalkten Knochentrenndünnschliff-präparaten und deren histomorphometrischer und -morpho-logischer Analyse.

Insgesamt nahm mit Zunahme der postimplantären Einhei-lungszeit die Trabekeldichte kontinuierlich ab. Die Implan-tation vom langsam degradierbaren, jedoch beschleunigt re-sorbierbaren Ethisorb führte im Vergleich zu Ethisorb Rapid und dem Leerdefekt histomorphometrisch zu statistisch signi-fikant höheren Trabekeldichten (Tuckey-Test,  $p \leq 0,05$ ) und histomorphologisch zu einer optimierten Knochenregenera-tion. Dagegen war Ethisorb Rapid beschleunigt degradierbar, aber verzögert resorbierbar. Polarisationsmikroskopisch war der Nachweis von Ethisorb bis zur 12. und von Ethisorb Rapid bis zur 26. Woche postimplantär möglich. Ethisorb war ein geeignetes Trägermaterial für autogene Spongiosachips im critical-size-defect der Tibia, sodass eine multilokuläre, d. h. polytope Knochenregeneration mit höheren Trabekeldichten erzielt werden konnte.

Schweiz Monatsschr Zahnmed 117: 720–727 (2007)

Schlüsselwörter: Biopolymer, Ethisorb, Trabekeldichte, Knochenregeneration, critical-size-defect

Zur Veröffentlichung angenommen: 19. April 2007

Korrespondenzadresse:

Dr. A. Nitsch

Klinik und Poliklinik für Neurochirurgie, Klinikum der Georg-August-Universität, Robert-Koch-Str. 40, 37075 Göttingen

E-Mail: axel.nitsch@gmx.de

Tel. +49 (0)551 398745, Fax +49 (0)551 398794

AXEL NITSCH<sup>1</sup>, HANS-ALBERT MERTEN<sup>2</sup>  
und RAPHAELA VERHEGGEN<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Klinik und Poliklinik für Neurochirurgie, Georg-August-Universität Göttingen

<sup>2</sup> Abteilung Kieferorthopädie, Medizinische Hochschule Hannover

## Einleitung

Zum Niveauegleich kleinflächiger Kontinuitätslücken des Schädeldachs bieten sich generell autogene Knochentransplan-tate an, die jedoch aufgrund von zahlreichen Nachteilen, z.B. Notwendigkeit zum Zweiteingriff und knöchernen Transplantat-resorptionen, die Suche nach alternativen Versorgungsmöglich-keiten beschleunigten (PROLO et al. 1984, GERLACH 2000). Als Alternative wird daher die Entwicklung von Knochensubstituten

unterschiedlichen Ursprungs, verschiedener Zusammensetzung, Gefügestruktur und Löslichkeit vorangetrieben, die zunehmend an Bedeutung gewinnen (MERTEN et al. 2003, SCHLEGEL et al. 2004, THORWARTH et al. 2004a u. b, NITSCH et al. 2005). Daher ist eine Einteilung in Knochenersatz- (KEM) und Knochenaufbaumaterialien (KAM) sinnvoll (MERTEN et al. 2003): Osteokonduktive KEM werden nach der Implantation knöchern integriert und geringfügig resorbiert, sodass im weiteren Heilungsverlauf ein funktioneller Fremdkörper *in situ* verbleibt, d.h. dass dieser aufgrund eines Volumen- und Formerhalts eine längerfristige Platzhalterfunktion einnimmt (MERTEN et al. 2003). Dagegen werden die in den Knochendefekt eingebrachten osteokonduktiven KAM vom regenerierenden Knochen substituiert, sodass eine biofunktionelle Adaptation sowie eine topographisch-anatomische *Restitutio ad integrum* resultiert. Als KAM stehen u.a. resorbierbare Biopolymere wie das in der vorliegenden Untersuchung verwendete synthetische Biopolymer Ethisorb (Ethisorb®, Fa. Ethicon, Norderstedt), ein filamentöses, dreidimensionales synthetisches Composite-Implantat (Verhältnis Polyglactin 910: Poly-p-dioxanon (PDS) = 7:1) auf der Grundlage von Polyglactin 910 (Verhältnis Polyglycolid:Polylactid = 9:1) und PDS, zur Verfügung. Aufgrund der differierenden Schmelzpunkte beider Biopolymere wird PDS bei seinem Schmelzpunkt von 100 °C auf Polyglactin, das bei 200 °C schmilzt, aufgeschmolzen, sodass eine punktuelle Verklebung beider Biopolymere resultiert (Abb. 1a). Nach der Definition von VERT et al. 1992 werden resorbierbare Polymere *in-vivo* enzymatisch bzw. nicht-enzymatisch degradiert, d.h. fragmentiert und resorbiert, wobei die entstehenden Abbauprodukte u.a. abhängig von der Molekülgröße renal filtriert bzw. über physiologische Zyklen, wie z.B. den Zitratzyklus, weitergehend metabolisiert werden (VERT et al. 1992, KRONENTHAL 1975). Zusätzlich beinhaltet die Resorption die vollständige Elimination des initial körperfremden Materials (VERT et al. 1992). Die Resorptionszeiten der Co-Polymere von Ethisorb werden für Polyglactin 910 (Vicryl®) mit 56 Tagen und von PDS mit 180 Tagen angegeben (JANK et al. 2003, BÜCHEL et al. 2005). Der Abbau des Biopolymers erfolgt neben der Hydrolyse über eine parallel ablaufende durch Histiozyten geprägte Gewebereaktion (MERTEN et al. 1997). Die hierbei anfallenden Polymerausgangssubstanzen, wie z.B. Glycolid und Lactid, können direkt mit dem Urin ausgeschieden oder in den Zitronensäurezyklus eingeschleust und dabei unter Energiegewinn zu Wasser und Kohlenstoffdioxid verstoffwechselt werden (BRANDT et al. 1984, AMECKE et al. 1992).

Ethisorb findet vielfältige Anwendungen, u.a. zur Knochendefektfüllung im spongiosen Lager (MERTEN et al. 1997), zum Duraverschluss bzw. -ersatz und zur Auffüllung von Bohrlochdefekten (BARBOLT et al. 2001, FILIPPI et al. 2000, SEIDL et al. 2000, VERHEGGEN et al. 1997), als Trägermaterial für diverse Zellen (FROSCH et al. 2005, GROGER et al. 2003, SCHIMMING & SCHMELZEISEN 2004, SCHMELZEISEN et al. 2002) sowie zur Nachblutungsprophylaxe in Zahnalveolen aufgrund der blutkoagel-stabilisierenden Wirkung (MERTEN et al. 2004). Ziel der vorliegenden Untersuchung war es, Ethisorb vergleichend mit Ethisorb Rapid, einer Ethisorb-Modifikation, hinsichtlich der Degradations- bzw. knöchernen Substitutionseigenschaften zu untersuchen.

