

Aus dem Universitätsklinikum Münster
Klinik und Poliklinik für
Allgemeine Orthopädie und Tumororthopädie
-Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. G. Gosheger-

Beurteilung der Osseointegration einer Silberbeschichtung
von Hüftendoprothesen bei Hunden anhand mikroskopischer Techniken

INAUGURAL – DISSERTATION

zur

Erlangung des doctor medicinae

der Medizinischen Fakultät

der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster

vorgelegt von Schorn, Dominik

aus Mülheim an der Ruhr

2010

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Westfälischen
Wilhelms-Universität Münster

- Dekan: Univ.-Prof. Dr. med. W. Schmitz
1. Berichterstatter: Priv. Doz. Dr. med. J. Harges
 2. Berichterstatter: Prof. Dr. med. B. Greitemann
- Tag der mündlichen Prüfung: 21.04.2010

Aus dem Universitätsklinikum Münster
Klinik und Poliklinik für Allgemeine Orthopädie
-Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. G. Gosheger-
Referent: Priv. Doz. Dr. med. J. Harges
Koreferent: Prof. Dr. med. B. Greitemann

ZUSAMMENFASSUNG

Beurteilung der Osseointegration einer Silberbeschichtung
Von Hüftendoprothesen bei Hunden anhand mikroskopischer Techniken
Schorn, Dominik

Die vorliegende Studie sollte unter Verwendung mikroskopischer Techniken belegen, dass eine silberbeschichtete Hüftendoprothese ebenso gut in den Knochen osseointegriert wird wie eine baugleiche Titanprothese ohne Silberbeschichtung.

In einer doppelblind, randomisierten in vivo Studie wurde 20 Beagle-Hunden eine Hüftendoprothese (10 Titanprothesen, 10 silberbeschichtete Prothesen) in einen ihrer Hinterläufe implantiert. 365 Tage postoperativ wurden die Tiere euthanasiert und die entnommenen Femora mechanischen Testungen, sowie mikroskopischen Untersuchungen zugeführt.

Mikroskopisch zeigte sich, analog zu den vorweg durchgeführten mechanischen Testungen, dass die mit Silber beschichteten Endoprothesen in keinem einzigen Fall mit direktem Knochen-Implantatkontakt in ihr Lager integriert wurden. Stattdessen trennte eine bindegewebige Matrix das Implantat vom umliegenden Knochen. Die implantierten Titanprothesen der Kontrollgruppe zeigten sich in jedem Fall fest in ihr Lager integriert. Ursächlich für die nicht stattgehabte Osseointegration in der Silberprothesen-Gruppe sehen wir toxische Effekte einer zu hohen Silberkonzentration auf die Osteoblasten im periprothetischen Gewebe.

Tag der mündlichen Prüfung: 21.04.2010

In Liebe und Dankbarkeit gewidmet:
Meinen Eltern, Christa und Norbert Schorn
Meiner Tante Mia

Inhaltsverzeichnis

1 <u>Einleitung</u>	S. 8
1.1 Grundlagen und Theorie	S. 8
1.1.1 Arthrose	S. 9
1.1.2 Endoprothetik	S. 10
1.1.3 Silber	S. 13
1.1.4 Prinzipien der knöchernen Integration von Fremdmaterial	S. 15
1.2 Hypothese	S. 16
2 <u>Material und Methoden</u>	S. 17
2.1 Modell	S. 17
2.2 Die Versuchstiere	S. 18
2.3 Versuchsgruppen	S. 18
2.4 Die Prothese	S. 19
2.5 Operation	S. 22
2.5.1 Drop out	S. 24
2.6 Meßmethoden	S. 25
2.7 Histologische Untersuchungen	S. 25
2.7.1 Materialgewinnung	S. 25
2.7.2 Methodik der Gewebeeinbettung	S. 26
2.7.3 Schneiden am Mikrotom	S. 31
2.7.4 Die Färbungen	S. 32

2.7.5	Mikroskopie	S. 33
2.7.6	Methodenkritik	S. 34
3	<u>Ergebnisse</u>	S. 36
3.1	Übersichts- u. Detailaufnahmen Schnittpräparate	S. 36
3.1.1	Histologie Silberprothesen	S. 36
3.1.2	Histologie Titanprothesen	S. 40
3.1.3	Tabellarische Auflistung Interface	S. 43
3.1.4	Chi-Quadrat-Test	S. 43
3.2	Schichtdickenbestimmung der kollagenen Matrix	S. 45
3.2.1	Tabellarische Auflistung Kollagenmatrix	S. 45
3.2.2	Zweistichproben t-Test	S. 45
4	<u>Diskussion</u>	S. 46
4.1	Ausblick	S. 55
5	<u>Literatur</u>	S. 58
6	<u>Danksagung</u>	S. 67
7	<u>Lebenslauf</u>	S. 68
8	<u>Anhang</u>	S. 70
8.1	Versuchsgenehmigung	S. 70

1 Einleitung

1.1 Grundlagen und Theorie

Der Bereich der Endoprothetik spielt in den Fachdisziplinen Orthopädie, Unfallchirurgie und in der Zahnheilkunde eine tragende Rolle.

Aus dem demographischen Wandel der Bevölkerung, mit Zunahme des Durchschnittsalters und der Lebenserwartung, ergibt sich eine Zunahme der Morbidität^{25, 48}. Da die Prävalenz der primären Coxarthrose jenseits der 6. Lebensdekade stetig zunimmt, führt das Altern der Bevölkerung zu einer Zunahme der Gesamtprävalenz der Hüftgelenksarthrose⁴⁸. Bei Zunahme des Anspruchs auf körperliche Unversehrtheit und Integrität, erhöht sich die Anzahl potentieller Patienten für eine Endoprothesenversorgung.

Die endoprothetische Versorgung des Arthrosepatienten erfolgt erst nach Ausschöpfung aller konservativen und weniger invasiven Therapiemöglichkeiten. Bei persistierenden Beschwerden und hohem Leidensdruck des Patienten ist die Implantation einer Prothese häufig unumgänglich.

In der Tumororthopädie werden große Knochendefekte durch eine (Megaendo-)Prothese ersetzt, um die Funktion der Extremität erhalten zu können.

Nach traumatischen Ereignissen mit resultierender Zerstörung eines Gelenkes oder seiner Binnenstrukturen, wird auch im Fachbereich Unfallchirurgie eine Endoprothesenversorgung durchgeführt.

1.1.1 Arthrose

Da die Therapie der Arthrose den größten Einsatzbereich der Endoprothetik darstellt, soll hier kurz auf diese Erkrankung eingegangen werden.

Bei der Arthrose handelt es sich um eine Degeneration des Gelenkknorpels und daraus resultierenden Knochenläsionen (Mikrofrakturen, Zysten) und entzündlichen Veränderungen der Gelenkkapsel ⁵⁷. Ätiologisch wird zwischen primärer und sekundärer Arthrose unterschieden. Bei der primären Arthrose ist die Ursache unbekannt. Ursachen für die sekundäre Arthrose sind unter anderem Überbelastung von Knorpelarealen durch Achsfehler, Instabilitäten und Gelenkdysplasien. Entzündliche Gelenkprozesse, metabolische Erkrankungen und Traumen zählen ebenfalls zu den Ursachen der Sekundärarthrose. Initial kommt es bei der Arthrose zu einem Elastizitätsverlust des Knorpels mit Freilegung kollagener Fasern und Bildung von minderwertigem Faserknorpel ³⁰. Dies führt im weiteren Verlauf zur Abnahme der Höhe und Glätte der kartilaginären Schicht, was zu einer Einschränkung der Pufferfunktion und zur Erhöhung des Reibungswiderstandes, sowie der Scherkräfte zwischen den artikulierenden Flächen führt. Osteophytäre Anbauten an den Rändern der Gelenkfläche sind die Folge. Nach anfänglicher subchondraler Sklerosierung des Knochens kommt es im Verlauf, unter den maximal beanspruchten Arealen des Gelenks, zu zystischem Abbau von Knochenmaterial.

Eine genaue Korrelation zwischen diesen radiologisch gut darstellbaren Veränderungen (Gelenkspaltverschmälerung, subchondrale Sklerosierung, Osteophyten, Geröllzysten) und der Symptome des Patienten (Bewegungs-/Belastungsschmerz, Bewegungseinschränkung etc.) gibt es nicht. Auch bei schon stark fortgeschrittenem Knorpelverlust kann eine

Arthrose asymptomatisch bleiben. Kommt es schließlich durch Knorpelabriebprodukte oder subchondrale Knochennekrosen zu einer reaktiven Entzündung, äußert sich dies meist durch die Trias dolor, tumor, calor und Bewegungseinschränkung des Gelenkes. Die Indikation zur Therapie wird somit aufgrund der Beschwerdesymptomatik und nicht der radiologischen Befunde gestellt.

Bleiben nicht invasive Behandlungen wie Physiotherapie, Gabe von analgetisch und antiphlogistisch wirkenden Medikamenten, sowie Orthesenversorgung ohne Erfolg, führt der therapeutische Weg über wenig invasive Eingriffe (z.B. Injektionen mit Kortison oder Chondroprotektiva, Mikrofrakturierung, Synovialektomie und Debridement) zur Versorgung des Patienten mit einer Endoprothese.

1.1.2 Endoprothetik

Die Implantation einer Gelenksprothese ist kein neues Therapiekonzept. Schon im 19. Jahrhundert wurden die ersten Endoprothesenimplantationen durchgeführt. Damals eingebaute Prothesen mussten aber zumeist schon nach kurzer Standzeit wieder explantiert werden. Hauptursache hierfür waren vor allem Infektion, nicht stattgehabtes Einheilen der Prothese und die aseptische Lockerung im weiteren Verlauf³⁷.

Durch moderne Prothesendesigns und neue Materialien ist es gelungen die Primärstabilität und das Prothesenüberleben zu verbessern (87% nach 5 Jahren, 80% nach 10 Jahren und 56% nach 15 Jahren)⁴⁰. Es zeigt sich aber, dass die Infektion trotz der neuen Implantationstechniken und Materialien weiterhin als schwere Komplikation bestehen bleibt⁶². Auch heute, im 21. Jahrhundert, stehen neben dem Einbringen von körperfremden Materialien nur wenige Alternativen zur Rekonstruktion

des Gelenkes und der Gelenkflächen zur Verfügung. Vor allem Titan-Aluminium-Legierungen, Keramiken und Polyethylen zählen zu diesen Materialien. Diese werden mit verschiedenen Beschichtungen wie Hydroxylapatit kombiniert. Jeder dieser Stoffe kann von verschiedenen Bakterien, vor allem den Biofilmbildenden Bakterien, besiedelt werden. Hierbei sind endogene und exogene Infektion voneinander zu unterscheiden⁶³.

Zu den endogenen Infektionen zählen allen voran die hämatogenen Infektionen. Der Infektfokus liegt zunächst in einem anderen Bereich des Körpers. Die Endoprothese wird dann über den Blutweg von den Erregern erreicht. Ursache für eine hämatogene Infektion können eine akute Sepsis, oder verschiedene lokalisierte Infektionen als Streuherde sein. Infektionen mit Staphylococcus aureus und β -hämolytischen Streptokokken haben ihren Ursprung vor allem in der Haut (Furunkeln, Erysipel, infizierter Dekubitus), Escherichia coli Infektionen beginnen zumeist im Urogenitalsystem, Pneumokokkeninfektionen im Respirationstrakt, Salmonellen- und Anaerobierinfektionen im Gastrointestinaltrakt⁸³.

Endogene Infektionen können jederzeit auftreten. Verglichen mit den exogenen Infektionen manifestieren sie sich jedoch in den ersten 2 Jahren vergleichsweise selten. Ein anderer Mechanismus ist das versehentliche Einbringen der Bakterien peri- oder postoperativ im Rahmen einer Kontamination⁷⁹. Hierbei spricht man von einer exogenen Infektion. Diese Art der Infektion kann sich schon nach Tagen manifestieren oder, speziell bei „Low-Grade-Infektionen“, erst nach Monaten bis zu 2 Jahren erkannt werden. Ob es zur klinisch relevanten Besiedlung der Prothesenoberfläche kommt, hängt von vielen verschiedenen Faktoren, wie beispielsweise der Virulenz des Erregers, dem Immunsystem des Patienten, dem Implantat und dem Implantationsort ab⁸³.

Zur manifesten periprothetischen Infektion kommt es bei den heutigen hygienischen Standards und einer primären Implantation einer Hüftendoprothese in 0,4 – 1,6% der Fälle. Handelt es sich bereits um eine Revision mit erneutem Einbau einer Prothese steigt die Wahrscheinlichkeit einer Infektion des neuen Implantates auf 1,7 – 5% an^{56, 80}. Lag eine Infektion des vorherigen Implantates vor, steigt das Risiko der Reinfektion, trotz Debridement und Sanierung der Infektion, weiter an. Studien zeigen hier Infektionsraten, die bei bis zu 26% liegen können^{21, 47, 66, 67, 76, 78}. Capanna et al. beschreibt sogar eine Infektionsrate von 43% bei Revisionsoperationen in der Tumorendoprothetik.

Das Keimspektrum umfasst vor allen Dingen Staphylokokken (Staph. aureus, Staph. epidermidis) und gram negative Erreger⁷⁹. Eine Zunahme von Infektionen mit multiresistenten Keimen ist zu verzeichnen⁴⁹.

Die besondere Problematik einer periprothetischen Infektion liegt darin, dass die Bakterien für das Immunsystem und auch für eine medikamentöse Therapie nur schwer erreichbar sind. Ursache hierfür ist vor allem die schlechte Durchblutungssituation des periprothetischen Gewebes. So werden weder immunologisch wirksame Zellen und Proteine, noch Medikamente in ausreichender Konzentration zum Infektfokus transportiert. Zudem schützen sich manche Bakterien, wie Staphylococcus epidermidis, mit der Bildung eines Biofilms vor Medikamenten und der immunologischen Abwehr. Bei erheblichen Beschwerden des Patienten stellt der komplette Ausbau des infizierten Fremdkörpers eine kurative Option dar. Einzeitiger, oder zweizeitiger Wechsel mit Einbringen eines Platzhalters (spacer) sollte bei jedem Patienten individuell abgewogen werden⁵⁰.

Wesentliche Voraussetzungen, um eine periprothetische Infektion zu vermeiden, sind steriles Arbeiten während der Operation⁷⁹, eine

perioperative (ggfs. auch postoperative) Antibiotikaprophylaxe und eine gute Muskeldeckung des Implantates.

1.1.3 Silber

Um Früh- und Spätinfektionen weiter zu verringern hat sich in den letzten Jahren die Applikation von Silber, d.h. die Beschichtung der Fremdoberflächen mit verschiedenen Arten von Silber etabliert. Bei hoher bakterizider Wirksamkeit gegen Bakterien und Pilze besitzt Silber nur eine geringe lokale und systemische Toxizität³⁴.

