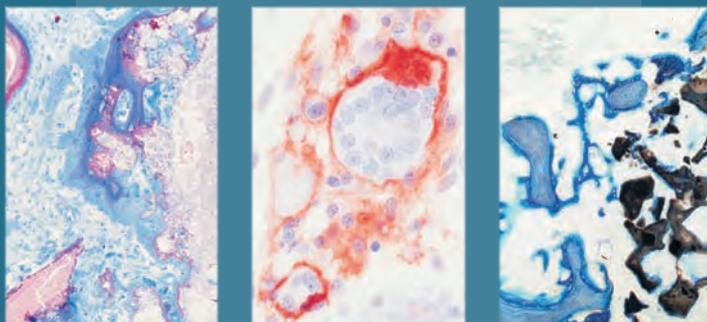


VERGLEICHENDE MORPHOLOGISCHE  
UNTERSUCHUNGEN AM TIBIABOHRLOCHMODELL  
DES SCHAFES ZUR FREMDKÖRPERREAKTION NACH  
IMPLANTATION VON CALCIUMPHOSPHAT-BASIERTEN  
KNOCHENERSATZSTOFFEN



TASSILO GRAF VON PÜCKLER VON SCHWICHOW

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 2011

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.

1<sup>st</sup> Edition 2011

© 2011 by VVB LAUFERSWEILER VERLAG, Giessen  
Printed in Germany



*édition scientifique*  
**VVB LAUFERSWEILER VERLAG**

STAUFENBERGRING 15, D-35396 GIESSEN  
Tel: 0641-5599888 Fax: 0641-5599890  
email: [redaktion@doktorverlag.de](mailto:redaktion@doktorverlag.de)

[www.doktorverlag.de](http://www.doktorverlag.de)

Aus dem Klinikum Veterinärmedizin  
Klinik für Kleintiere, Chirurgie  
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Betreuerin: Prof. Dr. Sabine Wenisch

**Vergleichende morphologische Untersuchungen  
am Tibiaboehrlochmodell des Schafes  
zur Fremdkörperreaktion nach Implantation von  
Calciumphosphat-basierten Knochenersatzstoffen**

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

Eingereicht von  
**Tassilo Graf von Pückler von Schwichow**  
Tierarzt aus Köln

Giessen 2011

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

Dekan: Prof. Dr. Martin Kramer

Gutachter /-in: Prof. Dr. Sabine Wensch

Prof. Dr. Manfred Reinacher

Tag der Disputation: 11.07.2011

**Meiner Familie**



## Inhaltsverzeichnis

<b>Abbildungsverzeichnis</b> .....	<b>IV</b>
<b>Tabellenverzeichnis</b> .....	<b>VI</b>
<b>Abkürzungsverzeichnis</b> .....	<b>VII</b>
<b>1 Einführung</b> .....	<b>1</b>
<b>2 Literaturübersicht</b> .....	<b>3</b>
<b>2.1 Knochenersatzmaterialien</b> .....	<b>3</b>
2.1.1 Autologer Knochenersatz .....	3
2.1.2 Allogener Knochenersatz .....	6
2.1.3 Xenograft .....	7
2.1.4 Knochenersatzstoffe .....	8
<b>2.2 Fremdkörperreaktion</b> .....	<b>14</b>
<b>2.3 Knochenstoffwechsel</b> .....	<b>23</b>
<b>2.4 Zielstellung</b> .....	<b>28</b>
<b>3 Material und Methode</b> .....	<b>30</b>
<b>3.1 Versuchstiere</b> .....	<b>30</b>
<b>3.2 Versuchsaufbau</b> .....	<b>30</b>
3.2.1 Knochenersatzmaterialien.....	31
<b>3.3 Operationen</b> .....	<b>32</b>
3.3.1 OP-Vorbereitung.....	32
3.3.2 Narkose .....	32
3.3.3 Implantations-Operation.....	32
3.3.4 Postoperative Nachsorge.....	33
3.3.5 Explantations-Operation.....	33

<b>3.4</b>	<b>Bearbeitung der Proben für die Lichtmikroskopie .....</b>	<b>34</b>
3.4.1	Histologie .....	34
3.4.1.1	Trenn-Dünnschliff-Technik .....	34
3.4.1.2	Paraffin-Technik .....	38
3.4.1.3	Semidünnschnitte .....	40
3.4.2	Histochemische Methoden .....	41
3.4.2.1	Enzymhistochemie - TRAP .....	41
3.4.2.2	Immunhistochemie .....	41
<b>3.5</b>	<b>Lichtmikroskopische Auswertung .....</b>	<b>44</b>
<b>4</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>45</b>
<b>4.1</b>	<b>Versuchstiere .....</b>	<b>45</b>
<b>4.2</b>	<b>Auswertungsgrundlage .....</b>	<b>45</b>
<b>4.3</b>	<b>Gruppe I: TCP-Zement .....</b>	<b>46</b>
4.3.1	Histologie: .....	46
4.3.2	Immunhistochemie .....	51
4.3.2.1	CD68 .....	51
4.3.2.2	CD44 .....	54
4.3.3	Enzymhistochemie - TRAP .....	56
4.3.4	Zusammenfassung Gruppe I: TCP .....	58
<b>4.4</b>	<b>Gruppe II: CaP-Granulat (Calcibon® Granules) .....</b>	<b>59</b>
4.4.1	Histologie .....	59
4.4.2	Immunhistochemie .....	64
4.4.2.1	CD 68 .....	64
4.4.2.2	CD 44 .....	67
4.4.2.3	Doppelinkubation CD44 – CD68 .....	68
4.4.3	Enzymhistochemie - TRAP .....	69
4.4.4	Zusammenfassung der Gruppe II: CaP-Granulat .....	71

<b>4.5</b>	<b>Gruppe III: Calciumphosphat-Zement + Phosphoserin</b> .....	<b>73</b>
4.5.1	Histologie .....	73
4.5.2	Immunhistochemie .....	77
4.5.2.1	CD 68 .....	78
4.5.2.2	CD 44 .....	80
4.5.3	Enzymhistochemie - TRAP .....	81
4.5.4	Zusammenfassung der Gruppe III: CaP-Zement + Phosphoserin .....	82
<b>4.6</b>	<b>Gruppe IV: Leerdefekte</b> .....	<b>84</b>
4.6.1	Histologie .....	84
4.6.2	Immunhistochemie .....	86
4.6.2.1	CD68 .....	86
4.6.2.2	CD 44 .....	87
4.6.3	Enzymhistochemie - TRAP .....	88
4.6.4	Zusammenfassung der Gruppe IV: Leerdefekte .....	88
<b>4.7</b>	<b>Vergleichende Beurteilung</b> .....	<b>89</b>
<b>5</b>	<b>Diskussion</b> .....	<b>93</b>
<b>5.1</b>	<b>Tier- und Operationsmodell</b> .....	<b>93</b>
<b>5.2</b>	<b>CaP-basierte Werkstoffe</b> .....	<b>94</b>
<b>5.3</b>	<b>Zellnachweis und -identifizierung</b> .....	<b>95</b>
<b>5.4</b>	<b>Fremdkörperreaktion als Indikator der Biokompatibilität</b> .....	<b>98</b>
<b>5.4</b>	<b>Einfluss der Applikationsform</b> .....	<b>107</b>
<b>6</b>	<b>Zusammenfassung</b> .....	<b>112</b>
<b>7</b>	<b>Summary</b> .....	<b>115</b>
<b>8</b>	<b>Literaturverzeichnis</b> .....	<b>117</b>

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1:	Ablauf der Entzündungs- und Heilungskaskade.....	16
Abbildung 2:	Entwicklungsstadien zirkulierender Monozyten.....	17
Abbildung 3:	Schema Knochenstoffwechsel.....	24
Abbildung 4:	Mechanismus der Knochenresorption durch Osteoklasten.....	26
Abbildung 5:	OP-Situs nach Entnahme des Knochenzylinder.....	33
Abbildung 6:	OP-Situs nach Implantation des CaP-Granulates.....	33
Abbildung 7:	Schematische Einteilung des Defektes.....	45
Abbildung 8:	TCP: Dünnschliff, Toluidinblau.....	46
Abbildung 9:	TCP: Semidünnschnitt, Toluidinblau-Safranin O.....	47
Abbildung 10:	TCP: Paraffin-Schnitt, HE.....	48
Abbildung 11:	TCP: Paraffin-Schnitt, HE.....	49
Abbildung 12:	TCP: Paraffin-Schnitt, HE.....	49
Abbildung 13:	TCP: Paraffin-Schnitt, HE.....	50
Abbildung 14:	TCP: Semidünnschnitt, Toluidinblau-Safranin O.....	50
Abbildung 15:	TCP: Immunhistochemie CD68, Gegenfärbung mit Hämatoxylin.....	52
Abbildung 16:	TCP: Immunhistochemie CD68, Gegenfärbung mit Hämatoxylin.....	53
Abbildung 17:	TCP: Immunhistochemie CD68, Gegenfärbung mit Hämatoxylin.....	53
Abbildung 18:	TCP: Immunhistochemie CD44, Gegenfärbung mit Hämatoxylin.....	55
Abbildung 19:	TCP: Immunhistochemie CD44, Gegenfärbung mit Hämatoxylin.....	55
Abbildung 20:	TCP: Enzymhistochemie TRAP, Gegenfärbung mit Hämatoxylin.....	56
Abbildung 21:	TCP: Enzymhistochemie TRAP, Gegenfärbung mit Hämatoxylin.....	57
Abbildung 22:	TCP: Enzymhistochemie TRAP, Gegenfärbung mit Hämatoxylin.....	57
Abbildung 23:	CaP: Dünnschliff, Toluidinblau.....	59
Abbildung 24:	CaP: Paraffin-Schnitt, HE.....	60
Abbildung 25:	CaP: Paraffin-Schnitt, HE.....	61
Abbildung 26:	CaP: Paraffin-Schnitt, HE.....	62

Abbildung 27:	CaP: Semidünnschnitt, Toluidinblau-Safranin O.....	63
Abbildung 28:	CaP: Immunhistochemie CD68, Gegenfärbung mit Hämatoxylin.....	65
Abbildung 29:	CaP: Immunhistochemie CD68, Gegenfärbung mit Hämatoxylin.....	66
Abbildung 30:	CaP: Immunhistochemie CD68, Gegenfärbung mit Hämatoxylin.....	66
Abbildung 31:	CaP: Immunhistochemie CD44, Gegenfärbung mit Hämatoxylin.....	67
Abbildung 32:	CaP: Immunhistochemie Doppelinkubation CD68 + CD44, Gegenfärbung mit Hämatoxylin.....	68
Abbildung 33:	CaP: Enzymhistochemie TRAP, Gegenfärbung Hämatoxylin.....	69
Abbildung 34:	CaP: Enzymhistochemie TRAP, Gegenfärbung Hämatoxylin.....	70
Abbildung 35:	CaP: Enzymhistochemie TRAP, Gegenfärbung Hämatoxylin.....	71
Abbildung 36:	CaP-PS: Dünnschliff, Toluidinblau.....	73
Abbildung 37:	CaP-PS: Paraffin-Schnitt, HE.....	74
Abbildung 38:	CaP-PS: Semi-Dünnschnitt, Toluidinblau-Safranin O.....	76
Abbildung 39:	CaP-PS: Semi-Dünnschnitt, Toluidinblau-Safranin O.....	77
Abbildung 40:	CaP-PS: Semi-Dünnschnitt, Toluidinblau-Safranin O.....	77
Abbildung 41:	CaP-PS: Dünnschliff (T9100), HE.....	78
Abbildung 42:	CaP-PS: Immunhistochemie CD68, Gegenfärbung mit Hämatoxylin.....	79
Abbildung 43:	CaP-PS: Immunhistochemie CD68, Gegenfärbung mit Hämatoxylin.....	79
Abbildung 44:	CaP-PS: Immunhistochemie CD44, Gegenfärbung mit Hämatoxylin.....	80
Abbildung 45:	CaP-PS: Enzymhistochemie TRAP, Gegenfärbung Hämatoxylin.....	81
Abbildung 46:	CaP-PS: Enzymhistochemie TRAP, Gegenfärbung Hämatoxylin.....	82
Abbildung 47:	Leerdefekt: Dünnschliff, Toluidinblau.....	84
Abbildung 48:	Leerdefekt: Paraffin-Schnitt, HE.....	85
Abbildung 49:	Leerdefekt: Immunhistochemie CD68, Gegenfärbung Hämatoxylin.....	86
Abbildung 50:	Leerdefekt: Immunhistochemie CD44, Gegenfärbung Hämatoxylin.....	87
Abbildung 51:	Leerdefekt: Immunhistochemie CD44, Gegenfärbung Hämatoxylin.....	87
Abbildung 52:	Leerdefekt: Enzymhistochemie TRAP, Gegenfärbung Hämatoxylin.....	88

**Tabellenverzeichnis**

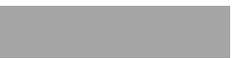
Tabelle 1:	Klassifikation von Knochenersatzmaterialien.....	10
Tabelle 2:	Markervergleich/-übersicht Osteoklast/Riesenzelle.....	28
Tabelle 3:	Entzündungszellen und deren räumliche Verteilungsmuster.....	93
Tabelle 4:	Defektfüllung, Ausmaß der Osteogenese und Fremdkörperreaktion.....	93

**Abkürzungsverzeichnis**

°C	Grad Celsius
µm	Mikrometer
µl	Mikroliter
Abb.	Abbildung
ABC	Avidin-Biotin-Complex
APAAP	Alkalische Phosphatase Anti-Alkalische Phosphatase
BDGF	<i>Bone derived Growth Factor</i>
bFGF	<i>basic Fibroblast Growth Factor</i>
BK	Bohrkante
BM	Bohrmehl
BMP	<i>Bone Morphogenetic Protein</i>
BPO	Dibenzoylperoxid
BSA	Bovines Serumalbumin
BSP	<i>Bone Sialoprotein</i>
ca.	circa
CaP	Calcium-Phosphat
CD	<i>Cluster of Differentiation</i>
Coll-I	Kollagen Typ I
CPC	Calciumphosphat-Zement
CTR	Calcitonin-Rezeptor
DAB	3,3'-Diaminobenzidin
DBM	Demineralisierte Knochenmatrix
DC-STAMP	<i>Dendritic Cell-Specific Transmembrane Protein</i>
DM	Defektmitte
DP	Defektperipherie
DZ	Defektzentrum
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure

FKRZ	Fremdkörperriesenzellen
g	Gramm
G-CSF	<i>Granulocyte-Colony stimulating Factor</i>
GM-CSF	<i>Granulocyte Macrophage-Colony Stimulating Factor</i>
h	Stunde
HA	Hydroxylapatit
HE	Hämatoxylin-Eosin
ICD	Intrazelluläre Domäne
IGF-1	<i>Insulin-like growth factor-1</i>
IgG	Immunglobulin G
IL	Interleukin
IP	Implantatpartikel
kg	Kilogramm
KL	Knochenlager
LK	Lagerknochen
M	Molar
mAK	monoklonaler Antikörper
mbar	Millibar
MCP-1	<i>Monocyte Chemoattractant Protein 1</i>
M-CSF	<i>Macrophage-Colony Stimulating Factor</i>
MFR	<i>Macrophage Fusion Receptor</i>
min	Minute
MIP-1 $\alpha$ /-1 $\beta$	<i>Macrophage Inflammatory Protein-1<math>\alpha</math>/1<math>\beta</math></i>
ml	Milliliter
mm	Millimeter
MPa	Megapascal
NF- $\kappa$ B	<i>Nuklear Factor-<math>\kappa</math>B</i>
OB	Osteoblasten

OI	Osteoid
OPG	Osteoprotegerin
OPN	Osteopontin
OZ	Osteozyten
PAP	Peroxidase-Antiperoxidase
PDGF	<i>Platelet Derived Growth Factor</i>
PF4	<i>Platelet Factor 4</i>
PFA	Paraformaldehyd
pHA	präzipitiertes Hydroxylapatit
p.i.	<i>post implantationem</i>
PS	Phosphoserin
PTH	Parathormon
RANK	<i>Receptor Activator of Nuklear Factor-<math>\kappa</math>B</i>
RANKL	<i>Receptor Activator of Nuklear Factor-<math>\kappa</math>B-Ligand</i>
RANTES	<i>Regulated upon Activation Normal T-cell Expressed and presumably Secreted</i>
RGD	Arginin-Glycin-Aspartat-Sequenz
SIRP $\alpha$	<i>Signal Regulatory Protein <math>\alpha</math></i>
s. o.	siehe oben
TBS	<i>Tris-Buffered Solution</i>
TCP	Tricalcium-Phosphat
TGF $\beta$	<i>Transforming Growth Factor <math>\beta</math></i>
TNF $\alpha$	<i>Tumor Necrosis Factor <math>\alpha</math></i>
TRAP	Tartrat-resistente saure Phosphatase
u. a.	unter anderem
vgl.	vergleiche
VNR	Vitronectin-Rezeptor
wt%	<i>weight percent</i>



## 1 Einführung

Knöcherner Defekte kritischer Größe, wie sie traumatisch, nach Tumor-Resektion, periprothetisch oder angeboren entstehen, können in der Regel nicht allein von umgebendem Lagerknochen durchbaut werden. Zur Therapie solcher Defekte werden heute verschiedene Materialien eingebracht, die der Auffüllung der Defekte bis zur knöchernen Konsolidierung dienen. Sie dürfen keine Toxizität, Kanzerogenität, Teratogenität aufweisen, keine systemischen, unerwünschten Wirkungen haben und sollten sich durch hohe, knochenspezifische Biokompatibilität und hohe Bioaktivität auszeichnen (Linhart et al., 2004). Das implantierte Material soll dem umgebenden Lagerknochen als Leitschiene dienen (Osteokonduktion) und idealerweise die Knochenneubildung induzieren (Osteoinduktion).

Zuverlässigkeit, Wirksamkeit, Verfügbarkeit und das Fehlen potenzieller Krankheitsübertragungen machen den autologen Knochenersatz zum „*golden standard*“ (St. John et al., 2003). Dabei muss jedoch in Kauf genommen werden, dass die autologen Knochenersatztherapien ernstzunehmende Nachteile mit sich bringen: Die Notwendigkeit eines Zweiteingriffs, die Morbidität an der Entnahmestelle und die eingeschränkte Verfügbarkeit.

Der allogene Knochenersatz birgt das Risiko der Übertragung von Infektionen und ist aufgrund des finanziellen und logistischen Aufwandes nur in großen Transplantations-Zentren oder vergleichbaren Einrichtungen mit Knochenbanken verfügbar.

An den xenogenen Transplantaten, die vorwiegend bovinen Ursprungs sind, müssen aufwendige Reinigungsverfahren vollzogen werden, um die Gefahr von potenziell auftretenden Immunreaktionen gegenüber dem speziefremden, antigen wirkenden Material zu umgehen (Chappard et al., 1993).

Daher rücken die synthetischen, darunter vor allem die Calciumphosphat (CaP)-basierten Knochenersatzstoffe, immer mehr in den Fokus des wissenschaftlichen und chirurgischen Interesses. Dies liegt nicht zuletzt an dem guten „*Handling*“ der diversen verfügbaren Applikationsformen (wie beispielsweise Pasten, Granulate, Blöcke), und der Zeit- (Operations-Dauer, Rekonvaleszenz, Anzahl der Eingriffe) und damit der Geld-Ersparnis (Horch und Pautke, 2006).

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, einen neu entwickelten, modifizierten Calcium-

Phosphat-Zement mit bereits etablierten Knochenersatzstoffen in der Frühphase *post implantationem (p.i.)* zu vergleichen. Hauptkriterium für die Beurteilung der Biokompatibilität war das Ausmaß der zu beobachtenden Fremdkörper- und Entzündungsreaktion. Zur Beurteilung der Gewebeverträglichkeit *in vivo* diente das Tibiakopf-Bohrloch-Modell an Schafen. Diese wurden nach 10 Tagen euthanasiert und der Tibiakopf wurde entnommen. Nach Explantation der Knochenersatzstoffe *in situ* soll durch die Histologie ein Überblick über den Gewebe-Zell-Material-Verband nach 10 Tagen *p.i.* gegeben werden. Anschließend folgt die genauere Charakterisierung der Zellen mithilfe immun- und enzymhistologischer Verfahren.

Die ermittelten Ergebnisse erlauben eine Beurteilung des Heilungs- und Entzündungszustandes sowie eine Prognose des weiteren Heilungsverlaufes und damit die Beurteilung der Biokompatibilität der verwendeten Knochenersatzstoffe.

## 2 Literaturübersicht

### 2.1 Knochenersatzmaterialien

Seit Nussbaum 1875 erstmals erfolgreich autologen Knochen aus der Ulna gewann, um einen knöchernen Defekt zu therapieren (Urist et al., 1994), haben sich die Kosten für autogenen und allogenen Knochenersatz in den Vereinigten Staaten von Amerika auf über 2,2 Milliarden US\$ jährlich gesteigert (Linhart und Briem, 2001). Nach Blut ist Knochen das zweithäufigste Transplantat mit mehr als 1,5 Millionen Transplantationen jährlich allein in den USA (Einhorn, 2003), in Deutschland wird die Zahl auf etwa 71000 autologe Transplantationen jährlich geschätzt (Jäger et al., 2005). Indikationen für diese Transplantationen ergeben sich bei knöchernen Defekten in der Unfallchirurgie, Orthopädie, Neurochirurgie, rekonstruktiven Chirurgie und Zahnmedizin. Erforderlich sind sie vor allem beim Auffüllen kaverner Defekte wie sie nach Tumor-Resektion oder bei Knochenzysten entstehen, aber auch bei der Behandlung von posttraumatischen Heilungs-Komplikationen des Skelettsystems nach Frakturen wie *delayed unions*, *malunions* und *nonunions*, Arthrodesen, Wirbelkörperfusionen und zur kraniofazialen Rekonstruktion zum Beispiel der Orbita (Block und Thorn, 2000).

#### 2.1.1 Autologer Knochenersatz

Im Hinblick auf Gewebeersatz durch Knochentransplantationen sind autologe Knochentransplantationen, betrachtet man die absoluten Mengen, in der Orthopädie und Traumatologie dominierend (Horch und Pautke, 2006). Unter der autologen Knochentransplantation versteht man die Übertragung von körpereigenem Knochen. Dabei erfolgt die Entnahme von spongiösem Knochen meist am hinteren Beckenkamm aber auch am vorderen Beckenkamm, Tibiakopf, distalen Radius oder am Olekranon. Nach St. John et al. (2003) machen Zuverlässigkeit, Verfügbarkeit, Wirksamkeit und das Fehlen von potenziellen Krankheitsübertragungen den autologen Knochen zum „*golden standard*“. Er ist von höchster biologischer Wertigkeit und weist die drei Haupteigenschaften auf, die zu solider Knochenheilung führen: Osteokonduktion, Osteoinduktion und Osteogenität (Bloemers et al., 2003).

Osteokonduktion bedeutet ein durch Anwesenheit eines Knochenersatzstoffes und dessen Eigenschaften verursachtes, räumlich gerichtetes Einwachsen von Lager-

knochen in den Defekt (Albrektson und Johannsson, 2001; Bauer, 2007b). Es beschreibt den sogenannten „Leitschieneneffekt“. Unter Osteoinduktion wird die induzierende Wirkung von Wachstumsfaktoren wie *bone morphogenetic protein* (BMP), *basic fibroblast growth factor* (bFGF), *transforming growth factor- $\beta$*  (TGF- $\beta$ ) oder *Insulin-like growth factor-1* (IGF-1) auf Zellen zur Knochenneubildung verstanden (Aspenberg und Lohmander, 1989; Lind, 1996; Albrektsson und Johannsson, 2001; Schieker et al., 2008). Osteogene Zellen sind wenig ausdifferenzierte Vorläuferzellen aus dem Knochenmark, die bei entsprechender Stimulation zu knochenbildenden Zellen ausreifen können (Bauer, 2007b; Schieker et al., 2008).

Nach Horch und Pautke (2006) muss weiterhin, je nach Art des Knochens, zwischen verschiedenen Qualitäten des Knochentransfers unterschieden werden:

Spongiosa ist aufgrund ihrer interkonnektiven Porosität osteokonduktiv und der in der Knochenmatrix enthaltenen Wachstumsfaktoren osteoinduktiv. Die meisten der transplantierten Zellen sterben zwar ab, doch die überlebenden Vorläuferzellen weisen, wenn sie dem vaskularisierten Lagerknochen anliegen, eine lokale osteogene Potenz auf (Merten et al., 2003). Allerdings schwindet diese osteogene Potenz mit zunehmendem Lebensalter des Patienten: ist das Verhältnis von adulten Stammzellen zur Gesamtzellzahl im Knochenmark beim Neonaten noch bei 1:10.000 sinkt es bei einem 80jährigen Menschen auf ein Verhältnis von 1:2.000.000 (Horch und Pauke, 2006). Ferner besitzt ein rein spongiöses Implantat nur eine geringe Festigkeit und ist starker osteoklastärer Resorption unterworfen, was seine funktionelle Qualität mindert.

Im Gegensatz dazu besitzt kortikaler Knochen nur sehr begrenzt osteokonduktive Eigenschaften, da nur die Havers'schen und Volkmann'schen Kanäle als Leitschiene dienen können. Im Vergleich zur Spongiosa sind in der Kortikalis deutlich weniger (25%) osteogene Zellen nachweisbar (Merten et al., 2003), die transplantierten Osteozyten sterben nicht zuletzt aufgrund der verzögerten Revaskularisierung ab, der transplantierte Knochen wird nekrotisch.

Während der Knochenaufbauphase verhalten sich Kortikalis und Spongiosa anti-proportional zueinander: Während die Sponigosa durch die Osteokonduktivität zunehmend an Stabilität gewinnt, verliert die Kortikalis im Laufe der Zeit durch die Resorptionsvorgänge an Stabilität (Burchardt, 1983). Aufgrund dieser Eigenschaften

werden meist keine reinen kortikalen sondern vielmehr kortikospongiöse Knochen-  
transplantate verwendet.

Alternativ werden vaskularisierte Knochentransplantate verwendet, die in der Ein-  
heilungsphase weder einer ischämischen Nekrose noch einer Immunabwehrreaktion  
unterliegen. Hierbei ist eine Überlebensrate der Zellen von ca. 90% zu erwarten.  
Dies ist vor allem abhängig von adäquater Anastomosierung, der Gefäßversorgung  
des Zielgebietes sowie der mechanischen Stabilität des Transplantats im Lager  
(Horch und Pautke, 2006).

Dennoch gibt es auch ernstzunehmende Nachteile, wegen derer die Transplantation  
von autologem Knochen zunehmend kritischer betrachtet wird. Zu diesen gehören:

- Begrenzte Verfügbarkeit
- Die Notwendigkeit eines Zweiteingriffs
- Postoperative, persistierende Schmerzen an der Entnahmestelle
- Neurovaskuläre Verletzungen
- Kosmetische Deformierungen, störende Narbenbildung, Keloide
- Revisionsbedürftige Hämatome / Serome
- Revisionsbedürftige, tiefe Infektionen
- Frakturen am Beckenkamm,
- Gang-/ Bewegungsstörungen
- Instabilität im Iliosakral-Gelenk, Verletzung der Iliosakralfuge
- Heterotrope Ossifikationen
- Herniation von Abdominalorganen
- Paralytischer Ileus
- Harnleiterverletzungen ( sehr selten )

Diese von verschiedenen Autoren (Kurz et al., 1987; Banwart et al., 1995; Arrington  
et al., 1996; Wippermann et al., 1997; Ebraheim et al., 2001; Niedhart et al., 2003;  
Jäger et al., 2005) übereinstimmend erwähnten Komplikationen verdeutlichen die  
zunehmende Notwendigkeit der Erforschung und Etablierung alternativer Verfahren  
zum Knochenersatz. Niedhart et al. (2003) kommen zu dem Schluss, dass aufgrund  
der höheren Komplikationsrate bei der Entnahme am ventralen Beckenkamm im  
Vergleich zum dorsalen Beckenkamm dieses Vorgehen gut indiziert sein muss, und  
nicht zuletzt aufgrund einer um 28 Minuten verlängerten Operationszeit und damit

auch aus wirtschaftlichen Gründen synthetische Knochenersatzstoffe in Erwägung gezogen werden müssen. Die Kosten für eine Spongiosaentnahme aus dem Beckenkamm belaufen sich auf ca. 750 €/h, kalkuliert ohne prä- und postoperative Kosten (Horch und Pautke, 2006).

### **2.1.2 Allogener Knochenersatz**

Die am weitesten verbreitete Alternative zu autogenen Knochenplastiken sind allogene Knochentransplantate. Sie stellen für den Chirurgen die Methode der zweiten Wahl dar (Giannoudis et al., 2005). Unter der allogenen Transplantation ist die Übertragung von Gewebe eines genetisch nicht identischen Spenders der gleichen Art auf den Empfänger zu verstehen. Zum ersten Mal erfolgreich wurde die allogene Knochenzelltransplantation 1881 durchgeführt, als mit Teilen einer humanen Tibia ein Humerus-Defekt kuriert wurde (MacEwan, 1881). Die Verwendung von allogenen Knochen stieg in den letzten zehn Jahren um das Fünzfach und macht ein Drittel der Knochentransplantationen in den USA aus (Boyce et al., 1999). Allogener Knochen verfügt über ähnlich günstige biologische Eigenschaften wie autologe Knochenplastiken, wobei die Fähigkeit zur Osteokonduktion überwiegt (Bauer und Muschler, 2000; Flören et al., 2007). Die Verwendung von allogenen Knochentransplantaten, deren Haltbarkeit meist durch unterschiedliche Konservierungsverfahren, insbesondere der Kryokonservierung, gewährleistet wird, weist Nachteile auf, die das Risiko einer potenziellen Übertragung infektiöser Erkrankungen (Günther et al., 1998) und die Antigenität betreffen. Immunologische Reaktionen vermindern die Knochenneubildung und führen häufig zur Abstoßung des Transplantats. Durch bakterielle Kontamination der Transplantate, aber auch durch beim Spender bestehende Infektionskrankheiten wie Hepatitis oder gar HIV/AIDS ist der Empfänger einer nicht unerheblichen Gefahr von Infektionen ausgesetzt. Um das Infektionsrisiko zu minimieren, ist ein immenser Aufwand bezüglich Spenderselektion und Knochenbankmanagement notwendig. (Stünzle et al., 1998). Die Richtlinien für diese Verfahren sind streng festgelegt und wurden 2001 von der Bundesärztekammer im deutschen Ärzteblatt ausgegeben: Durch die hier definierten Ausschlusskriterien muss ein großer Teil (>40%) von dem gespendeten Material ausgeschlossen werden (Flören et al., 2007). Inzwischen sind auch von dem EU-Parlament und dem europäischen Rat die Richtlinien 2004/23/EG und 2006/17/EG verabschiedet worden, welche in nationales Recht überführt wurden

und die Voraussetzungen zum Betreiben einer Knochenbank in Deutschland neu definieren und erstmals gesetzlich verankern (Flören et al., 2007).