## Material und Methode

An insgesamt 20 Göttinger Miniaturschweinen (Tierversuchsgenehmigungsnummer: X 330a-72241.123-2(44-6/96), Ministerium für Landwirtschaft und Forsten, Kiel) wurde unter aseptischen Kautelen beidseits an der *pars medialis* der proximalen

Tibiametaphyse ( $n_{\text{gesamt}} = 40$ ) jeweils ein critical-size-defect (CSD, Volumen: 3 ml) präpariert. Dieser wird *per definitionem* zeitlebens nicht knöchern durchbaut (SCHMITZ & HOLLINGER 1986). Zusätzlich wurde ein Kortikalisdeckel (Dimension: 10×20 mm), dessen Periost vollständig entfernt wurde, präpariert. Anschliessend erfolgte die Spongiosa-Entnahme, die Elektrokoagulation der *A. nutricia* sowie die Kürettage und Spülung der resultierenden fünfwandigen Tibiamarkhöhle, die aus den drei regenerationschwachen kortikalen sowie zwei regenerationsstarken medullären Anteilen bestand. Als Implantationsmaterialien, die wandständig und kompressionsfrei eingebracht wurden, dienten (jeweils zwei Defekte/Standzeit) das nur zu experimentellen Zwecken hergestellte Ethisorb Rapid, eine hydrolytisch angehaute Ethisorb-Modifikation (Abb. 1b) bzw. Ethisorb Rapid in Kombination mit autogenen Spongiosachips sowie Ethisorb bzw. Ethisorb in Kombination mit autogenen Spongiosachips sowie zur Kontrolle Leerdefekte (Tab. I). Hierbei wurden die bei der Kürettage des Tibiamarkraums anfallenden autogenen Spongiosachips mit den entsprechenden Biopolymeren im Verhältnis 1:1 gemischt und orthotop replantiert. Nach Abschluss der Implantation wurde der Kortikalisdeckel ebenfalls orthotop

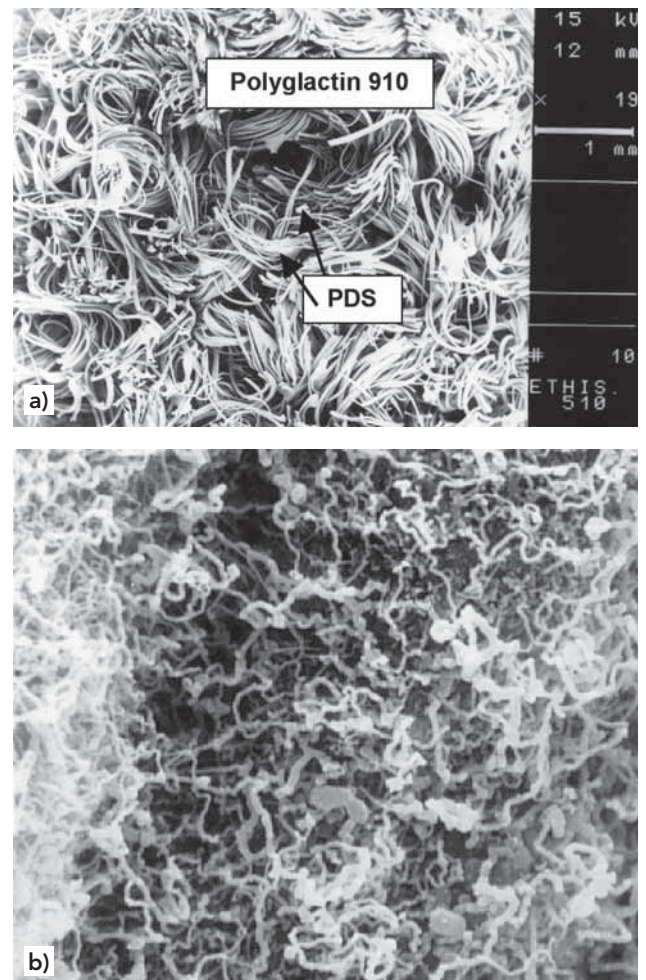


Abb. 1 a) Ethisorb imponiert als eine filamentäre Matrix mit makroporöser, schwammartiger Struktur (Rasterelektronenmikroskopie, Vergr. 19×); b) Ethisorb Rapid mit mikrofilamentärer Rauigkeit und hieraus resultierender Oberflächenvergrößerung der biopolymeren Fasern (Rasterelektronenmikroskopie, Vergr. 1500×).

Tab. I Probenverteilung

Material	Einheilungszeit			
	6 Wochen	12 Wochen	26 Wochen	52 Wochen
Leerdekt	n=2	n=2	n=2	n=2
Ethisorb Rapid	n=2	n=2	n=2	n=2
Ethisorb Rapid mit autogener Spongiosa	n=2	n=2	n=2	n=2
Ethisorb	n=2	n=2	n=2	n=2
Ethisorb mit autogener Spongiosa	n=2	n=2	n=2	n=2

plantiert und mit einer Osteosyntheseplatte (nach Luhr) stabilisiert, wobei die Osteosyntheseschrauben zusätzlich eine reproduzierbare postoperative sowie radiologische Defektlokalisierung ermöglichten. Im Anschluss erfolgte der schichtweise Wundverschluss der Haut mit Monocryl-Einzelknopfnah der Stärke 2-0. Um die Dynamik der Osteoidbildung zu erfassen, wurde postoperativ in entsprechenden Zeitintervallen eine polychrome Sequenzmarkierung durchgeführt. Im Anschluss an die Tötung der Miniaturschweine nach sechs, 12, 26 und 52 Wochen wurden