Als Infektionsprophylaxe wird Silber schon seit dem Altertum benutzt. Bereits Herodot (ca. 450 v. Chr.) und König Cyrus (601-530 v. Chr.) erwähnte die bakterizide Wirkung von Silber. So wurden größere Wasserreserven für das Heer von König Cyrus in Silberkrügen transportiert. Auch aus dem alten Ägypten sind Überlieferungen bekannt in denen aus Silber gefertigte Folien erwähnt werden, die zur Wundabdeckung verwendet wurden. Dieses Prinzip der Wundversorgung wird noch heute angewandt⁷².

Die positiven Eigenschaften von Silber werden in den verschiedensten Bereichen genutzt. Kontaktflächen von Türklinken, Kühlschränken und Hygieneartikeln erhalten Beschichtungen mit Silberpartikeln. Auch Tabletten zur Wasseraufbereitung (Camping/Outdoor) enthalten Silber zur Dezimierung von Keimen.

Ursächlich für die bakterizide Wirkung ist der oligodynamische Effekt einiger Metalle, der bei Silber besonders effektiv ist⁶¹ und daher auch in der Medizin genutzt wird (zentralvenöse Gefäßkatheter, Harnwegskatheter, Verbandsmaterialien, Gefäßprothesen, Knochenzement, Herzklappen etc.). Erstmals Erwähnung fand der oligodynamische Effekt durch den Schweizer Botaniker Carl Wilhelm von Nägeli (1817-

1891). Er beschrieb das Absterben von Mikroorganismen in Wasser, welches mit Metallen in Berührung kommt ⁶¹. Beim oligodynamischen Effekt handelt es sich um die Freisetzung ionisierten Silbers. Aus dessen Eigenschaften ergeben sich verschiedene Mechanismen, die zur Abtötung des Bakteriums führen.

Silberionen besitzen die Fähigkeit an Zellmembranen, Enzymen, Nukleinsäuren und Komponenten im Cytosol zu binden ¹⁷. Dadurch kommt es zu irreversiblen/er Funktionsverlust/-einschränkung verschiedener Proteine, Enzyme und Membrankanäle. Desweiteren binden Silberionen an die bakterielle DNA und greifen somit in die Proteinbiosynthese des Bakteriums ein. Die Inhibierung der bakteriellen Atmungskette ist ein weiterer Angriffspunkt. Silberionen schränken hier die Sauerstoffaufnahme der Mikroorganismen stark ein ¹⁵.

Durch oben genannte Mechanismen besitzt Silber großes toxisches Potential gegenüber Keimen bei gleichzeitig geringem toxischem Potential gegenüber tierischen Zellen ³⁴.

Bereits in niedrigen Konzentrationen (35 parts per billion) zeigt sich die bakterizide Wirkung im therapeutischen Sinne ²². Das Wirkspektrum erstreckt sich dabei auf eine Vielzahl von Bakterien und auch Pilzen ¹⁷. Eine toxische Wirkung für humane/tierische Zellen wird erst bei wesentlich höheren Konzentrationen (300-1200 parts per billion) beschrieben ⁷⁴.

Mögliche Nebenwirkungen des eingebrachten Silbers ist die lokale und systemische Argyrie. Bei der Argyrie handelt es sich um eine grauschiefrige Verfärbung der Haut und Schleimhaut durch Silbereinlagerung nach längerer Einnahme silberhaltiger Präparate, beziehungsweise durch Verbleiben von silberbeschichteten Fremdkörpern (z.B. Endoprothesen) im menschlichen Organismus ⁶⁸. Ablagerungen in Form von Silbersalzen

konnten zudem in Organen wie Haut, Mundschleimhaut, Hornhaut, Leber und Niere beobachtet werden. Die Behandlung mit verschiedenen Silberverbindungen in hohen Konzentrationen führte zu Argyrie, Leukopenien, Nervengewebsschäden, Linsenveränderungen, toxischen Leber- und Nierenschäden⁷⁷. Entzündungsreaktionen und Fremdkörpergranulome, basierend auf Silbereinschlusskörperchen, wurden zwar beschrieben, sind aber als Raritäten anzusehen.

Nicht direkt als Nebenwirkung, aber als unerwünschtes Ereignis können Resistenzbildungen von Bakterien auftreten. Häufigster Mechanismus ist die Ausbildung von Metallionenpumpen. Diese befähigen die Bakterienzelle dazu die Silberionen mittels ATPase oder über einen membranpotenzialabhängigen Kation/Proton-Antiporter aus der Zelle auszuschleusen².

1.1.4 Prinzipien der knöchernen Integration von Fremdmaterial

Im Rahmen der stabilen und dauerhaften Integration eines Implantates in vitales Knochengewebe wird das sogenannte Interface als wichtiger Faktor angesehen. Als Interface wird der Raum, beziehungsweise die Kontaktfläche zwischen Knochen und Implantat bezeichnet.

Zu einer stabilen Verbindung zwischen Knochen und Fremdmaterial kommt es bei direktem Kontakt zwischen Osteoblasten und Implantatoberfläche. Als Ausdruck völliger Integration findet man somit ein direktes Anwachsen von Knochenzellen an die Fremdoberfläche, ohne dass eine bindegewebige Zwischenschicht vorliegt⁴⁵. Branemark und Albrektsson prägten in diesem Zusammenhang den Begriff Osseointegration^{3, 16, 51}. Albrektsson und Johansson (2001) differenzierten diesen Integrationsprozess weiter und beschrieben drei Phasen: Osteoinduktion, Osteokonduktion und Osteointegration.

Die Osteoinduktion beschreibt die Einwanderung und Differenzierung mesenchymaler Stammzellen ⁵⁵ mit resultierender Knochenneubildung (Osteoneogenese) ⁴.

Bei der Osteokonduktion handelt es sich um die Phase der Zellverteilung und des Knochenwachstums auf der Implantatoberfläche. Das umliegende Gewebe mit Osteoprogenitorzellen und sprossenden Kapillaren nähert sich dem Implantat an. Durch Bewegungen im Zellverband kommt es zu Spannungserhöhung in der zuvor gebildeten Fibrinmatrix. Abhängig von der Beschaffenheit der Implantatoberfläche (rau oder glatt) lösen sich Zellen oder bleiben haften ²⁴. Nach Ausdifferenzierung der Zellen, beginnen sie mit der Produktion von Osteoid ²⁴. Je nach Entfernung der Zelle zum Implantat befindet sich das Osteoid mit diesem in direktem Kontakt oder nicht.

Stehen nach dem Ablauf der ersten zwei Phasen mehr als 60% der Implantatoberfläche mit Knochengewebe in direktem Kontakt, wird dies als Osseointegration bezeichnet ⁴. Der primär gebildete Geflechtknochen wird durch Remodelling (physiologischer Umbauprozess, der sich nach der vorherrschenden Belastung richtet) zu lamellären Knochen umgebaut und so das Implantat stabil in das biomechanische Gefüge des Knochens integriert ⁶⁹. Diese Festigkeit bezeichnet man als Sekundärstabilität, welche für die Belastungen im täglichen Leben erforderlich ist.

1.2 Hypothese

Bei zusätzlicher antiinfektiöser Wirkung wird ein mit Silber beschichteter Schaft einer Hüftendoprothese nach 12 Monaten ebenso gut in den Knochen integriert wie ein herkömmlicher Schaft aus Titan.

2 Material und Methoden

2.1 Modell

Voraussetzung für ein geeignetes Versuchsmodell ist, dass die zu testenden Parameter erfasst werden können und den tatsächlich im menschlichen Körper stattfindenden Prozessen entsprechen.

In dieser Arbeit soll ein Modell entworfen und genutzt werden, welches die Endoprothetik beim Menschen möglichst exakt repräsentiert.

Da in Tierkliniken der Hüftgelenkersatz bei Hunden ein inzwischen häufiger und gut etablierter Eingriff ist, wurde in diesem Versuch die Hüftendoprothese ausgewählt. Hierdurch können Verfälschungen des Ergebnisses im Rahmen einer Lernkurve vermieden werden.

Zudem sollte das Versuchstier anatomisch mit dem Menschen vergleichbar sein, um makroskopisch eine möglichst identische Krafteinleitung in den Oberschenkelknochen zu erzeugen. Histologisch-anatomisch sollten ebenfalls vergleichbare Strukturen (ähnliche Blutversorgung und Osteonenaufbau) vorliegen.

Der Hund erweist sich hierfür als das geeignete Versuchstier⁶⁴. Die Struktur des Knochens ist dem des Menschen, im Vergleich mit anderen Spezies, sehr ähnlich^{1, 26}. Hundeknochen weisen eine sekundäre Osteonenstruktur auf, wie sie auch beim Menschen vorkommt. Kaninchen, Schafe und andere Huftiere weisen nur die primäre Osteonenstruktur auf. Besonders im Gefäßverteilungsmuster wird der Unterschied deutlich. Bei Mensch und Hund entspringen nutritive Gefäße baumartig aus den Markraumarterien. Tiere mit primärer Osteonenstruktur weisen hingegen eine netzwerkartige Struktur des intraossären Gefäßsystems auf, die mit der periostalen Oberfläche

verbunden ist. Im Gefäßnetz auftretende Schäden können wesentlich besser toleriert werden, was zu einem schnelleren und nicht mit dem Menschen vergleichbaren Regenerationsprozeß führt. Somit hat sich auf internationaler Ebene bei Fragestellungen zur Knocheneinheilung der Hund als Versuchstier etabliert^{9, 39, 42, 53, 54, 58, 64}.

2.2 Die Versuchstiere

Als Versuchstiere wurden Hunde der Rasse “Beagle” (Züchter: Harlan-Winkelmann GmbH, Germany) genutzt.

Alle Tiere waren weiblichen Geschlechts. Das durchschnittliche Alter lag bei 3,5 Jahren, das ungefähre Körpergewicht bei 18 Kilogramm. Bei einem Alter von 3,5 Jahren gelten Beagle als ausgewachsen, so dass Komplikationen durch Wachstum im Prothesenlager ausgeschlossen werden konnten.

Gerade der Beagle eignet sich aufgrund seines ruhigen Gemütes besonders gut als Versuchstier. Übermäßiges postoperatives laufen und springen würde das Einwachsen der Prothese gefährden und dem Verhalten eines frisch operierten menschlichen Patienten nicht entsprechen.

2.3 Versuchsgruppen

Die gesamte Versuchsgruppe bestand aus 20 weiblichen Hunden. Jedem Hund wurde jeweils eine Hüftendoprothese implantiert.

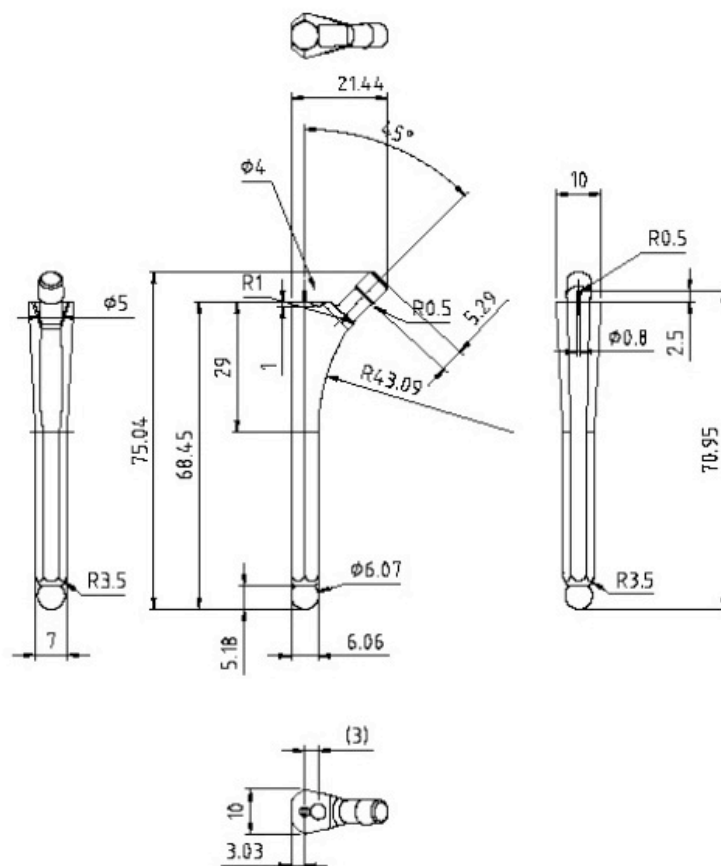
Es erfolgte eine durch würfeln randomisierte Aufteilung in 2 Gruppen (Gruppe A und Gruppe B). Gruppe A enthält 10 Tiere mit einer silberbeschichteten Hüftendoprothese, Gruppe B beinhaltet 10 Tiere mit der herkömmlichen Titanprothese.

Eine weitere Randomisierung entschied über die Implantation in den rechten oder linken Hinterlauf.

Pro Tag wurde jeweils ein Tier pro Gruppe operiert. Um eine Verfälschung der Ergebnisse im Rahmen einer "learning curve" zu vermeiden, wurde die OP-Reihenfolge ebenfalls für jeden Tag randomisiert.

2.4 Die Prothese

Im Rahmen dieser Studie wurden zwei Prothesen verwendet. Diese unterschieden sich lediglich durch die Oberflächenbeschichtung. Die Grundkonstruktion war bei beiden Prothesen identisch.



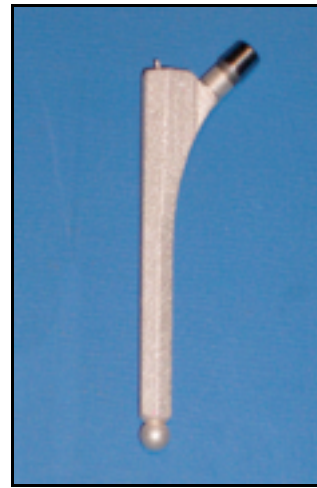
(Abb.1: Konstruktionszeichnung der Prothese Fa. Implantcast, Buxtehude)

Entwickelt wurde die Prothese durch die Firma Implantcast (Implantcast, Buxdehude, Lüneburger Schanze 26, Germany).

Das Design ist auf die Anatomie und Biomechanik des Hundes hin entwickelt. Die größten Unterschiede zur beim Menschen benutzten Prothese sind die Größe und Länge. Zum anderen werden beim Menschen, bei primärer Implantation, zumeist metaphysär verankernde Prothesen benutzt. Die hier eingesetzte Prothese verankert sich diaphysär.



(Abb. 2: Titanprothese)



(Abb. 3: Silberprothese)

herkömmliche Titanprothese:

Diese bestand aus einer Aluminium-Vanadium-Legierung (TiAl4A6).

Die Oberfläche wurde mittels Korundstrahl aufgeraut, um eine Vergrößerung der Oberfläche zu schaffen.

silberbeschichtete Prothese:

Diese war baugleich mit der Titanprothese, und wurde zusätzlich mit einer Oberflächenbeschichtung versehen.

