

**UNTERSUCHUNGEN ZUM EINFLUSS VON
THROMBOZYTÄREN WACHSTUMSFAKTOREN
AUF DEN ZELLVERMITTELTEN
ABBAU EINES NANOPARTIKULÄREN
KNOCHENERSATZSTOFFES AUF
HYDROXYLAPATITBASIS**

**- EINE EXPERIMENTELLE STUDIE AM
MINIATURSCHWEIN -**

MARKUS LAUER

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines
Dr. med. vet.

beim Fachbereich Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

Das Werk ist in allen seinen Teilen urheberrechtlich geschützt.

Jede Verwertung ist ohne schriftliche Zustimmung des Autors oder des Verlages unzulässig. Das gilt insbesondere für Vervielfältigungen, Übersetzungen, Mikroverfilmungen und die Einspeicherung in und Verarbeitung durch elektronische Systeme.

1. Auflage 2006

All rights reserved. No part of this publication may be reproduced, stored in a retrieval system, or transmitted, in any form or by any means, electronic, mechanical, photocopying, recording, or otherwise, without the prior written permission of the Author or the Publishers.

1st Edition 2006

© 2006 by VVB LAUFERSWEILER VERLAG, Giessen
Printed in Germany



VVB LAUFERSWEILER VERLAG
édition scientifique

STAUFENBERGRING 15, D-35396 GIESSEN
Tel: 0641-5599888 Fax: 0641-5599890
email: redaktion@doktorverlag.de

www.doktorverlag.de

Aus dem Institut für Veterinär-Anatomie, -Histologie und -Embryologie
am Fachbereich Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Betreuerin: Privatdozentin Dr. S. Wenisch

**UNTERSUCHUNGEN ZUM EINFLUSS VON THROMBOZYTÄREN
WACHSTUMSFAKTOREN AUF DEN ZELLVERMITTELTEN ABBAU
EINES NANOPARTIKULÄREN KNOCHENERSATZSTOFFES AUF
HYDROXYLAPATITBASIS
-EINE EXPERIMENTELLE STUDIE AM MINIATURSCHWEIN-**

INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung des Grades eines Dr. med. vet.
beim Fachbereich Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

eingereicht von

Markus Lauer
Tierarzt aus Marburg

Gießen 2006

Mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Dekan: Prof. Dr. M. Reinacher

Gutachter:

Privatdozentin Dr. S. Wensch

Prof. Dr. K. Bonath

Tag der Disputation: 02.11.2006

Meinen Eltern

Schreiben ist leicht.

Man muss nur die falschen Wörter weglassen.

Mark Twain

INHALTSVERZEICHNIS

1	EINFÜHRUNG	1
2	LITERATURÜBERSICHT	4
2.1	KNOCHENERSATZSTOFFE AUF KALZIUMPHOSPHATBASIS	4
2.2	ABBAUVERHALTEN UND DEGRADATIONSMECHANISMEN	6
2.3	FREMDKÖRPERREAKTIONEN	6
2.4	PHAGOZYTOSEMECHANISMEN	7
2.5	OSTEOKLASTEN – MEHRKERNIGE RIESENZELLEN: MÖGLICHKEITEN UND GRENZEN DER ZELLCHARAKTERISIERUNG UND ZELLDIFFERENZIERUNG	10
2.6	WACHSTUMSFAKTOREN	13
2.6.1	Plättchenreiches Plasma (PRP)	13
2.6.2	Thrombozytäre Wachstumsfaktoren	16
2.6.3	Kombinationen verschiedener Wachstumsfaktoren bei der Behandlung von Knochendefekten	19
3	MATERIAL UND METHODEN	20
3.1	VERSUCHSTIERE	20
3.1.1	Spezies und Rasse	20
3.1.2	Haltung und Fütterung	20
3.2	VERSUCHSAUFBAU	20
3.2.1	Der Hydroxylapatit-Knochenersatzstoff Ostim®	20
3.2.2	Plättchenreiches Plasma (PRP)	22
3.2.3	Bestimmung der Thrombozytenzahl	22
3.2.4	Konzentrationsbestimmung der Wachstumsfaktoren im PRP	22
3.3	VERSUCHSABLAUF	23
3.4	OPERATIONEN	24
3.4.1	Narkose	24
3.4.2	Implantationsoperation	24
3.4.3	Postoperative Nachsorge	26
3.4.4	Explantationsoption	26

3.5	WEITERFÜHRENDE BEHANDLUNG DER PROBEN FÜR DIE LICHTMIKROSKOPIE.....	27
3.5.1	Histologie	27
3.5.2	Paraffintechnik	30
3.6	HISTOCHEMISCHE METHODEN	32
3.6.1	Enzymhistochemie.....	32
3.6.2	Immunhistochemie	33
3.7	LICHTMIKROSKOPISCHE AUSWERTUNG.....	37
3.8	TRANSMISSIONSELEKTRONENMIKROSKOPIE.....	37
3.8.1	Einbettung unentkalkter Knochenpräparate in Epon 812.....	37
3.8.2	Standardvorgehen bei der Transmissionselektronenmikroskopie.....	37
3.8.3	Färbung mit Safranin.....	37
3.9	COMPUTERGESTÜTZTE DATENQUANTIFIZIERUNG.....	38
3.9.1	Messverfahren.....	38
3.9.2	Statistische Auswertung.....	39
4	ERGEBNISSE.....	40
4.1	VERSUCHSTIERE	40
4.2	ANREICHERUNG DER THROMBOZYTEN	40
4.3	KONZENTRATIONEN DER WACHSTUMSFAKTOREN.....	40
4.4	GRUPPE I/PRP-.....	41
4.4.1	Histologie	41
4.4.2	Enzymhistochemie - Tartrat-resistente saure Phosphatase.....	42
4.4.3	Immunhistochemie	43
4.5	GRUPPE II/PRP+	45
4.5.1	Histologie	45
4.5.2	Enzymhistochemie - Tartrat-resistente saure Phosphatase.....	46
4.5.3	Immunhistochemie	46
4.6	LEERDEFEKTE.....	47
4.6.1	Histologie	47
4.6.2	Enzymhistochemie - Tartrat-resistente saure Phosphatase.....	47
4.6.3	Immunhistochemie	48
4.7	TRANSMISSIONSELEKTRONENMIKROSKOPIE.....	48

4.8	ABBILDUNGEN	50
4.9	STATISTISCHE AUSWERTUNG DER TRAP-POSITIVEN FLÄCHENANTEILE	63
4.10	ZUSAMMENFASSUNG DER ERGEBNISSE	65
5	DISKUSSION	66
5.1	PRP-UNABHÄNGIGE EFFEKTE	66
5.1.1	Der nanopartikuläre Knochenersatzstoff Ostim®	66
5.1.2	Differenzierung der Zelltypen	67
5.1.3	Zellvermittelter Implantatabbau - Makrophagen und Fremdkörperreaktion	71
5.1.4	Nicht-zellvermittelte Degradationseffekte am Implantatmaterial	74
5.2	PRP-ABHÄNGIGE EFFEKTE.....	77
5.2.1	Methodenaspekte	77
5.2.2	Einfluss von PRP auf den zellvermittelten Implantatabbau	78
5.2.3	Schlussfolgerungen	80
6	ZUSAMMENFASSUNG	81
7	SUMMARY	83
8	LITERATURVERZEICHNIS	85
9	ANHANG	105

TABELLENVERZEICHNIS

Tabelle 1: Auf dem Markt befindliche Knochenersatzstoffgruppen 4

Tabelle 2: Studien zur Verwendung von PRP in Verbindung mit Implantatmaterialien 15

Tabelle 3: Verwendete Antikörper 35

Tabelle 4: Mittelwerte der Thrombozytenzahlen der Spendertiere im Vollblut und im
Thrombozytenkonzentrat mit Standardabweichung 40

Tabelle 5: Konzentrationen von Wachstumsfaktoren in Blutplasma und PRP 41

Tabelle 6: Übersicht der Untersuchungsergebnisse aus Gruppe I/PRP- und Gruppe II/PRP+
in Bezug auf implantatabbauende Zellen 65

TABELLEN IM ANHANG

Tabelle A: Quantifizierung der TRAP-positiven Flächenanteile Gruppe I/PRP- 105

Tabelle B: Quantifizierung der TRAP-positiven Flächenanteile Gruppe II/PRP+ 106

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 1: Ostim[®], Knochenersatzstoff, Rasterelektronenmikroskopie..... 21

Abbildung 2: Anlegen des Knochendefekts in der Intercondylarregion des Femurs 25

Abbildung 3: Intercondylarregion des Femurs nach Entfernung des Knochenzylinders 25

Abbildung 4: Schematische Darstellung der Messmethode TRAP-positiver Flächenanteile.... 39

Abbildung 5: Dünnschliffhistologie, Gruppe II/PRP+, Toluidinblau-Färbung 50

Abbildung 6: Semidünnschnitte, Gruppe II/PRP+, Färbung mit Safranin O und Toluidinblau..... 51

Abbildung 7: Semidünnschnitte, Gruppe II/PRP+, Färbung Safranin O und Toluidinblau ... 52

Abbildung 8: TRAP-Färbung, Gegenfärbung Hämatoxylin..... 54

Abbildung 9: Paraffinschnitt, Kathepsin K–Immunhistochemie, Gegenfärbung mit Hämatoxylin..... 55

Abbildung 10: Paraffinschnitte, Gruppe II/PRP+, CD44–Immunhistochemie, Gegenfärbung mit Hämatoxylin..... 57

Abbildung 11: Paraffinschnitt, GruppeII/PRP+, Vimentin–Immunhistochemie, Gegenfärbung mit Hämatoxylin 58

Abbildung 12: Transmissionselektronenmikroskopische Übersicht einer am Implantat lokalisierten mehrkernigen Riesenzelle 59

Abbildung 13: Ultrastrukturelles Detail der Kontaktzone einer mehrkernigen Riesenzelle mit der Implantatoberfläche 60

Abbildung 14: Ultrastruktur einer im Granulationsgewebe lokalisierten mehrkernigen Riesenzelle..... 61

Abbildung 15: Ultrastrukturelles Detail einer mehrkernigen Riesenzelle mit intrazytoplasmatischer Inklusion 62

Abbildung 16: Darstellung der Mittelwerte TRAP-positiver Flächen in den untersuchten Präparaten in Prozent..... 63

Abbildung 17: Box-and Whisker-Plots bezüglich des Merkmals „TRAP-positive Fläche pro Untersuchungsfeld in Prozent“ 64

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

°C	Grad Celsius
µg	Mikrogramm
µm	Mikrometer
A., Aa.	Arteria, Arteriae
AK	Antikörper
AOI	Area of interest
Aqua dest.	Aqua destillata
bFGF	Basic Fibroblast growth factor
biol.	biologisch
bzw.	beziehungsweise
Ca/P-Verhältnis	Kalzium/Phosphor-Verhältnis
CaP	Kalziumphosphat
CD	Cluster of differentiation
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGF	Epidermal growth factor
FBGC	Foreign Body Giant Cell
FGF	Fibroblast growth factor
g	Gramm
h	Stunde
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
HA	Hydroxylapatit
i. E.	Internationale Einheiten
Ig	Immunglobulin
IGF	Insulin-like growth factor
kD	Kilo-Dalton
kg	Kilogramm
KG	Körpergewicht
M	molar
m ²	Quadratmeter
mg	Milligramm
min	Minute

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

ml	Milliliter
mm	Millimeter
pg	Picogramm
PRP	Plättchenreiches Plasma
PDGF	Platelet derived growth factor
s	Sekunde
synth.	synthetisch
TEM	Transmissionselektronenmikroskopie
TGF	Transforming growth factor
TRAP	Tartrat-resistente saure Phosphatase
U/min	Umdrehungen pro Minute
V.	Vena
VEGF	Vascular endothelial growth factor
VPF	Vaskulärer Permeabilitätsfaktor

1 EINFÜHRUNG

Durch traumatische Einwirkung und nach der Entfernung von Knochentumoren entstehen häufig Knochendefekte einer kritischen Größe (critical size defects), die vom umgebenden Lagerknochen nicht mehr aus eigener Kraft durchbaut werden können. Dieses Defizit kann durch das operative Einbringen unterschiedlicher Füllmaterialien in die Defekte ausgeglichen werden. Das implantierte Material dient den vom Lager ausgehenden Knochenneubildungen als räumliche Leitschiene (Osteokonduktion) und kann im günstigsten Fall sogar die Knochenneubildung induzieren (Osteoinduktion) (Rueger 1998; Yuan et al. 1998).

Der goldene Standard zur Auffüllung von Knochendefekten ist die Transplantation autogener Spongiosa (Rueger 1998; Rizzi et al. 2001; Briem et al. 2002). Deren Gewinnung erfordert jedoch einen zweiten operativen Eingriff, der die Gefahr von Komplikationen wie Blutverlusten und Infektionen erhöht (Rueger 1998; Gierse und Donath 1999; Ylinen et al. 2002). Darüber hinaus wurde bei humanmedizinischen Untersuchungen festgestellt, dass 55 % der Patienten noch ein Jahr nach der Spongiosaentnahme am Beckenkamm an der Entnahmestelle lokale Irritationen oder Schmerzen aufwiesen (Wippermann et al. 1997). Weiterhin sind die Entnahmemengen limitiert und häufig nicht ausreichend für eine Defektauffüllung (Mangano et al. 2003).

Daher kommen allogene Knochentransplantate alternativ zum Einsatz. Deren Verwendung setzt allerdings eine kostenintensive Infrastruktur voraus, da die Transplantate in einer Knochenbank aufgearbeitet und gelagert werden müssen (Günther et al. 1998; Stützle et al. 1998). Trotz Sterilisation des Transplantats besteht weiterhin ein Übertragungsrisiko von Infektionserregern auf den Empfänger (Knaepler 1997; Schnettler et al. 1998).

Bei xenogenen Implantaten ist darüber hinaus die Entfernung aller antigen wirkenden Strukturen notwendig (Schnürer et al. 2003), um die Immunreaktionen des Empfängers auf spezieisfremdes Gewebe zu verhindern. Die genannten Nachteile der autogenen, allogenen und xenogenen Transplantate favorisieren daher den klinischen Einsatz von industriell hergestellten Knochenersatzstoffen zur Auffüllung von Knochendefekten. Dabei ist die Biokompatibilität die wesentliche Voraussetzung für die Verwendung von Implantaten (Schnürer et al. 2003).

Bei der industriellen Entwicklung von Knochenersatzstoffen steht die Forderung nach

Optimierung von Menge und Qualität des neugebildeten Knochens bei gleichzeitig optimaler Belastbarkeit im Vordergrund (Rueger 1998). Da die Materialien in großen Mengen industriell produziert werden, stehen sie nahezu unbegrenzt zur Verfügung. Durch die Art ihrer Zusammensetzung und ihrer Darreichungsform können sie den Bedürfnissen der Defektheilung angepasst werden. Grundvoraussetzung für eine ungestörte und optimale Heilung ist stets, dass die Resorption und der biologische Abbau mit der gleichen Geschwindigkeit erfolgen, wie der autochthone Knochen den Defekt auffüllt (Rueger 1998).

Um die Dauer der Defektheilung zu verkürzen, werden Knochendefekte seit einigen Jahren durch die lokale Applikation von einzelnen oder mehreren Wachstumsfaktoren in verschiedenen Darreichungsformen therapiert (Einhorn 1995). Die dabei verwendeten Substanzen sind physiologischer Bestandteil der extrazellulären Knochenmatrix (Hauschka et al. 1988; Baylink et al. 1993). Neben rekombinanten Wachstumsfaktoren wird plättchenreiches Plasma (platelet-rich plasma, PRP), als Quelle von Wachstumsfaktoren, zur Beschleunigung der Knochenneubildung eingesetzt (Marx et al. 1998; Aghaloo et al. 2002; Freymiller und Aghaloo 2004).

Da bislang nur wenige Informationen zur Wirksamkeit von PRP auf den zellvermittelten Implantatabbau existieren, soll in der vorliegenden tierexperimentellen Studie der Einfluss von PRP auf die zelluläre Degradation eines neuartigen nanopartikulären Hydroxylapatits in der Frühphase der Knochendefektheilung untersucht werden.

Der Knochenersatzstoff Ostim[®] wurde bereits bei Schafen in Knochendefekte des Tibiakopfes und bei Kaninchen in den Condylus lateralis des Femur implantiert (Schnettler und Dingeldein 2002). In der vorliegenden Untersuchung wurde mit Miniaturschweinen eine Versuchstierspezies gewählt, die sowohl in Bezug auf die mechanische Belastung des Knochendefekts als auch in Hinblick auf Faktoren wie Knochenstruktur und Gerinnungsparameter dem Menschen sehr ähnlich ist (Hönig und Merten 1993; Schnettler et al. 1998).

Für die Frühphase der Heilung von Knochendefekten, die mit Ostim[®] versorgt wurden, fehlen Daten in Bezug auf Degradation, Osteokonduktion und Osteoinduktion nahezu vollständig. Im Pilotversuch zur vorliegenden Studie wurde daher bei zwei Schweinen der Knochenersatzstoff Ostim[®] in den Condylus lateralis des Femur implantiert und Proben vom 10. und 20. Tag *post*

operationem im Hinblick auf die Frühphase der Knochendefektheilung untersucht. Dabei konnte festgestellt werden, dass für die Beantwortung wesentlicher Fragestellungen im Rahmen der Knochenneubildung, Zellmigration, Degradation und der Angiogenese der 20. Tag nach der Operation der aussagekräftigere Zeitpunkt ist (Kilian et al. 2002).

2 LITERATURÜBERSICHT

2.1 Knochenersatzstoffe auf Kalziumphosphatbasis

Synthetisch hergestellte Knochenersatzstoffe auf Kalziumphosphatbasis werden seit einigen Jahren erfolgreich klinisch eingesetzt. Sie können sowohl zur permanenten Substitution im Sinne einer Prothese als auch als Gerüstsubstanz für die Knochenregeneration verwendet werden (Hasegawa et al. 2003). Wie aus Tabelle 1 zu entnehmen ist, lässt sich die Vielzahl von auf dem Markt befindlichen Produkten in unterschiedliche Zubereitungen klassifizieren. Sie finden als gesinterte Keramiken, *in situ* aushärtende Zemente und als nicht wärmebehandelte Pasten Verwendung.

Tabelle 1: Auf dem Markt befindliche Knochenersatzstoffgruppen (Schnürer und Gopp 2003)

Knochenersatzstoffgruppe	Beispiele für kommerziell erhältliche Produkte der Knochenersatzstoffgruppen
<i>Hydroxylapatit-Keramik (biol.)</i>	Pro-Osteon™ (korallin), Endobon® (bovin)
<i>Hydroxylapatit-Keramik (synth.)</i>	Synatite®, Cerabone®
<i>Trikalziumphosphat-Keramik</i>	Calciresorb®, Cerasorb®
<i>Biphasische Keramiken</i>	Biocer®R, Ceraform®
<i>Kalziumphosphat-, Zemente“</i>	Biobon®, BoneSource®
<i>Kollagen-Kalziumphosphat</i>	Collapat®, Healos®
<i>Xenograft (bovin)</i>	Isobone®, Orthoss®

Zur Auffüllung von Knochendefekten werden Implantatmaterialien aus der Grundsubstanz Hydroxylapatit (HA) in keramischer und nicht-keramischer Form eingesetzt, da HA dem Hauptbestandteil der anorganischen Phase des natürlichen Knochens entspricht und sich durch eine sehr gute Gewebeverträglichkeit (Sun et al. 1999) und Osteokonduktivität (Hasegawa et al.

2003) auszeichnet. Die große Ähnlichkeit in der chemischen Zusammensetzung und dem biologischen Verhalten von synthetisch hergestelltem und natürlich im Knochen vorkommendem HA ist im Hinblick auf die Verträglichkeit und Osseointegration im Empfänger von großer klinischer Bedeutung (Hollinger et al. 1996; Bohner 2001).

In Bezug auf die Abbaubarkeit im Empfängerorganismus *post implantationem* handelt es sich bei HA um ein biodegradierbares Material, welches einem langsamen Abbauprozess unterliegt (Goto et al. 2001). Bei Raumtemperatur durch Präzipitation entstandene HA-Werkstoffe sind aufgrund ihrer großen Oberfläche (bis zu 100 m²/g) biologisch aktiver als Kalziumphosphat-Keramiken, die mit hohen Temperaturen behandelt werden und deren spezifische Oberfläche etwa 1 m²/g beträgt (Bohner 2001). Abhängig von der Methode der Zubereitung variiert die Löslichkeit dieser HA-Präzipitate jedoch stark (Bohner 2000).

HA ist ein bioaktives Material, das nach Implantation im Empfänger eine spezifische Gewebeantwort induziert, die zu einer engen Implantat-Knochen-Bindung am Interface führt (Merry et al. 1998). Ermöglicht wird diese räumliche Verknüpfung durch die partielle Oberflächenlöslichkeit und die direkte Anlagerung von Knochenmatrix am Implantat (Müller-Mai et al. 2001). Eine osteoinduktive Wirkung von gesintertem HA nach Implantation in die Muskulatur von Affen wurde von Ripamonti (1996) beschrieben.

HA-Keramiken gelten als nicht vollständig resorbierbar. Nicht resorbierte Partikel des Implantats sollen das *Remodeling* des Knochens stören, was theoretisch zu suboptimalen mechanischen Eigenschaften führen kann (Bloemers et al. 2003) oder die Entstehung einer auf die funktionell-physiologischen Bedürfnisse abgestimmten Knochenstruktur verhindert (Schulte und Donath 1991). Dem unvollständigen Abbau von Keramiken auf Kalziumphosphatbasis soll ein schnelles Überwachsen der Implantatoberfläche mit neuem Knochen zugrunde liegen, so dass resorbierenden Zellen der Weg zur Implantatoberfläche versperrt wird (Sarkar et al. 2001). Hohe Sinterungstemperaturen von über 1000 °C werden als weiterer Grund für die unvollständige Degradation von HA-Keramiken angesehen. Bei diesen Temperaturen entstehen große HA-Kristalle, die von Osteoklasten nur noch schwer abzubauen sind (van Landuyt et al. 1995).

2.2 Abbauverhalten und Degradationsmechanismen

Ein wesentliches Kriterium zur Beurteilung der klinischen Eignung von Knochenersatzstoffen ist ihre Degradierbarkeit, die bei unterschiedlichen Zubereitungen variiert.

Grundsätzlich basiert der Abbau von Knochenersatzmaterialien auf Kalziumphosphatbasis auf zwei Mechanismen: Einerseits auf der Degradation durch extrazelluläre Flüssigkeit mittels Hydrolyse, andererseits auf dem Abbau durch Makrophagen und multinukleäre Riesenzellen oder Osteoklasten (Merten et al. 2000). Letztlich bestimmen die unterschiedlichen Materialeigenschaften eines Knochenersatzstoffes dessen Abbauverhalten und den Degradationsmechanismus. Dazu zählen Parameter wie die Partikelgröße, Partikelform (Monchau et al. 2002), Reinheit des Materials (Schnettler und Dingeldein 2002), Kristallinität (Overgaard et al. 1999; Shi et al. 2002), die Beschaffenheit der Implantatoberfläche (Kieswetter et al. 1996), Porosität (Sun et al. 2002) und bei Keramiken die zur Herstellung notwendige Sinterungstemperatur (Zheng et al. 1998).

In Bezug auf den zellulären Abbau von Kalziumphosphatkeramiken finden in der Literatur stets zwei unterschiedliche Mechanismen Erwähnung: Einerseits die Phagozytose von Implantatpartikeln, zu der Zellen der Monozyten/Makrophagen-Zellreihe, Fibroblasten und Osteoblasten befähigt sind und andererseits die Osteoklasten-vermittelte Resorption. Hierbei erniedrigt sich der pH-Wert innerhalb eines vom Osteoklasten umgebenen Kompartimentes der Implantatoberfläche mit Hilfe von membrangebundenen Protonenpumpen, worauf die Auf- und Ablösung von Implantatanteilen und deren anschließende zelluläre Inkorporation erfolgt (Blair 1998; Heymann et al. 1999; Teitelbaum 2000a; Wenisch et al. 2003).

Für den Knochenersatzstoff Ostim® liegen in Bezug auf das Degradationsverhalten nur wenige Informationen vor.

2.3 Fremdkörperreaktionen

Nach der Implantation von Knochenersatzmaterialien vollzieht sich die Fremdkörperreaktion als lokale Antwort des Empfängers auf den eingebrachten Fremdkörper und auf die Zerstörung der knöchernen Integrität im Zuge der Implantationsoperation. Die Fremdkörperreaktion spiegelt sich in der Rekrutierung von Makrophagen und multinukleären Riesenzellen zur Implantatoberfläche wider und geht mit Fibroblasten-Proliferation, Kollagendeposition und

Angiogenese im Interface einher (Anderson 1988).

Diese Reaktion ist Ausdruck eines naturgemäßen Geschehens, das sich aufgrund der phylogenetisch hoch konservierten Abwehrmechanismen der Wirbeltiere vollzieht. Somit stellt die Fremdkörperreaktion eine für den Organismus notwendige Schutzmaßnahme im Zuge der Gewebeheilung dar, insbesondere wegen der Fähigkeit der Makrophagen zur Bildung inflammatorischer Zytokine und einer großen Anzahl von Wachstumsfaktoren (Sunderkötter et al. 1994).

Die protektive Wirkung der Fremdkörperreaktion im Verlauf der initialen Entzündungsphase *post implantationem* ist somit unbestritten. Bei chronischem Verlauf kann die lokale Entzündungsreaktion jedoch zu Komplikationen wie mangelnder Osseointegration, Implantatinsuffizienzen oder fibröser Abkapselungen des eingebrachten Materials führen (Tang und Eaton 1995). Informationen über die Art und Anzahl der am Implantatabbau beteiligten Zellen sind daher notwendig, um die Biokompatibilität eines Implantatwerkstoffes zu beurteilen.

Die Fusion mononukleärer Makrophagen zu mehrkernigen Riesenzellen findet in der Regel statt, um die Lyse- und Degradationskapazitäten dieser phagozytären Zellpopulation zu steigern. Wie durch chronisch inflammatorische Prozesse generiert (Vignery 2000), wirkt ein niedriger pH-Wert in der Mikroumgebung von mononukleären Makrophagen fusionsaktivierend (Franklin 1958; Hernandez et al. 1996). Als eine weitere wichtige Voraussetzung für die Fusion von mononukleären Makrophagen wird in der Literatur das Vorhandensein von **CD44** diskutiert. CD44-Moleküle bilden eine weitverbreitete Gruppe integraler Membranglykoproteine (Lesley und Hyman 1998), welche Zell-Zell- und Zell-Matrix-Interaktionen vermitteln (Borland et al. 1998; Sterling et al. 1998; Goodison et al. 1999; Vignery 2000). Auch in der vorliegenden Untersuchung sollen die Fusionseigenschaften der am Implantatabbau beteiligten Zellen durch den Einsatz von Antikörpern gegen CD44 geklärt werden.

2.4 Phagozytosemechanismen

Makrophagen werden als „professionelle“ Phagozyten bezeichnet (Djaldetti et al. 2002), da die Phagozytose von Zelltrümmern und körperfremden Substanzen zu ihren Hauptaufgaben zählt.

Darüber hinaus sind auch „nicht-professionelle“ Phagozyten wie Fibroblasten (Segal et al. 2000) und B-Lymphozyten (Djaldeiti et al. 2002) durch die Entwicklung phagozytärer Eigenschaften charakterisiert.

Phagozytose bedeutet die Aufnahme fester Partikel in Zytoplasmavakuolen von Phagozyten (Allen und Aderem 1996). Dieser Vorgang geht mit einer Aktin-Polymerisierung in der Zelle einher, die durch eine Interaktion auf der Partikel-/Phagozytenoberfläche ausgelöst wird (Rabinovitch 1995; Belyi 2002; Djaldeiti et al. 2002). Im Anschluss an die Ausbildung von Pseudopodien, die den Partikel umfassen (Ángeles Esteban 2002), wird dieser schnell und selektiv zusammen mit einem Stück der Plasmamembran in die Zelle aufgenommen, wo sich aus beiden Komponenten ein Phagosom bildet (Berón et al. 1995). Dieses Phagosom reift infolge einer Fusion mit Lysosomen zum Phagolysosom, in dem die inkorporierte Substanz mit Hilfe von Enzymen degradiert wird (Aderem und Underhill 1999). In der Vergangenheit wurden einige Rezeptortypen identifiziert, die die Bindung und Aufnahme von Partikeln vermitteln. Diese Rezeptoren können mit ihren Zielstrukturen entweder direkt interagieren, indem sie an strukturelle Determinanten auf der Oberfläche binden oder indirekt nach vorheriger Opsonierung des Fremdkörpers (Greenberg 1995). Ein Beispiel für eine initiale Opsonierung ist die Fc-Rezeptor-vermittelte Phagozytose. Hierbei wird der Fremdkörper von spezifischen Immunglobulinen umschlossen und erst durch diese Ummantelung für abbauende Zellen phagozytierbar. Das Opsonin, das bei der Phagozytose die größte Rolle spielt, ist Immunglobulin G (IgG) (May und Machesky 2001). Es bindet an Fc- γ -Rezeptoren, während IgA an Fc- α - und IgE an Fc- ϵ -Rezeptoren binden (Yokota et al. 1992; van Egmond et al. 1999). Die Interaktion zwischen Fc- γ -Rezeptor und IgG führt zur Phosphorylierung eines spezifischen Tyrosinrestes im Rezeptor, die eine Konformationsänderung im zytoplasmatischen Anteil des Rezeptors zur Folge hat (May und Machesky 2001). Diese Konformationsänderung ist der Beginn einer intrazellulären Signalkette, die zu einer strukturellen Neuordnung der Aktinfilamente führt (May und Machesky 2001; Belyi 2002). Darüber hinaus können Fremdkörper und Pathogene auch relativ unspezifisch mit Komplementfaktoren opsoniert und anschließend von Komplement-Rezeptoren gebunden werden. Diese Bindung induziert Strukturänderungen des Aktin-Zytoskeletts zur Ausbildung von Pseudopodien (Greenberg 1999) und gipfelt in der Internalisierung des Fremdkörpers in die Phagozyten (Aderem und Underhill 1999).

Weiterhin existiert auf der Zellmembran von Phagozyten eine große Anzahl von Nicht-Komplement-Rezeptoren, die die Internalisierung von körperfremden Partikeln vermitteln. Zu dieser Rezeptorenklasse gehören zum Beispiel Integrin- und Mannoserezeptoren (May und Machesky 2001).

Integrine sind heterodimere transmembrane Glykoproteine, die aus unterschiedlichen Kombinationen von 16 α - und acht β -Untereinheiten bestehen (Hughes et al. 1993; Boissy et al. 1998). Hierbei ist die α -Untereinheit für die spezifische Ligandenbindung zuständig, während die β -Untereinheit mit Komponenten der intrazellulären Signalwege in Verbindung steht (Teti et al. 2002). **α V β 3-Integrin** wird in großen Mengen auf der Plasmamembran von Osteoklasten exprimiert und hat, wie alle Proteine der Integrin-Familie, eine entscheidende Funktion bei der Ausbildung von Zell-Zell- und Zell-Matrix-Verbindungen (Hughes et al. 1993; Isberg und Nhieu 1995; Nakamura et al. 1999). Die Bindung wird auf der Matrixseite durch extrazelluläre Matrixproteine vermittelt, die eine Arginin-Glycin-Aspartat-Sequenz (RGD sequence) als Bindungsstelle enthalten, wie sie beim Vitronectin zu finden ist (Aubin 1992; Duong und Rodan 1998; Wenisch et al. 2003). Weiterhin findet man α V β 3-Integrin in intrazellulären Vakuolen von Osteoklasten (Vaananen et al. 2000). Aus einer Liganden-Integrin-Bindung resultieren intrazelluläre Veränderungen in der Anordnung des Zytoskeletts, die zu einer Veränderung der Zell-Adhäsion und der Motilität der Zelle führen (Hynes 1992; Nakamura et al. 1999). Die Polarisierung von Osteoklasten mit der Ausbildung von *clear zone* und *ruffled border*, die der Resorption von Knochensubstanz vorausgeht, ist ebenfalls von der Funktion des α V β 3-Integrins abhängig (Suda et al. 1997). α V β 3-Integrin, auch als Vitronectin-Rezeptor bezeichnet, wird, obwohl häufig als Osteoklastenmarker bezeichnet (Quinn et al. 1998; Hirayama et al. 2002), nicht exklusiv von Osteoklasten exprimiert, sondern konnte in der Membran von aktivierten humanen Makrophagen *in vitro* nachgewiesen werden (Quinn et al. 1999). Um die knochenabbauenden Zellen zu detektieren, wurden in der vorliegenden Studie kommerziell erhältliche α V β 3-Integrin-Antikörper eingesetzt.

Auf zytoplasmatischer Ebene werden Änderungen der Zellmotilität und des Adhäsionsverhaltens durch Intermediärfilamente vermittelt. **Vimentin** ist das meist verbreitete Intermediärfilament-Protein (Mor-Vaknin et al. 2003). In den meisten Vertebratenzellen formen Intermediärfilamente strukturelle Netzwerke, die von der Oberfläche der Zellkerne zur

Peripherie der Zellen ziehen (Chou und Goldman 2000). Intermediärfilamente sind dynamische Strukturen in lebenden Zellen, welche die Integrität und mechanischen Eigenschaften des Zytoplasmas aufrecht erhalten (Yoon et al. 1998; Goldman et al. 1999) sowie in die Zelladhäsion involviert sind (Correia et al. 1999). In humanen Monozyten und aktivierten Makrophagen, sowie in mehrkernigen Riesenzellen ist Vimentin in großen Mengen nachzuweisen (Cain et al. 1983). *In vitro*-Versuche zeigen hohe Vimentin-Konzentrationen in Makrophagen von Mäusen in der Frühphase der Adhäsion, vor allem innerhalb adhärenter Zellanteile und Podosomen (Correia et al. 1999). In der vorliegenden Untersuchung diente der Nachweis von Vimentin der Darstellung unterschiedlicher Funktionszustände von implantatassoziierten Polykaryen.

2.5 Osteoklasten – mehrkernige Riesenzellen: Möglichkeiten und Grenzen der Zellcharakterisierung und Zelldifferenzierung

Nach heutigem Kenntnisstand beteiligen sich am Abbau CaP-basierter Knochenersatzstoffe zwei Populationen mehrkerniger Zellen: Osteoklasten und mehrkernige Riesenzellen (Constantz et al. 1998; Lu et al. 2002; Bloemers et al. 2003). Während sich die Identifizierung einkerniger Makrophagen mittels morphologischer und immunhistochemischer Methoden (CD68) eindeutig gestaltet, ist die Charakterisierung und Differenzierung der Polykaryen ungleich schwieriger, denn die Morphologie und die Markerprofile auf immunochemischer und molekularbiologischer Ebene sind nahezu gleich.

Sowohl Osteoklasten als auch mehrkernige Riesenzellen, die auch als Fremdkörperriesenzellen (FBGC) bezeichnet werden, haben ihren Ursprung im hämatopoetischen System und stammen von mononukleären Zellen des Monozyten-Makrophagen-Systems ab (Webber et al. 1990; Zheng et al. 1991; Mostov und Werb 1997; Roodman 1999; Anderson 2000; Teitelbaum 2000a).

Während jedoch die Osteoklasten im Rahmen des physiologischen *Remodelings* mineralisierte Substanz abbauen (Wang et al. 1997b; Vaananen et al. 2000; Webster et al. 2001), entstehen FBGC im Rahmen von Entzündungen wie nach der Implantation einer körperfremden Substanz, die wegen ihrer Partikelgröße nicht mehr von mononukleären Makrophagen phagozytär bewältigt werden kann (Vignery 2000). Für die Beurteilung der Tauglichkeit von Knochenersatzmaterialien und deren Wirkung auf den Empfängerorganismus ist die

Differenzierung beider Zelltypen daher von größter Wichtigkeit.

Während sich auf lichtmikroskopischer Ebene keine Möglichkeiten eröffnen, beide Zelltypen voneinander zu unterscheiden, legt die ultrastrukturelle Betrachtung wesentliche zellspezifische Merkmale offen und wird daher in der vorliegenden Untersuchung durchgeführt.

Aktive Osteoklasten bilden als deutlich polarisierte Zellen einen dem Knochen oder Implantat zugewandten Resorptionsapparat aus, der aus der *sealing zone* und dem *ruffled border* besteht (Blair 1998; Teitelbaum 2000a; Wenisch et al. 2003). Entlang der Knochenoberfläche entsteht damit ein extrazelluläres Kompartiment, in dem zunächst durch H⁺-Ionen ein niedriger pH-Wert erzeugt wird. Dies hat die Demineralisierung der anorganischen Knochenmatrix zur Folge und erzeugt optimale Reaktionsbedingungen für proteolytische Enzyme (Dodds 2003). Lysosomale Enzyme werden, in Vesikel verpackt, zum *ruffled border* transportiert und in das extrazelluläre Kompartiment sezerniert (Duong und Rodan 1998). Durch ihre Resorptionskapazität sind Osteoklasten damit zur Bildung von Resorptionslakunen entlang mineralisierter Oberflächen befähigt (Athanasou 1996; Felsenberg 2001).