Alternativ zur Kryokonservierung besteht die Möglichkeit einer Sterilisation von Knochentransplantaten durch chemische Maßnahmen, ionisierende Strahlen oder thermische Behandlung. Diese Verfahren können jedoch in unterschiedlichem Ausmaß biologische bzw. biomechanische Eigenschaften von Transplantaten schwächen (Günther et al. 1998).

Von weiteren erheblichen klinisch-praktischen Nachteilen berichten Moore und Mitarbeiter (2001): Abhängig von der Größe des verwendeten Allografts wird von bis zu 10% bakteriellen Infektionen berichtet, außerdem von Frakturierungen des Allografts *in situ* von 19% und radiologischen *non-unions* von 17%.

Inzwischen ist die Verwendung von allogenen Materialien nur noch großen, überregionalen Prothese-Zentren vorbehalten, da kleinere Einheiten die finanziellen und logistischen Aufwendungen, die heute zum gesetzeskonformen Führen einer Knochenbank notwendig sind, nicht erbringen können (Linhart et al., 2004).

Eine Alternative zu den Allografts ist die demineralisierte Knochenmatrix (DBM), ein Erzeugnis aus allogenem Knochen. Das Knochenmaterial wird mit entsprechenden Lösungsmitteln behandelt, gegebenenfalls zusätzlich bestrahlt, wodurch es an Infektiosität verliert, ein Restrisiko existiert jedoch. Die osteokonduktiven und -induktiven Eigenschaften sollen aber erhalten bleiben (Flören et al., 2007), weil die Wachstumsfaktoren nicht vollständig zerstört werden und durch den Vorgang der Demineralisation besser bioverfügbar bleiben (Giannoudis et al, 2005). In der Praxis wird DBM oft in Verbindung mit gemörsertem autogenen oder allogenen Knochen, gegebenenfalls auch mit synthetischem Knochenersatzmaterial in Granulat-Form appliziert (Bauer, 2007a), und wird so vorwiegend als Knochenersatz-Expander denn als eigenständiger Knochenersatz eingesetzt. (Giannoudis et al., 2005).

### **2.1.3 Xenograft**

Unter Xenograft versteht man Knochengewebe, das einer Spezies entnommen wurde, um es einer anderen Spezies zu implantieren (Bauer und Muschler, 2000). Verwendung finden in der Regel Xenografts bovinen Ursprungs, es sind aber auch solche korallinen Ursprungs auf dem Markt verfügbar. Unbehandelte Xenograft-

Präparate sind obsolet, weil sie eine immense Immun-Reaktion auslösen. Entfettet und deproteiniert man die Xenografts durch intensive Aufbereitungsverfahren, dann treten keine Abwehrreaktionen auf, jedoch zerstört man so auch die erwünschten osteoinduktiven Matrix-Proteine (Bauer und Muschler, 2000), es bleibt allerdings die charakteristische Struktur des Knochens weitestgehend bestehen (Chappard et al., 1993).

Xenografts bestehen aus einer anorganischen Apatitmatrix und einer organischen Kollagenphase mit einem Anteil von 20-30% und werden als Formkörper, Granulate oder Pulver vertrieben. Aufgrund des knochentypischen interkonnektierenden Porensystems weisen sie sehr gute osteokonduktive Eigenschaften auf und bieten ausgezeichnete Eigenschaften für eine Osseointegration. Sterilisiert werden diese Materialien in der Regel durch  $\gamma$ -Strahlen (Schnürer et al., 2003). Im Raum steht noch die Frage, inwiefern Viren und Prionen durch Xenotransplantate auf Empfänger übertragen werden können.

#### **2.1.4 Knochenersatzstoffe**

Ist man sich über die oben erwähnte Vielzahl an Risikofaktoren des autogenen, allogenen und xenogenen Knochenersatzes bewusst, so ist es nicht verwunderlich, dass Forscher der ganzen Welt seit Jahrzehnten nach möglichen Alternativen suchen, und sich bemühen Knochenersatzstoffe zu generieren, die den Anforderungen der modernen Medizin gerecht werden. Dies bedeutet, dass mit der Implantation von Knochenersatzstoffen mehr erreicht werden soll als der bloße Ersatz von körpereigenem Gewebe durch ein Implantat: Es muss nach Auffassung von Rueger (1998) angestrebt werden, die Knochenheilung im Bezug auf

- die Menge,
- die Qualität des neugebildeten Knochens, und
- die Zeiteinheit, in der die Knochenneubildung und -heilung stattfinden positiv zu beeinflussen beziehungsweise zu beschleunigen und
- gleichzeitig ein mechanisch besser belastbares Implantat, als es das autogene knöcherne Transplantat repräsentiert, zu entwickeln.

Voraussetzung dafür sind neben der erforderlichen Biokompatibilität, also der absoluten Gewebeverträglichkeit und dem Ausbleiben von Abstoßungsreaktionen (Schnürer et al., 2003), die erwähnten Eigenschaften der Osteokonduktivität,

Osteoinduktion und Osteogenität. Hinzu kommen klinische und ökonomische Aspekte: Die Sterilisation, Lagerung und intraoperative Lagerung müssen einfach, die Applikation sicher und reproduzierbar möglich sein. Sollte es gelingen ein Ersatzmaterial zu entwickeln, welches alle geforderten Eigenschaften aufweist und somit den „golden standard“ ersetzen kann, so wird dies auch auf jeden Fall kostengünstiger sein (Linhart et al., 2004). Bisher konnte jedoch noch kein Knochenersatz entwickelt werden, der *in situ* alle wünschenswerten Eigenschaften besitzt. So weiß man, dass synthetische Knochenersatzstoffe einen osteo-konduktiven Leitschienen-Effekt aufweisen (Moore et al., 2001), während Extrakte der Knochenmatrix wie zum Beispiel Wachstumsfaktoren osteoinduktiv wirken. Daher wird an den verschiedensten Kombinationen unterschiedlicher Biomaterialien geforscht, was eine wünschenswerte Klassifizierung erschwert.

Weil nach der Auffassung von Rueger (1992) eine Klassifikation nach chemischen Eigenschaften, Wirkmechanismus oder Indikationsstellung aufgrund der Heterogenität der Materialien nicht möglich ist, klassifiziert er nach Ausgangsverbindungen bzw. ihrer Herstellungsverfahren in

- I. biologisch, organische Substanzen
- II. synthetische, anorganische Materialien
- III. synthetische, organische Verbindungen
- IV. Komposite

Diese Einteilung wurde von seinen Mitarbeitern (Linhart et al., 2004) modifiziert (Tabelle 1). Weil die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Knochenersatzstoffe den Klassen Ia und b sowie III zuzuordnen sind und diese nachfolgend genauer beschrieben werden, wird zunächst ein kurzer Überblick über die übrigen Klassen gegeben:

Unter die Klasse Ic (vgl. Tabelle 1) fallen neben metallischen Implantaten unter anderem die Biogläser, die durch Erhitzung von sauren Oxiden (z.B: Phosphorpentoxid, Siliciumoxid, Aluminiumoxid) mit basischen Oxiden wie Calciumoxid, Natriumoxid, Zinkoxid etc. hergestellt werden. Für den Schmelzprozess sind Temperaturen von ca. 1500°C nötig. Gläser können als kompaktes oder poröses Material vorliegen (abhängig von dem Herstellungsprozess) und sind als Pulver oder Formkörper erhältlich. Werden die Gläser implantiert, so kommt es zu

Ionenaustausch-Reaktionen mit dem umliegenden Milieu: Calcium- und Natrium-Ionen wandern aus und werden durch Oxonium-Ionen ersetzt. Diese Bioaktivität der Oberfläche ermöglicht ein Anwachsen von vitalem Gewebe an die Glasoberfläche.

Klassifikation von Knochenersatzmaterialien	
Klasse	Material
I	Anorganische Knochenersatzmaterialien a) Keramiken ( HA, $\beta$ -TCP ) b) Zemente ( CPC ) c) Metalle, Biogläser
II	Organische Knochenersatzmaterialien a) biologischer Ursprung (Knochenmatrix (mineralisiert/entmineralisiert), Wachstumsfaktoren, nicht knochenspezifische Faktoren) b) synthetischer Ursprung (Polymere)
III	Komposite

**Tabelle 1:** mod. nach Linhart et al., 2004: Klassifikation von Knochenersatzmaterialien

Der Klasse IIa (vgl. Tabelle 1) zugehörig sind Knochenmatrix-Präparate, die mineralisiert oder demineralisiert vorliegen können, aber auch knochenspezifische und -unspezifische Wachstumsfaktoren. Eine weitere Methode ist die autologe Knochenzelltransplantation („self cell therapy“) in Kombination mit einem Kollagen-Vlies als tragende Matrix, wie sie von Schneider (1998) beschrieben wurde. Hierbei wurde eine definierte Anzahl von Knochenzellen angezchtet, auf das Vlies aufgebracht und in einen standardisierten Femurdefekt bei Merinoschafen eingebracht. Da Kollagen allein keinerlei Belastung standhält, wird es in der Regel als Komposit (Klasse III) in Verbindung mit anderen Materialien wie zum Beispiel Keramiken verwendet.

Zur Klasse IIb (vgl. Tabelle 1) werden zum Beispiel die Polymere gerechnet, die aber aufgrund ihres Entwicklungsstandes noch nicht praxisrelevant sind.

Unter Kompositen der Klasse III (vgl. Tabelle 1) versteht man ein fast unüberblickbares Feld an Knochenersatzstoffen, das durch die Kombination der Materialien der Klassen I und II in allen Variationen repräsentiert wird.

Betrachtet man nun die Klassen Ia und Ib (vgl. Tabelle 1), so muss folgendes vorher vergegenwärtigt werden: Der Idee, Knochen durch Calciumphosphate (CaP) zu ersetzen, liegt die Erkenntnis zugrunde, dass die Mineralphase des Knochens (sie macht 60-70% des lebenden Knochens aus) vor allem aus Calcium, Orthophosphat und Karbonat besteht. Dieses Karbonat-haltige Kalziumphosphatapatit wird „Dahlite“ genannt. Es enthält 4-6% Karbonat und kleinere Mengen Magnesium und Natrium, die auch eine entscheidende Rolle spielen: sie beeinflussen die Löslichkeit der apatischen Mineralphasen erheblich. Hydroxalapatit (HA) –  $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$  – ist der Prototyp des ausgereiften Knochenminerals, kommt aber in Reinform nicht vor, sondern ist ein mit Karbonat- und Wasserstoff angereichertes, biologisch präzipitiertes Apatit-Analogon, in dem Kalziumionen partiell durch Eisen-, Magnesium- und Bleiionen ersetzt sind (Anderson, 1978). Das Calcium-Phosphor (Ca-P)-Verhältnis liegt bei etwa 1,6. Dieses Verhältnis versucht man mit CaP-basierten Knochenersatzstoffen nachzuahmen.

Seit den 70er Jahren des letzten Jahrhunderts werden der Klasse Ia (vgl. Tabelle 1) angehörende HA-Keramiken eingesetzt, die dem biologischen HA sehr ähnlich sind und ein Ca-P Verhältnis von 1,67 aufweisen. Sie sind nicht oder nur langsam biologisch abbaubar und werden aus bovinem Knochen, dem Exoskelett von Korallen (Holmes et al., 1984; Pool, 1995) oder aus synthetischen Ausgangsstoffen gewonnen. Entscheidend für den osteokonduktiven Effekt der Keramiken ist ihr Porensystem. Während solche, die biologischen Ursprungs sind, immer ein Gefüge aus Makro- (>100µm) und Mikroporen aufweisen, muss das interkonnektierende Porengefüge bei Keramiken, die aus pulverförmigen Ausgangsstoffen durch Sinterung hergestellt werden, über spezielle Herstellungsverfahren sichergestellt werden (Schnürer et al., 2003). Dies ist von enormer Bedeutung, da nur Poren, die eine Mindestdurchmesser von 80-100µm haben, von Gewebe und Zellen erschlossen werden und somit als Leitschiene dienen können (Gauthier et al., 1998). Draenert et al. (2001) konnten zeigen, dass ein knöchernes Erschließen auch durch Poren von weniger als 50µm möglich ist. Die Mikroporen ermöglichen die Diffusion von Nährstoffen (Bauer, 2007a) und sind damit für die Mehrzahl der Autoren vorwiegend von nutritiver Bedeutung für die Zellen.

Synthetische Keramiken zeichnen sich gegenüber solchen biologischen Ursprungs dadurch aus, dass sie mit genau definierbaren physio- und kristallochemischen

Eigenschaften herstellbar sind, eine gleich bleibende Chargenqualität besitzen und so eine besser abschätzbare biologische Reaktionsweise ermöglichen. Darüber hinaus sind sie atoxisch, biologisch inert und weder kanzerogen noch teratogen (Horch et al., 2004). Aufgrund der langsamen Biodegradationsrate der HA-Keramiken rücken die Tricalciumphosphat (TCP)-Keramiken mit einem Ca-P-Verhältnis von 1,5 immer mehr in den Focus des wissenschaftlichen und chirurgischen Interesses. Auch sie werden durch ein Sinterungsverfahren hergestellt, wobei die verwendete Temperatur über die kristalline Struktur entscheidet, also über  $\alpha$ - oder  $\beta$ -TCP, welche ein unterschiedliches Lösungsverhalten zeigen (Schnürer et al., 2003). Die Hochtemperatur-Modifikation  $\alpha$ -TCP entsteht bei Temperaturen über 1125°C,  $\beta$ -TCP bildet sich als Niedertemperatur-Modifikation unterhalb von 1125°C und ist im Gegensatz zu  $\alpha$ -TCP bei Raumtemperatur stabil (Dorozhkin und Epple, 2002).  $\alpha$ -TCP ist eine Zehnerpotenz löslicher als  $\beta$ -TCP (Vereecken und Lemaître, 1990). Nach Merten et al. (2000) und Wiltfang et al. (2002) sind beide Modifikationen geeignet zum Knochenaufbau, wobei  $\beta$ -TCP durch feinere Mikroarchitektur und höhere Porosität und damit einer größeren Oberfläche einem beschleunigten Abbau unterliegt und eine optimale Gewebeverträglichkeit aufweist. TCP ist vor allem als  $\beta$ -Modifikation erhältlich und wird als Block oder Granulat verarbeitet.

Die ersten zu der Klasse Ib (vgl. Tabelle 1) gehörigen resorbierbaren CaP-Zemente (*calcium phosphate cements*, CPC) wurden in den 80er Jahren des letzten Jahrhunderts im „Pfaffenburger Research Center of the American Dental Association Health Foundation“ von Brown und Chow entwickelt (1985). Hintergrund dafür war das Verlangen nach einem *in situ* formbaren, biokompatiblen Knochenersatzstoff. Heute sind die Ansprüche an die Zemente deutlich gewachsen. Hillmeier et al. (2004) formulierten für minimal-invasive Wirbelsäulen Chirurgie folgende Anforderungen:

- Injizierbarkeit
- Schnelle Aushärtung und ausreichende Primärstabilität
- Bioaktivität mit knöcherner Integration und langsamer Ersatz des Zements durch neugebildeten Knochen und
- Ausreichende Röntgenkontrastgebung zur intraoperativen Kontrolle.

Bajammal et al. (2008) resümieren, dass nach Frakturversorgung unter Verwendung von CPC die Schmerzhaftigkeit im Frakturbereich reduziert ist verglichen mit

Patienten, bei denen kein Knochenersatz zum Einsatz kam. Darüber hinaus wurde ein verminderter Verlust der Fraktur-Reduktion gegenüber der Verwendung von autologem Knochenersatz festgestellt (Welch et al., 2003).

Die heute verfügbaren Zemente sind in der Regel Zwei- oder Dreikomponenten-Systeme bestehend aus ein oder zwei Pulverkomponenten und einer wässrigen Lösung. Durch Anmischen der Komponenten entsteht eine formbare Paste, die per Hand oder mittels einer Spritze appliziert werden kann. An ihrem Bestimmungsort härtet die Paste durch Sedimentation zu einer CaP-Verbindung aus bzw. bindet ab (Claes et al., 1997; Chow, 2001). Diese Abbindungs- bzw. Härtungsreaktion ist eine Kombination aus temperaturabhängigen Lösungs- und Fällungsprozessen (Fernandez et al., 1999a,b). Als Setzprodukte können entstehen:

- Dicalciumphosphat-Dihydrat:  $\text{CaHPO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$ ,
- Octacalciumphosphat:  $\text{Ca}_8(\text{HPO}_4)_2(\text{PO}_4)_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ,
- amorphes Calciumphosphat:  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ,
- calciumdefizitärer Apatit:  $\text{Ca}_9(\text{HPO}_4)(\text{PO}_4)_5\text{OH}$ ,
- Hydroxylapatit:  $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{OH}$ .

Endprodukt aller kommerziell hergestellter CPC ist gefälltes Hydroxylapatit (Bone Source<sup>®</sup>, Cementek<sup>®</sup>, Biobon<sup>®</sup>, Biopex<sup>®</sup>, Mimix<sup>®</sup>) oder karbonathaltiges gefälltes Hydroxylapatit (Norian SRS<sup>®</sup> und CRS<sup>®</sup>, Calcibon<sup>®</sup>). Nach dem Aushärten liegen die Hauptunterschiede zwischen den einzelnen Zementen (Bohner, 2001) in

- dem Ca-P-Verhältnis
- den Verunreinigungen (d.h. Karbonat-Gruppen z.B. bei Calcibon<sup>®</sup>)
- der Porösität
- der Kristallgröße.

Um diese Knochenzemente weiter zu verbessern, vor allem hinsichtlich der Geschwindigkeit des Remodelings, wurden sie mit Hilfe von Kollagenen oder Knochen-Matrix-Proteinen nicht kollagenen Ursprungs wie zum Beispiel Osteocalcin, Ostopontin (OPN), Bone Sialoprotein (BSP) oder mittels Wachstumsfaktoren wie BMP modifiziert. Von diesen nach Linhart et al. (2004) in die Klasse der Komposite einzustufenden Werkstoffen konnte gezeigt werden, dass sie die Aktivität der Knochenzellen deutlich stimulieren und es zu einer verbesserten Knochenheilung kommt. Außerdem wirken sie sich aufgrund ihrer spezifischen Peptid-Sequenzen und

funktionellen Gruppen positiv auf die Ausbildung einer dem Knochen morphologisch sehr ähnlichen HA-Struktur aus. Weil aber die Verfügbarkeit von Spezies-spezifischen Proteinen begrenzt ist und demzufolge auch die Kosten für ausreichende Mengen sehr hoch sind (Schneiders et al., 2007), ist man dazu übergegangen, die übereinstimmenden funktionellen Sequenzen verschiedener Proteine den Knochenersatzmaterialien zuzusetzen, um so die Interaktion mit Zellen und Gewebe zu verbessern.

Vor dem Hintergrund, dass Matrix-Proteine wie BSP oder OPN phosphorylierte Serin-Reste enthalten und diese die spezifische Interaktion des Proteins mit der anorganischen Knochenmatrix HA vermitteln (Ganss et al. 1999; Sodek et al., 1999), wurde einem der in der vorliegenden Arbeit untersuchten Knochenersatzstoffe Phosphoserin (PS) zugesetzt. Reinstorf et al. beschrieben 2004 erstmals diesen Ansatz. In ihrer Arbeit konnten sie nach Zusatz von 25mg/g PS zu einem Komposit, bestehend aus dem bei Gruppe III eingesetzten Zement und Kollagen Typ I (Coll-I), zeigen, dass sich durch die Zusatz von PS die Mikrostruktur des Zementes hin zu kleineren Kristallen mit verbesserten biomechanischen Eigenschaften verändert hat, dass das Löslichkeitsverhalten des Zementes zum Positiven verändert wurde, und dass Zellen (Osteoblasten) *in vitro* eine gute Lebensfähigkeit und eine gesteigerte Proliferation auf dem modifizierten Zement aufweisen. Basierend auf diesen Erkenntnissen beschrieb Mai (2008), dass die Applikation dieses Komposites in Defekte kritischer Größe im Unterkiefer von Minipigs in einer besonders eindrucksvollen Beschleunigung der Zement-Resorption und der Defekt-Regeneration resultiert.

## 2.2 Fremdkörperreaktion

Der Implantation von Knochenersatzmaterialien geht immer eine Verletzung von Gewebe voraus (Abb. 1). Diese Verletzung bedeutet zunächst eine Störung der zellulären und humoralen Homöostase im Knochen, die Reaktion des Körpers darauf führt nachfolgend zur Knochenheilung.

Die Antwort auf eine Verletzung ist abhängig von vielen Faktoren, unter anderem dem Ausmaß der Verletzung, der Blut-Material-Interaktionen, der Bildung einer provisorischen Matrix, dem Ausmaß zellulärer Nekrosen und dem Grad der Entzündungsreaktion. Die Fremdkörperreaktion ist dabei die Endstufe der ent-

zündlichen Reaktion und Gewebeheilung (Anderson et al., 2008).

All diese in die Gewebeheilung implementierten Faktoren entscheiden über das konsekutive Ausmaß der Granulationsgewebebildung, der Fremdkörperreaktion und der Kapselbildung. Die Einschätzung der Fremdkörperreaktion in der Frühphase *post implantationem (p.i.)* ist daher wichtig, da sie ein Maß für die Biokompatibilität und damit für die Osseointegration und Langzeitstabilität des Werkstoffes ist.

### **Provisorische Matrix**

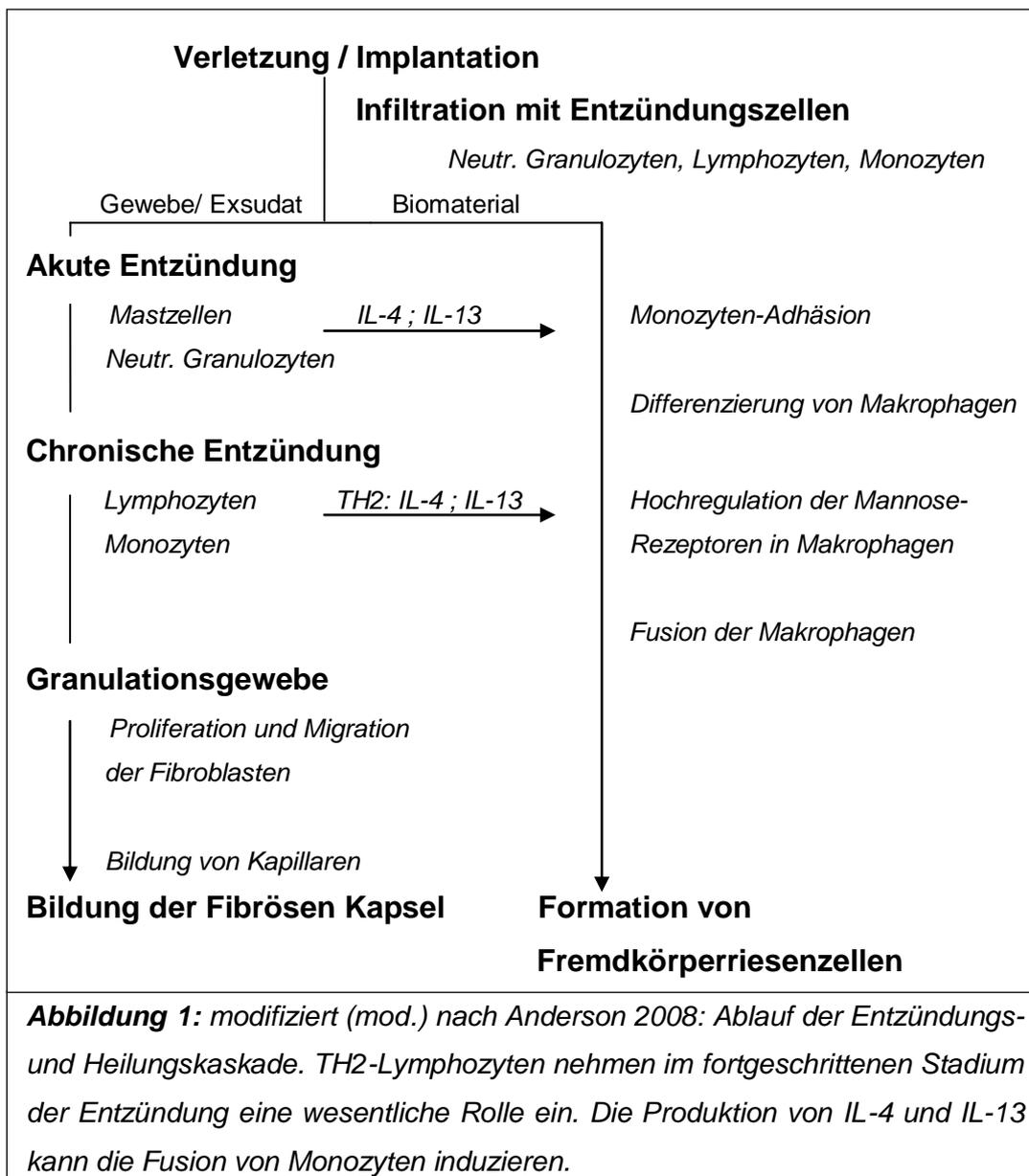
Unmittelbar nach der Implantation finden Blut-Material-Interaktionen statt, die zunächst die Protein-Adsorption auf der Material-Oberfläche und die Ausbildung einer provisorischen Matrix beinhalten. Diese vorübergehende provisorische Matrix ist das Fibrin-dominierte Blutgerinnsel am Implantat-Interface, welches sich durch Aktivierung des extrinsischen und intrinsischen Koagulationssystems, des Komplement-Systems, des fibrinolytischen Systems und des Kinin-generierenden Systems sowie der Thrombozyten ausbildet (Anderson et al., 2008). Das Bestehen der provisorischen Matrix ist eng verbunden mit dem dynamischen System der Protein-Adsoption und -Desorption entlang der Implantatoberflächen, bekannt als Vroman-Effekt (Horbett, 2004). Typ, Konformation und Konzentration dieser Proteine sind dabei abhängig von den Oberflächeneigenschaften des Materials (Wilson et al., 2005).

Zu solchen Proteinen zählen Albumin, Fibrinogen, Komplement, Fibronectin, Vitronectin und  $\gamma$ -Globulin. Die Interaktionen dieser Proteine mit zellulären Adhäsionsrezeptoren sind Grundlage des an der Implantatoberfläche vorherrschenden zellulären Erkennungssystems (Anderson et al., 2008).

Die provisorische Matrix liefert strukturelle, biochemische und zelluläre Komponenten der Wundheilung und Fremdkörperreaktion. Die Anwesenheit von Mitogenen, Chemokinen, Cytokinen, Wachstumsfaktoren und anderen bioaktiven Substanzen sorgt für ein Milieu reich an aktivierenden und hemmenden Substanzen, das die Aktivität von Makrophagen aber auch von anderen Zell-Populationen moduliert. Die provisorische Matrix kann als natürliches, abbaubares, ständig bioaktive Substanzen freisetzendes System angesehen werden, welches die nachfolgenden Phasen der Defektheilung fein abgestuft reguliert (Anderson et al., 2008).

## Akute Entzündung

Nach der Bildung der vorübergehenden Matrix dominiert die akute Entzündung, die durch das gehäufte Auftreten von neutrophilen Granulozyten gekennzeichnet ist.

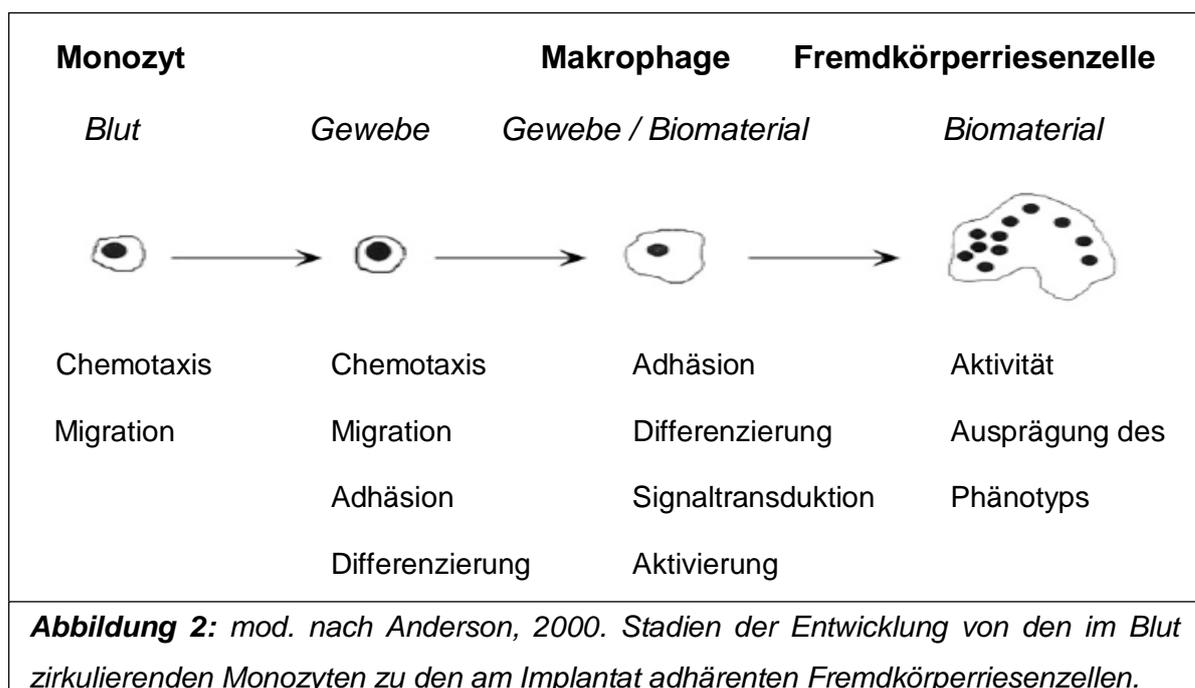


Diese besitzen ebenfalls Rezeptoren, mit Hilfe derer sie an Biomaterial-assoziierte Opsonine wie Immunglobulin G (IgG) oder das Komplement-Fragment C3b binden können (Anderson, 2001). Aufgrund der Divergenz zwischen Werkstoff- und Granulozytenoberfläche kommt es zu einer „frustrated phagozytosis“ (Henson, 1971a/b, 1980). Hierbei wird nach der Erkennung und Anlagerung des zu phagozytierenden Materials nicht internalisiert, sondern es werden durch Extrusion

oder Exozytose lytische Enzyme in den Extrazellulärraum freigesetzt, um den Fremdkörper abzubauen (Anderson, 2001). Die Mastzell-Degranulation und die damit einhergehende Histamin-Freisetzung und Fibrinogen-Adsorption ist ebenfalls typisch für akute Entzündungsreaktionen auf implantierte Biomaterialien (Tang et al., 1998; Zdolsek et al., 2007). Histamin vermittelt in diesem Zusammenhang die Rekrutierung von Phagozyten, adsorbiertes Fibrinogen deren nachfolgende Adhäsion an das Implantat. Die bei der Mastzell-Degranulation freigesetzten Interleukine IL-4 und IL-13 sind wesentlich am Ausmaß der Fremdkörperreaktion beteiligt, weil sie die Makrophagen alternativ aktivieren, eine Grundvoraussetzung für deren spätere Fusionsbereitschaft. Die akute Phase der Entzündung ist in der Regel recht schnell, meist innerhalb einer Woche, abgeklungen, abhängig von der Größe des Defektes (Anderson et al., 2008).