Bevor die eigentliche Beschichtung mit Silber durchgeführt werden konnte, wurde eine Beschichtung der Titanoberfläche mit einer dünnen

Goldschicht vorweg durchgeführt. Die Dicke der Schicht betrug 0,2 Mikrometer mit einer Schwankungsbreite von +/- 20%. Das Auftragen des Edelmetalls Gold (Au) erfolgte, um als Kathode in einem galvanischen Element mit dem Silber zu fungieren. Eine reine Silberbeschichtung hätte zur Folge, dass sich das unedlere Titan anstatt des Silbers in Lösung begeben würde. Bei Umkehrung in der elektrochemischen Reihe, erfolgt hier die Freisetzung von Silber wie es intendiert ist. Erst bei völligem Aufbrauchen der Silberschicht kommt es ggf. zum Freiwerden von Titanionen.

Als Verfahren zur Goldbeschichtung wurde die Sputterdeposition genutzt. Hierbei handelt es sich um eine hochvakuumbasierte Beschichtungstechnik, bei der Atome aus einem Festkörper (Target) durch Beschuss mit energiereichen Ionen gelöst werden, in Gasphase übergehen und dann auf dem zu beschichtenden Gegenstand kondensieren.

Hierzu befinden sich das Target (hier: Goldtarget aus Au 99,79 Gew.% und Co 0,2 Gew. %) und das Substrat (hier: Titanprothese) in einem Vakuumbehälter. Target und Substrat fungieren als Kathode und Anode. Wird unter dem Target noch ein Magnet angebracht, spricht man auch von Magnetronzerstäubung. Zwischen Kathode und Anode wird eine Gleichspannung erzeugt. In das Vakuum eingebrachte positive Argonionen schlagen aus dem Target Atome heraus, die dann zum Substrat wandern und dort kondensieren.

Durch die Sputterdeposition kann eine sehr reine, dünne und feste Beschichtung erreicht werden.

Die eigentliche Implantatbeschichtung aus Silber wurde mittels Galvanisierung/Galvanotechnik aufgebracht. Bei der Galvanotechnik befindet sich das aufzutragende Metall (hier: Silber) mit dem zu

beschichtendem Gegenstand (hier: Prothese) in einem Elektrolysebad. Das Silber befindet sich an der Anode (Pluspol), die Prothese an der Kathode (Minuspole). Es wird Strom durch das elektrolytische Bad geleitet, welcher Metallionen von der Verbrauchselektrode (= Anode) löst. Diese legen sich durch Reduktion auf die Prothese an der Kathode ab.

Die Schichtdicke des aufzutragenden Metalls kann durch die Stromstärke und den Aufenthalt im Elektrolysebad bestimmt werden.

Die Silberschicht auf den verwendeten Implantaten betrug 10 Mikrometer (Abweichung +/- 5 Mikrometer). Der Reinheitsgrad betrug 99,7 %.

2.5 Die Operation

Hüftoperationen am Hund werden an der Tierärztlichen Hochschule Hannover und an der Technischen Universität München sehr häufig und als standardisierter Eingriff durchgeführt.

Die angewandte Operationstechnik ist derzeitiger Goldstandard und hat keinen experimentellen Charakter.

Präoperativ:

Die Hunde bekamen ab dem Abend des präoperativen Tages keine Nahrung mehr. Kurz vor der Operation erhielten die Tiere zur Beruhigung Diazepam oder Azepromacin intramuscular.

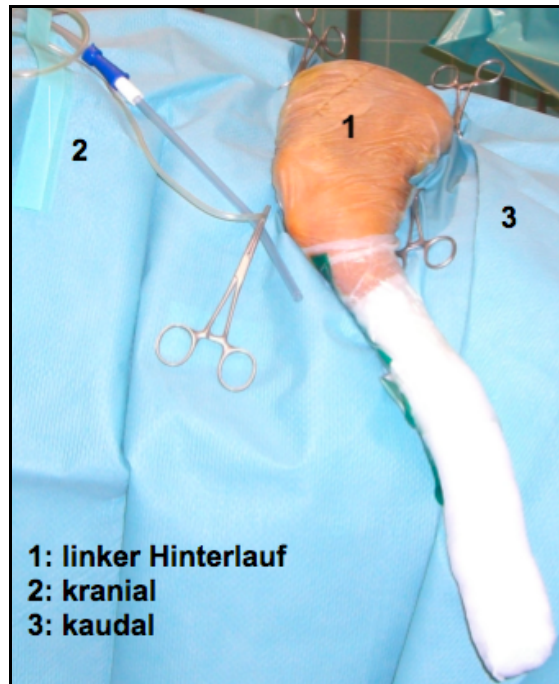
Desweiteren wurde Atropin zur Verringerung der Speichelproduktion verabreicht. Ein venöser Zugang zur Volumensubstitution und Verabreichung der Narkosemedikamente wurde in die Vena cephalica gelegt.

Zusätzlich bekamen die Tiere einen Singleshot Enrofloxacin (10mg/kg Körpergewicht) i.v.. Diese Antibiose wurde oral bis zum zweiten

postoperativen Tag weitergeführt.

Operiert wurde jeweils ein Hund pro Gruppe, pro Tag.

Nach Einleitung der Narkose (Intubationsnarkose mit Propofol und Isofluran) erfolgte das Scheren und Desinfizieren des OP-Gebietes.



(Abb. 4: Hund steril abgedeckt)

Darauf folgend konnte die Operation am Hinterlauf des Hundes beginnen. Gruppenabhängig wurde in den randomisiert ausgewählten Hinterlauf eine Titan-Prothese bzw. ein mit Silber beschichtetes Implantat eingebracht. Hierzu wurde in einer lateralen Inzision die Haut über dem Musculus vastus lateralis eröffnet und die Muskulatur zwischen Flexoren und Extensoren stumpf voneinander getrennt. Nach Freilegung des Femurs erfolgte die Osteotomie im Bereich der Fossa intertrochanterica.

Nach Aufbohrung des Markraumes mit 0,5mm Untermaß, konnte der Schaft zementfrei in press-fit-Technik verankert werden. Durch das press-fit-Verfahren verkantete sich das Implantat innerhalb der

diaphysären Femuranteile und gewährleistete somit die Primärstabilität der Schaftprothese.



(Abb. 5: Präparation des Femurs)

Nach Festlegung der geeigneten Offsetgröße und Reponieren des Hüftgelenks folgte die sorgfältige Faszien- und Subkutannaht. Die Haut wurde anschließend geklammert und steril verbunden.

Postoperativ wurden die Tiere zwei Wochen überwacht und physiotherapeutisch betreut.

Alle drei Monate wurde ein Kontrollröntgen der operierten Extremität durchgeführt.

365 Tage nach erfolgter Operation wurden die Tiere unter Vollnarkose mit einer Barbituratüberdosierung euthanasiert.

2.5.1 Drop out

Postoperativ mussten 3 Hunde komplett aus der Studie ausgeschlossen werden. Die Ursachen, die zum Ausschluß führten sind im Folgenden aufgelistet:

- 1x Bandscheibenprolaps mit folgender Fehl-/Minderbelastung der

operierten Extremität.

- 1x Hund an Bissverletzung durch Artgenossen verstorben
- 1x oberflächliche Wundinfektion mit beginnender Sepsis; Das Tier wurde infolgedessen eingeschläfert.

Ein weiterer Hund schied ebenfalls im Verlauf der Studie für den direkten Vergleich der beiden Prothesentypen aus, da er infektionsbedingt revidiert werden musste. Hierbei wurde die primäre Prothese ausgebaut und eine zementpflichtige Titanprothese implantiert.

2.6 Meßmethoden

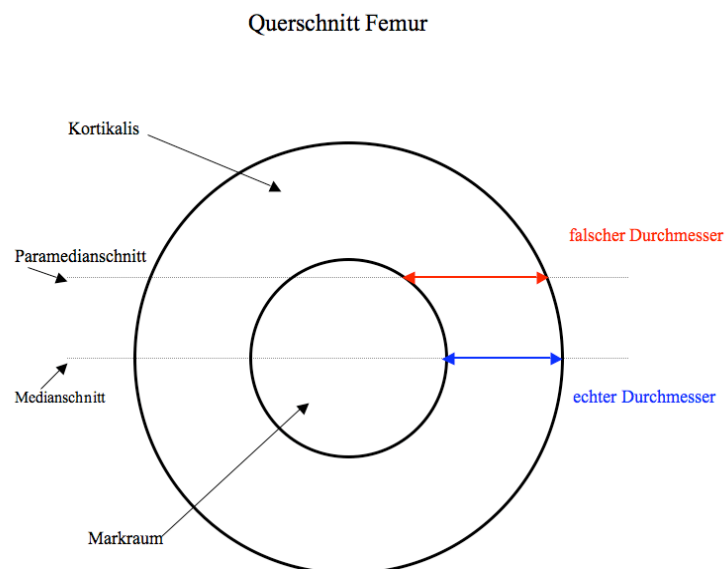
Im Rahmen der Studie wurden verschiedene Messungen und Untersuchungen vorgenommen. Hierzu zählen radiologische und laborchemische Untersuchungen, mechanische Testungen, sowie Herstellung und Auswertung histologischer Präparate. Diese Teilbereiche wurden von verschiedenen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe durchgeführt. Der Schwerpunkt dieser Arbeit lag im Bereich der histologischen Auswertung.

2.7 Histologische Untersuchungen

2.7.1 Materialgewinnung

Das verwendete Material für die histologischen Untersuchungen wurde nach Durchführung der biomechanischen Tests in folgender Art und Weise gewonnen, identifiziert und aufbewahrt:

Im Anschluss an die Pull-out Tests wurde aus dem metaphysären und diaphysären Implantatlager ein 1 cm langer Knochenblock mit 90 Grad Schnitfführung zur Femurlängsachse aus dem Knochen entnommen. Durch eine weitere Schnitfführung durch die Mitte des Knochenstücks (Medianschnitt), parallel zur Femurlängsachse, erhielt man im optimalen Fall ein Probenstück Mit Blick auf den Querdurchmesser beider Diaphysenseiten. Für eine reale Wiedergabe der Schichtdicken einzelner Gewebe ist der Medianschnitt wichtig (siehe Abb.6).



(Abb. 6: Querschnitt durch Femur)

Jeder der angefertigten Blöcke wurde einzeln in einem beschrifteten Probenbehälter in 97%iger Alkohollösung bis zur Durchführung der Probeneinbettung aufbewahrt.

2.7.2 Methodik der Gewebeeinbettung

Für die histologischen Untersuchungen der Knochenproben werden, im Rahmen dieser Arbeit, zwei unterschiedliche Einbettungsverfahren

angewandt. Hierbei handelt es sich zum einen um eine Einbettung in Paraffin (Paraplast-PLUS), zum anderen um Technovit (Technovit 9100).

Technovit 9100:

Bei Technovit handelt es sich um ein Polymerisationssystem auf der Basis von Methylmethacrylat (MMA), das in Kälte aushärtet. Es ist geeignet für die Einbettung von mineralisiertem Gewebe und Weichgewebe zur histologischen, immun- und enzymhistochemischen Untersuchung.

Ein besonderer Vorteil von Technovit liegt in seiner Härte. Diese verhindert, dass auch nicht entkalkter Knochen beim Schneiden im Mikrotom nicht aus dem Probenblock gelöst wird. Der entfallende Schritt des Entkalkens ermöglicht eine Untersuchung des Knochens, der dem in vivo Zustand des Probematerials nahe kommt.

Vorgehen bei der Gewebeeinbettung mit Technovit:

1. Das Gewebe wird für 12 Stunden in 4%igem Paraformaldehyd gelegt und somit fixiert. Es wird Paraformaldehyd 4%ig verwendet, da es schonend für die gewebeeigenen Antigene der Probe ist und somit eine gute Voraussetzung für die Immunhistologie darstellt.
2. Im Folgenden gibt man die Probe für 24 Stunden bei Raumtemperatur in den Sörensen Phosphatpuffer.
3. Weil Technovit nicht mit Wasser mischbar ist, muss das Gewebe nach der Fixierung entwässert werden. Dies geschieht mit Alkohol.

Um dem Gewebe das Wasser zu entziehen, wird es wie folgt in Alkoholbäder mit steigender Konzentration gegeben. Ein sofortiges Einbringen der Probe in ein 100%iges Alkoholbad würde zu einer Verformung und Schädigung des Gewebes führen.

In 70 %igen Alkohol für 1 x 7 Tage

In 80 %igen Alkohol für 2 x 7 Tage

In 90 %igen Alkohol für 2 x 7 Tage

In 100 %igen Alkohol für 3 x 7 Tage

Im mangelhaft entwässerten Gewebe entstehen sogenannte Lunkerstellen, die aus weißem Perlpolymerisat bestehen und das Schneiden sowie die Schnittqualität negativ beeinträchtigen. Um dies zu verhindern wurden die Einwirkzeiten der Probengröße angepasst.

Anschließend wird die Probe noch für 2 x 10 Stunden in Xylol gelegt. Xylol ist ein Lösungsmittel. Es wäscht den Alkohol aus und entfettet das Gewebe.

4. Um das Gewebe in das eigentliche Technovit Polymer einbetten zu können, muss es zuerst eine vierstufige Vorbereitung (Präinfiltration 1-3 und Infiltration) durchlaufen. Hierzu wird die Probe nacheinander in folgende Medien gegeben.

Präinfiltration 1:

Die Präinfiltrationslösung 1 besteht aus 100ml stabilisierter Basislösung und 100ml Xylol. Die Probe verweilt bei Raumtemperatur für 7 Tage in dieser Lösung.

Präinfiltration 2:

Die Präinfiltrationslösung 2 besteht aus 200ml stabilisierter Basislösung und 1g Härter 1. Die Probe verweilt bei Raumtemperatur für 7 Tage in dieser Lösung.

Präinfiltration 3:

Bevor die Präinfiltrationslösung 3 angemischt werden kann, muss die Basislösung zuerst entstabilisiert werden. Dies geschieht mit Hilfe einer Chromatographiesäule die mit 50 g Aluminiumoxid gefüllt ist. Nachdem die Basislösung den Chromatographen durchlaufen hat, kann sie entstabilisiert entnommen werden. Die Entstabilisierung bewirkt, dass der endgültig gegossene Probekblock nicht zu hart wird und schneidbar bleibt. Die Präinfiltrationslösung 3 besteht aus 200ml entstabilisierter Basislösung und 1g Härter 1. Die Probe verweilt bei 4°C für 7 Tage in dieser Lösung.

Infiltration:

Die Infiltrationslösung besteht aus 250ml entstabilisierter Basislösung, 1g Härter 1 und 20g PMMA-Pulver. Auch in dieser Lösung verweilt die Gewebeprobe für 7 Tage bei 4°C.

5. Sind die oben aufgeführten Schritte durchlaufen, kann nun die eigentliche Einbettung beginnen. Hierzu werden zwei Stammlösungen (A und B) verwandt. Diese werden im Verhältnis 9 Volumenteile A und 1 Volumenteil B gemischt.

Die einzubettende Probe wird in die Einbettform gelegt und mit dem Polymerisationsgemisch (Stammlösung A + B) übergossen.

Die Einbettform wird nun in einen vorgekühlten Exsikkator gestellt und so lange unter Vakuum gehalten, bis keine Blasen mehr aufsteigen.