drei oder vier unentkalkte Knochentrenndünnschliff-Präparate aus der Mitte der jeweiligen Defektzentren angefertigt, wobei die Knochenregeneration histomorphometrisch hinsichtlich der Trabekeldichte (Anzahl Knochentrabekel/Markraumfläche) sowie histomorphologisch hinsichtlich der Knochenregeneration und des Biopolymerabbaus beurteilt wurde. Dabei erfolgte die histomorphometrische Auswertung (RECKER 1983) der Knochendünnschliffpräparate mittels eines Durchlichtmikroskops. Die generierten individuellen Bilddaten wurden über eine Digitalkamera, die mit dem Mikroskop verbunden war, direkt in einen PC-Rechner übertragen. Daraufhin erfolgte die Bildbearbeitung und -analyse mit der Software KS 300 (Zeiss, Göttingen). Die histomorphometrisch ermittelten Mittelwerte der drei bis vier Knochendünnschliffpräparate eines Defekts wurden zu einem Mittelwert verrechnet. Unterschiedliche Gewebestrukturen eines Präparats wurden anhand ihrer typischen Charakteristika identifiziert (z. B. Osteone des Knochens) und farblich selektiv markiert, sodass eine Berechnung des Flächeninhalts möglich war. Zusätzlich wurde zur Beurteilung der Mikroarchitektur der Knochenregenerate, des semiquantitativen Biopolymerabbaus sowie des Biopolymerabbaus in Zusammenhang mit inflammatorischen Reaktionen eine Score-Einteilung vorgenommen. Der Stichprobenumfang war bewusst auf 20 Tiere reduziert worden. Eine statistische Auswertung war nur möglich, da ähnliche Behandlungsgruppen zusammengefasst wurden (Tab. II).

Tab. II Multipler t-Test ( $p \leq 0,05$ ) für den Vergleich der Trabekeldichte (Anzahl Knochentrabekel/Markraumfläche [%]) der Gruppe 1 (Leerdekt), Gruppe 2 (Ethisorb Rapid und Ethisorb Rapid mit autogenen Spongiosachips) sowie Gruppe 3 (Ethisorb und Ethisorb mit autogenen Spongiosachips); ns: nicht signifikant; \*: signifikant

Material	Wochen	Gruppe 1				Gruppe 2				Gruppe 3			
		6	12	26	52	6	12	26	52	6	12	26	52
Gruppe 1	6		ns	*	*	ns	ns	ns	*	ns	ns	ns	ns
	12			ns	*	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
	26				ns	ns	ns	ns	ns	*	*	ns	ns
	52					ns	ns	ns	ns	*	*	ns	ns
Gruppe 2	6						ns	ns	*	ns	ns	ns	ns
	12							ns	ns	ns	ns	ns	ns
	26								ns	ns	ns	ns	ns
	52									*	*	ns	ns
Gruppe 3	6										ns	ns	*
	12											ns	*
	26												ns
	52												



Tab. III Mittelwerte des prozentualen Anteils Knochen trabekel/Markraumfläche ( $\hat{=}$  Trabekeldichte) zu den vier Standzeiten sechs, 12, 26 und 52 Wochen

Einheilungszeit Material	Standzeit			
	6 Wochen	12 Wochen	26 Wochen	52 Wochen
Leerdefekt	17,3	11,13	11,04	6,92
Ethisorb Rapid	16,67	14,69	9,58	9,11
Ethisorb Rapid mit autogener Spongiosa	17	16,27	16,02	14,42
Ethisorb	21,05	20,49	16,15	16,12
Ethisorb mit Spongiosa	21,64	21,04	17,45	16,5

**Resultate**

**Histomorphometrie**

Insgesamt nahm mit Zunahme der postimplantären Einheilungszeit von sechs bis 52 Wochen der prozentuale Anteil der Knochen trabekel/Markraumfläche, d.h. die Trabekeldichte für die jeweils untersuchten Defektfüllmaterialien im Rahmen der Knochenremodellation kontinuierlich ab, jedoch für die einzelnen, implantierten Biopolymere auf unterschiedlichem Niveau (Tab. III). Sechs Wochen postimplantär resultierten für den Leerdefekt, Ethisorb Rapid und für Ethisorb Rapid in Kombination mit autogenen Spongiosachips vergleichbare Trabekeldichten von 17,3%, 16,67% und 17%, die sich mit Fortschreiten der Knochenregeneration bis 52 Wochen postimplantär kontinuierlich auf 6,92%, 9,11% und 14,42% verringerten. Dagegen waren sechs Wochen postimplantär mit Ethisorb bzw. Ethisorb in Kombination mit autogenen Spongiosachips deutlich höhere Trabekeldichten von 21,05% bzw. 21,64% zu erzielen, die sich im Verlauf der Knochenregeneration bis 52 Wochen postimplantär auf 16,12% und 16,5% reduzierten.

Durch Bildung von Gruppen mit demselben Biopolymer, aber ungeachtet der Verwendung von autogenen Spongiosachips (Gruppe 1: Leerdefekt; Gruppe 2: Ethisorb Rapid und Ethisorb Rapid mit autogenen Spongiosachips; Gruppe 3: Ethisorb und Ethisorb mit autogenen Spongiosachips) resultierten beim paarweisen Vergleich (Tuckey-Test,  $p \leq 0,05$ ) folgende Differenzen zwischen den Gruppen: Gruppe 1 versus Gruppe 2 ( $p \geq 0,05$ ), Gruppe 1 versus Gruppe 3 ( $p \leq 0,05$ ), Gruppe 2 versus Gruppe 3 ( $p \leq 0,05$ ).

Die Gruppe 2 (Mittelwert:  $15,2 \pm$  Standardabweichung:  $4,28\%$ ) wies gegenüber der Gruppe 1 ( $11,9 \pm 4,713\%$ ) eine erhöhte Trabekeldichte auf, die sich jedoch statistisch nicht signifikant unterschied, d.h. in dieser Untersuchung keine Vorteile hinsichtlich der Trabekeldichte ergab. Dagegen bewirkte die Verwendung von Ethisorb sowie von Ethisorb mit autogenen Spongiosachips (Gruppe 3,  $20,4 \pm 3,851\%$ ) eine statistisch signifikant höhere Trabekeldichte sowohl im Vergleich zur Gruppe 1 als auch zur Gruppe 2.

Der multiple t-Test ermöglichte weitergehende Aussagen sowohl innerhalb der jeweiligen Gruppe als auch zwischen den Gruppen (Tab. II,  $p \leq 0,05$ ). Während mit zunehmender postimplantärer Einheilungszeit in Gruppe 1 die Trabekeldichte statistisch signifikant abnahm, resultierten in Gruppe 2 «stabile» Trabekeldichten bis zur 26. Woche, die erst ab der 52. Woche statistisch signifikant geringere Dichten im Vergleich zur sechsten Woche aufwies. In

Tab. IV Mikroarchitektur der Knochenregenerate (Score) zu den vier Standzeiten sechs, 12, 26 und 52 Wochen

Material	Standzeit			
	6 Wochen	12 Wochen	26 Wochen	52 Wochen
Leerdefekt	1	2	2	2
Ethisorb Rapid	1	2	2	2
Ethisorb Rapid mit autogener Spongiosa	1	1	2	2
Ethisorb	3	3	3	2
Ethisorb mit autogener Spongiosa	3	3	3	2

Score: siehe Text

Gruppe 3 konnte im Vergleich zu den beiden anderen Gruppen eine auf höherem Niveau generierte Trabekeldichte erzielt werden, wobei bis 26 Wochen postoperativ keine statistisch signifikanten Differenzen nachweisbar waren. Statistisch signifikant höhere Trabekeldichten konnten für die 6. und 12. postimplantäre Woche im Vergleich zum 52-Wochen-Wert ermittelt werden.