### **Chronische Entzündung**

Die folgende chronische Entzündung ist an der nun vorherrschenden Zahl von mononukleären Zellen, also Monozyten, Makrophagen, Lymphozyten und Plasmazellen zu erkennen, auch wenn sich die chronische Entzündungsphase histologisch weniger einheitlich als die akute präsentiert (Anderson, 2001). Von biokompatiblen Materialien wird erwartet, dass die Anzeichen der akuten und chronischen Entzündung in der Regel nicht länger als zwei Wochen anhalten.



Die Progression der Entzündung erfordert die Extravasation und Migration von Monozyten und Makrophagen zum Implantat unter Beteiligung von Chemokinen und anderen „chemoattractants“. Chemokine sind Cytokine mit chemoattraktiven Eigenschaften und bestehen aus den 4 Hauptfamilien CXC ( $\alpha$ -family), CC ( $\beta$ -family), C ( $\gamma$ -family), CX3C ( $\delta$ -family) (Esche et al., 2005). Chemokine spielen ebenfalls bei der Hämatopoese, Angiogenese, Organogenese, Tumor-Metastasierung, Lymphozyten-Differenzierung und -Homing, Zellproliferation und Apoptose eine Rolle. (Gerard und Rollins, 2001; Murakami et al., 2004)

Thrombozyten und das sich bildende Gerinnsel setzen chemotaktisch wirksame Stoffe wie TGF $\beta$ , *Platelet Derived Growth Factor* (PDGF), *Platelet Factor 4* (PF4), Leukotriene und Interleukin 1 (IL-1) frei, die die Makrophagen zum Implantat leiten. Außerdem werden Phagozyten, vor allem Makrophagen, durch die Mastzell-Degranulation und Histamin-Freisetzung angezogen (Zdolsek et al., 2007).

Auch die Makrophagen selbst setzen eine Vielzahl von Signalstoffen frei: PDGF, *Tumor Necrosis Factor  $\alpha$*  (TNF $\alpha$ ), IL-6, *Granulocyte-Colony Stimulating Factor* (G-CSF), *Granulocyte Macrophage-Colony Stimulating Factor* (GM-CSF), *Monocyte Chemoattractant Protein-1* (MCP-1), *regulated upon activation normal T-cell expressed, and presumably secreted* (RANTES), *Macrophage Inflammatory Protein 1 $\alpha$*  (MIP-1 $\alpha$ ) und MIP-1 $\beta$  rufen weitere Makrophagen herbei (de Broughton et al., 2006). Einmal an der Werkstoff-Oberfläche angekommen, können die Makrophagen sich anlagern und es folgen die Ereignisse der Fremdkörperreaktion.

### **Formation von Fremdkörperriesenzellen**

Die verschiedenen Plasma- und extrazellulären Matrix-Proteine auf der Material-Oberfläche sind das Substrat der sich anlagernden Monozyten/ Makrophagen. Sie ermöglichen den Zellen die Bindung mit Hilfe von Oberflächen-Rezeptoren. Integrine sind eine große Familie von Transmembranrezeptoren, die sowohl Zell-Matrix- als auch Zell-Zell-Interaktionen ermöglichen. Sie erlauben die Migration durch die extrazelluläre Matrix und ermöglichen die Kommunikation mit der Umgebung (Hynes, 1992). Integrine sind Heterodimere, die aus einer  $\alpha$ - und einer  $\beta$ -Untereinheit bestehen. Die  $\alpha$ -Untereinheit dient der spezifischen Liganden-Bindung während die  $\beta$ -Untereinheit mit Komponenten der intrazellulären Signalwege in Verbindung steht (Teti et al., 2002). Die unterschiedlichen Paarungen der Untereinheiten ermöglichen

die Variabilität von Substrat-Spezifität und Funktion (Berton und Lowell, 1999). Monozyten/ Makrophagen sind ausgestattet mit drei verschiedenen  $\beta 1$  Integrinen, vier verschiedenen  $\beta 2$  Integrinen und einem  $\beta 3$  Integrin (McNally und Anderson, 2002).

Die initiale Adhäsion der Monozyten vermitteln die  $\beta 2$  Intergrine, vor allem  $\alpha M/\beta 2$  (CD11b/CD18), welches an Materialoberflächen adsorbierte Proteine wie Fibronectin, Fibrinogen, IgG oder Komplement-Fragment iC3b bindet. Die weitere Anlagerung während der Reifung zu Makrophagen und der Fusion zu Fremdkörperriesenzellen (FKRZ) wird auf die Hochregulation und Bindung von  $\beta 1$ -Integrinen zurückgeführt, deren Nachweis erst auf reifenden und fusionierenden Makrophagen sowie FKRZ gelingt. Es wird vermutet, dass die Bindung von  $\beta 2$  Integrinen die Synthese von  $\beta 1$  Integrinen induziert, um die Rezeptor-Substrat-Interaktionen mittels Bindung an RGD-Motive (Arginin-Glycin-Aspartat-Sequenz) zu erhöhen und damit die Adhäsion zu festigen. Dieses soll die Besiedelung und „zytoplasmatische Ausbreitung“ der Riesenzellen entlang der Substratoberfläche gewährleisten (McNally und Anderson, 2002).

Integrin  $\alpha V\beta 3$  bindet an Vitronectin und andere extrazelluläre Proteine, welche ein RGD-Motiv aufweisen. Es wird in FKRZ in relativ niedrigen Mengen exprimiert im Vergleich zu  $\beta 1$  und  $\beta 2$  Integrinen. Dies ist erstaunlich, weil  $\beta 3$  Integrine maßgeblich an der Adhäsion von Osteoklasten an der Knochenoberfläche zuständig sind. Osteoklasten können in Abwesenheit von  $\beta 3$  Integrin die zum Ausbilden der „*sealing zone*“ notwendigen Aktin-Ringe nicht bilden (McHugh et al., 2001), wodurch die notwendige zytoskelettale Organisationsstruktur fehlt. Das legt nahe, dass obwohl FKRZ und Osteoklasten mehrkernige Zellen monozytären Ursprungs sind, ihre Differenzierung von unterschiedlichen Zell-Substrat-Interaktionen und unter dem Einfluss unterschiedlicher Cytokine begünstigt wird.

Nach der initialen Anlagerung der Makrophagen an die Materialoberfläche kommt es zu einer die Lymphozyten-Proliferation stimulierenden Cytokin-Sekretion. Sehr wahrscheinliche Kandidaten hierfür sind IL-2 und IL-6. Die so stimulierten Lymphozyten setzen ihrerseits IL-4 und IL-13 frei, zwei Cytokine, die für die Stimulation der Makrophagen-Fusion bekannt sind (Brodbeck et al., 2005; Abb. 2). Biomaterial-adhärenz, IL-4/IL-13 stimulierte Makrophagen machen einen phänotypischen Wandel von einem klassisch aktivierten zu einem alternativ

aktivierten Status durch. Anderson und Jones (2007) postulieren, dass möglicherweise auch die Interaktion der Makrophagen mit der Materialoberfläche diesen Wandel initiiert. Diese scheint jedoch nicht abhängig von der Chemie des Materials zu sein. Während in klassisch aktivierten (Interferon  $\gamma$ /Lipopolysaccharide) Makrophagen pro-inflammatorische Cytokine (IL-1, IL-6, TNF) hoch- und anti-inflammatorische Cytokine (IL-10) herabreguliert sind, zeigen alternativ (IL-4/IL-13) aktivierte ein anderes Profil: pro-inflammatorische Cytokine (IL-1/IL-6/TNF) sind herabreguliert und es werden vermehrt anti-inflammatorische Stoffe (IL-10/IL-1-Rezeptor-Antagonist) freigesetzt. Darüber hinaus konnte nachgewiesen werden, dass bei fusionierenden Makrophagen durch IL-4 und IL-13 Mannose-Rezeptoren am Fusions-Interface hochreguliert werden (DeFife et al., 1997) und dass eine Inhibierung der Mannose-Rezeptoren eine reduzierte Fusionsrate oder die vollständige Blockade der Fusion zur Folge hat (McNally et al., 1996). Dies weist auf eine Notwendigkeit der Mannose-Rezeptoren, die auf Makrophagen und dendritischen Zellen zur Vermittlung von Endo- und Phagozytose präsentiert werden, bei der Fusion hin. Dem gegenüber stehen neuere Untersuchungen (Helmig und Gordon, 2007), in denen bei Mannose-Rezeptor-Knockout-Mäusen keine reduzierte Fusionsrate bei IL-4-induzierter Fusion festgestellt wurde.

Aufgrund des antiproportionalen Verhältnisses von Apoptose zu Fusion wird vermutet, dass die Fusion zu FKRZ die „Bündelung“ von zellulären Phagozytose-Kräften gegen ein nicht phagozytierbares Material repräsentiert (McNally und Anderson, 2002) und möglicherweise ein Ausweg-Mechanismus darstellt, um den Apoptose-Signalweg zu umgehen (Brodbeck et al., 2001). Anderson et al. (2008) postulieren, dass Makrophagen in der Lage sind Partikel von einer Größe bis maximal 5  $\mu\text{m}$  zu phagozytieren, Partikel mit einer Größe von mehr als 10  $\mu\text{m}$  führen zur Entstehung von FKRZ. Der Vorgang der Fusion von Monozyten/Makrophagen zu Polykaryen ist bis heute noch nicht geklärt. Zwar wurden einige an der Fusion beteiligte Proteine identifiziert, ihre Funktion ist allerdings noch nicht bis ins Detail geklärt.

Eines dieser Proteine ist *Macrophage Fusion Receptor* (MFR)/*Signal Regulatory Protein  $\alpha$*  (SIRP $\alpha$ ), ein ebenso wie sein Ligand CD47 zu der Familie der Immunglobuline gehörender Oberflächenrezeptor (Han et al., 2000). Die Expression von MFR ist begrenzt auf myeloide Zellen und Neuronen, und wird vor allem zu

Beginn der Fusion verstärkt synthetisiert, während sein Ligand konstant von einer Vielzahl von Zellen produziert wird. Diese Tatsache spricht für die Hypothese, dass die Fusion ein regulierter Vorgang ist (Vignery, 2005).

Ein anderer Oberflächenrezeptor, dessen zellulär gebundener Ligand noch nicht bekannt ist, ist CD44. Es ist ein integrales Membran-Glykoprotein, welches eine wichtige Rolle sowohl in der Zell-Zell- als auch in der Zell-Substrat-Adhäsion spielt (Belitsos et al., 1990; Stamenkovic et al., 1991; Sy et al., 1991). Es existiert in vielen Isoformen in einer Vielzahl von Zellen und ist beteiligt an der Migration von Zellen, der Lymphopoese und an dem Lymphozyten-Homing (Johnson und Ruffell, 2009). CD44 bindet an extrazelluläre Matrix-Proteine wie Hyaluronsäure (Lesley et al., 1990; Miyake et al., 1990), Typ I Kollagen, Fibronectin (Jalkanen und Jalkanen, 1992) und OPN (Weber et al., 1996). Aus der nachgewiesenen Beteiligung von CD44 an der viralen Infektion von Zellen ergab sich die Frage, ob CD44 auch in die Multinukleation von Makrophagen involviert ist. In der Tat wird die Expression von CD44 durch fusionsfördernde Bedingungen induziert und konzentriert sich auf die non-adhärenzte Domäne der Plasmamembran (Sterling et al., 1998). Diese Beobachtungen führten zu der Vermutung, dass CD44 zusammen mit seinem Oberflächen-Ligand möglicherweise an der Makrophagen-Makrophagen-Interaktion und damit an der Fusion beteiligt ist. Aufgrund ihrer Untersuchungen stellte Sterling (1998) die Theorie auf, dass die basale Expression von CD44 durch die Bindung an extrazelluläre Moleküle wie Hyaluronsäure der Sicherung des mononukleären Staus dient, während zu Beginn der Fusion der Rezeptor stark hochreguliert werden muss, sodass überschüssig produziertes CD44 unbesetzt bleiben kann. Dieses „freie“ CD44 könnte nun der Zell-Zell-Interaktion während der Fusion dienen, indem es ein Peptid auf der Oberfläche des Makrophagen bindet. Cui et al. (2006) zeigten, dass Preseniline, Transmembranproteine mit 8 transmembranösen Domänen, die intrazelluläre Domäne (ICD) von mindestens 8 Typ-I-Membranproteinen spalten, unter anderem auch die von CD44, und dass die abgespaltene ICD von CD44 zum Kern transloziert und dort *Nuklear Factor- $\kappa$ B* (NF- $\kappa$ B) aktiviert, einen Transkriptionsfaktor, dessen Aktivierung notwendig ist für die Differenzierung von vielkernigen Osteoklasten. Nach Suzuki et al. (2002) ist die Assoziation von intrazellulärem OPN mit CD44 eine essentielle Voraussetzung für die Differenzierung und Aktivität von Osteoklasten.

Ein weiteres an der Fusion beteiligtes Protein ist *Dendritic Cell-Specific Transmembrane Protein* (DC-STAMP), ein Rezeptor mit 7 transmembranösen Domänen, der keine Homologie zu anderen bekannten Proteinen oder Rezeptoren aufweist. Yagi et al. (2005, 2006) zeigten, dass bei der Fusion eine Zelle die Führung in der „Zellphagozytose“ übernehmen muss, und dass diese führende Zelle DC-STAMP präsentieren muss, um die Vielkernigkeit zu erreichen. Ein Ligand für DC-STAMP konnte noch nicht gefunden werden, allerdings geht man aufgrund der Ähnlichkeit mit Chemokin-Rezeptoren davon aus, dass ein möglicher Ligand MCP-1 sein könnte (Vignery, 2005). Die Entdeckung, dass die Fusion sowohl von Osteoklasten als auch von Riesenzellen von dem Vorhandensein von DC-STAMP abhängig ist, stellt das lange Zeit bestehende Dogma in Frage, dass Osteoklasten und Riesenzellen zwei unterschiedliche Zelltypen sind, die unterschiedliche Fusionsmechanismen nutzen (Vignery, 2005). Die Konsequenz der sich bildenden, adhären Riesenzellen ist das Entstehen von ganz speziellen Mikro-Kompartimenten, in denen die von Henson (1971) beschriebene „frustrated phagozytosis“ stattfindet. Es werden freie Sauerstoff-Radikale, Enzyme und Säuren in den Spalt zwischen der Zell-Membran und der Oberfläche des Fremdmaterials freigesetzt, die dessen Abbau bewirken sollen. Dabei werden pH-Werte bis 4 erreicht. Ein weiterer Effekt der Adhäsion von Makrophagen und FKRZ an Biomaterialien ist die Reduktion ihrer bakteriziden Eigenschaften (Anderson et al., 2008).

### **Granulationsgewebe**

Schon während der Phase der chronischen Entzündung beginnt die Bildung von Granulationsgewebe, das durch Makrophagen, einwandernde Fibroblasten und Neovaskularisation gekennzeichnet ist. Es ist als die Vorstufe der fibrösen Kapsel anzusehen und wird vom Implantat durch die Zellen der Fremdkörperreaktion abgegrenzt. In der frühen Phase der Entstehung des Granulationsgewebes proliferieren die einwandernden Fibroblasten und synthetisieren zunächst vor allem Proteoglycane, später Kollagen, hauptsächlich Typ I Kollagen, welches die Hauptkomponente der Kapsel ist (Anderson, 2001). Die Abkapselung oder Fibrose ist das Endstadium der entzündlichen Antwort, es sei denn, das eingebrachte Material ist porös genug, um knöchern integriert zu werden.

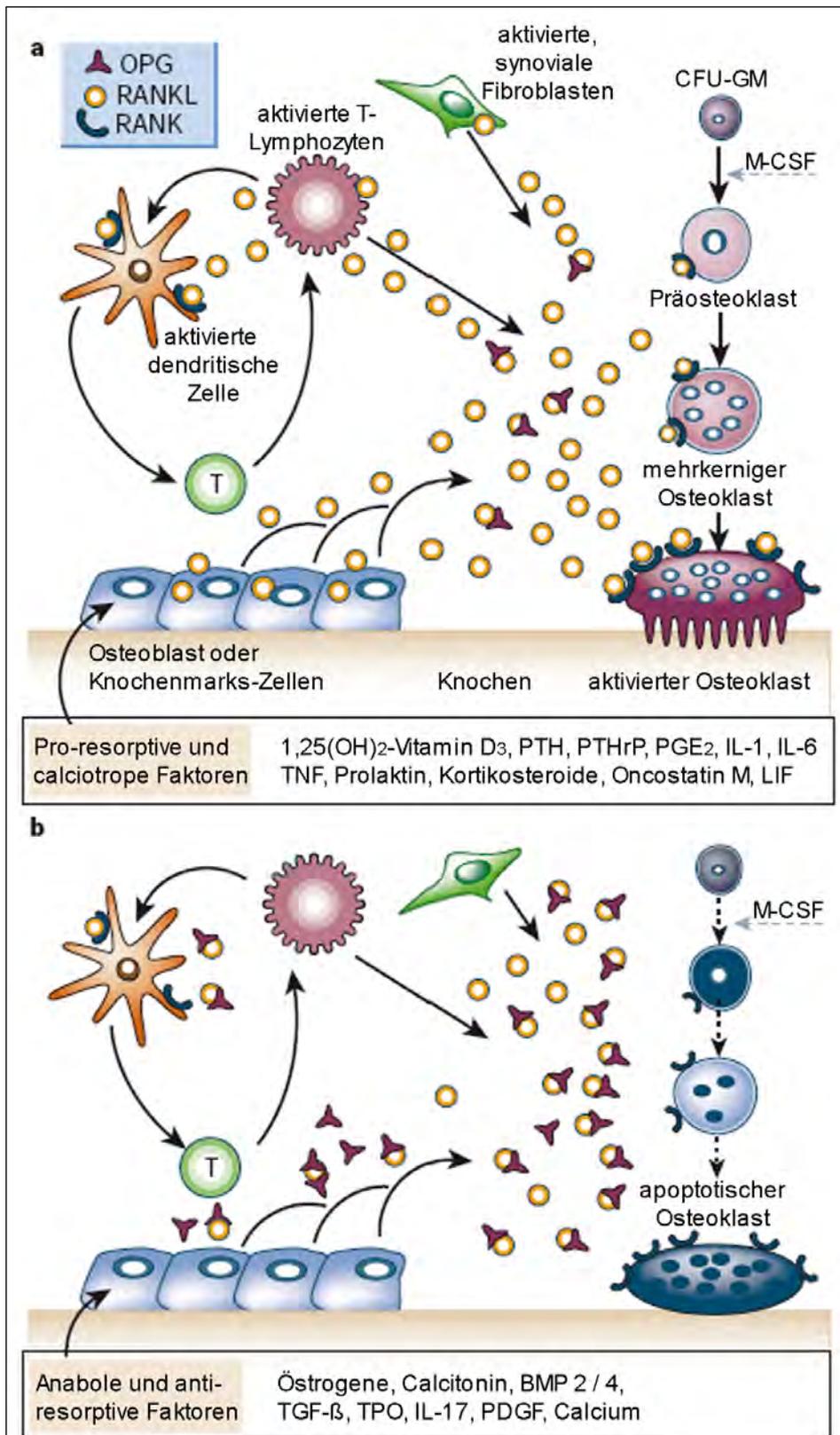
Wie eingangs erwähnt ist die Fremdkörperreaktion als Endstufe der lokalen

entzündlichen Antwort auf das implantierte Material zu sehen. Um die Biokompatibilität des verwendeten Knochenersatzstoffes beurteilen zu können müssen die Zellen der Fremdkörperreaktion von den mehrkernigen Zellen des physiologischen Knochenstoffwechsels (Osteoklasten) abgegrenzt werden, welcher im Folgenden kurz beschrieben wird.

### 2.3 Knochenstoffwechsel

Circa 80% der Knochenmatrix besteht aus Hydroxylapatit  $[\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2]\text{CaOH}_2$ , der Hauptquelle des Körpers für Calcium und äquivalente Basen bei Calcium-Mangelzuständen. Solche Zustände werden von Calcium-sensitiven Zellen in den Epithelkörperchen erkannt, die mit einer vermehrten Ausschüttung von Parathormon (PTH) reagieren. PTH bewirkt neben einer verstärkten Phosphat-Sekretion und Calcium-Rückresorption in der Niere und der verstärkten Umsetzung von 25-Hydroxycholecalciferol zu Calcitriol vor allem eine Steigerung des Knochenabbaus durch Osteoklasten. PTH wirkt dabei nicht direkt auf die Osteoklasten, vielmehr regt es die Osteoblasten zur Bildung von Macrophage-Colony Stimulating Factor (M-CSF) an und unterbindet die Produktion von Osteoprotegerin (OPG), dem löslichen „*decoy receptor*“ von *Receptor-Activator of NF- $\kappa$ B-Ligand* (RANKL) (Ma et al., 2001; Abb. 3). Durch den Knochenabbau werden von den Osteoklasten Wachstumsfaktoren wie *Bone Derived Growth Factor* (BDGF) oder PDGF aus der Knochenmatrix freigesetzt, die wiederum Osteoblasten anregen, sodass ein verstärkter Knochenabbau physiologischerweise auch einen forcierten Knochenaufbau nach sich zieht. Osteoblasten sekretieren eine organische Knochenmatrix, die zu 90% aus stark vernetztem Kollagen I besteht welches sich entlang der Stress-Linien orientiert, und mineralisieren die Matrix anschließend durch Einlagerung von Hydroxylapatit (Blair, 1998). Antagonist des PTH ist das in den C-Zellen der Schilddrüse gebildete Calcitonin, welches sich hemmend auf die Aktivität der Osteoklasten auswirkt und den  $\text{Ca}^{2+}$ -Einbau in das Osteoid fördert.

Osteoklasten sind gewebespezifische mehrkernige Zellen, die durch Differenzierung von Vorläuferzellen der Granulozyten-Makrophagen-Linie an oder in der Nähe der Knochenoberfläche entstehen (Boyle et al., 2003). Nachdem Ancuta et al. (2003) und Geissmann et al. (2003) herausfanden, dass sich die im peripheren Blut zirkulierenden Makrophagen in die CD16-positiven (5-10%) und die CD16-negativen (90-



**Abbildung 3:** mod. nach Boyle et al., 2003:

Schematische Darstellung der Wirkungsweise von

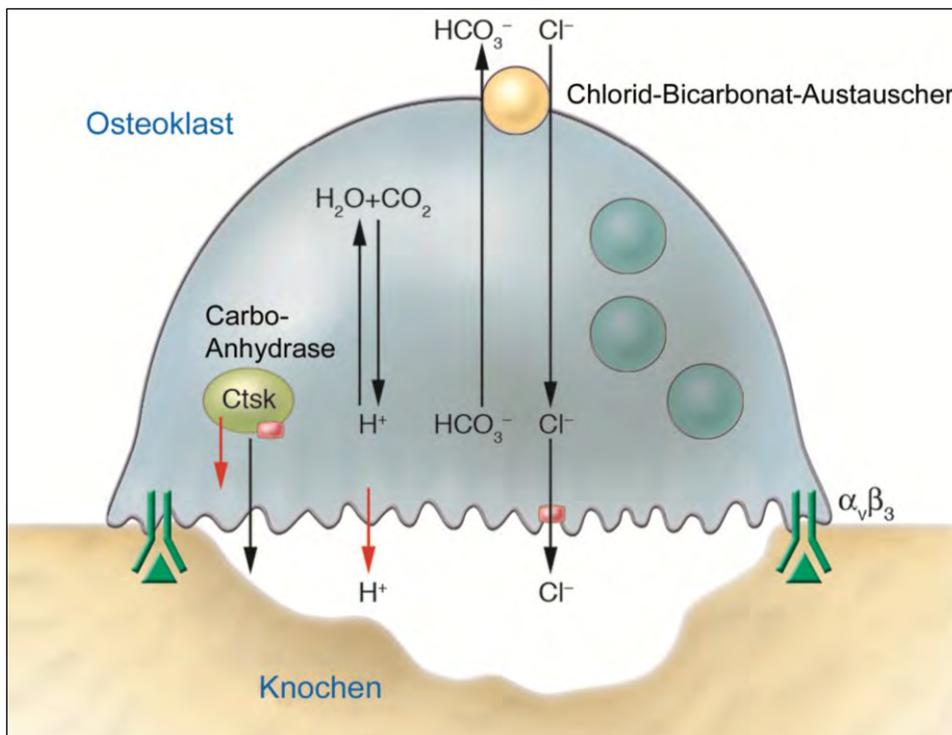
a) pro-resorptiven, calciotropen Faktoren und

b) anabolen, Osteoklasten-hemmenden Faktoren.

95%) Subpopulationen aufteilen, und diese Subpopulationen unterschiedliche Eigenschaften im Bezug auf ihr Cytokin-Muster und ihr Migrationsverhalten aufweisen, zeigte Komano 2006, dass die beiden Subpopulationen unterschiedlich auf Osteoklasten-generierende Stimuli reagieren und der Ursprung der Osteoklasten vermutlich in der CD16-negativen-Population liegt. Diese Ergebnisse decken sich mit den Vermutungen von Fujikawa et al. (1996a/b) nach deren Auffassung mindestens 2-5% der zirkulierenden Monozyten-Fraktion in der Lage zu sein scheint, sich in Osteoklasten zu differenzieren. Die wichtigsten Stimuli zur Differenzierung in Osteoklasten sind *Macrophage-Colony-Stimulating Factor* (M-CSF) und *Receptor Activator of Nuclear Factor  $\kappa$ B* (RANK) mit seinem Ligand RANK-Ligand (RANKL) und dessen Antagonist Osteoprotegerin (OPG) (Ross, 2006; Boyce und Xing, 2007). Der essentielle Wachstumsfaktor M-CSF, welcher von Osteoblasten gebildet und freigesetzt wird, bewirkt bei den frühen, teilungsfreudigen Vorläuferzellen der Osteoklasten nach Binden an seinen Rezeptor c-fms die Proliferation und schützt sie vor Apoptose (Roodman, 2006). Unter dem Einfluss von RANKL, einem Cytokin, welches nach Stimulation u.a. durch PTH vermehrt von Osteoblasten aber auch Fibroblasten auf ihrer Zelloberfläche und auch in gelöster Form gebildet wird, differenzieren sich die Vorläuferzellen weiter und fusionieren zu unreifen, mehrkernigen Osteoklasten.

Der Antagonist zu RANKL ist OPG. Es wird verstärkt unter dem anabolen, anti-resorptiven Einfluss von Calcitonin von den Osteoblasten gebildet und verhindert durch Bindung an RANKL dessen Interaktion mit RANK auf der Oberfläche der Osteoklasten-Vorläufer (Abb. 3).

Das RANKL-RANK-OPG-System unterliegt sowohl der hormonellen Steuerung des Körpers als auch lokalen Stimuli und ist hauptverantwortlich für die Regulation der Knochendichte im Körper (Roodman, 2006). Der differenzierte, vielkernige Osteoklast baut die anorganische und organische Knochensubstanz nach einem recht gut erforschten Prinzip ab (Abb. 4). Nach seiner Anheftung durch das Integrin  $\alpha\beta 3$  an RGD-Motive von im Knochen angesiedelten Proteinen wie BSP oder OPN polarisiert die Zelle und bildet die am Knochen anliegende „*ruffled border*“, die apikale Membran, deren umfangreiche Aufwerfungen ihre Oberfläche stark vergrößern. Mittels des nach der Anheftung an den Knochen gebildeten Aktin-Ringes in der „*sealing zone*“ bildet sich ein zum übrigen Extrazellularraum abgegrenztes Komparti-



**Abbildung 4:** mod. nach Ross und Christiano, 2006: Mechanismus der Knochenresorption durch Osteoklasten: Der Osteoklast heftet sich durch Binden an RGD-Motive enthaltende, adsorbierte Proteine (grünes Dreieck) mittels des Integrins  $\alpha_v\beta_3$  an den Knochen an. Dies führt zur Integration von lysosomalen, Kathepsin K (Ctsk) enthaltenden Vesikeln in die Plasma-Membran. Dadurch entsteht die „ruffled border“ über der Resorptions-Lakune, in welche Salzsäure sowie saure Proteasen wie Kathepsin K sekretiert werden. Die Säure entsteht durch Zusammenspiel der  $H^+$ -ATPase (roter Pfeil) mit dem daran gekoppelten  $Cl^-$ -Kanal (pinke Box) und dem basolateralen Chlorid-Bicarbonat-Austauscher. Bicarbonat entsteht durch die Carboanhydrase aus  $CO_2$  und  $H_2O$ , ebenso wie die Protonen. Gelöste mineralische Komponenten werden bei der Zellmigration freigesetzt, organische Abbauprodukte werden auf gleiche Weise oder durch Transzytose auf der basolateralen Oberfläche ausgeschleust.

ment, dessen Milieu auf einen pH-Wert von 4,5 erniedrigt wird. Dieses geschieht durch Freisetzung von Vesikeln aus der „ruffled border“, die sowohl die membran-gebundene V-Typ  $H^+$ -ATPase als auch Kathepsin K enthalten. Durch die Carboanhydrase Typ II werden im Zytoplasma des Osteoklasten Protonen und Bicarbonat aus Kohlendioxid und Wasser gewonnen. Die Protonen werden über die  $H^+$ -ATPase in das Resorptions-Kompartiment, die so genannte „Howship’sche Lakune“ abge-

geben, die  $\text{Cl}^-$ -Ionen folgen über einen spannungsgesteuerten  $\text{Cl}^-$ -Kanal nachdem sie vorher über einen Chlorid-Bicarbonat-Austauscher in den Osteoklasten gelangt sind. Der saure pH hat die Demineralisierung der an-organischen Matrix zur Folge, die organischen Bestandteile, vor allem Kollagen Typ I, werden auf diese Weise freigelegt. Diese werden von dem Enzym Kathepsin K unter sauren Bedingungen abgebaut und durch vesikuläre Transzytose entfernt (Blair, 1998).