Um eine komplette Aushärtung des Probekblocks zu gewährleisten, wird er für zwei Tage bei einer Temperatur von 0-2°C aufbewahrt.

Nachdem man den Probekblock aus der Einbettform entnommen hat, kann er am Mikrotom beschnitten werden.

Paraplast-PLUS:

Paraffin bezeichnet ein Gemisch aus gesättigten Kohlenwasserstoffen (Alkanen). Es hat eine wachsartige Konsistenz und ist Wasser abstoßend. Seit Jahrzehnten bewährt sich Paraffin als Einbettungsmedium.

Vorgehen bei der Gewbeeinbettung mit Paraplast-PLUS:

1. Das Gewebe wird für 24 - 48 Stunden in 4%igem Paraformaldehyd gelegt und somit fixiert. Es wird Paraformaldehyd 4%ig verwendet, da es nicht die Antigene der Probe zerstört und somit eine gute Voraussetzung für die Immunhistologie darstellt.
2. Nach der Fixierung wird das Gewebe für 24 h bei Raumtemperatur auf einem Schwenker in Sörensen-Phosphatpuffer (pH 7,4) gelagert. Die Pufferlösung wird alle acht Stunden erneuert.
3. Weil Paraffin nicht mit Wasser mischbar ist, muss das Gewebe nach der Fixierung entwässert werden. Dies geschieht mit Alkohol nach folgendem Schema:

In 70%igen Alkohol für 24 Stunden

In 90%igen Alkohol für 24 Stunden

In 96%igen Alkohol für 24 Stunden

In 100%igen Alkohol für 24 Stunden

Um nun wieder den Alkohol aus der Probe zu verdrängen wird diese nach der Alkoholreihe für mehrere Tage in Zedernholzöl gebettet.

5. Schließlich kann die Probe in Paraffin überführt werden. Auch hier muß eine Lösungsreihe mit ansteigender Konzentration durchlaufen werden, um das Gewebe nicht zu schädigen.

Zedernholzöl-Paraffingemisch (1:1) für 24 Stunden, bei 48°C

Paraffin 1 für 8 Stunden, bei 60°C

Paraffin 2 für 16 Stunden, bei 60°C

Paraffin 3 für 8 Stunden, bei 60°C

Paraffin 4 für 16 Stunden, bei 60°C

Paraffin 5 für 4 Stunden, bei 60°C

6. Hat das Gewebe die oben aufgeführten Schritte durchlaufen, kann es nun eingebettet werden.

Hierzu wird die Gewebeprobe mit der zu untersuchenden Seite nach unten in eine Einbettform gelegt und mit flüssigem, auf 60°C erwärmten, Paraffin übergossen. Ist der Probenblock ausgehärtet und aus der Form genommen, kann mit dem Schneiden am Mikrotom begonnen werden.

2.7.3 Schneiden am Mikrotom

Zum Schneiden der Probenblöcke wurde das Mikrotom RM 2145 der Firma Leica benutzt.

Nach Einspannen und Ausrichten des Probenblocks in die Haltevorrichtung wurden solange Schnitte abgetragen und verworfen, bis die Tiefe des Probenblocks erreicht war in der man einen Medianschnitt durch die Femurquerachse erlangt. Nur in dieser Schnittebene kann der reale Durchmesser verschiedener Gewebeschichten gemessen werden

(siehe *Abb.6*). Nach Erreichen der relevanten Schicht wurden mehrere Schnittpräparate (5µm Schichtdicke) angefertigt, auf einem Objektträger ausgelegt und mit einer Deckfolie fixiert. Es folgte die Beschriftung der Objektträger mit der Probennummer, um Verwechslungen zu vermeiden.

2.7.4 Die Färbungen

Alle Schnittpräparate wurden nach drei Färbemethoden angefärbt.

Hämatoxylin-Eosin-Färbung:

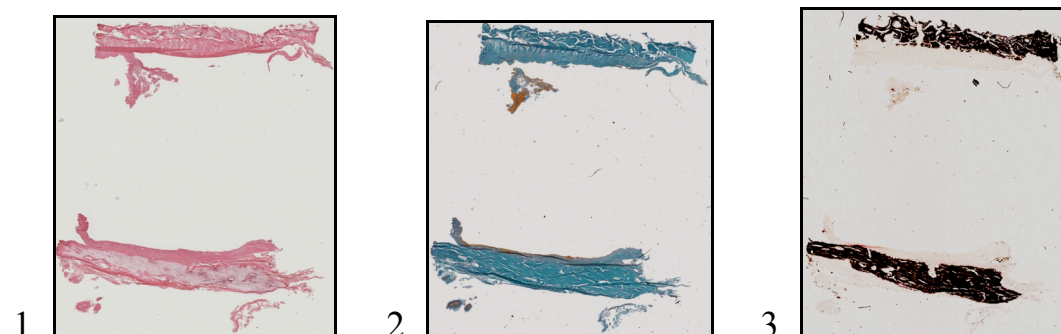
Sie ist gut geeignet als Übersichtsfärbung und für diesen Zweck die am häufigsten verwendete Färbung. Zellkerne zeigen sich blau-violett, Zellplasmae rote.

Färbung nach Masson-Goldner:

Diese Färbung eignet sich gut zur Darstellung von Bindegewebe und Mukos/Schleim. Beides wird grün-bläulich angefärbt.

Färbung nach van Kossa:

Die Van-Kossa-Färbung erbringt den Nachweis kalkhaltiger und kalkproduzierender Zellen und ist spezifisch für Osteoblasten. Diese werden hierbei schwarz-bräunlich angefärbt.



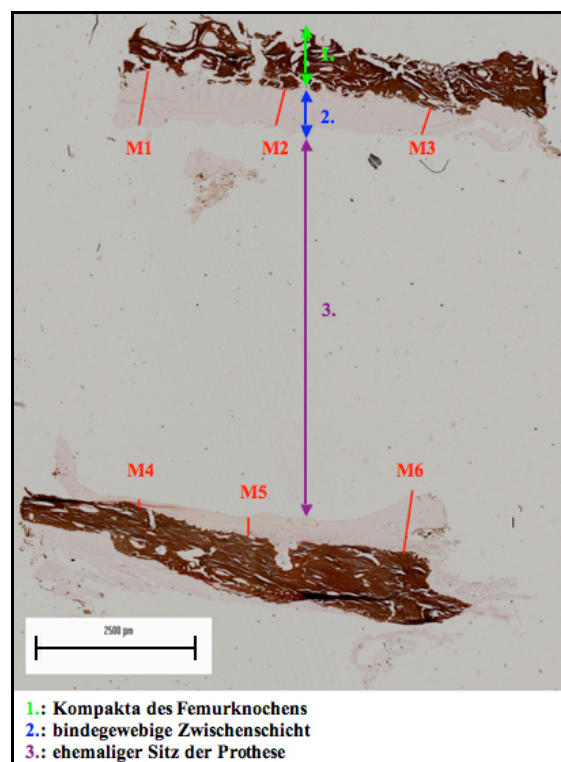
(*Abb.7: Probe 419 in 1.HE-Färbung, 2. Masson-Goldner-Färbung, 3. v.-Kossa-Färbung*)

2.7.5 Mikroskopie

Die fertigen Schnittbildpräparate wurden mit einem Olympus BX 51 Mikroskop unter 40 facher Vergrößerung ausgewertet.

Von allen 16 Proben wurden Übersichtsaufnahmen in 40facher Vergrößerung angefertigt und regions of interest (ROI) am Interface nach Zufall gesetzt und das Interface auf Osseointegration untersucht (siehe Ergebnisse 3.1.3., Tab.1)

Anschließend wurde an den Schnittpräparaten aller 16 Proben an sechs, in etwa gleichen Abständen ausgewählten Bereichen des Interfaces die Schichtdicke der bindegewebigen Matrix gemessen (siehe Abb.8). Aus diesen sechs Messungen wurde der jeweilige Mittelwert und Median, Standardabweichung, Minimum- und Maximumwert ermittelt (Siehe Ergebnisse 3.2.1., Tab.2).



Probe 419 in 40facher Vergrößerung, van Kossa Färbung
(Abb. 8: Schichtdickenmessung kollagene Matrix)

2.7.6 Methodenkritik

zur Operation und Entnahme:

Bei der Implantation kam es in zwei Fällen zu Fissuren im knöchernen Lager. Die Knochen wurden mit Draht Cerclagen und Osteosyntheseplatten versehen. Diese Tiere wurden trotzdem ausgewertet, da nur 20 Tiere an dem Versuch teilnahmen. Um aus tierschutzrechtlichen Gesichtspunkten eine möglichst geringe Menge an Tieren zu verwenden und da mit dieser Anzahl von Tieren bereits signifikante Ergebnisse erzielt werden konnten, wurde auf das Ausschöpfen der genehmigten Anzahl der Tiere (26 Stück) verzichtet.

Der per Konusverbindung befestigte Kugelkopf musste vom Implantat gelöst werden. Mittels zweier Zangen, die ausschließlich am Implantatkörper angriffen, um keinen Zug auf den Knochen auszuüben, konnte die Konusverbindung gelöst werden. Hierbei wurde das Implantat im Lager erschüttert. Das Entfernen des Kugelkopfes war jedoch unerlässlich.

zur histologischen Präparation und Auswertung:

Die Proben für die histologische Untersuchung wurden nach den pull-out Tests entnommen. Die bei den mechanischen Testungen entstandenen Kräfte müssen bei der Betrachtung und Auswertung des Interface berücksichtigt werden. Es ist bekannt, dass an den Titanprothesen Knochenmaterial haften geblieben ist. Daraus ist abzuleiten, dass die unter dem Mikroskop betrachtete Grenzfläche zwischen Knochen und Implantatlager nicht dem reellen Interface entspricht. Das Anhaften des

Knochens am ausgerissenen Implantat spricht für eine stattgehabte Osseointegration.

Eine Analyse der direkten Osteoblasteninteraktion mit der Implantatoberfläche konnte nach stattgehabten pull-out-Tests nicht durchgeführt werden.

Da an mehreren Probestücken beim Zuschneiden Beschädigungen auftraten, konnte die Anfertigung des Schnittpräparates nicht immer aus dem Medianschnitt erfolgen. Starke Abweichungen konnten aber vermieden werden.

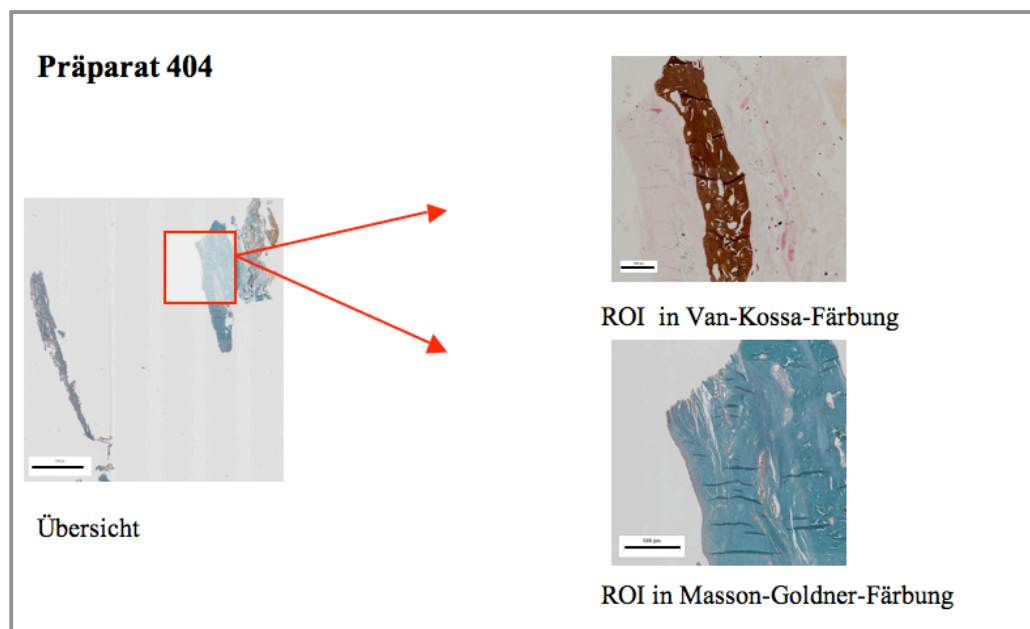
3 Ergebnisse

3.1 **Übersichts- u. Detailaufnahmen der Schnittpräparate**

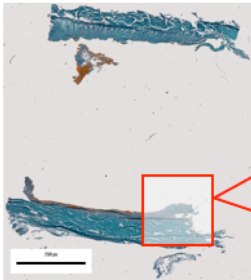
Die Rahmen der einzelnen Proben zeigen jeweils auf der linken Seite ein Übersichtsbild in Masson-Goldner-Färbung, in dem eine “region of interest“ (ROI) durch einen roten Kasten gekennzeichnet ist. Dieser Bereich wird auf der rechten Seite in Masson-Goldner-Färbung und Van-Kossa-Färbung vergrößert dargestellt.

Die Im-Bild-Maßstäbe in den Übersichtsbildern haben eine Länge von 2500 μ m. In den ROI-Bildern entsprechen die Im-Bild-Maßstäbe einer Länge von 500 μ m.