Die Detektion des **Calcitonin-Rezeptors** wird als spezifischer Nachweis der Osteoklasten angesehen, wodurch die Unterscheidung von mehrkernigen Riesenzellen gelingt, denen dieser Rezeptor fehlen soll (Owens et al. 1996; Quinn et al. 1999; Teitelbaum 2000b). Calcitonin ist ein Peptidhormon, das in parafollikulären Zellen der Schilddrüse gebildet wird und primär die Funktion hat, den Serum-Kalziumspiegel zu senken. Dies geschieht über verminderte Rückresorption von Kalzium in der Niere und die Verhinderung der Freisetzung von Kalzium aus der Knochensubstanz durch Osteoklasten. Calcitonin bindet direkt an Osteoklasten und moduliert deren Resorptionsaktivität (Galvin et al. 1998). Lee und Mitarbeiter (1995) beobachteten die Reifung von Osteoklasten aus Vorläuferzellen *in vitro* und postulieren, dass der Calcitonin-Rezeptor ein Marker für mature Osteoklasten ist.

Die Detektion des **CD68**-Antigens eignet sich zum Nachweis von Monozyten und Makrophagen (Kelly et al. 1988; Falini et al. 1993; Yamate et al. 2000). CD68 ist ein Transmembran-Glykoprotein, das mit den Lysosomen in Makrophagen assoziiert (Ackermann et al. 1994) und am lysosomalen Transport und der Endozytose beteiligt ist. Für die Detektion von Makrophagen stehen als Antikörper gegen CD68 die Klone EBM11 und PG-M1 zur Verfügung (Kelly et al. 1988; Greywoode et al. 1990; Falini et al. 1993). Beide Klone sind nach

Herstellerangaben für humanes Gewebe geeignet. Da sie jedoch auch an caninem (Christgau et al. 1998), bovinem und porcinem Gewebe (Ackermann et al. 1994) bereits erfolgreich eingesetzt wurden, fanden beide Klone Eingang in die vorliegende Untersuchung.

Darüber hinaus erfolgt der immunhistochemische Nachweis weiterer Antigene, die nach neuesten Erkenntnissen von Makrophagen und Osteoklasten exprimiert werden:

Kathepsin K ist eine Cystein-Proteinase der Papain-Familie mit der Fähigkeit, zwei Komponenten der organischen Knochenmatrix, Kollagen und Osteonektin, abzubauen (Bossard et al. 1996; Delaisse et al. 2000). Sie wird in Osteoklasten gebildet und über das *ruffled border* auf die Knochenoberfläche abgegeben. Garnero et al. (1998) zufolge besitzt Kathepsin K die einzigartige Eigenschaft, die Triple-Helix von nativem Kollagen bei saurem pH abzubauen und ist daher das Schlüsselenzym für den Abbau der organischen Knochenmatrix. Drake et al. (1996) und Chambers (2000) stellten dar, dass Kathepsin K selektiv in Osteoklasten gebildet wird. Wie nachfolgende Untersuchungen verschiedener Arbeitsgruppen jedoch bewiesen haben, wird Kathepsin K nicht nur von Osteoklasten, sondern auch von multinukleären Riesenzellen exprimiert. Kontinen et al. (2001) fanden Kathepsin K in Makrophagen und Riesenzellen. In granulomatösen Veränderungen von Rinderlungen, die durch Zysten von *Echinococcus granulosus* entstanden waren, fanden Diaz et al. (2000) vielkernige Riesenzellen, die Kathepsin K bildeten. Die Untersucher schlossen daraus, dass die Produktion von Kathepsin K eine Eigenschaft von hochdifferenzierten Zellen der Monozyten-Linie ist, die auf zellulären Abbau spezialisiert sind. Die von Bühling et al. (2001) in verschiedenen pathologisch veränderten humanen Geweben untersuchten vielkernigen Riesenzellen erwiesen sich nahezu vollständig als Kathepsin K-positiv, während residente Makrophagen in gesundem Gewebe Kathepsin K-negativ waren. Da diese Ergebnisse die Annahme favorisieren, dass die Expression von Kathepsin K den Aktivierungs- und Differenzierungsgrad von Makrophagen anzeigen, wurde der Kathepsin K-Nachweis auf immunhistochemischer Ebene in der vorliegenden Untersuchung angestrebt.

Als klassische enzymhistochemische Methode zur Detektion von Osteoklasten wird stets der Nachweis der **Tartrat-resistenten sauren Phosphatase** (TRAP) in der Literatur aufgeführt (Nordahl et al. 1998; Quinn et al. 1998; Roodman 1999; Yuasa et al. 2001). Darüber hinaus wird dieses Enzym aber auch von Makrophagen und Fremdkörperriesenzellen (Kadoya et al. 1994;

Athanasou 1996; Gauthier et al. 1999) exprimiert. Da die TRAP jedoch als verlässlicher Indikator für das Ausmaß der zellvermittelten Degradation von Implantatmaterialien gilt (Shishatskaya et al. 2004), erfolgte der entsprechende enzymhistochemische Nachweis auch in der vorliegenden Studie.

2.6 Wachstumsfaktoren

2.6.1 Plättchenreiches Plasma (PRP)

PRP ist als ein „Konzentrat autologer Thrombozyten in einem kleinen Plasmavolumen“ definiert (Marx 2004). Die α -Granula der Thrombozyten enthalten verschiedene Wachstumsfaktoren, die nach Degranulation der Thrombozyten freigesetzt werden. Dazu gehören *Platelet Derived Growth Factor* (PDGF), *Transforming Growth Factor β 1,2* (TGF β_1 und β_2), *Insulin-like Growth Factor* (IGF), *Epidermal Growth Factor* (EGF), *Vascular Endothelial Growth Factor* (VEGF) und *a,b-Fibroblast Growth Factor* (saurer: aFGF, basischer: bFGF) (Carlson und Roach 2002; Dugrillon et al. 2002; Martinez-Gonzalez et al. 2002). Als Quelle thrombozytärer Wachstumsfaktoren wird PRP zur Beschleunigung der Geweberegeneration seit einigen Jahren klinisch verwendet (Marx et al. 1998; Wiltfang et al. 2003).

Ausgangsstoff zur Herstellung von PRP ist Vollblut, das bei der Entnahme durch die Beimischung von Citrat-Phosphat-Dextrose-Antikoagulans ungerinnbar gemacht wird (Fürst et al. 2003b; Aghaloo et al. 2004). Bei gebräuchlichen Herstellungsmethoden wird das Vollblut bei 5600 Umdrehung pro Minute zentrifugiert und so das plättchenarme Plasma (platelet-poor plasma, PPP) von den Erythrozyten und dem *buffy coat* getrennt, der die Leukozyten und die Thrombozyten enthält. Die Fraktion, die die Erythrozyten und den *buffy coat* enthält, wird erneut bei 2400 Umdrehung pro Minute zentrifugiert, wobei sich das PRP von dem Rest der Fraktion trennt und so gesondert entnommen werden kann (Sanchez et al. 2003; Soffer et al. 2003; Choi et al. 2004). Die Freisetzung der Wachstumsfaktoren aus den Thrombozyten erfolgt nach Zugabe von Kalziumchlorid und Thrombin zum PRP (Carlson und Roach 2002). PRP kann zeitnah aus Patientenblut während der Operation gewonnen werden. Ein Spenderindividuum wird nicht benötigt, was die Entstehung von Immunreaktionen und die Übertragung von Infektionserregern ausschließt (Tözüm und Demiralp 2003). Seit einigen Jahren wird PRP in der Traumatologie sowie der Mund- und Kieferchirurgie eingesetzt, um die Osteogenese nach Zerstörung der knöchernen Integrität zu beschleunigen. In der Regel werden

die Wachstumsfaktoren an Trägersubstanzen gekoppelt. An diese Trägersubstanzen müssen folgende Anforderungen gestellt werden: 1) Fähigkeit zum Transport von wirksamen Mengen von Wachstumsfaktoren, 2) eine strukturelle Beschaffenheit, welche die Zellmigration nicht behindert und 3) ein Abbauverhalten, bei dessen Fortschreiten weder eine entzündliche Reaktion noch toxische Abbauprodukte entstehen, welche die Defektheilung behindern (Lieberman et al. 1999).

Trotz des klinischen Einsatzes sind die Ansichten über den osteoinduktiven Effekt von PRP äußerst konträrer Natur. Untersuchungen, die einen osteoinduktiven Effekt von PRP belegen, stehen Studie gegenüber, die keinen Effekt des PRP dokumentieren (Tabelle 2).

Untersuchungen zum Einfluß von PRP auf die zellvermittelte Degradation resorbierbarer Biomaterialien existieren bislang nicht.

Tabelle 2: Studien zur Verwendung von PRP in Verbindung mit Implantatmaterialien

Implantatmaterial	Spezies	Defektlokalisation	Effekt	Literatur
β-Trikalziumphosphat	Mensch	Maxilla	Knochenneubildungsrate um 8-10 % erhöht im Vergleich zur Kontrollgruppe	Wiltfang et al. 2003
Autogener Knochen	Mensch	Mandibula	signifikant erhöhte Knochenichte	Marx et al. 1998
Entproteinerter boviner Knochen	Kaninchen	Schädelknochen	signifikant erhöhte Knochenichte	Aghaloo et al. 2004
Chirurgischer Stahl	Schwein	Mandibula	signifikant erhöhte Anzahl von Knochen-Implantat-Kontakten	Fürst et al. 2003a
Autogener Knochen, Knochenersatzmaterialien Biogran[®] und Algipore[®]	Schwein	Schädelknochen	positiver Effekt in Frühphase bei Gruppe „autogener Knochen + PRP“; kein Effekt bei Knochenersatzstoffen zu allen Untersuchungszeitpunkten	Schlegel et al. 2003
Autogener Knochen und drei xenogene Knochenersatzstoffe	Schwein	Schädelknochen	positiver Einfluss auf Knochenregeneration in der Gruppe „autogener Knochen + PRP“ kein Effekt in den übrigen Untersuchungsgruppen	Wiltfang et al. 2004
Boviner Hydroxylapatit	Schwein	Maxilla	kein Effekt	Fürst et al. 2003b
Autogener Knochen	Schaf	Maxilla	kein Effekt	Jakse et al. 2003
Anorganische bovine Knochenmatrix, Autogener Knochen	Ratte	Mandibula	kein Effekt	Roldan et al. 2004
Autogener Knochen	Hund	Mandibula	verminderte Knochenneubildung in der Gruppe „autogener Knochen + PRP“ nach sechs Wochen <i>post implantationem</i>	Choi et al. 2004

2.6.2 Thrombozytäre Wachstumsfaktoren

Bei den Wachstumsfaktoren handelt es sich um Polypeptide (Mundy 1993), die Signale zur Modulation von Zellaktivitäten übermitteln (Lee 2000). Sie können zelluläre Aktionen wie Proliferation, Differenzierung, Migration und Genexpression stimulieren oder hemmen. Weiterhin sind Wachstumsfaktoren in der Lage, konzentrationsabhängig die Rezeptorsynthese zu stimulieren oder zu inhibieren (Nimni 1997). Wachstumsfaktoren initiieren ihre Wirkung durch die Bindung an spezifische Rezeptoren der Zellmembran der Zielzelle (Lee 2000). Ihre Wirkung kann endokrin, parakrin und/oder autokrin sein. Die Wirkung von PRP, bei dem es sich letztlich um einen „Cocktail“ von Wachstumsfaktoren handelt, ergibt sich aus den Effekten der einzelnen Faktoren, allem voran jedoch aus dem Zusammenspiel aller Faktoren. Während über Interaktionen der Faktoren miteinander und die daraus resultierenden Auswirkungen auf Zellen, Gewebe und Organe nur spärliche Erkenntnisse vorliegen (Sanchez et al. 2003), sind zellabhängige Effekte der einzelnen Wachstumsfaktoren, wie im Folgenden dargelegt, ansatzweise geklärt. Die Wirkung thrombozytärer Wachstumsfaktoren im Gewebe wird durch ihren Abbau terminiert, der acht bis zehn Tage nach ihrer Freisetzung erfolgt (Garg 2000).

2.6.2.1 Platelet-derived growth factor (PDGF)

PDGF ist ein basisches dimeres Glykoprotein. Es sind drei Isoformen bekannt, die aus unterschiedlichen Kombinationen der A- und B-Ketten (PDGF-AA, PDGF-BB, PDGF-AB) resultieren (Rydzziel et al. 1994). PDGF wird von Thrombozyten, Osteoblasten, Makrophagen und Endothelzellen gebildet und spielt in der Entwicklung verschiedener Organsysteme (zentrales Nervensystem, Niere, Lunge) eine Rolle. Er fördert die Proliferation von Bindegewebe, Gliazellen und glatten Muskelzellen (Lee 2000). Während der Wundheilung fördert PDGF die Zellproliferation, die Gefäßneubildung und die Makrophagenaktivierung. Darüber hinaus verstärkt PDGF die Aktivität anderer Wachstumsfaktoren (Yazawa et al. 2003).

Während *in vitro*-Studien aufzeigen, dass PDGF auf Osteoblasten mitogen wirkt (Lieberman et al. 2002), konnte bei der lokalen Anwendung von PDGF *in vivo* keine signifikante Zunahme oder Beschleunigung der Knochenneubildung im Rahmen der Frakturheilung beobachtet werden (Nash et al. 1994; Lieberman et al. 2002; Schliephake 2002).

2.6.2.2 Transforming growth factor beta (TGF- β)

Die Bezeichnung TGF- β wird für eine Familie von mehr als 30 Proteinen verwendet. Bei diesen handelt es sich um homodimere Proteine mit einem Molekulargewicht von 25 kD. Sie werden hauptsächlich von Thrombozyten und Makrophagen gebildet, sind aber auch in anderen Zelltypen und Geweben wie Knochen und Knorpel nachweisbar (Lieberman et al. 2002).

Nach ihrer Freisetzung wirken die Proteine der TGF- β -Familie parakrin auf Fibroblasten, Knochenmarksstammzellen und Präosteoblasten. Jeder der genannten Zelltypen ist selbst in der Lage, TGF- β zu produzieren und damit autokrin seine eigene Funktion zu beeinflussen (Marx et al. 1998).

TGF- β 1 und TGF- β 2 wirken chemotaktisch und mitogen auf die Vorläuferzellen der Osteoblasten, vermitteln die Differenzierung zu maturen Zellen (Baylink et al. 1993) und regen Osteoblasten zur Bildung von Kollagenmatrix an (Lind 1998; Marx et al. 1998; Yazawa et al. 2003). TGF- β 1 stimuliert *in vivo* die Knochendefektheilung (Gombotz et al. 1994; Fujimoto et al. 1999). Darüber hinaus hemmt TGF- β die Aktivität von Osteoklasten (Marx et al. 1998; Anitua 1999; Sanchez et al. 2003) und die Proliferation von Makrophagen und Lymphozyten (Lee 2000), worin seine anti-inflammatorische Wirkung begründet liegt (Lee 2000).

Untersuchungen *in vivo* haben gezeigt, dass die Stimulation der Knochenneubildung durch TGF- β deutlich von der Auswahl der Trägersubstanz und deren Abbaukinetik abhängt (Yamamoto et al. 2000). Die dosisabhängige Wirkung von TGF- β 1 auf die Beschleunigung der Knochenneubildung wird in der Literatur kontrovers angegeben (Szivek et al. 2004).

2.6.2.3 Vascular endothelial growth factor (VEGF)

Von VEGF, der auch als vaskulärer Permeabilitätsfaktor (VPF) bekannt ist (Ferrara und Davis-Smyth 1997), existieren vier verschiedene Isoformen.

VEGF hat eine wichtige regulatorische Funktion während der Angiogenese im Embryo, Fetus und im Adulten im Rahmen zyklischer Prozesse von Ovar und Plazenta (Ferrara et al. 2003). VEGF wird von Thrombozyten, Makrophagen, Osteoblasten und glatten Muskelzellen gebildet und beeinflusst die Proliferation und Chemotaxis von Endothelzellen. Die Bildung dieses Wachstumsfaktors wird aber auch durch Gewebehypoxie induziert (Martinez-Gonzalez et al.

2002). VEGF forciert die Chemotaxis von Monozyten (Clauss et al. 1990) und induziert deren Koloniebildung. Darüber hinaus fördert er die Reifung der Granulozyten-Makrophagen-Vorläuferzellen (Broxmeyer et al. 1995). Die funktionellen Effekte von VEGF auf die Knochenbildung konnten in einem Frakturmodell an Mäusen demonstriert werden. So führte die Inhibierung von VEGF durch einen löslichen neutralisierenden VEGF-Rezeptor zu einer verminderten Angiogenese, Knochenneubildung und Kallusmineralisierung im Frakturbereich (Street et al. 2002).

2.6.2.4 Fibroblast growth factor (FGF)

Es sind zwei Isoformen des FGF bekannt: der saure Fibroblast growth factor (aFGF) und der basische Fibroblast growth factor (bFGF).

Die Wirkungen von FGF umfassen die Steigerung der Proliferation und Differenzierung von Fibroblasten und Osteoblasten (Siebert et al. 2003). Darüber hinaus erhöhen beide Isoformen die Produktion von Fibronectin durch Fibroblasten, während sie die Aktivität von Osteoklasten hemmen (Martinez-Gonzalez et al. 2002). FGF hat einen stimulierenden Effekt auf die Angiogenese, indem er mitogen und chemotaktisch auf Endothelzellen einwirkt (Martinez-Gonzalez et al. 2002).

Informationen über die osteoinduktive Wirkung von bFGF *in vivo* sind widersprüchlich. Während zum einen über eine Steigerung der Kallus- und Knochenneubildung in Defektmodellen des Kaninchens und Hundes berichtet wird (Inui et al. 1998; Hosokawa et al. 2000), konnte zum anderen kein signifikant positiver Effekt von bFGF auf die tibiale Frakturheilung des Kaninchens (Bland et al. 1995) und auf die Defektheilung der Femura von Ratten (Niedhart et al. 2004) und Miniaturschweinen (Schnettler et al. 2003) nachgewiesen werden.

2.6.2.5 Insulin-like growth factors (IGFs)

IGFs sind monomere Polypeptide, die in zwei Isoformen vorkommen. IGF-1 besteht aus 70 Aminosäuren, IGF-2 aus 67 Aminosäuren. Der Name resultiert aus einer 40-50%igen Homologie zwischen IGF und Insulin (Schliephake 2002).

Im Gegensatz zu vielen anderen Wachstumsfaktoren, die ausschließlich lokal wirken, hat IGF auch eine systemische Wirkung auf viele Zell- und Gewebetypen sowohl in metabolischer als

auch in wachstumsfördernder Weise (Schliephake 2002).

IGF stimuliert die Proliferation und Differenzierung von Knochenmarkstammzellen (Martinez-Gonzalez et al. 2002) und Osteoblasten (Baylink et al. 1993). *In vitro* konnte eine mitogene Wirkung von IGF-1 auf verschiedene Zelltypen beobachtet werden. IGF-1 zeigt in Osteoblastenkulturen einen dosisabhängigen chemotaktischen Effekt (Schliephake 2002) und regt *in vitro* die Vermehrung von Osteoblasten an (Hock et al. 1988).

2.6.3 Kombinationen verschiedener Wachstumsfaktoren bei der Behandlung von Knochendefekten

In einem Frakturmodell der Ratte konnte nachgewiesen werden, dass ein kombinierter lokaler Einsatz von TGF- β 1 und IGF-I über ein gesteigertes *Remodeling* des Kallus im Frakturbereich und eine vermehrte Mineralisierung des Gewebes zu einer höheren Belastbarkeit mit größerer Torsionssteifigkeit des Knochens führt (Schmidmaier et al. 2003). Osteotomien an Rattenfemura, die mit TGF- β 1 und IGF-I-beschichteten Titanplatten stabilisiert wurden, zeigten im Vergleich zur Kontrollgruppe einen signifikant höheren Anteil von mineralisiertem Gewebe im Osteotomiebereich und eine größere mechanische Belastbarkeit (Wildemann et al. 2004). In einer weiteren Untersuchung an Ratten zur Knochendefektheilung mit Zusatz von Wachstumsfaktoren konnte festgestellt werden, dass in der Tiergruppe, in der TGF- β mit IGF-1 kombiniert eingesetzt wurde, der Fortschritt der Defektheilung im Gegensatz zu den Kontrollgruppen am größten war (Blumenfeld et al. 2002). In Kombination mit PDGF fördert IGF-1 die Osseointegration von Titanimplantaten und verbessert so deren Einheilungsverhalten (Lynch et al. 1991; Nociti et al. 2000; Stefani et al. 2000). Weiterhin steigert diese Kombination von Wachstumsfaktoren beim Menschen und im Tierversuch signifikant die Knochenneubildung in Defekten des Kieferknochen (Giannobile et al. 1996; Howell et al. 1997).

.

3 MATERIAL UND METHODEN

3.1 Versuchstiere

3.1.1 Spezies und Rasse

Bei den Versuchstieren handelte es sich um Miniaturschweine der Rasse Mini-LEWE. Diese Rasse entstammt einem Züchtungsvorhaben der Humboldt-Universität Berlin (Außenstelle Berlin-Lehnitz) und dem Vermehrungsbetrieb Gut Wendefeld. Die Rasse entstand durch Rotationskreuzung aus den Ursprungsrassen Vietnamesisches Hängebauchschwein, Deutsche Landrasse und Sattelschwein (Rademacher 1999).

Für den Versuch wurden 26 kastrierte männliche Tiere (Herkunft: SBMF Labor, Dresden) im Alter von neun Monaten verwendet. Miniaturschweine sind dem Menschen in Bezug auf die Thrombozytenanzahl, Gerinnungsparameter und Knochenstruktur sehr ähnlich (Hönig und Merten 1993) und wurden daher für die vorliegende Untersuchung ausgewählt.

3.1.2 Haltung und Fütterung

Die Miniaturschweine wurden drei Tage vor Versuchsbeginn im Tierstall des Physiologischen Institutes des Fachbereiches Humanmedizin der Justus-Liebig-Universität Gießen in Einzelboxen auf Gummimatten aufgestellt, wobei ein natürlicher Tag-Nacht-Rhythmus gegeben war. Die Fütterung erfolgte zweimal täglich mit einer hauseigenen Mischung aus Haferflocken, Mais und Weizenkleie. Wasser wurde den Tieren *ad libitum* angeboten.

3.2 Versuchsaufbau

3.2.1 Der Hydroxylapatit-Knochenersatzstoff Ostim®

Ostim® ist ein vollsynthetischer, nanopartikulärer, phasenreiner Hydroxylapatit ($\{Ca[Ca_3(PO_4)_2]_3\}^{2+} \times 2 OH$). Ostim® liegt in Form einer wässrigen Paste vor und wird als Knochenersatzmaterial bereits in den chirurgischen Disziplinen Traumatologie, Orthopädie, Kieferchirurgie und Zahnheilkunde angewendet.

Ostim® wurde auf Anregung von Traumatologen und Kieferchirurgen an der „Russian State Medical University“ in Moskau entwickelt und dort ausgedehnten präklinischen sowie toxikologischen Untersuchungen unterzogen.

Seit Februar 2002 ist Ostim® als Medizinprodukt der Klasse III nach der EG-Richtlinie über Medizinprodukte 93/42/EWG, Anhang II inklusiv der DIN EN 46001:1996 für den gesamten Europäischen Wirtschaftsraum zugelassen.

Ostim® ist ein resorbierbares, nichtgesintertes, kristallines Material (Schnettler und Dingeldein 2002) (Abbildung 1). Die Größe der langgestreckten, flachen Kristalle beträgt im Mittel 17 nm. Mit der Feinheit der Kristalle korreliert eine sehr große Oberfläche, die bei Ostim® in getrocknetem Zustand ca. 100 m²/g entspricht. Das Ca/P-Verhältnis beträgt 1,675 und die Löslichkeit 2,6 mg Hydroxylapatit/100 g Wasser. Der durchschnittliche pH-Wert liegt bei 7,5. Damit entspricht dieses Knochenersatzmaterial in seiner chemischen Zusammensetzung und seiner kristallinen Struktur der CaP-Komponente des natürlichen Knochens.

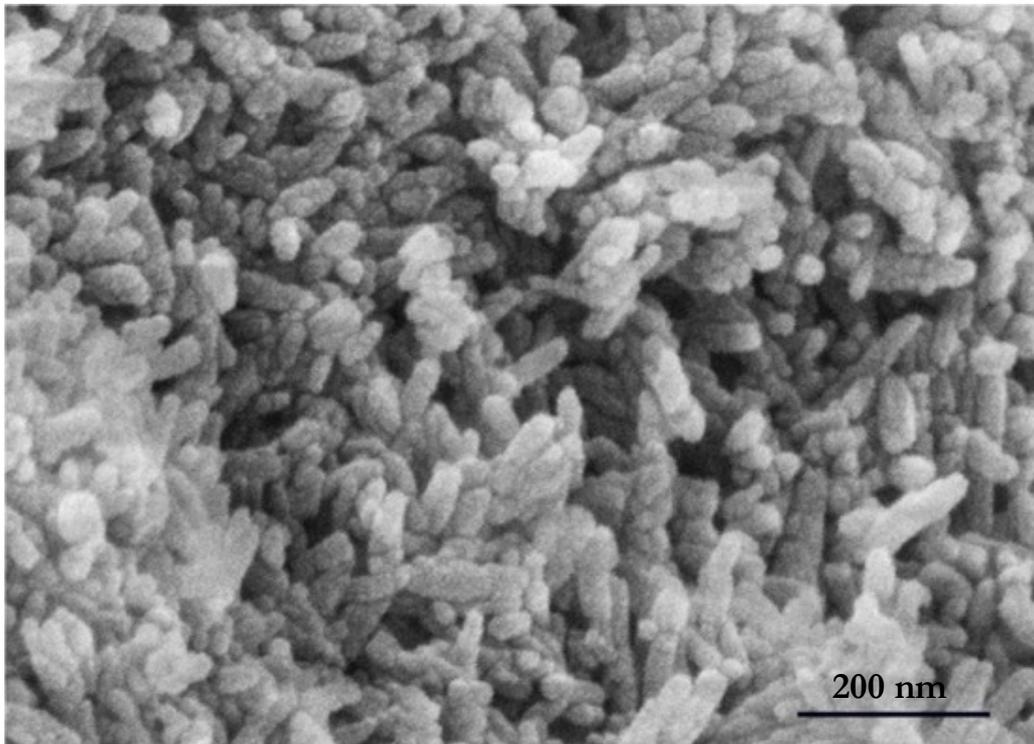


Abbildung 1: Ostim®, Knochenersatzstoff, Rasterelektronenmikroskopie

Mit Gammastrahlen sterilisiertes Ostim® wird in Form einer wässrigen Suspension angeboten. Mit steigender Konzentration von Hydroxylapatit nimmt die Viskosität der Suspension zu. Der Knochenersatzstoff ist weiß, geruchlos, enthält keine körnigen Anteile und lässt sich mit Hilfe einer Applikationskartusche leicht und formschlüssig in Knochendefekte einbringen. Das Implantatmaterial härtet *in situ* nicht aus. Durch seine pastöse Verabreichungsform können

dem Knochenersatzstoff leicht Pharmaka oder Wachstumsfaktoren beigemischt werden. In der vorliegenden Untersuchung wurde Ostim® mit Feststoffanteilen von 25 % und 35 % verwendet.

3.2.2 Plättchenreiches Plasma (PRP)

Die Gewinnung des PRP erfolgte unter Verwendung eines mobilen vollautomatischen Blutkomponenten-Separationssystems (Baureihe Compact A, Dideco/Sorin Biomedica, Puchheim) in der Abteilung für Transfusionsmedizin der Universität Tübingen entsprechend den Anweisungen des Herstellers.

Dazu wurden jeweils 250 ml Vollblut von sechs zufällig ausgewählten Versuchstieren der Gruppe I/PRP- in handelsübliche Vollblutbeutel überführt, denen ein Antikoagulant mit den Bestandteilen Natriumcitrat, Phosphat und Dextrose (Fürst et al. 2003b; Aghaloo et al. 2004) im Verhältnis 5:1 zugesetzt war. Im Rahmen der ersten Zentrifugation bei 5600 U/min für zehn Minuten erfolgte die Trennung des plättchenarmen Plasmas von Erythrozyten und *buffy-coat* (Leukozyten und Thrombozyten). Die zweite, niederfrequente Zentrifugation (2400 U/min für zehn Minuten) führte zur Trennung von Erythrozyten, Leukozyten und PRP.

Zur Gewinnung der thrombozytären Wachstumsfaktoren wurde das Thrombozytenkonzentrat mit 1000 i. E. Thrombin (Gentrac Inc., Middleton, USA) und 10 ml 8,4%igem Kalziumglukonat (Braun, Melsungen) versetzt, wodurch die Degranulation der Thrombozyten und letztlich die Freisetzung der thrombozytären Wachstumsfaktoren erreicht wurde. Das derart aufbereitete PRP wurde in Kartuschen zu jeweils 2 ml bei -20 °C bis zur weiteren Verwendung aufbewahrt.

3.2.3 Bestimmung der Thrombozytenzahl

Die Bestimmung der Thrombozytenzahl erfolgte mit dem Zellzählgerät System 9000 (Serono, USA). Die Anzahl der Thrombozyten wurde bei jeder Probe sowohl im Vollblut als auch im Thrombozytenkonzentrat ermittelt.

3.2.4 Konzentrationsbestimmung der Wachstumsfaktoren im PRP

Mit Hilfe des Quantikine™ ELISA-Testkits (R&D Systems Inc., Minneapolis, USA) erfolgte die Konzentrationsbestimmung folgender Wachstumsfaktoren im PRP und Blutplasma der jeweiligen Proben:

Transforming growth factor beta 1 (*TGF- β 1*), Platelet-derived growth factor-BB (*PDGF-BB*), Platelet-derived growth factor-AB (*PDGF-AB*), Vascular endothelial growth factor (*VEGF*) und b-Fibroblast growth factor (*bFGF*).

Als Messstandard dienten jeweils sieben Verdünnungen zwischen 32,2 pg/ml und 2000 pg/ml.

3.3 Versuchsaufbau

Der den Untersuchungen zugrunde liegende Tierversuch wurde vom Regierungspräsidium Gießen (Aktenzeichen VI 25.3 – 19 c 20/15 c GI 20/14) genehmigt. Gefördert wurde die Untersuchung vom Bundesministerium für Bildung und Forschung im Rahmen des Verbundprojektes: „Tissue engineering: Hochaktive Stimulation der Knochenheilung durch Kombination einer neuartigen resorbierbaren Matrix mit Wachstumsfaktoren und Zellen“ (Forschungsvorhaben 0312741). Projektträger war das Forschungszentrum Jülich.

Das Kollektiv der Versuchstiere bestand aus zwei Gruppen zu je 13 Tieren. Bei elf Tieren pro Gruppe wurden Knochendefekte angelegt und mit dem nanopartikulären Knochenersatzstoff gefüllt, während bei zwei Tieren pro Gruppe der Defekt im Sinne einer Leerdefektkontrolle ungefüllt belassen wurde.

Zunächst erfolgte die Operation der Tiere, denen der Knochenersatzstoff ohne Zugabe von PRP verabreicht wurde. Diese Gruppe wird im Folgenden als „Gruppe I/PRP-“, bezeichnet. Hierbei wurde Ostim® 25 (Feststoffanteil 25 %) in den Knochendefekt implantiert. Während der Operation wurden sechs zufällig ausgewählten Tieren jeweils 250 ml Vollblut aus der *V. jugularis* entnommen. Das aus dem Vollblut eines Versuchstieres gewonnene PRP wurde den Tieren der zweiten Versuchsgruppe (Gruppe II/PRP+) zusammen mit Ostim® 35 (Feststoffanteil 35 %) in die Knochendefekte implantiert. Hierzu wurde das PRP mit der höchsten Konzentration thrombozytärer Wachstumsfaktoren bei den Tieren der Gruppe II/PRP+ verwendet. Das Gemisch bestand aus 1,8 ml Ostim® 35 und 0,2 ml PRP. Durch die Verwendung der verschiedenen Ostim®-Konzentrationen konnten Differenzen im Feststoffanteil des Implantatmaterials, die aufgrund der Zumischung von PRP unvermeidlich waren, ausgeglichen werden.

3.4 Operationen

3.4.1 Narkose

Zunächst erhielten die Versuchstiere zur Prämedikation Azaperon (Stresnil[®], Janssen-Cilag, 2 mg/kg KG) und Ketamin (Ketavet[®], Pharmacia-Upjohn, 20 mg/kg KG) als intramuskuläre Injektion. In der folgenden tiefen Sedation wurde eine Venenverweilkanüle in die *V. auricularis intermedia* eingelegt. Die Narkoseeinleitung erfolgte mit einer intravenösen Gabe von Propofol (Propofol-Lipuro[®], Braun-Melsungen, 2 mg/kg KG).

In Rückenlage wurden die Tiere unter Verwendung eines Endotrachealtubus der Größe 8 intubiert. Zur Aufrechterhaltung der Narkose wurden die Tiere mit einem Sauerstoff-Isofluran-Gemisch beatmet. Der Isoflurananteil betrug hierbei zwischen 0,1 und 0,4 Volumenprozent.

3.4.2 Implantationsoperation

Die rechte hintere Gliedmaße der auf dem Rücken gelagerten, narkotisierten Versuchstiere wurde geschoren, mit Jod-PVP-Lösung mehrmals desinfiziert und steril abgedeckt.

Nach Anlegen eines 6 cm langen mediopatellaren Hautschnittes erfolgte eine schrittweise Präparation der Unterhaut, Faszien und Muskulatur bis zur Gelenkkapsel. Nach Durchtrennung der Gelenkkapsel wurde die Patella nach lateral luxiert und die Intercondylarregion des Femurs dargestellt. Mit Hilfe des Diamond Bone Cutting Systems (DBCS, Stryker) wurde in der Intercondylarregion des Femurs ein Knochendefekt von 7 mm Durchmesser und 20 mm Tiefe angelegt (Abbildung 2 und Abbildung 3). Das flüssigkeitsgekühlte DBCS ermöglicht die Herstellung von standardisierten Knochendefekten, ohne durch eine hohe Drehzahl des rotierenden Hohlbohrers Hitzenekrosen im umliegenden Gewebe zu verursachen.



Abbildung 2: Anlegen des Knochendefekts in der Intercondylarregion des Femurs

Der entstandene Knochenzylinder wurde mit einem Extraktor aus dem Defekt entfernt. Anschließend wurde der Knochendefekt mit steriler physiologischer Kochsalzlösung gespült, um durch den Bohrvorgang entstandenes Knochenmehl zu entfernen.

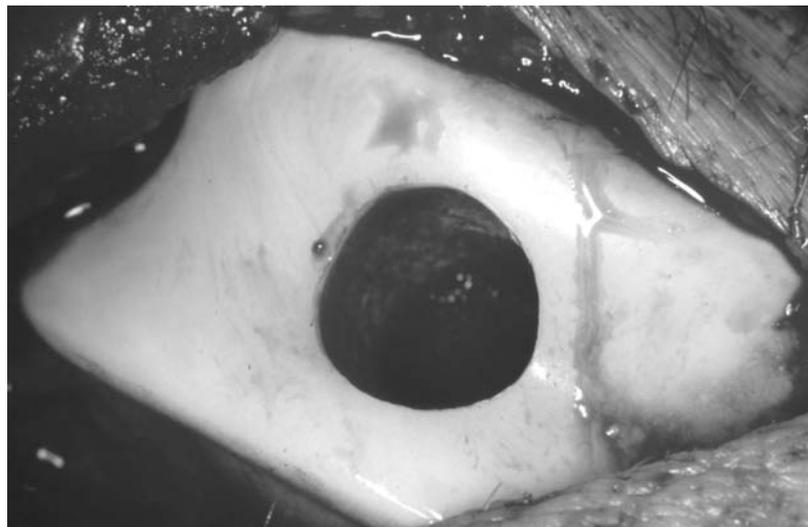


Abbildung 3: Intercondylarregion des Femurs nach Entfernung des Knochenzylinders

Die Defekte wurden mit Hilfe einer Applikationskartusche vollständig mit Knochenersatzmaterial aufgefüllt beziehungsweise bei den Kontrollen leer belassen und anschließend mit einem spezialangefertigten Kunststoffdeckel (Osartis, Obernburg) pressfit verschlossen. Dieser Defektverschluss sollte einerseits das Austreten des pastösen Implantats aus dem Defekt, zum anderen das Eindringen neugebildeter Synovia in den Defekt verhindern, um das Ausmaß externer hydrolytischer Einflüsse auf das Implantatmaterial zu reduzieren. Danach erfolgte die Rückverlagerung der Patella und ein schichtweiser Wundverschluss. Die Hautnaht wurde mit Verbandspray (Silber-Spray, Heiland, Hamburg) versorgt.

Intraoperativ erhielten die Versuchstiere eine einmalige intravenöse Gabe von Gentamicin (Gentamicin, Selectavet, 3 mg/kg KG) zur Infektionsprophylaxe.

3.4.3 Postoperative Nachsorge

Im Anschluss an die Implantationsoperation erhielten die Versuchstiere einmalig zur Analgesie Buprenorphin (Temgesic®, Boehringer Ingelheim, 0,01 mg/kg KG) und zur antiphlogistischen Therapie Carprofen (Rimadyl®, Pfizer, 4 mg/kg KG) als intramuskuläre Injektion. Die Versuchstiere wurden täglich, jeweils zu den Fütterungszeiten, nach Plan überwacht. Besonderes Augenmerk wurde auf das Allgemeinbefinden, die Wundkontrolle und die Belastung der operierten Gliedmaße gerichtet.

3.4.4 Explantationsoperation

Die zweite nach 20 Tagen Standzeit der Tiere durchgeführte Operation hatte die Entnahme des distalen Femurs zum Ziel. Der Zugang zur Defektregion erfolgte in gleicher Weise wie bei der Implantationsoperation.

Die Proben von zwei Tieren pro Versuchsgruppe wurden in flüssigem Stickstoff tiefgefroren und fanden keinen Eingang in die vorliegende Untersuchung. Bei jeweils sechs Versuchstieren beider Versuchsgruppen wurde eine Perfusionsfixierung der operierten Gliedmaße durchgeführt, um eine schnelle, adäquate Fixierung des Gewebes für die Untersuchung am Transmissionselektronenmikroskop (TEM) zu erreichen. Bei den restlichen Tieren wurden die Proben nach der Entnahme immersionsfixiert.