An dem Abbau von implantierten Werkstoffen beteiligte mehrkernige Zellen sind vor allem Osteoklasten im Rahmen des physiologischen Knochen-Remodelings und Fremdkörperriesenzellen im Zusammenhang mit einer Implantat-assoziierten entzündlichen Reaktion. Osteoklasten sind in der Lage auf CaP-basierten Knochenersatzstoffen ihre typischen ultrastrukturellen Merkmale zu zeigen, und diese durch Lösungs- und Phagozytierungsprozesse abzubauen (Heymann et al., 2001; Wenisch et al, 2003 a/b).

Ist die Identifizierung von mononukleären Zellen der monozytären Linie mittels immunhistochemischer Detektion des CD68-Antigens und morphologisch-histologischer Untersuchung noch eindeutig, erweist sich die Differenzierung der multinukleären Populationen als weitaus schwieriger, denn die enzymhistochemischen Markerprofile beider „Zelltypen“ unterscheiden sich nur sehr geringgradig, wenn überhaupt, voneinander. Vignery (2000) postuliert, dass beide Zelltypen trotz unterschiedlicher Funktion gleiche Marker-Profile aufweisen und beide durch Fusion von Vorläuferzellen der monozytären Linie gebildet werden – einem obligatorischen Schritt im Entwicklungsgeschehen beider Zellen. Zwar berichten Yagi et al. (2006), dass DC-STAMP-negative Mäuse in der Lage sind mononukleäre, resorptiv-aktive Osteoklasten zu bilden, jedoch fanden sie heraus, dass eine definierte Zahl an mononukleären Osteoklasten eine schwächere resorptive Kapazität haben, als die multinukleären Osteoklasten der Wildtyp-Mäuse mit der gleichen absoluten Zahl an Zellkernen. Alle in dem Vignery-Labor generierten Zelllinien wiesen dieselben Osteoklasten-typischen funktionellen Marker auf, zu denen Na-K-ATPasen,  $\text{H}^+$ -ATPasen, Calcitonin-Rezeptor (CTR) und Tartrat-resistente saure Phosphatase (TRAP) gehören. Nach ihrer Auffassung ist noch kein Molekül gefunden worden, dessen Expression eindeutig entweder für Osteoklasten oder für Fremdkörperriesenzellen charakteristisch ist. Andere Autoren berichten übereinstimmend von CTR als Osteoklasten-spezifischen Marker (vgl. Tabelle 2).

Marker	Osteoklast	Riesenzelle	Quelle	Datum
CTR	+		Nicholson	1986
	+	-	Quinn et al.	1999
	+	+	Vignery	2000
	+	-	Shen	2006
V-ATPase	+	+	Quinn et al.	1999
	+	+	Vignery	2000
CA II	+	+	Quinn et al.	1999
VNR	+	+	Kadoya et al.	1994
	+	+	Quinn et al.	1999
TRAP	+	+	Hattersley	1989
	+	+	Kadoya et al.	1994
	+	+	Quinn et al.	1999
	+	+	Vignery	2000
	+	+	Shen	2006
Kathepsin K	+	?	Quinn et al.	1999
	+	+	Kontinen et al.	2001
	+	+	Shen et al	2006
αvβ3	+	(+)	Athanasou	1990
	+	(+)	Shen et al.	2006
	+	(+)	Anderson et al.	2008
CD68	+	+	Athanasou	1990
	+	+	Shen et al.	2006
CD14	-	+	Athanasou et Quinn	1991
	+	+	Sabokbar et al.	1997

**Tabelle 2:** Übersicht und Vergleich von in Osteoklasten und Riesenzellen nachgewiesenen Markern

## 2.4 Zielstellung

Ziel dieser Arbeit ist es, in der Frühphase der Entzündungsreaktion, 10 Tage nach der Implantation, drei verschiedene osteokonduktive Knochenersatzstoffe auf CaP-Basis im Hinblick auf die Fremdkörperreaktion zu vergleichen, ein Vergleich, wie er unter anderem auch von Hak (2007) gefordert wird. Dafür wurde der metaphysäre Tibiabohrlochdefekt an der Schafstibia gewählt. Dieses Tiermodell erlaubt am ehesten, die experimentell gewonnenen Erkenntnisse hinreichend auf die beim Menschen zu erwartenden Verhältnisse zu übertragen:

- Die Schafstibia ist in Form und Größe mit menschlichem Knochen vergleichbar.
- Sie lässt sich mit gebräuchlichem humanmedizinischem Instrumentarium bearbeiten.
- Sie liegt wie die menschliche Tibia in der Tragachse der Gliedmaße und erfährt ein ähnliches Belastungsmoment.
- Die Geschwindigkeit der ablaufenden Regenerationsprozesse sind mit der menschlichen Knochenregeneration weitestgehend vergleichbar (Wissing et al., 1990; Stünzle et al., 1998).

Der Bohrlochdefekt als Operationsmodell erlaubt dabei zusätzlich die Schaffung von standardisierten Knochen-Defekten, welche den systematischen Vergleich verschiedener Implantate unter vergleichbaren Bedingungen ermöglicht (Stünzle et al., 1998).

Die Untersuchungen wurden 10 Tage nach der Implantation durchgeführt, um den Einfluss und das Ausmaß der entzündlichen Reaktion auf die verwendeten Biomaterialien beurteilen zu können und anhand dieser Beobachtungen eine Aussage über die Biokompatibilität machen zu können. Diese Beurteilung beschränkt sich aufgrund der geringen Anzahl der Tiere pro Vergleichsgruppe auf eine deskriptive Analyse.

### 3 Material und Methode

#### 3.1 Versuchstiere

Nach entsprechender Genehmigung wurden für die drei Versuchsabschnitte 2-jährige weibliche Merino-Schwarzkopfschafe an der linken Tibia operiert. Diese Schafe entstammten dem Gut Bendeleben GbR und wurden eigens für Tierversuche gezüchtet. Ihr Gewicht lag im Mittel bei 50,1 kg.

Die Tiere wurden am Institut für innovative Medizin in Beichlingen artgerecht im Tierstall und auf der Weide gehalten, mit Rauh- und Saftfutter ernährt, erhielten Wasser *ad libitum* und standen unter permanenter tierärztlicher Kontrolle.

Das Institut für innovative Medizin in Beichlingen ist speziell auf Tierversuche und die veterinärmedizinische Betreuung der Versuchstiere ausgelegt. Es verfügt über alle erforderlichen Genehmigungen für die Tierhaltung und die Durchführung von Tierversuchen (Veterinär- und Lebensmittelüberwachungsamt Sömmerda, Landesverwaltungsamt Weimar)

#### 3.2 Versuchsaufbau

Nach Genehmigung der Tierversuche durch das Thüringer Landesamt für Lebensmittelsicherheit und Verbraucherschutz in Weimar wurden vier Gruppen gebildet: drei entsprechend der zu untersuchenden Knochenersatzmaterialien und eine Gruppe mit Leerdefekten zur Kontrolle. In der ersten Gruppe (Gruppe I: n=3) wurden die Tibiadefekte mit TCP-Zement gefüllt. Den Schafen der zweiten Gruppe (Gruppe II: n=2) Schafen wurde CaP (Calcibon<sup>®</sup>)-Granulat implantiert, in der dritten Gruppe (Gruppe III: n=5) wurden die Bohrlochdefekte mit CaP-Zement in Verbindung mit Phosphoserin versorgt. In der vierten Gruppe (Gruppe IV: n=3) wurden die Defekte nicht gefüllt sondern nur mit einem Knochendeckel verschlossen und dienten somit zur Kontrolle. Nach den Implantations-Operationen wurden die Schafe 10 Tage *p.i.* am Institut in Beichlingen gehalten bevor sie für die Explantation in Vollnarkose gelegt und schließlich euthanasiert wurden. Die explantierten Tibiaköpfe wurden anschließend für die histomorphologische Beurteilung sowie die immun- und enzymhistochemischen Untersuchungen aufbereitet.

### 3.2.1 Knochenersatzmaterialien

Bei den verwendeten Füllmaterialien handelt es sich zum Einen um einen *in situ* aushärtenden Knochenzement, dessen Hauptkomponente  $\beta$ -TCP ist (Stryker, USA).

Das zweite zum Einsatz gekommene Knochenersatzmaterial in Granulat-Form (CaP-Granulat (Calcibon<sup>®</sup> Granules, BioMet Merck, Darmstadt)) entspricht in seinen Ausgangsmaterialien (Kalzium- und Phosphat-Salze) dem nachfolgend beschriebenen Zement-Pulver. Über ein spezielles Herstellungsverfahren wurde ein poröses Granulat bestehend aus mikrokristallinem, karbonatisiertem, kalziumdefizienten Hydroxyl-Apatit mit einer Partikelgröße zwischen 2 und 4 mm hergestellt, welches in seiner chemischen Zusammensetzung und kristallinen Struktur dem mineralischen Anteil des natürlichen Knochens entspricht. Durch das spezielle Herstellungsverfahren wurde eine Makro- (150-550 $\mu$ m) und Mikroporösität (<10 $\mu$ m) geschaffen, die zum einen das Einwachsen von neu formiertem Knochen und die Vaskularisierung desselben gewährleisten soll, zum anderen zu einer im Vergleich zu dem Calcibon<sup>®</sup>-Pulver reduzierten Kompressionsfestigkeit (4-7 MPa) führt.

Nach Herstellerangaben ist dieses Material zur Auffüllung und Rekonstruktion von großen, nicht- infizierten, metaphysären, spongiösen Knochendefekten unterschiedlichster Genese bestimmt, die unter Umständen zusätzlich mit einer ausreichenden Osteosynthese versorgt werden müssen.

Die Grundlage für den dritten verwendeten Knochenersatz bildet ein Calciumphosphat-Zement (InnoTERE GmbH, Dresden). Dieser besteht aus zwei Komponenten: einem Pulver, das mit einer flüssigen Komponente im Operationssaal zu einer modellierbaren Paste angemischt wird. Die Ausgangsstoffe des Pulvers sind  $\alpha$ -Trikalziumphosphat ( $\alpha$ -TCP), Kalziumhydrogen-Phosphat ( $\text{CaHPO}_4$ ), Kalziumcarbonat ( $\text{CaCO}_3$ ), und präzipitiertes Hydroxylapatit (pHA). Die Flüssigkeit ist eine wässrige Lösung (4 wt%) des phosphathaltigen Salzes Di-Natrium-Hydrogenphosphat ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ). Diese initiiert in einer „liquid-to-powder ratio“ von 0,4 ml/g als Starterlösung den Aushärtungsprozess der Paste, die sofort eingesetzt werden kann und ohne Wärmeentwicklung abbindet. Dabei steigt die Kompressionsfestigkeit mit der Abbindereaktion an: schon nach 6 Stunden ist die Kompressionsfestigkeit von spongiösem Knochen erreicht und nach 3 Tagen beträgt sie bis zu 60 MPa. Die mikrokristalline Struktur des ausgehärteten Materials

entspricht in seiner chemischen Zusammensetzung der Kalziumphosphatkomponente des natürlichen Knochens: karbonatisierter, kalziumdefizienter Hydroxylapatit. Zu den weiteren positiven Eigenschaften sind die Modellierbarkeit *in situ* und die Applikationsmöglichkeit in blutende Defekte zu zählen.

Dem beschriebenen Ausgangspulver wurde am Max Bergmann Zentrum für Biomaterialien (Institut für Materialforschung, Technische Universität Dresden, Dresden) O-Phospho-L-Serin (Fluka, Buchs, Schweiz) in einer Konzentration von 10 mg/g zugesetzt.

### **3.3 Operationen**

#### **3.3.1 OP-Vorbereitung**

Alle Tiere wurden während einer Adaptationsphase an den Tierstall gewöhnt. Währenddessen wurden sie einer hämatologischen und parasitologischen Untersuchung unterzogen. Alle Tiere wurden vor Aufstallung in Hinblick auf Rickettsien-Befall serologisch untersucht mit negativem Ergebnis.

#### **3.3.2 Narkose**

Die Anästhesie-Einleitung und perioperative Überwachung erfolgte durch einen Tierarzt. Die Tiere erhielten als Prämedikation Xylazin 2%. Zur Intubation wurden 6 ml des Analgo-Anästhetikums Ketanest 10%<sup>®</sup> in Kombination mit dem Muskelrelaxans My301 5%<sup>®</sup> appliziert. Die Anästhesie wurde durch eine Inhalationsnarkose mit Sauerstoff, Lachgas und Halothan aufrechterhalten.

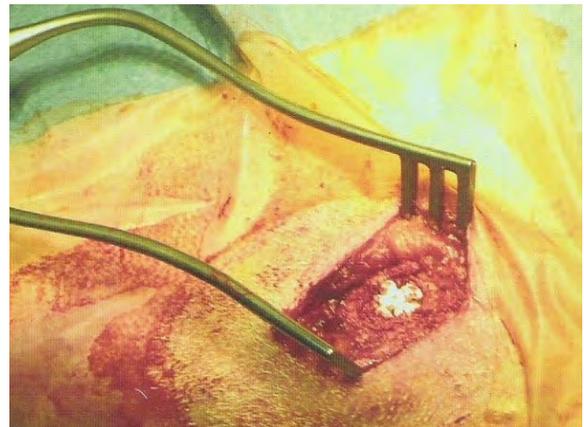
#### **3.3.3 Implantations-Operation**

Die Operation erfolgte unter aseptischen Bedingungen in einem veterinärmedizinischen Operationssaal. Nach der Rasur der linken Hintergliedmaße und ordnungsgemäßer chirurgischer Desinfektion mit Jod-PVP-Lösung wurde das Operationsfeld steril abgedeckt. Es folgte der Zugang zum Tibiakopf von medial. Nach dem Hautschnitt und stumpfer Präparation des Unterhautgewebes wurde das Periost abgelöst. Anschließend wurde mit Hilfe einer innengekühlten Diamant-hohlschleife (Diamant Bone Cutting System DBCS, Stryker, USA) etwa einen Zentimeter unterhalb der Gelenkfläche ein 20 mm tiefer und 12mm breiter Substanz-

defekt geschaffen. Der Vorteil dieses Systems ist, dass es durch Flüssigkeit gekühlt wird und damit trotz schneller Rotation im umliegenden Gewebe nur minimale Hitzenekrosen verursacht. Der so entstandene Knochenzylinder wurde mit einer Entnahmehülse entfernt (Abb. 5). Nun wurde der Defekt mit physiologischer Kochsalzlösung gespült um entstandenes Bohrmehl zu entfernen, anschließend mit dem zu prüfenden Knochenersatzmaterial aufgefüllt (Abb. 6) oder im Falle der Leerddefekte ungefüllt mit einer Scheibe des entnommenen Zylinders abgedeckt. Es folgte ein schichtweiser Wundverschluss durch Naht und ein Sprühverband.



**Abbildung 5:** Operationssitus nach Entnahme des Knochenzylinders



**Abbildung 6:** Operationssitus nach Implantation des CaP-Granulates.

### 3.3.4 Postoperative Nachsorge

Die Tiere erhielten *intra operationem* eine antibiotische Prophylaxe und wurden während der Aufwachphase auf angemessener Einstreu ständig überwacht. Anschließend wurden sie artgerecht in einer Laufbox im Tierstall gehalten mit Zugang zur Weide nach zwei Tagen. Die Tiere erhielten nach Indikation Metamizol zur Analgesie.

### 3.3.5 Explantations-Operation

Die Explantation und Euthanasie der Tiere erfolgte in Vollnarkose. Nachdem in der linken Leiste die Arteria femoralis und Vena femoralis freipräpariert wurden, wurden die Schafe sofort mit einer tödlichen Dosis T61<sup>®</sup> euthanasiert. Im Anschluss an die Tötung der Tiere erfolgte die Spülung der Gefäße mit physiologischer Kochsalzlösung über die Arteria femoralis nach Eröffnung der Vena femoralis. Dies wurde solange fortgesetzt, bis die Lösung klar wurde und makroskopisch keine Hinweise

mehr auf Blutbeimengungen zu sehen waren. Es folgte die Präparation der linken Tibia und das Absetzen des Tibiakopfes mit einer Drahtsäge. Der so gewonnene Tibiakopf wurde in saggitaler Schnitfführung aufgesägt, dabei wurde die Dicke der entstehenden Scheiben der späteren Verwendung entsprechend gewählt. So wurde für Knochenscheiben, die der Erstellung von Dünnschliffen dienen sollten, eine Dicke von 3-4 mm gewählt. Sie wurden sofort über 24-48 Stunden bei 5°C in Karnowsky-Fixans (bestehend aus 4%iger, gepufferter Paraformaldehyd-Lösung (pH 7,2-7,4) und 2% Glutardialdehyd) eingelegt. Für die für Paraffin-Schnitte geplanten Proben wurde eine Schichtdicke von zwei mm gewählt, sie wurden 24-48 Stunden in 4%iger bei pH 7,2-7,4 gepufferter Paraformaldehyd-Lösung fixiert. Für die Scheiben, die für die Herstellung von Semidünnschnitten vorgesehen waren wurde eine Stärke von einem mm gewählt. Diese wurden für 10 Stunden in Yellow-Fix-Fixiermedium bei 5°C eingelegt. Dieses Medium besteht aus 2%iger bei pH 7,3 gepufferter Paraformaldehyd-Lösung, 2% Glutardialdehyd und 0,02% Pikrin-Säure.

### **3.4 Bearbeitung der Proben für die Lichtmikroskopie**

#### **3.4.1 Histologie**

##### **3.4.1.1 Trenn-Dünnschliff-Technik**

Die Trenn-Dünnschliff-Technik ist eine Methode um dünne Schriffe von nicht schneidbaren Geweben für die lichtmikroskopische Auswertung ohne Entkalkungsprozedur herzustellen. Nicht schneidbare Gewebe sind zum Beispiel Implantat-tragende Knochen, dicke Kortikalis, zahntragende Kieferabschnitte oder hypermineralisierte Knochenteile. Die hier verwendete Technik wurde von Donath und Breuner (1982) entwickelt und wird heute täglich in der Routine-Diagnostik angewendet.

Um einen Schliff nach der Trenn-Dünnschliff-Technik durchführen zu können, muss die fixierte Gewebe/Implantat-Scheibe zunächst in Kunststoff eingebettet werden. Dabei richtet sich die Wahl des zu verwendenden Kunststoffes nach der geplanten Untersuchungstechnik: ist eine Standard-Färbung wie Toluidin-Blau oder Hämatoxylin-Eosin vorgesehen, bettet man die zu untersuchenden Proben in Technovit 7200 (T7200, Kulzer EXAKT, Wehrheim) ein, soll dagegen an dem Schliff zusätzlich eine immun- oder enzymhistochemische Untersuchung durchgeführt werden, so empfiehlt sich die Einbettung in Technovit 9100 NEU KOMBI (T9100 Kulzer, Wehrheim).

***Einbettung in T7200:***

Zunächst wurden die Proben nach einem Spül-Schritt in 0,1m Natrium-Phosphat-Puffer zur Entwässerung durch eine aufsteigende Alkohol-Reihe (70%, 80%, 96%, 100%, 100%, 100% für je 1-3 Tage) geführt. Nun überführte man die Proben für jeweils 48 Stunden in Lösungen, in der Technovit 7200 und reines Ethanol in unterschiedlichen Mischverhältnissen vorlagen: 30/70, 50/50, 70/30. Es folgte das Überführen in Technovit 7200 I, II und III, zu denen jeweils BPO (Dibenzoylperoxid, EXAKT Firma Hereus-Kulzer, Werheim) in 1%iger Konzentration zum Beschleunigen der Infiltration zugemischt wurde. Die Verweildauer in den Lösungen richtet sich dabei nach der Dicke und Oberfläche der Proben: kleine Proben blieben jeweils 2 Tage, große je 4 Tage in den Lösungen.

Nun folgte das Ausblocken. Die Proben wurden zunächst auf dem Boden der Einbettmulde mit Technovit T7230 (Kulzer, Wehrheim) festgeklebt, wonach die Mulde mit Technovit 7200 + BPO (1%) unter Vermeidung von Luftblasen aufgefüllt wurde. Die so vorbereiteten Proben wurden nun zur Polymerisation in das Licht-Polymerisationsgerät Histolux (EXAKT Apparatebau, Norderstedt) gestellt, wo sie für 2 Stunden unter Gelblicht vorpolymerisierten, um im Anschluss daran endgültig über 10 Stunden unter Blaulicht zu polymerisieren. Anschließend wurden die Proben über Nacht in den auf 40°-50°C vorgeheizten Wärmeschrank verbracht, da BPO seine Wirkung nur bei Wärme entfaltet. Vor der Entnahme aus dem Schrank sollten die Probe langsam abzukühlen, um Spannungsrisse zu vermeiden.

***Einbettung in T9100:***

Auch hier wurden die Proben zunächst durch eine aufsteigende Alkohol-Reihe geführt (analog Einbettung in T7200), es folgte die Behandlung mit Xylol für 24 Stunden anschließend die aus drei Schritten bestehende Präinfiltration. Dabei fanden die beiden ersten Schritte bei Raumtemperatur und der letzte Schritt bei 4°C statt. Für den ersten Schritt wurden die Präparate für 3 Tage in ein Gemisch aus Xylol und stabilisiertem T9100 (1:1) verbracht, das auf einem Rüttler in Bewegung gehalten und mehrfach für 10 Minuten im Exsikkator evakuiert (200mbar) wurde. Im nächsten Schritt kamen die Proben abermals für 3 Tage in stabilisiertes T9100 gemischt mit dem Härter 1. Auch dieses Gemisch wurde laufend bewegt und mehrfach im Exsikkator evakuiert. Wieder 72 Stunden später erfolgte der letzte Schritt der

Präinfiltration: das Verbringen in entstabilisiertes T9100 vermischt mit Härter 1. Dieses wurde auf 4°C gekühlt und ebenfalls mehrfach für 10 Minuten evakuiert.

Nun folgte die eigentliche Infiltration: bei 4°C wurde dem T9100/Härter 1- Gemisch PMMA- Pulver (Polymethylmethacrylat, EXAKT Apparatebau, Norderstedt) zugefügt. Dieses reduziert die Polymerisationswärme, um einen besseren Polymerisationsablauf zu gewährleisten. Auch in dieser Mischung verblieben die Proben für 72 Stunden.

Anschließend folgte die Polymerisation: die Proben wurden in Einbettformen gelegt (Hereus Kulzer, Wehrheim) und mit der Polymerisations-Lösung übergossen. Die Komponenten der Polymerisationslösung, Stammlösung 1 und 2 wurden vorher vorbereitet und im Verhältnis 9:1 vermischt. Nun wurden die Proben im Exsikkator wieder für 5 Minuten evakuiert, anschließend randvoll aufgefüllt und ohne Blasenbildung verschlossen. Die Polymerisation fand bei -4°C für 2 Tage im Kühlschrank statt.

Um den das jeweilige Präparat enthaltenden Kunststoffblock weiter bearbeiten zu können musste der Block, auf der Präparat-fernen Seite aufgeraut, mit Hilfe der EXAKT Vakuum-Klebedresse (EXAKT Apparatebau, Norderstedt) und Technovit 4000 (Kulzer, Wehrheim) auf einen ebenfalls aufgerauten, beschrifteten Plexiglas-Objektträger aufgebracht werden. Es folgte das Freilegen der Präparat-Oberfläche mit dem EXAKT Mikroschleif-System (EXAKT Apparatebau, Norderstedt) und einem Schleifpapier mit 500er Körnung. Dieses trägt unter ständiger Befeuchtung langsam, in oszillierenden Bewegungen, das überschüssige T7200 oder T9100 von dem Präparat ab. Unmittelbar nach Freilegen der gesamten Präparat-Oberfläche wurde das Präparat von dem Mikroschleif-System genommen.

Bevor nun auf die freigelegte Seite des Präparates ein Objektträger aufgeklebt werden konnte, mussten die Objektträger zunächst vermessen werden. Dabei war zu beachten, dass bei dem Glasobjektträger maximal 3 µm Varianz in der Dicke auftreten dürfen. Auch die absolute Dicke von dem Plexiglas-Objektträger mit Kleber und Block wurde notiert. Anschließend wurden die geeigneten Glas-Objektträger mit Silicoup (Kulzer, Wehrheim) beschichtet. Zum Kleben wurde der beschichtete Objektträger mit Vakuum in der EXAKT Klebedresse befestigt. Dann wurde der Block mit dem Präzisionskleber Technovit T7210 unter Vermeidung von Luftblasen auf

dem beschichteten Objektträger geklebt. Dieser Kleber polymerisiert danach binnen 10 Minuten unter Blaulicht. Die Gesamt-Dicke des „Sandwiches“ wurde bestimmt und durch Subtraktion der absoluten Dicke und der Glas-Objektträger-Dicke von der Sandwich-Dicke konnte die Dicke des T7210 errechnet werden.

Nun befestigte man den „Sandwich“ auf dem beweglichen Schlitten des EXAKT-Trennschleifsystems (EXAKT Apparatebau, Norderstedt) mittels Vakuum und brachte ihn vor dem Sägeband in Stellung. Die Diamant-beschichtete Bandsäge durchtrennte nun den Block auf der dem Glasobjektträger zugewandten Seite. Dabei wurde der Block mit einer definierten Kraft gegen die Säge gedrückt.

Derart durchtrennt, wurde wiederum die Dicke des Glasobjektträgers mit Präparat gemessen. Nun wurde das Präparat im EXAKT Mikro Schleifsystem (EXAKT Apparatebau, Norderstedt) auf die gewünschte Dicke abgetragen und anschließend poliert. Das Polieren war gleichzeitig der Abschluss der Herstellung eines Dünnschliffs.

### **Färbung**

Bei der Färbung der Präparate musste je nach verwendetem Kunststoff unterschiedlich vorgegangen werden:

Die in Technovit 7200 eingebetteten Schliffe mussten im Vorfeld der Färbung zunächst angeätzt werden. Dafür wurden sie unter ständigem Rühren für 10 Minuten in 20%iges  $H_2O_2$  überführt und anschließend unter Leitungswasser abgespült und getrocknet. Zur Toluidin-Blau-Färbung wurde der Farbstoff für 10 Minuten aufgebracht, danach mit Wasser abgespült und der Schliff getrocknet.

Für die Hämatoxylin-Eosin (HE)-Färbung wurden die Schliffe mit Hämatoxylin nach Mayer oder Hämalaun für 5-10 Minuten benetzt, dann folgte das 10 minütige Bläuen in Leitungswasser. Eosin wurde für eine Minute aufgetragen, mit Aqua dest. abgespült und der Schliff mit EUKITT® (Sigma Aldrich, Steinheim) eingedeckelt.

Der Kunststoff T9100 musste vor dem Färben der Schliffe entfernt werden („Entplastung“), indem die Objektträger zunächst dreimal für je 20 Minuten in 2-Methylmethacrylat (MEA, Merck Schuchardt OHG, Hohenbrunn) überführt wurden. Darauf folgten zweimal 5 Minuten reines Aceton und 5 Minuten ein Gemisch (1:1) aus Aqua dest. und Aceton. Nach einem letzten Spülen mit Aqua dest. waren die

Schliffe entplastet und bereit für die Färbungen.

Für die Toluidin-Blau-Färbung wurde nun für 20 Sekunden Toluidin-Blau aufgetragen. Die HE- Färbung erfolgte analog der Vorgehensweise bei der Färbung von Paraffin-Schnitten: zunächst 5 Minuten Hämatoxylin nach Mayer, dann 10 Minuten Bläuen, zum Schluss eine Minute Eosin.

Im Anschluss an die Färbung führte man die Präparate durch eine aufsteigende Alkohol-Reihe (70%,80%, 96%, 100%, 100%) und brachte sie zwei mal in das Intermedium Xylol, bevor sie mit EUKITT® (Sigma Aldrich, Steinheim) eingedeckt wurden.

#### **3.4.1.2 Paraffin-Technik**

Um die zu untersuchenden Knochenpräparate strukturerhaltend schneiden zu können, musste der Knochen zuvor entkalkt werden. Die schnellste und schonendste Methode dafür ist das Entkalken mit Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA). Es bilden sich wasserlösliche, komplexe Verbindungen des Calciums an das EDTA, welche dann durch Auswaschen beseitigt werden. Je nach Größe und Strukturdichte variierte die Entkalkungszeit.

Vor Beginn der Entkalkung wurden die Präparate für 24h in 4%iger PFA-Lösung fixiert und anschließend mit 0,1M Na-P-Puffer gespült. Nun erfolgte die Entkalkung in Bechergläsern bei Raumtemperatur und unter ständigem Rühren. Es wurde alle 2 Tage das Entkalkungsmedium erneuert. Dabei wurde immer der Entkalkungszustand mittels einer Präpariernadel geprüft. Die Präparate waren ausreichend entkalkt, wenn die Präpariernadel ohne nennenswerten Widerstand in das Gewebe eindringen konnte. Im Durchschnitt dauerte dies etwa 30 Tage.

#### ***Entkalkung (Standard-Protokoll)***

Durch Mischen von 17g TRIZMA®-Base (Trishydroxymethylaminomethan, Sigma, Steinheim) und 50g TITRIPLEX III® (Ethylendiamintetraessigsäure, Merck, Darmstadt) mit 500ml Aqua dest. wurde die Entkalkungsflüssigkeit angesetzt und auf einen pH von 7,3 eingestellt.