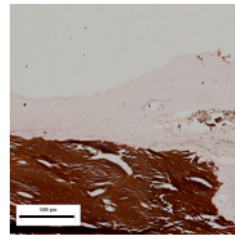
3.1.1 **Histologie Silberprothesen**



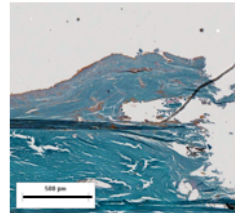
Präparat 419



Übersicht

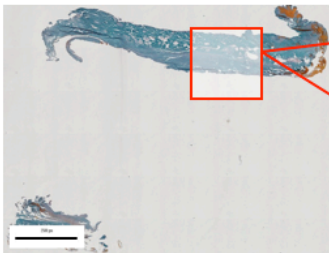


ROI in Van-Kossa-Färbung

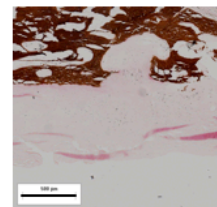


ROI in Masson-Goldner-Färbung

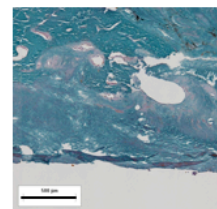
Präparat 516



Übersicht

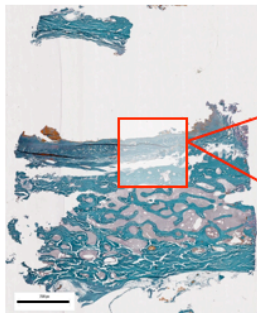


ROI in Van-Kossa Färbung

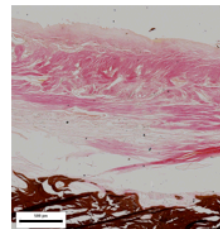


ROI in Masson-Goldner-Färbung

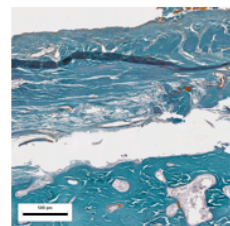
Präparat 551



Übersicht

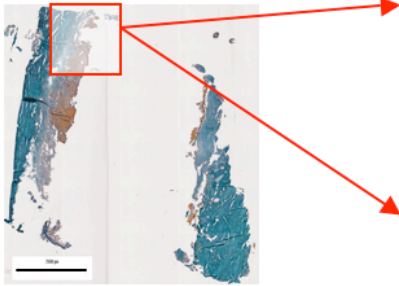


ROI in Van-Kossa-Färbung

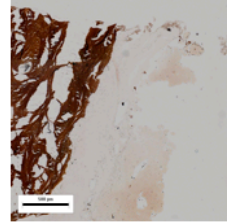


ROI in Masson-Goldner-Färbung

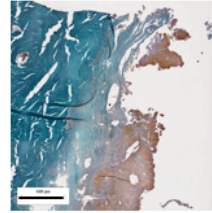
Präparat 1146



Übersicht

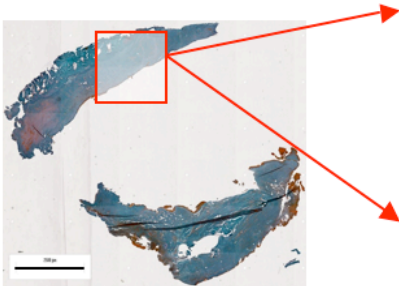


ROI in Van-Kossa-Färbung

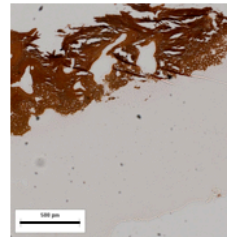


ROI in Masson-Goldner-Färbung

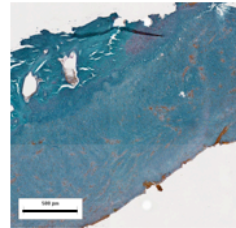
Präparat 1200



Übersicht

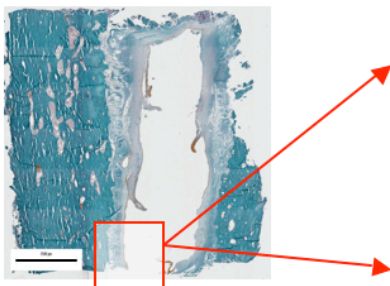


ROI in Van-Kossa-Färbung

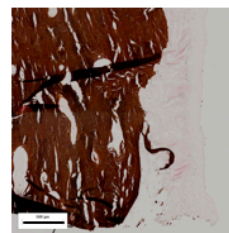


ROI in Masson-Goldner-Färbung

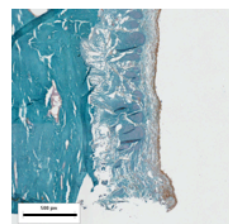
Präparat 1204



Übersicht

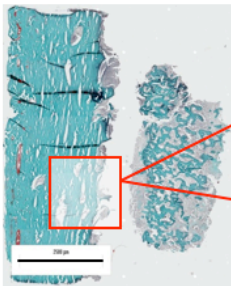


ROI in Van-Kossa-Färbung

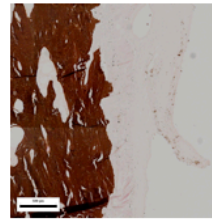


ROI in Masson-Goldner-Färbung

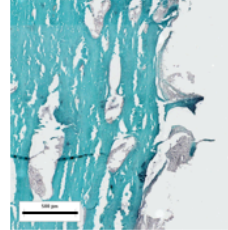
Präparat 1311



Übersicht

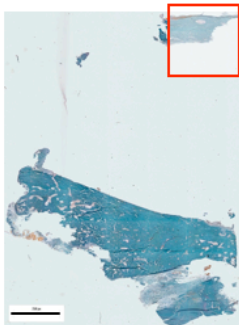


ROI in Van-Kossa-Färbung

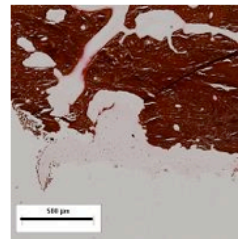


ROI in Masson-Goldner-Färbung

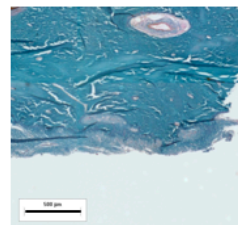
Präparat A



Übersicht

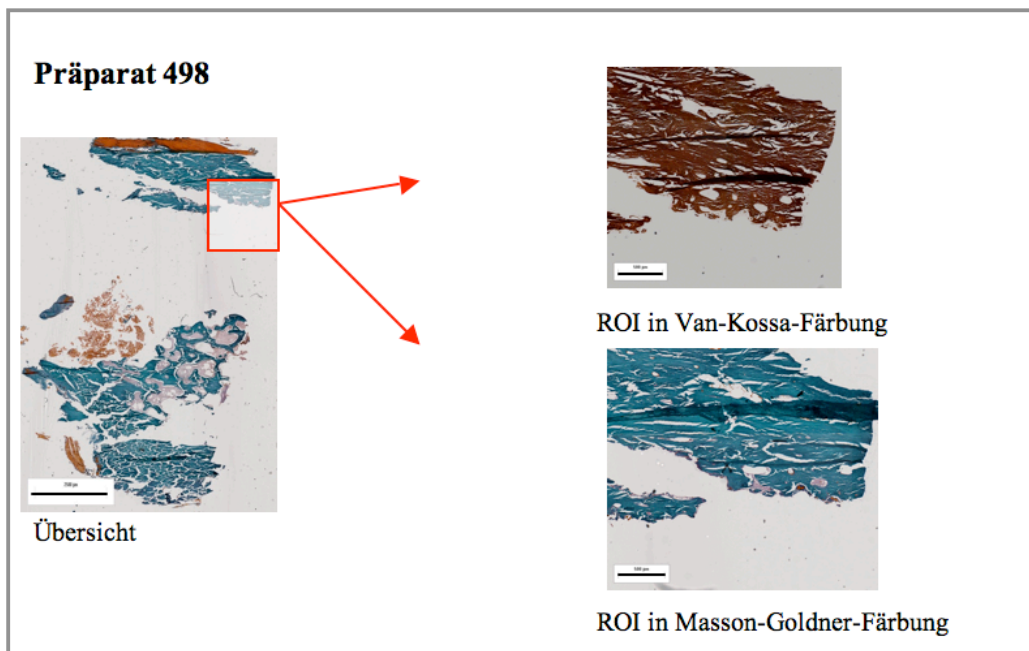
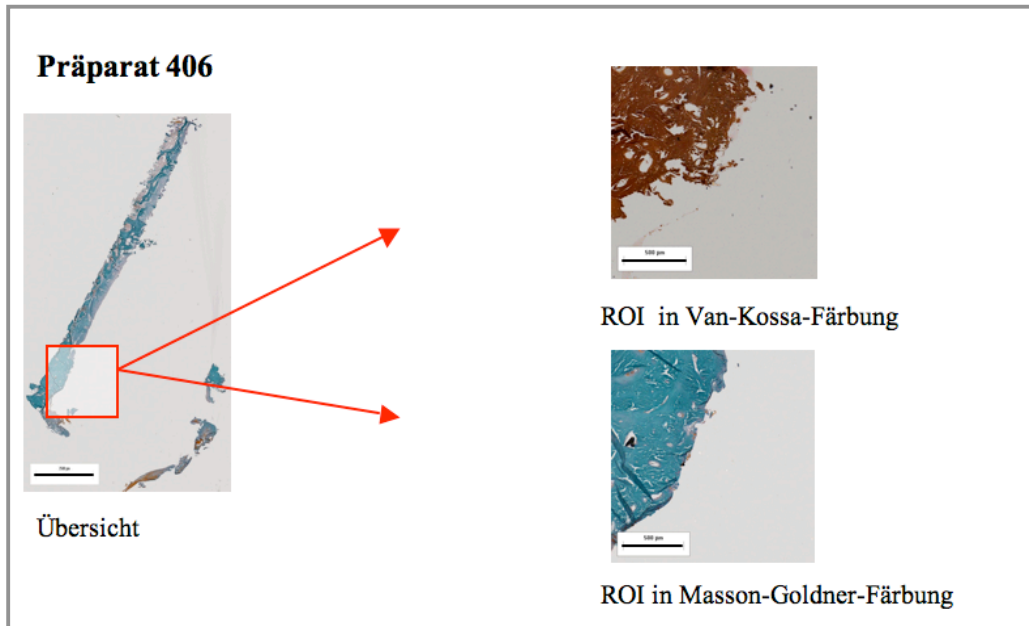


ROI in Van-Kossa-Färbung

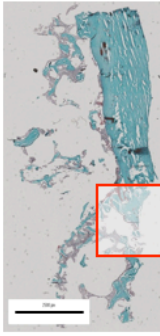


ROI in Masson-Goldner-Färbung

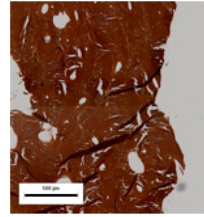
3.1.2 Histologie Titanprothesen



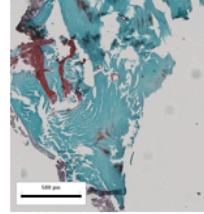
Präparat 713



Übersicht



ROI in Van-Kossa-Färbung

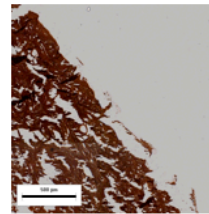


ROI in Masson-Goldner-Färbung

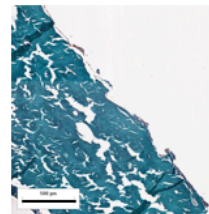
Präparat 820



Übersicht

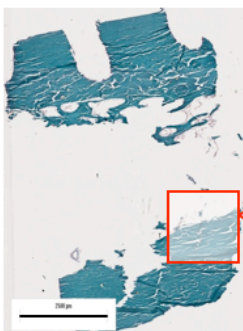


ROI in Van-Kossa-Färbung

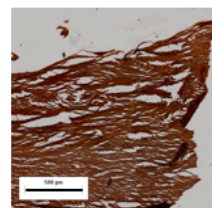


ROI in Masson-Goldner-Färbung

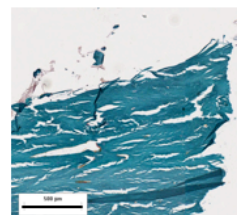
Präparat 1199



Übersicht

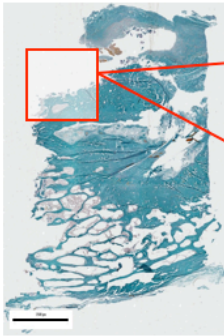


ROI in Van-Kossa-Färbung

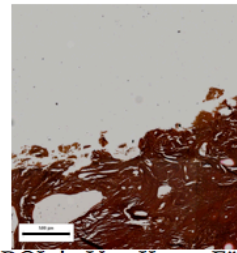


ROI in Masson-Goldner-Färbung

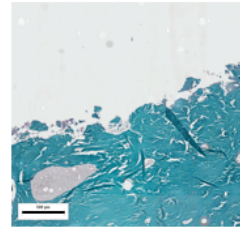
Präparat 1812



Übersicht

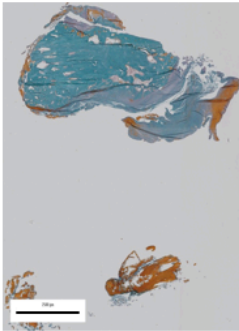


ROI in Van-Kossa-Färbung



ROI in Masson-Goldner-Färbung

Präparat E



Übersicht

Lokalisation des Interface nicht möglich

Wie in den oben dargestellten histologischen Bildern zu sehen, findet sich bei keiner der mit Silber beschichteten Prothesen ein direkter Kontakt zwischen Knochen und Implantat. Eine Osseointegration ist nicht nachzuweisen. Stattdessen umgibt eine bindegewebige Matrix das Implantat und trennt dieses vom umliegenden Knochen.

Die folgende Tabelle legt die mikroskopisch erhobenen Ergebnisse dar:

3.1.3 Tabellarische Auflistung Interface

Probe	Direkter Knochenkontakt	Kollagene Zwischenschicht
404 (Silber)	nein	ja
419 (Silber)	nein	ja
516 (Silber)	nein	ja
551 (Silber)	nein	ja
1146 (Silber)	nein	ja
1200 (Silber)	nein	ja
1204 (Silber)	nein	ja
1311 (Silber)	nein	ja
A (Silber)	nein	ja
406 (Titan)	ja	nein
498 (Titan)	ja	nein
713 (Titan)	ja	nein
820 (Titan)	ja	nein
1199 (Titan)	ja	nein
1812 (Titan)	ja	nein
E (Titan)	nicht beurteilbar	nicht beurteilbar

(Tab.1: Ergebnisse Interface)

3.1.4 Chi-Quadrat-Test

Der Chi-Quadrat-Test wird zur Überprüfung von Häufigkeitsverteilungen eingesetzt, bei Variablen mit nominalem Skalenniveau. Mit dem Chi-Quadrat-Test untersucht man also Verteilungseigenschaften einer statistischen Grundgesamtheit. Jedes Versuchstier hat zwei Merkmale:

Osseointegration (ja/nein) und Prothesenmaterial (Titan/Titan-Silber). Mit dem Chi-Quadrat-Test wird die Hypothese überprüft, ob die beiden Merkmale voneinander unabhängig sind. Da beim Chi-Quadrat-Test nur Häufigkeiten verglichen werden, ist es bei diesem Test unerheblich, was als unabhängige und was als abhängige Variable angesehen wird.

Bei einer der Proben (Probe E) aus der Titangruppe konnte in der mikroskopischen Untersuchung das Interface nicht sicher identifiziert werden. Diese Probe wurde in der unten dargestellten Tabelle als nicht osseointegriert gewertet.

	Silberprothese	Titanprothese
osseointegriert (n)	0	6
nicht osseointegriert (n)	9	1

(Tab.2: Chi-Quadrat-Test)

Aus den vorliegenden Parametern ergibt sich ein p-Wert von **p<0,001**. Allgemein üblich ist es einen p-Wert von weniger als 0,05 mit "signifikant" und von weniger als 0,01 mit „hoch signifikant“ zu bezeichnen. In einigen Fällen werden p-Werte von weniger als 0,10 darüber hinaus "grenzwertig signifikant" genannt. Der Unterschied in der vorliegenden Berechnung ist also hoch signifikant. Daraus folgt, dass mit hoher Wahrscheinlichkeit in der Grundgesamtheit der Versuchstiere ein Zusammenhang zwischen der Osseointegration und dem implantierten Prothesenmodell existiert. Somit ist mit an Sicherheit grenzender Wahrscheinlichkeit davon auszugehen, dass die Titan-Silber Prothesen nicht osseointegrieren.