Zur Perfusion wurde die Bauchfellhöhle median eröffnet. Nach Verlagerung des Darmkonvoluts nach lateral wurde die *Aorta abdominalis* und der abdominale Anteil der *Vena*

cava caudalis dargestellt und freipräpariert. Nach Ligatur der *Aorta* kranial ihrer Aufzweigung in die *Aa. iliaci externae* wurde kaudal der Ligatur eine Kanüle eingelegt und bis in die *A. iliaca externa* des rechten Beins vorgeschoben. Die *V. cava caudalis* wurde ebenfalls kranial ihrer Aufzweigung ligiert und in den kaudalen Anteil ein Silikonschlauch eingelegt. Über den arteriellen Schenkel des Gefäßsystems wurde nunmehr die operierte Gliedmaße mit Ringer-Lösung gespült. Zu diesem Zeitpunkt wurden die Tiere mit einer intravenösen Injektion des Medikamentes T 61 (Intervet, Unterschleißheim) euthanasiert.

Die Spülung wurde solange fortgesetzt, bis die Spüllösung klar und ohne makroskopisch sichtbare Blutbeimengungen aus der *V. cava caudalis* abgeleitet werden konnte. Nun wurde die Ringer-Lösung durch Fixierungslösungen ersetzt. Je nach vorgesehener Untersuchungstechnik kamen 4 % Paraformaldehydlösung (Immun- und Enzymhistochemie, Schlifftechnik), Karnovsky-Lösung (Schlifftechnik) und Yellow-Fix-Lösung (Transmissionselektronenmikroskopie) zum Einsatz. Die Fixierungswirkung zeigte sich durch Strecken und Verhärten der Gliedmaße.

Zum Abschluss der Explantationsoperationen wurden die distalen Femura mit einer Drahtsäge nach Liess vom Schaft abgesetzt und unverzüglich mit einer Präzisionsbandsäge (EXAKT Apparatebau, Norderstedt) in 3 mm messende, planparallele Scheiben in sagittaler Richtung zertrennt. Die Scheiben wurden für 12 - 24 h in die jeweiligen Fixierungslösungen verbracht.

3.5 Weiterführende Behandlung der Proben für die Lichtmikroskopie

3.5.1 Histologie

3.5.1.1 Trenn-Dünnschliff-Technik

3.5.1.1.1 Einbettung unentkalkter Knochenpräparate in Technovit 7200 VLC

Die Trenn-Dünnschliff-Technik (Donath und Breuer 1982) ist eine Methode zur Herstellung histologischer Präparate von nicht schneidbaren Geweben (Knochen ohne/mit Metallimplantaten). Selbst größere Probenstücke können mit dieser Technik bearbeitet werden.

Für die Durchführung der Trenn-Dünnschliff-Technik ist es notwendig, dass unentkalkte Knochenpräparate in einen Hartkunststoff, Technovit 7200 VLC (flüssiger Methylmethacrylat-Kunststoff, Heraeus-Kulzer, Wehrheim), eingebettet werden.

Standardprotokoll:

Die in 4%iger Paraformaldehydlösung fixierten, unentkalkten Knochenscheiben wurden durch die aufsteigende Alkoholreihe geführt, wobei die Präparate jeweils für 48 h in Ethanol verschiedener Konzentrationen verblieben. Im Anschluss wurden die Knochenpräparate für jeweils 48 h in Medien überführt, in denen Technovit 7200VLC und reines Ethanol in verschiedenen Mischverhältnissen vorlagen (Technovit/Ethanol: 30:70, 50:50, 70:30). Dazu diente das Entwässerungssystem 510 (Entwässerungs- und Infiltrationsautomat, EXAKT Apparatebau, Norderstedt). Zuletzt erfolgte eine neuntägige Inkubation in Technovit 7200 VLC, das mit 1 % Dibenzoylperoxid (BPO, Exakt-BPO Penetrationsbeschleuniger, Heraeus-Kulzer, Wehrheim) versetzt war. Die Erneuerung der Infiltrationslösung erfolgte alle 72 h. Während dieses letzten Arbeitsschrittes wurden die Präparate pro Stunde 15 min einem Vakuum ausgesetzt, damit sie besser vom Flüssigkunststoff penetriert werden konnten und kleinste Luftblasen aus dem Präparat herausgezogen wurden.

Zum Einbetten wurden die Präparate auf dem Boden von Einbettmulden mit dem Fixationskleber Technovit 7230 VLC (Heraeus-Kulzer, Wehrheim) fixiert und mit Technovit 7200 VLC + 1 % BPO überschichtet.

Zur Polymerisation wurden die eingebetteten Proben in das Lichtpolymerisationsgerät Histolux (EXAKT Apparatebau, Norderstedt) überführt und durch Gelblichtbestrahlung für 2 h vorpolymerisiert. Die Vorpolymerisation musste langsam erfolgen, um die Bildung von Spannungsrissen im Kunststoffblock zu vermeiden. Die endgültige Polymerisation fand während der anschließenden vierstündigen Bestrahlung mit Blaulicht statt.

Die Einbettformen wurden zur Aushärtung der Blockoberflächen für 16 h bei 40 °C in einen Wärmeschrank eingestellt. Danach erfolgte das Ausblocken.

3.5.1.1.2 Trenn-Dünnschliff-Technik

Vor Herstellung eines Dünnschliffes war es notwendig, die Dicke des verwendeten Glasobjektträgers mit Hilfe einer Mikrometerschraube zu ermitteln, um später rechnerisch die Dicke des Dünnschliffes bestimmen zu können.

Der das Präparat enthaltende Kunststoffblock wurde mit der vom Präparat weiter entfernten Fläche auf einen Plexiglas-Objektträger (EXAKT Apparatebau, Norderstedt) aufgeklebt. Um

einen gleichbleibenden Anpressdruck sicherzustellen, wurde das Präparat auf dem Objektträger in eine Vakuum-Klebeeinrichtung (EXAKT Apparatebau, Norderstedt) eingelegt.

Die näher am Präparat liegende Fläche des Kunststoffblocks wurde mit Hilfe des EXAKT-Mikro-Schleifsystems (EXAKT Apparatebau, Norderstedt) angeschliffen. Nach Fixation des Kunststoffblocks mit dem Objektträger in einer Halterung mittels Vakuum, wurde diese mit einem Gewicht von 400 g beschwert und auf eine rotierende Scheibe abgesenkt, auf der ein Schleifpapier auflag, das während des Schleifvorganges kontinuierlich befeuchtet wurde. Der Kunststoffblock wurde solange automatisch mit oszillierenden Bewegungen über das Schleifpapier geführt, bis die Präparatoberfläche vollständig von Technovit 7200 befreit war. Die anschließende Verwendung von Polierpapier diente der Entfernung der durch die Schleifpapierbehandlung entstandenen Schleifspuren auf der Knochenoberfläche.

Nach dem Polieren fand eine erneute Messung des Präparatblockes auf dem Plexiglas-Objektträger mittels einer Mikrometerschraube statt. Auf die angeschliffene, planparallele Fläche des Präparatblockes wurde nun ein Glasobjektträger mit Technovit 7210 VLC-Präzisionskleber (Heraeus-Kulzer, Wehrheim) in oben beschriebener Weise aufgeklebt und dann die Gesamtdicke des Konstruktes ermittelt.

Das entstandene Präparat-Objektträger-Sandwich konnte nun in das EXAKT-Trennschleif-System (EXAKT Apparatebau, Norderstedt) eingespannt werden. Dieses einer Bandsäge sehr ähnliche System durchtrennt mit einem wassergekühlten, diamantbeschichteten Trennband den Präparatblock auf der dem Glasobjektträger zugewandten Seite. Das Sandwich-Präparat wurde auf einem beweglichen Schlitten befestigt, der das Präparat mit einer definierten Kraft gegen das Trennband drückte. Nach dem Trennvorgang entstand eine bis zu 100 µm dicke, auf dem Glasobjektträger aufgeklebte, Präparatscheibe. Die Gesamtdicke von Objektträger und Präparat wurde mit Hilfe der Mikrometerschraube ermittelt.

Das EXAKT-Mikro-Schleifsystem trug das Präparat im Anschluss bis zur gewünschten Zieldicke sensorgesteuert ab. Als Erfolgskontrolle diente wiederum die Messung der Präparatdicke mittels Mikrometerschraube. Mit einem Polierschritt war die Herstellung des Dünnschliffs abgeschlossen.

3.5.1.1.3 Färbung der Dünnschliff-Präparate mit Toluidinblau

Die folgenden zwei Stammlösungen dienten der Herstellung von Toluidinblau-Färbelösung. Für Stammlösung A wurden in 80 ml Aqua dest. 800 µg di-Natriumtetraborat (Merck, Darmstadt) und 800 µg Toluidin-O (Chroma, Köngen) gelöst und mit Hilfe eines Magnetrührers 15 min vermischt. Die Lösung B bestand aus 200 µg Pyronin G (Merck, Darmstadt), das in 200 ml Aqua dest. aufgelöst und ebenfalls für 15 min gerührt wurde. Nach Überführen der Lösung A in die Lösung B schloss sich ein weiterer 15 minütiger Rührschritt an. Nach zweimaligem Filtrieren war die Färbelösung einsatzbereit.

Die Knochenschliffe wurden für 10 min in 10%ige H₂O₂-Lösung überführt, um die Präparatoberfläche anzuätzen, was wiederum ein besseres Färbeergebnis gewährleistet. Nach einem Spülschritt in Aqua dest. erfolgten die Behandlung mit Toluidinblau für 10 min, ein weiterer Spülschritt und das Eindeckeln der Präparate.

3.5.2 Paraffintechnik

3.5.2.1 Entkalkung der Knochenpräparate mit Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)

Zur Gewährleistung einer guten Strukturhaltung im Rahmen der Paraffinschnitttechnik wurde eine Entkalkung der Knochenpräparate, die für die enzymhistochemischen und immunhistochemischen Untersuchungen bestimmt waren, durchgeführt. In Entkalkungsversuchen mit EDTA im Rahmen von Vorversuchen konnte festgestellt werden, dass der Lagerknochen zuverlässig entkalkt wurde, das neugebildete fibro-vaskuläre Gewebe eine sehr gute Strukturhaltung aufwies und bei dem eingebrachten Implantat keine Degradationserscheinungen durch das Entkalkungsmedium zu erkennen waren.

Standardprotokoll:

Zur Herstellung von 500 ml Entkalkungsmedium wurden 17 g TRIZMA[®]-Base (Trishydroxymethylaminomethan, Sigma, St. Louis, USA) und 50 g TITRIPLEX III (Ethylendiamintetraessigsäure, Merck, Darmstadt) in 500 ml Aqua dest. gelöst. Anschließend erfolgte die Einstellung der Lösung auf einen pH-Wert von 7,4.

Eine Menge von 50 ml des Mediums diente der Entkalkung einer 3-4 mm dicken Knochenscheibe. Die Entkalkung erfolgte in Bechergläsern bei Zimmertemperatur und durch

Erneuerung des Entkalkungsmediums im 2-Tage-Turnus. Eine zu diesen Zeitpunkten durchgeführte Überprüfung der Festigkeit des Präparates mittels einer Präpariernadel gab Aufschluss über den aktuellen Grad der Entkalkung. Diese war beendet, sobald sich die Präpariernadel ohne fühlbaren Widerstand in das Präparat hineinführen ließ. Im Durchschnitt dauerte der Entkalkungsvorgang 21 Tage.

3.5.2.2 Paraffineinbettung der entkalkten Knochenpräparate

Standardprotokoll:

Im Anschluss an die Entkalkung wurden die Knochenpräparate für 1 h mit Aqua dest. gespült. Der Behandlung in der aufsteigenden Alkoholreihe und in 100%igem Ethanol für 2 x 1 h, schloss sich die zweistündige Entwässerung in reinem Xylol an.

Das Paraffingranulat (Paraplast[®], Sherwood Medical, St. Louis, USA) wurde bei 58 °C verflüssigt. Es folgte das Einlegen der entkalkten Knochenpräparate in das verflüssigte Paraffin für 4 h. Danach wurden die Proben einzeln in Einbettformen (Base Molds, Miles, Elkhart, USA) überführt und mit flüssigem Paraffin überschichtet.

Nachdem das Paraffin in den Einbettformen nach 16 h bei 8 °C erstarrt war, konnten die eingebetteten Präparate aus den Formen ausgebettet werden.

3.5.2.3 Herstellung von Paraffinschnitten

Die in Paraffin eingebetteten Proben wurden in die Haltevorrichtung des Rotationsmikrotoms (LEICA RM 2155, LEICA Instruments GmbH, Nussloch) eingespannt und die Präparatoberfläche parallel zur Mikrotomklinge (LEICA 819, LEICA Instruments GmbH, Nussloch) ausgerichtet. Nach vorsichtigem Anschneiden des Paraffinblockes bis zur Freilegung des Knochenpräparates wurden Schnitte von 3-5 µm Dicke abgetragen, die, in Aqua schwimmend, auf Glasobjektträgern (SuperFrost[®]Plus, Menzel-Gläser, Deutschland) aufgezogen wurden. Anschließend wurden die Paraffinschnitte luftgetrocknet.

3.5.2.4 Färbung mit Hämatoxylin-Eosin

Die in Paraffin eingebetteten Gewebeschnitte wurden für 10 min in Xylol entparaffiniert, durch die absteigende Alkoholreihe geführt und in Aqua dest. gespült, bevor sie für fünf min in Hämaunlösung (Mayers Hämaunlösung, 9249, Merck, Darmstadt) gefärbt wurden. Nach

einem Spülschritt in Aqua dest. und der Blaufärbung der Schnitte nach der Behandlung mit Leitungswasser wurden sie für 30 s in eine 1%ige alkoholische Eosin-Lösung (Certistain[®], Eosin G, Merck, Darmstadt) überführt. Nach erneutem Spülen der Präparate in Aqua dest., dem Führen durch die aufsteigende Alkoholreihe und einer abschließenden Xylolbehandlung wurden die Schnitte mit Entellan[®] (Schnelleinschlußmedium, Merck, Darmstadt) eingedeckt.

3.6 Histochemische Methoden

3.6.1 Enzymhistochemie

3.6.1.1 Nachweis der Tartrat-resistenten sauren Phosphatase (TRAP)

Standardprotokoll:

Der enzymhistochemischen Untersuchung dienten Paraffinschnitte, die zu Beginn der Untersuchung für 2 x 10 min in Xylol entparaffiniert wurden. Nach einem Spülschritt in Aceton für 2 x 5 min wurden die Präparate für 2 x 2 min in Aqua dest. überführt, nachfolgend für 10 min mit 0,1 M Acetatpuffer (pH 5,2) gespült, um sie anschließend zu inkubieren.

Die Inkubationslösung setzte sich wie folgt zusammen: 7 mg Naphthol-AS-TR-Phosphat (FLUKA, Seelze) gelöst in 25 µl N-N-Dimethylformamid (Sigma, St. Louis, USA), 5 ml 0,1 M Acetatpuffer (pH 5,2), 11,5 mg Natrium-Tartrat (Merck, Darmstadt) und 7 mg Echtrot-Salz TR (FLUKA, Seelze).

Die Inkubation erfolgte für 30 min bei einer Temperatur von 37 °C in einer feuchten Kammer. Nach 30 min hatten TRAP-positive Strukturen in den Schnitten eine intensiv-rote Farbe angenommen. Gründlichem Spülen der Schnitte in Aqua dest. folgte eine Kernfärbung mit Hämatoxylin (Shandon Scientific Ltd., Cheshire, UK). Dem Bläuen der Schnitte schloss sich eine Spülung in Leitungswasser an, der ein weiterer Spülschritt in Aqua dest. folgte. Zum Abschluss wurden die Schnitte mit Hilfe von Glyceringelatine (KAISERS Glyceringelatine, Merck, Darmstadt) mit Deckgläsern versehen.

Kontrollinkubation

Die Negativkontrollen erfolgten durch Inkubation der Schnitte mit 0,1 M Acetatpuffer (pH 5,2) für 30 min.

3.6.2 Immunhistochemie

3.6.2.1 Antigen-Demaskierung

Durch die Behandlung der histologischen Präparate mit Fixierungslösungen wurden die Proteine häufig so stark vernetzt, dass der immunhistochemischer Nachweis antigener Strukturen nicht mehr gelang. Mit Hilfe von unterschiedlichen Demaskierungsmethoden konnten die nachzuweisenden Epitope wieder freigelegt werden.

3.6.2.1.1 Hitzebehandlung in Citratpuffer

Die entparaffinierten Gewebeschnitte wurden in 0,01 M Citratpuffer (pH 6,0) bei einer Temperatur von 95 °C für 20 min erhitzt.

3.6.2.1.2 Pronase-Vorbehandlung

Zur enzymatischen Antigen-Demaskierung wurden die entparaffinierten Gewebeschnitte in 0,05 M Tris/HCl mit Zusatz von 0,05 % Pronase (DAKO, Denmark) bei pH 7,2 für sieben min. Anschließend erfolgte das Abstoppen der Reaktion durch das Überführen der Gewebeschnitte in 0,1 M Tris-NaCl-Puffer.

3.6.2.2 Avidin-Biotin-Complex-Methode (ABC-Methode)

Für die immunhistochemische Untersuchungen des Knochengewebes wurde die Avidin-Biotin-Methode ausgewählt. Bei dieser Methode werden drei verschiedene Reagenzien benötigt. Erstens, der gegen ein bestimmtes Antigen gerichtete Primärantikörper, zweitens ein biotinylierter Sekundärantikörper und drittens der Peroxidase-konjugierte Avidin-Biotin-Komplex. Das Avidinmolekül bindet aufgrund seiner starken Affinität an das Biotin des als Brückenmolekül fungierenden Sekundärantikörpers. Mit Hilfe eines geeigneten Chromogens wird das Enzym Peroxidase und damit der Antigen-Antikörperkomplex sichtbar gemacht.

Standardprotokoll

Die Schnitte wurden zunächst in Xylol für 2 x 10 min entparaffiniert und nach einem Spülschritt in Aceton (10 min) für 2 x 2 min in Waschpuffer überführt, der aus 0,1 M Tris-NaCl-Puffer und 0,1 % Triton X-100 (Merck, Darmstadt) bestand. Es schloss sich eine Inkubation mit 0,3%igem H₂O₂ (Merck, Darmstadt) für 5 min an, um die Aktivität der endogenen Peroxidase im Präparat zu hemmen. Im weiteren Verlauf wurden die Objektträger

in Waschpuffer gestellt, der mit 3 % Schweineserum versetzt war, um freie Bindungsstellen im Präparat zu blockieren. Diese freien Bindungsstellen bergen die Problematik, dass sie den Primärantikörper wegen ihrer starken Ladung unspezifisch adsorbieren können und somit zu falsch-positiven Untersuchungsergebnissen führen. Im Anschluss an zwei weitere Spülschritte in Waschpuffer wurden die mit einem kommerziell erhältlichen Medium (Antibody Diluent S3022, DAKO, Dänemark) verdünnten Primärantikörper (Tabelle 3) auf die Präparate aufgebracht.

Die Präparate wurden in einer feuchten Kammer für 16 h bei einer Temperatur von 8 °C inkubiert.

Nach Abspülen der Primärantikörperlösung wurden die Präparate mit dem Sekundärantikörper (Tabelle 3) bei Raumtemperatur für eine h in einer feuchten Kammer belassen.

Spülschritten in Waschpuffer (2 x 2 min) folgte die Inkubation mit dem in 0,05 M Tris-NaCl-Puffer verdünnten Peroxidase-konjugierten Avidin-Biotin-Komplex (ABCComplex/HRP, K0355, DAKO, Dänemark) für 30 min bei Raumtemperatur in einer feuchten Kammer. Nach weiteren Spülschritten in Waschpuffer (2 x 2 min) wurde das Chromogen (NovaRED™ Substrate Kit for Peroxidase, Vector Laboratories, Burlingame, USA) für 5 min aufgetragen und eine Kernfärbung mit Haematoxylin-Lösung (Shandon Scientific Ltd., Cheshire, UK) durchgeführt. Nach dem Bläuen in Leitungswasser und einem Spülschritt in Aqua bidest. wurden die Präparate in der aufsteigenden Alkoholreihe entwässert. Zum Abschluss erfolgten zwei Xylol-Schritte und das Eindecken der Präparate mit Entellan® (Schnelleinschlussmedium, Merck, Darmstadt).

Kontrollinkubation

Die Negativkontrollen erfolgten durch eine Inkubation mit Antikörperverdünnungsmedium ohne Zusatz von Primärantikörper.

Tabelle 3: Verwendete Antikörper

Primär-Antikörper	(M)onoklonal (P)olyklonal	Bezugsquelle	Artikelcode	Verdün- nung	Spezies- reaktivität	Sekundär- Antikörper	Bezugs- quelle	Verdün- nung
Anti-Kathepsin K	P	Santa Cruz Biotech., USA	SC6506	1:1000	Mensch	Biotinylated Rabbit Anti- Goat Immunoglobulins E0466	DAKO, Denmark	1:800
Anti-CD44	M	Serotec, Oxford, UK	MAC329	1:25	Schwein	Biotinylated Rabbit Anti- Rat Immunoglobulins E0467	DAKO, Denmark	1:600
Anti-Vimentin	M	Chemicon, Temecula, USA	MAB3400	1:400	Schwein Mensch Ratte Maus Hund Katze Rind	Biotinylated Rabbit Anti-Mouse Immunoglobulins E0354	DAKO, Denmark	1:400

Fortsetzung Tabelle 3:

Primär-Antikörper	(M)onoklonal (P)olyklonal	Bezugsquelle	Artikelcode	Verdünnung	Spezies- reaktivität	Sekundär- Antikörper	Bezugs- quelle	Verdün- nung
Anti-Calcitonin-Rezeptor	P	DPC Biermann, Bad Nauheim	SP1338P	1:25 bis 1:1000	Ratte	Biotinylated Goat Anti-Rabbit Immunoglobulins E0432	DAKO, Denmark	1:400 bis 1:1000
Anti-CD68 (<i>Klon EBM11</i>)	M	DAKO, Denmark	M0718	1:25 bis 1:1000	Mensch	Biotinylated Rabbit Anti-Mouse Immunoglobulins E0354	DAKO, Denmark	1:200 bis 1:600
Anti-CD68(<i>Klon PG-M1</i>)	M	Biologo, Kronshagen	CD68-5	1:25 bis 1:1000	Mensch	Biotinylated Rabbit Anti-Mouse Immunoglobulins E0354	DAKO, Denmark	1:200 bis 1:600
Anti-Integrin αVβ3	M	Chemicon, Temecula, USA	MAB1976	1:25 bis 1:1000	Mensch Schwein Rind Hund	Biotinylated Rabbit Anti-Mouse Immunoglobulins E0354	DAKO, Denmark	1:200 bis 1:600

3.7 Lichtmikroskopische Auswertung

Die Auswertung erfolgte mit Hilfe des Lichtmikroskops Zeiss Axioplan 2 (Carl Zeiss, Jena). Die Digitalaufnahmen der Untersuchungsergebnisse wurden mit der Kamera DC 500 (Leica Microsystems, Wetzlar) in Verbindung mit dem Mikroskop-Fotoaufsatz Axiophot 2 (Carl Zeiss, Jena) angefertigt. Die Bildbearbeitung erfolgte mit dem Bildmanagementsystem Leica IM 1000, Version 4.0, (Leica Microsystems Digital Imaging, Cambridge, UK).

3.8 Transmissionselektronenmikroskopie

3.8.1 Einbettung unentkalkter Knochenpräparate in Epon 812

Bei Epon 812 (Serva, Heidelberg) handelt es sich um ein Einbettungsmedium auf Epoxidharzbasis, mit dem sich eine sehr gute Erhaltung der Ultrastruktur der Präparate für die Transmissionselektronenmikroskopie erzielen lässt.

Unmittelbar nach Entnahme der perfusionsfixierten Proben erfolgte deren weitere Immersionsfixierung mit Yellow-Fix-Lösung (4 % Paraformaldehyd, 2 % Glutaraldehyd, 0,04 % Pikrinsäure) in 0,1 M Na-Phosphatpuffer (pH 7,2) für 7 h. Nach gründlichem Spülen der Proben in 0,1 M Na-Phosphatpuffer (pH 7,2) schloss sich eine zweistündige Nachfixierung in 1%iger Osmiumtetroxid-Lösung bei Raumtemperatur an. Nach erneuten Spülgängen in 0,1 M Na-Phosphatpuffer und Entwässerung in der aufsteigenden Alkoholreihe erfolgte die Einbettung der Präparate in den Kunststoff Epon 812. Dafür wurden die Proben über drei Tage in Epon–Xylol–Gemischen mit ansteigendem Epongehalt bis hin zur reinen Eponlösung behandelt. Die Behandlung erfolgte mit Unterdruck, um eine optimale Penetration der Präparate zu erhalten. Der Kunststoff polymerisierte im Wärmeschrank für zunächst 3 h bei 48 °C und anschließend für weitere 20 h bei 60 °C.

3.8.2 Standardvorgehen bei der Transmissionselektronenmikroskopie

Die zunächst mit dem Ultramikrotom (Reichert-Jung, Wien, Österreich) hergestellten Semidünnschnitte dienten sowohl der Orientierung als auch der Auswahl von Regionen, die Eingang die in transmissionselektronenmikroskopische Untersuchungstechnik fanden.

3.8.3 Färbung mit Safranin

Zur Herstellung von Safranin-Färbelösung wurden zunächst 1 g Safranin (Merck, Darmstadt)

und 1 g di-Natriumtetraborat (Merck, Darmstadt) in 100 ml Aqua bidest. gelöst und für 30 min gerührt. Anschließend wurden Semidünnschnitte entplastet und nach Spülen mit Aqua dest. für 5 s gefärbt. Nach weiterem Spülen, einer Gegenfärbung mit Toluidinblau und abschließenden Spülen in Aqua dest. erfolgte das Eindeckeln der Präparate.

Ultradünnschnitte der entsprechenden Regionen wurden mit 1 % Uranylacetat und 1 % Bleizitrat behandelt und mit dem Elektronenmikroskop EM 109 (Carl Zeiss, Jena) untersucht.

3.9 Computergestützte Datenquantifizierung

Das halbautomatische computergesteuerte Bildanalyseverfahren setzt das Vorhandensein geeigneter Färbemethoden in Verbindung mit einer optimalen Strukturhaltung voraus, um spezifische Strukturen wie immun- oder enzymhistochemische Zellen selektiv zu detektieren.

3.9.1 Messverfahren

Für diese Untersuchung wurden Paraffinschnitte nach Anwendung der TRAP-Histochemie herangezogen, um mononukleäre Makrophagen und mehrkernige Riesenzellen optisch zu erfassen. Auf eine Gegenfärbung mit Hämatoxylin wurde bei diesen Präparaten verzichtet, um zur Optimierung der computergestützten Quantifizierung einen möglichst großen Farbkontrast im Präparat zu erreichen.

Zur Quantifizierung der TRAP-positiven Zellen wurden Präparate von jeweils acht Tieren aus der Gruppe I/PRP- und der Gruppe II/PRP+ untersucht. Auf die Untersuchung der Leerdefekte wurde verzichtet, da dort keine TRAP-positiven Zellen detektiert werden konnten.

Mit Hilfe des Stereomikroskops Stemi SV 11 (Carl Zeiss, Jena) und der Kamera Kappa DX 30 (Kappa, Gleichen) konnten die diagnoserelevanten Bereiche jedes Präparates segmentweise aufgenommen werden. Anschließend erfolgte die Bearbeitung der fotografierten Präparatausschnitte am Computer. Zur Quantifizierung kam die Software Image Pro Plus, Version 4.5 (Media Cybernetics Inc., Silver Spring, USA) zum Einsatz.

Die TRAP-positiven Zellen ordneten sich im Granulationsgewebe ringförmig um die Defekte an. Mit Hilfe der Quantifizierungssoftware wurde deshalb ein kreisförmiges Messfeld („area of interest“, AOI) definiert, das in jedem Testpräparat zirkulär um den ganzen Defekt

herumgeführt wurde (Abbildung 4). Somit konnten in sämtlichen Lokalisationen die TRAP-positiven Zellen erfasst werden. In dieser Untersuchung wurden pro Paraffinschnitt zwischen 12 und 24 AOIs vermessen. Limitierender Faktor für die Anzahl der Messfelder war die variierende Größe der ringförmigen Defektbereiche der Präparate, in dem die TRAP-positiven Zellen lokalisiert waren. Bei der Messung wurden rote Bildpunkte positiv bewertet. Die Quantifizierung erfolgte automatisch. Die positiv gewerteten Areale wurden mit der Einheit „% pro Gesamtfläche“ des Messfeldes angegeben. Zum Abschluss wurde aus allen Messwerten eines Präparates der Mittelwert ermittelt.

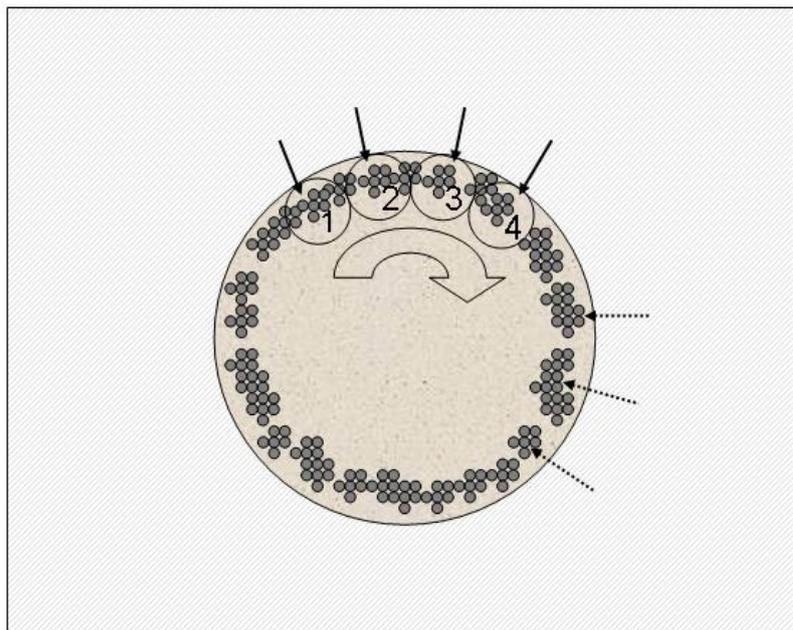


Abbildung 4: Schematische Darstellung der Messmethode TRAP-positiver Flächenanteile

Die Abbildung zeigt schematisch ein in Paraffin eingebettetes Knochenpräparat. Hierbei entspricht die schraffierte Fläche dem Anteil des Lagerknochens. Innerhalb des kreisrunden Knochendefektes sind die TRAP-positiven Zellen (**unterbrochene Pfeile**) ringförmig angeordnet. Exemplarisch sind vier Messfelder (**durchgezogene Pfeile, Nr. 1 - 4**) dargestellt, die sowohl an die Defektgrenze als auch an die jeweils benachbarten Messfelder angelagert sind. Die Messung erfolgte zirkulär entlang des gesamten Defektrandes durch Hinzufügen weiterer Messfelder im Uhrzeigersinn (**transparenter Pfeil**).

3.9.2 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung der Verhältnisse der Mittelwerte pro Tier in beiden Untersuchungsgruppen wurde mit Hilfe eines Wilcoxon-Rangsummentests für zwei unabhängige Stichproben durchgeführt. Die Berechnungen erfolgten mit Hilfe der Software SAS (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA), Version 8.1.

4 ERGEBNISSE

4.1 Versuchstiere

Bei 25 der 26 Miniaturschweine gestaltete sich der postoperative Verlauf ohne Komplikationen. Die Tiere belasteten die operierte Gliedmaße zwischen dem fünften und neunten postoperativen Tag wieder vollständig.

Bei einem Tier der Gruppe I/PRP- traten Komplikationen in Form einer Patellaluxation an der operierten Gliedmaße auf. Das Schwein wurde am dritten postoperativen Tag erneut operiert und die Patella repositioniert. Das Knochenpräparat dieses Tieres fand keinen Eingang in die weiteren Untersuchungen.

4.2 Anreicherung der Thrombozyten

Tabelle 4 zeigt die Mittelwerte der Thrombozytenzahlen der Spendertiere im Vollblut und im Thrombozytenkonzentrat mit Standardabweichung.

Tabelle 4: Mittelwerte der Thrombozytenzahlen der Spendertiere im Vollblut und im Thrombozytenkonzentrat mit Standardabweichung

Anzahl der Thrombozyten in G/l		
	Vollblut	Thrombozytenkonzentrat
Versuchstier 1 – 6	267.000 ± 33.000	1.300.000 ± 700.000

4.3 Konzentrationen der Wachstumsfaktoren

Für die Implantation in die Knochendefekte der Versuchstiere aus Gruppe II/PRP+ wurde das PRP mit der höchsten Konzentration an thrombozytären Wachstumsfaktoren eingesetzt. Tabelle 5 zeigt die Konzentrationen der Wachstumsfaktoren in Blutplasma und im verwendeten PRP.

Tabelle 5: Konzentrationen von Wachstumsfaktoren in Blutplasma und PRP

Wachstumsfaktor	Konzentration (pg/ml)	
	Blutplasma	PRP
VEGF	< 10	< 10
PDGF-AB	Keine AK-Reaktion	Keine AK-Reaktion
PDGF-BB	343,45	2.452,10
TGF-β1	6678,10	11.129,00
bFGF	13,69	334,10

Mit Hilfe des ELISA-Verfahrens konnte ermittelt werden, dass bei der Herstellung von PRP PDGF-BB um den Faktor 7,1, TGF-β1 um den Faktor 1,6 und bFGF um den Faktor 24,4 konzentriert wurde. Die VEGF-Konzentration befand sich unter der Nachweisgrenze von 10 pg/ml. Für PDGF-AB konnte keine Antikörperreaktion nachgewiesen werden.

4.4 Gruppe I/PRP-

4.4.1 Histologie

Wie in den Hämatoxylin-Eosin-gefärbten (HE) Paraffinschnitten und den Dünnschliffen zu erkennen ist, sind die inneren Oberflächen der Defektränder bei allen Tieren von einem zellreichen Granulationsgewebe ausgekleidet, dessen Fasern sich parallel zum Defektrand anordnen. Das zellreiche Granulationsgewebe füllt die Räume zwischen den einzelnen Implantatpartikeln aus und ist von zahlreichen quer- und längs angeschnittenen Gefäßen durchzogen. Das Implantatmaterial besteht aus Solitärpartikeln, die peripher Auflockerungen der Materialdichte aufzeigen. In den Defektzentren der untersuchten Präparate sind weder Implantatanteile noch Granulationsgewebe nachzuweisen.

Die Zellpopulationen des Granulationsgewebes sind heterogen. Fibroblasten und Fibrozyten mit spindelförmigem Zytoplasma und hellen runden Zellkernen sind die vorherrschenden

Zelltypen. Darüber hinaus sind mononukleäre Zellen, die stellenweise intrazytoplasmatische Einschlüsse aufweisen, zu erkennen. Diese polymorphen mononukleären Zellen sind häufig gruppenweise im Granulationsgewebe lokalisiert.

Entlang der Implantatoberflächen sind typischerweise zwei unterschiedliche Zelltypen zu identifizieren. Einerseits kubisch geformte Osteoblasten, die perlschnurartig aufgereiht, schmalen Osteoidsäumen entlang der Implantatoberfläche aufsitzen und zum Teil mehrere Zellreihen bilden. Andererseits große multinukleäre Zellen, die abhängig von der Schnittebene mehr als 20 Zellkerne aufweisen können (Abbildung 5). Diese Zellen sind nur an den Implantatoberflächen lokalisiert, die nicht von Osteoblasten besetzt sind (Abbildung 6). Die multinukleären Zellen lassen eine Polarisierung erkennen. Sie liegen mit ihrem apikalen Anteil dem Implantat zumeist breitflächig auf. Die Zellkerne befinden sich im basalen Zytoplasma der Zellen. Diese Zellen enthalten häufig große intrazytoplasmatische Einschlüsse, die in Struktur und Anfärbbarkeit dem Implantatmaterial gleichen (Abbildung 7). Die Einschlüsse sind überwiegend apikal in den Zellen lokalisiert. In Implantatspalten zeigen die multinukleären Zellen eine abgeflachte Gestalt.

Solitär im Granulationsgewebe liegende vielkernige Zellen sind häufig kugelig gestaltet. Hier lassen sich zwei unterschiedliche Erscheinungsformen erkennen. Einerseits sind es Zellen, die zahlreiche, bis zellkerngroße Einschlüsse im umfangreichen Zytoplasma aufweisen. Bei diesen Zellen sind die Zellkerne in der Regel peripher entlang der inneren Oberfläche der Zellmembran aufgereiht. Andererseits finden sich multinukleäre Zellen, die nur sehr wenig Zytoplasma enthalten und keinerlei Einschlüsse aufweisen. In diesen Zellen sind die Zellkerne meist gleichmäßig über den gesamten Zelleib verteilt.

In den Übersichtspräparaten kann nach der Versuchsdauer von 20 Tagen keine knöcherne Überbrückung der angelegten Knochendefekte festgestellt werden. Eine auf die Defektperipherie beschränkte Knochenneubildung, die vom Lagerknochen ausgeht, ist jedoch deutlich zu erkennen. Zwischen den neugebildeten Knochenbälkchen befindet sich Granulationsgewebe, das sich in Richtung Defektzentrum erstreckt, ohne jedoch die Defekte vollständig auszufüllen.