Neben diesen histomorphometrischen Befunden ist für die Interpretation der Knochenregeneration die Histomorphologie des jeweiligen Defektareals zu berücksichtigen, die im Folgenden beschrieben wird.

**Mikroarchitektur der Knochenregenerate**

Hierbei wurde eine Score-Einteilung vorgenommen (Tab. IV, Score 1: Randständige Knochenregeneration mit zentralem Restdefekt, Score 2: Rarefizierte knöcherne Defektdurchbauung, Score 3: Vollständige trabekuläre Defektdurchbauung). Durch die Implantation von Ethisorb sowie dessen Kombination mit autogenen Spongiosachips konnte bis 26 Wochen postimplantär bereits eine vollständige trabekuläre Defektdurchbauung erzielt werden (Abb. 2, Score 3), die sich erst nach 52 Wochen den phy-

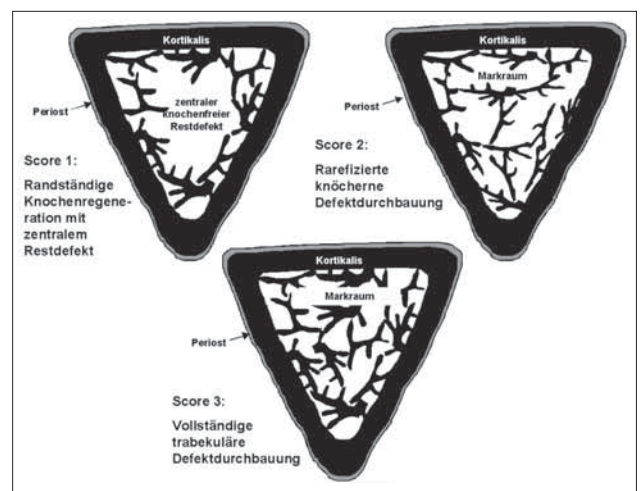


Abb. 2 Schematische Darstellung der differentiellen, histomorphologisch nachweisbaren Reossifikationsmuster im Tibiamarkraumdefekt. Bei identischer histomorphometrischer (quantitativ) Trabekeldichte (z. B. 60%) kann ein histomorphologisch (qualitativ) differentes Knochenregenerationsmuster resultieren (Score 1–3).

siologischen Gegebenheiten der Remodellationsdynamik anpasste und sich somit ein rarefiziertes Knochenregenerationsmuster ausbildete (Score 2). Dagegen führten der Leerdefekt und Ethisorb Rapid sechs Wochen postimplantär zu einer randständigen Knochenregeneration (Score 1), wobei von 12 Wochen bis 52 Wochen eine rarefizierte trabekuläre Defektdurchbauung resultierte (Score 2). Die Implantation von Ethisorb Rapid mit autogenen Spongiosachips führte nach sechs bzw. 12 Wochen zu einer randständigen Knochenregeneration mit zentralem Restdefekt (Score 1), der erst ab der 26. Woche eine rarefizierte trabekuläre Defektdurchbauung aufwies (Score 2). Damit lag mit zunehmender Heilungsdauer bis 52 Wochen postoperativ und einem hiermit verbundenen biologischen Altern des Tieres remodellationsbedingt für alle untersuchten Defektkonstellationen eine rarefizierte trabekuläre Defektdurchbauung vor, wobei eine chondrale Knochenheilung aber nicht nachweisbar war.

**Semiquantitative Beurteilung des Biopolymerabbaus**

Hierzu wurde eine Score-Einteilung vorgenommen (Tab.V, Evaluationskriterien: Biopolymernachweis, d.h. degradierter (fragmentierter), aber noch nicht resorbierter Biopolymeranteil/Markraumdefektfläche (%): Score 0: 0%, Score 1: 1–25%, Score 2: 26–50%, Score 3: 51–75%, Score 4: 76–100%). Der zum Zeitpunkt der Implantation für alle Biopolymervarianten polarisationsmikroskopisch gegebene 100%ige Biopolymernachweis (Score 4) reduzierte sich für die jeweiligen biopolymeren Implantationsmaterialien im weiteren postoperativen Verlauf auf unterschiedlichem Niveau: Sowohl für Ethisorb und Ethisorb in Kombination mit autogenen Spongiosachips als auch für Ethisorb Rapid und Ethisorb Rapid in Kombination mit autogenen Spongiosachips waren deren Polymerbestandteile aufgrund der fortgeschrittenen Resorption nach sechs bzw. 12 Wochen semiquantitativ nur noch zu ca. 26–50% (Score 2) sowie zu 1–25% (Score 1) nachweisbar. Nach 26 Wochen war das langsam degradierbare, d.h. langsam fragmentierbare, sowohl solitär als auch in Kombination mit autogenen Spongiosachips implantierte Ethisorb bereits vollständig degradiert und zellulär metabolisiert (Score 0). Im Gegensatz hierzu war Ethisorb Rapid und die Kombination von Ethisorb Rapid mit autogenen Spongiosachips mit einem Biopolymerrestanteil bis zu 25% (Score 1) weiterhin nach 26 Wochen nachweisbar, wobei nach 52 Wochen hier ebenfalls keine Biopolymerreste mehr detektierbar waren (Score 0). Überraschenderweise wies das *per definitionem* als beschleunigt abbaubar eingestufte Defektfüllmaterial Ethisorb Rapid einen verzögerten Resorptionsmechanismus auf, indem auch nach halbjährlicher Liegedauer doppelbrechende Biopolymerreste spo-

Tab.V Semiquantitative Beurteilung der dynamischen Biopolymerdegradation in den Tibiamarkraumdefekten

Material \ Standzeit	Implantation	6 Wo	12 Wo	26 Wo	52 Wo
	Ethisorb Rapid	4	2	1	1
Ethisorb Rapid mit autogener Spongiosa	4	2	1	1	0
Ethisorb	4	2	1	0	0
Ethisorb mit autogener Spongiosa	4	2	1	0	0

Score: siehe Text

Tab.VI Biopolymerabbau mit begleitender inflammatorischer Zellreaktion

Material \ Standzeit	6 Wochen	12 Wochen	26 Wochen	52 Wochen
	Ethisorb Rapid	2	2	2
Ethisorb Rapid mit autogener Spongiosa	2	2	2	0
Ethisorb	1	1	0	0
Ethisorb mit autogener Spongiosa	1	1	0	0

Score: siehe Text

radisch polarisationsmikroskopisch nachweisbar waren. Als mögliche Ursache dieses interessanten histomorphologischen Ergebnisses konnte eine Überlastung der zellulären, phagozytären Kapazitäten (ein- und mehrkernige Riesenzellen, Granulozyten, Schaumzellen) vermutet werden.