***Einbettung in Paraffin (Standard-Protokoll):***

Vor der Paraffineinbettung wurden die Präparate über eine Stunde unter Leitungswasser gewaschen, mittels einer aufsteigenden Alkoholreihe (70% für 10h, 80% ,96%, 100%, 100% für je 1 h) entwässert und zweimal 15 Minuten in Xylol inkubiert. Anschließend wurden die entwässerten Präparate im Einbettautomat in Paraffin (ROTI<sup>®</sup>-PLAST, C.Roth GmbH, Karlsruhe) eingebettet. Nach dem Erstarren wurden die Proben bei -20°C aufbewahrt, um weiter auszuhärten.

***Herstellung von Paraffinschnitten***

Zur Herstellung der Paraffinschnitte wurde ein Rotationsmikrotom (Leica RM2155, Leica Instruments GmbH, Nussloch) verwendet. Dazu wurden die Präparate in der Haltevorrichtung fixiert, die Oberfläche des Präparates planparallel zur Mikrotomklinge (Feather Microtome Blades R35, Japan) ausgerichtet und die Oberfläche des Knochenpräparates vorsichtig freigelegt. Nun wurden Schnitte von 4µm Dicke abgetragen, auf Wasser schwimmend geglättet und anschließend auf Objektträger (Langenbrinck, Emmendingen) aufgezogen, die zuvor mit APES ((3-Aminopropyl)Triethoxysilan) beschichtet wurden. Abschließend wurden die Schnitte luftgetrocknet.

***Färbungen***

Für den Färbevorgang mussten die Präparate wiederum mit Xylol entparaffiniert werden, durch eine absteigende Alkohol-Reihe gewässert werden und in Aqua dest. verbraucht werden.

Für die HE-Färbung wurden sie für 5 min in Mayers Hämalaun-Lösung (Merck, Darmstadt) gefärbt und anschließend für 10 min unter Leitungswasser gebläut. Es folgte die Färbung in Eosin (Certistain<sup>®</sup> Eosin G, Merck, Darmstadt) für eine Minute. Dieses wurde mit Aqua dest. abgewaschen, wonach die Objektträger durch eine aufsteigende Alkohol-Reihe (70% ,80%, 96%, 100%) und Xylol geführt wurden. Anschließend folgte das Eindeckeln in DePeX (Gurr<sup>®</sup>, VWR International Ltd., Pooke, England).

Für die Toluidin-Blau-Färbung wurden die Präparate für 10 Sekunden in Toluidin-Blau-Lösung (Waldeck GmbH & Co, Münster) gefärbt und im Anschluss mit sehr kurzen Zeiten durch die aufsteigende Alkohol-Reihe geführt, um einer Entfärbung

entgegenzuwirken. Zum Schluss folgte das Intermedium Xylol und das Eindecken in DePex (Gurr<sup>®</sup>, VWR International Ltd., Pooke, England).

### **3.4.1.3 Semidünnschnitte**

Epon ist ein Einbettungsmedium auf Epoxidharzbasis, welches zur Herstellung von Semi-Dünnschnitten und für die Transmissionselektronenmikroskopie genutzt wird aufgrund seiner guten Konservierung der Ultrastruktur der Präparate. Es lassen sich durch diese Art der Einbettung Schnitte mit einer Dicke von 1 µm herstellen.

#### ***„Epon“-Einbettung***

Dafür müssen zunächst die Reste der in Yellow-Fix enthaltenen Pikrinsäure durch mehrfaches Waschen in 0,1M Cacodylat-Puffer (pH 7,2-7,4) entfernt werden bevor die Proben in mit selbigem Puffer gepufferter 1%iger Osmiumtetroxid-Lösung über 2 Stunden nachfixiert werden konnten. Nach anschließendem gründlichen Waschen in der Pufferlösung folgte das Entwässern in einer aufsteigenden Alkohol-Reihe bevor das eigentliche Einbetten beginnen konnte. Dazu wurden die Proben über 6 Tage in Gemischen aus Xylol, einem aufsteigenden Gehalt an Epon (Serva) und 1,5% (bezogen auf das Gesamtgemisch) Reaktionsbeschleuniger behandelt, wobei ein Unterdruck von -600 mbar eine optimale Penetration der Proben gewährleistete. An den letzten beiden Tagen wurden die Präparate mit reinem Epon unter Unterdruck versetzt, bevor die Polymerisation zunächst für 3 Stunden bei 48°C und dann nochmal für 20 Stunden bei 60°C erfolgte.

Die Herstellung von Schnitten erfolgte an einem Ultramikrotom („Ultracut“, Reichert-Jung), die so gewonnenen Semidünnschnitte mit einer Schnittdicke von 1 µm wurden anschließend auf Objektträger aufgebracht und luftgetrocknet.

#### ***Färbung***

Die Semidünnschnitte werden zunächst mit Toluidin-Blau (1% Toluidinblau (Chroma, Münster) + 1% Dinatriumtetraborat (Merck, Darmstadt)) auf einer Wärmeplatte bei 70-80°C für 20 Sekunden gefärbt, bevor nach Spülung mit Aqua dest. die Gegenfärbung mit Safranin O (1% Safranin (Merck, Darmstadt) + 1% Dinatriumtetraborat (Merck, Darmstadt)) durchgeführt wird. Dieses lässt man nur 5 Sekunden einwirken, bevor es mit Aqua dest. abgespült wird. Anschließend werden die Semi-Dünnschnitte eingedeckelt.

### 3.4.2 Histochemische Methoden

#### 3.4.2.1 Enzymhistochemie - TRAP

Für den enzymhistochemischen Nachweis der Tartrat-resistenten sauren Phosphatase (TRAP) wurden 2 Färbelösungen angesetzt:

Lösung 1: 35 mg Naphthol-AS-TR-Phosphat (Sigma-Aldrich, Taufkirchen) + 125µl N-N-Dimethylformamid (Sigma-Aldrich, Taufkirchen)

Lösung 2: 57,5mg Dinatrium-Tartrat-Dihydrid (Merck, Schwalbach) + 35 (FastRed TR Salt, Aldrich CC, Milwaukee) in 25ml 0,1M Natriumacetatpuffer (Merck, Schwalbach) (pH 5,2).

Die Lösungen 1 und 2 wurden im Anschluss in 25ml Acetatpuffer (pH 5,2) zur Gebrauchslösung zusammengeführt.

#### ***Standard-Protokoll „Paraffin“:***

Nach der Entparaffinierung und Wässerung der Schnitte in einer absteigenden Alkoholreihe und Einstellen des pH auf 5,2 mittels Acetatpuffer wurde auf die Objektträger die Gebrauchslösung verbracht, um sie darin für 20 Minuten bei 37°C im Dunkeln zu inkubieren. Anschließend erfolgte die zwei minütige Kernfärbung mit Hämatoxylin (Instant-Hematoxylin, Sahnidon Inc., Pittsburgh, 1:1 verdünnt in Aqua bidest.) und das Stabilisieren des Farbstoffs in Leitungswasser. Dieses wurde im Anschluss durch Aqua dest. ersetzt. Das Eindeckeln erfolgte mit Kaisers Glycerin-Gelatine (Merck, Darmstadt).

#### ***Standard-Protokoll „Technovit T9100“:***

Nach Entplastung erfolgte die TRAP-Färbung analog dem oben beschriebenen Standardprotokoll „Paraffin“, allerdings wurden die Schliffe nur für 10 Minuten inkubiert. Eingedeckelt wurde ebenfalls mit Kaisers Glyceringelatine.

#### 3.4.2.2 Immunhistochemie

Für die immunhistochemischen Untersuchungen wurde aufgrund der höheren Sensitivität - verglichen mit der PAP-Methode - die Avidin-Biotin-Komplex-Methode (ABC-Methode) ausgewählt. Diese basiert auf der hohen Affinität ( $K_m=10^{-15}$ ) von (Strept)Avidin für Biotin. Dieses befindet ist mit dem Sekundärantikörper konjugiert,

der seinerseits gegen den Primärantikörper gerichtet ist. Es werden also für die Methode drei Reagenzien benötigt: Primärantikörper (gerichtet gegen das nachzuweisende Antigen), biotinylierter Sekundärantikörper (gerichtet gegen den Primärantikörper) und der Peroxidase-konjugierte (Strept)Avidin-Biotin-Komplex. Im Anschluss daran wird der Antigen-Antikörper-Komplex mit einer geeigneten Substrat-Chromogen-Lösung sichtbar gemacht und eine Kernfärbung durchgeführt.

### **Standardprotokoll „Paraffin“:**

Nach der Entparaffinierung in zwei mal 5 Minuten Xylol wurden die Präparate zunächst zweimal gespült: zunächst 5 Minuten in Aceton und anschließend wiederum 5 Minuten in einem Gemisch aus Aceton und Pufferlösung (im Verhältnis 1:1). Anschließend wurden sie in Waschpuffer überführt, der aus Tris-NaCl-Puffer (Tris-Buffered Solution, TBS: 0,15 mol/l NaCl + 0,05 mol/l Tris/HCl, pH 7,3) und 0,025% Triton-X (Merck, Darmstadt) bestand. Um nun die Aktivität der endogenen Peroxidase zu hemmen folgte eine 5 minütige Inkubation in 3%igem H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, der wieder ein zweimaliges Waschen in Waschpuffer-Lösung folgte. Nun konnte der mit Hintergrund-reduzierendem Verdünnungspuffer (DAKO, Denmark; Code S3022) verdünnte Primär-Antikörper aufgebracht werden, welcher im Anschluss für 16 Stunden bei 8°C in einer feuchten Kammer wirkte. Nach dem Abspülen des Primärantikörpers wurden die Präparate mit dem mit Schafserum verdünnten biotinylierten Sekundärantikörper bei Raumtemperatur für 30 Minuten in der feuchten Kammer inkubiert. Nach den notwendigen Spülschritten in Waschpuffer (zweimal 2 Minuten) wurde der mit Tris-NaCl-Puffer (pH 7,3) verdünnte, Peroxidase-konjugierte Streptavidin-Biotin-Komplex (DAKO, Denmark; Code K0355) aufgebracht und für 30 Minuten bei Raumtemperatur in einer feuchten Kammer belassen. Nach weiteren Spülschritten in Waschpuffer (zweimal 2 Minuten) wurde das Chromogen (NovaRED<sup>®</sup>Substrate kit for Peroxidase, Vector Laboratories, USA) für 5 Minuten aufgetragen und nach abermaligem Spülen mit Aqua bidest. und Aqua dest. eine Kernfärbung mit Hämatoxilin durchgeführt. Abschließend wurden die Präparate wie zuvor beschrieben in einer aufsteigenden Alkoholreihe entwässert und anschließend mit DePeX eingedeckt. Zur Negativkontrolle wurden die Schnitte im Verdünnungspuffer ohne Primärantikörper inkubiert.

**CD16**

Zur CD16-Markierung wurde der monoklonale (Klon 2H7) aus der Maus stammende Antikörper der Firma AbD Serotec verwendet. Dieser ist gegen humanes CD16 gerichtet und kam in der höchsten in der Literatur angegebenen Verdünnung von 1:20 zum Einsatz. Als Sekundärantikörper wurde ein biotinylierter, gegen Immunglobuline der Maus gerichteter Antikörper aus dem Hasen benutzt (DAKO, Denmark; Code E0354).

Für diesen Nachweis kamen sowohl native als auch zur Antigen-Demaskierung vorbehandelte Paraffin-Schnitte zum Einsatz. Thermisch vorbehandelte Schnitte wurden 20 Minuten bei 90°C in Citrat-Puffer (pH 6,0) erhitzt, anschließend folgte langsames Abkühlen über weitere 20 Minuten. Zur enzymatischen Antigen-Demaskierung wurden die Schnitte für 5 Minuten mit Pronase (0,5 mg/ml) behandelt.

**CD68**

Bei dem verwendeten CD68 Primärantikörper handelt es sich um einen monoklonalen (EBM-11) Antikörper (DAKO, Denmark; Code No. M 0718) aus der Maus, der gegen humanes CD68 gerichtet ist. Dieses Antigen wird intrazytoplasmatisch, möglicherweise assoziiert mit Lysosomen, von Monozyten, Makrophagen, neutrophilen Granulozyten und wenigen Lymphozyten exprimiert. Er wurde auf allen Schnitten in der Verdünnung 1:50 angewendet. Als Sekundärantikörper wurde ebenfalls der biotinylierte, gegen Immunglobuline der Maus gerichteter Antikörper aus dem Hasen benutzt (DAKO, Denmark; Code E0354).

**CD44**

Für den Nachweis von CD44 wurde der monoklonale Primärantikörper (clone MAC329) der Firma Serotec, UK (code MCA 1449), verwendet. Gewonnen aus der Ratte bindet der Antikörper vom Isotyp IgG1 an CD44 des Schweines. Da aber auch eine Reaktivität bei Schafen gezeigt werden konnte, kam er hier, 1:25 verdünnt, zum Einsatz. Als Sekundär-Antikörper wurde ein biotinylierter gegen IgG der Ratte gerichteter Antikörper aus dem Hasen (DAKO, Denmark; Code E0467) benutzt.

### ***Doppelinkubation CD44 / CD68***

Bei der Doppelinkubation wurde CD44 als erster Antikörper analog zu dem oben beschriebenen Standardprotokoll für die ABC-Methode eingesetzt. In diesem Fall kam allerdings das Chromogen 3,3'-Diaminobenzidin (DAB, DAKO, Denmark) zum Einsatz. Für den folgenden Nachweis von CD68 wurde nach der Alkalische-Phosphatase-Anti-Alkalische-Phosphatase (APAAP)-Methode vorgegangen: Dazu wurde nach Abspülen des DAB mit Aqua dest. der aus der Maus stammende Primär-Antikörper gegen CD68 über Nacht aufgebracht. Nun wurde für 30 Minuten der verdünnte (1:25 in 3%BSA +0,1%Triton + 1:8 Schafserum) nicht-biotinylierte, gegen die Maus gerichtete Sekundär-Antikörper (*polyclonal rabbit anti mouse*, Code Z0259, DAKO, Denmark) aufgetragen, der „Brückenantikörper“ dieser Methode. Nach dem Waschen in Waschpuffer wurde der lösliche Enzym-Anti-Enzym-Immunkomplex (APAAP) 1:50 verdünnt in TBS für 30 Minuten aufgetragen. Nachdem dieser Komplex abgewaschen war, folgte das Fuchsin (Substrat-Chromogen-System, DAKO, Denmark) mit Levamisol (DAKO, Denmark), dieses wurde für 15 Minuten aufgetragen. Im Anschluss daran folgte die Gegenfärbung mit Hämatoxilin und abschließend das wasserhaltige Eindeckeln mit DAKO Glycergel.

### **3.5 Lichtmikroskopische Auswertung**

Der Auswertung diente ein Lichtmikroskop vom Typ Zeiss Axioskop 2 plus (Carl Zeiss, Jena). Die digitalen Aufnahmen der Untersuchungsergebnisse wurden mit der Kamera DC500 (Leica Microsystems, Wetzlar) in Verbindung mit dem Mikroskop-Aufsatz Axiophot 2 (Carl Zeiss, Jena) mit dem Mikroskop Axioplan 2 (Carl Zeiss, Jena) angefertigt. Die Bearbeitung der Bilder erfolgte mit Hilfe der Software IM1000 (Leica Microsystems Digital Imaging, Cambridge, UK) sowie Adobe Photoshop CS3.

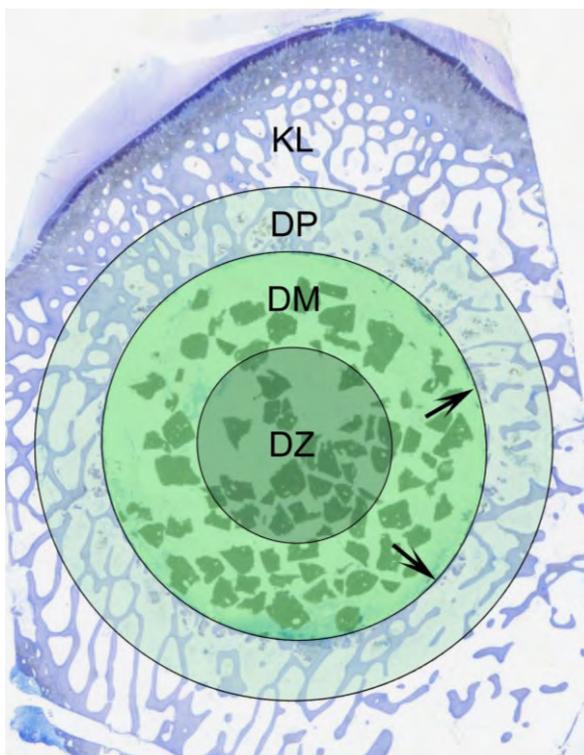
## 4 Ergebnisse

### 4.1 Versuchstiere

Der Heilungsverlauf *post operationem* gestaltete sich bei allen operierten Schafen komplikationslos, demzufolge fanden auch Präparate aller Tiere Eingang in die nachfolgenden Untersuchungen.

### 4.2 Auswertungsgrundlage

Zur adäquaten und differenzierten Dokumentation der in den Defekten stattgefundenen histologischen und zellulären Abläufe wurde bei der nachfolgenden Beschreibung der Defekte die von von Dörnberg (2005) eingeführte Systematik in modifizierter Weise angewandt. Diese beinhaltet, wie in Abbildung 7 dargestellt, die ringförmige Einteilung eines Defektes von peripher nach zentral. Insgesamt ergeben sich drei Zonen: die äußere Zone umfasst die Defektperipherie (DP), welche innerhalb des Knochenlagers (KL) liegt und von Granulationsgewebe und Fettgewebsnekrosen geprägt wird. Den Abschluss der DP bildet stets die Bohrkante (BK). Daran schließt sich die Defektmitte (DM) an, während die zentralen Regionen des Defektes das Defektzentrum (DZ) repräsentieren (Abb. 7).



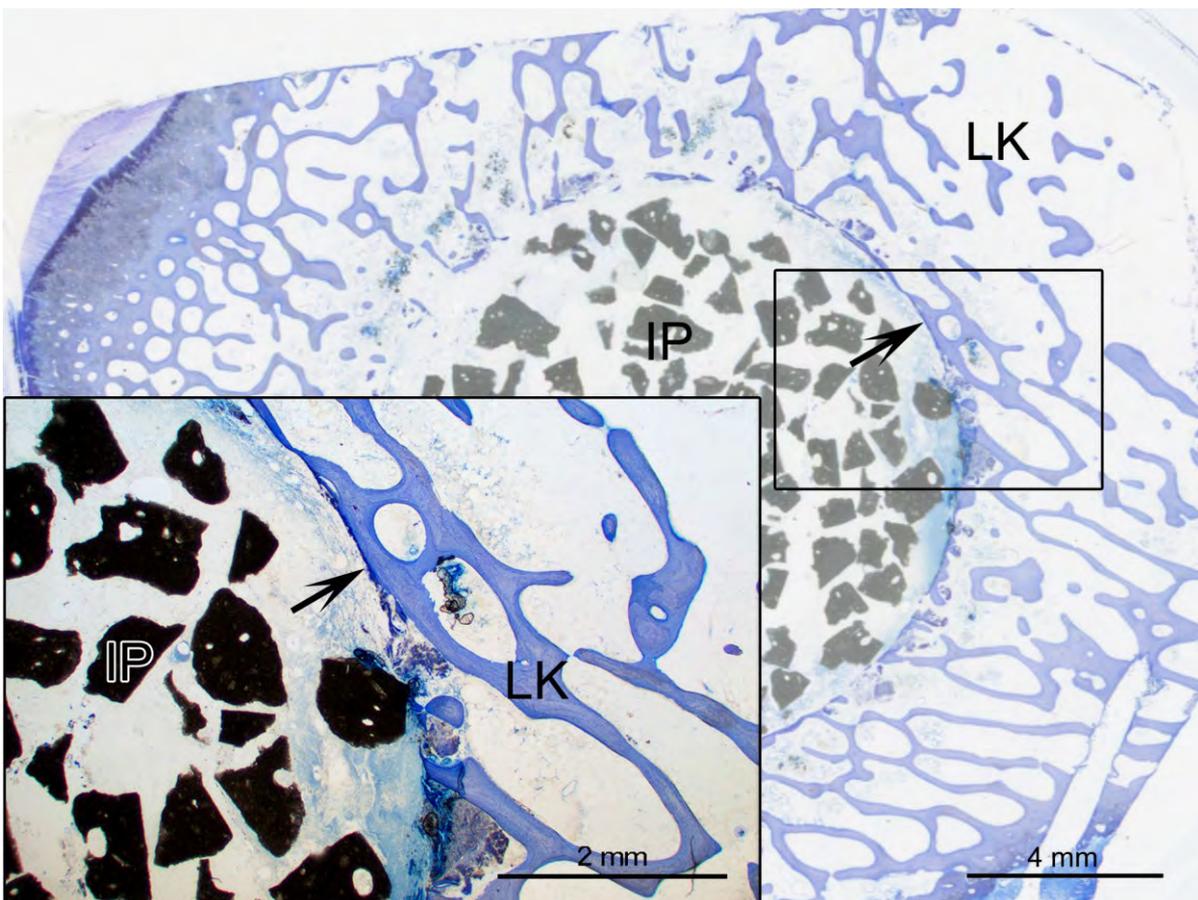
**Abbildung 7:** modifiziert nach von Dörnberg (2005): schematische Einteilung des Defektes: Knochenlager (KL), Defekt-Peripherie (DP), Defekt-Mitte (DM), Defekt-Zentrum (DZ); Bohrkante (↘). Scan.

### 4.3 Gruppe I: TCP-Zement

#### 4.3.1 Histologie:

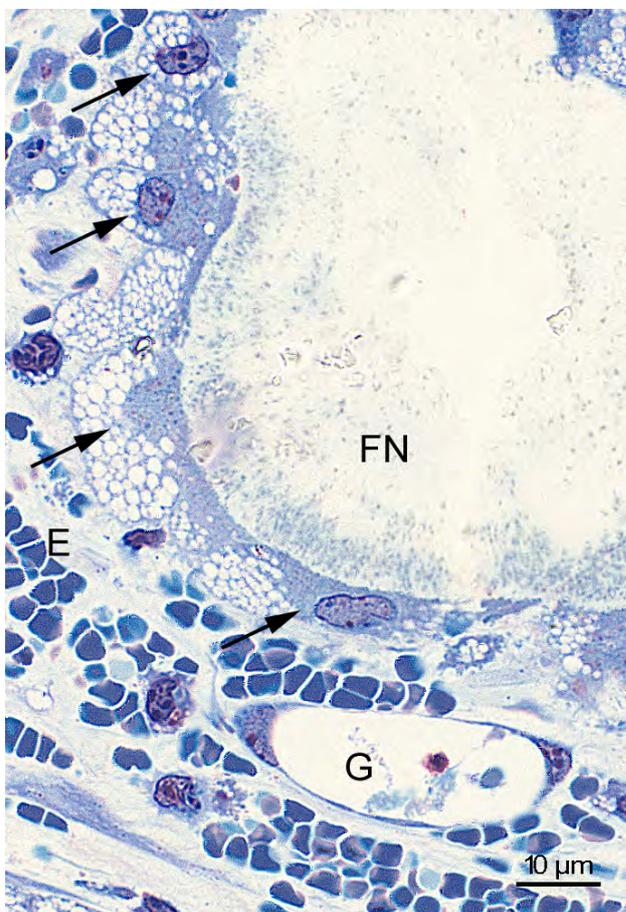
Bei den Schafen der Gruppe I stellt sich das TCP in den Defekten bei Betrachtung der Dünnschliff-Präparate in Form von grauen, unregelmäßig großen und unregelmäßig geformten Solitärpartikeln dar. Diese füllen den gesamten Defekt gleichmäßig von der Defektperipherie bis zum Defektzentrum aus und liegen in unregelmäßigen Abständen zur Bohrkante.

Schon in der Übersicht (Abb. 8) ist zellreiches Granulationsgewebe zwischen den Partikeln zu erkennen. In dem Lagerknochen der Defektperipherie beginnend setzt es sich bis in die Defektmitte zwischen die Bohrkante und die ersten Implantat-Fragmente fort. Auch das Zentrum des Defektes ist bereits von Zellen erschlossen.



**Abbildung 8:** Mit fragmentierten, grauen TCP-Partikeln (IP) gefüllter, vollständig zellulär erschlossener Defekt. Lagerknochen (LK) stellt sich blau dar, Bohrkante ist durch Pfeile (↗) markiert. Dünnschliff T7200, Scan, Toluidinblau.

Im intakten Knochenlager, bestehend aus Spongiosa und zwischen den Knochenbälkchen liegendem Fettmark, ist ausgehend von den Knochenbälkchen eine Tendenz zur Knochenneubildung zu erkennen. Einkernige Zellen, die als Osteoblasten zu identifizieren sind, liegen ein- oder zweischichtig epitheloid oder kubisch geformt der Oberfläche der Knochenbälkchen an und sorgen für eine Verstärkung des Lagerknochens vor allem in Richtung der Bohrkante. Polykaryen sind defektfern entlang der Oberflächen des spongiösen Lagers nur vereinzelt zu sehen, in der Defektperipherie nahe der Bohrkante nimmt ihre Zahl jedoch deutlich zu. Zwischen den Knochenbälkchen im Bereich der Defektperipherie liegt Fettmark, welches in Richtung Bohrkante zunehmend von Bindegewebsfasern durchzogen wird: Sind im intakten Knochenmark des Knochenlagers nur vereinzelt Fibrozyten zu

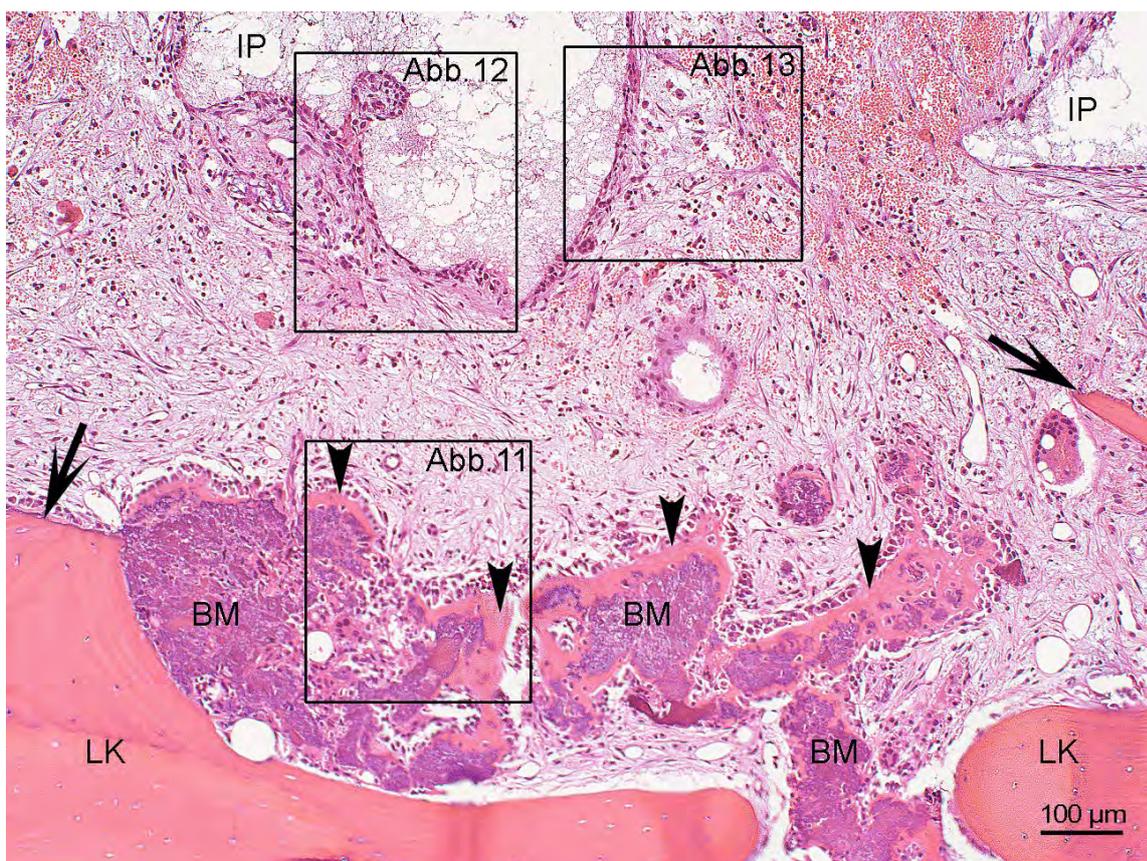


**Abbildung 9:** Ausschnitt aus der Defektperipherie nahe der Bohrkante: Makrophagen (↗) an Fettgewebsnekrosen (FN), freie, extravasal liegende Erythrozyten (E) und ein Gefäß (G). Semidünnschnitt, Toluidin-Safranin O.

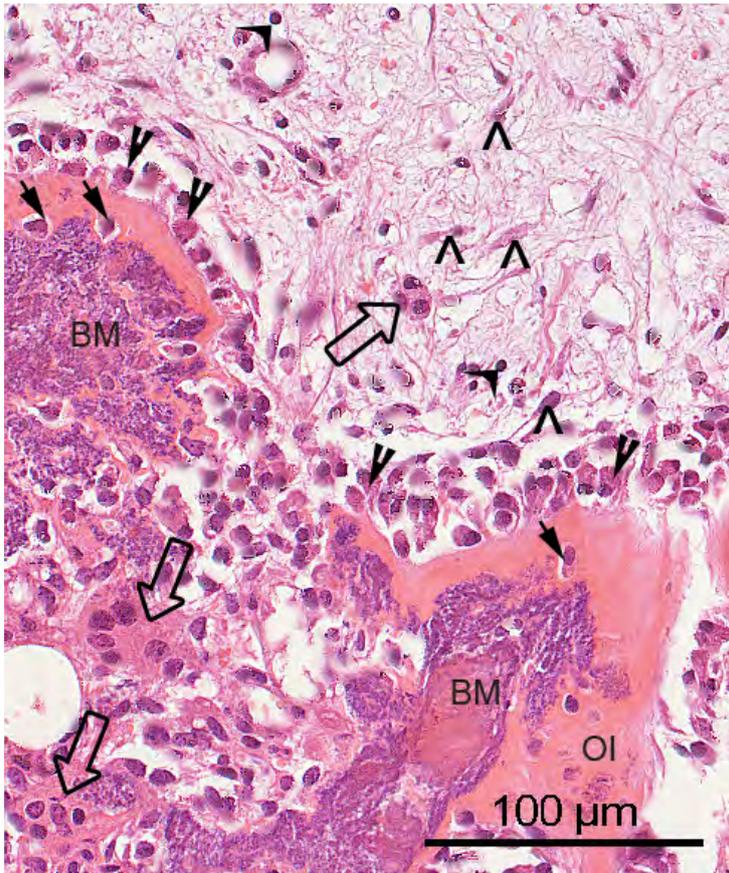
erkennen, so sind in der Peripherie des Defektes in Richtung Bohrkante zunehmend auch Fibroblasten anzutreffen. In regelmäßigen Abständen zur Bohrkante sind, eingeschlossen in dieses faserreiche Bindegewebe, innerhalb der Defektperipherie Nekrosen des Fettmarks zu sehen. Anliegend an diese Bereiche sind vor allem ein- aber auch mehrkernige, polymorphe Zellen der monozytären Linie zu sehen (Abb. 9). Das die Nekrosen umgebende Bindegewebe findet Anschluss an das bis in das Defektzentrum reichende Granulationsgewebe. Neben den an die nekrotischen Areale anliegenden Zellen wird es durch zahlreiche Gefäß-Anschnitte sowie durch das Vorkommen von Zellen der Erythropoese, Monozyten, Makrophagen, Lymphozyten und wenigen neutrophilen

Granulozyten charakterisiert, die frei in dem Netzwerk aus Fibrozyten und Fibroblasten vorkommen. Ferner fällt ein zunehmendes Aufkommen an freien Erythrozyten auf (Abb. 9).