4.4.2 Enzymhistochemie - Tartrat-resistente saure Phosphatase

Bei den TRAP-positiven multinukleären Zellen im Bereich des Lagerknochens handelt es sich

aufgrund der zellassozierten Ausbildung von Resorptionslakunen um Osteoklasten.

Es sind viele TRAP-positive mehrkernige Riesenzellen zu beobachten, die sich entweder in unmittelbarem Kontakt zum Implantatmaterial oder in geringerer Anzahl im umliegenden Granulationsgewebe befinden (Abbildung 8a). Die Markierung beschränkt sich auf das Zytoplasma der Zellen. Innerhalb des Zytoplasmas finden sich häufig Bereiche mit intensiverer Färbung. Multinukleäre Zellen, die dem Implantat anhaften, enthalten häufig eine größere Anzahl von intrazytoplasmatischen Einschlüssen als die Riesenzellen, die sich implantatfern im Granulationsgewebe befinden. Die Größe dieser Inklusionen variiert bis hin zur Zellkerngröße. Bei dieser Untersuchungstechnik stellen sich diese Einschlüsse als helle Bereiche innerhalb des Zytoplasmas dar. Das eingeschlossene Material gleicht in Struktur und Anfärbbarkeit dem eingebrachten Knochenersatzstoff. Entsprechende zytoplasmatische Einschlüsse besitzen auch die frei im Granulationsgewebe lokalisierten TRAP-positiven Riesenzellen.

Weiterhin ist im Granulationsgewebe eine geringe Anzahl mononukleärer Zellen markiert.

4.4.3 Immunhistochemie

Zur Bewertung der Färbeintensität der immunhistochemischen Reaktion werden bei der folgenden Darstellung der Untersuchungsergebnisse die Symbole (+) für schwach positiv, (++) für mäßig positiv und (+++) für stark positiv verwendet.

4.4.3.1 Kathepsin K

Grundsätzlich beschränkt sich die Markierung nach Anwendung des Kathepsin K–Antikörpers auf das Zytoplasma von Zellen. Hierbei zeigen sich häufig Zonen mit stärkerer Anfärbung innerhalb des Zytoplasmas.

An der Oberfläche des Lagerknochens befinden sich zahlreiche markierte mehrkernige Zellen. Bei den zum einen sehr flach und langgestreckt der Knochenoberfläche aufliegenden und zum anderen Teil kugelig in lakunenartigen Substanzverlusten des Lagerknochens lokalisierten Zellen handelt es sich aufgrund der benachbarten Resorptionslakunen um Osteoklasten.

Entlang der osteoidfreien Implantatoberflächen ist eine Vielzahl von multinukleären Kathepsin K-positiven Riesenzellen lokalisiert. Das Zytoplasma der Zellen enthält viele Inklusionen. Die Implantatstruktur ist in unmittelbarer Nähe dieser Zellen stärker aufgelockert als es ohnehin in

der Peripherie der Partikel zu beobachten ist. Bei einigen Implantatpartikeln, die von neugebildetem Knochengewebe bereits partiell umgeben sind, sind nur die osteoidfreien Oberflächen von markierten Zellen besetzt.

Wiederum sind zwei unterschiedliche Phänotypen gefärbter Riesenzellen im Granulationsgewebe nachweisbar. Überwiegend haben diese Zellen eine kompakte kugelige Form und enthalten wenig Zytoplasma. Andere sind deutlich größer und zeigen eine starke Auflockerung des Zytoplasmas und eine höhere Anzahl von Einschlüssen, die deutlich größer sind als in den übrigen Riesenzellen. Das Zytoplasma der Riesenzellen, die am Implantat lokalisiert sind, ist stark positiv angefärbt (+++) (Abbildung 9). Die Zellen des gleichen Zelltyps, die sich implantatfern im Granulationsgewebe befinden, weisen eine mäßige (++) bis starke (+++) Antigenmarkierung auf.

Im Granulationsgewebe findet sich eine geringe Anzahl von mononukleären Makrophagen häufig in der Nähe von Implantatpartikeln, die eine schwach positive Kathepsin K-Markierung aufweisen.

Die übrigen Zellen des Granulationsgewebes sind nicht angefärbt (Abbildung 9).

4.4.3.2 CD44

Im Granulationsgewebe der mit Knochenersatzmaterial versehenen Präparate befinden sich zahlreiche angefärbte mononukleäre Makrophagen, die sowohl solitär als auch gruppenweise lokalisiert sind. Eine große Anzahl dieser Zellen kann in unmittelbarer Nachbarschaft von Gefäßanschnitten beobachtet werden. Das Färbesignal beschränkt sich stets auf die Zellmembranen. Die Zellmembranen eng benachbarter Makrophagen sind an den einander zugewandten Seiten häufig nur punktuell gefärbt und daher nicht mehr vollständig darstellbar (Abbildung 10).

Die basalen Membrandomänen der mehrkernigen Riesenzellen, die den Implantatpartikeln anhaften, sind ebenfalls markiert (+++), während die apikalen Membrananteile keine Anfärbungen der Zellmembran aufweisen (Abbildung 10). Frei im Granulationsgewebe lokalisierte mehrkernige Riesenzellen haben eine durchgehend markierte Zellmembran (+++).

4.4.3.3 Vimentin

Die mehrkernigen Riesenzellen zeigen in Abhängigkeit von der Lokalisation unterschiedliche intrazytoplasmatische Färbemuster.

Riesenzellen, die in Kontakt mit den Implantatpartikeln stehen, sind im Allgemeinen mäßig (++) bis intensiv (+++) angefärbt. Darüber hinaus ist festzustellen, dass in der Regel implantatnahe Zellbereiche eine stärkere Reaktivität aufweisen als die implantatabgewandten, basalen Anteile des Zytoplasmas (Abbildung 11).

Die frei im Granulationsgewebe, ohne direkten Implantatkontakt, eingebetteten mehrkernigen Riesenzellen zeigen ein homogenes und nur schwaches zytoplasmatisches Farbsignal (+ bis ++). Im Granulationsgewebe weisen außerdem Fibroblasten (+++) und Osteoblasten (++) eine zytoplasmatische Anfärbung auf.

Die immunhistochemischen Untersuchungen zum Nachweis von **CD68**, **Calcitoninrezeptor** und **α V β 3-Integrin** führten, auch nach Antigen-Demaskierungsmaßnahmen wie Proteinase K-Behandlung und Kochen der Präparate in Citrat-Pufferlösung, zu ausbleibenden oder unspezifischen Signalen.

4.4.3.4 Negativkontrollen

Bei den durchgeführten Negativkontrollen, die ohne Primärantikörper inkubiert wurden, sind keine markierten Strukturen zu beobachten.

4.5 Gruppe II/PRP+

4.5.1 Histologie

Im Vergleich zur Gruppe I/PRP- ist in diesen Präparaten schon in der Übersichtsvergrößerung eine deutlich größere Anzahl von mehrkernigen Riesenzellen im Granulationsgewebe augenfällig. Sowohl die Zahl der zytoplasmareichen, mit Phagozytoseprodukten beladenen mehrkernigen Zellen, als auch die der nur wenig Zytoplasma enthaltenden Zellen ist vermehrt. Weiterhin fällt auch eine Vielzahl von implantatassoziierten Riesenzellen auf. Zwischen den Implantatpartikeln, an der Grenze zum optisch leeren Raum des Defektzentrums, ist eine Vielzahl von mononukleären Zellen zu beobachten.

In der Übersichtsvergrößerung wird im Unterschied zur Gruppe I/PRP- der starke Zerfall des Knochenersatzstoffes in zahlreiche kleine Partikel evident. Weiterhin weisen die Präparate nahezu durchgehend ein höheres Maß an Knochenneubildung auf. In Lagerknochennähe sind breitere Osteoidsäume zu erkennen, die weit in das Granulationsgewebe hineinreichen. Die Implantatpartikel sind im Vergleich zur Gruppe I/PRP- stärker mit Osteoidstegen untereinander vernetzt. Wie in Gruppe I/PRP- ist auch in dieser Gruppe das Defektzentrum von Granulationsgewebe und Implantat ausgespart.

4.5.2 Enzymhistochemie - Tartrat-resistente saure Phosphatase

Im Unterschied zur Gruppe I/PRP- ist in dieser Gruppe eine Vielzahl von TRAP-positiven mehrkernige Riesenzellen zu beobachten (Abbildung 8 b).

Vergleichsweise treten mononukleäre Zellen ebenfalls sehr häufig in Erscheinung.

4.5.3 Immunhistochemie

4.5.3.1 Kathepsin K

Der überwiegende Anteil der mehrkernigen Riesenzellen ist intensiv (+++) gefärbt (Abbildung 9). Hierbei zeigt sich das gleiche Färbemuster wie in Gruppe I/PRP-. Darüber hinaus kann in den Präparaten dieser Gruppe eine größere Anzahl von positiv gefärbten mononukleären Makrophagen (++) in Implantatnähe beobachtet werden.

4.5.3.2 CD44

In dieser Untersuchungsgruppe tritt auch eine Vielzahl von CD44-positiven Zellen in Erscheinung. Sowohl mehrkernige Zellen als auch mononukleäre Makrophagen sind membranmarkiert. Die Färbemuster der mehrkernigen Zellen in Abhängigkeit ihrer Lokalisation (implantatassoziiert *versus* frei im Granulationsgewebe) entsprechen denen der Zellen in Gruppe I/PRP-.

Mononukleäre Makrophagen befinden sich auch in den Spalten zwischen den Implantatschollen nahe am Zentrum des Defektes.

4.5.3.3 Vimentin

In dieser Gruppe können keine abweichenden Färbemuster der in hoher Zahl markierten

vielkernigen Zellen im Vergleich zur Gruppe I/PRP- beobachtet werden. Im Granulationsgewebe ist jedoch vergleichsweise eine größere Anzahl Osteoblasten im Bereich des neugebildeten Osteoids, sowohl am Lagerknochen als auch entlang der Implantatpartikel, markiert.

Die immunhistochemischen Untersuchungen zum Nachweis der Antikörper gegen **CD68**, **Calcitoninrezeptor** und **α V β 3-Integrin** führten, auch nach Antigen-Demaskierungsmaßnahmen wie Proteinase K-Behandlung und Kochen der Präparate in Citrat-Pufferlösung, zu ausbleibenden oder unspezifischen Signalen.

4.5.3.4 **Negativkontrollen**

Bei den durchgeführten Negativkontrollen, in denen keine Primärantikörper eingesetzt wurden, sind keine Immunreaktivitäten festzustellen.

4.6 **Leerdefekte**

4.6.1 **Histologie**

Die Leerdefekte weisen eine vollständige, bis ins Defektzentrum reichende Auffüllung mit zellreichem Granulationsgewebe auf. Hier können zahlreiche Gefäßanschnitte beobachtet werden. Eine große Anzahl Fibroblasten ist zu identifizieren, vereinzelt finden sich Lymphozyten. Mehrkernige Riesenzellen treten nicht in Erscheinung. Der Faserverlauf des Granulationsgewebes ist im Bereich des Defektrandes parallel zum Lagerknochen ausgerichtet, während im Defektzentrum ein ungeordnetes Fasernetzwerk dominiert. Weiterhin ist eine deutliche Knochenneubildung vom Lagerknochen ausgehend zu beobachten, die sich radiär in Richtung Defektzentrum orientiert.

4.6.2 **Enzymhistochemie - Tartrat-resistente saure Phosphatase**

Im Granulationsgewebe der Leerdefekte können keine TRAP-positiven Zellen nachgewiesen werden.

4.6.3 Immunhistochemie

4.6.3.1 Kathepsin K

In den Leerdefekt-Präparaten sind die Osteoklasten des Lagerknochens markiert. Im Granulationsgewebe sind weder multinukleäre Riesenzellen noch mononukleäre Zellen mit Antikörpermarkierung nachweisbar.

4.6.3.2 CD44

In den Leerdefekten lassen sich keine markierten Makrophagen nachweisen.

4.6.3.3 Vimentin

Die Markierung beschränkt sich auf das Zytoplasma von Fibroblasten und Osteoblasten (++ bis +++).

4.6.3.4 Negativkontrollen

Hier sind keine markierten Strukturen zu erkennen.

4.7 Transmissionselektronenmikroskopie

In beiden Untersuchungsgruppen weisen die multinukleären Zellen eine übereinstimmende Ultrastruktur auf. An den Implantatoberflächen befinden sich multinukleäre langgestreckte, abgeflachte Zellen (Abbildung 12). Die Zellen stehen in enger Verbindungen zum Implantat, indem die apikalen Zellmembranen die Implantatoberflächen direkt kontaktieren. Diese Membranabschnitte weisen über ihre gesamte Länge subplasmalemmale Aktinansammlungen auf. Es zeigen sich nur seichte Einbuchten der apikalen Zellmembran (Abbildung 13). Die basalen Membrandomänen sind durch zahlreiche kurze Pseudopodien charakterisiert.

Die Zellkerne der implantatassoziierten mehrkernigen Zellen sind stets in den basalen Zytoplasmaabschnitten lokalisiert (Abbildung 12). Sie sind von unregelmäßiger Gestalt und enthalten zwei Arten von Chromatin, das osmiophile, dunkel gefärbte Heterochromatin und das hellere Euchromatin. Das Heterochromatin lagert sich der inneren Kernmembran an und ist in einzelnen Konglomeraten im umgebenden Euchromatin lokalisiert. Häufig lassen sich in den Zellkernen, in Abhängigkeit vom Anschnitt, runde bis ovale, stark kontrastierte

Kernkörperchen identifizieren.

Im Zytoplasma ist eine große Anzahl von Mitochondrien lokalisiert. Ribosomen sind häufig in kleinen Gruppen rosettenartig als Polysomen zusammengelagert. Darüber hinaus können kurze Membranabschnitte des rauen endoplasmatischen Retikulums und des Golgi-Apparates nachgewiesen werden (Abbildung 13).

Intrazytoplasmatische elektronendichte Einschlüsse von feinnadeliger Struktur ohne erkennbare Membranabgrenzung sind häufiger Bestandteil der implantatassoziierten mehrkernigen Zellen. Die Einschlüsse gleichen dem Implantatmaterial in Struktur und Elektronendichte (Abbildung 12). Es stellt sich als eine feinpartikuläre Grundsubstanz unterschiedlicher Elektronendichte dar, die locker zusammengefügt ist. Zahlreiche elektronendichte nadelartige Anteile, wie sie auch intrazellulär als zytoplasmatische Einschlüsse zu finden sind, liegen innerhalb einer mäßig elektronendichten Matrix (Abbildungen 12, 14, 15). Die Kontinuität des Materials ist von einer großen Anzahl kontrastarmer, blasiger Zwischenräume unterbrochen.

Die frei im Granulationsgewebe lokalisierten mehrkernigen Zellen (Abbildungen 14, 15) zeigen häufig Zytoplasmaprotrusionen, die im Granulationsgewebe lokalisierte Implantatpartikel partiell umschließen. In diesen Protrusionen sind Zellorganellen zu erkennen. Die Zellen enthalten darüber hinaus Einschlüsse von bis zu mehreren Mikrometern Durchmesser, die durch ihre Größe zu den dominierenden Strukturen der Zellen werden. In diesen Fällen sind die Zellkerne aufgrund der großen Ausdehnungen der Einschlüsse in die Peripherie verdrängt (Abbildung 14).

4.8 Abbildungen

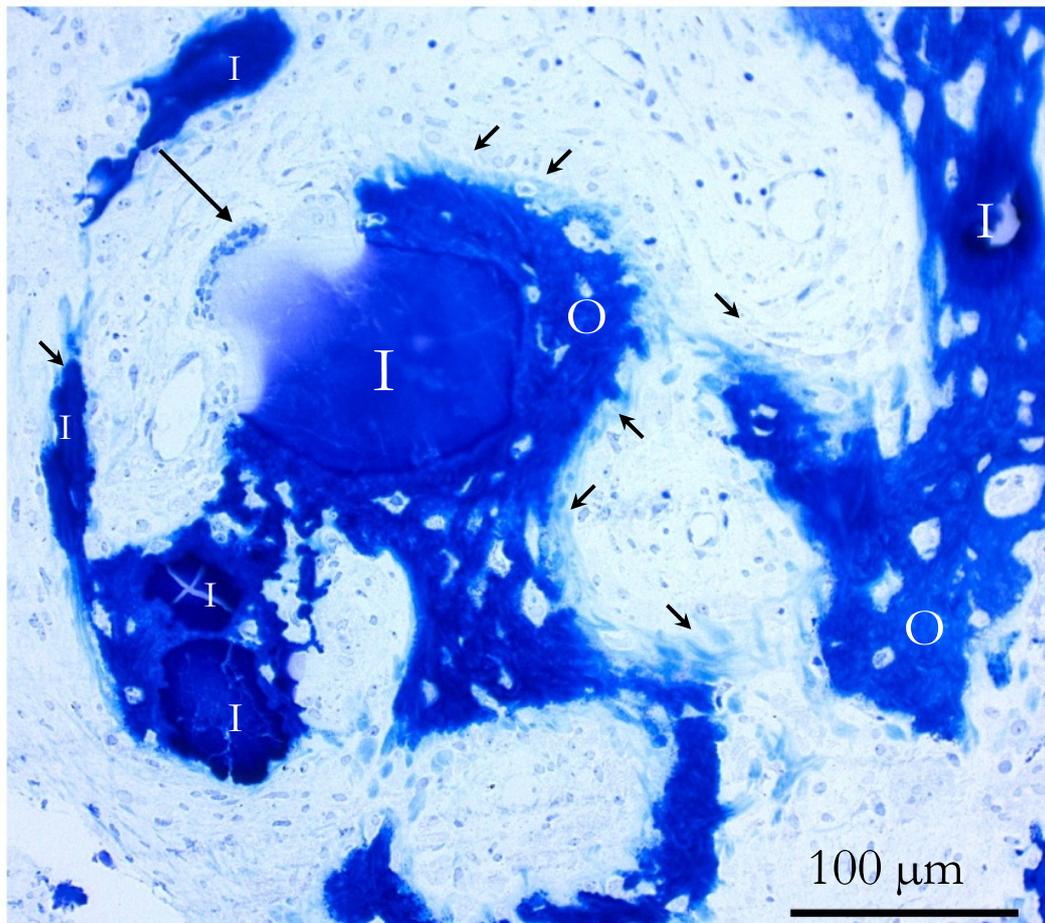


Abbildung 5: Dünnschliffhistologie, Gruppe II/PRP+, Toluidinblau-Färbung

Implantatpartikel (**I**) sind nahezu vollständig in neugebildetes Osteoid (**O**) integriert. An der osteoidfreien Oberfläche einer Implantatscholle ist eine mehrkernige Riesenzelle (**langer Pfeil**) zu erkennen. In diesem Bereich ist die Anfärbbarkeit des Implantatmaterials reduziert.

Zahlreiche Osteoblasten (**kurze Pfeile**) flankieren die Osteoidränder.

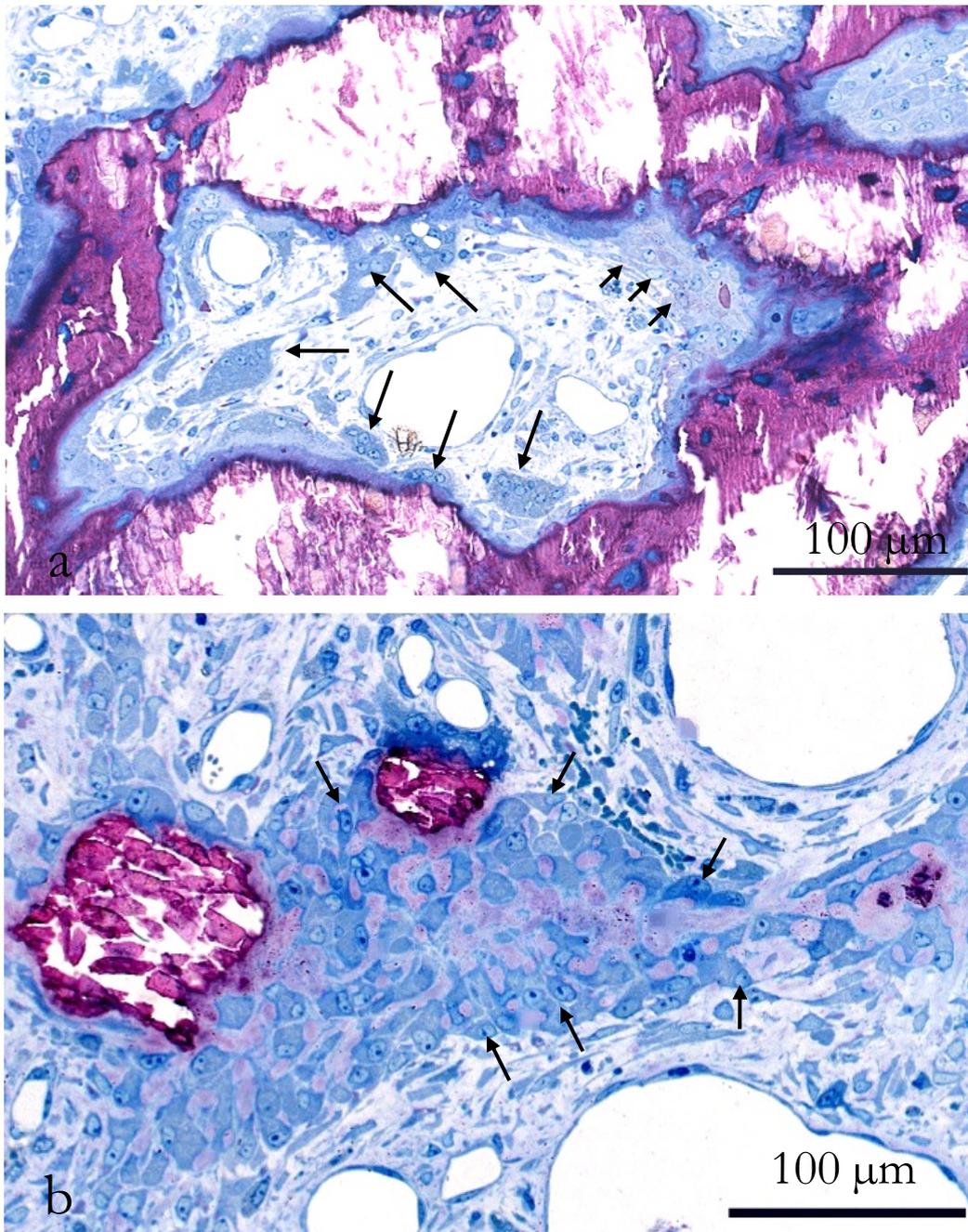


Abbildung 6: Semidünnschnitte, Gruppe II/PRP+, Färbung mit Safranin O und Toluidinblau
 (a) Das im Schnitt violett gefärbte Implantat weist Bearbeitungsartefakte im Sinne von partiellem Materialverlust auf. Das umgebende Granulationsgewebe ist zell- und gefäßreich. Es lassen sich zahlreiche mehrkernige Riesenzellen (**lange Pfeile**) und Osteoblasten (**kurze Pfeile**) in unmittelbarer Nachbarschaft des Implantats nachweisen. Zwischen Osteoblasten und Knochenersatzmaterial ist stets ein schmaler Osteoidsaum lokalisiert.
 (b) Implantatassoziierte Knochenneubildung
 Zahlreiche Osteoblasten (**Pfeile**) liegen in Implantatnähe. Die neugebildete Matrix ist aufgrund des Mineralisationsgehaltes bereits leicht violett tingiert.

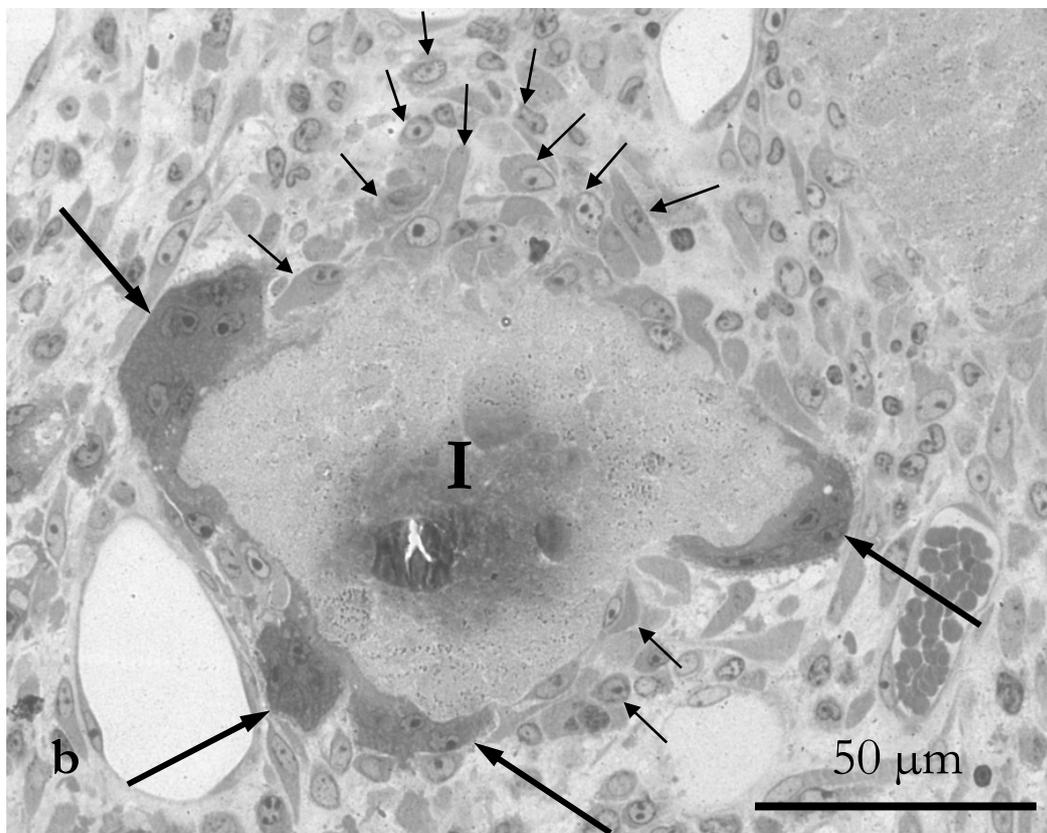
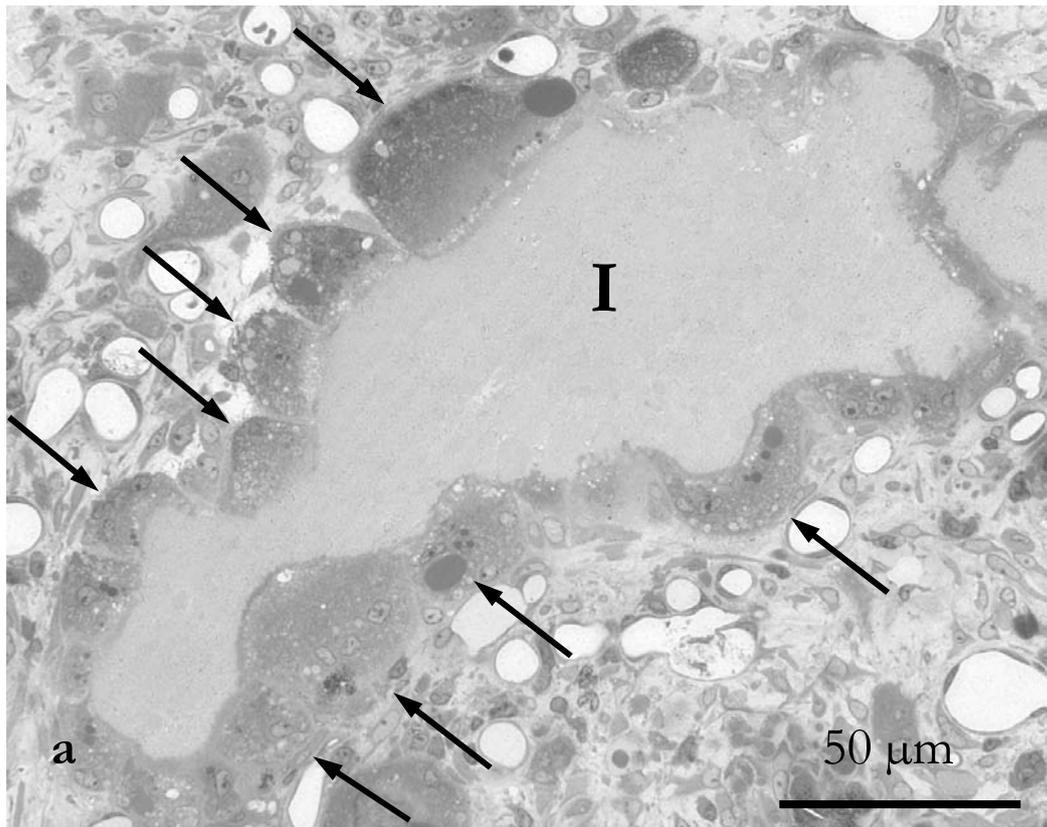


Abbildung 7: Semidünnschnitte, Gruppe II/PRP+, Färbung Safranin O und Toluidinblau

Abbildung 7 (a, b): Die Oberflächen des Implantates (**I**) sind nahezu vollständig von mehrkernigen Riesenzellen (**lange Pfeile**) besetzt. In einigen der Riesenzellen finden sich Einschlüsse, die in Aussehen und Struktur dem Knochenersatzmaterial gleichen. (b) Gleichzeitig okkupieren Osteoblasten (**kurze Pfeile**) die Implantatoberflächen.

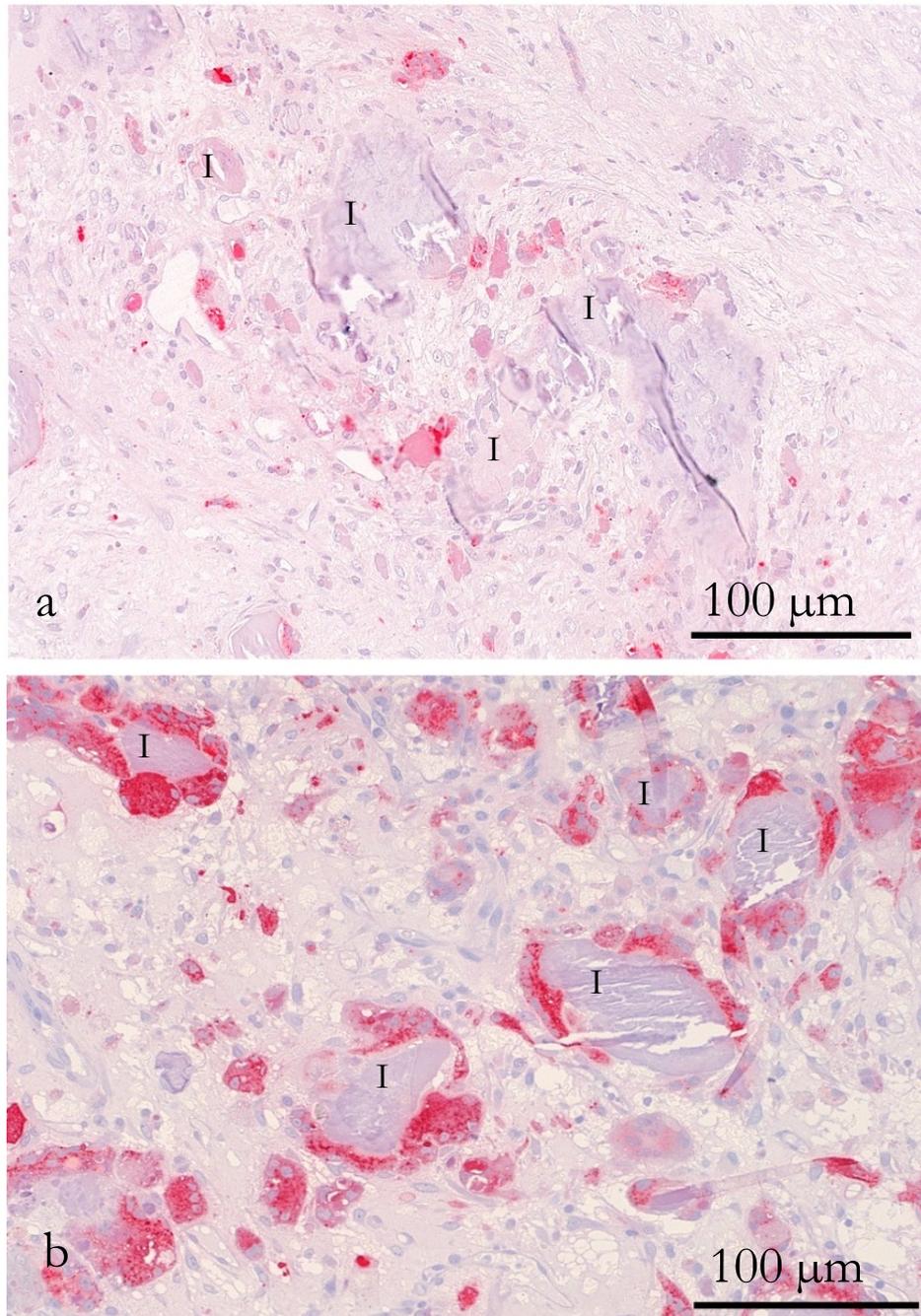


Abbildung 8: TRAP-Färbung, Gegenfärbung Hämatoxylin

(a) Gruppe I/PRP-, (b) Gruppe II/PRP+

(a) Im zellreichen Granulationsgewebe befinden sich in Nähe der Implantatpartikel (I) TRAP-positive mehrkernige Zellen.

(b) Den Oberflächen sämtlicher Implantatpartikel (I) im Bildausschnitt haften TRAP-positive mehrkernige Riesenzellen an. Weiterhin ist eine Vielzahl TRAP-positiver Zellen im Granulationsgewebe zu beobachten.

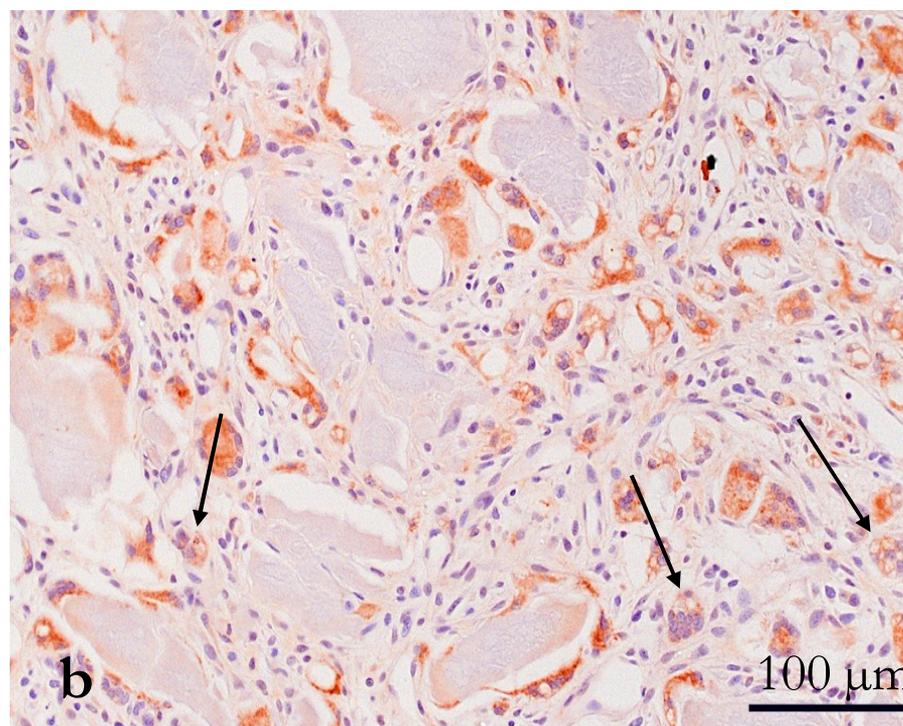
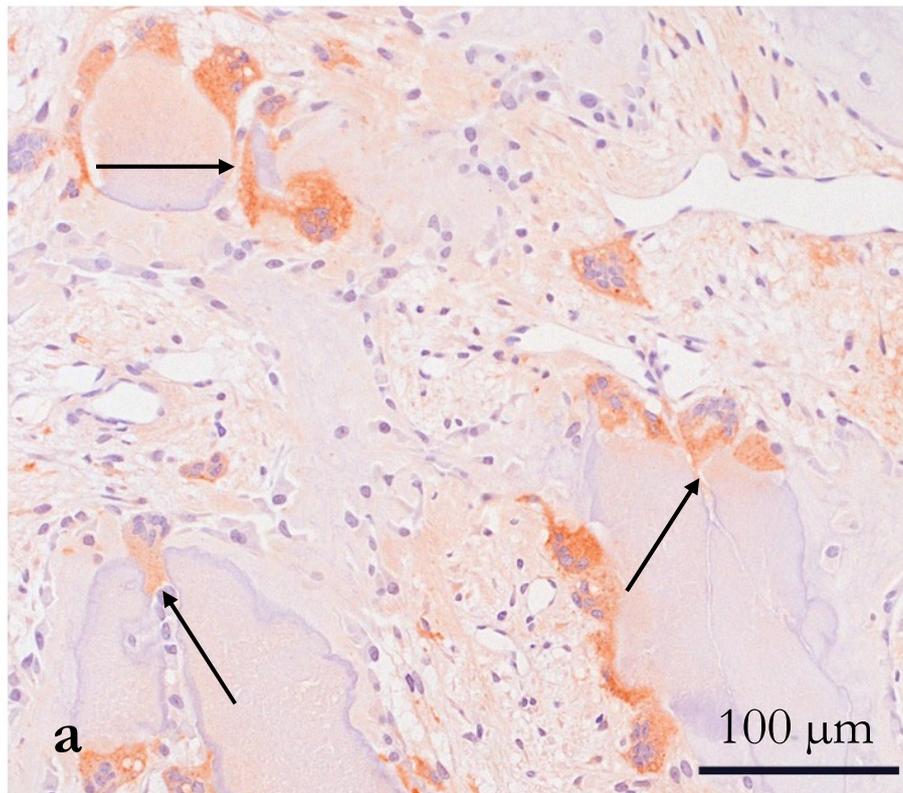


Abbildung 9: Paraffinschnitt, Kathepsin K-Immunhistochemie, Gegenfärbung mit Hämatoxylin

Gruppe I/PRP- (a), GruppeII/PRP+ (b)

(a, b) Den Implantatschollen haften zahlreiche mehrkernige Riesenzellen an, die alle eine Kathepsin K-Markierung aufweisen. Zytoplasmanteile einiger Riesenzellen (**Pfeile**) erstrecken sich bis in kleinste Spalten des Implantates.