**Semiquantitative Beurteilung des Biopolymerabbaus – Zusammenhang mit inflammatorischen Reaktionen**

Hierzu wurde ebenfalls eine Score-Einteilung vorgenommen (Tab.VI, Score 0: vollständige Polymerdegradation ohne Nachweis entzündlicher Zellreaktionen, Score 1: mit begleitenden, geringen inflammatorischen Zellreaktionen (akute granulozytäre Reaktion mit vereinzelt Nachweis von Riesenzellen) Score 2: mit begleitenden, ausgeprägten inflammatorischen Zellreaktionen (akute granulozytäre Zellreaktion mit überwiegend chronisch lympho-plasmazellulärer Zellreaktion und phagozytärer Abbaureaktion des Biopolymers). Für Ethisorb sowie für die Kombination von Ethisorb mit autogenen Spongiosachips resultierte nach sechs bzw. 12 Wochen postimplantär eine Biopolymerdegradation, d.h. Biopolymerfragmentation, mit einer die Biopolymerreste umgebenden begleitenden, geringen inflammatorischen Zellreaktion (Score 1) mit einer akuten granulozytären Reaktion mit vereinzelt Nachweis von Riesenzellen. Diese war nach 26 Wochen nicht mehr nachweisbar, da Ethisorb analog der Tab.V vollständig degradiert und resorbiert war (Score 0). Im Gegensatz hierzu rief die beschleunigt degradierbare Biopolymervariante Ethisorb Rapid bzw. die Kombination von Ethisorb Rapid mit autogenen Spongiosachips eine die Biopolymerreste umgebende, begleitende ausgeprägte inflammatorische Zellreaktion bis zur postimplantären Einheilungszeit von 26 Wochen hervor (Score 2). Hierbei war neben einer akuten granulozytären Reaktion zusätzlich ab der 12. Woche postimplantär eine lympho-plasmazelluläre, chronische Reaktion mit einer phagozytären Abbaureaktion (Riesenzellen und Schaumzellen) des Biopolymers nachweisbar. Erst nach 52 Wochen war für das protrahiert resorbierbare Ethisorb Rapid eine vollständige Biopolymerdegradation sowie -resorption nachweisbar (Score 0).

**Histomorphologie**

Für den Leerdefekt war nur eine von der Innenkortikalis ausgehende, ungerichtete Knochenregeneration nachweisbar (Abb.3). Sowohl für Ethisorb Rapid (Abb. 4) als auch für dessen Kombination mit autogenen Spongiosachips resultierte durch die rasche Biopolymerdegradation ein vermutlich entstehendes saures Milieu mit Mikropartikeln, das neben den o.g. Entzündungsreaktionen zu einem bereits nach sechs Wochen, frühzeitigen, for-

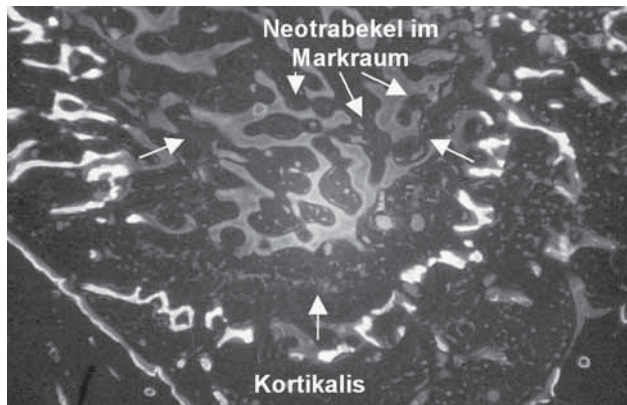


Abb. 3 Leerddefekt, sechs Wochen: zentripetale Reossifikation ausgehend von den vitalen endostalen Lagerrändern (siehe Pfeile). Die frühe, reparative autochthone Osteoneogenese ist erkennbar an den vitalen endostalen kortikalen Innenwänden (Calcein-Markierung). Nach 4 Wochen finden sich bereits im Zentrum Neotrabeikel, wie dies durch die Oxytetracyclin-Markierungen objektiviert werden kann (Fluoreszenzmikroskopie, Blauanregung, ungefärbt, Vergr. 4×).

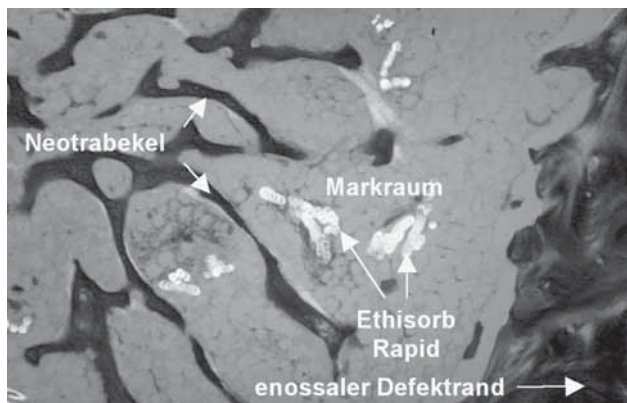


Abb. 4 Ethisorb Rapid, sechs Wochen: sporadischer Nachweis von Ethisorb-Rapid-Filamenten (Polarisationsmikroskopie, ungefärbt, Vergr. 10×).