3.2 Schichtdickenbestimmung der kollagenen Matrix

3.2.1 Ergebnisse tabellarisch

Ps	M1	M2	M3	M4	M5	M6	Durschnitt	Median	min	max	Stabw
404	105,7	126,1	212,9	898	941,4	997,7	547,0	555,5	105,7	997,7	401,1
419	94,4	293,4	386,4	411,8	649,9	905,7	456,9	399,1	94,4	905,7	259,4
515	250,9	420,4	461,7	472,2	685,3	836,2	521,1	466,95	250,9	836,2	189,4
551	283,8	333,9	467,7	935,6	1192,8	1251,5	744,2	701,65	283,8	1251,5	398,3
1146	380,7	433,4	972,3	996,1	1261,8	1437,8	913,7	984,2	380,7	1437,8	391,8
1200	622,2	1008,9	1046,2	1216,8	1267,9	1565,5	1121,3	1131,5	622,2	1565,5	287,3
1204	450,7	451,9	818	1018,4	1804,3	1859,2	1067,1	918,2	450,7	1859,2	576,4
1311	133,5	146,9	153,7	213,7	261,8	568,2	246,3	183,7	133,5	568,2	150,6
A	21,1	162,6	167,5	203,8	410,6	504,7	245,1	185,65	21,1	504,7	163,0
PT											
406	0	0	0	0	0	0	0,0	0	0	0	0
498	0	0	0	0	0	0	0,0	0	0	0	0
713	0	0	0	0	0	0	0,0	0	0	0	0
820	0	0	0	0	0	0	0,0	0	0	0	0
1199	0	0	0	0	0	0	0,0	0	0	0	0
1812	0	0	0	0	0	0	0,0	0	0	0	0
E	0	0	0	0	0	0	0,0	0	0	0	0

Ps= Proben Silberprothesen, PT= Proben Titanprothesen, M= Messung, min= Minimalwert, max= Maximalwert, Stabw= Standartabweichung, Maßeinheit: μm

(Tab.3: Messungen der kollagenen Zwischenschicht)

3.2.2 Student t-Test:

Mit dem Student t-Test kann untersucht werden, ob die Mittelwertunterschiede, die man bei zwei Untergruppen festgestellt hat, signifikant sind und somit auch für die Grundgesamtheit gelten.

Die von uns erfaßten Messungen ergaben im student t-Test eine Wahrscheinlichkeit für ein zufälliges Zustandekommen von 0,07%. Das Ergebnis ist damit hoch signifikant ($p=0,0007$).

4 Diskussion

Das Ziel dieser Studie war zu untersuchen, ob eine mit Silber beschichtete Titanprothese ebenso gut in den Oberschenkelknochen osseointegriert wird wie eine herkömmliche Titanprothese ohne Silberbeschichtung. Da sich Titan und dessen Legierungen durch gute Biokompatibilität, Korrosionsbeständigkeit, Osseointegration und hervorragende mechanische Eigenschaften experimentell^{18, 20, 31, 75}, sowie im klinischen Gebrauch als Prothesenmaterial etabliert hat, wäre es von Vorteil diese Eigenschaften durch zusätzliche infektophylaktische Eigenschaften des Silbers zu erweitern.

Um diese Frage adäquat beantworten zu können, muß sich das Versuchsmodell den Gegebenheiten einer in den menschlichen Organismus implantierten Prothese möglichst stark annähern. Das gewählte Hundemodell erweist sich, wie bereits im Material und Methoden Teil (Kap. 2.2) ausführlich dargelegt, als geeignet.

Das Verfahren der Zellkultur hat sich ebenfalls bei Fragen zur Osseointegration etabliert. Vor allem die einfache, günstige und daher häufig replizierbare Durchführung ist dabei von Vorteil. Die in vitro Bedingungen dieser Testmethode weichen jedoch von dem Einwachsverhalten eines Implantates in einem lebenden Organismus ab¹². So finden physikalische/dynamische Belastungen wie Druck- und Zugbelastungen, die als adäquater Reiz für Osteoblasten gesehen werden und das Zusammenspiel von Osteoblast und Osteoklast als Bone-Multicellular-Unit keine Beachtung. Insbesondere Faktoren des Immunsystems des Organismus mit Entzündungsreaktionen, Abstoßung, Überempfindlichkeit, Allergie und Infektion werden nicht berücksichtigt. Das Einbringen von Prüfkörpern in verschiedenen Knochentypen bei diversen Tierrassen ist ebenfalls ein häufig verwendetes Testmodell.

Hierbei werden genormte Prüfkörper (Pins, Cages, Zylinder etc.) vorwiegend transkortikal in den Knochen des Versuchstieres eingebracht. Als Versuchstiere dienen meist Kaninchen oder Ratten. Die Operation ist mit geringem Aufwand durchzuführen und die zu beachtenden Tierschutzgesetze erlauben eine hohe Anzahl von Versuchen.

Nachteile dieses Versuchsmodells sind die nicht mit einer Prothese vergleichbaren physikalischen/dynamischen Belastungen. Desweiterm weicht die Knochenheilung bei Nagetieren (primäre Osteonenstruktur) und bei transkortikaler Implantation der Prüfkörper von der Implantateinheilung bei einem menschlichen Prothesenträger ab ^{1, 26}. Weiterhin sind Nagetiere aufgrund ihrer vergleichsweise geringen Lebenserwartung bei Langzeitversuchen an adulten Tieren nur begrenzt einsetzbar (z.B. einjahres Follow-up). Potentielle Spätfolgen (Lockerung nach Monaten, Spätinfektion >12 Monate) sind teilweise so nicht messbar.

Tiere mit primärer Osteonenstruktur besitzen im Vergleich zu Primaten schnellere und komplikationslosere Reparations- und Heilungsvorgänge ²⁶. Die transkortikale Insertion der Prüfkörper ist aufgrund des dichteren knöchernen Lagers nur bedingt mit der diaphysären bzw. metaphysären Insertion einer Hüfttotalendoprothese zu vergleichen. Auch die dynamische, axiale Belastung der Prüfkörper ist aufgrund des Insertionsortes (z.B. laterale Tibia) nicht vergleichbar mit einem intramedullär eingebrachten Schaft einer Endoprothese ¹². Daher gilt der Einbau einer krafttragenden Endoprothese als Goldstandart. Somit ist die Übertragbarkeit von Zellkulturverfahren und Prüfkörpertestungen auf den Menschen aus oben aufgeführten Gründen begrenzt.

Bisherige Veröffentlichungen zeigen, dass lediglich beim Hund eine vergleichbare Krafteinleitung in den Oberschenkelknochen vorliegt. Ebenso ist der Aufbau, die Elastizität und Regenerationsfähigkeit des

Hundeknochens dem menschlichen Knochen sehr ähnlich ^{15, 25, 48, 51, 60, 69,}
 39, 42, 53, 54, 64

Diese Arbeit zeigte, analog zu den vorweg in dieser Studie durchgeführten mechanischen Testungen (axialer pull-out-Test), dass die silberbeschichteten Endoprothesen in keinem einzigen Fall mit direktem Knochen-Implantatkontakt in das prothetische Lager integriert wurden (siehe Tab.3).

Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass die Titanprothesen der Kontrollgruppe einen direkten Kontakt zum Oberschenkelknochen mit adäquater Osseointegration aufwiesen.

Probe	Direkter Knochenkontakt	Kollagene Zwischenschicht	Mechanische Testungen
404 (Silber)	nein	Ja	Implantat locker
419 (Silber)	nein	Ja	Implantat locker
516 (Silber)	nein	Ja	Implantat locker
551 (Silber)	nein	Ja	Implantat locker
1146 (Silber)	nein	Ja	Implantat locker
1200 (Silber)	nein	Ja	Implantat locker
1204 (Silber)	nein	Ja	Implantat locker
1311 (Silber)	nein	Ja	Implantat locker
A (Silber)	nein	Ja	Implantat locker
406 (Titan)	ja	Nein	Implantat fest
498 (Titan)	ja	Nein	Implantat fest
713 (Titan)	ja	Nein	Implantat fest
820 (Titan)	ja	Nein	Implantat fest
1199 (Titan)	ja	Nein	Implantat fest
1812 (Titan)	ja	Nein	Implantat fest
E (Titan)	nicht beurteilbar	nicht beurteilbar	Implantat fest

(Tab.4: mikroskopische Beurteilung vs. mechanische Testungen)

Die aufgestellte Hypothese, dass silberbeschichtete Implantate ebenso gut in den Knochen integriert werden wie herkömmliche Titanimplantate, konnte nicht bestätigt werden. Ursache hierfür könnten verschiedene Mechanismen sein:

Die Oberflächenbeschaffenheit des Prothesenschaftes wird durch die Silberbeschichtung verändert. Die mikroskopisch kleinen Exkavationen und Einbuchtungen werden durch die zusätzlich aufgetragene Schicht reduziert. Die Rauigkeit und die Gesamtoberfläche nehmen ab. Diese spielen für das Anhaften der Knochenzellen aber eine entscheidende Rolle ^{8, 60, 69, 71}. Schneider et al. und Bowers et al. konnten ebenfalls nachweisen, dass eine rauhere Oberfläche mit einer stärkeren Mineralisation und einem vermehrten zellulärem attachment (Anhaftung) einhergeht ^{14, 70}. Da aber bei Titanimplantaten verschiedene Oberflächengeometrien (z.B. sandgestrahlt, geätzt oder maschinert) verwendet werden und diese gut osseointegriert werden ^{5, 11}, reicht dieser Ansatz unseres Erachtens nicht aus, um das Versagen der Silberimplantate zu erklären.

Ein Grund für das Versagen der Silberprothesen, könnte die Bioverträglichkeit des Silbers, abhängig von dessen Konzentration im periprothetischen Gewebe sein. Cortizo et al. untersuchten morphologische Veränderungen, Zellwachstum und Differenzierung von Osteoblasten nach Exposition mit reinem Metall (Ag, Cu, Pd, Au und NiTi Legierung) in einer Elektrolytlösung ²³. Kupfer zeigte sich hier am stärksten zytotoxisch. Eine Korrelation zweiter Ordnung zwischen Zellzahl und freigesetzten Metallionen konnte nachgewiesen werden. Zudem zeigte sich eine starke Abhängigkeit vom Zeitpunkt der Messung und von der Lokalisation der Zellen zum Metall. Während nach vier Stunden nur direkt um die Kupferprobe eine Verminderung der Zellzahl um 40% zu beobachten war, zeigte sich nach 24 Stunden auch in größerer Distanz zur Kupferprobe eine leichte Abnahme der Zellzahl und eine weitere Reduktion direkt am Metall auf 2%.

Bei der Silberprobe zeigten sich erst nach 48 Stunden Exposition

zytotoxische Effekte (Abnahme der Mitoserate, kleinere Zellen, Apoptosefiguren) auf die Osteoblasten. Der geringere zytotoxische Effekt steht in Korrelation zur geringeren Konzentration von in Lösung gegangenen Metallionen (Kupfer: 0,225mg/l, Silber 0,001mg/l ~1ppb).

Zainali et al. beschreiben eine stark verminderte mechanische Fixierung und verminderten Implantat-Knochenkontakt auch bei goldbeschichteten Implantaten ⁸². Analog zu unserer Studie verwendeten Zainali et al. ein Hundemodell und eine hundertprozentige Beschichtung des Implantates mit dem Edelmetall. Die Titanzylinder (9 beschichtet, 9 unbeschichtet) wurden mit der press-fit Methode in die proximale Tibia der Hunde eingebracht. Nach vier Wochen wurden die Tiere euthanasiert. Es folgten mechanische Testungen, histologische Untersuchungen (Knochen-Implantatkontakt) und Untersuchungen auf die Freisetzung von Goldionen. Wie in unserer Studie zeigte sich auch bei Zainali et al. in der mechanischen Testung eine signifikante Abnahme der Fixierung des Implantates im Lager (50%) und histomorphologisch eine Abnahme des Knochen-Implantatkontaktes (über 35%). Autometallographisch konnten im periprothetischen Raum Goldionen nachgewiesen werden. Diese waren größtenteils von Makrophagen phagozytiert worden. Da wir in vorangegangenen Studien keine Silberpartikel im periprothetischen Gewebe nachweisen konnten ³⁶, sahen wir im Rahmen dieser Studie die Notwendigkeit für eine Autometallographie nicht gegeben.

Untersuchungen zur Silberkonzentration und Zelltypisierung im periprothetischen Gewebe sollen im Rahmen unserer Studie noch folgen. Als Hauptursache für den geringeren Knochen-Implantat Kontakt vermuten Zainali et al. eine immunmodulatorische Komponente der Goldbeschichtung. Antiinflammatorische Effekte sind für Gold nachgewiesen ^{19,65}. Es wirkt als spezifischer COX-2 Inhibitor ⁷³, blockiert

NF- κ B-DNA-Interaktionen und einige Transkriptionsfaktoren⁸², die in Entzündungsreaktionen involviert sind. Dass eine negative Korrelation zwischen Knochenheilung und Entzündungsreaktionen besteht, konnte in mehreren Studien belegt werden^{6, 7, 32}. Für Silber sind solche immunmodulatorischen Effekte bislang nicht bekannt. Da bei den silberbeschichteten Implantaten unserer Arbeit ebenfalls eine signifikante Abnahme von Implantatfixierung und Knochen-Implantat Kontakt vorlag und für Silber kein immunmodulatorischer Effekt bekannt ist, gehen wir davon aus, dass es sich in beiden Studien primär um einen toxischen Effekt von Silber und Gold handelt. Edelmetalle, wie Gold und Silber, werden neben Bismut, Eisen, Kupfer, Blei, Zink, Zinn, Nickel, Cadmium, Chrom und Uran allgemein zu den Schwermetallen gezählt und könnten daher toxisch auf Zellen wirken. Eine eindeutige und wissenschaftlich anerkannte Definition des Begriffs "Schwermetall" fehlt jedoch^{43, 46}. Erwiesen ist, dass nicht jedes Metall, welches aufgrund seiner Dichte und seines Atomgewichts zu den Schwermetallen gezählt wird, auch toxisch ist. Es ist nicht die Masse des Metalls, die ausschlaggebend für die Toxizität ist, sondern seine Dosis und die Verfügbarkeit der Substanz für die Aufnahme durch einen Organismus. Diese ist bei metallischen Elementen unter anderem von ihrer Elektrophilie (Lewis-Azidität) und positiven Nettoladung abhängig⁴³. Somit ist die Zugehörigkeit von Silber und Gold zu den Schwermetallen ein Indiz für ihre potentielle Toxizität, jedoch kein Beweis.

Die Abhängigkeit zwischen der Dosis von elementarem Silber und dem Verhalten von Osteoblasten weist auch Hardes et al. in einer in vitro Studie aus 2007 nach⁴¹. Gemessen an der Aktivität der alkalischen Phosphatase von Osteosarkomzellen zeigte sich bei Hinzugabe von geringen Mengen (5-10 mg) Silberpartikeln (Partikelgröße unter 90 μ m)

signifikant höhere Aktivität der alkalischen Phosphatase im Vergleich zu der Titankontrollgruppe. Bei Supplementation von 20-25 mg zeigte sich eine Abnahme der Zellfunktion im Vergleich zur Kontrollgruppe.