Im Granulationsgewebe sind ebenfalls Kathepsin K-exprimierende Zellen lokalisiert, die vor allem in der Versuchsgruppe mit PRP-Zusatz augenfällig sind (b). Zum Teil weisen diese Zellen eine schwächere Markierung (b/**Pfeile**) auf.

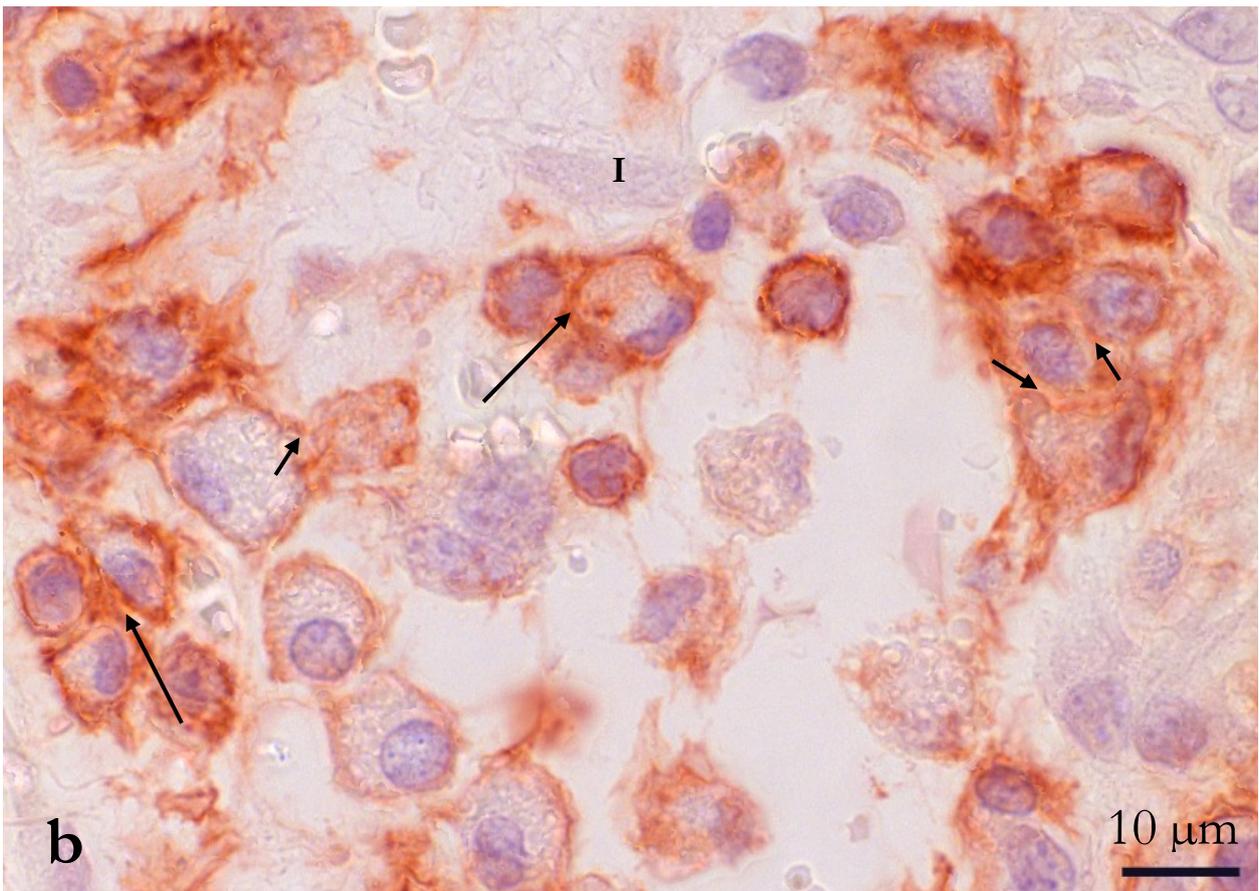
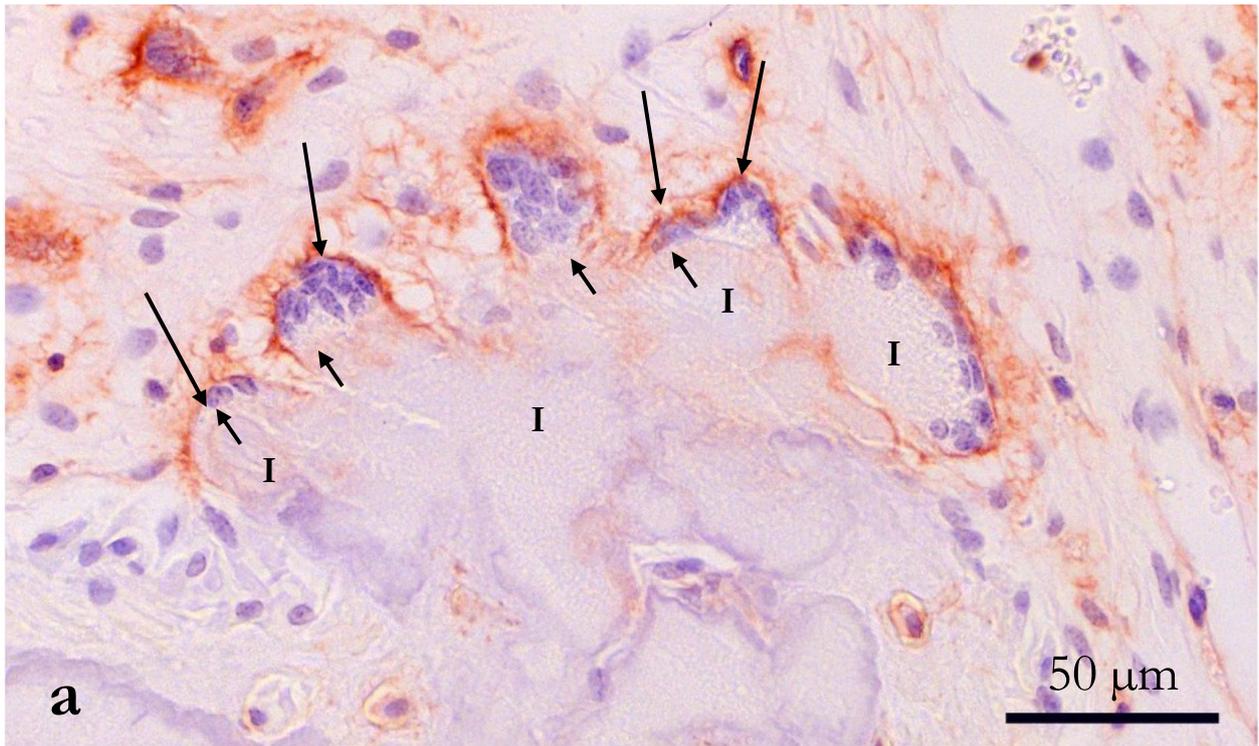


Abbildung 10: Paraffinschnitte, Gruppe II/PRP+, CD44-Immunhistochemie, Gegenfärbung mit Hämatoxylin

(a) Implantatpartikel (**I**) werden von mehrkernigen Riesenzellen umgeben. Diese weisen an den basalen Zellmembranen eine intensive CD44-Antikörper-Reaktivität (**lange Pfeile**) auf. Den apikalen, dem Implantat zugewandten Membranen fehlt eine solche Reaktion vollständig (**kurze Pfeile**).

(b) Im Granulationsgewebe ist eine große Anzahl von CD44-positiven mononukleären Zellen lokalisiert. Häufig lagern sich mehrere dieser Zellen traubenähnlich zusammen. Hierbei sind teilweise unversehrte, antikörpermarkierte, Zellmembranen zu erkennen (**lange Pfeile**). Stellenweise sind die Zellmembranen der Zellen nur sehr undeutlich oder nicht mehr darstellbar (**kurze Pfeile**).

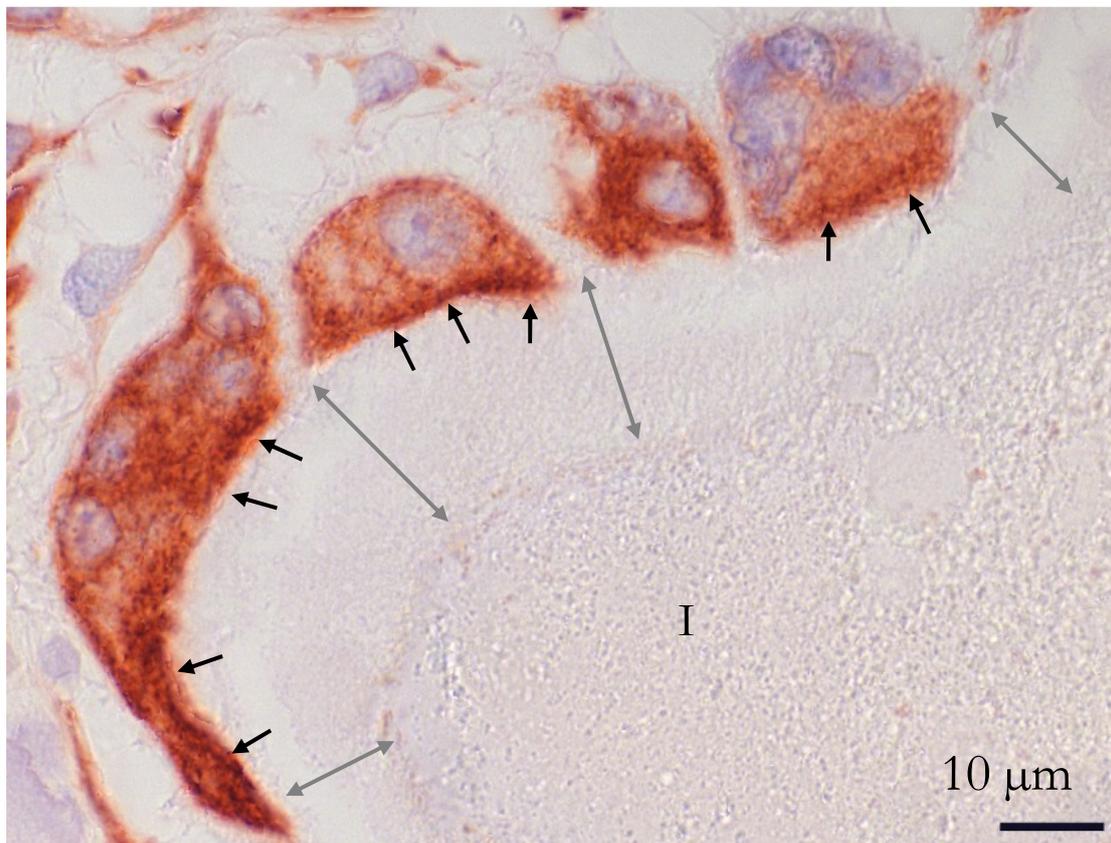


Abbildung 11: Paraffinschnitt, GruppeII/PRP+, Vimentin-Immunhistochemie, Gegenfärbung mit Hämatoxylin

Die implantatassoziierten mehrkernigen Riesenzellen weisen im apikalen Zytoplasma eine bandartige Verstärkung des Antikörpersignals auf (**kurze Pfeile**). Das Implantat (**I**) zeigt peripher eine breite Zone der strukturellen Auflockerung (**Doppelpfeile**).

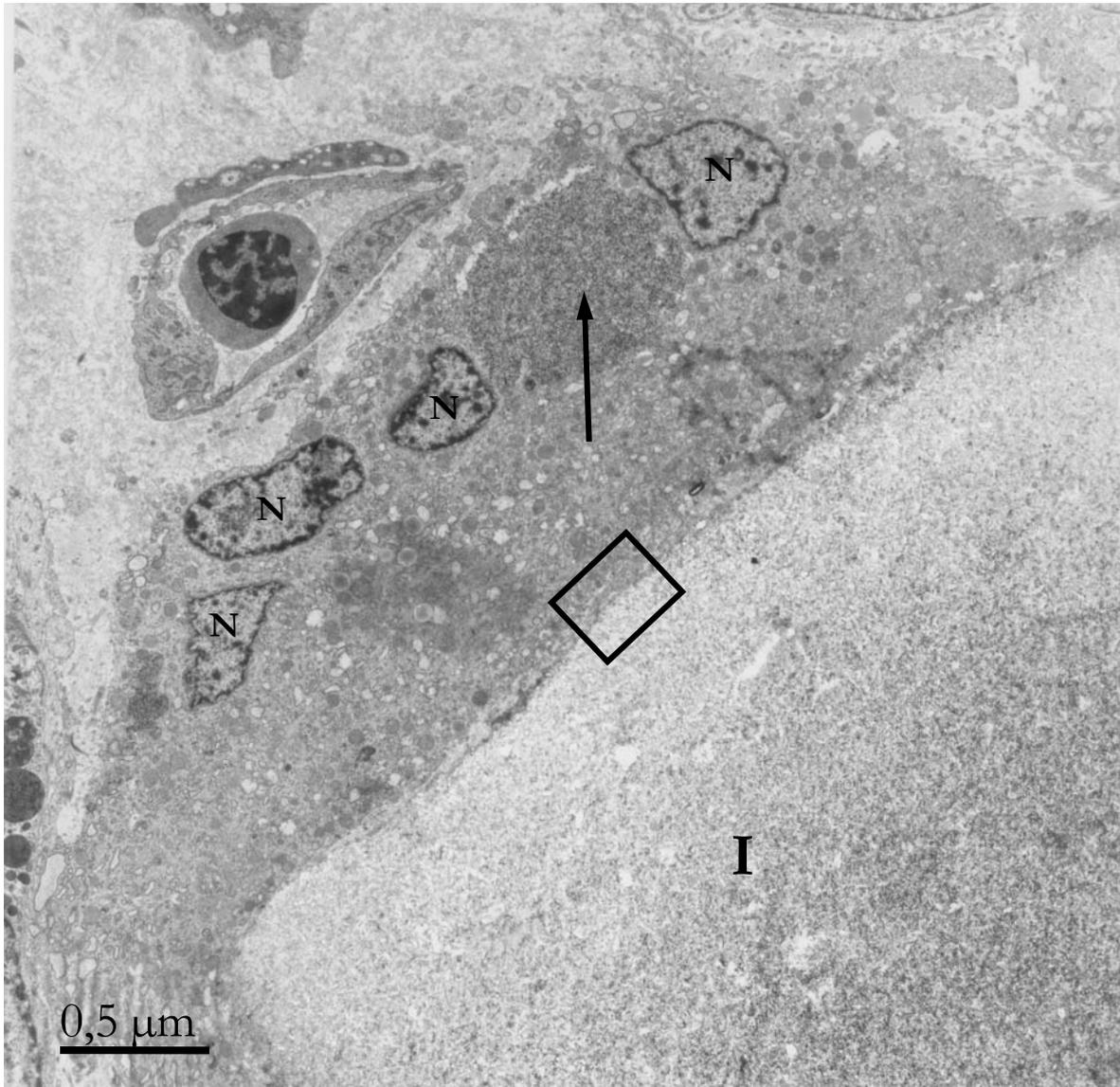


Abbildung 12: Transmissionselektronenmikroskopische Übersicht einer am Implantat (I) lokalisierten mehrkernigen Riesenzelle

Die Zellkerne (N) sind im implantatfernen, basalen Anteil der Zelle lokalisiert. Ein intrazytoplasmatischer Einschluss (Pfeil) ist deutlich zu erkennen. Das Gebiet innerhalb der schwarzen Umrandung ist in Abbildung 13 im Detail dargestellt.

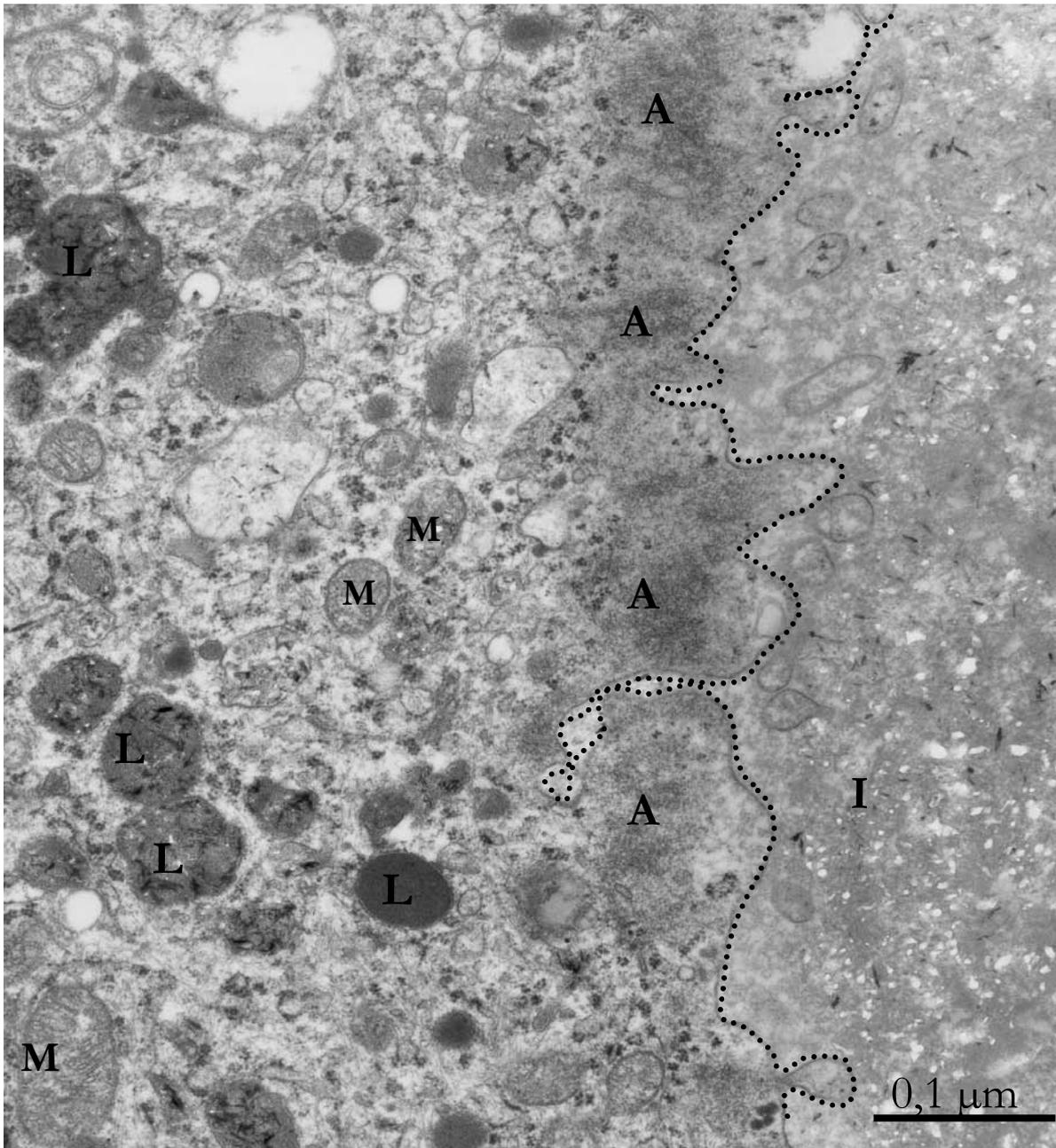


Abbildung 13: Ultrastrukturelles Detail der Kontaktzone einer mehrkernigen Riesenzelle mit der Implantatoberfläche

Die Oberflächenkontur des Knochenersatzmaterials (**I**) ist durch die unterbrochene Linie dargestellt. Subplasmalemmale Aktinkondensationen (**A**) charakterisieren die apikale Membrandomäne einer multinukleären Zelle, die ohne erkennbaren Spaltraum der Implantatoberfläche anhaftet und seichte, unregelmäßige Einbuchtungen aufweist. Im organellenreichen Zytoplasma befinden sich zahlreiche Mitochondrien (**M**) sowie Lysosomen (**L**) mit strukturell und in der Elektronendichte variierendem Inhalt.

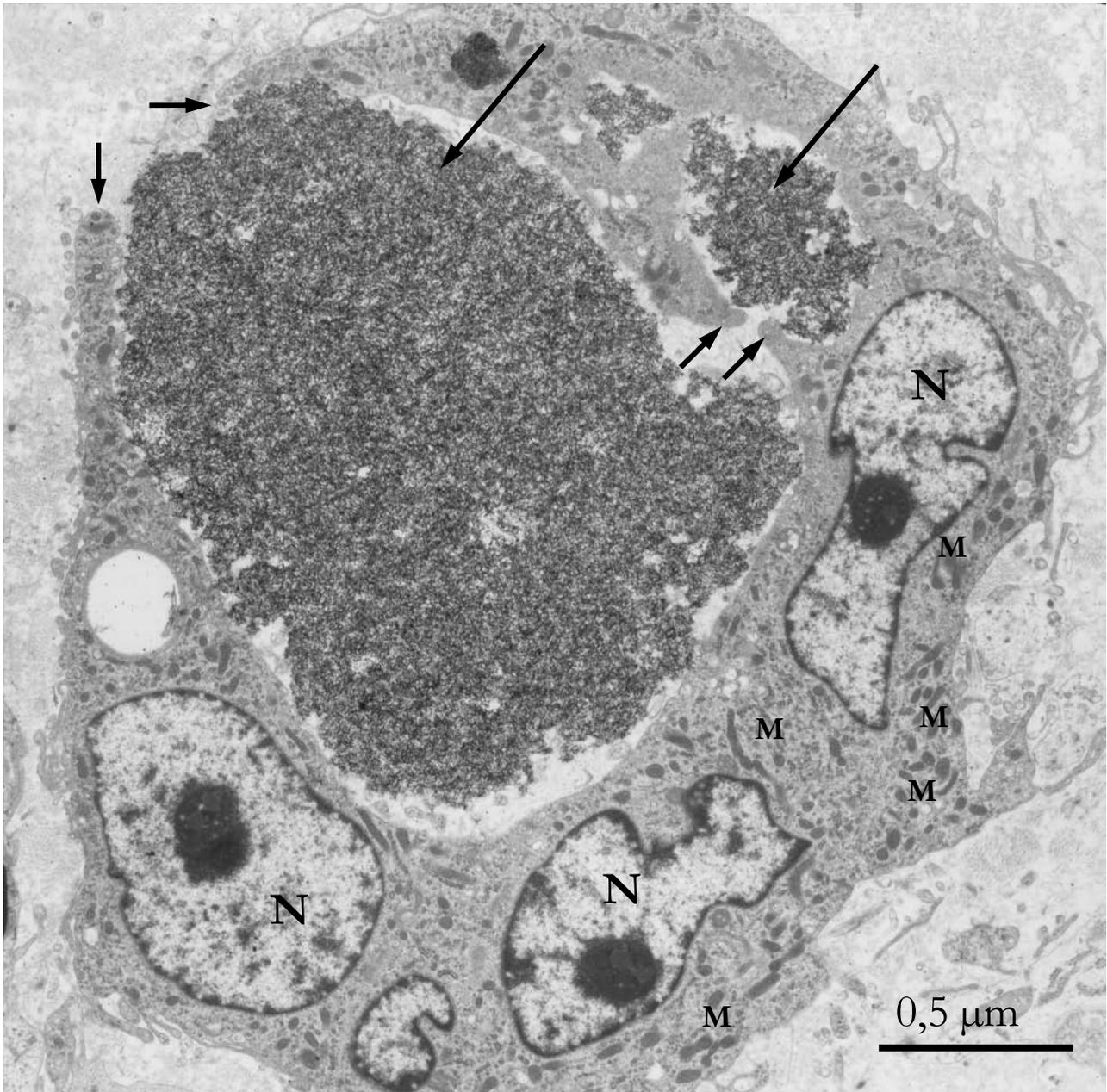


Abbildung 14: Ultrastruktur einer im Granulationsgewebe lokalisierten mehrkernigen Riesenzelle

Fremdkörpereinschlüsse (**lange Pfeile**) unterschiedlicher Größe. Zytoplasmaausläufer (**kurze Pfeile**) umschließen das Knochenersatzmaterial nahezu vollständig. Die Zellkerne (**N**) sind durch den großen Umfang der Inklusionen in die Peripherie verlagert. Im Zytoplasma sind zahlreiche Mitochondrien (**M**) zu erkennen.

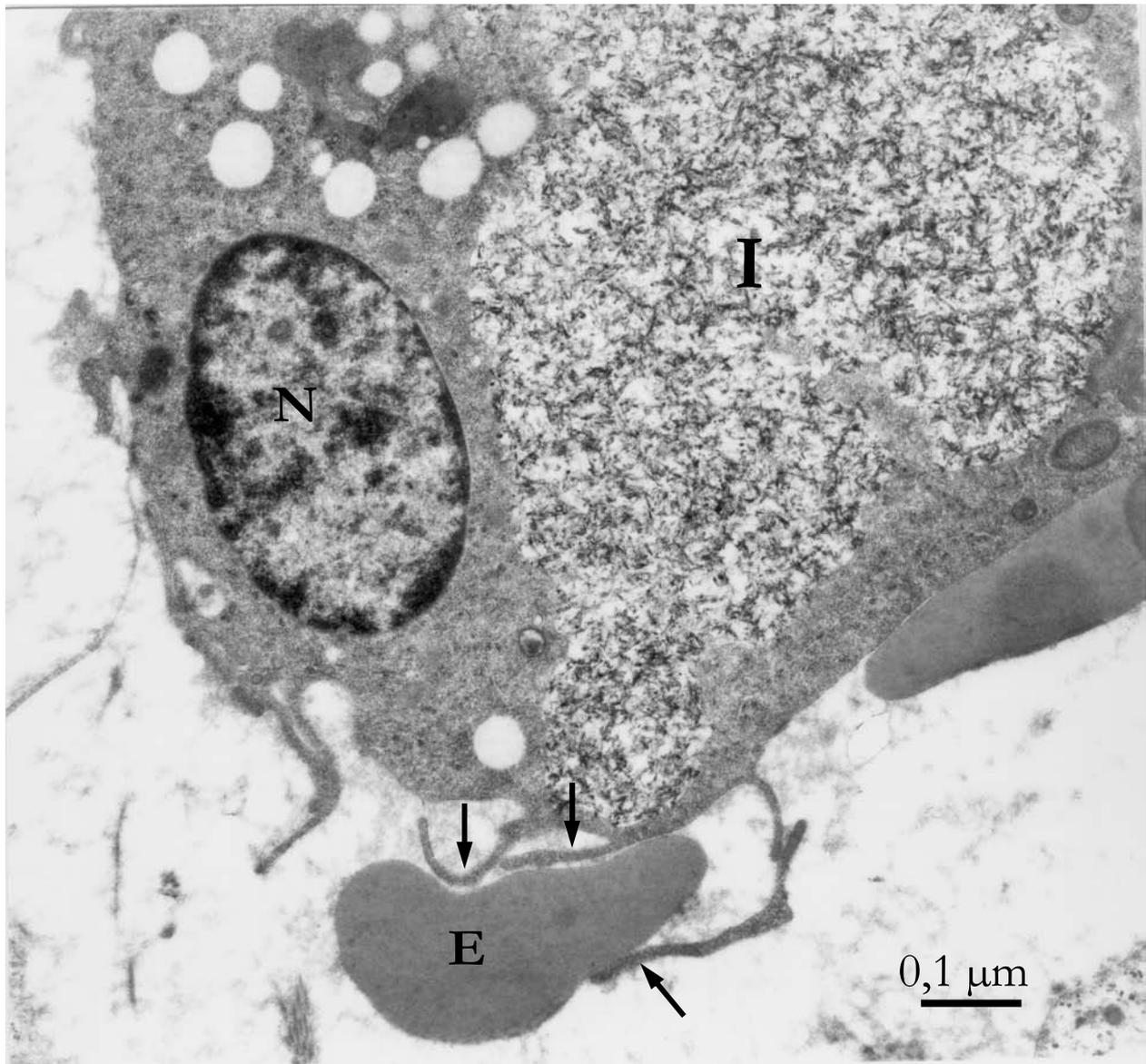


Abbildung 15: Ultrastrukturelles Detail einer mehrkernigen Riesenzelle mit intrazytoplasmatischer Inklusion

Das eingeschlossene Implantatmaterial (I) weist eine heterogene Struktur und Elektronendichte auf. Eine Membranbegrenzung des Einschlusses ist nicht zu erkennen. Im Zellkern (N) ist die unterschiedliche Verteilung der beiden Chromatinarten zu beobachten, wobei das kontrastreiche Heterochromatin überwiegend an der inneren Kernmembran lokalisiert ist. Tentakelartige, organellenfreie Fortsätze der Zelle (Pfeile) kontaktieren einen Erythrozyten (E).

4.9 Statistische Auswertung der TRAP-positiven Flächenanteile

Die Tabellen A und B im Anhang zeigen den Anteil TRAP-positiver Flächen pro Gesamtfläche der untersuchten Messfelder pro Tier. Abhängig von der Defektgröße variiert die Anzahl der untersuchten Messfelder pro Präparat. In der Gruppe I/PRP- konnten zwischen 12 und 23 Messfelder, in der Gruppe II/PRP+ zwischen 12 und 24 Messfelder pro Tier untersucht werden.

In der Gruppe I/PRP- werden für die TRAP-positiven Flächenanteile aller Messfelder pro Präparat Mittelwerte zwischen 2,64 % und 6,79 % errechnet. In der Gruppe II/PRP+ variieren diese Mittelwerte zwischen 6,27 % und 15,07 % (Abbildung 16).

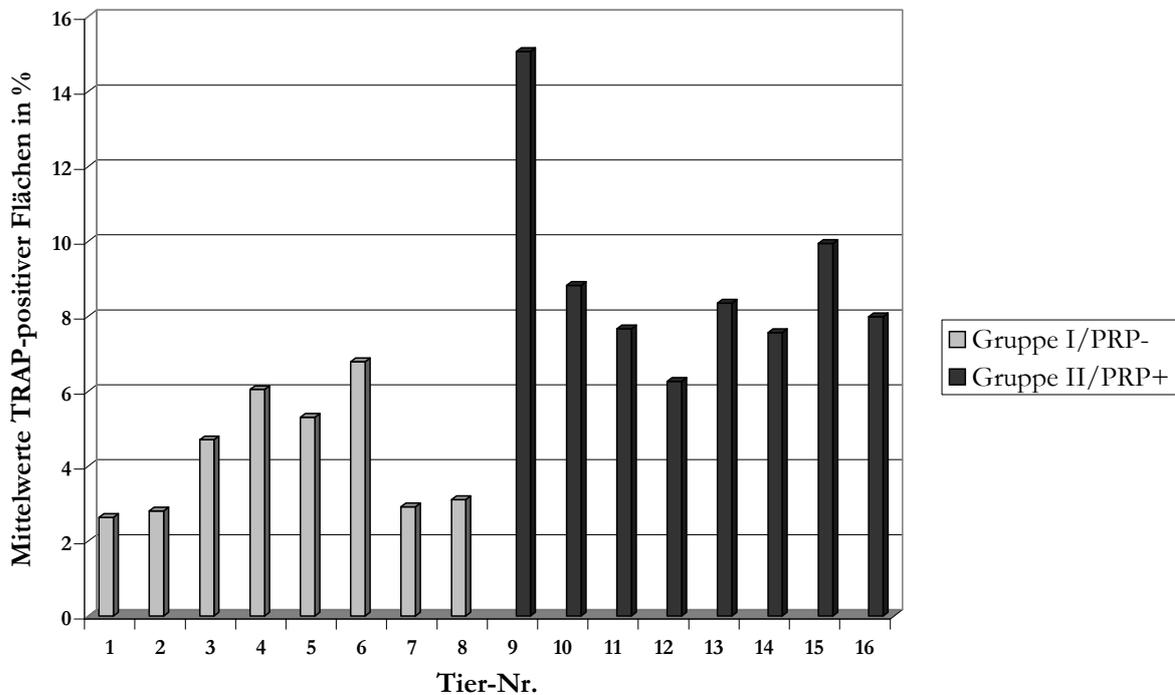


Abbildung 16: Darstellung der Mittelwerte TRAP-positiver Flächen in den untersuchten Präparaten in Prozent

Die Verteilung der Daten wird nachfolgend in einem Box- and Whisker Plot dargestellt (Abbildung 17).

Aus diesen Mittelwerten werden für jede der beiden Gruppen Gesamtmittelwerte berechnet, welche für die Gruppe I/PRP- 4,29 % und für die Gruppe II/PRP+ 8,96 % betragen.

Da die Messwerte keine Normalverteilung aufweisen, erfolgt die statistische Auswertung mit Hilfe des Wilcoxon-Rangsummentests für zwei unverbundene Stichproben. Dieser Test zeigt einen hochsignifikanten Einfluss ($p < 0,01$) des Faktors PRP auf die Größe TRAP-positiver Areale in den Präparaten.

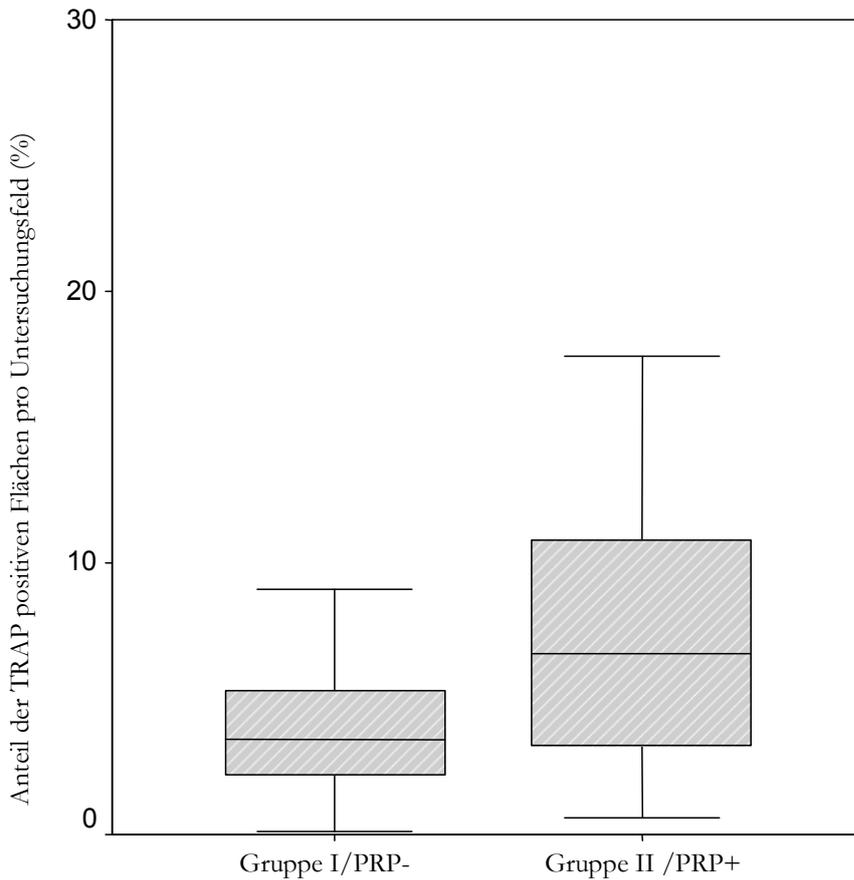


Abbildung 17: Box-and Whisker-Plots bezüglich des Merkmals „TRAP-positive Fläche pro Untersuchungsfeld in Prozent“

4.10 Zusammenfassung der Ergebnisse

In Tabelle 6 sind die wichtigsten Ergebnisse in Bezug auf die implantatabbauenden Zellen zusammengefasst.

Tabelle 6: Übersicht der Untersuchungsergebnisse aus Gruppe I/PRP- und Gruppe II/PRP+ in Bezug auf implantatabbauende Zellen

	Gruppe I/PRP-	Gruppe II/PRP+
Histologie	- starker Implantatabbau durch mononukleäre Makrophagen und multinukleäre Riesenzellen	- starker Implantatabbau durch mononukleäre Makrophagen und multinukleäre Riesenzellen - deutlich größere Anzahl von Phagozyten im Vergleich zur Gruppe I/PRP-
TRAP	- mononukleäre Makrophagen +++ - multinukleäre Riesenzellen +++	- mononukleäre Makrophagen +++ - multinukleäre Riesenzellen +++
Kathepsin K	- implantatassoziierte multinukleäre Riesenzellen +++ - Makrophagen +++	- implantatassoziierte multinukleäre Riesenzellen +++ - Makrophagen +++
CD44	- Makrophagen u. implantatferne Riesenzellen +++ - basale Membrananteile implantatassoziiierter multinukleärer Riesenzellen +++, apikale Membrananteile -	- Makrophagen u. implantatferne Riesenzellen +++ - basale Membrananteile implantatassoziiierter multinukleärer Riesenzellen +++, apikale Membrananteile -
Vimentin	- polarisierte Verteilung bei implantatassoziierten Riesenzellen - homogene Verteilung bei implantatfernen Riesenzellen	- polarisierte Verteilung bei implantatassoziierten Riesenzellen - homogene Verteilung bei implantatfernen Riesenzellen
Quantifizierung TRAP-positiver Flächenanteile	- Mittelwert aller ermittelten Flächenanteile: 4,2908 % TRAP-positive Flächenanteile pro Gesamtfläche	- Mittelwert aller ermittelten Flächenanteile: 8,9588 % TRAP-positive Flächenanteile pro Gesamtfläche
TEM	- implantatassoziierte mehrkernige Riesenzellen weisen parallel zu den apikalen Zellmembranen verlaufende Aktinkondensationen auf - apikale Zellmembranen zeigen nur wenige, seichte Einbuchtungen und sind mit der Implantatoberfläche ohne erkennbaren Zwischenraum verbunden - in den Riesenzellen finden sich elektronendichte, nadelartige zytoplasmatische Einschlüsse	

Die vergleichende tabellarische Übersicht der Ergebnisse verdeutlicht, dass nach Applikation von PRP keine qualitativen Unterschiede in Bezug auf die an der Degradation des Implantates beteiligten Zellpopulationen festzustellen sind. Dagegen zeigt die quantitative Datenerfassung, dass nach Zugabe von PRP die Ausdehnung der TRAP-positiven Flächenanteile statistisch hoch signifikant vergrößert ist.