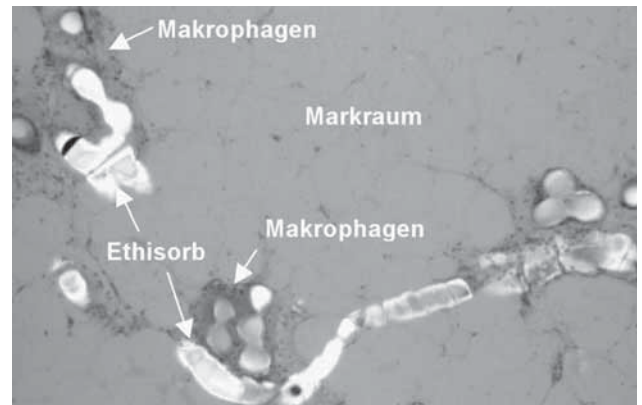


Abb. 5 Ethisorb mit autogenen Spongiosachips, 12 Wochen: zelluläre Phagozytose mittels Makrophagen von Biopolymerpartikeln (Polarisationsmikroskopie, ungefärbt, Vergr. 10×).

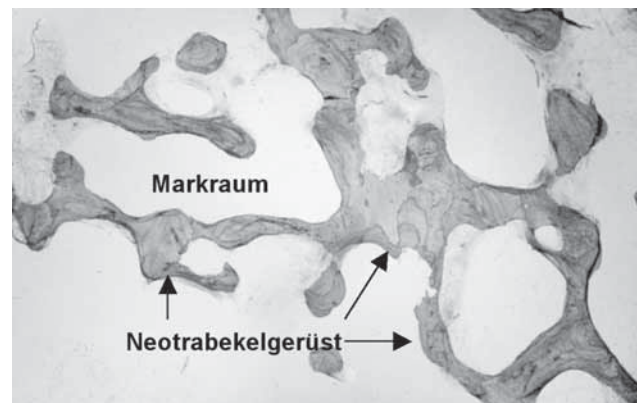


Abb. 6 Ethisorb mit autogenen Spongiosachips, 52 Wochen: Neotrabeikelgerüst ohne Nachweis von Biopolymerresten (Polarisationsmikroskopie, ungefärbt, Vergr. 10×).

cierten Verlust der dreidimensionalen Leitschienenfunktion führte. Hierdurch bedingt zeigten sich nur sporadische Revitalisierungen der transplantierten autogenen Spongiosachips, die auf die erste postimplantäre Woche terminiert werden konnten. 12 bzw. 26 Wochen postimplantär wurde die zentrale Kunststoffresorption durch die in unmittelbarer Nähe zum Defektrand von den in den Knochendefekt aus dem Endost einwachsenden Gefäßneubildungen unterstützt, die Riesenzellen via Blutstrom zur Biopolymerresorption heranführten (Abb. 5). Im Gegensatz hierzu war bei der Implantation von Ethisorb sowie dessen Kombination mit autogenen Spongiosachips bereits nach sechs bzw. 12 Wochen eine von den seitlichen endostalen Defekträndern ausgehende zentripetale Knochenneubildung nachweisbar, die das Biopolymergerüst des Ethisorb im Sinne einer Osteokonduktion bei geringer, begleitender inflammatorischer Reaktion benutzte. Durch die vital transplantierten autogenen Spongiosachips konnte zusätzlich eine multilokuläre, d.h. eine polytope Knochenregeneration erreicht werden (Abb. 6). Die verlangsamte Biopolymerdegradation von Ethisorb ermöglichte im Gegensatz zu Ethisorb Rapid eine längerfristige Leitschienenfunktion bis 12 Wochen postimplantär für eine zentripetale Reossifikation.

## Diskussion

Das langsam degradierbare, d.h. langsam fragmentierbare, aber schnell resorbierbare Ethisorb rief im Vergleich zum schnell degradierbaren, aber verzögert resorbierbaren Ethisorb Rapid histomorphometrisch nachweisbar grössere Trabekeldichten hervor. Nach 26 Wochen waren keine Biopolymerreste von Ethisorb mehr nachweisbar, wohingegen Filamente von Ethisorb Rapid bis 26 Wochen postimplantär nachweisbar waren (Tab. V). Es zeigte sich im Gegensatz zum Leerddefekt, dass durch eine Defektfüllung mittels osteokonduktivem Biopolymer des ersatzstarken Tibiamarkraumdefekts aufgrund des tridirektionalen Knochenregenerationsmusters grössere Trabekeldichten erzielbar waren. Zusätzlich üben die bei der Degradation der Biopolymere entstehenden Aminosäuren, wie z.B. Glycin und Serin (HOLLINGER 1983), eine osteostimulative Wirkung auf den Lagerknochen sowie auf die autogenen Spongiosachips aus. Letztere zeigten in Kombination mit Biopolymeren osteokonduktive und -induktive Eigenschaften, da sie frühzeitig eine multilokuläre Knochenregeneration ermöglichten. Hierbei erzielte die Implantation von Ethisorb und Ethisorb mit autogenen Spongiosachips statistisch



signifikant höhere Trabekeldichten im Vergleich zum Leerdefekt sowie Ethisorb Rapid und Ethisorb Rapid mit autogenen Spongiosachips (Tuckey-Test,  $p \leq 0,05$ ).

Die hierfür erforderlichen Wachstumsfaktoren wie Bone Morphogenetic Proteins (BMP) und Glykosaminoglykane werden aus dem transplantären ungeformten interzellulären Gerüst freigesetzt (KÜBLER 1998), die auch über den Zelltod hinaus wirksam bleiben (ZILCH 1980). Den durch die Neovaskularisation des tierexperimentellen Defektes herangeführten pluripotenten mesenchymalen Stammzellen wird hiermit die Möglichkeit einer osteogenen Differenzierung und schnelleren Proliferation gegeben (CAPLAN 1991, FOITZIK & MERTEN 1999). Folglich ist eine, dieser optimierten Knochenregeneration angepasste, degradationsstabile Mindestfunktionszeit des Trägermaterials (MERTEN et al. 2003) von 12 Wochen, wie hier für Ethisorb nachgewiesen, erforderlich. Hierbei kam besonders, wie die histomorphometrischen Messungen belegen, den ersten sechs postimplantären Wochen eine grosse Bedeutung zu, wobei hier korrespondierend zur Zunahme der Knochenregeneration eine kalkulierte Degradation des Trägermaterials Ethisorb ablief. Durch die nach der Implantation von Ethisorb Rapid ablaufende, gesteigerte Polymerdegradation bei gleichzeitig protrahierter Resorption kam es im Vergleich zu der konstanteren Polymerdegradation und -resorption bei Ethisorb vermutlich zu einer pH-Wert-Verschiebung in den sauren Bereich, sodass die Knochenregeneration vergleichsweise reduziert war. Daher sollte Ethisorb Rapid aufgrund einer Polymerpersistenz bis zur 26. Woche sowie begleitenden, vermehrten periimplantären inflammatorischen Reaktionen zur rückhaltenden Anwendung finden.