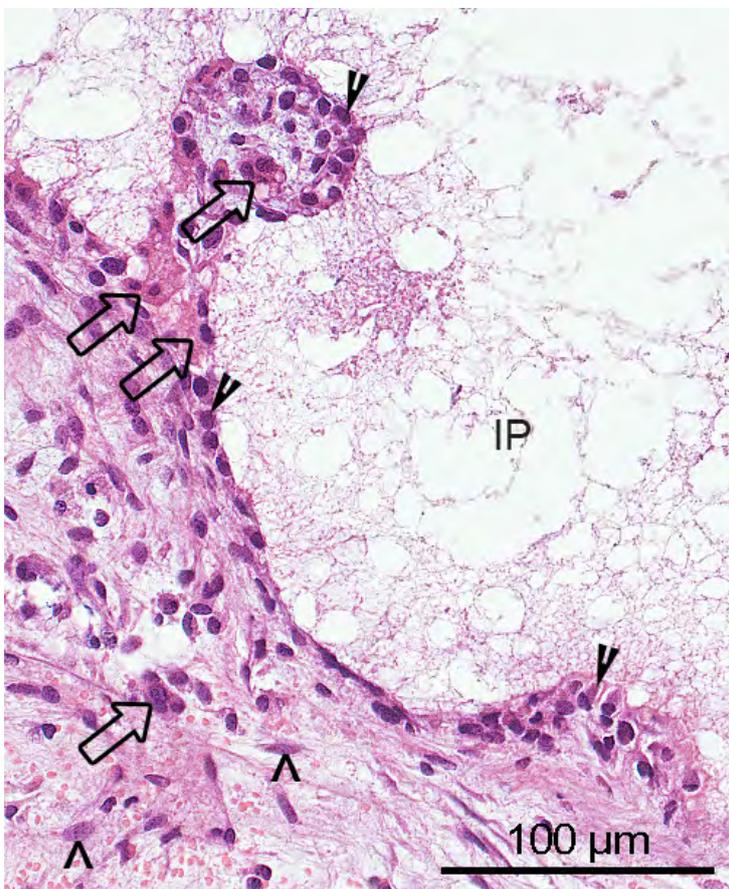
Entlang der Bohrkante liegen Bohrmehlpartikel zwischen den Knochenbälkchen der Defektperipherie, deren Oberflächen von mehrschichtigen Osteoblastensäumen belegt sind. Diese haben zum Teil schon deutlich sichtbare Mengen Osteoid gebildet (Abb. 10, Abb. 11). An unbesetzten Bereichen des Bohrmehls liegen, den Osteoblasten benachbart, Makrophagen sowie Polykaryen, die bis zu 8 Zellkerne in der Schnittebene aufweisen (Abb. 11). Die mit dem Bohrmehl assoziierten multinukleären Zellen haben eine abgeflachte Form. Sie dehnen sich entlang des zu phagozytierenden Materials aus und weisen deutlich intrazytoplasmatische Anschnitte von phagozytiertem Bohrmehl auf. An den Knochenbälkchen der Bohrkante überwiegen ebenfalls multinukleäre Zellen, die in dem Saum von Osteoblasten zu liegen kommen.



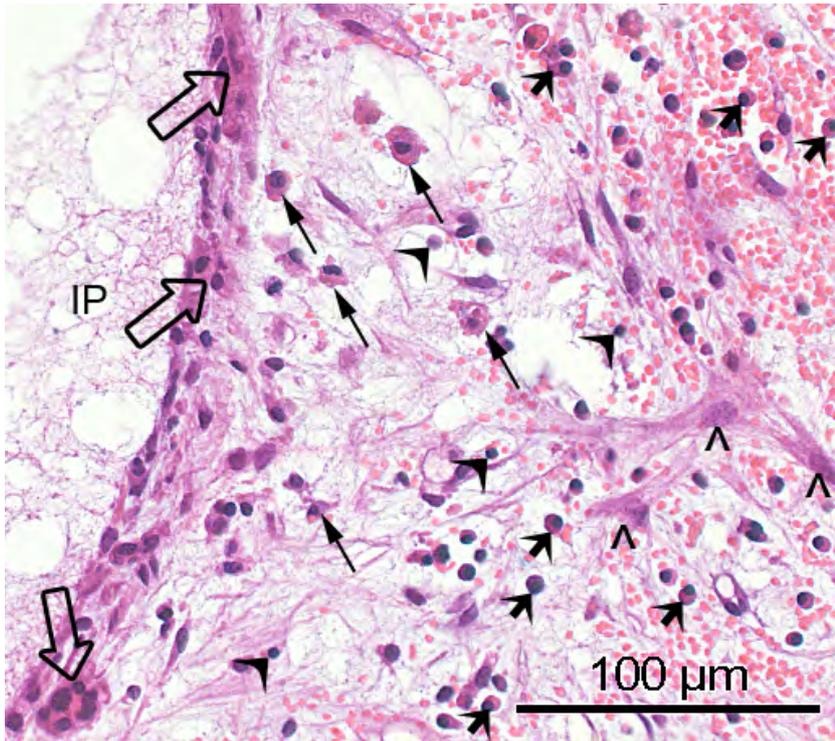
**Abbildung 10:** Übergang Peripherie zur Defektmittle: Erkennbar die deutliche Knochenneubildung (▼) am Bohrmehl (BM) sowie die Ausbildung von zellreichem Granulationsgewebe zwischen der Bohrkante (↘) am Lagerknochen (LK) und den Implantat-Partikeln (IP). Paraffin, HE.



**Abbildung 11:** Ausschnitt aus Abb.10. Übergang von Defektperipherie in Defektmittle: neben Bohrmehl (BM) phagozytierenden Polykaryen (↔) ist die intensive Besiedelung von Osteoid (OI)-produzierenden Osteoblasten (▼) und bereits eingemauerten Osteozyten (▾) zu sehen. Im faserreichen Granulationsgewebe liegen Fibrozyten (△), Lymphozyten (▿) und runde Polykaryen. Paraffin, HE.



**Abbildung 12:** Ausschnitt aus Abb.10. Granulationsgewebe am Interface: Anliegend an die TCP-Partikel (IP) sind Osteoblasten (▼), Polykaryen (↔) und Fibrozyten (△) zu identifizieren. Paraffin, HE.



**Abbildung 13:**

Granulationsgewebe am Interface, Aus-schnitt aus Abb.10:

IP: TCP-Partikel

Fibroblasten (Λ)

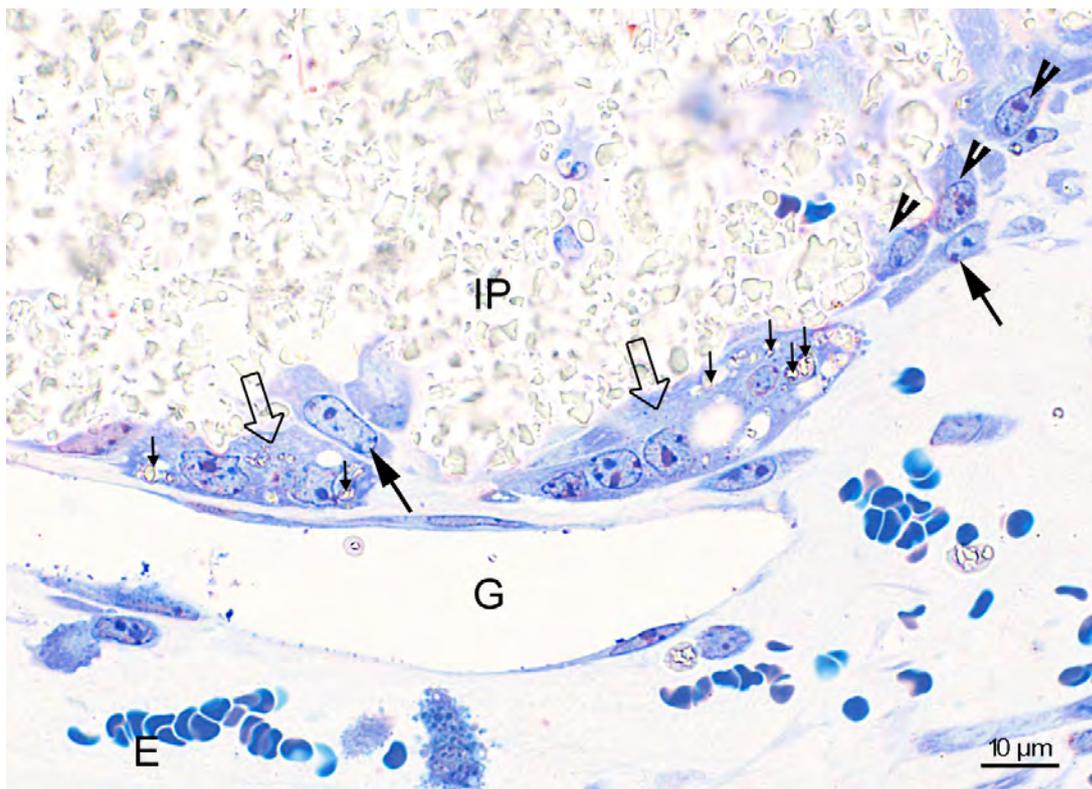
Lymphozyten (▽)

Makrophagen (↖)

Polykaryen (⊃)

Plasmazellen (↗)

Paraffin, HE.



**Abbildung 14:** Interface im mittleren Defektbereich: Makrophagen (↖) und Polykaryen (⊃) mit zytoplasmatischen Einschlüssen gleicher Anfärbbarkeit und Struktur wie der implantierte Knochenersatzstoff (↓) sowie benachbarte Osteoblasten (↗) liegen entlang der Oberfläche eines TCP-Partikels (IP). Außerdem ein unmittelbar dem Zement grenzendes Gefäß (G) und frei vorkommende Erythrozyten (E). Semidünnschnitt, Toluidinblau-Safranin O.

Das faserreiche Bindegewebe setzt sich im mittleren Defektbereich fort und bildet die Grundlage des Granulationsgewebes: die Fibrozyten vor allem aber die zahlenmäßig überwiegenden Fibroblasten orientieren sich entlang der soliden Strukturen des Defektareals, welche durch die Bohrkante und die Zement-Partikel repräsentiert werden. Das Granulationsgewebe ist mit Erythrozyten angereichert, die sowohl extravasal als auch innerhalb von kleinen und kleinsten Gefäßen zu sehen sind. An Entzündungszellen dominieren Makrophagen, Monozyten und Lymphozyten, es sind weiterhin Plasmazellen sowie wenige mehrkernige Zellen zu sehen (Abb. 13). Die Zusammensetzung des Gewebes in der Umgebung der TCP-Partikel der Defektmitte ist unterschiedlich: Entlang der Partikel-Oberflächen in der Nähe von Bohrmehl dominieren neben hochprismatischen sehr aktiven Osteoblasten Makrophagen und Polykaryen, die nur selten mehr als 5 Kerne in der Schnittebene aufweisen (Abb. 12, 13). Bei diesen Zellen lassen sich phagozytierte Implantatpartikel im Zytoplasma nachweisen (Abb. 14). An weiter zentral in den Defekten gelegenen Partikeln sind vorwiegend mononukleäre Phagozyten zu sehen.

Zwischen den Partikeln nimmt die Dichte der Fibroblasten in Richtung Defektzentrum ab, die Matrix geht in ein Erythrozyten-reiches Fibrin-Netzwerk über. Am Übergang zum Defektzentrum dominieren neutrophile Granulozyten, Fibroblasten sind nicht zu sehen. Zwischen den Erythrozyten sind außerdem Plasmazellen und Lymphozyten zu erkennen. Innerhalb des Defektzentrums ist das Zellbild sehr homogen: Hier sind in dem Fibrin-Netzwerk interpartikulär und am Implantat vor allem neutrophile Granulozyten zu finden. Lymphozyten liegen nur vereinzelt vor. Makrophagen sind in den zentralen Bereichen des Defektes nicht zu identifizieren.

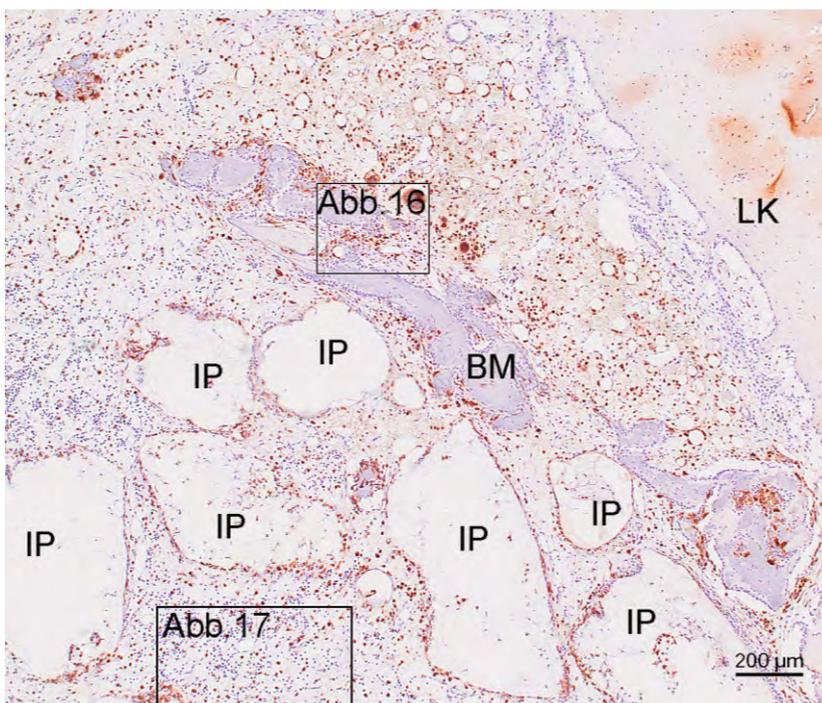
### **4.3.2 Immunhistochemie**

Die zum Nachweis von CD16 durchgeführten immunhistochemischen Untersuchungen führten auch nach thermischer und enzymatischer Antigendemaskierung nur zu unspezifischen Signalen.

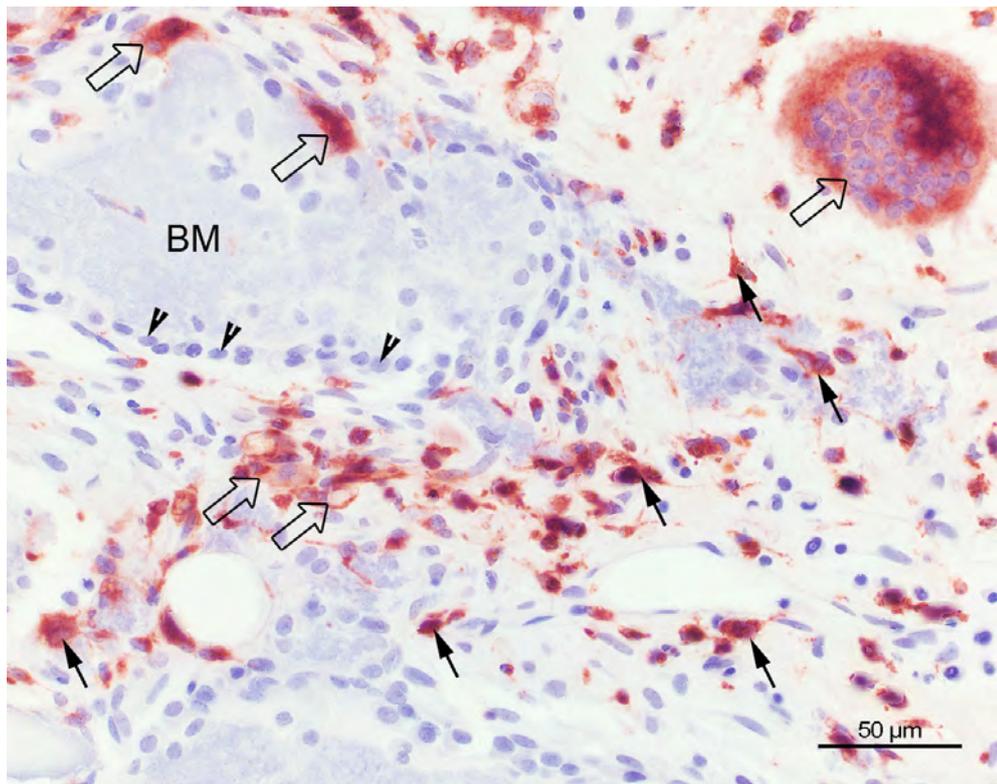
#### **4.3.2.1 CD68**

Mittels des CD68 Antikörpers können Monozyten, Makrophagen und Polykaryen monozytären Ursprungs deutlich visualisiert werden. Ihre intensive zytoplasmatische Färbung kennzeichnet sie als solche und unterscheidet sie markant von den übrigen nicht markierten Zellpopulationen (Abb. 15). Entlang der Oberflächen des

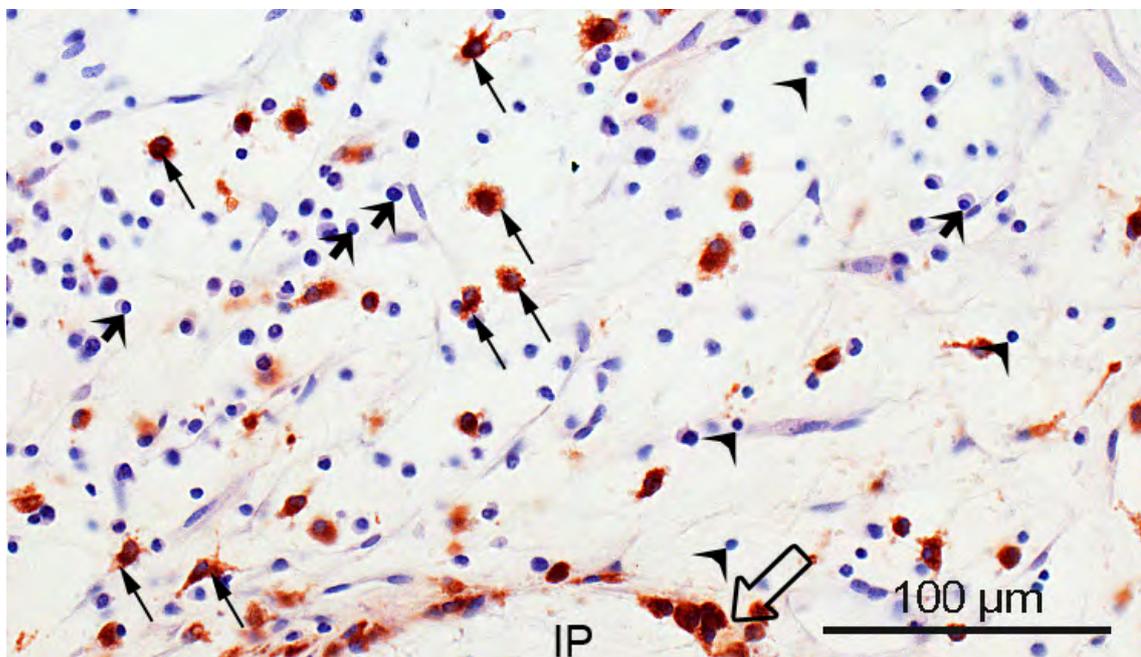
Knochenlagers sind die positiven Zellen meist 3-6 kernig, bei frei im Granulationsgewebe lokalisierten Zellen ist die Zahl der Kerne sehr variabel: Vorwiegend sind mononukleäre Makrophagen zu erkennen, aber auch mehrkernige, runde Polykaryen sind sicher aufgrund ihrer intensiven Färbung als Zellen monozytären Ursprungs anzusprechen. Sie dominieren innerhalb der Defekte in Bereichen der Bohrkante am Übergang von der Peripherie zur Defektmittle. Vor allem in Nachbarschaft zum dort lokalisierten Bohrmehl ist eine hohe Zahl markierter multinukleärer Zellen zu sehen (Abb. 16). Im Granulationsgewebe des mittleren Defektbereiches sind hauptsächlich mononukleäre Zellen detektiert. Diese liegen gleichmäßig verteilt im Netzwerk aus Fibrozyten und Fibroblasten (Abb. 17). Auch entlang der Implantatoberflächen in der Defektmittle sind die detektierten Zellen vorwiegend einkernig, die markierten Polykaryen haben nur selten mehr als 5 Kerne und heben sich deutlich von den nicht markierten neutrophilen segmentkernigen Granulozyten im Defektzentrum ab. Im Defektzentrum sind nur noch sehr vereinzelt mononukleäre Zellen zu detektieren. Daraus ergibt sich ein Gradient, der durch eine markante Häufung von positiven Zellen um die Fettgewebsnekrosen in der Peripherie der Defekte und in Bereichen der Bohrkante am Übergang zu den mittleren Defektbereichen gekennzeichnet wird, in Richtung Defektzentrum schwächer wird, bis in den Defektzentren schließlich keine CD68-positiven Zellen mehr zu sehen sind.



**Abbildung 15:** Übersicht über den Bereich nahe der Bohrkante. Konzentration von markierten Zellen in der Defektperipherie zwischen Lagerknochen (LK) und Bohrmehl (BM) und in der Defektmittle am Implantat (IP). Paraffin, CD68.



**Abbildung 16:** Ausschnitt aus Abb.15: Im Übergangsbereich der Peripherie zur Defektmittle finden sich assoziiert mit Bohrmehl (BM) Osteoblasten (↘), Makrophagen (↗) und Polykaryen (↗). Paraffin, CD68.



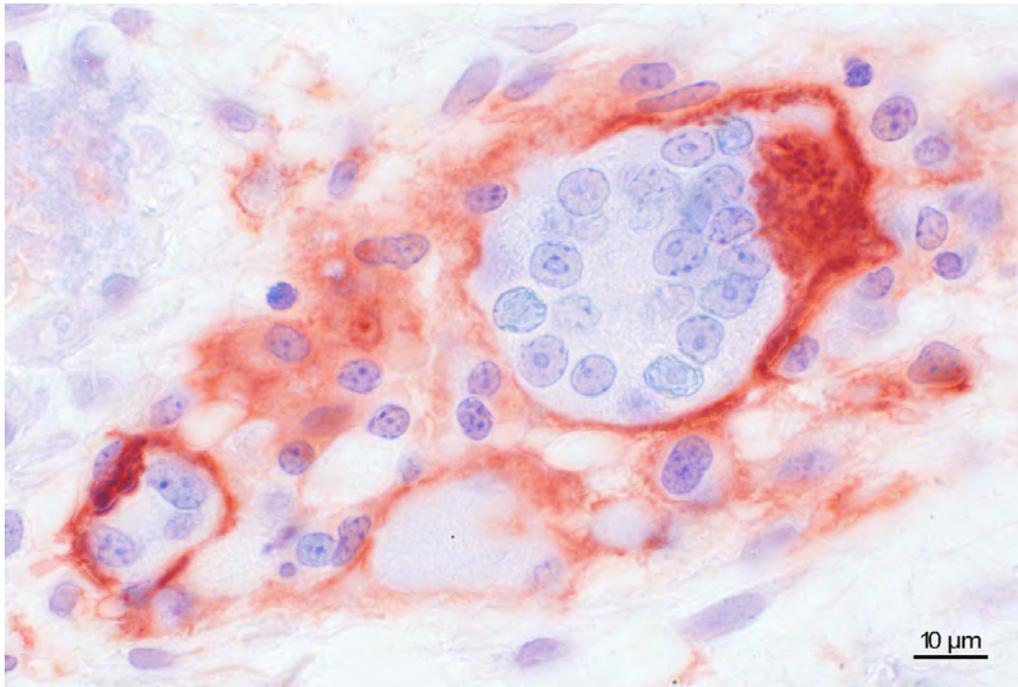
**Abbildung 17:** Ausschnitt aus Abb.15: Granulationsgewebe im mittleren Defektbereich. Die rot markierten, CD68-positiven Zellen sind frei im Granulationsgewebe vorkommend vorwiegend mononukleär (↗), anliegend an Implantat-Partikel (IP) lassen sich Polykaryen (↗) detektieren. Nicht markiert sind Plasmazellen (↗) und Lymphozyten (↗). Paraffin, CD68.

#### 4.3.2.2 CD44

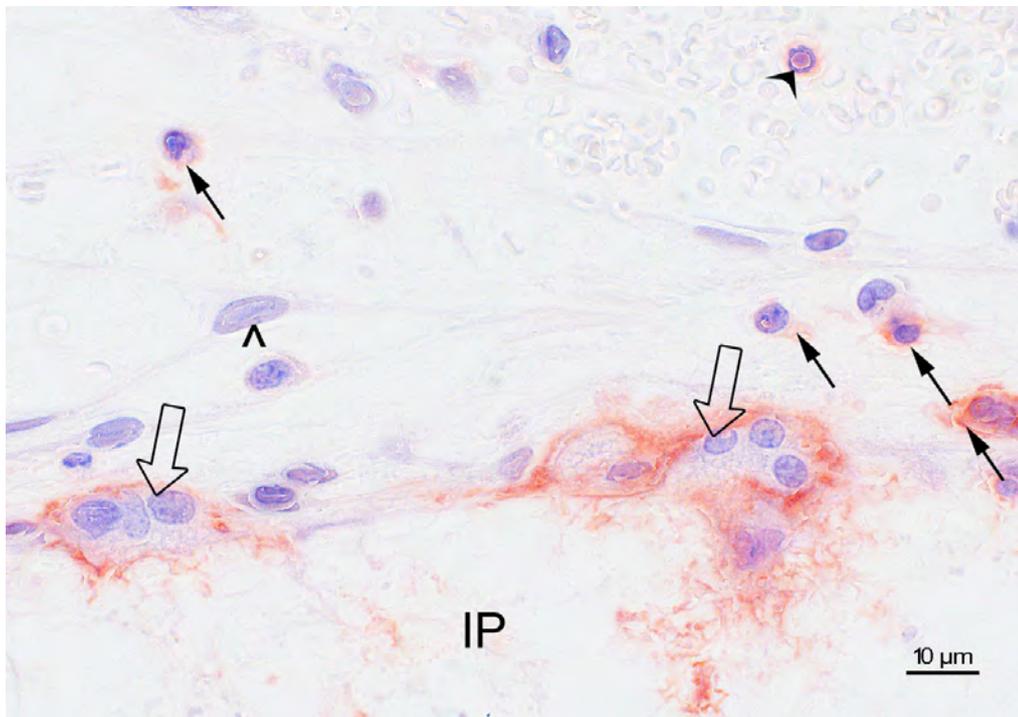
Bei allen Schafen mit TCP-gefüllten Defekten können CD44-positive Zellen nachgewiesen werden. Weil CD44 in seiner Eigenschaft als Hyaluronsäure-Rezeptor auf einer Vielzahl migrierender Zellen unterschiedlicher Herkunft und Funktion vorkommt, ergibt dieser Nachweis erwartungsgemäß auch in allen vorliegenden Präparaten kein auf die Zellen der monozytären Linie beschränktes Ergebnis. Neben Makrophagen und Polykaryen weisen auch aktivierte Lymphozyten und Osteozyten ein unterschiedlich stark ausgeprägtes Membran-assoziiertes Signal auf. Bei den Zellen monozytären Ursprungs ist das Färbesignal, abhängig von der Lokalisation der Zelle, entlang der gesamten Zellmembran oder nur abschnittsweise zu erkennen. Es gilt für alle Defektbereiche, dass adhärente Makrophagen und Polykaryen ein deutlich schwächeres Signal bis hin zum Signalverlust an der dem zu phagozytierenden Material zugewandten, apikalen Domäne der Zellmembran aufweisen.

In der Peripherie des Defektes sind in der Nähe der Fettgewebsnekrosen positive Zellen zu sehen. Diese positiven Zellen sind in der Regel vielkernig und zeigen, sofern sie den Nekrosen direkt anliegen, ein starkes Signal der basolateralen Zellmembran. In unmittelbarer Nachbarschaft sind häufig Gruppen von mononukleären Makrophagen zu finden, die ein vergleichsweise schwächeres aber noch deutliches erkennbares, zirkumferentes Signal zeigen. Ein ähnliches Bild ist am Bohrmehl zu beobachten: Neben den vielen nicht angefärbten Osteoblasten sind einige stark positive vielkernige Zellen zu sehen, umgeben von schwächer positiven mononukleären Makrophagen (Abb. 18). Frei im Granulationsgewebe innerhalb der Defektmittelpunkte sind Monozyten und Makrophagen ebenso wie Lymphozyten jeweils entlang der gesamten Membran markiert.

An den TCP-Partikeln nimmt die Zahl der positiven Zellen in Richtung des Defektzentrums ab: Es sind am Rand des mittleren Defektbereiches noch eindeutig positiv markierte mono- und multinukleäre Zellen anliegend an das TCP zu identifizieren (Abb. 19), zeigen sich in den zentralen Bereichen vor allem markierte Lymphozyten zwischen nicht markierten Granulozyten.