5 DISKUSSION

Die Ergebnisse der vorliegenden Studie haben gezeigt, dass der zelluläre Abbau des nanopartikulären Knochenersatzstoffes Ostim® von mononukleären Makrophagen und vor allem durch multinukleäre Fremdkörperriesenzellen bewerkstelligt wird. Im Hinblick auf die an der Degradation beteiligten Zellen sind keine qualitativen Unterschiede im Sinne PRP-abhängiger Effekte festzustellen. Diese manifestierten sich jedoch deutlich auf quantitativer Ebene.

Im Folgenden wird zunächst auf die PRP-unabhängigen Effekte *post implantationem* eingegangen, die in beiden Versuchsgruppen gleichermaßen zu beobachten sind.

5.1 PRP-unabhängige Effekte

5.1.1 Der nanopartikuläre Knochenersatzstoff Ostim®

Der Knochenersatzstoff Ostim® ist weder hitzebehandelt, noch härtet er *in situ* aus. Wegen der pastösen Konsistenz kann dieses Knochenersatzmaterial nur in mechanisch unbelasteten Knochendefekten eingesetzt werden.

Thermische Behandlungen von Hydroxylapatitzubereitungen führen zu Einschränkungen oder Verzögerungen im Abbau des Implantates (van Landuyt et al. 1995; Bloemers et al. 2003). Die gleiche Problematik besteht bei Kalziumphosphatzementen, die nach der Applikation einer Härtungsreaktion unterliegen. Durch das Unterbleiben einer thermischen Vorbehandlung von Ostim® soll eine schnell fortschreitende Degradation bei gleichzeitigem Voranschreiten der Osteogenese erzielt werden.

Eine weitere Voraussetzung für eine schnelle Degradation von Ostim® soll nach Herstellerangaben die nanopartikuläre Struktur darstellen, die eine große Angriffsfläche für degradierende „Kräfte“ bietet. In der vorliegenden Untersuchung zeigte Ostim® in beiden Versuchsgruppen innerhalb von 20 Tagen einen erheblichen Substanzverlust. Struktur- und Dichteveränderungen der Implantatschollen spiegelten sich vor allem in den mit Toluidinblaugefärbten Histologien wider. Die vom Zentrum der Implantatpartikel zu deren Peripherie stetig abnehmende Intensität der Färbung ist als Anzeichen für die Strukturauflockerung und abnehmende Dichte des Materials in den peripheren Bezirken zu interpretieren (Lubnow 2003). Die abnehmende Materialdichte führt zu einer verringerten mechanischen Stabilität und in der

Folge zur Ablösung kleinerer Ostim®-Konglomerate. Wie die Ergebnisse gezeigt haben, bleibt die Knochenneubildung vom Lagerknochen aus jedoch deutlich hinter dem Schwund des Implantatmaterials zurück. Um eine definitive Aussage im Hinblick auf den zeitlichen Verlauf der knöchernen Defektdurchbauung treffen zu können, müssen spätere Untersuchungszeitpunkte in die Beurteilung einbezogen werden.

5.1.2 Differenzierung der Zelltypen

Bei Untersuchungen zur zellvermittelten Degradation von Knochenersatzmaterialien steht stets die Frage im Vordergrund, ob es sich bei den implantatassoziierten Polykaryen um Osteoklasten oder um mehrkernige Makrophagen handelt. Experimentell konnten sowohl mehrkernige Riesenzellen (Wada et al. 1989; Willert et al. 1990) als auch Osteoklasten (Davies et al. 1993; Gomi et al. 1993; Wenisch et al. 2003) als alleinige implantatabbauende Zelltypen, sowie ihr gemeinsames Vorhandensein an Oberflächen von Biomaterialien (Baslé et al. 1993; Yamada et al. 1997a; Yamada et al. 1997b) nachgewiesen werden.

Wie die vorliegende Untersuchung gezeigt hat, wird der Knochenersatzstoff Ostim® unabhängig von einer PRP-Beimischung 20 Tage *post implantationem* von mononukleären Makrophagen und mehrkernigen Riesenzellen abgebaut. Mononukleäre Makrophagen sind anhand ihrer Morphologie lichtmikroskopisch nicht immer sicher zu identifizieren. Hier erweist sich der Nachweis über membrangebundene Makrophagen-spezifische Antigene mit Hilfe der immunhistochemischen Technik als hilfreich. Als zellspezifisches Antigen zum Nachweis von Makrophagen und mineralisierte Matrix-abbauende Polykaryen gilt CD68 (Kelly et al. 1988; Falini et al. 1993; Yamate et al. 2000). Der Calcitonin-Rezeptor wird als Osteoklasten-Marker angesehen (Owens et al. 1996; Quinn et al. 1999; Teitelbaum 2000b).

Immunhistochemisch wurden zwei Antikörper gegen **CD68** (Klon EBM11 und PG-M1) überprüft. Dabei kamen verschiedene Techniken zur Antigendemaskierung (Kochen des Präparates in Citrat-Puffer, Proteinaseandauung) und unterschiedliche Primärantikörperverdünnungen zum Einsatz. Obwohl der Klon EBM11 schon erfolgreich für die Markierung porciner Alveolarmakrophagen in formalinfixierten, in Paraffin eingebetteten Gewebeschnitten eingesetzt wurde (Ackermann et al. 1994), zeigten Makrophagen in dieser Untersuchung keine Immunreaktion. Da speziesspezifische Unterschiede ausscheiden, kann die Expression unterschiedlicher Oberflächenantigene auf der Zellmembran von

Gewebemakrophagen und Alveolarmakrophagen ein möglicher Grund für das Versagen des Antikörperklons EBM11 sein.

Der **Calcitonin-Rezeptor** (Athanasou 1996; Roodman 1999), konnte immunhistochemisch ebenfalls nicht dargestellt werden, da der eingesetzte, gegen die Ratte gerichtete Antikörper mit Zellen des porcinen Gewebes keine Kreuzreaktivität aufweist.

Die enzymhistochemische Untersuchung mittels TRAP zeigt in allen untersuchten Gruppen eine Markierung von Osteoklasten im Lagerknochen und darüber hinaus auch von Makrophagen und mehrkernigen Fremdkörperriesenzellen. Diese Resultate bestätigen vergangene Untersuchungen (Kadoya et al. 1994; Athanasou 1996; Gauthier et al. 1999), in denen die TRAP als verlässlicher Indikator für das Ausmaß der zellvermittelten Degradation von Implantatmaterialien beschrieben wurde.

Die Proteinase **Kathepsin K** kann in Übereinstimmung mit den Ergebnissen anderer Untersucher (Bossard et al. 1996; Delaisse et al. 2000) in den Osteoklasten des Lagerknochens nachgewiesen werden. Auch gelingt in sämtlichen mehrkernigen Riesenzellen des Granulationsgewebes der Expressionsnachweis (Diaz et al. 2000; Bühling et al. 2001). Dass im Granulationsgewebe lokalisierte Riesenzellen häufig weniger starke Antigenmarkierungen aufweisen als implantatassoziierte Riesenzellen, gibt Anlass zur Vermutung, dass die Kathepsin K-Synthese erst am Bestimmungsort der Zelle ihre volle Leistung erreicht. Die Tatsache, dass nur wenige mononukleäre Makrophagen im Granulationsgewebe Kathepsin K-Expression aufzeigen, stützt die Vermutung von Bühling et al. (2001), dass es sich bei Kathepsin K auch um einen Indikator des Aktivierungs- und Differenzierungszustandes von Makrophagen handelt.

Mit einer verminderten **CD44**-Expression sinkt in Makrophagen deren Fähigkeit zur Zellfusion und Chemotaxis (Zhu et al. 2004). Darüber hinaus verhindern CD44-Liganden wie Hyaluronsäure, Chondroitinsulfat und Osteopontin die Ausbildung von multinukleären Makrophagen (Sterling et al. 1998; Vignery 2000). Durch die Implantation von bovinem Kollagen-1 in subkutanes Gewebe von Ratten konnten Bonnema und Mitarbeiter (2003) beweisen, dass ab dem 14. postoperativen Tag sowohl Makrophagen als auch mehrkernigen Riesenzellen CD44 exprimieren, während nach 15 Wochen nur noch die Riesenzellen CD44-Signale aufweisen. Übereinstimmend zeigen die vorliegenden Untersuchungsergebnisse, dass

am 20. postoperativen Tag mononukleäre Makrophagen und mehrkernige Riesenzellen in der Nähe von Implantatpartikeln eine CD44-Immunoreaktivität aufweisen.

Im Bindegewebe gruppenweise angeordnete Makrophagen zeigen ein positives CD44-Signal entlang der gesamten Zellmembran. Nach der Definition Vignerys (2000) ist eine „kritische Annäherung“ von Zellen die Voraussetzung für deren Fusionen. Eng benachbarte Makrophagen weisen an den einander zugewandten Membranflächen stellenweise eine fehlende Immunreaktion auf. Dieses Phänomen kann mit der beginnenden punktuellen stattfindenden Fusion und der daraus resultierenden partiellen Auflösung der Zellmembranen erklärt werden. Der Grund für die Fusion von mononukleären Makrophagen zu multinukleären Fremdkörperriesenzellen ist die Steigerung der Phagozytoseleistung. Mit dem im Zuge der Fusion steigenden Zytoplasmagehalt vermehrt sich der Anteil der Zellorganellen und damit die metabolische Leistungsfähigkeit der Zelle (Ishiguro et al. 1997).

Sterling et al. (1998) wiesen nach der Implantation von Knochenspänen in Muskeltaschen von Ratten nach, dass sowohl mononukleäre als auch multinukleäre Zellen in unmittelbarer Nähe der Knochenimplantate transient große Mengen von CD44-Molekülen in den Zellmembranen exprimieren. Die Zellen, die dem Implantat unmittelbar auflagen, wiesen die stärksten Signale für CD44 an den freien, basalen Plasmamembranabschnitten auf, welche potenzielle Andockstellen für fusionsbereite Makrophagen darstellen. Auch in der vorliegenden Untersuchung sind mehrkernige Riesenzellen, die dem Implantat anhaften, an ihren freien, basalen Membrananteilen intensiv CD44-positiv, während die dem Implantat zugewandten, apikalen Membranabschnitte keine Markierung aufweisen. Sterling et al. (1998) erklären die unterschiedliche CD44-Verteilung entlang der Zellmembran mit der Ausrichtung der CD44-Membranproteine in Richtung auf benachbarte Makrophagen, um deren Fusion mit der Riesenzelle zu vermitteln. Darüber hinaus dienen CD44-freie Membrandomänen der Adhärenz. CD44-freie Zonen der Zellmembran sind somit notwendig, um von Haftungsproteinen okkupiert zu werden (Sterling et al. 1998).

Das Integrin $\alpha V\beta 3$, das in großen Quantitäten auf den Zellmembranen von Osteoklasten exprimiert und als möglicher Adhärenzfaktor in Betracht gezogen wurde (Blair 1998; Duong und Rodan 1998; Teitelbaum 2000a), konnte in der vorliegenden Studie nicht nachgewiesen werden, obwohl der eingesetzte Antikörper auch gegen porcines Gewebe gerichtet ist. Aufgrund dieser Ergebnisse ist nicht auszuschließen, dass die Implantathaftung der

multinukleären Zellen über andere Integrine als $\alpha V\beta 3$ erfolgt. Es ist aber auch möglich, dass das „Versagen“ des Antikörpers durch die Veränderung der Antigenstruktur im Zuge der Nachbearbeitung der Proben (Fixierung, mehrwöchige Entkalkung) herbeigeführt wurde. Die adhärenen Eigenschaften der implantatassoziierten Riesenzellen bestätigen sich jedoch in jedem Fall in der Elektronenmikroskopie und der Vimentin-Immunhistochemie.

Der Einsatz von Vimentin-Antikörpern ermöglichte die Darstellung unterschiedlicher räumlicher Verteilungsmuster von Vimentinfilamenten und damit die Unterscheidung zwischen aktiven und nicht aktiven Phagozyten. Die dem Implantat anhaftenden, aktiven Phagozyten weisen apikal ein subplasmalemmales Vimentinband auf, während die inaktiven über eine homogene Vimentinverteilung im Zytoplasma aufzeigen. Die starke Akkumulation von **Vimentin** innerhalb adhärenter Zelldomänen von Makrophagen wurde von Correia und Mitarbeitern (1999) beschrieben. In diesem Sinne verweist die dominante Vimentinfärbung an den implantatzugewandten Zytoplasmaanteilen der Riesenzellen auf eine Funktion des Intermediärfilamentes bei dem Zell-Implantat-Kontakt.

Aktive Osteoklasten bilden als deutlich polarisierte Zellen einen dem Knochen oder Implantat zugewandten Resorptionsapparat aus, der aus *sealing zone* und *ruffled border* besteht (Blair 1998; Teitelbaum 2000a; Wenisch et al. 2003). Entlang der Knochenoberfläche entsteht damit ein extrazelluläres Kompartiment, in dem zunächst durch H^+ -Ionen ein niedriger pH-Wert erzeugt wird. Dies hat die Demineralisierung der anorganischen Knochenmatrix zur Folge und erzeugt optimale Reaktionsbedingungen für proteolytische Enzyme (Dodds 2003). Lysosomale Enzyme werden, in Vesikel verpackt, zum *ruffled border* transportiert und in das extrazelluläre Kompartiment sezerniert (Duong und Rodan 1998). Durch ihre Resorptionskapazität sind Osteoklasten damit zur Bildung von Resorptionslakunen entlang mineralisierter Oberflächen befähigt (Athanasou 1996; Wang et al. 1997b; Felsenberg 2001).

In der vorliegenden Untersuchung stellten sich bei den Implantat-assoziierten Zellen keine osteoklastenspezifischen ultrastrukturellen Zelldomänen wie *ruffled border* und *sealing zone* dar. Stattdessen liegen die apikalen Zellmembranen der mehrkernigen Riesenzellen dem Implantat eng an und zeigen nur seichte Einbuchtungen. Statt der ringförmigen Ausbildungen einer *clear zone*, die im transmissionselektronenmikroskopischen Bild in Form von Aktinkondensationen an den lateralen Anteilen des dem Implantat aufliegenden Zellbereiches zu erkennen ist (Teitelbaum 2000a; Wenisch et al. 2003), zeigen sich in dieser Untersuchung durchgehende

apikale Verdichtungen der Aktinfilamente in unmittelbarer Nachbarschaft der implantatassoziierten Zellmembranen. Diese Verteilung der Aktinkondensationen werden auch in Fremdkörperriesenzellen beschrieben, die auf Dimethylsilan-beschichteten Objektträgern kultiviert wurden (Anderson et al. 1999). Die in der vorliegenden Studie identifizierten multinukleären Phagozyten zeigen überwiegend eine Polarisierung im Sinne von Riesenzellen des Langhans-Typs (Cain et al. 1983; Smetana 1987). Die Zellen liegen dabei den Implantatoberflächen breitflächig auf, während die Zellkerne im basalen Zytoplasma lokalisiert sind. Schieben sich die Ausläufer dieser Riesenzellen in Spalten des Implantatmaterials, tragen sie dort sehr wahrscheinlich zur aktiven Fragmentierung bei. Im Zytoplasma der untersuchten Zellen sind Einschlüsse lokalisiert, deren Inhalt strukturell mit dem Implantatmaterial übereinstimmt. Frei im Granulationsgewebe liegende Zellen vom gleichen Phänotyp umschließen die Partikel mit ihren Ausläufern. Dies verweist auf die Inkorporation von Fremdmaterial mittels Phagozytose. Die Degradationstechnik von Osteoklasten besteht hingegen darin, auf dem Substrat aufliegend, ein extrazelluläres Lysosom als resorptiven Reaktionsraum auszubilden, in den nach der Erniedrigung des pH-Werts durch den Einstrom von H⁺-Ionen Proteasen sezerniert werden. Anorganische und organische Knochenmatrix werden durch Säure- und Enzymwirkung aufgelöst. Einige Untersucherguppen beschreiben die Fähigkeit von Osteoklasten zur Phagozytose (Wang et al. 1997a; Wang et al. 1997b; Heymann et al. 2001; Wenisch et al. 2003), die aber erst nach Ausbildung der bereits genannten osteoklastenspezifischen Morphologie beobachtet werden konnte.

5.1.3 Zellvermittelter Implantatabbau - Makrophagen und Fremdkörperreaktion

Charakteristischerweise zerfällt die in dieser Studie verwendete HA-Paste nach der Implantation in runde bis ovoide Partikel verschiedener Größe. Der Zerfall eines Implantatstoffes in kleine Fragmente soll Makrophagen und mehrkernige Fremdkörperriesenzellen, mit der daraus folgenden entzündlichen Reaktion, stimulieren (Spector 1991; Dupraz et al. 1998; Goodman et al. 1998; Günther et al. 1998). Zechner et al. (2003) fanden drei Wochen nach der Implantation von HA-beschichteten Dentalimplantaten in Miniaturschweinen eine Resorption des HA durch mehrkernige Riesenzellen. Diese zelluläre Reaktion verstärkte sich im Beobachtungszeitraum bis zur sechsten Woche *post operationem*. In einer *in vitro*-Untersuchung wurde gezeigt, dass partikulärer HA-Debris die Produktion von proinflammatorischen Zytokinen (Interleukin 1 und 6, Tumor-Nekrose-Faktor- α) in humanen

Fibroblasten steigert (Ninomiya et al. 2001). Somit konnte ein kausaler Zusammenhang zwischen HA und der konsekutiven Induktion entzündlicher Reaktionen im umgebenden Bindegewebe hergestellt werden.

Die Anzahl von degradierenden Zellen scheint maßgeblich von der Partikelgröße des Implantates bestimmt zu werden. In einer vergleichenden Untersuchung eines injizierbaren biphasischen (Hydroxylapatit und Trikalziumphosphat) Knochenersatzstoffes mit zwei unterschiedlichen Partikelgrößen (40-80 μm bzw. 200-500 μm) fanden Gauthier et al. (1999) in der Gruppe mit der kleineren Partikelgröße eine signifikant höhere Anzahl von TRAP-positiven Zellen. Die positive TRAP-Färbung ist ein Indikator für die Aktivität des zellulären Abbaus (Athanasou 1996). Mit dem nanopartikulären Charakter des Knochenersatzstoffes Ostim® kann somit die zahlreiche Präsenz von TRAP-positiven ein- und mehrkernigen Makrophagen erklärt werden.

Der Entstehung mehrkerniger Riesenzellen durch die Fusion von mononukleären Makrophagen soll darüber hinaus eine saure Umgebung zugrunde liegen (Franklin 1958; Hernandez et al. 1996). Die Erniedrigung des physiologischen Gewebe-pH-Wertes in den sauren Bereich kann die Folge einer entzündlichen Gewebereaktion auf das Implantat oder von pH-Wert-erniedrigenden Komponenten des Implantates an sich sein, die durch Auflösung frei werden.

Im Tierversuch führt die Implantation von CaP-basierten Knochenzementen in knöcherne Defekte, subkutanes Bindegewebe (Eid et al. 2001) und die Orbitalhöhle von Kaninchen (Yeatts et al. 2002) zur Rekrutierung von mehrkernigen Riesenzellen zur Implantatoberfläche. Auch wird der Makrophagen/Riesenzellen-vermittelte Abbau von HA-Keramiken nach Implantation in den Unterkiefer von Menschen (Schulte und Donath 1991), Schädelknochendefekte (Dersot et al. 1995), Muskeltaschen und Femurdiaphysen der Ratte (Rueger et al. 1998), sowie Femurdiaphysen des Schafes (Marcacci et al. 1999) dokumentiert und als Ausdruck der Fremdkörperreaktion im Verlauf der Entzündungsreaktion interpretiert (Schulte und Donath 1991). Experimentelle Daten zum Degradationsverhalten eines CaP-Pulvers (60 % HA + 40 % β -Trikalziumphosphat) (Dupraz et al. 1998) und einer β -Trikalziumphosphatkeramik (Wiltfang et al. 2003) bestätigen die durch mononukleäre Makrophagen und multinukleäre Riesenzellen gekennzeichnete Implantat-induzierte Entzündungsreaktion.

Daten über den zeitlichen Verlauf der Fremdkörperreaktion nach HA-Keramik-Implantation dokumentieren Entzündungsphasen, die bis zu 14 Tage beim Kaninchen (Yeatts et al. 2002), bis zu 21 Tage bei der Ratte (Rueger et al. 1998) und bis zum 60. Tag *post implantationem* beim Schaf (Marcacci et al. 1999) anhalten. In der vorliegenden Studie konnte am 20. Tag *post implantationem* eine vom Implantatmaterial ausgelöste zelluläre Fremdkörperreaktion nachgewiesen werden.

Beim Menschen werden sogar noch sechs Monate nach der Implantation einer β -Trikalzium-Keramik mehrkernige Riesenzellen am Implantationsort gefunden (Wiltfang et al. 2003).

Der Fähigkeit von Implantatoberflächen zur Adsorption von Proteinen und die Affinität von Phagozyten zu diesem Biofilm liegt ebenfalls die Entstehung von Fremdkörperreaktionen zugrunde (Tang et al. 1996; Jenney und Anderson 2000). Spezifische Oberflächenladungen der Implantatmaterialien rufen spezifische Reaktionen im Empfängerorganismus hervor, indem sie die Adsorption bestimmter Proteinmuster dirigieren (Thull 2002). So sind Oberflächen, die *von Willebrand*-Faktor in großen Mengen adsorbieren, vor einer langanhaltenden Adhäsion durch Makrophagen geschützt, während große IgG-Konzentrationen auf Implantatoberflächen die Makrophagenadhäsion fördern. Die höchste Anzahl von Fremdkörperriesenzellen befindet sich auf Implantatoberflächen, die große Mengen des Proteins Vitronektin adsorbieren (Jenney und Anderson 2000). Materialoberflächen bestimmen so in Abhängigkeit von dem adsorbierten Proteinmuster die zelluläre Antwort *post implantationem*. Die gute Anfärbbarkeit des Knochenersatzstoffes Ostim[®] im Rahmen der histologischen Untersuchungen ist mit großer Wahrscheinlichkeit auf die Adsorption von Proteinen zurückzuführen, die wiederum die Adhäsion von Fremdkörperriesenzellen an die Implantatoberfläche fördern können.

Darüber hinaus sind Mastzellen und deren granuläre Inhaltsstoffe, insbesondere Histamin, wichtige Mediatoren für die Rekrutierung von Entzündungszellen zum Ort der Implantation. So gehen intraperitoneale und subkutane Injektionen eines polyethylenhaltigen Biomaterials in Mäuse mit einer verstärkten Degranulierung von Mastzellen und konsekutiver Histaminausschüttung in Implantatnähe einher. Mit dem Einsatz der Histaminrezeptor-Blocker Pyrilamin und Famotidin reduziert sich die Rekrutierung und Adhäsion von Monozyten/Makrophagen an der Biomaterialoberfläche um mehr als 30 % im Vergleich zur Kontrollgruppe (Tang et al. 1998). In der vorliegenden Studie konnten jedoch keine Mastzellen

identifiziert werden. Diese Zellpopulation scheint in Bezug auf die Induktion der vorliegend festgestellten Entzündungsreaktion nur eine untergeordnete Rolle zu spielen.

Wie die vorliegenden Ergebnisse gezeigt haben, findet sich in den Leerdefekten eine Defektauffüllung mit Granulationsgewebe, in dem weder mononukleäre Makrophagen noch mehrkernige Riesenzellen lokalisiert sind. Im Gegensatz dazu ist in der Gruppe I/PRP- das Vorhandensein dieser Zellpopulation zu beobachten. Die Induktion einer Fremdkörperreaktion durch den HA-Knochenersatzstoff Ostim® mit Beteiligung zahlreiche mehrkerniger Riesenzellen ist somit, unabhängig von der Applikation von PRP, in der vorliegenden Untersuchung festzustellen.

Der fortschreitende Prozess der zellulären Degradation von Knochenersatzstoffen auf CaP-Basis mit Rekrutierung von Makrophagen und deren Fusion zu vielkernigen Riesenzellen kann zu chronischen entzündlichen Veränderungen führen (Anderson 1988; Eid et al. 2001). Durch die kontinuierliche Freisetzung von Implantatfragmenten werden Makrophagen zur Expression von Zytokinen angeregt, wodurch weitere Makrophagen rekrutiert werden. Auf diese Weise ist eine andauernde Verstärkung der Fremdkörperreaktion gegeben (Ishiguro et al. 1997; Koerten und van der Meulen 1999). Bei Implantatmaterialien, die nur sehr langsam abgebaut werden und bei Prothesen, die dauerhaft im Körper verbleiben sollen, können Fremdkörperreaktionen zu Implantatverlusten führen (Soballe und Overgaard 1996; Sun et al. 1998; Sun et al. 1999). Im vorliegenden Fall dient der nanopartikuläre Knochenersatzstoff Ostim® der transienten Auffüllung von Knochendefekten und soll durch körpereigene Zellen abgebaut sowie von Knochengewebe ersetzt werden. Die beobachtete zelluläre Reaktion auf den Knochenersatzstoff ist somit erwünscht und ist mit den Ergebnissen anderer Studien (Spector 1991; Dupraz et al. 1998; Günther et al. 1998; Zechner et al. 2003) vergleichbar.

5.1.4 Nicht-zellvermittelte Degradationseffekte am Implantatmaterial

Das Abbauverhalten sowie der Degradationsmodus von Knochenersatzmaterialien werden in der Literatur äußerst widersprüchlich geschildert. Lu und Mitarbeiter (2002) verglichen im Tierversuch das Abbauverhalten von CaP-Keramiken und -Zementen und zeigten, dass sich gesinterte Keramiken primär in der extrazellulären Flüssigkeit auflösen, während bei den CaP-Zementen die zelluläre Degradation im Vordergrund steht. Für hydrolytische Vorgänge sprechen auch Befunde nach der Implantation einer HA-Keramik und einer β -

Trikalziumphosphatkeramik in die Femura von Kaninchen. Die Abnahme der Implantatmasse wird auf die Auflösung durch die interstitielle Flüssigkeit zurückgeführt, da ab der dritten postoperativen Woche nur wenige Osteoklasten und Makrophagen im Bindegewebe rund um die Implantate zu erkennen waren (Lu et al. 1998). Vergleichende *in vivo*-Untersuchungen von zwei Trikalziumphosphatkeramiken (Merten et al. 2000) und einem Hydroxylapatit–Kollagen–Composit (Du et al. 1998) verweisen dagegen auf die Koexistenz von hydrolytischer Halisterese und zellulärer Degradation.

Der Ablauf und die Geschwindigkeit der hydrolytischen Prozesse sind stark vom pH-Wert der Flüssigkeit abhängig, die das Implantatmaterial umgibt. So konnte die Degradation der HA-Beschichtung eines Endoprothesenschaftes experimentell durch die Absenkung des pH-Wertes in den sauren Bereich beschleunigt werden (Gross et al. 2002). Bell und Mika (1979) zeigten eine Zunahme der Löslichkeit von HA um das 45fache bei einer Erniedrigung des pH-Wertes von 7,36 auf 5,19.

Weiterhin bestimmt die chemische Zusammensetzung eines Knochenersatzstoffes dessen Löslichkeit (Dingeldein und Engart 2004). In einer vergleichenden Untersuchung wurden eine Hydroxylapatitkeramik und eine Karbonatkeramik in einer definierten Menge essigsaurer wässriger Lösung und einem pH von 5,0 bei 37 °C inkubiert. Diese Lösung erreicht bei der Karbonatkeramik eine Sättigung mit Ca⁺⁺-Ionen und anorganischem Phosphat bereits nach 30 Sekunden, während bei der Hydroxylapatitkeramik bis zum Erreichen des Sättigungspunktes 3,8 Tage vergehen (Doi et al. 1998). Die Auflösung von HA-Partikeln im sauren pH-Bereich erfolgt in zwei Schritten: Ein kurzzeitiger und stark wirkender Initialschritt schreitet einem zweiten, langandauernden Schritt mit nur noch sehr schwacher Auflösung des Implantats voran (Bloebaum et al. 1998; Koerten und van der Meulen 1999; Story et al. 1999).

In der vorliegenden Untersuchung stellt sich die Degradation durch eine Auflockerung der Implantatoberfläche an der Grenze zum Granulationsgewebe dar. Der Substanzverlust ist unabhängig vom Vorhandensein von Riesenzellen entlang der Implantatoberflächen zu beobachten. Das Phänomen ist durch das Einwirken der interstitiellen Flüssigkeit auf das Knochenersatzmaterial zu erklären. Dielert und Mitarbeiter (1988) berichteten von der Implantation einer Hydroxylapatitkeramik in Femurdiaphysen von Hunden, bei der ein physiko-chemischer Angriff auf die HA-Keramik beobachtet wurde, der sich in Elution und

Abbau äußerte. Als Grund hierfür wurde der Einfluss einer schlecht vaskularisierten Umgebung mit erniedrigtem pH-Wert auf das in den Lagerknochen eingebrachte Implantat angesehen. Diese Aussage wird durch Untersuchungen gestützt, bei denen eine erhöhte HA-Löslichkeit bei erniedrigtem pH-Wert gefunden wurde (Bell und Mika 1979). Die große Oberfläche des nanopartikulären Implantatmaterials Ostim[®] begünstigt die Degradation durch die beschriebenen lytischen Kräfte, da die Möglichkeit der Interaktionen zwischen Implantat und Umgebung durch die große Angriffsfläche erhöht und die biologische Reaktion dadurch amplifiziert wird (Eid et al. 2001). Aus diesem Grund muss neben dem zellulären auch der physiko-chemische Abbau des Implantatmaterials, der unmittelbar nach dem Einbringen in den Knochen beginnt, als Degradationsparameter berücksichtigt werden. Untersuchungen zur Degradation durch interstitielle Flüssigkeiten geben Anlass zur Vermutung, dass die Rate der Knochenneubildung positiv mit der zunehmenden Auflösung von CaP-Knochenersatzstoffen korreliert (Ducheyne und Qiu 1999).

Der Zustand des Implantats nach 20 Tagen verweist darauf, dass das Konglomerat aus Nanopartikeln zunächst in kleine Schollen zerfällt, bevor ein zellulärer Abbau beginnt. Dies lässt sich daraus ableiten, dass zahlreiche unterschiedlich große Implantatschollen im Granulationsgewebe lokalisiert sind, ohne dass sich abbauende Zellen auf deren Oberfläche nachweisen lassen. Die relativ großen Distanzen zwischen den Implantatpartikeln verweisen auf eine vorangegangene Degradation des Materials, der physiko-chemische Prozesse zugrunde liegen. Dieser partielle Abbau fördert die Schaffung von Raum für die Migration von Zellen und die Bildung von Granulationsgewebe (Shi et al. 2002). Diese erwünschte Wirkung wurde bei der Herstellung eines injizierbaren keramischen Knochenersatzstoffes erst durch den Zusatz von Hydroxylpropylmethyl-Zellulose als interpartikulärem *Spacer* erreicht (Dupraz et al. 1998).

Eine Platzhalterfunktion des Implantats für die Knochenneubildung, die im Idealfall in gleicher Geschwindigkeit wie der Implantatabbau erfolgt (Rueger 1998), ist zum Untersuchungszeitpunkt gegeben. Wie die Ergebnisse zeigen, weist das Implantat trotz großer Abstände zwischen den Schollen eine osteokonduktive Wirkung auf. Dies spiegelt sich in der Vernetzung einzelner Implantatanteile mit neugebildetem Knochen in Lagerknochennähe wider.

Das zum Untersuchungszeitpunkt in vielen Präparaten festgestellte Fehlen des

Implantatmaterials im Zentrum der Knochendefekte könnte sich für das weitere Fortschreiten der Knochendefektheilung als problematisch erweisen. In der Leerdefekt-Gruppe findet sich hingegen eine vollständige Auffüllung der Defekte durch Granulationsgewebe. Dies legt die Vermutung nahe, dass durch das Einbringen des Knochenersatzmaterials in die Defekte die Ausbildung und räumliche Ausbreitung eines Hämatoms verhindert wurde. Im Laufe der Wundheilung wandeln sich Hämatome in Granulationsgewebe um (Günther et al. 1998). Das Ausscheiden des Implantates als Leitschiene für die Knochenneubildung und die ausbleibende Auffüllung der Defektzentren mit Ersatzgewebe führt mit hoher Wahrscheinlichkeit zu einer verzögerten Defektheilung.

Das beobachtete Fehlen des Knochenersatzmaterials in den Zentren der Defekte mag auf einen ungenügenden Verschluss des Knochendefekts zurückzuführen sein, der das Eindringen von Synovialflüssigkeit und die konsekutive Hydrolyse des Implantats zur Folge hatte. Da die Deckel zum Verschluss der Defekte industriell nach Maß gefertigt wurden, ist der Grund für die mögliche Undichtigkeit im Anlegen des Knochendefektes zu vermuten. So führt schon eine leichte Abweichung von der Senkrechten beim Ansetzen des Hohlbohrers zu einem, makroskopisch nicht wahrnehmbaren, ungenügenden Verschluss des Deckels. Durch diesen Spalt kann dann Flüssigkeit, die zusätzlich durch die Gelenkmechanik unter Druck gesetzt wird, in den Defekt gepresst werden. Daher sollte die Methode im Hinblick auf den vollständigen Verschluss des Knochendefektes und somit auf den Schutz des Implantates vor externen degradierenden Einflüssen verbessert werden. In der Peripherie der Knochendefekte wurden die Implantatpartikel vom Lagerknochen ausgehend von Granulationsgewebe umschlossen und somit vor der Hydrolyse geschützt.

5.2 PRP-abhängige Effekte

5.2.1 Methoden Aspekte

Die Untersuchung der Wachstumsfaktorenkonzentration zeigt in dieser Studie eine zum Teil erhebliche Anreicherung von bestimmten Wachstumsfaktoren (Tabelle 5). Es fällt schwer, das Maß und damit den Erfolg der Anreicherung anhand anderer Studien zu kontrollieren, da die Untersuchungen an unterschiedlichen Spezies (Jakse et al. 2003; Yazawa et al. 2003; Choi et al. 2004) und die PRP-Herstellung mit verschiedenen Methoden (Anitua 1999; Dugrillon et al.

2002; Weibrich et al. 2002; Schlegel et al. 2003) erfolgten. Weiterhin werden häufig nur Endkonzentrationen einzelner Wachstumsfaktoren angegeben. Diese Angaben lassen keinen Rückschluss auf den Anreicherungsfaktor zu. In einer Studie zur PRP-Herstellung aus humanem Blut konnte PDGF im PRP um den Faktor 7,1 und TGF- β 1 um den Faktor 6,5 angereichert werden (Yazawa et al. 2003). Die PDGF-Konzentration entspricht damit dem Konzentrationsfaktor für PDGF-BB, der in der vorliegenden Studie ermittelt wurde. Die im Vergleich schwache Anreicherung von TGF- β 1 lässt sich mit speziesspezifischen Quantitätsunterschieden und/oder mit einer wenig spezifischen Reaktion des humanen Antikörpers gegen das porcine TGF- β 1 erklären. Eine mögliche Interpretation der fehlenden Antikörperreaktion für PDGF-AB im ELISA-Test kann die fehlende Kreuzreaktivität des porcinen PRP auf den verwendeten, gegen humanes Antigen gerichteten Antikörper sein. Antikörper gegen porcines PDGF-AB standen zum Zeitpunkt der Untersuchung nicht zur Verfügung.

Die Menge der thrombozytären Wachstumsfaktoren im Knochendefekt setzt sich aus den im Wundhämatom auf natürlichem Wege freigesetzten und aus den in der Gruppe II/PRP+ mit dem Knochenersatzstoff hinzugefügten Wachstumsfaktoren zusammen. Da die Größe des Wundhämatoms in jedem Defekt individuellen Schwankungen unterworfen ist, lassen sich bei den Individuen einer Versuchsgruppe keine standardisierte Versuchsbedingungen herstellen. Darüber hinaus werden durch osteolytische Prozesse am Defektrand und durch Degradation von Bohrmehl unterschiedliche Quantitäten lokaler Wachstumsfaktoren aus der organischen Knochenmatrix freigesetzt (Cornell und Lane 1992).

5.2.2 Einfluss von PRP auf den zellvermittelten Implantatabbau

Da der Zusatz von PRP den wesentlichen methodologischen Unterschied zwischen beiden Versuchstiergruppen darstellt, lässt sich damit das vermehrte Auftreten von Makrophagen im Granulationsgewebe um die Implantatpartikel bei der Gruppe II/PRP+ erklären. Ein durchgeführter Wilcoxon-Rangsummentest zeigt einen hoch signifikanten Einfluß des Faktors PRP auf die Größe TRAP-positiver Areale in den Präparaten.