Auch Gosheger et al. konnten im Zellkulturversuch zeigen, dass Silber in geringer Konzentration eher aktivierend, in hoher Konzentration toxisch auf Osteoblasten wirkt ³⁵.

In einer in vitro Studie aus dem Jahre 2004 bestätigte sich auch in Bezug auf Silberbeschichtungen von Prüfkörpern, dass niedrige Silberkonzentrationen in einer Legierung mit Titan (Silberanteil: 0,7-20%) keine toxischen Auswirkungen auf die verwendeten Zelllinien (Osteoblasten, Epithelzellen) hatte, wogegen eine deutliche Wachstums-
hemmung der Zellen bei reinem Silber zu sehen war ²⁹.

Wir gehen davon aus, dass in unserem Versuchsmodell die Silberkonzentration im periprothetischen Lager zu hoch war, um ein Anwachsen von Osteoblasten zu gewährleisten.

Die Messungen der vorweg erwähnten in vitro Studien konnten eine Beziehung zwischen der eingebrachten absoluten Masse des Silbers und der Osteoblastenkulturen zeigen. Allerdings wurden keine Umgebungs-
konzentrationen bestimmt, so dass über die aktiv wirkende Konzentration an der Osteoblastenzellmembran keine Aussage getroffen werden kann. Es ist bisher nicht bekannt welche Silberkonzentration für Osteoblasten im Interface notwendig ist, um diese in Ihrer Funktion zu verlangsamen/behindern oder sie sogar abzutöten.

Da es sich beim Interface um einen Raum mit geringem Volumen handelt, sind Rückschlüsse durch einen in vitro Versuch, bei dem die Zelllinien von einer Lösung umgeben sind, nur bedingt möglich. Auch Prüfkörper, die in spongiösen Knochen eingebracht werden, berücksichtigen diese räumlichen Gegebenheiten nicht. Bei diaphysärer

Verankerung einer Prothese ist der Raum zwischen Implantat und Knochen sehr klein. Zudem kann durch perioperative Manipulation (Markraumborner, Rasparatorium) eine verminderte Durchblutungssituation im Implantatlager entstehen, die zu einer Behinderung des Abtransportes und Akkumulation der Silberionen führt. Aus diesem Grunde können schon durch geringe Mengen gelöster Silberionen hohe Konzentrationen im Interface entstehen.

Es ist sinnvoll in einer weiteren Studie zu untersuchen, welche Konzentrationen im Interface vorlagen und wie diese gegebenenfalls reduziert werden könnten (siehe auch 4.1 Ausblick).

Abschließend ist aufgrund vorliegender Resultate davon auszugehen, dass der Osseointegrationsmechanismus bei derzeitiger Silberbeschichtung dauerhaft im Langzeitversuch unterbunden wird. Bei fehlender Kraftübertragung zwischen Implantat und Knochen im Interface kommt es somit erwartungsgemäß, im durchgeführten Tierexperiment, zu keiner kraftschlüssigen Verbindung. Daraus resultiert eine verringerte Belastbarkeit der operierten Extremität, was bei den Hunden durch Parameter wie humpelndes Gangbild und Atrophie der Muskulatur erfasst werden konnte ¹⁰. Die Extrapolation auf den Menschen kann nach derzeitigem Forschungsstand zu ähnlichen Ergebnissen führen. Allerdings ist hier zu berücksichtigen, dass in der Standbeinphase beim schnellen Gehen das Mehrfache des Körpergewichtes vollständig durch die Hüfttotalendoprothese an den Knochen weitergegeben werden muss. Zusätzliche Kompensationsmöglichkeiten wie 3 weitere Beine (wie beim Vierbeiner) existieren nur unter Nutzung von Kraftverteilungshilfsmitteln wie ein Gehstock, Unterarmgehstützen oder Rollator. Das zu erwartende Gangbild ist bei Lockerung der Totalendoprothese beim Menschen als deutlich schlechter anzusehen als bei einem Vierbeiner. Dies wird im Hundexperiment

dahingehend bestätigt, dass die Tiere trotz manifester Lockerung relativ gut laufen konnten, in dem sie die operierte Extremität entlasteten¹⁰.

Die Indikation zur Implantation einer auch intramedullär mit Silber beschichteten Prothese ist sehr zurückhaltend zu stellen. In der Kosten-Nutzen-Risikoabwägung sollte der Vorteil durch den antiinfektiven Effekt dem Nachteil einer möglichen fehlenden Osseointegration weit überlegen sein. Im Rahmen von Heilversuchen, zum Beispiel bei persistierender Osteomyelitis und drohendem Gliedmassenverlust, kann eine Implantation sinnvoll sein. Die (Re-)Infektion des Implantates kann bei ausreichend persistierender Silberoberfläche höchstwahrscheinlich auch intramedullär suffizient verhindert werden. Bereits durchgeführte Testungen zeigten eine antimikrobielle Wirksamkeit gegen noch höhere Bakterienkonzentrationen als sie bei Reinfektionen implantatassoziiertes Infekte zu finden sind³⁶. Nach Erradikation des Infektes könnte die lockere Silberprothese gegen ein zu zementierendes Implantat (nach ca. 12 Monaten) ausgetauscht werden.

Im Rahmen einzelner Heilversuche (Priv. Doz. Dr. U. Lehmann, Klinikum Forchheim) konnten bereits silberbeschichtete Hüftschäfte implantiert werden, die aufgrund ähnlicher Lockerungsmuster die Tierexperimente indirekt bestätigen.

Bei der Abwägung von Vor- und Nachteilen einer komplett silberbeschichteten Prothese ist zu berücksichtigen, dass nur lokal toxische Wirkungen zu erwarten sind, die eine Osseointegration lokal behindern werden, aber von keiner Fernwirkung im Körper auszugehen ist. Dies wird auch durch bereits in den Menschen implantierte extramedullär silberbeschichtete Megaendoprothesen gestützt, die über eine große Oberfläche verfügen. Die in den Organen und im Blut gefundenen Konzentrationen wurden als nicht toxisch bezeichnet³⁶.

Es ist davon auszugehen, dass auch in unserem Versuch systemisch keine höheren Konzentrationen wirksam wurden, auch wenn dies nicht gemessen wurde und somit nicht erneut verifiziert werden kann.

4.1 Ausblick

Der Grund für die Durchführung dieser Studie war die Aussicht auf ein Implantat, welches gute osseointegrative Eigenschaften besitzt und zugleich vor einer Besiedlung mit Bakterien geschützt ist. Um dieses Ziel zu erreichen könnten folgende Lösungsansätze in Erwägung gezogen werden:

- Reduzierung des Silberanteils in der Implantatbeschichtung
- Kombination mit osseoinduktiven oder osseokonduktiven Materialien
- Verwendung eines anderen Materials zur Beschichtung der Implantate
- Modifizierung der Morphologie der Implantatoberfläche

Im Anschluß an unsere Studie sollten Testungen zur Bestimmung einer geeigneten Silberkonzentration der Beschichtung erfolgen. Wie bereits erwähnt konnte die Arbeitsgruppe um Thull und Glückermann Erkenntnisse auf diesem Gebiet erbringen. In den einzelnen Versuchsgruppen wurden Titanprüfkörper mit einer Silber-Titanlegierung (0,7%; 1%; 3%; 4%; 5%; 7,5%; 9%; 18%; und 20% Silberanteil) mittels Sputtertechnik beschichtet und die Wirkung dieser Beschichtung auf die Proliferations- und Differenzierungsleistung von Osteoblasten und Epithelzellen *in vitro* untersucht. In keiner dieser Gruppen konnte ein toxischer Einfluß auf die Zellen nachgewiesen werden²⁹. Somit könnte die Reduzierung des Silberanteils eine Osseointegration des Implantates bewirken. Ob dies *in vivo* der Fall ist, sollte Gegenstand nachfolgender

Untersuchungen sein. Desweiteren gilt es zu prüfen, ob mit einer Reduktion des Silbergehaltes die bakterizide Wirkung im Implantatlager weiter gegeben ist.

Durch eine zusätzliche Beschichtung der Silberschicht auf der Grundlage von Polymeren, oder anderen Substanzen könnte die Freisetzung der Silberionen verzögert und zudem eine für Osteoblasten kompatible Oberflächenstruktur geschaffen werden.

Um eine zusätzliche Verbesserung der Osseointegration zu erreichen könnte Silber mit osseinduktiven oder osseokonduktiven Materialien kombiniert werden. Stoffe wie Hydroxyapatit und Calciumphosphat führen durch ihre Oberflächenmorphologie und ihrer stimulierenden Wirkung auf das Knochenwachstum zu einem verstärkten Anwachsen der Knochenzellen an das Implantat^{27, 38, 81}.

In einer aktuellen in vivo Studie aus dem Jahre 2009 zeigte sich auch für eine Beschichtung von Prüfkörpern mit Hyaluronsäure eine signifikante Steigerung des Knochen-Implantat Kontaktes und einer Beschleunigung der Knochenreifung⁵⁹.

An der ETH Zürich hat das Team um Wendelin Stark eine Folie entwickelt, die aus einer Polymerbasis besteht. Auf diese werden Calciumphosphatpartikel (20-50nm) aufgebracht. Diese sind wiederum mit bis zu 2nm großen Silberpartikeln versetzt. Das Calciumphosphat wird von Bakterien für ihren Stoffwechsel benötigt und daher aufgenommen. Somit inkorporieren die Bakterien auch die Silberpartikel, die zum Tod des Bakteriums führen⁵².

Gollwitzer und Heidenau et al. beschäftigen sich derzeit mit der Entwicklung einer antiinfektiösen Titanoxidbeschichtung. Als Grundlage

dient eine Sol-Gel-Tauchbeschichtung auf der Basis von Titanoxid. In diese können antibakteriell wirkende Substanzen integriert werden. Kupfer zeigte hierbei die günstigsten Ergebnisse. In bereits durchgeführten in vitro Versuchen konnte eine antibakterielle Wirksamkeit bei gleichzeitiger Zytokompatibilität nachgewiesen werden^{33, 44}. Die in vivo Untersuchungen stehen hierzu noch aus.

Ein weiterer interessanter Ansatz liegt in der Beeinflussung der Kommunikation der Bakterien im Biofilm. Dieser Kommunikationsvorgang wird als „quorum sensing“ bezeichnet. Über ihn werden mehrere Prozesse der Bakterienkolonie, wie Resistenz-, Abwehr- und Wachstumsprozesse gesteuert. Interventionen in diesen Prozess könnten therapeutisch genutzt werden.³⁷.

Auch die Verwendung von immunmodulatorischen Stoffen ist zur Zeit Gegenstand der Forschung. Etienne et al. berichtet von einem Schutz für Implantate vor bakterieller Kolonisation durch Beschichtungen mit Defensinen oder pegyliertem Polypeptid^{13, 28}.

5 Literatur

1. Aerssens J, Boonen S, Lowet G, et al: Interspecies differences in bone composition, density, and quality: potential implications for in vivo bone research. *Endocrinology* 139(2): 663-670, 1998
2. Ahrens H, Gosheger G, Streitbürger A, et al: Antimikrobielle Silberbeschichtung von Tumorprothesen. *Der Onkologe* 12(2): 221-226, 2006
3. Albrektsson T, Branemark PI, Hansson HA, et al: Osseointegrated titanium implants. Requirements for ensuring a long-lasting, direct bone-to-implant anchorage in man. *Acta Orthop Scand* 52(2): 155-170, 1981
4. Albrektsson T, Johansson C: Osteoinduction, osteoconduction and osseointegration. *Eur Spine J* 10 Suppl 2: S96-101, 2001
5. Arlin ML: Survival and success of sandblasted, large-grit, acid-etched and titanium plasma-sprayed implants: a retrospective study. *J Can Dent Assoc* 73(9): 821, 2007
6. Aspenberg P: Drugs and fracture repair. *Acta Orthop* 76(6): 741-748, 2005
7. Aspenberg P: Postoperative Cox inhibitors and late prosthetic loosening--suspicion increases! *Acta Orthop* 76(6): 733-734, 2005
8. Balasundaram G, Webster TJ: Nanotechnology and biomaterials for orthopedic medical applications. *Nanomed* 1(2): 169-176, 2006
9. Bobynd JD, Toh KK, Hacking SA, et al: Tissue response to porous tantalum acetabular cups: a canine model. *J Arthroplasty* 14(3): 347-354, 1999
10. Bonin T: Klinische und röntgenologische Ergebnisse nach Implantation einer neuen, zementfreien Schaftprothese zum Hüftgelenkersatz des Hundes. : 79-87, 2008

11. Bornstein MM, Valderrama P, Jones AA, et al: Bone apposition around two different sandblasted and acid-etched titanium implant surfaces: a histomorphometric study in canine mandibles. *Clin Oral Implants Res* 19(3): 233-241, 2008
12. Bostrom MP, Aspenberg P, Jeppsson C, et al: Enhancement of bone formation in the setting of repeated tissue deformation. *Clin Orthop Relat Res* (350)(350): 221-228, 1998
13. Boulmedais F, Frisch B, Etienne O, et al: Polyelectrolyte multilayer films with pegylated polypeptides as a new type of anti-microbial protection for biomaterials. *Biomaterials* 25(11): 2003-2011, 2004
14. Bowers KT, Keller JC, Randolph BA, et al: Optimization of surface micromorphology for enhanced osteoblast responses in vitro. *J oral maxillofac implants* 7(3): 302-310, 2002
15. Bragg PD, Rainnie DJ: The effect of silver ions on the respiratory chain of Escherichia coli. *Can J Microbiol* 20(6): 883-889, 1974
16. Branemark PI, Adell R, Breine U, et al: Intra-osseous anchorage of dental prostheses. I. Experimental studies. *Scand J Plast Reconstr Surg* 3(2): 81-100, 1969
17. Brutel de la Riviere A, Dossche KM, Birnbaum DE, et al: First clinical experience with a mechanical valve with silver coating. *J Heart Valve Dis* 9(1): 123-9; discussion 129-30, 2000
18. Buchhorn GH, Willert HG, Semlitsch M, et al: Preparation, characterisation and animal testing for biocompatibility of metal particles of iron-, cobalt- and titanium based implant alloys. *American society for testing materials*, 1992
19. Burmester GR: Molecular mechanisms of action of gold in treatment of rheumatoid arthritis--an update. *Z Rheumatol* 60(3): 167-173, 2001