**Abbildung 18:** Dargestellt sind Polykaryen im peripheren Defektbereich nahe der Bohrkante mit einer vergleichsweise stärkeren Membranfärbung als die der umgebenden Makrophagen. Paraffin, CD44.

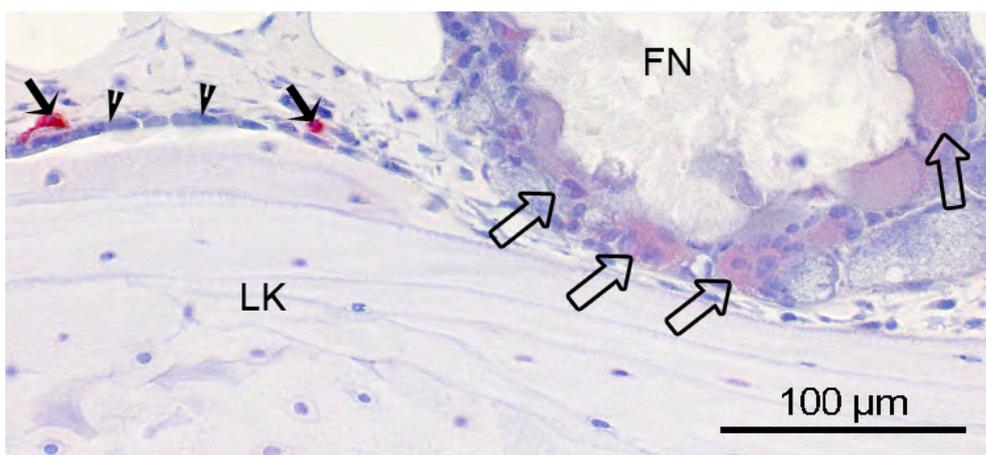


**Abbildung 19:** Situation am Interface der Implantat-Partikel (IP) im mittleren Defektbereich: Polykaryen (↓) und Makrophagen (↑) mit deutlich markierter Zellmembran erstrecken sich am Implantat umgeben von Granulationsgewebe bestehend aus Fibrozyten (↑), Makrophagen, Lymphozyten (↑) und Erythrozyten. Paraffin, CD44.

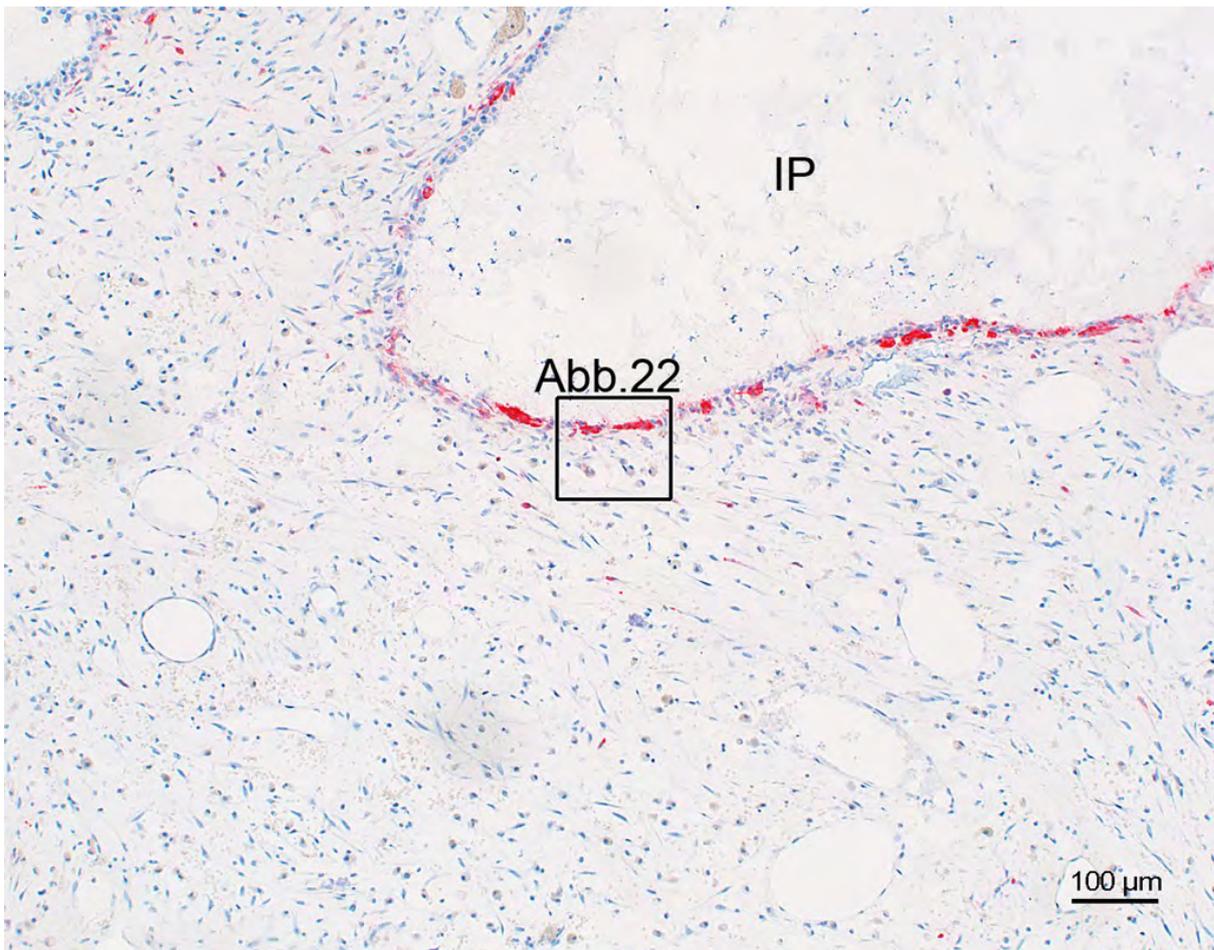
### 4.3.3 Enzymhistochemie - TRAP

Der enzymhistochemische Nachweis der Tartrat-resistenten sauren Phosphatase (TRAP) zeigt eindeutige Verteilungsmuster und -signale: Dem Lagerknochen anliegende Osteoklasten sind stark gefärbt, im intakten Fettmark des Lagerknochens sind keine positiven Zellen zu sehen. Die die Fettgewebsnekrosen umgebenden Polykaryen sind zum Teil nur sehr schwach angefärbt, verglichen mit der Signalintensität der TRAP-Färbung in direkter Nachbarschaft dem Lagerknochen anliegenden Polykaryen (Abb. 20).

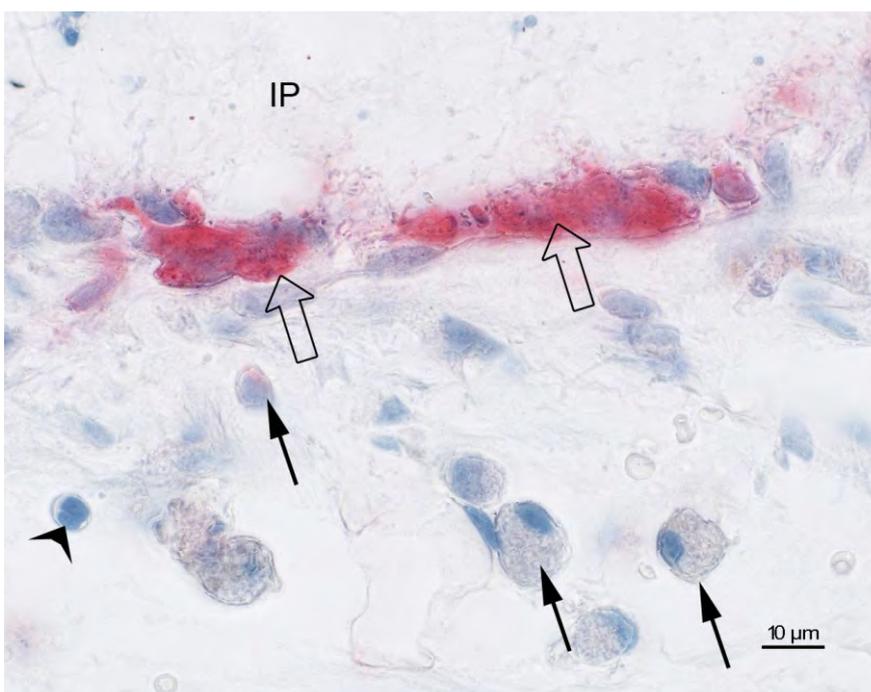
In der Defektperipherie nahe der Bohrkante nimmt sowohl die Zahl der am Lagerknochen anliegenden Polykaryen mit starkem Signal, als auch die der frei im Granulationsgewebe lokalisierten TRAP-positiven Zellen deutlich zu. Diese besitzen meist 1-5 Zellkerne. Die höchste Dichte an positiven Zellen findet sich entlang der in Nachbarschaft zur Bohrkante lokalisierten Bohrmehlpartikeln. Diesen liegen dicht nebeneinander aufgereiht große, vielkernige Zellen an. Innerhalb des Granulationsgewebes im mittleren Defektbereich sind nur wenige frei vorkommende positive Zellen zu sehen. Erst mit Kontakt zu den Implantat-Partikeln werden wieder TRAP-produzierende Zellen nachweisbar (Abb. 21, Abb. 22). Diese nehmen in Richtung Defektzentrum sowohl was ihre Anzahl als auch was ihre Zahl an Zellkernen betrifft ab, zentral können keine positiven Zellen mehr detektiert werden.



**Abbildung 20:** Im Knochenlager zeigen sich Polykaryen (↗) anliegend an Fettgewebsnekrosen (FN) nur schwach positiv markiert, während in der Nachbarschaft dem Lagerknochen (LK) mit seinem schmalen Saum an Osteoblasten (∇) stark positive Osteoklasten (∨) anliegen. Paraffin, TRAP.



**Abbildung 21:** Übersicht des interpartikulären Granulationsgewebes: TRAP-produzierende Zellen (rot) konzentrieren sich am Implantat, frei im Granulationsgewebe lassen sich nur wenige solcher Zellen finden. Paraffin, TRAP.



**Abbildung 22:** Ausschnitt aus Abbildung 21: Polykaryen (↖) anliegend an das Implantat (IP) zeigen ein stark positives Signal. Monozyten (↘) im Granulationsgewebe sind nicht angefärbt. Lymphozyten (↙). Paraffin, TRAP.

#### 4.3.4 Zusammenfassung Gruppe I: TCP

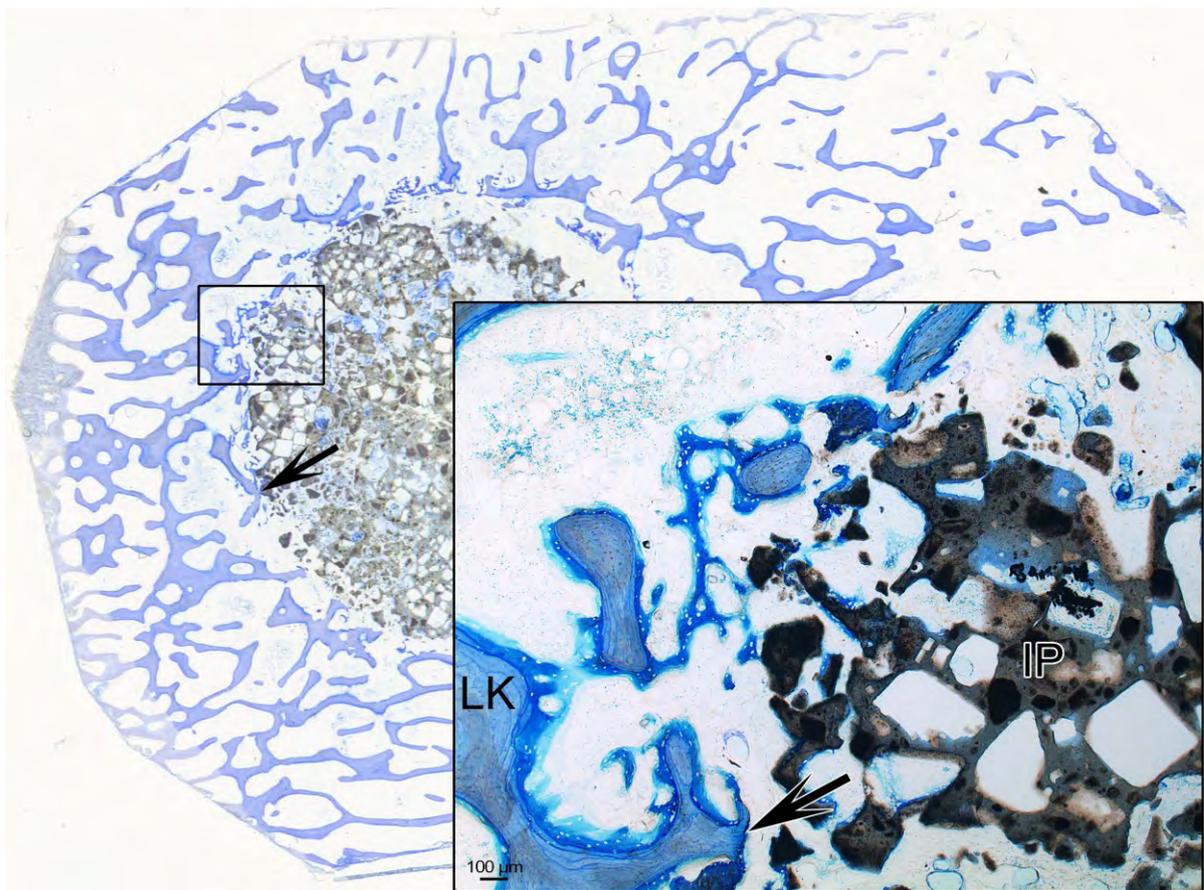
Bei den Defekten der untersuchten Schafen ergibt sich ein charakteristisches Erscheinungsbild: Fragmentierungs- und Lösungsvorgänge des Zementes *in situ* erlauben die Erschließung des Defektes durch Granulationsgewebe. Dabei zeigen die morphologischen sowie die immun- und enzymhistochemischen Untersuchungen, dass innerhalb eines Defektes verschiedene Phasen der Entzündung und damit der Heilung zeitgleich durchlaufen werden. Während an den Fettgewebnekrosen der Defekt-Peripherie eine von vielkernigen Riesenzellen dominierte Fremdkörperreaktion zu sehen ist, ist am Übergang zum mittleren Defektbereich nahe der Bohrkante der Übergang der Fremdkörperreaktion in eine chronische Entzündung festzustellen, für das die Dominanz der mononukleären Zellen (Monozyten, Makrophagen, Lymphozyten, Plasmazellen) spricht. Fusionsprozesse von mononukleären zu multinukleären Phagozyten haben erst vereinzelt stattgefunden. Frei im Granulationsgewebe finden sich vorwiegend mononukleäre Phagozyten. Die TCP-assoziierten Polykaryen der Defektmitte haben in der Regel nicht mehr als 5 Kerne in der Schnittebene, jedoch sind die starke Synthese von CD44 und das beinahe ausschließliche Vorkommen von mononukleären Phagozyten im bereits von Kapillaren erschlossenen Granulationsgewebe Indiz für bevorstehende Fusionsvorgänge am Implantat zur Steigerung der resorptiven Kapazität und damit erstes Indiz für eine bevorstehende Fremdkörperreaktion. In Richtung des Defektzentrums geht das Zellbild fließend in das einer späten akuten Entzündungsphase über. Dort sind vereinzelt Fibroblasten zu sehen, es dominieren segmentkernige, zum Teil pyknotische neutrophile Granulozyten in einer Fibrin-dominierten Matrix.

Die Besiedelung der Bohrkante, des defektnahen Lagerknochens inklusive der hier liegenden Bohrmehlpartikel sowie der benachbarten Zement-Partikel mit hochprismatischen Osteoblasten lässt eine von der Peripherie in das Zentrum fortschreitende Osteogenese erwarten.

## 4.4 Gruppe II: CaP-Granulat (Calcibon® Granules)

### 4.4.1 Histologie

Bei den mit CaP-Granulat versorgten Defekten ist in der Übersichtshistologie der Knochenersatzstoff als unregelmäßig geformte, graue, partikuläre Substanz mit geometrischen Poren innerhalb des gebohrten Defektes zu erkennen. Schon auf den ersten Blick fallen die vom Lagerknochen der Defektperipherie ausgehenden Knochenneubildungsprozesse auf, die sich auch entlang der Knochenersatzstoff-Oberflächen im mittleren Defektbereich anliegend an die Bohrkante nachvollziehen lassen (Abb. 23). Sowohl in den Poren des implantierten Materials als auch zwischen den Partikeln ist Granulationsgewebe zu erkennen, das die Partikel vollständig umschließt.

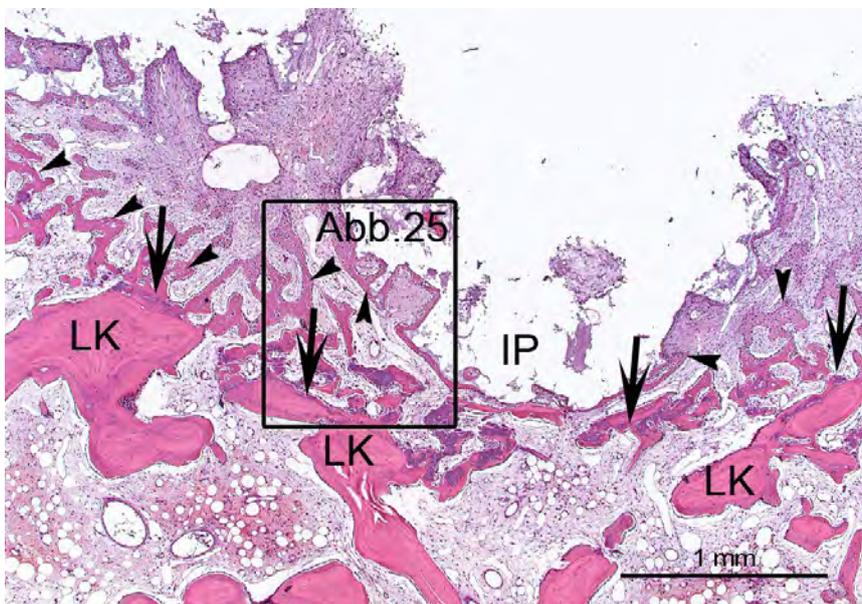


**Abbildung 23:** Das poröse CaP-Granulat (dunkelgrau, IP) füllt den Defekt vollständig aus. Im Bereich der Bohrkante fällt der leuchtend blau gefärbte neugebildete Knochen auf, der den Bereich der Bohrkante ( ↙ ) umgibt und sich ausgehend vom Lagerknochen (LK) auf die Implantat-Partikel ausdehnt. (Ausschnitt). Dünnschliff T7200, Toluidin-Blau. Scan.

Stärkere Vergrößerungen zeigen, dass sich der Lagerknochen fern des Defektes in einem für das Alter der Tiere physiologischen Zustand befindet. Dort sind die verschiedenen Phasen des Remodelings zu erkennen: Knochenabbau durch Osteoklasten, Knochenaufbau durch Osteoblasten, sowie inaktive Areale. Zwischen den spongiösen Knochenbälkchen liegt zellarmes Fettmark.

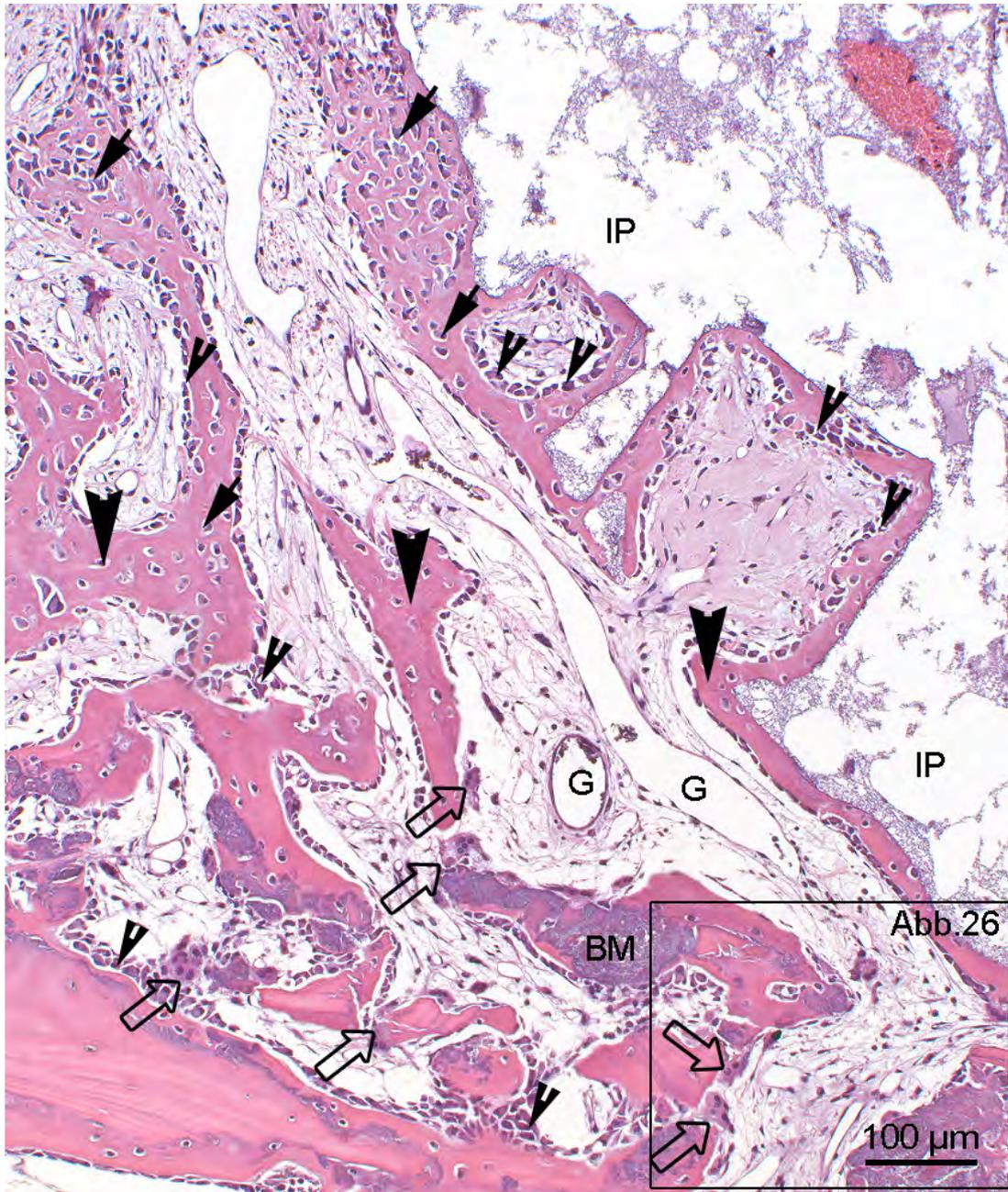
Mit zunehmender Annäherung an die Bohrkante stößt man in der Peripherie des Defektes auf Nekrosen des Fettmarks, die von Makrophagen oder mehrkernigen Phagozyten umgeben sind. Diese Nekrosen werden von Granulationsgewebe umschlossen, welches sich in diesem Bereich vorwiegend aus Fibrozyten, Fibroblasten, sowie Gefäßen, Erythrozyten, und mononukleären Entzündungszellen zusammensetzt. Frei und oft gruppenweise in dem Gerüst aus faserreichem Bindegewebe vorkommende Phagozyten sind sowohl ein- als auch mehrkernig. Den Knochenbälkchen anliegend sind, ein- oder mehrschichtig angeordnet, kubisch geformte Zellen zu sehen, die stellenweise bereits von Osteoid umgeben sind. Die Zellen sind als Osteoblasten, respektive als junge Osteozyten, anzusprechen. Diese Knochenneubildung betrifft den Lagerknochen der Defektperipherie, setzt sich über die Bohrkante hinaus bis in den mittleren Defektbereich fort und verbindet so den Lagerknochen mit dem eingebrachten Granulat (Abb. 24).

In der Defektperipherie nimmt mit zunehmender Nähe zu der Bohrkante auch die Zahl an mehrkernigen Phagozyten zu, die vor allem den Bohrmehl-Partikeln und dem Lagerknochen anliegen. Die phagozytierenden Zellen weisen, entlang der Knochenoberfläche, eine gestreckte Form mit basaler Aufhellung des Zytoplasmas auf und

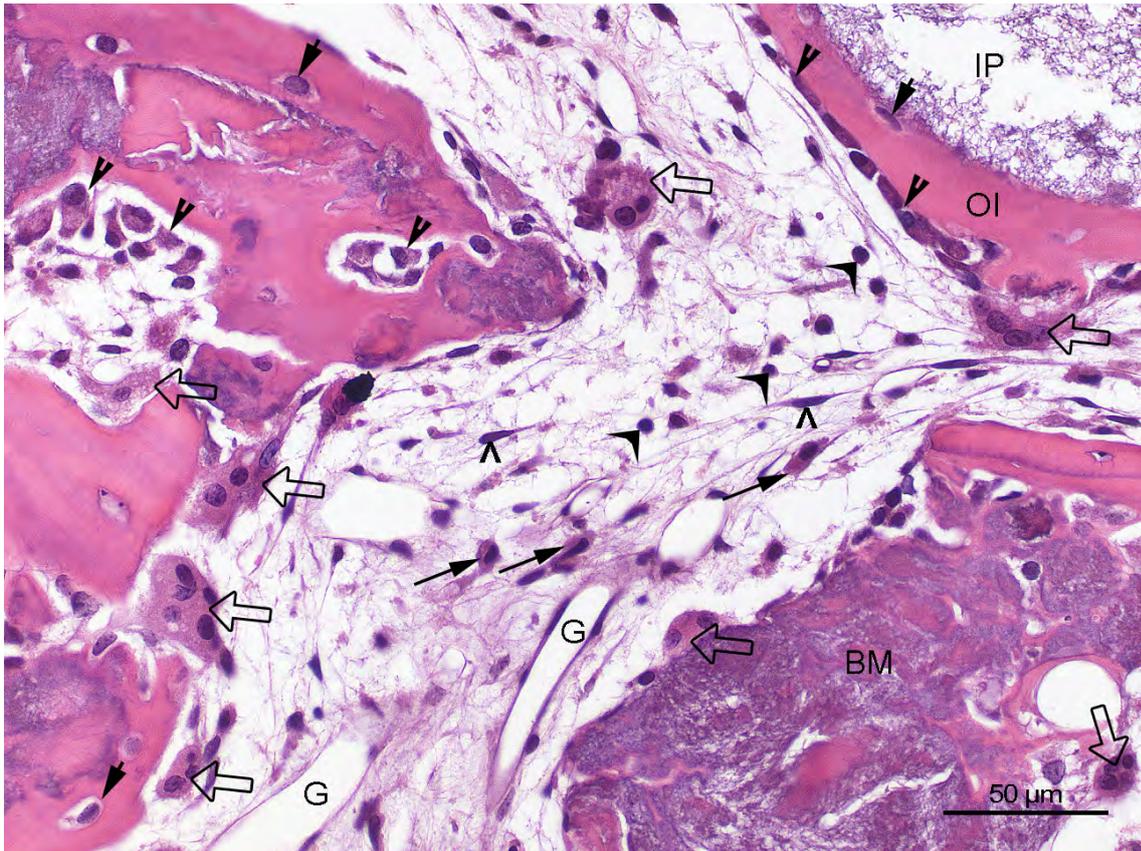


**Abbildung 24:** Neu formierte Knochenbälkchen (  $\blacktriangle$  ) orientieren sich ausgehend von der Bohrkante (  $\blacktriangledown$  ) des Lagerknochens (LK) in Richtung auf den mit Knochenersatzmaterial (IP) befüllten Defekt. Paraffin, HE.

eine in apikale Richtung orientierte Anordnung der durchschnittlich 2-5 Zellkerne. Frei im Granulationsgewebe finden sich aber auch mehrkernige, rundliche Zellen mit unregelmäßiger Anordnung der Kerne.



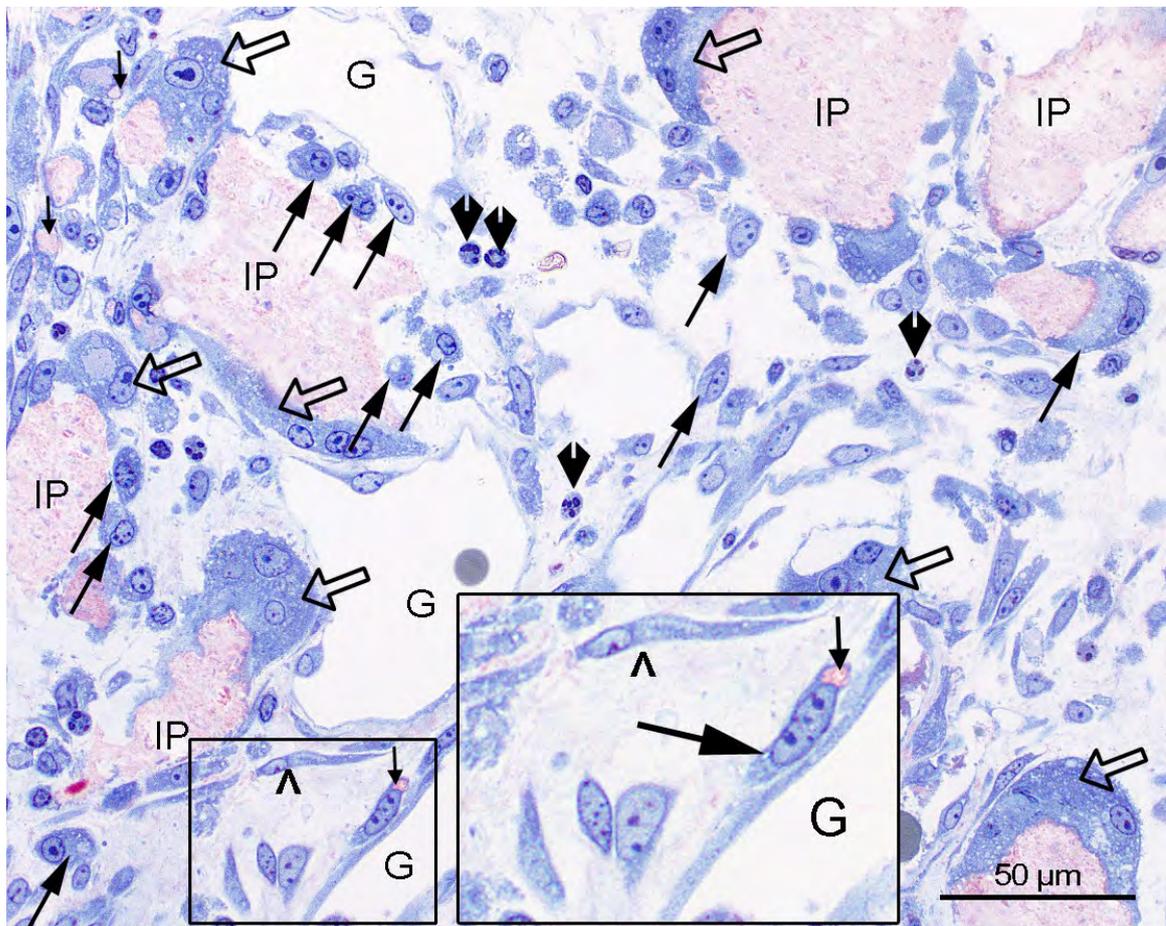
**Abbildung 25:** Ausschnittvergrößerung aus Abb. 24: Granulationsgewebe im mittleren Defektbereich zwischen Bohrkante (↗) und CaP-Granulat (IP). Polykaryen (◄=) sind vereinzelt zu sehen. Kubisch bis epitheloid geformte Osteoblasten (▾) dominieren diesen Bereich. Neu formierter Knochen (▼) mit Osteozyten (↗) schafft über Bohrmehlpartikel (BM) eine Verbindung zwischen dem Lagerknochen und dem Knochenersatzmaterial. Darüber hinaus sind Gefäße (G) im Anschnitt zu sehen. Paraffin, HE.