Bei der Untersuchung des Einflusses von PRP auf den zellvermittelten Abbau des Knochenersatzstoffes Ostim[®] ist eine deutlich größere Anzahl von Fremdkörperriesenzellen in der PRP-Gruppe augenfällig. Die computergestützte Quantifizierung der Flächenausdehnungen

der TRAP-positiven Areale in den Präparaten der Gruppen I/PRP- und II/PRP+ ergibt eine Erhöhung der Ausdehnung in Gruppe II/PRP+ um den Faktor 2. Da sich die Zellgröße TRAP-positiver Riesenzellen in Gruppe I und II nicht unterscheidet, verweist das Ergebnis auf eine erhöhte Anzahl dieser Zellen in Gruppe II/PRP+.

Die aktivierende Wirkung einzelner Wachstumsfaktoren wie PDGF und TGF- β auf die Reifung und Chemotaxis von Makrophagen ist detailreich dokumentiert (Lee 2000; Sanchez et al. 2003). PDGF-BB und TGF- β 1 konnten im PRP, das für die vorliegende Untersuchung verwendet wurde, unterschiedlich stark konzentriert werden. Vor allem die Anreicherung von PDGF-BB um den Faktor 7,1 könnte für die erhöhte Anzahl von Makrophagen und Fremdkörperriesenzellen in der Gruppe II/PRP+ verantwortlich sein. Dieser Effekt ist sowohl durch die direkte Wirkung von PDGF auf die Makrophagen, als auch durch seine aktivierende Wirkung auf andere thrombozytäre Wachstumsfaktoren erklärbar (Yazawa et al. 2003). Daten über bFGF-vermittelte Aktivierung der Fremdkörperreaktionen *in vivo* liegen derzeit nicht vor. Insofern ist bFGF als auslösender Faktor der beobachteten Fremdkörperreaktion eher auszuschließen. Dennoch darf die Wirkung der einzelnen Wachstumsfaktoren nicht isoliert beurteilt werden, weil deren vielfältige Interaktionen sonst außer Acht gelassen würden (Sanchez et al. 2003).

Es ist darüber hinaus zu beachten, dass es sich bei dem verwendeten Thrombozytenkonzentrat um ein homologes Konzentrat handelt. Der Einsatz von homologem PRP war notwendig, um eine optimale Vergleichbarkeit der Untersuchungsergebnisse zu gewährleisten, da bei autologer Anwendung die Quantitäten thrombozytärer Wachstumsfaktoren bei allen Versuchstieren der Gruppe II/PRP+ unterschiedlich gewesen wären. Die anerkannte Definition besagt jedoch, dass PRP, das zur Beschleunigung der Knochenneubildung eingesetzt wird, eine autologe Zubereitung ist (Sanchez et al. 2003; Marx 2004). Homologe Zubereitungen können im Empfängerorganismus Immunreaktionen auslösen (Marx 2004), die sich in dem vermehrten Auftreten von Entzündungszellen und inflammatorischer Zeichen zeigen. Im ungünstigsten Fall kann eine solche Reaktion zu einer Verzögerung der Defektheilung führen. In der vorliegenden Untersuchung kann daher nicht ausgeschlossen werden, dass die stärker zu beobachtende Fremdkörperreaktion in der PRP-Gruppe auf den Einsatz homologer thrombozytärer Wachstumsfaktoren zurückzuführen ist. Wiltfang und Mitarbeiter (2003) implantierten humanen Patienten einen TCP-Keramik-Knochenersatzstoff in Verbindung mit

autologem PRP. In Knochenbiopsien, die sechs Monate nach der Implantation entnommen wurden, war in der PRP-Gruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe eine größere Anzahl von mehrkernigen Riesenzellen augenfällig. Dass auch beim Einsatz von autologem PRP höhere Quantitäten von vielkernigen Phagozyten im Granulationsgewebe rund um CaP-Knochenersatzstoffe zu beobachten sind, spricht für PRP-abhängige Effekte auf die Proliferation und Migration von Makrophagen durch die exogen applizierten autologen Wachstumsfaktoren.

5.2.3 Schlussfolgerungen

Zum Untersuchungszeitpunkt zeigen sich starke Degradationerscheinungen des implantierten Materials, die sowohl durch physiko-chemische als auch durch zelluläre Einwirkungen entstanden sind. Auf zellulärer Ebene wird der Implantatabbau von mononukleären Makrophagen und mehrkernigen Fremdkörperriesenzellen vermittelt. Die in der Gruppe II/PRP+ signifikant höhere Anzahl von phagozytierenden Zellen ist auf die Substitution von thrombozytären Wachstumsfaktoren zurückzuführen.

Durch die große Anzahl von Fremdkörperriesenzellen in den Knochendefekten der Gruppe II/PRP+ bietet sich hier das Bild einer massiven Fremdkörperreaktion. Zum Untersuchungszeitpunkt kann eine Beeinträchtigung der Defektheilung im weiteren Heilungsverlauf nicht ausgeschlossen werden. Obwohl die schnelle Degradation des Implantats die Fremdkörperreaktion zeitlich limitiert, kann die Kinetik einer solchen Reaktion nicht vorausgesagt werden. Eine Amplifizierung der Reaktion ist in beiden Ostim®-Gruppen durch die fortschreitende Fragmentierung des Implantats zu erwarten. Es ist davon auszugehen, dass die im Defektbereich lokalisierten Makrophagen durch Zytokinausschüttung weitere Makrophagen rekrutieren werden. Aus diesem Grund wird die Fremdkörperreaktion unter Umständen noch weiter verstärkt werden.

Der klinische Wert der Anwendung von autologem und homologem PRP ist aufgrund der starken Fremdkörperreaktion und vor dem Hintergrund der Aussage, dass sich die Wirkung von PRP weder voraussagen noch steuern lässt (Sanchez et al. 2003), kritisch zu beurteilen.

6 ZUSAMMENFASSUNG

Ziel der vorliegenden tierexperimentellen Studie am Miniaturschwein war es, den Einfluss von plättchenreichem Plasma (PRP) auf den zellvermittelten Abbau eines nanopartikulären Hydroxylapatits (HA) in der Frühphase der Knochendefektheilung zu untersuchen.

Hierzu wurden 26 männliche Miniaturschweine der Rasse Mini-Lewe in drei Versuchsgruppen eingeteilt und jeweils ein standardisierter Knochendefekt in der Intercondylarregion des rechten Femurs angelegt. Die Defekte wurden entweder mit dem Knochenersatzstoff (Gruppe I/PRP-, n = 11) oder dem Knochenersatzstoff kombiniert mit PRP (Gruppe II/PRP+, n = 11) befüllt. In einer Kontrollgruppe (n = 4) blieben die Defekte unbefüllt. Während der Implantationsoperation wurden bei sechs Tieren jeweils 250 ml Vollblut entnommen, aus dem anschließend durch fraktionierte Zentrifugation plättchenreiches Plasma gewonnen wurde. Die enthaltenen Thrombozyten wurden durch den Zusatz von Thrombin und Kalziumglukonat zur Degranulation angeregt, wodurch die enthaltenen Wachstumsfaktoren aus den α -Granula freigesetzt wurden. Zu diesen Wachstumsfaktoren gehören *Platelet Derived Growth Factor* AB und BB (PDGF AB, BB), *Transforming Growth Factor β 1* (TGF β ₁), *Vascular Endothelial Growth Factor* (VEGF) und *basic Fibroblast Growth Factor* (bFGF). Die Konzentration der genannten Wachstumsfaktoren wurde mit Hilfe der ELISA-Technik bestimmt. Sie lagen zwischen Faktor 1,6 für TGF- β 1 und Faktor 24,4 für bFGF. 20 Tage *post operationem* fand die Explantation der operierten distalen Femura statt.

Zur lichtmikroskopischen Untersuchung fanden die Knochen-Implantat-Proben Eingang in unterschiedliche Techniken der Einbettung (Paraffin-, Kunststoffeintrittungen), Präparation (Paraffinschnitte, Kunststoffschnitte und Schliffpräparationen), Färbung (Toluidinblau, Haematoxylin-Eosin, Safranin) und Histochemie (Enzym-, Immunhistochemie). Darüber hinaus wurden transmissionselektronenmikroskopische und computergestützte histomorphometrische Untersuchungen durchgeführt.

Wie die Ergebnisse der Licht- und Transmissionselektronenmikroskopie aufgezeigt haben, erfolgt in den mit Knochenersatzmaterial behandelten Versuchsgruppen, unabhängig von der PRP-Applikation, die HA-Degradation hydrolytisch und Makrophagen-vermittelt. Die Makrophagen-Population wird durch Riesenzellen vom Langhans-Typ repräsentiert. Diese polarisierten Polykaryen adhären über ihre apikale Membrandomäne an den

Implantatoberflächen. Das subplasmalemmale Zytoplasma ist immunhistochemisch durch Vimentin-Kondensationen gekennzeichnet. Nicht-adhärenente, frei im Granulationsgewebe lokalisierte Polykaryen zeigen dagegen ein homogenes Vimentin-Verteilungsmuster im Zytoplasma. Der zelluläre Abbau des HA erfolgt mittels Phagozytose, indem die Polykaryen den „Fremdkörper“ mit pseudopodienartigen Zytoplasmaausläufern umschließen und in ihr Zytoplasma inkorporieren. Diese Art der Degradation wird durch den *post implantationem* stattfindenden Zerfall des Knochenersatzmaterials in zahlreiche kleine Partikel unterstützt. Die hieraus resultierende Vergrößerung der Implantatoberfläche bietet einer Vielzahl von Zellen die Möglichkeit zur Haftung. Die festgestellten Expressionsmuster des CD44-Membranglykoproteins verweisen auf dessen funktionelle Rolle im Rahmen der Fusion mononukleärer Makrophagen zu multinukleären Riesenzellen. Die darüber hinaus beobachtete Umverteilung von CD44 von der apikalen zur basalen Membrandomäne bei Implantat-assoziierten Polykaryen ist als transientes Geschehen im Zuge der Adhäsion zu interpretieren. Der hohe Aktivitätsstatus der adhärenenten Polykaryen ist immunhistochemisch durch eine intensive Kathepsin K-Expression gekennzeichnet.

Die vergleichende histomorphometrische Auswertung der mit HA aufgefüllten Defekte dokumentiert eine Verdopplung der Anzahl von Polykaryen in der Gruppe „Knochenersatzstoff mit PRP“. Ein auf Basis der Messergebnisse durchgeführter Wilcoxon-Rangsummentest verweist auf den hochsignifikanten Einfluss ($p < 0,01$) des Faktors PRP auf die Ausdehnung Tartrat-resistenter saurer Phosphatase-positiver Areale in den Präparaten. Diese Effekte können sowohl auf den im PRP angereicherten Wachstumsfaktoren als auch auf dem homologen Charakter der PRP-Zubereitung beruhen.

Die beobachteten Polykaryen – sogenannte „Fremdkörperriesenzellen“ – sind auch immer Indikatoren einer stattfindenden Entzündungsreaktion. Die histomorphometrisch dargestellte, deutlich verstärkte Fremdkörperreaktion in Gruppe II/PRP+ kann auf die PRP-Applikation zurückgeführt werden. Im weiteren Heilungsverlauf kann dies zu einer Verzögerung der knöchernen Konsolidierung der Defekte führen.

7 SUMMARY

Aim of the current experimental study in Minipigs was to examine the effects of homologous platelet-rich plasma (PRP) on the cell-mediated degradation of a nanoparticulate hydroxyapatite (HA) during the early phase of bone defect healing.

Twenty-six male “Lewe” minipigs were divided into three groups. Standardized bone defects were created in the intercondylar region of the right femur of each pig and were filled with HA (Group I/PRP-, n = 11) or HA + PRP (Group II/PRP+, n = 11). The defects of the control group (n = 4) were left empty. During the implantation procedure blood was drawn from six minipigs (250 ml each). PRP was isolated from these blood samples after several centrifugation steps. After the addition of thrombin and calcium gluconate growth factors were released from the α -granules of the thrombocytes which were enriched within the PRP. Some of these growth factors are *Platelet Derived Growth Factor* AB and BB (PDGF AB, BB), *Transforming Growth Factor β 1* (TGF β ₁), *Vascular Endothelial Growth Factor* (VEGF) and *basic Fibroblast Growth Factor* (bFGF). The level of enrichment of these growth factors was controlled by the ELISA technique. Growth factor enrichment within the PRP ranged from 1.6 fold (TGF- β ₁) to 24.4 fold (bFGF). After 20 days the treated distal femura were explanted.

For light microscopical examination different tissue embedding methods (paraffine, plastic, resin), sectioning techniques (paraffine sections, plastic and resin sections, sawing and grinding sections), staining procedures (toluidine blue, hematoxylin eosin, safranin) and histochemical methods (enzyme- and immunohistochemistry) were performed. Additionally transmission electron microscopy and computer-assisted histomorphometry were used.

The results of light microscopy and transmission electron microscopy showed that regardless of the addition of PRP, the HA is degraded by hydrolysis and macrophages. The population of macrophages consists of Langhans-type giant cells. The adhesion of the polarized polykaryons at the surfaces of the implant is mediated by the apical domain of the plasmamembranes. Vimentin condensations of the cytoplasm are attached to the apical plasmalemma. In contrast, non-adherent polykaryons of the granulation tissue reveal a homogeneous Vimentin distribution pattern within their cytoplasm.

As shown ultrastructurally, the implant is degraded by means of phagocytosis. The implant

particles are encircled by pseudopodia of the polykaryons and become incorporated into the cytoplasm. The degradation process is supported by disintegration of the bone substitute into numerous small particles after implantation. This disintegration causes enlargement of the implant surface and increases the probability of phagocyte adhesion.

The pattern of CD44 expression points towards a functional role of the molecule during fusion of mononucleated macrophages into multinucleated giant cells. Implant-associated polykaryons show CD44 immunoreactivity only along the basal domains of the cytomembrane. This pattern can be interpreted as a temporal event during adhesion. Adherent polykaryons are further characterized by strong cathepsin K expression.

The histomorphometric examination demonstrates twice as much foreign body giant cells in "Group II/PRP+" as in "Group I/PRP-". Based on these results, a Wilcoxon-signed-rank test was performed and a highly significant effect ($p < 0.01$) of PRP on the expansion of tartrate resistant acid phosphatase (TRAP)-positive areas within bone defects could be demonstrated. This effect could be a result of the substitution of PRP or of its homologous character.

The polykaryons described in this work - so-called *Foreign Body Giant Cells* - are also indicators of inflammation. The enhanced cellular reaction observed in Group II/PRP+ must be interpreted as a strong foreign body reaction, triggered by the addition of PRP. It cannot be excluded that the strong inflammation reaction will lead to delayed bone formation in the course of healing.

8 LITERATURVERZEICHNIS

- ACKERMANN, M. R., B. M. DEBEY, T. J. STABEL, J. H. GOLD, K. B. REGISTER and J. T. MEEHAN** (1994). Distribution of Anti-CD68 (EBM11) immunoreactivity in formalin-fixed, paraffin-embedded bovine tissue. *Vet. Pathol.* 31: 340-348.
- ADEREM, A. and D. M. UNDERHILL** (1999). Mechanisms of phagocytosis in macrophages. *Annu. Rev. Immunol.* 17: 593-623.
- AGHALOO, T. L., P. K. MOY and E. G. FREYMILLER** (2002). Investigations of platelet-rich plasma in rabbit cranial defects: a pilot study. *J. Oral Maxillofac. Surg.* 60: 1176-1181.
- AGHALOO, T. L., P. K. MOY and E. G. FREYMILLER** (2004). Evaluation of platelet-rich plasma in combination with anorganic bovine bone in the rabbit cranium: a pilot study. *Int. J. Oral Maxillofac. Implants* 19: 59-65.
- ALLEN, L. A. and A. ADEREM** (1996). Mechanisms of phagocytosis. *Curr. Opin. Immunol.* 8: 36-40.
- ANDERSON, J. M.** (1988). Inflammatory response to implants. *ASAIO Trans.* 34: 101-107.
- ANDERSON, J. M.** (2000). Multinucleated giant cells. *Curr. Opin. Hematol.* 7: 40-47.
- ANDERSON, J. M., K. DEFIFE, A. MCNALLY, T. COLLIER and C. JENNEY** (1999). Monocyte, macrophage and foreign body giant cell interactions with molecularly engineered surfaces. *J. Mater. Sci. Mater. Med.* 10: 579-588.
- ÁNGELES ESTEBAN, M.** (2002). Introduction to the biology of phagocytosis. *Microsc. Res. Tech.* 57: 419-420.
- ANITUA, E.** (1999). Plasma rich in growth factors: preliminary results of use in the preparation of future sites for implants. *Int. J. Oral Maxillofac. Implants.* 14: 529-535.
- ATHANASOU, N. A.** (1996). Cellular biology of bone-resorbing cells. *J. Bone Joint Surg. Am* 78: 1096-1112.
- AUBIN, J. E.** (1992). Osteoclast adhesion and resorption: the role of podosomes. *J. Bone Miner. Res.* 7: 365-368.

- BASLÉ, M. F., D. CHAPPARD, F. GRIZON, R. FILMON, J. DELECRIN, G. DACULSI and A. REBEL** (1993). Osteoclastic resorption of Ca-P biomaterials implanted in rabbit bone. *Calcif. Tissue Int.* 53: 348-356.
- BAYLINK, D. J., R. D. FINKELMAN and S. MOHAN** (1993). Growth factors to stimulate bone formation. *J. Bone Miner. Res.* 8: 565-572.
- BELL, L. C. and H. MIKA** (1979). The pH dependence of the surface concentrations of calcium and phosphorus on hydroxyapatite in aqueous solutions. *J. Soil Sci.* 30: 247.
- BELYI, I. F.** (2002). Actin machinery of phagocytic cells: universal target for bacterial attack. *Microsc. Res. Tech.* 57: 432-440.
- BERÓN, W., C. ALVAREZ-DOMINQUEZ, L. MAYORGA and P. D. STAHL** (1995). Membrane trafficking along the phagocytic pathway. *Trends Cell Biol.* 5: 100-104.
- BLAIR, H. C.** (1998). How the osteoclast degrades bone. *Bioessays* 20: 837-846.
- BLAND, Y., M. CRITCHLOW and D. ASHHURST** (1995). Exogenous fibroblast growth factors-1 and -2 do not accelerate fracture healing in the rabbit. *Acta Orthop. Scand.* 66: 543-548.
- BLOEBAUM, R. D., G. A. LUNDEEN, K. N. BACHUS, I. ISON and A. A. HOFMANN** (1998). Dissolution of particulate hydroxyapatite in a macrophage organelle model. *J. Biomed. Mater. Res.* 40: 104-114.
- BLOEMERS, F. W., T. J. BLOKHUIS, P. PATKA, F. C. BAKKER, B. W. WIPPERMANN and H. J. HAARMAN** (2003). Autologous bone versus calcium-phosphate ceramics in treatment of experimental bone defects. *J. Biomed. Mater. Res.* 66B: 526-531.
- BLUMENFELD, I., S. SROUJI, Y. LANIR, D. LAUFER and E. LIVNE** (2002). Enhancement of bone defect healing in old rats by TGF-beta and IGF-1. *Exp. Gerontol.* 37: 553-565.
- BOHNER, M.** (2000). Calcium orthophosphates in medicine: from ceramics to calcium phosphate cements. *Injury* 31 Suppl 4: 37-47.
- BOHNER, M.** (2001). Physical and chemical aspects of calcium phosphates used in spinal surgery. *Eur. Spine J.* 10 Suppl 2: S114-121.

- BOISSY, P., I. MACHUCA, M. PFAFF, D. FICHEUX and P. JURDIC** (1998). Aggregation of mononucleated precursors triggers cell surface expression of alphavbeta3 integrin, essential to formation of osteoclast-like multinucleated cells. *J. Cell Sci.* 111 (Pt 17): 2563-2574.
- BONNEMA, H., E. R. POPA, M. M. VAN TIMMEREN, P. B. VAN WACHEM, L. F. DE LEIJ and M. J. VAN LUYN** (2003). Distribution patterns of the membrane glycoprotein CD44 during the foreign-body reaction to a degradable biomaterial in rats and mice. *J. Biomed. Mater. Res.* 64A: 502-508.
- BORLAND, G., J. A. ROSS and K. GUY** (1998). Forms and functions of CD44. *Immunology* 93: 139-148.
- BOSSARD, M. J., T. A. TOMASZEK, S. K. THOMPSON, B. Y. AMEGADZIE, C. R. HANNING, C. JONES, J. T. KURDYLA, D. E. MCNULTY, F. H. DRAKE, M. GOWEN and M. A. LEVY** (1996). Proteolytic activity of human osteoclast cathepsin K. Expression, purification, activation, and substrate identification. *J. Biol. Chem.* 271: 12517-12524.
- BRIEM, D., W. LINHART, W. LEHMANN, N. M. MEENEN and J. M. RUEGER** (2002). [Long-term outcomes after using porous hydroxyapatite ceramics (Endobon) for surgical management of fractures of the head of the tibia]. *Unfallchirurg* 105: 128-133.
- BROXMEYER, H. E., S. COOPER, Z. H. LI, L. LU, H. Y. SONG, B. S. KWON, R. E. WARREN and D. B. DONNER** (1995). Myeloid progenitor cell regulatory effects of vascular endothelial cell growth factor. *Int. J. Hematol.* 62: 203-215.
- BÜHLING, F., A. REISENAUER, A. GERBER, S. KRUGER, E. WEBER, D. BROMME, A. ROESSNER, S. ANSORGE, T. WELTE and C. ROCKEN** (2001). Cathepsin K - a marker of macrophage differentiation? *J. Pathol.* 195: 375-382.
- CAIN, H., B. KRAUS, R. KRAUSPE, M. OSBORN and K. WEBER** (1983). Vimentin filaments in peritoneal macrophages at various stages of differentiation and with altered functions. *Virchows Arch. B* 42: 65-81.
- CARLSON, N. E. and R. B. ROACH, JR.** (2002). Platelet-rich plasma: clinical applications in dentistry. *J. Am. Dent. Assoc.* 133: 1383-1386.
- CHAMBERS, T. J.** (2000). Regulation of the differentiation and function of osteoclasts. *J. Pathol.* 192: 4-13.
- CHOI, B. H., C. J. IM, J. Y. HUH, J. J. SUH and S. H. LEE** (2004). Effect of platelet-rich plasma on bone regeneration in autogenous bone graft. *Int. J. Oral Maxillofac. Surg.* 33: 56-59.

- CHOU, Y. H. and R. D. GOLDMAN** (2000). Intermediate filaments on the move. *J. Cell Biol.* 150: F101-106.
- CHRISTGAU, M., R. G. CAFFESSE, J. R. NEWLAND, G. SCHMALZ and R. N. D'SOUZA** (1998). Characterization of immunocompetent cells in the diseased canine periodontium. *J. Histochem. Cytochem.* 46: 1443-1454.
- CLAUSS, M., M. GERLACH, H. GERLACH, J. BRETT, F. WANG, P. C. FAMILLETTI, Y. C. PAN, J. V. OLANDER, D. T. CONNOLLY and D. STERN** (1990). Vascular permeability factor: a tumor-derived polypeptide that induces endothelial cell and monocyte procoagulant activity, and promotes monocyte migration. *J. Exp. Med.* 172: 1535-1545.
- CONSTANTZ, B. R., B. M. BARR, I. C. ISON, M. T. FULMER, J. BAKER, L. MCKINNEY, S. B. GOODMAN, S. GUNASEKAREN, D. C. DELANEY, J. ROSS and R. D. POSER** (1998). Histological, chemical, and crystallographic analysis of four calcium phosphate cements in different rabbit osseous sites. *J. Biomed. Mater. Res.* 43: 451-461.
- CORNELL, C. N. and J. M. LANE** (1992). Newest factors in fracture healing. *Clin. Orthop.* 277: 297-311.
- CORREIA, I., D. CHU, Y. H. CHOU, R. D. GOLDMAN and P. MATSUDAIRA** (1999). Integrating the actin and vimentin cytoskeletons: adhesion-dependent formation of fimbrin-vimentin complexes in macrophages. *J. Cell Biol.* 146: 831-842.
- DAVIES, J. E., G. SHAPIRO and B. F. LOWENBERG** (1993). Osteoclastic resorption of calcium phosphate ceramic thin film. *Cells Mater.* 3: 245-256.
- DELAISSE, J. M., M. T. ENGSIG, V. EVERTS, M. DEL CARMEN OVEJERO, M. FERRERAS, L. LUND, T. H. VU, Z. WERB, B. WINDING, A. LOCHTER, M. A. KARSDAL, T. TROEN, T. KIRKEGAARD, T. LENHARD, A. M. HEEGAARD, L. NEFF, R. BARON and N. T. FOGED** (2000). Proteinases in bone resorption: obvious and less obvious roles. *Clin. Chim. Acta* 291: 223-234.
- DERSOT, J. M., M. L. COLOMBIER, J. LAFONT, B. BAROUKH, D. SEPTIER and J. L. SAFFAR** (1995). Multinucleated giant cells elicited around hydroxyapatite particles implanted in craniotomy defects are not osteoclasts. *Anat. Rec.* 242: 166-176.
- DIAZ, A., A. C. WILLIS and R. B. SIM** (2000). Expression of the proteinase specialized in bone resorption, cathepsin K, in granulomatous inflammation. *Mol. Med.* 6: 645-659.
- DIELERT, E., E. FISCHER-BRANDIES and F. BAGAMBISA** (1988). [SEM studies on the hydroxyapatite/bone interface structures]. *Dtsch. Zahnärztl. Z.* 43: 22-25.

- DINGELDEIN, E. and B. ENGART** (2004). Ostim-Paste. Produktinformation, Osartis GmbH & Co. KG Oberburg.
- DJALDETTI, M., H. SALMAN, M. BERGMAN, R. DJALDETTI and H. BESSLER** (2002). Phagocytosis--the mighty weapon of the silent warriors. *Microsc. Res. Tech.* 57: 421-431.
- DODDS, R. A.** (2003). A cytochemical assay for osteoclast cathepsin K activity. *Cell. Biochem. Funct.* 21: 231-234.
- DOI, Y., T. SHIBUTANI, Y. MORIWAKI, T. KAJIMOTO and Y. IWAYAMA** (1998). Sintered carbonate apatites as bioresorbable bone substitutes. *J. Biomed. Mater. Res.* 39: 603-610.
- DONATH, K. and G. BREUER** (1982). A method for the study of undecalcified bones and teeth with attached soft tissue. *J. Oral Pathol.* 11: 318-326.
- DRAKE, F. H., R. A. DODDS, I. E. JAMES, J. R. CONNOR, C. DEBOUCK, S. RICHARDSON, E. LEE-RYKACZEWSKI, L. COLEMAN, D. RIEMAN, R. BARTHLOW, G. HASTINGS and M. GOWEN** (1996). Cathepsin K, but not cathepsins B, L, or S, is abundantly expressed in human osteoclasts. *J. Biol. Chem.* 271: 12511-12516.
- DU, C., F. Z. CUI, Q. L. FENG, X. D. ZHU and K. DE GROOT** (1998). Tissue response to nano-hydroxyapatite/collagen composite implants in marrow cavity. *J. Biomed. Mater. Res.* 42: 540-548.
- DUCHEYNE, P. and Q. QIU** (1999). Bioactive ceramics: the effect of surface reactivity on bone formation and bone cell function. *Biomaterials* 20: 2287-2303.
- DUGRILLON, A., H. EICHLER, S. KERN and H. KLUTER** (2002). Autologous concentrated platelet-rich plasma (cPRP) for local application in bone regeneration. *Int. J. Oral Maxillofac. Surg.* 31: 615-619.
- DUONG, L. T. and G. A. RODAN** (1998). Integrin-mediated signaling in the regulation of osteoclast adhesion and activation. *Front. Biosci.* 3: 757-768.
- DUPRAZ, A., J. DELECRIN, A. MOREAU, P. PILET and N. PASSUTI** (1998). Long-term bone response to particulate injectable ceramic. *J. Biomed. Mater. Res.* 42: 368-375.
- EID, K., S. ZELICOF, B. P. PERONA, C. B. SLEDGE and J. GLOWACKI** (2001). Tissue reactions to particles of bone-substitute materials in intraosseous and heterotopic sites in rats: discrimination of osteoinduction, osteocompatibility, and inflammation. *J. Orthop. Res.* 19: 962-969.

- EINHORN, T. A.** (1995). Current concepts review: enhancement of fracture-healing. *J. Bone Joint Surg. Am.* 77: 940-956.
- FALINI, B., L. FLENGHI, S. PILERI, M. GAMBACORTA, B. BIGERNA, H. DURKOP, F. EITELBACH, J. THIELE, R. PACINI and A. CAVALIERE** (1993). PG-M1: a new monoclonal antibody directed against a fixative-resistant epitope on the macrophage-restricted form of the CD68 molecule. *Am. J. Pathol.* 142: 1359-1372.
- FELSENBERG, D.** (2001). [Supporting function of collagen and hydroxyapatite. Structure and function of bone]. *Pharm. Unserer Zeit* 30: 488-494.
- FERRARA, N. and T. DAVIS-SMYTH** (1997). The biology of vascular endothelial growth factor. *Endocr. Rev.* 18: 4-25.
- FERRARA, N., H. P. GERBER and J. LECOUTER** (2003). The biology of VEGF and its receptors. *Nat. Med.* 9: 669-676.
- FRANKLIN, R. M.** (1958). Some observations on the formation of giant cells in tissue cultures of chicken macrophages. *Z. Natur. Forsch.* 13: 213.
- FREYMILLER, E. G. and T. L. AGHALOO** (2004). Platelet-rich plasma: ready or not? *J. Oral Maxillofac. Surg.* 62: 484-488.
- FUJIMOTO, R., T. TANIZAWA, S. NISHIDA, N. YAMAMOTO, S. SOSHI, N. ENDO and H. TAKAHASHI** (1999). Local effects of transforming growth factor-beta 1 on rat calvaria: changes depending on the dose and the injection site. *J. Bone. Miner. Metab.* 17: 11-17.
- FÜRST, G., R. GRUBER, S. TANGL, F. SANROMAN and G. WATZEK** (2003a). Enhanced bone-to-implant contact by platelet-released growth factors in mandibular cortical bone: a histomorphometric study in minipigs. *Int. J. Oral Maxillofac. Implants* 18: 685-690.
- FÜRST, G., R. GRUBER, S. TANGL, W. ZECHNER, R. HAAS, G. MAILATH, F. SANROMAN and G. WATZEK** (2003b). Sinus grafting with autogenous platelet-rich plasma and bovine hydroxyapatite. A histomorphometric study in minipigs. *Clin. Oral Implants Res.* 14: 500-508.
- GALVIN, R. J., P. BRYAN, M. VENUGOPALAN, D. P. SMITH and J. E. THOMAS** (1998). Calcitonin responsiveness and receptor expression in porcine and murine osteoclasts: a comparative study. *Bone* 23: 233-240.
- GARG, A. K.** (2000). The use of platelet rich plasma to enhance the success of bone grafts around dental implants. *Dent. Impl. Update* 11: 17-20.

- GARNERO, P., O. BOREL, I. BYRJALSEN, M. FERRERAS, F. H. DRAKE, M. S. MCQUENEY, N. T. FOGED, P. D. DELMAS and J. M. DELAISSE** (1998). The collagenolytic activity of cathepsin K is unique among mammalian proteinases. *J. Biol. Chem.* 273: 32347-32352.
- GAUTHIER, O., J. M. BOULER, P. WEISS, J. BOSCO, G. DACULSI and E. AGUADO** (1999). Kinetic study of bone ingrowth and ceramic resorption associated with the implantation of different injectable calcium-phosphate bone substitutes. *J. Biomed. Mater. Res.* 47: 28-35.
- GIANNOBILE, W., R. HERNANDEZ, R. FINKELMAN, S. RYAN, C. KIRITSY, M. D'ANDREA and S. LYNCH** (1996). Comparative effect of platelet-derived growth factor-BBC and insulin-like growth factor-1, individually and in combination, on periodontal regeneration in *Macaca fascicularis*. *J. Periodontol. Res.* 31: 301-312.
- GIERSE, H. and K. DONATH** (1999). Reactions and complications after the implantation of Endobon including morphological examination of explants. *Arch. Orthop. Trauma. Surg.* 119: 349-355.
- GOLDMAN, R. D., Y. H. CHOU, V. PRAHLAD and M. YOON** (1999). Intermediate filaments: dynamic processes regulating their assembly, motility, and interactions with other cytoskeletal systems. *Faseb J.* 13 Suppl 2: S261-265.
- GOMBOTZ, W., S. PANKEY, L. BOUCHARD, D. PHAN and P. PUOLAKKAINEN** (1994). Stimulation of bone healing by transforming growth factor-beta 1 released from polymeric or ceramic implants. *J. Appl. Biomater.* 5: 141-150.
- GOMI, K., B. F. LOWENBERG, G. SHAPIRO and J. E. DAVIES** (1993). Resorption of synthetic hydroxyapatite by osteoclasts in vitro. *Biomaterials* 14: 91-96.
- GOODISON, S., V. URQUIDI and D. TARIN** (1999). CD44 cell adhesion molecules. *Mol. Pathol.* 52: 189-196.
- GOODMAN, S. B., M. LIND, Y. SONG and R. SMITH** (1998). In vitro, in vivo, and tissue retrieval studies on particulate debris. *Clin. Orthop.* 1 (352): 25-34.
- GOTO, T., T. KOJIMA, T. IJIMA, S. YOKOKURA, H. KAWANO, A. YAMAMOTO and K. MATSUDA** (2001). Resorption of synthetic porous hydroxyapatite and replacement by newly formed bone. *J. Orthop. Sci.* 6: 444-447.
- GREENBERG, S.** (1995). Signal transduction of phagocytosis. *Trends Cell Biol.* 5: 93-99.

- GREENBERG, S.** (1999). Modular components of phagocytosis. *J. Leukoc. Biol.* 66: 712-717.
- GREYWOODE, G. I., S. P. MCCARTHY and J. O. MCGEE** (1990). Labelling of cells of the mononuclear phagocyte system in routinely processed archival biopsy specimens with monoclonal antibody EBM/11. *J. Clin. Pathol.* 43: 992-996.
- GROSS, K. A., N. RAY and M. ROKKUM** (2002). The contribution of coating microstructure to degradation and particle release in hydroxyapatite coated prostheses. *J. Biomed. Mater. Res.* 63: 106-114.
- GÜNTHER, K. P., H. P. SCHARF, H. J. PESCH and W. PUHL** (1998). [Integration properties of bone substitute materials. Experimental studies on animals]. *Orthopäde* 27: 105-117.
- HASEGAWA, M., Y. DOI and A. UCHIDA** (2003). Cell-mediated bioresorption of sintered carbonate apatite in rabbits. *J. Bone Joint Surg. Br.* 85: 142-147.
- HAUSCHKA, P. V., T. L. CHEN and A. E. MAVRAKOS** (1988). Polypeptide growth factors in bone matrix. *Cell and molecular biology of vertebrate hard tissues*, Ciba Foundation Symposium 136, Chichester, Wiley.
- HERNANDEZ, L., L. HOFFMAN, T. WOLFSBERG and J. WHITE** (1996). Virus-cell and cell-cell fusion. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 12: 627-661.
- HEYMANN, D., J. GUICHEUX and A. V. ROUSSELLE** (2001). Ultrastructural evidence in vitro of osteoclast-induced degradation of calcium phosphate ceramic by simultaneous resorption and phagocytosis mechanisms. *Histol. Histopathol.* 16: 37-44.
- HEYMANN, D., G. PRADAL and M. BENAHMED** (1999). Cellular mechanisms of calcium phosphate ceramic degradation. *Histol. Histopathol.* 14: 871-877.
- HIRAYAMA, T., L. DANKS, A. SABOKBAR and N. A. ATHANASOU** (2002). Osteoclast formation and activity in the pathogenesis of osteoporosis in rheumatoid arthritis. *Rheumatology (Oxford)* 41: 1232-1239.
- HOCK, J., M. CENTRELLA and E. CANALIS** (1988). Insulin-like growth factor 1 has independent effects on bone matrix formation and cell replication. *Endocrinology* 122: 254-260.
- HOLLINGER, J. O., J. BREKKE, E. GRUSKIN and D. LEE** (1996). Role of bone substitutes. *Clin. Orthop.*: 55-65.