20. Buser D, Schenk RK, Steinemann S, et al: Influence of surface characteristics on bone integration of titanium implants. A histomorphometric study in miniature pigs. *J Biomed Mater Res* 25(7): 889-902, 1991
21. Capanna R, Morris HG, Campanacci D, et al: Modular uncemented prosthetic reconstruction after resection of tumours of the distal femur. *J Bone Joint Surg Br* 76(2): 178-186, 1994
22. Chambers, C. W. P. C., Kabler PW: Bacterial effect of low concentrations of silver. *J. Am Water Works Assoc.* 54: 208-216, 1962
23. Cortizo MC, De Mele MF, Cortizo AM: Metallic dental material biocompatibility in osteoblastlike cells: correlation with metal ion release. *Biol Trace Elem Res* 100(2): 151-168, 2004
24. Davies JE: Mechanisms of endosseous integration. *Int J Prosthodont* 11 (5): 391-401, 1998
25. Deutsches Zentrum für Altersfragen: Morbiditätsentwicklung, in Deutsches Zentrum für Altersfragen (ed): *Ökonomische Perspektiven auf das hohe Alter Bd. II.* Vincentz Network, 2002
26. Eitel F, Seiler H, Schweiberer L: Morphological examination of animal-experiment results: comparison with regeneration of the human bone-structure. II. Research results (author's transl). *Unfallheilkunde* 84(6): 255-264, 1981
27. Epinette JA: in *Fifteen Years of Clinical Experience with Hydroxyapatite Coatings in Joint Arthroplasty*, pp 250, Berlin, Springer, 2004
28. Etienne O, Picart C, Taddei C, et al: Multilayer polyelectrolyte films functionalized by insertion of defensin: a new approach to protection of implants from bacterial colonization. *Antimicrob Agents Chemother* 48(10): 3662-3669, 2004

29. Ewald A, Gluckermann SK, Thull R, et al: Antimicrobial titanium/silver PVD coatings on titanium. *Biomed Eng Online* 5: 22, 2006
30. Fuchs S: Periostlappenplastik und Perichondriumlappenplastik, in: *Arthrose*. Steinkopff, pp 161, 2004
31. Galante J, Rostoker W, Lueck R, et al: Sintered fiber metal composites as a basis for attachment of implants to bone. *J Bone Joint Surg Am* 53(1): 101-114, 1971
32. Gerstenfeld LC, Thiede M, Seibert K, et al: Differential inhibition of fracture healing by non-selective and cyclooxygenase-2 selective non-steroidal anti-inflammatory drugs. *J Orthop Res* 21(4): 670-675, 2003
33. Gollwitzer H: A biocompatible sol-gel derived titania coating for medical implants with antibacterial properties. 2004
34. Golubovich VN, Rabotnova IL: Kinetics of *Candida utilis* growth suppression by silver ions. *Mikrobiologiya* 43(6): 1115-1117, 1974
35. Gosheger G, Ahrens H: Silberbeschichtete Mutars-Tumorendoprothese - in vitro Versuch zur Evaluation der osteointegrativen Eigenschaften. 2003
36. Gosheger G, Hardes J, Ahrens H, et al: Silver-coated megaendoprotheses in a rabbit model--an analysis of the infection rate and toxicological side effects. *Biomaterials* 25(24): 5547-5556, 2004
37. Gradinger R, Gollwitzer H: Ossäre Integration. 2006
38. Habibovic P, van der Valk CM, van Blitterswijk CA, et al: Influence of octacalcium phosphate coating on osteoinductive properties of biomaterials. *J Mater Sci Mater Med* 15(4): 373-380, 2004
39. Hacking SA, Bobyn JD, Tanzer M, et al: The osseous response to corundum blasted implant surfaces in a canine hip model. *Clin Orthop Relat Res* (364)(364): 240-253, 1999

40. Ham SJ, Schraffordt Koops H, Veth RP, et al: Limb salvage surgery for primary bone sarcoma of the lower extremities: long-term consequences of endoprosthetic reconstructions. *Ann Surg Oncol* 5(5): 423-436, 1998
41. Hardes J, Streitburger A, Ahrens H, et al: The influence of elementary silver versus titanium on osteoblasts behaviour in vitro using human osteosarcoma cell lines. *Sarcoma* 2007: 26539, 2007
42. Harvey EJ, Bobyn JD, Tanzer M, et al: Effect of flexibility of the femoral stem on bone-remodeling and fixation of the stem in a canine total hip arthroplasty model without cement. *J Bone Joint Surg Am* 81(1): 93-107, 1999
43. Heffernan V: "Schwermetall" bedeutet nicht notwendigerweise "toxisch". *Nickel Magazin, The magazin devoted to nickel and its applications* 21(4), 2006
44. Heidenau F, Mittelmeier W, Detsch R, et al: A novel antibacterial titania coating: metal ion toxicity and in vitro surface colonization. *J Mater Sci Mater Med* 16(10): 883-888, 2005
45. Herren T, Remagen W, Schenk R: Histology of the implant-bone interface in cemented and uncemented endoprostheses. *Orthopade* 16(3): 239-251, 1987
46. Hodson ME: Heavy metals--geochemical bogey men? *Environ Pollut* 129(3): 341-343, 2004
47. Ilyas I, Pant R, Kurar A, et al: Modular megaprosthesis for proximal femoral tumors. *Int Orthop* 26(3): 170-173, 2002
48. Jerosch J, Heisel J, Imhoff AB: Fortbildung Orthopädie - Traumatologie 11 Hüfte, in: *Fortbildung Orthopädie - Traumatologie 11 Hüfte*. Steinkopff, pp 134-134, 2005
49. Kilgus DJ, Howe DJ, Strang A: Results of periprosthetic hip and knee infections caused by resistant bacteria. *Clin Orthop Relat Res* (404)(404): 116-124, 2002
50. Kirschner P, Bayer M: Prothesenwechsel am Hüftgelenk. 2008

51. Linder L, Carlsson A, Marsal L, et al: Clinical aspects of osseointegration in joint replacement. A histological study of titanium implants. *J Bone Joint Surg Br* 70(4): 550-555, 1988
52. Loher S, Schneider OD, Maienfisch T, et al: Micro-organism-triggered release of silver nanoparticles from biodegradable oxide carriers allows preparation of self-sterilizing polymer surfaces. *Small* 4(6): 824-832, 2008
53. Maistrelli GL, Mahomed N, Fornasier V, et al: Functional osseointegration of hydroxyapatite-coated implants in a weight-bearing canine model. *J Arthroplasty* 8(5): 549-554, 1993
54. Marcellin-Little DJ, DeYoung BA, Doyens DH, et al: Canine uncemented porous-coated anatomic total hip arthroplasty: results of a long-term prospective evaluation of 50 consecutive cases. *Vet Surg* 28(1): 10-20, 1999
55. Marx RE, Garg AK: Bone structure, metabolism, and physiology: its impact on dental implantology. *Implant Dent* 7(4): 267-276, 1998
56. Matewski D, Szymkowiak E, Gumanski R, et al: Outcome of total hip replacement in rheumatic arthritis. *Ortop Traumatol Rehabil* 7(6): 633-638, 2005
57. Mohr W, Enders-Klein R: Mechanische Schädigungen, in: *Gelenkpathologie*. Berlin, Springer, pp 417-439, 2000
58. Moroni A, Caja VL, Egger EL, et al: Histomorphometry of hydroxyapatite coated and uncoated porous titanium bone implants. *Biomaterials* 15(11): 926-930, 1994
59. Morra M, Cassinelli C, Cascardo G, et al: Covalently-linked hyaluronan promotes bone formation around Ti implants in a rabbit model. *J Orthop Res* 27(5): 657-663, 2009
60. Mundy GR: Local control of bone formation by osteoblasts. *Clin Orthop Relat Res* (313)(313): 19-26, 1995

61. Nägeli Cv: Über oligodynamische Erscheinungen in lebenden Zellen *Neue Denkschr Allg schweiz Ges Naturw* 33, 1893
62. Niethard FU, Pfeil J: in *Orthopädie 5. Auflage*. Stuttgart, Thieme, 2005
63. Ochsner PE, Zimmerli W (eds): in *Hüftprothetik und Infektion*. Berlin Heidelberg, Springer, 2005
64. Pohl Y, Joos G: Der Hund als Modell für die zahnärztliche Implantologie. *Acta Chir. Austrica Supplement* : 117, 1995
65. Rau R: Have traditional DMARDs had their day? Effectiveness of parenteral gold compared to biologic agents. *Clin Rheumatol* 24(3): 189-202, 2005
66. Renard AJ, Veth RP, Schreuder HW, et al: The saddle prosthesis in pelvic primary and secondary musculoskeletal tumors: functional results at several postoperative intervals. *Arch Orthop Trauma Surg* 120(3-4): 188-194, 2000
67. Ritschl P, Capanna R, Helwig U, et al: KMFTR (Kotz Modular Femur Tibia Reconstruction System) modular tumor endoprosthesis system for the lower extremity. *Z Orthop Ihre Grenzgeb* 130(4): 290-293, 1992
68. Roche: in *Roche Lexikon Medizin*. München Jena, Urban & Fischer Verlag, 2003
69. Schenk RK, Buser D: Osseointegration: a reality. *Periodontol* 2000 17: 22-35, 1998
70. Schneider GB, Perinpanayagam H, Clegg M, et al: Implant surface roughness affects osteoblast gene expression. *J Dent Res* 82 (5): 372-376, 2003
71. Schwartz Z, Boyan BD: Underlying mechanisms at the bone-biomaterial interface. *J Cell Biochem.* 56 (3): 340-347, 1994
72. Stenger E, Eibl-Eibesfeld B: in *Verbandslehre*. Urban & Fischer Verlag, , pp 245, 1997

73. Stuhlmeier KM: The anti-rheumatic gold salt aurothiomalate suppresses interleukin-1beta-induced hyaluronan accumulation by blocking HAS1 transcription and by acting as a COX-2 transcriptional repressor. *J Biol Chem* 282(4): 2250-2258, 2007
74. Tweden KS, Cameron JD, Razzouk AJ, et al: Biocompatibility of silver-modified polyester for antimicrobial protection of prosthetic valves. *J Heart Valve Dis* 6(5): 553-561, 1997
75. Ungersbock A, Pohler O, Perren SM: Evaluation of the soft tissue interface at titanium implants with different surface treatments: experimental study on rabbits. *Biomed Mater Eng* 4(4): 317-325, 1994
76. Voutzoulis S, Demetzi N, Kyriazoglou I, et al: Limb salvage surgery in primary bone tumors. The Saint Savvas experience in 52 patients. *Acta Orthop Scand Suppl* 275: 101-102, 1997
77. Wan AT, Conyers RA, Coombs CJ, et al: Determination of silver in blood, urine, and tissues of volunteers and burn patients. *Clin Chem* 37(10 Pt 1): 1683-1687, 1991
78. Wirganowicz PZ, Eckardt JJ, Dorey FJ, et al: Etiology and results of tumor endoprosthesis revision surgery in 64 patients. *Clin Orthop Relat Res* (358)(358): 64-74, 1999
79. Wise DL: Bacterial adhesion to biomaterial surfaces
, in: *Human Biomaterials Applications*. Humana Pr., pp 29-43, 1996
80. Witjes S, Schrier JC, Gardeniers JW, et al: Complications within two years after revision of total hip prostheses. *Ned Tijdschr Geneesk* 151(35): 1928-1934, 2007
81. Wnek GE, Bowlin GL: Bone-implant interface, in Informa healthcare (ed): *Encyclopedia of Biomaterials and Biomedical Engineering*. pp 423-431, 2008

82. Zainali K, Danscher G, Jakobsen T, et al: Effects of gold coating on experimental implant fixation. *J Biomed Mater Res A* 88(1): 274-280, 2009
83. Zimmerli W: Hematogenous infection of prostheses in man and in an animal model. *Schweiz Med. Wochenschr.* 114(48): 1756-1757, 1984

6 Danksagung

Bei Herrn Prof. Dr. med. Georg Gosheger möchte ich mich ganz herzlich bedanken für die Anregung des interessanten Themas und seine begleitende freundliche Beratung und konstruktive Unterstützung in allen Belangen.

Gleichermaßen möchte ich mich herzlich bei Dr. med. Helmut Ahrens und PD. Dr. med. Jendrik Harges für die vorbildliche Betreuung und kompetente Beratung bedanken.

Weiterhin möchte ich mich herzlich bei den medizinisch-technischen Assistentinnen des Forschungslabors der Unfallchirurgie bedanken, die mir zu jeder Zeit mit Rat und Tat zur Seite standen.

7 Lebenslauf

PERSÖNLICHE DATEN:

Name: Dominik Schorn

geboren: 24. Juli 1981

Adresse: -

Familienstand: -

SCHULAUSBILDUNG:

-

ZIVILDIENTST:

-

HOCHSCHULLAUFBAHN:

-

PRAKTISCHE BERUFSERFAHRUNG:

Famulaturen:

-

praktisches Jahr:

-

studentische Hilfskraft:

-


Ort, Datum

Dominik Schorn

8 Anhang

8.1 Versuchsgenehmigung

ENTWURF
Dateiname: N:\TIERVERS\G-10-2000\G10
Erstellt am 09.03.00
Bearbeiter: Spölming



Bezirksregierung Münster

Bezirksregierung Münster · 48129 Münster

1. Gegen Empfangsbekanntnis
Herrn
Dr. med. Georg Gosheger
Klinik und Poliklinik für
Allgemeine Orthopädie der
Westf. Wilhelms-Universität Münster
Albert-Schweitzer-Straße 33
48129 Münster

AB 10. März 2000

Dienstgebäude
Domplatz 1-3
Telefon: (0251) 411-0
Durchwahl: 2110
Zimmer: 431
Frau Möller
Aktenzeichen
23.0833.1.0 (G 10/2000)
10. März 2000

Betr.: Tierschutz;
hier: Durchführung von Versuchen an Wirbeltieren

Bezug: Ihr Antrag vom 10.01.2000, hier eingegangen am
13.01.2000

G e n e h m i g u n g s b e s c h e i d :

Sehr geehrter Herr Dr. Gosheger,

gemäß § 8 Tierschutzgesetz (TierSchG) in der Fassung der Bekanntmachung vom 25. Mai 1998 (BGBl. I. S. 1105) wird Ihnen die Genehmigung zur Durchführung nachstehenden Versuchsvorhabens erteilt:

Antibiotische Silberoberfläche auf Tumorprothesen (Kurzbezeichnung)

Leiter des Versuchsvorhabens und sein Stellvertreter sind:

Herr Prof. Dr. med. W. Winkelmann Klinik und Poliklinik für Allgemeine Orthopädie der Westf. Wilhelms-Universität Albert-Schweitzer-Straße 33 48129 Münster	Herr Dr. med. Georg Gosheger Klinik und Poliklinik für Allgemeine Orthopädie der Westf. Wilhelms-Universität Albert-Schweitzer-Straße 33 48129 Münster
---	--

Grünes Umweltschutztelefon (0251) 411-3300
e-mail: poststelle@bezreg-muenster.nrw.de • X-400: C=de, A=brp, P=dvs-nrw, O=bezreg-muenster, S=poststelle • Telefax (0251) 411-2525
Konten der Regierungskasse Münster:
Landeszentralbank Niederlassung Münster BLZ: 400 000 00 Konto: 40 001 520
Westfälische Landesbank Girozentrale Münster BLZ: 400 500 00 Konto: 61 820
Öffentliche Verkehrsmittel - Bushaltes 1, 5, 6, 17 bis Haltestelle Prinzipalmarkt und 2, 10, 11, 14, 21, 64 bis Domplatz