Ein critical-size-defect (CSD) heilt zeitlebens spontan nicht knöchern, sondern bindegewebig aus (SCHMITZ & HOLLINGER 1986). Das in dieser Untersuchung im ersatzstarken Lager der Tibiametaphyse gewählte Volumen von 3 ml/Markraumdefekt war durch eine zusätzliche Entfernung des Periostes am Kortikalisdeckel ein ausreichend dimensionierter, d.h. die o.g. Kriterien erfüllender CSD, da der Leerdefekt nach sechs Wochen einen zentralen Restdefekt sowie nach 12, 26 und 52 Wochen ein rarefiziertes knöchernes Regenerationsmuster aufwies (Tab. IV). Demgegenüber konnte durch die Implantation von Biopolymeren sowie deren Kombinationen mit autogenen Spongiosachips eine vollständige knöcherne Defektdurchbauung erzielt werden.

Bei Übertragung dieser Ergebnisse auf den Menschen könnte dies bedeuten, dass durch Biopolymer-Implantation in Zahnalveolen, neben einer hierbei erzielbaren hämostyptischen Wirkung (MERTEN et al. 2004), eine zusätzlich gesteigerte Knochenregeneration zu einer postulierten, möglicherweise frühzeitigeren Versorgung der Kieferknochen mit dentalen Implantaten führen könnte (AL-NAWAS et al. 2006). Abschliessend liess sich zeigen, dass die Ergebnisse bei alleiniger Betrachtung der Histomorphometrie keine Rückschlüsse auf das histomorphologische Erscheinungsbild erlauben, sodass letzteres grundsätzlich bei einer Bewertung der Knochenregeneration hinzugezogen werden sollte.

## Schlussfolgerung

Ethisorb ist als resorbierbares Biopolymer für die Implantation in ersatzstarke Tibiamarkraumdefekte geeignet. Hierbei resultiert neben einer von den Defekträndern ausgehenden tridirektionalen Knochenregeneration durch Beimischung von autogenen Spongiosachips zusätzlich eine multilokuläre Knochenregeneration. Die Degradationsprodukte des Biopolymers wirken osteo-

stimulativ mit im Vergleich zum Leerdefekt und Ethisorb Rapid sowie Ethisorb Rapid mit autogenen Spongiosachips generierten statistisch signifikant höheren Trabekeldichten. Ethisorb weist als Trägermaterial für autogene Spongiosachips eine degradationsstabile Mindestfunktionszeit von 12 Wochen auf. Zur vollständigen Beurteilung der Knochenregeneration sollte neben den rein histomorphometrischen Daten zusätzlich das histomorphologische Bild hinzugezogen werden.

## Summary

Nitsch A, Merten H A, Verheggen R: **Histological comparison of different biopolymers in osseous defects** (in German). Schweiz Monatsschr Zahnmed 117: 720–727 (2007)

The goal of this animal study in Goettingen minipigs was to compare Ethisorb with its modification Ethisorb Rapid where the hydrolytic degradation process has started, with respect to degradation and bony substitution qualities. For comparison, both biopolymers were implanted with and without addition of autogenic spongiosa chips in comparison with blank defects in metaphysis of the tibia. The animals were killed after six, 12, 26 and 52 weeks. Undecalcified bone cuts were obtained and subjected to a histomorphometric and histomorphological analysis.

All in all, with increasing time after implantation a continuous decrease of the density of trabecula could be observed. In comparison to Ethisorb Rapid and blank defects, the implantation of the slowly degrading but quickly resorbing Ethisorb led to statistically significantly higher densities of trabecula (Tuckey Test,  $p \leq 0.05$ ) and to best bone regeneration. In contrast to this, Ethisorb Rapid could be degraded more quickly but resorbed more slowly. In the polarizing microscope, Ethisorb could still be detected after 12 weeks of implantation. Ethisorb Rapid could still be detected after 26 weeks of implantation. To conclude, Ethisorb proved to be a suitable scaffold for autogenic spongiosa-chips in critical-size defects of the tibia so that a multiloculated bone regeneration could be obtained.

## Résumé

Le but de cette expérimentation animale, réalisée sur des cochons «miniatures» (Göttingen), était de comparer la performance du biopolymère ETHISORB avec sa forme modifiée, l'ETHISORB RAPIDE, pour laquelle le processus de dégradation hydrolytique a déjà été initié. Pour faire cette comparaison, les deux bio-polymères ont été implantés avec ou sans addition de particules d'os spongieux autogène au niveau de la métaphyse du tibia. Des défauts non-comblés ont été utilisés comme contrôle. Après six, 12, 26 et 52 semaines, les animaux ont été sacrifiés et des coupes non-décalcifiées ont été analysées par techniques histomorphologique et histomorphométrique.

De manière générale, une diminution continue de la densité des trabécules osseuses a été observée en fonction du temps écoulé après l'implantation. En comparaison à l'ETHISORB RAPIDE et aux défauts contrôle, l'implantation d'ETHISORB à dégradation lente mais se résorbant rapidement, a abouti à une densité plus importante des trabécules en histomorphométrie (test de Tuckey,  $p \leq 0,005$ ) et à une meilleure régénération osseuse histomorphologique. Au microscope polarisant, l'ETHISORB est encore détectable 12 semaines après son implantation, tandis que l'ETHISORB RAPIDE peut encore être détecté après 26 semaines. En conclusion, l'ETHISORB démontre être une matrice favorable pour l'utilisation de particules osseuses spongieuses dans



des défauts de taille critique du tibia et permet d'obtenir une régénération osseuse multi-loculaire.