- HÖNIG, J. F. and H. A. MERTEN** (1993). Das Göttinger Miniaturschwein (GMS) als Versuchstier in der human-medizinischen osteologischen Grundlagenforschung. *Zeit. Zahnärztl. Implantol.* 9: 244-254.
- HOSOKAWA, R., K. KIKUZAKI, T. KIMOTO, T. MATSUURA, D. CHIBA, M. WADAMOTO, Y. SATO, M. MAEDA, A. SANO and Y. AKAGAWA** (2000). Controlled local application of basic fibroblast growth factor (FGF-2) accelerates the healing of GBR. *Clin. Oral Implants Res.* 11: 345-353.
- HOWELL, T., J. FIORELLINI, D. PAQUETTE, S. OFFENBACHER, W. GIANNOBILE and S. LYNCH** (1997). a phase I/II trial to evaluate a combination of recombinant human platelet-derived growth factor-BB and recombinant human insulin-like growth factor-1 in patients with perodontal disease. *J. Periodontol. Res.* 68: 1168-1193.
- HUGHES, D. E., D. M. SALTER, S. DEDHAR and R. SIMPSON** (1993). Integrin expression in human bone. *J. Bone Miner. Res.* 8: 527-533.
- HYNES, R. O.** (1992). Integrins: versatility, modulation, and signaling in cell adhesion. *Cell* 69: 11-25.
- INUI, K., M. MAEDA, A. SANO, K. FUJIOKA, Y. YUTANI, A. SAKAWA, Y. YAMANO, Y. KATO and T. KOIKE** (1998). Local application of basic fibroblast growth factor minipellets induces the healing of segmental bony defects in rabbits. *Calcif. Tissue Int.* 63: 490-495.
- ISBERG, R. R. and G. T. V. NHIEU** (1995). The mechanism of phagocytic uptake promoted by invasin-integrin interaction. *Trends Cell Biol.* 5: 120-124.
- ISHIGURO, N., T. KOJIMA, T. ITO, S. SAGA, H. ANMA, K. KUROKOUCHI, Y. IWAHORI, T. IWASE and H. IWATA** (1997). Macrophage activation and migration in interface tissue around loosening total hip arthroplasty components. *J. Biomed. Mater. Res.* 35: 399-406.
- JAKSE, N., S. TANGL, R. GILLI, A. BERGHOLD, M. LORENZONI, A. ESKICI, R. HAAS and C. PERTL** (2003). Influence of PRP on autogenous sinus grafts. *Clin. Oral Implants Res.* 14: 578-583.
- JENNEY, C. R. and J. M. ANDERSON** (2000). Adsorbed serum proteins responsible for surface dependent human macrophage behavior. *J. Biomed. Mater. Res.* 49: 435-447.
- KADOYA, Y., N. AL-SAFFAR, A. KOBAYASHI and P. A. REVELL** (1994). The expression of osteoclast markers on foreign body giant cells. *Bone Miner.* 27: 85-96.

- KELLY, P. M., E. BLISS, J. A. MORTON, J. BURNS and J. O. MCGEE** (1988). Monoclonal antibody EBM/11: high cellular specificity for human macrophages. *J. Clin. Pathol.* 41: 510-515.
- KIESWETTER, K., Z. SCHWARTZ, D. D. DEAN and B. D. BOYAN** (1996). The role of implant surface characteristics in the healing of bone. *Crit. Rev. Oral Biol. Med.* 7: 329-345.
- KILIAN, O., S. WENISCH, C. HEISS, U. HORAS, E. DINGELDEIN and R. SCHNETTLER** (2002). Ostim-Einfluss kombiniert mit autologen thrombozytären Wachstumsfaktoren auf die Knochendefektheilung in vivo. *Biomaterialien* 3: 126-132.
- KNAEPLER, H.** (1997). Thermische Behandlung allogener Knochentransplantate - experimentelle Ergebnisse. In: *Knochenersatzmaterialien und Wachstumsfaktoren*. Eds. R. Schnettler and E. Markgraf. Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York, 118-122.
- KOERTEN, H. K. and J. VAN DER MEULEN** (1999). Degradation of calcium phosphate ceramics. *J. Biomed. Mater. Res.* 44: 78-86.
- KONTTINEN, Y. T., M. TAKAGI, J. MANDELIN, J. LASSUS, J. SALO, M. AINOLA, T. F. LI, I. VIRTANEN, M. LILJESTROM, H. SAKAI, Y. KOBAYASHI, T. SORSA, R. LAPPALAINEN, A. DEMULDER and S. SANTAVIRTA** (2001). Acid attack and cathepsin K in bone resorption around total hip replacement prosthesis. *J. Bone Miner. Res.* 16: 1780-1786.
- LEE, S. J.** (2000). Cytokine delivery and tissue engineering. *Yonsei Med. J.* 41: 704-719.
- LEE, S. K., S. R. GOLDRING and J. A. LORENZO** (1995). Expression of the calcitonin receptor in bone marrow cell cultures and in bone: a specific marker of the differentiated osteoclast that is regulated by calcitonin. *Endocrinology* 136: 4572-4581.
- LESLEY, J. and R. HYMAN** (1998). CD44 structure and function. *Front. Biosci.* 3: 616-630.
- LIEBERMAN, J. R., A. DALUISKI and T. A. EINHORN** (2002). The role of growth factors in the repair of bone. Biology and clinical applications. *J. Bone Joint Surg. Am.* 84-A: 1032-1044.
- LIEBERMAN, J. R., A. DALUISKI, S. STEVENSON, L. WU, P. MCALLISTER, Y. P. LEE, J. M. KABO, G. A. FINERMAN, A. J. BERK and O. N. WITTE** (1999). The effect of regional gene therapy with bone morphogenetic protein-2-producing bone-marrow cells on the repair of segmental femoral defects in rats. *J. Bone Joint Surg. Am.* 81: 905-917.

- LIND, M.** (1998). Growth factor stimulation of bone healing. Effects on osteoblasts, osteotomies and implant fixation. *Acta Orthop. Scand. Suppl.* 283: 2-37.
- LU, J., M. DESCAMPS, J. DEJOU, G. KOUBI, P. HARDOUIN, J. LEMAITRE and J. P. PROUST** (2002). The biodegradation mechanism of calcium phosphate biomaterials in bone. *J. Biomed. Mater. Res.* 63: 408-412.
- LU, J. X., A. GALLUR, B. FLAUTRE, K. ANSELME, M. DESCAMPS, B. THIERRY and P. HARDOUIN** (1998). Comparative study of tissue reactions to calcium phosphate ceramics among cancellous, cortical, and medullar bone sites in rabbits. *J. Biomed. Mater. Res.* 42: 357-367.
- LUBNOW, M.** (2003). Reaktion auf Nanoapatit-haltige Implantate mit pharmakologisch aktivem Polymer. Dissertation am Institut für Pathologie des Universitätsklinikums Benjamin Franklin. Freie Universität Berlin.
- LYNCH, S., D. BUSER, R. HERNANDEZ, H. WEBER, H. STICH, C. FOX and R. WILLIAMS** (1991). Effects of the platelet-derived growth factor/insulin-like growth factor-1 combination on bone regeneration around dental implants. Results of a pilot study in beagle dogs. *J. Periodontol.* 62: 710-716.
- MANGANO, C., E. G. BARTOLUCCI and C. MAZZOCCO** (2003). A new porous hydroxyapatite for promotion of bone regeneration in maxillary sinus augmentation: clinical and histologic study in humans. *Int. J. Oral Maxillofac. Implants* 18: 23-30.
- MARCACCI, M., E. KON, S. ZAFFAGNINI, R. GIARDINO, M. ROCCA, A. CORSI, A. BENVENUTI, P. BIANCO, R. QUARTO, I. MARTIN, A. MURAGLIA and R. CANCEDDA** (1999). Reconstruction of extensive long-bone defects in sheep using porous hydroxyapatite sponges. *Calcif. Tissue Int.* 64: 83-90.
- MARTINEZ-GONZALEZ, J. M., J. CANO-SANCHEZ, J. C. GONZALO-LAFUENTE, J. CAMPO-TRAPERO, G. ESPARZA-GOMEZ and J. SEOANE** (2002). Do ambulatory-use Platelet-Rich Plasma (PRP) concentrates present risks? *Med. Oral.* 7: 375-390.
- MARX, R. E.** (2004). Platelet-rich plasma: evidence to support its use. *J. Oral Maxillofac. Surg.* 62: 489-496.
- MARX, R. E., E. R. CARLSON, R. M. EICHSTAEDT, S. R. SCHIMMELE, J. E. STRAUSS and K. R. GEORGEFF** (1998). Platelet-rich plasma: Growth factor enhancement for bone grafts. *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod.* 85: 638-646.
- MAY, R. C. and L. M. MACHESKY** (2001). Phagocytosis and the actin cytoskeleton. *J. Cell Sci.* 114: 1061-1077.
-

- MERRY, J. C., I. R. GIBSON, S. M. BEST and W. BONFIELD** (1998). Synthesis and characterization of carbonate hydroxyapatite. *J. Mater. Sci. Mater. Med.* 9: 779-783.
- MERTEN, H. A., J. WILTFANG, J. F. HONIG, M. FUNKE and H. G. LUHR** (2000). [Intra-individual comparison of alpha- and beta-TCP ceramics in an animal experiment]. *Mund Kiefer Gesichtschir.* 4 Suppl 2: S509-515.
- MONCHAU, F., A. LEFEVRE, M. DESCAMPS, A. BELQUIN-MYRDYCH, P. LAFFARGUE and H. F. HILDEBRAND** (2002). In vitro studies of human and rat osteoclast activity on hydroxyapatite, beta-tricalcium phosphate, calcium carbonate. *Biomol. Eng.* 19: 143-152.
- MOR-VAKNIN, N., A. PUNTURIERI, K. SITWALA and D. M. MARKOVITZ** (2003). Vimentin is secreted by activated macrophages. *Nat. Cell Biol.* 5: 59-63.
- MOSTOV, K. and Z. WERB** (1997). Journey across the osteoclast. *Science* 276: 219-220.
- MÜLLER-MAI, C., C. VOIGT, A. HERING, R. RAHMANZADEH and U. GROSS** (2001). [Madreporic hydroxyapatite granulates for filling bone defects]. *Unfallchirurg* 104: 221-229.
- MUNDY, G. R.** (1993). Factors which stimulate bone growth in vivo. *Growth Regul.* 3: 124-128.
- NAKAMURA, I., M. F. PILKINGTON, P. T. LAKKAKORPI, L. LIPFERT, S. M. SIMS, S. J. DIXON, G. A. RODAN and L. T. DUONG** (1999). Role of alpha(v)beta(3) integrin in osteoclast migration and formation of the sealing zone. *J. Cell Sci.* 112 (Pt 22): 3985-3993.
- NASH, T., C. HOWLETT, C. MARTIN, J. STEELE, K. JOHNSON and D. HICKLIN** (1994). Effect of platelet-derived growth factor on tibial osteotomies in rabbits. *Bone* 15: 203-208.
- NIEDHART, C., U. MAUS, O. MILTNER, H. G. GRABER, F. U. NIETHARD and C. H. SIEBERT** (2004). The effect of basic fibroblast growth factor on bone regeneration when released from a novel in situ setting tricalcium phosphate cement. *J. Biomed. Mater. Res.* 69A: 680-685.
- NIMNI, M. E.** (1997). Polypeptide growth factors: Targeted delivery systems. *Biomaterials* 18: 1201-1225.

- NINOMIYA, J. T., J. A. STRUVE, C. T. STELLOH, J. M. TOTH and K. E. CROSBY** (2001). Effects of hydroxyapatite particulate debris on the production of cytokines and proteases in human fibroblasts. *J. Orthop. Res.* 19: 621-628.
- NOCITI, F., C. STEFANI, M. MACHADO, E. SALLUM, S. TOLEDO and A. SALLUM** (2000). Histometric evaluation of bone regeneration around immediate implants partially in contact with bone: a pilot study in dogs. *Implant. Dent.* 9: 321-328.
- NORDAHL, J., G. ANDERSSON and F. P. REINHOLT** (1998). Chondroclasts and osteoclasts in bones of young rats: comparison of ultrastructural and functional features. *Calcif. Tissue Int.* 63: 401-408.
- OVERGAARD, S., U. BROMOSE, M. LIND, C. BUNGER and K. SOBALLE** (1999). The influence of crystallinity of the hydroxyapatite coating on the fixation of implants. Mechanical and histomorphometric results. *J. Bone Joint Surg. Br.* 81: 725-731.
- OWENS, J. M., A. C. GALLAGHER and T. J. CHAMBERS** (1996). Bone cells required for osteoclastic resorption but not for osteoclastic differentiation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 222: 225-229.
- QUINN, J. M., M. MORFIS, M. H. LAM, J. ELLIOTT, V. KARTSOGIANNIS, E. D. WILLIAMS, M. T. GILLESPIE, T. J. MARTIN and P. M. SEXTON** (1999). Calcitonin receptor antibodies in the identification of osteoclasts. *Bone* 25: 1-8.
- QUINN, J. M., S. NEALE, Y. FUJIKAWA, J. O. MCGEE and N. A. ATHANASOU** (1998). Human osteoclast formation from blood monocytes, peritoneal macrophages, and bone marrow cells. *Calcif. Tissue Int.* 62: 527-531.
- RABINOVITCH, M.** (1995). Professional and non-professional phagocytosis: an introduction. *Trends Cell Biol.* 5: 85-87.
- RADEMACHER, H.** (1999). Makroskopisch und mikroskopisch-anatomische Untersuchungen an Nieren und Nebennieren von Schweinen der Rasse Mini-LEWE und Deutsches Edelschwein nach Einwirkung operativer Belastungssituationen unter Berücksichtigung von Blutdruck und Herzfrequenz. Dissertation am Institut für Veterinär-Anatomie des Fachbereiches Veterinärmedizin. Freie Universität Berlin.
- RIPAMONTI, U.** (1996). Osteoinduction in porous hydroxyapatite implanted in heterotopic sites of different animal models. *Biomaterials* 17: 31-35.
- RIZZI, S. C., D. J. HEATH, A. G. COOMBES, N. BOCK, M. TEXTOR and S. DOWNES** (2001). Biodegradable polymer/hydroxyapatite composites: surface analysis and initial attachment of human osteoblasts. *J. Biomed. Mater. Res.* 55: 475-486.

- ROLDAN, J. C., S. JEPSEN, J. MILLER, S. FREITAG, D. C. RUEGER, Y. ACIL and H. TERHEYDEN** (2004). Bone formation in the presence of platelet-rich plasma vs. bone morphogenetic protein-7. *Bone* 34: 80-90.
- ROODMAN, G. D.** (1999). Cell biology of the osteoclast. *Exp. Hematol.* 27: 1229-1241.
- RUEGER, J. M.** (1998). [Bone substitution materials. Current status and prospects]. *Orthopäde* 27: 72-79.
- RUEGER, J. M., W. LINHART and D. SOMMERFELDT** (1998). [Biologic reactions to calcium phosphate ceramic implantations. Results of animal experiments]. *Orthopäde* 27: 89-95.
- RYDZIEL, S., S. SHAIKH and E. CANALIS** (1994). Platelet-derived growth factor-AA and -BB (PDGF-AA and -BB) enhance the synthesis of PDGF-AA in bone cell cultures. *Endocrinology* 134: 2441-2446.
- SANCHEZ, A. R., P. J. SHERIDAN and L. I. KUPP** (2003). Is platelet-rich plasma the perfect enhancement factor? A current review. *Int. J. Oral Maxillofac. Implants* 18: 93-103.
- SARKAR, M. R., N. WACHTER, P. PATKA and L. KINZL** (2001). First histological observations on the incorporation of a novel calcium phosphate bone substitute material in human cancellous bone. *J. Biomed. Mater. Res. (Appl. Biomater.)* 58: 329-334.
- SCHLEGEL, K. A., F. R. KLOSS, S. SCHULTZE-MOSGAU, F. W. NEUKAM and J. WILTFANG** (2003). [Osseous defect regeneration using autogenous bone alone or combined with Biogran or Algipore with and without added thrombocytes. A microradiologic evaluation]. *Mund Kiefer Gesichtschir.* 7: 112-118.
- SCHLIEPHAKE, H.** (2002). Bone growth factors in maxillofacial skeletal reconstruction. *Int. J. Oral Maxillofac. Surg.* 31: 469 - 484.
- SCHMIDMAIER, G., B. WILDEMANN, T. GÄBELEIN, J. HEEGER, F. KANDZIORA, N. P. HAAS and M. RASCHKE** (2003). Synergistic effect of IGF-I and TGF- β 1 on fracture healing in rats. *Acta Orthop. Scand.* 74: 604-610.
- SCHNETTLER, R., V. ALT, E. DINGELDEIN, H. J. PFEFFERLE, O. KILIAN, C. MEYER, C. HEISS and S. WENISCH** (2003). Bone ingrowth in bFGF-coated hydroxyapatite ceramic implants. *Biomaterials* 24: 4603-4608.

- SCHNETTLER, R. and E. DINGELDEIN** (2002). Inorganic bone substitutes. In: Tissue engineering and biodegradable equivalents - scientific and clinical applications. Eds. K. U. Lewandrowski, D. L. Wise, D. J. Trantolo, J. D. Gresser, M. J. Yaszemski and D. E. Altobelli. Marcel Dekker Inc., New York, Basel, 401-432.
- SCHNETTLER, R., E. DINGELDEIN and G. HERR** (1998). [Defect reconstruction using demineralized bone matrix. Experimental studies on piglets]. *Orthopäde* 27: 80-88.
- SCHNÜRER, S. M., U. GOPP, K. D. KUHN and S. J. BREUSCH** (2003). [Bone substitutes]. *Orthopäde* 32: 2-10.
- SCHULTE, W. and K. DONATH** (1991). [Side effects and dangers in hydroxylapatite implantation]. *Zahnärztl. Mitt.* 81: 977-978, 980, 982.
- SEGAL, G., W. LEE, P. D. ARORA, M. MCKNEE, G. DOWNEY and A. G. MCCULLOCH** (2000). Involvement of actin filaments and integrins in the binding step in collagen phagocytosis by human fibroblasts. *J. Cell Sci.* 114: 119-129.
- SHI, D., G. JIANG and J. BAUER** (2002). The effect of structural characteristics on the in vitro bioactivity of hydroxyapatite. *J. Biomed. Mater. Res.* 63: 71-78.
- SHISHATSKAYA, E. I., T. G. VOLOVA, A. P. PUZYR, O. A. MOGILNAYA and S. N. EFREMOV** (2004). Tissue response to the implantation of biodegradable polyhydroxyalkanoate sutures. *J. Mater. Sci. Mater. Med.* 15: 719-728.
- SIEBERT, C., O. MILTNER, M. WEBER, S. SOPKA, S. KOCH and C. NIEDHART** (2003). Healing of osteochondral grafts in an ovine model under the influence of bFGF. *Arthroscopy* 19: 182-187.
- SMETANA, K. J.** (1987). Multinucleated foreign-body giant cell formation. *Exp. Mol. Pathol.* 46: 258-265.
- SOBALLE, K. and S. OVERGAARD** (1996). The current status of hydroxyapatite coating of prostheses. *J. Bone Joint Surg. Br.* 78: 689-691.
- SOFFER, E., J. P. OUHAYOUN and F. ANAGNOSTOU** (2003). Fibrin sealants and platelet preparations in bone and periodontal healing. *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod.* 95: 521-528.
- SPECTOR, M.** (1991). Charakterisierung biokeramischer Kalziumphosphat-Implantate. In: *Hefte Unfallheilkunde*. Eds. A. H. Huggler and E. H. Kuner, 11-22.

- STEFANI, C., M. MACHADO, E. SALLUM, S. TOLEDO and H. J. NOCTI** (2000). Platelet-derived growth factor/insulin-like growth factor-1 combination and bone regeneration around implants placed into extractions sockets: a histometric study in dogs. *Implant. Dent.* 9: 126-131.
- STERLING, H., C. SAGINARIO and A. VIGNERY** (1998). CD44 occupancy prevents macrophage multinucleation. *J. Cell Biol.* 143: 837-847.
- STORY, B. J., A. V. BURGESS, D. LA and W. R. WAGNER** (1999). In vitro stability of a highly crystalline hydroxylapatite coating in a saturated citric acid solution. *J. Biomed. Mater. Res.* 48: 841-847.
- STREET, J., M. BAO, L. DEGUZMAN, S. BUNTING, F. V. PEALE, JR., N. FERRARA, H. STEINMETZ, J. HOEFFEL, J. L. CLELAND, A. DAUGHERTY, N. VAN BRUGGEN, H. P. REDMOND, R. A. CARANO and E. H. FILVAROFF** (2002). Vascular endothelial growth factor stimulates bone repair by promoting angiogenesis and bone turnover. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99: 9656-9661.
- STÜTZLE, H., K. HALLFELDT, H. MANDELKOW, S. KESSLER and L. SCHWEIBERER** (1998). [Bone regeneration stimulated by bone substitute materials]. *Orthopäde* 27: 118-125.
- SUDA, T., I. NAKAMURA, E. JIMI and N. TAKAHASHI** (1997). Regulation of osteoclast function. *J. Bone Miner. Res.* 12: 869-879.
- SUN, J. S., F. H. LIN, T. Y. HUNG, Y. H. TSUANG, W. H. CHANG and H. C. LIU** (1999). The influence of hydroxyapatite particles on osteoclast cell activities. *J. Biomed. Mater. Res.* 45: 311-321.
- SUN, J. S., H. C. LIU, W. H. CHANG, J. LI, F. H. LIN and H. C. TAI** (1998). Influence of hydroxyapatite particle size on bone cell activities: an in vitro study. *J. Biomed. Mater. Res.* 39: 390-397.
- SUN, L., C. C. BERNDT, K. A. KHOR, H. N. CHEANG and K. A. GROSS** (2002). Surface characteristics and dissolution behavior of plasma-sprayed hydroxyapatite coating. *J. Biomed. Mater. Res.* 62: 228-236.
- SUNDERKÖTTER, C., K. STEINBRINK, M. GOEBELER, R. BHARDWAJ and C. SORG** (1994). Macrophages and angiogenesis. *J. Leukoc. Biol.* 55: 410-422.

- SZIVEK, J. A., E. R. NELSON, S. D. HAJDU, K. YABLONSKI and D. W. DEYOUNG** (2004). Transforming growth factor-beta1 accelerates bone bonding to a blended calcium phosphate ceramic coating: A dose-response study. *J. Biomed. Mater. Res.* 68A: 537-543.
- TANG, L. and J. W. EATON** (1995). Inflammatory responses to biomaterials. *Am. J. Clin. Pathol.* 103: 466-471.
- TANG, L., T. A. JENNINGS and J. W. EATON** (1998). Mast cells mediate acute inflammatory responses to implanted biomaterials. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95: 8841-8846.
- TANG, L., T. P. UGAROVA, E. F. PLOW and J. W. EATON** (1996). Molecular determinants of acute inflammatory responses to biomaterials. *J. Clin. Invest.* 97: 1329-1334.
- TEITELBAUM, S. L.** (2000a). Bone resorption by osteoclasts. *Science* 289: 1504-1508.
- TEITELBAUM, S. L.** (2000b). Osteoclasts, integrins, and osteoporosis. *J. Bone Miner. Metab.* 18: 344-349.
- TETI, A., S. MIGLIACCIO and R. BARON** (2002). The role of the alphaVbeta3 integrin in the development of osteolytic bone metastases: a pharmacological target for alternative therapy? *Calcif. Tissue Int.* 71: 293-299.
- THULL, R.** (2002). Physicochemical principles of tissue material interactions. *Biomol. Eng.* 19: 43-50.
- TÖZÜM, T. and B. DEMIRALP** (2003). Platelet-rich plasma: A promising innovation in dentistry. *J. Can. Dent. Assoc.* 69: 664-664.
- VAANANEN, H. K., H. ZHAO, M. MULARI and J. M. HALLEEN** (2000). The cell biology of osteoclast function. *J. Cell Sci.* 113 (Pt 3): 377-381.
- VAN EGMOND, M. H., A. J. HANNEKE VAN VUUREN and J. G. VAN DE WINKEL** (1999). The human Fc receptor for IgA (Fc alpha RI, CD89) on transgenic peritoneal macrophages triggers phagocytosis and tumor cell lysis. *Immunol. Lett.* 68: 83-87.
- VAN LANDUYT, P., F. LI, J. P. KEUSTERMANS, J. M. STREYDIO, F. DELANNAY and E. MUNTING** (1995). The influence of high sintering temperatures on mechanical properties of hydroxyapatite. *J. Mater. Sci. Mater. Med.* 6.
- VIGNERY, A.** (2000). Osteoclasts and giant cells: macrophage-macrophage fusion mechanism. *Int. J. Exp. Pathol.* 81: 291-304.

- WADA, T., K. HARA, H. Y. QUIAN, F. WANG and S. A. ROSENZWEIG** (1989). Ultrastructural and histochemical study of beta-tricalcium phosphate resorbing cells in periodontium of dog. *J. Periodontal Res.* 24: 391-401.
- WANG, W., D. J. FERGUSON, J. M. QUINN, A. H. SIMPSON and N. A. ATHANASOU** (1997a). Biomaterial particle phagocytosis by bone-resorbing osteoclasts. *J. Bone Joint Surg. Br.* 79: 849-856.
- WANG, W., D. J. FERGUSON, J. M. QUINN, A. H. SIMPSON and N. A. ATHANASOU** (1997b). Osteoclasts are capable of particle phagocytosis and bone resorption. *J. Pathol.* 182: 92-98.
- WEBBER, D., P. OSDOBY, P. HAUSCHKA and M. KRUKOWSKI** (1990). Correlation of an osteoclast antigen and ruffled border on giant cells formed in response to resorbable substrates. *J. Bone Miner. Res.* 5: 401-410.
- WEBSTER, T. J., C. ERGUN, R. H. DOREMUS, R. W. SIEGEL and R. BIZIOS** (2001). Enhanced osteoclast-like cell functions on nanophase ceramics. *Biomaterials* 22: 1327-1333.
- WEIBRICH, G., W. K. KLEIS and G. HAFNER** (2002). Growth factor levels in the platelet-rich plasma produced by 2 different methods: curasan-type PRP kit versus PCCS PRP system. *Int. J. Oral Maxillofac. Implants* 17: 184-190.
- WENISCH, S., J. P. STAHL, U. HORAS, C. HEISS, O. KILIAN, K. TRINKAUS, A. HILD and R. SCHNETTLER** (2003). In vivo mechanisms of hydroxyapatite ceramic degradation by osteoclasts: Fine structural microscopy. *J. Biomed. Mater. Res.* 67A: 713-718.
- WILDEMANN, B., P. BAMDAD, C. HOLMER, N. P. HAAS, M. RASCHKE and G. SCHMIDMAIER** (2004). Local delivery of growth factors from coated titanium plates increases osteotomy healing in rats. *Bone* 34: 862-868.
- WILLERT, H. G., H. B. BERTRAM and G. H. BUCHHORN** (1990). Osteolysis in alloarthroplasty of the hip: the role of ultra-high molecule weight polyethylene wear particles. *Clin. Orthop.* 258: 95-107.
- WILTFANG, J., F. R. KLOSS, P. KESSLER, E. NKENKE, S. SCHULTZE-MOSGAU, R. ZIMMERMANN and K. A. SCHLEGEL** (2004). Effects of platelet-rich plasma on bone healing in combination with autogenous bone and bone substitutes in critical-size defects - an animal experiment. *Clin. Oral Implants Res.* 15: 187-193.

- WILTFANG, J., K. A. SCHLEGEL, S. SCHULTZE-MOSGAU, E. NKENKE, R. ZIMMERMANN and P. KESSLER** (2003). Sinus floor augmentation with beta-tricalciumphosphate (beta-TCP): does platelet-rich plasma promote its osseous integration and degradation? *Clin. Oral Implants Res.* 14: 213-218.
- WIPPERMANN, B. W., H. E. SCHRATT, S. STEEG and H. TSCHERNE** (1997). Complications of spongiosa harvesting of the ilial crest. A retrospective analysis of 1,191 cases. *Der Chirurg* 68: 1286-1291.
- YAMADA, S., D. HEYMANN, J. M. BOULER and G. DACULSI** (1997a). Osteoclastic resorption of calcium phosphate ceramics with different hydroxyapatite/beta-tricalcium phosphate ratios. *Biomaterials* 18: 1037-1041.
- YAMADA, S., D. M. HEYMANN, J. M. BOULER and G. DACULSI** (1997b). Osteoclastic resorption of biphasic calcium phosphate ceramics in vitro. *J. Biomed. Mater. Res.* 37: 346-352.
- YAMAMOTO, M., Y. TABATA, L. HING, S. MIYAMOTO, N. HASHIMOTO and Y. IKADA** (2000). Bone regeneration by transforming growth factor-beta 1 released from a biodegradable hydrogel. *J. Controlled Release* 64: 133-142.
- YAMATE, J., H. YOSHIDA, Y. TSUKAMOTO, M. IDE, M. KUWAMURA, F. OHASHI, T. MIYAMOTO, T. KOTANI, S. SAKUMA and M. TAKEYA** (2000). Distribution of cells immunopositive for AM-3K, a novel monoclonal antibody recognizing human macrophages, in normal and diseased tissues of dogs, cats, horses, cattle, pigs, and rabbits. *Vet. Pathol.* 37: 168-176.
- YAZAWA, M., H. OGATA, T. NAKAJIMA, T. MORI, N. WATANABE and M. HANDA** (2003). Basic studies on the clinical applications of platelet-rich plasma. *Cell Transplant.* 12: 509-518.
- YEATTS, P. R., W. GRIM, C. STANTON and C. CURRY** (2002). Injectable hydroxyapatite paste as an option for ocular implantation after evisceration. *Ophthalmology* 109: 2123-2128.
- YLINEN, P., R. SUURONEN, R. TAURIO, P. TORMALA and P. ROKKANEN** (2002). Use of hydroxyapatite/ polymer-composite in facial bone augmentation. An experimental study. *Int. J. Oral Maxillofac. Surg.* 31: 405-409.
- YOKOTA, A., K. YUKAWA, A. YAMAMOTO, K. SUGIYAMA, M. SUEMURA, Y. TASHIRO, T. KISHIMOTO and H. KIKUTANI** (1992). Two forms of the low-affinity Fc receptor for IgE differentially mediate endocytosis and phagocytosis: identification of the critical cytoplasmic domains. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89: 5030-5034.

- YOON, M., R. D. MOIR, V. PRAHLAD and R. D. GOLDMAN** (1998). Motile properties of vimentin intermediate filament networks in living cells. *J. Cell Biol.* 143: 147-157.
- YUAN, H., Z. YANG, Y. LI, X. ZHANG, J. D. DE BRUIJN and K. DE GROOT** (1998). Osteoinduction by calcium phosphate biomaterials. *J. Mater. Sci. Mater. Med.* 9: 723-726.
- YUASA, T., Y. MIYAMOTO, K. ISHIKAWA, M. TAKECHI, M. NAGAYAMA and K. SUZUKI** (2001). In vitro resorption of three apatite cements with osteoclasts. *J. Biomed. Mater. Res.* 54: 344-350.
- ZECHNER, W., S. TANGL, G. FURST, G. TEPPER, U. THAMS, G. MAILATH and G. WATZEK** (2003). Osseous healing characteristics of three different implant types. *Clin. Oral Implants Res.* 14: 150-157.
- ZHENG, M. H., J. M. PAPADIMITRIOU and G. C. NICHOLSON** (1991). A quantitative cytochemical investigation of osteoclasts and multinucleated giant cells. *Histochem. J.* 23: 180-188.
- ZHENG, Q., J. DU, Z. XIA, H. ZENG, S. LI, Y. YAN and F. CHEN** (1998). Biodegradation of tricalcium phosphate ceramics by osteoclasts. *J. Tongji Med. Univ.* 18: 257-261.
- ZHU, B., K. SUZUKI, H. A. GOLDBERG, S. R. RITTLING, D. T. DENHARDT, C. A. MCCULLOCH and J. SODEK** (2004). Osteopontin modulates CD44-dependent chemotaxis of peritoneal macrophages through G-protein-coupled receptors: evidence of a role for an intracellular form of osteopontin. *J. Cell Physiol.* 198: 155-167.

9 ANHANG

Tabelle A: Quantifizierung der TRAP-positiven Flächenanteile Gruppe I/PRP-

Messfeld	Tiernr.							
	1	2	3	4	5	6	7	8
1	1,9766	3,6337	5,5551	17,4031	2,8646	8,4684	0,4968	2,9516
2	1,0831	4,4462	10,3426	13,6634	5,5259	3,6253	1,1663	3,7709
3	2,1965	2,6726	2,5583	5,1019	5,0877	14,3124	0,4746	1,7318
4	8,5375	2,5003	4,6104	3,4227	7,1072	5,0899	0,6188	4,3942
5	2,8957	2,7611	8,1496	6,5586	6,6013	4,8173	0,2774	3,8919
6	6,4571	1,8493	4,1778	2,7939	8,3842	5,2037	0,7648	0,8085
7	2,7558	1,4147	4,6316	0,6107	3,5524	8,8965	1,2247	3,4104
8	3,0011	0,6701	4,6639	2,9116	4,8436	7,1246	0,4915	1,8839
9	1,1159	1,5112	2,6201	0,0974	5,1461	9,0622	2,0642	0,9975
10	2,1331	2,7865	3,9428	3,7546	3,0184	10,0479	1,4239	2,5149
11	0,7512	3,4397	2,1695	5,0445	6,2574	6,0719	10,1314	3,4537
12	1,9504	4,4645	3,0558	3,9756	3,4989	3,6515	1,9641	5,4104
13	0,7293	0,6736		6,1131	5,9803	3,6023	1,7907	3,9534
14	0,4179	3,2621		8,4301	4,4997	4,6191	6,1179	4,1486
15	2,6275	4,8327			7,2572	4,0068	2,8779	3,3448
16	3,2418	4,5709				12,1201	2,8772	
17	2,9621	2,5583				5,6856	5,4842	
18		1,4794				5,8139	2,5249	
19		3,8384					3,3491	
20							5,6964	
21							4,6182	
22							2,9779	
23							7,7105	
Mittel	2,6372	2,8087	4,7065	5,7058	5,3083	6,7900	2,9184	3,1111

Darstellung der Messwerte in % pro Gesamtfläche

ANHANG

Tabelle B: Quantifizierung der TRAP-positiven Flächenanteile Gruppe II/PRP+

Messfeld	Tiernr.							
	9	10	11	12	13	14	15	16
1	15,5935	11,6129	1,1475	4,0641	14,0619	12,4891	3,1691	3,4653
2	12,7441	12,5641	2,9295	8,7713	27,3423	11,6636	2,7142	2,6388
3	12,4527	5,2944	1,8849	8,4729	9,4758	6,5764	3,2763	7,1062
4	13,4908	3,9962	3,5935	3,1933	17,6527	10,3474	1,8717	2,4684
5	11,5396	3,3896	8,8226	3,2223	10,4127	6,3133	2,7024	6,7851
6	15,9399	6,9851	10,2526	13,3636	4,3707	1,4038	0,6371	8,1613
7	14,7719	8,5596	11,9818	4,2035	3,5625	2,2809	1,3959	7,0369
8	11,2741	7,0281	14,1068	5,2324	6,9145	1,9981	8,6668	4,5272
9	13,3047	5,1241	15,1492	4,5914	6,5788	3,6871	1,9626	3,0792
10	14,4008	5,4295	5,7001	6,7185	6,2071	3,3086	2,3044	7,2877
11	16,7863	6,7833	11,7623	2,4789	0,8189	2,8776	6,7879	11,6675
12	7,3297	4,9295	4,6060	3,8881	1,0459	10,4765	7,4646	9,6504
13	11,3937	10,1274		1,7306	0,9492	6,1107	11,0262	6,1038
14	7,0254	9,5586		5,4405	5,7853	7,7788	9,9453	8,8563
15	10,7454	11,7097		3,8912	0,8306	10,0035	21,5022	11,2071
16	21,0671	18,2733		8,4315	0,3431	7,6649	15,4687	12,5881
17	22,8511	14,2434		9,0051	0,3499	8,5574	11,8351	10,1065
18	31,9406	8,1387		11,1528	5,0661	9,5162	9,7629	13,0925
19	21,6459	12,2551		9,4121	3,6423	6,9628	27,7194	10,0089
20		8,8241		3,8831	4,4201	13,9133	32,2164	13,8898
21		9,1601		3,5583	3,8894	11,3028	26,4128	
22		10,1582		4,9878	5,0451	7,9964		
23		8,8386		11,5273	22,0063	6,0513		
24				9,1888	19,6257	12,2255		
Mittel	15,0683	8,8254	7,6614	6,2671	7,5165	7,5628	9,9449	7,9864

Darstellung der Messwerte in % pro Gesamtfläche

Danksagung

Frau PD Dr. Wenisch danke ich für die Überlassung des Promotionsthemas, ihre ständige Bereitschaft zur fachlichen Diskussion und ihre konstruktive Kritik während der Anfertigung der Arbeit.

Für die gewährte Möglichkeit, die für meine Dissertation nötigen Untersuchungen in der Abteilung für Unfallchirurgie der JLU Gießen durchführen zu können, danke ich Herrn Prof. Dr. Dr. Schnettler.

Herrn Dr. Kilian möchte ich für die Planung und Durchführung des operativen Anteiles des Tierversuches danken.

Herrn Dr. Flesch danke ich für die Herstellung des plättchenreichen Plasmas und Frau Dr. Jonuleit für die Durchführung der Konzentrationsbestimmung der Wachstumsfaktoren.

Den Mitarbeitern des Laboratoriums für Experimentelle Unfallchirurgie gebührt mein Dank für ihre große Unterstützung bei der Laborarbeit. Besonders bedanken möchte ich mich bei Maren Cassens, Anne Hild, Iris Schütz und Rainer Braun, die mich geduldig in die Geheimnisse der histologischen Methoden einführten und mir stets mit Rat und Tat zur Seite standen.

Meiner Mit-Doktorandin Ursula Fidorra danke ich für die nette Bürogemeinschaft, für das Einbringen ihres Organisationsgeschickes in das Projekt und für viele fachliche und private Gespräche.

Herrn PD Dr. Brandt gebührt mein Dank für seine statistische Beratung.

Meinen Eltern möchte ich auf diesem Weg danken, dass sie mir bei jeder meiner beruflichen Entscheidungen vertrauensvoll den Rücken stärkten und mich auf diesem langen Weg auf vielfältige Weise unterstützten.

Meiner Freundin Christina danke ich für ihr „lockeres Mitschwingen“ während der Anfertigung dieser Arbeit, für die Lösung unzähliger Probleme im Bereich EDV und für vieles mehr.

Ich erkläre:

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

édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

VVB LAUFERSWEILER VERLAG
STAUFENBERGRING 15
D - 3 5 3 9 6 G I E S S E N

Tel: 0641-5599888 Fax: -5599890
redaktion@doktorverlag.de
www.doktorverlag.de

ISBN 3-8359-5109-2



9 783835 095109