## Literaturverzeichnis

- AL-NAWAS B, KLEIN M O, GÖTZ H, DUSCHNER H, AL-NAWAS K: Strategien und Bauformen in der Entwicklung moderner Implantatsysteme. *DFZ* 3: 37–40 (2006)
- AMECKE B, BENDIX B, ENTENMANN G: Resorbable polyesters: composition, properties, applications. *Clin Mater* 10: 47–50 (1992)
- BARBOLT T A, ODIN M, LEGER M, KANGAS L, HOISTE J, LIU S H: Biocompatibility evaluation of dura mater substitutes in an animal model. *Neurol Res* 23: 813–820 (2001)
- BRANDT R B, WATERS M G, RISPLER M J, KLINE E S: D- and L-lactate catabolism to CO<sub>2</sub> in rat tissues. *Proc Soc Exp Biol Med* 175: 328–335 (1984)
- BÜCHEL P, RAHAL A, SETO I, IZUKA T: Reconstruction of orbital floor fracture with polyglactin 910/Polydioxanon patch (ethisorb): A retrospective study. *J Oral Maxillofac Surg* 63: 646–650 (2005)
- CAPLAN A I: Mesenchymal stem cells. *J Orthop Res* 9: 641–650 (1991)
- FILIPPI R, DERDILOPOULOS A, HEIMANN A, KRUMMENAUER F, PERNECZYK A, KEMPSKI O: Tightness of duraplasty in rabbits: a comparative study. *Neurosurgery* 46: 1470–1476 (2000)
- FOITZIK C, MERTEN H A: Intraindividuell Vergleich von klinisch-relevanten Augmentationsmaterialien im standardisierten Tierversuch. In: Heinenberg B J (Hrsg): *Restitutio ad integrum – Vom Knochenersatz zum Knochenaufbau. Innovationen für die Zahnheilkunde, Teil 26.* Spitta-Verlag, Balingen pp 64–116 (1999)
- FROSCHE K H, GRÖLL C, VIERECK V, DRENGK A, STÜRMER K M, DRESING K: Cell coated fibrin glue- and polymer fleece-cell constructs do not induce orthotopic bone formation in the rabbit. *Osteologie* 14: 162–171 (2005)
- GERLACH K L: Resorbierbare Polymere als Osteosynthesematerialien. *Mund Kiefer GesichtsChir* 4, Suppl. 1: 91–102 (2000)
- GROGER A, KLARING S, MERTEN H A, HOLSTE J, KAPS C, SITTINGER M: Tissue engineering of bone for mandibular augmentation in immunocompetent minipigs: preliminary study. *Scand J Plast Reconstr Surg Hand Surg* 37: 129–133 (2003)
- HOLLINGER J O: Preliminary report on the osteogenic potential of a biodegradable copolymer of polylactide (PLA) and polyglycolide (PGA). *J Biomed Mater Res* 17: 71–82 (1983)
- JANK S, EMSHOFF R, SCHUCHTER B, STROBL H, BRANDLMAIER I, NORER B: Orbital floor reconstruction with flexible ethisorb patches: a retrospective long-term follow-up study. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 95: 16–22 (2003)
- KRONENTHAL R L: Biodegradable polymers in medicine and surgery. In: Kronenthal R L, Oser Z, Martin E (Hrsg): *Polymers in medicine and surgery.* Plenum Publishing, New York, pp 119–137 (1975)
- KÜBLER N R: Knochenbildung durch Osteoinduktion. Vom demineralisierten Knochen zu rekombinanten Bone Morphogenetic Proteins – experimentelle Grundlagen und klinische Anwendung in der Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie. Quintessenz Verlag, Berlin (1998)
- MERTEN H A, WILTFANG J, BECKER H J, HÖNIG J F, WIESE K G: Resorbierbare Kunststoff-Tamponaden zur Knochendefektfüllung im spongiösen Lager. *Z Zahnärztl Implantol* 13: 165–174 (1997)
- MERTEN H A, GRUBER R M, NITSCH A, LUDWIG A, SCHLIEPHAKE H: Evaluation oralchirurgischer Augmentationsmaterialien – Ein tierexperimentell-histomorphologischer Vergleich. *Implantologie* 11: 215–236 (2003)
- MERTEN H A, MAZUREK M, GRUBER R, LUDWIG A: Postoperative Nachblutungsrate antikoagulierter Patienten nach oralchirurgischen Eingriffen. Ein Vergleich unterschiedlicher hämostypischer Therapiemodalitäten. *Quintessenz* 55: 113–122 (2004)
- NITSCH A, PATYK A, SCHWARTZ P, MERTEN H A: Einfluss unterschiedlicher Anrührflüssigkeiten auf die mechanischen und mikromorphologischen In-vitro-Eigenschaften von Hydroxylapatitzement. *Mund Kiefer GesichtsChir* 9: 89–94 (2005)
- PROLO D J, GUTIERREZ R V, DE VINE J S, OKLUND S: Clinical utility of allogenic skull discs in human craniotomy. *Neurosurgery* 14: 183–186 (1984)
- Recker R R: Bone histomorphometry: techniques and interpretation. CRC Press, Boca Raton, Florida (1983)
- SCHIMMING R, SCHMELZEISEN R: Tissue-engineered bone for maxillary sinus augmentation. *J Oral Maxillofac Surg* 62: 724–729 (2004)
- SCHLEGEL K A, FALK S, WILTFANG J: Der Einsatz eines resorbierbaren Knochenersatzmaterials (Colloss®) zur knöchernen Defektfüllung – eine tierexperimentelle Studie. *DFZ* 48: 39–43 (2004)
- SCHMELZEISEN R, SCHIMMING R, SITTINGER M: Soft tissue and hard tissue engineering in oral and maxillofacial surgery. *Ann R Australas Coll Dent Surg* 16: 50–53 (2002)
- SCHMITZ J P, HOLLINGER J O: The critical size defect as an experimental model for craniomandibulofacial nonunions. *Clin Orthop Relat Res* 205: 299–308 (1986)
- SEIDL R O, TODT I, ERNST A: Rekonstruktion von traumatischen Schädelbasisdefekten mit einem alloplastischen, resorbierbaren Vlies (Ethisorb). *HNO* 48: 753–757 (2000)
- THORWARTH W M, SCHLEGEL K A, SROUR S, SCHULTZE-MOSGAU S, WILTFANG J: Untersuchung zur knöchernen Regeneration ossärer Defekte unter Anwendung eines nanopartikulären Hydroxylapatits (Ostim®). *Implantologie* 12: 21–32 (2004a)
- THORWARTH W M, SROUR S, SCHULTZE-MOSGAU S, WILTFANG J, SCHLEGEL K A: Bioaktivierung einer Hydroxylapatitkeramik durch die P15-Sequenz – Einfluss auf die Knochenneubildung. *Implantologie* 12: 245–256 (2004b)
- VERHEGGEN R, SCHULTE-BAUMANN W J, HAHM G, LANG J, FREUDENTHALER S, SCHAAKE T, MARKAKIS E: A new technique of dural closure – experience with a vicryl mesh. *Acta Neurochir (Wien)* 139: 1074–1079 (1997)
- VERT M, LI S M, SPENLEHAUER G, GUERIN P: Bioresorbability and biocompatibility of aliphatic polyesters. *J Mat Sci* 3: 432–446 (1992)
- ZILCH H: Das Fibrinklebesystem in der Knochenchirurgie. *Med. Habilitationsschrift, Berlin* (1980)