**Abbildung 26:** Ausschnitt aus Abbildung 25: Polykaryen (↔) mit 2-7 Kernen liegen Bohrmehlpartikeln (BM) und Osteoid (OI) an, oft benachbart von kubischen sowie epitheloiden Osteoblasten (♣) und Osteozyten (♣). Im Granulationsgewebe, dessen Grundlage Fibrozyten (^) bilden, sind neben Gefäßanschnitten (G) runde, mehrkernige Phagozyten sowie Makrophagen (♣) und Lymphozyten (♣) zu sehen. Paraffin, HE.

Die zelluläre Zusammensetzung ändert sich im mittleren Bereich des Defektes zunächst nicht: Zwischen den Fibrozyten und den zunehmend vorkommenden Fibroblasten produzieren Osteoblasten ausgehend von Spongiosabälkchen des Lagers Osteoid (Abb. 25, 26). An dem neu gebildeten Knochen finden sich dort, wo keine Osteoblasten die Oberfläche besiedeln, auch mehrkernige Phagozyten. Desweiteren liegen Lymphozyten, Makrophagen und Polykaryen frei im Granulationsgewebe und es sind Anschnitte von neu formierten Gefäßen zu erkennen. An den Granulat-Partikeln sowie innerhalb von deren Poren liegen Osteoblasten, eingemauerte Osteozyten und Polykaryen, welche zum Teil intrazytoplasmatische Einschlüsse von phagozytiertem Material erkennen lassen (Abb. 27). Dies ist vor allem in den peripheren Bereichen der Defektmittle zu beobachten, wo bereits eine knöcherne Verbindung zwischen Werkstoff und Lagerknochen besteht (Abb. 25, 26, 27).

Bei beiden Tieren dieser Gruppe nimmt die Zahl der Lymphozyten in Richtung Defektzentrum zu, außerdem sind zunehmend mehr segmentkernige, neutrophile Granulozyten zu identifizieren. Mit der Zunahme an neutrophilen Granulozyten nimmt die Zahl der Makrophagen und die Zahl der Zellkerne der Riesenzellen ab. Im Zentrum des Defektes sind nur noch neutrophile Granulozyten zu sehen. Ein auffälliger Unterschied zwischen den Individuen besteht in der Anzahl der Zellkerne (die jeweils in der Schnittebene des Präparates zu sehen sind) bei den frei im mittleren Defektbereich vorkommenden Polykaryen: Dominieren bei einem Tier mit relativ wenig und vereinzelt liegenden Lymphozyten die 2-5 kernigen Phagozyten, so sind bei dem anderen Tier mit einer höheren Zahl an Lymphozyten einzelne Zellen mit bis zu 20 Zellkernen innerhalb des Granulationsgewebes von Defektperipherie und Defektmitte zu finden.



**Abbildung 27:** Mittlerer Defektbereich: Anliegend an die Granulat-Partikel (IP) sind Polykaryen (↪) zu sehen. Darüber hinaus sind im Granulationsgewebe Gefäße (G), Fibrozyten (A) sowie Makrophagen (M) zum Teil mit phagozytiertem CaP (↓, Inset) zu erkennen. Vereinzelt sind auch neutrophile Granulozyten (▼) zu sehen. Semidünnschnitt, Toluidinblau + Safranin O.

#### 4.4.2 Immunhistochemie

Die zum Nachweis von CD16 durchgeführten immunhistochemischen Untersuchungen führten auch nach thermischer und enzymatischer Antigendemaskierung nur zu unspezifischen Signalen.

##### 4.4.2.1 CD68

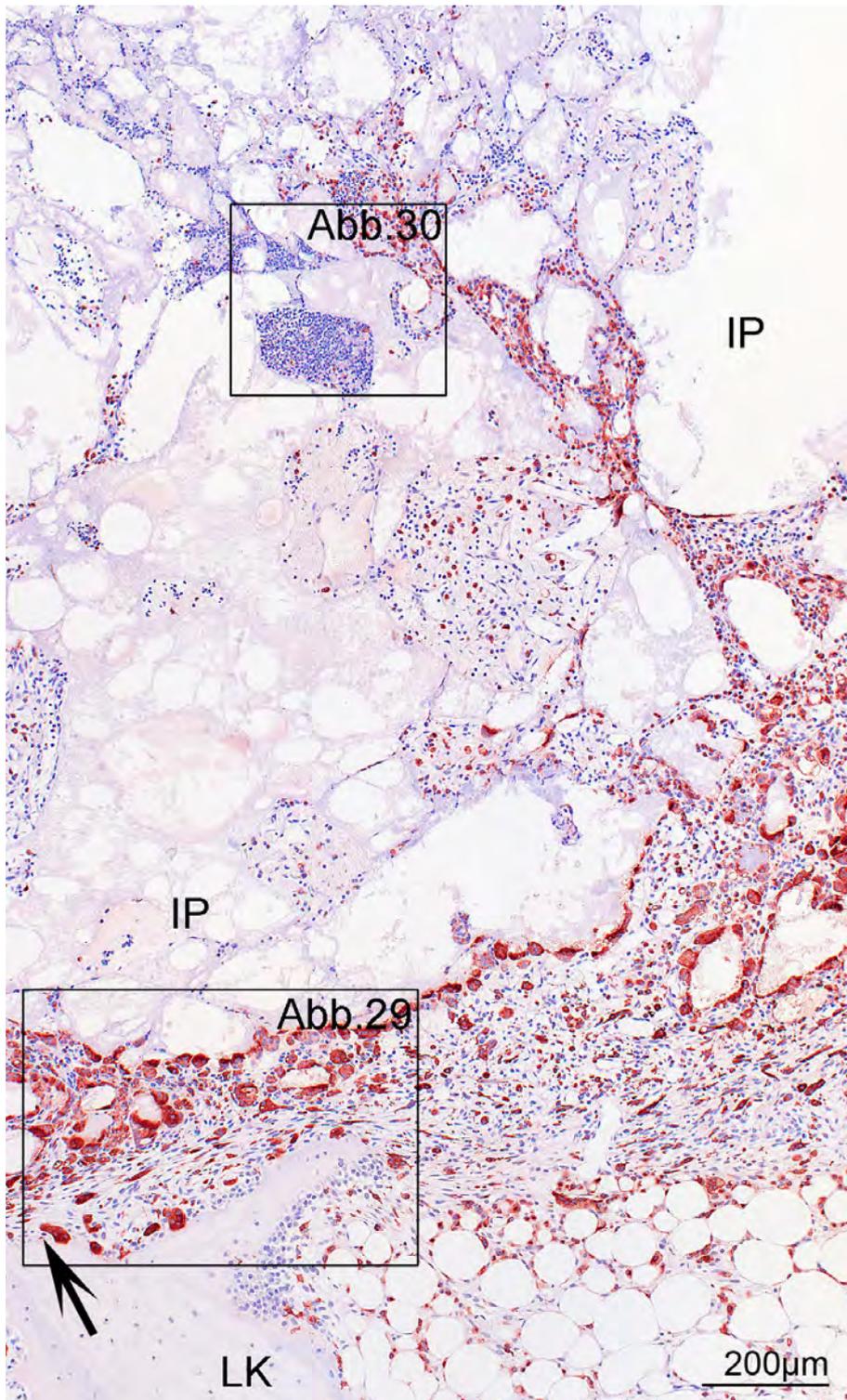
Ein- und mehrkernige Phagozyten der monozytären Linie zeigen unterschiedliche zytoplasmatische Färbesignale. Es bestätigt sich der Eindruck, wie schon im histologischen Untersuchungsabschnitt beschrieben, dass bei dem Tier mit den stärkeren Fettgewebsnekrosen und dem stärkeren Aufkommen an Lymphozyten und neutrophilen Granulozyten auch die Zahl an Makrophagen, Polykaryen und deren Zellkernen deutlich erhöht ist. Dies gilt vor allem für Phagozyten in Bereichen der erwähnten Fettgewebsnekrosen aber auch für die im Granulationsgewebe des mittleren Defektbereiches und entlang der Implantat-Oberflächen positionierten Zellen.

In der Defektperipherie sind markierte Zellen mit zum Teil mehr als 15 Zellkernen in den Bereichen der Fettgewebsnekrosen zu finden. Diesen Polykaryen benachbart sind Gruppen von Makrophagen eingebettet in das Granulationsgewebe. Frei im Granulationsgewebe sind in Richtung Bohrkante und Bohrmehl zunehmend mehr Monozyten und Makrophagen sowie 2-6 kernige Polykaryen zu detektieren. Anliegend an die Spongiosa-Bälkchen der Defektperipherie sind die Osteoklasten zuverlässig markiert, ihre Zahl nimmt ebenfalls in Richtung Bohrkante zu.

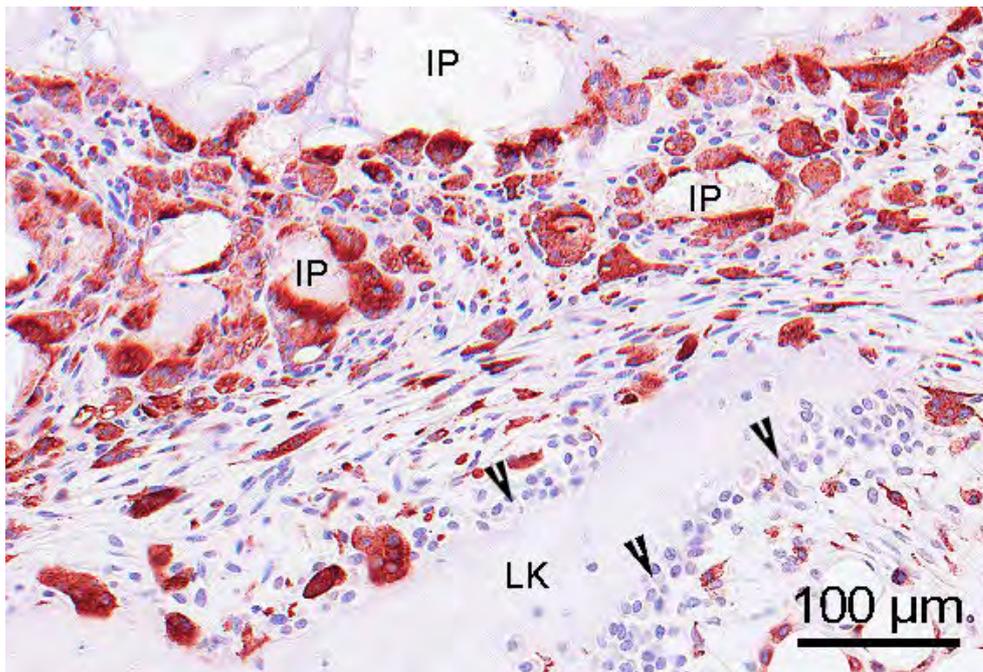
Im Bereich der Bohrkante ist die Mehrzahl der markierten Zellen anliegend an das Bohrmehl und die Spongiosa-Bälkchen in ein- und mehrschichtige hoch- bis isoprismatische Osteoblasten-Layer integriert, die schon deutlich erkennbar neues Osteoid produziert haben. Die wenigen migrierenden Zellen scheinen sich in Richtung des mittleren Defektbereiches zu orientieren. Dort ist das Vorkommen von mehrkernigen Zellen und auch von Makrophagen im Vergleich zum Lager deutlich erhöht.

Im mittleren Defektbereich liegen die CD68-positiven Polykaryen zum Teil in geschlossenen Reihen perlschnurartig großen Partikeln an, kleinere Partikel werden von ihnen umschlossen (Abb. 28, Abb. 29). An Partikeln in unmittelbarer Nachbar-

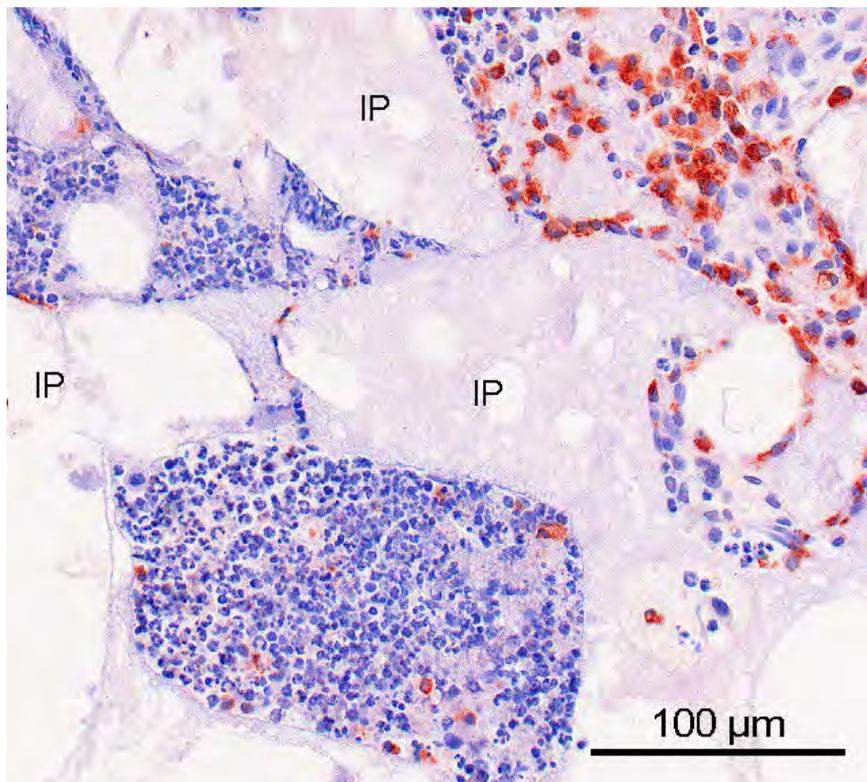
schaft zur Bohrkante sind zum Teil keine markierten Zellen zu detektieren, diese sind schon vollständig mit neu gebildetem Osteoid und daran anliegenden Osteoblasten überzogen und durch diesen neu formierten Knochen mit dem spongiösen Lagerknochen verbunden.



**Abbildung 28:** Vor allem das Granulationsgewebe im Bereich der Bohrkante (↗) zwischen Lagerknochen (LK) und Implantat (IP) ist von positiven Zellen geprägt. In den Granulalporen der zentralen Bereiche ist die Zahl der markierten Zellen deutlich geringer. Paraffin, CD68



**Abbildung 29:** Ausschnitt aus Abb.28: CD68-positive Zellen liegen im Bereich der Bohrkante, des Lagerknochens (LK) und umgeben die CaP-Granulat-Partikel. Osteoblasten (∇). Paraffin, CD68.

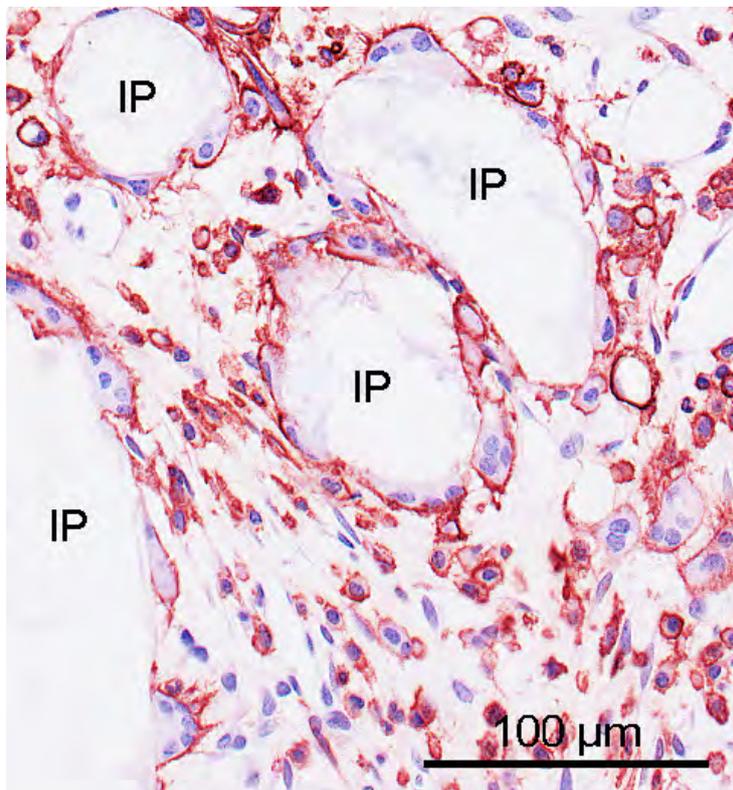


**Abbildung 30:** Ausschnitt aus Abb.28: Implantatporen zentral in den Defekten lokalisierter CaP-Granula (IP) sind gefüllt mit segmentkernigen, zum Teil pyknotischen, neutrophilen Granulozyten, während peripher davon das Zellbild von CD68-positiven Makrophagen (rot) geprägt wird. Paraffin, CD68.

Wie auch schon in der Standardfärbung beschrieben, verschiebt sich vom mittleren Bereich des Defektes in Richtung Defektzentrum das Verhältnis von mehrkernigen Riesenzellen hin zu Makrophagen, deren Zahl ebenfalls abnimmt, sodass schließlich im Zentrum des Defektes nur segmentkernige Granulozyten zu identifizieren sind (Abb. 30).

#### 4.4.2.2 CD44

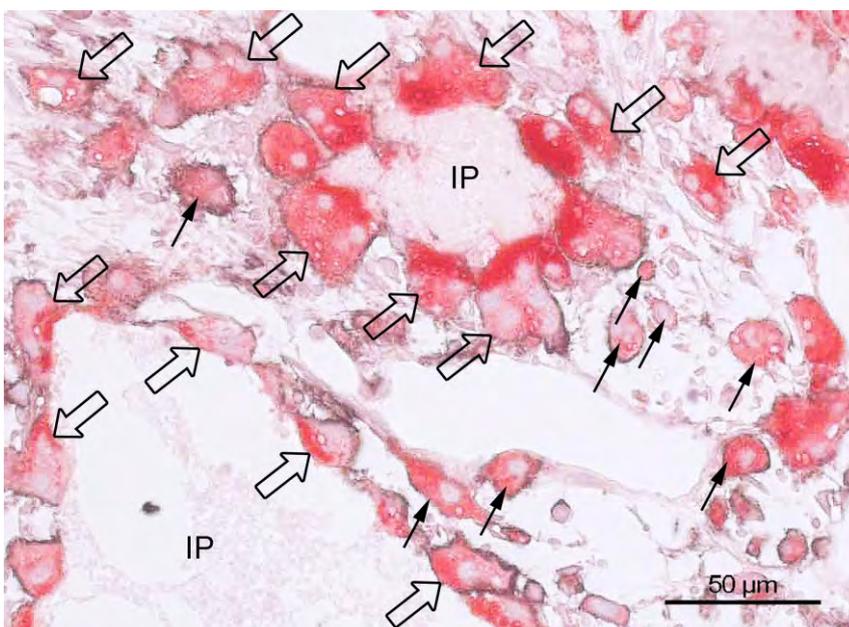
Das Farbsignal des Hyaluronsäure-Rezeptors CD44 beschränkt sich, wie auch bei den Tieren der Gruppe I, bei allen betroffenen Zellpopulationen allein auf die Zellmembran. Auch in dieser Gruppe zeigen neben den mono- und multinukleären Phagozyten der monozytären Linie Lymphozyten eine zirkumferente Membranfärbung. Ebenso sind auch hier die Ausläufer der Osteozyten markiert. Bei den Makrophagen beschränkt sich das Farbsignal, sofern sie dem Knochen oder dem Implantat anliegen, auf die basolateralen Abschnitte der Membran. Apikal, dort wo sie resorptiv oder phagozytierend aktiv sind, bleibt das Signal aus (Abb. 31). Darüber hinaus fällt ein Unterschied im Bezug auf die Signalintensität der multinukleären Zellen auf: Die Zellmembran der Knochen-assoziierten Polykaryen erscheint weniger intensiv angefärbt als die der an Fettnekrosen, Implantat oder frei im Granulationsgewebe lokalisierten Zellen.



**Abbildung 31:** Bei den Implantat-assoziierten Polykaryen ist das Signal auf basolaterale Bereiche der Zellmembran beschränkt, frei im Gewebe vorkommende Makrophagen und Polykaryen weisen ein unregelmäßig stark die gesamte Zelle umgebendes Membransignal auf. Darüber hinaus fällt die Gruppenbildung der Makrophagen auf. Paraffin, CD44.

#### 4.4.2.3 Doppelinkubation CD44/CD68

Mit Hilfe der immunhistochemischen Methode der Doppelinkubation lassen sich zwei verschiedene Antigene, die innerhalb der Zelle an unterschiedlichen Stellen lokalisiert sind, nachweisen. Im Rahmen der hier vorliegenden Arbeit bietet sich diese Methode an, um zu überprüfen, ob die CD44 synthetisierenden Zellen auch monozytären Ursprungs sind und folgerichtig auch ein CD68 Signal aufweisen. In Übereinstimmung mit den vorhergehend beschriebenen Ergebnissen ist zu beobachten, dass CD44, welches sich im Rahmen dieser Methode aufgrund des hier verwendeten Chromogens DAB in bräunlich-schwarzer Farbe darstellt, nicht nur auf CD68-positiven (hier durch leuchtend rote Färbung des Zytoplasmas markiert) sondern auch auf CD68-negativen Zellen, wie zum Beispiel Lymphozyten und Osteozyten ausdehnt. Wesentlich ist, dass alle CD68 positiven Zellen auch durch den CD44-Antikörper gekennzeichnet sind. Dabei ist wie schon in der allein mit Anti-CD44 durchgeführten Untersuchung zu beobachten, dass auch hier die Verteilung von CD44 abhängig von der Lokalisation der Zelle ist: während frei im Granulationsgewebe liegende Makrophagen und Polykaryen ein die ganze Zelle unterschiedlich deutlich umspannendes Färbemuster ihrer Membran zeigen, konzentriert sich bei adhärennten Zellen (Knochen, Fettgewebnsnekrosen, Bohrmehl, Implantatpartikel) das Signal auf die basolateralen Teile der Zellmembran (Abb. 32).



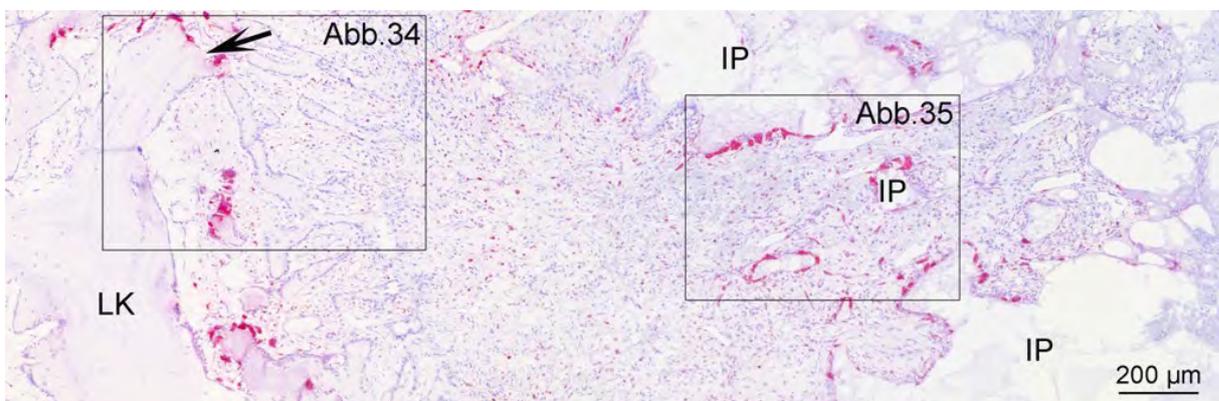
**Abbildung 32:** Im Zytoplasma rot (CD68) und entlang der Zellmembran bräunlich-schwarz (CD44) markierte Polykaryen (↗) umschließen Implantat-Partikel (IP). Auch Monozyten und Makrophagen (↖) sind doppelt markiert.  
Paraffin, CD44/CD68.

#### 4.4.3 Enzymhistochemie - TRAP

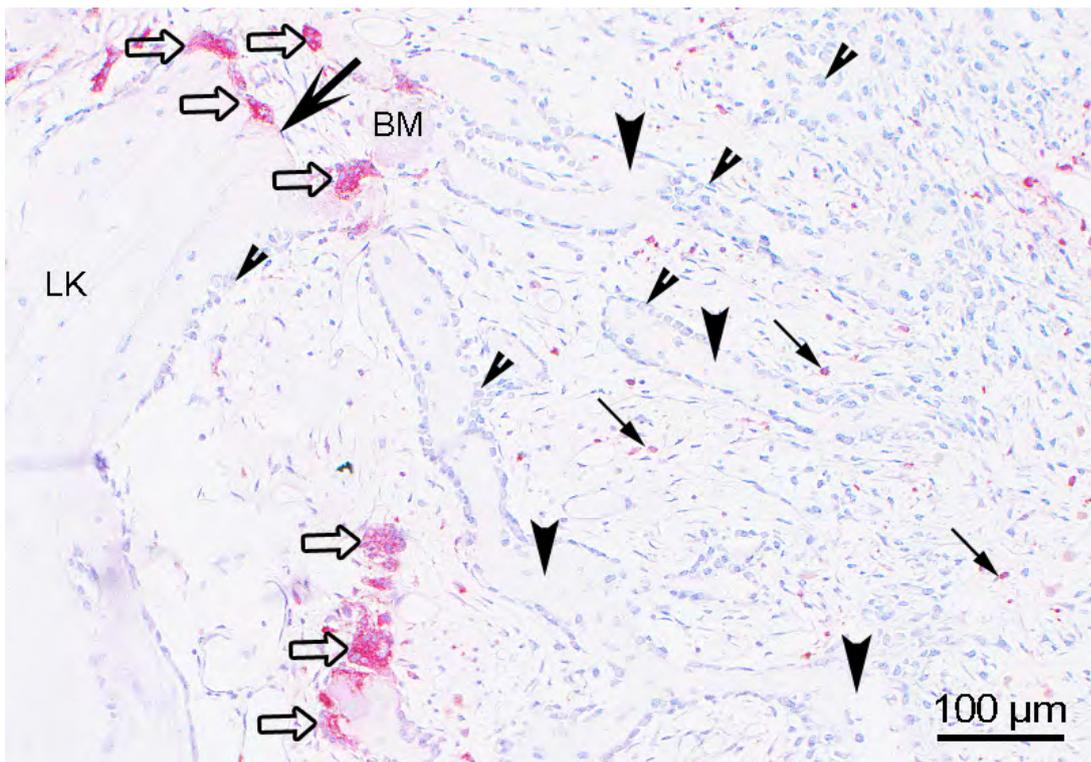
Die dem Lagerknochen anliegenden Osteoklasten zeigen deutliche TRAP-Signale. In der Peripherie des Defektes nehmen in Richtung Bohrkante die dem Knochen anliegenden positiven Zellen zu, im Bereich der Fettgewebsnekrosen finden sich auch gruppenweise auftretende, vorwiegend kreisrunde Polykaryen mit bis zu 10 Zellkernen, die nicht, oder nur schwach positiv angefärbt sind. Diese sind vor allem bei dem Schaf mit der insgesamt stärker ausgeprägten zellulären Reaktion zu sehen.

Im Bereich der Bohrkante sind positive Zellen vor allem am Bohrmehl und weniger an der Bohrkante zu finden. Sie weisen typischerweise etwa 3-5 Zellkerne auf und liegen zwischen den dicht aneinander liegenden Osteoblasten. Entlang der sich in den mittleren Bereich fortsetzenden, neu formierten Knochenbälkchen sind keine markierten Phagozyten sondern nur eng, ein- oder zweischichtig aneinander liegende Osteoblastensäume zu erkennen (Abb. 34). Im mittleren Defektbereich werden die dem Implantat anliegenden Osteoblastenreihen immer wieder unterbrochen von mehrkernigen Phagozyten. Frei im Granulationsgewebe kommen nur wenige, unterschiedlich kräftig markierte Makrophagen vor. Diese sind auch im sich Richtung Defektzentrum fortsetzenden Granulationsgewebe zu sehen.

Entlang der Implantat-Oberfläche nimmt die Zahl der ausnahmslos markierten Polykaryen in dem Maße zu, wie die Dichte der Osteoblasten abnimmt. Dies führt zu einer perlschnurartigen Anhäufung von detektierten, mehrkernigen Zellen im Übergangsbereich vom mittleren in den zentralen Defektbereich. Diese Implantat-



**Abbildung 33:** Diese Übersicht zeigt das Granulationsgewebe im mittleren Defektbereich zwischen dem Lagerknochen (LK) mit Bohrkante (  $\blackleftarrow$  ) und Implantat-Partikeln (IP). Auffallend ist die Konzentration von roten, TRAP-markierten Zellen am Implantat und dem Lagerknochen im Bereich der Bohrkante. Paraffin, TRAP.

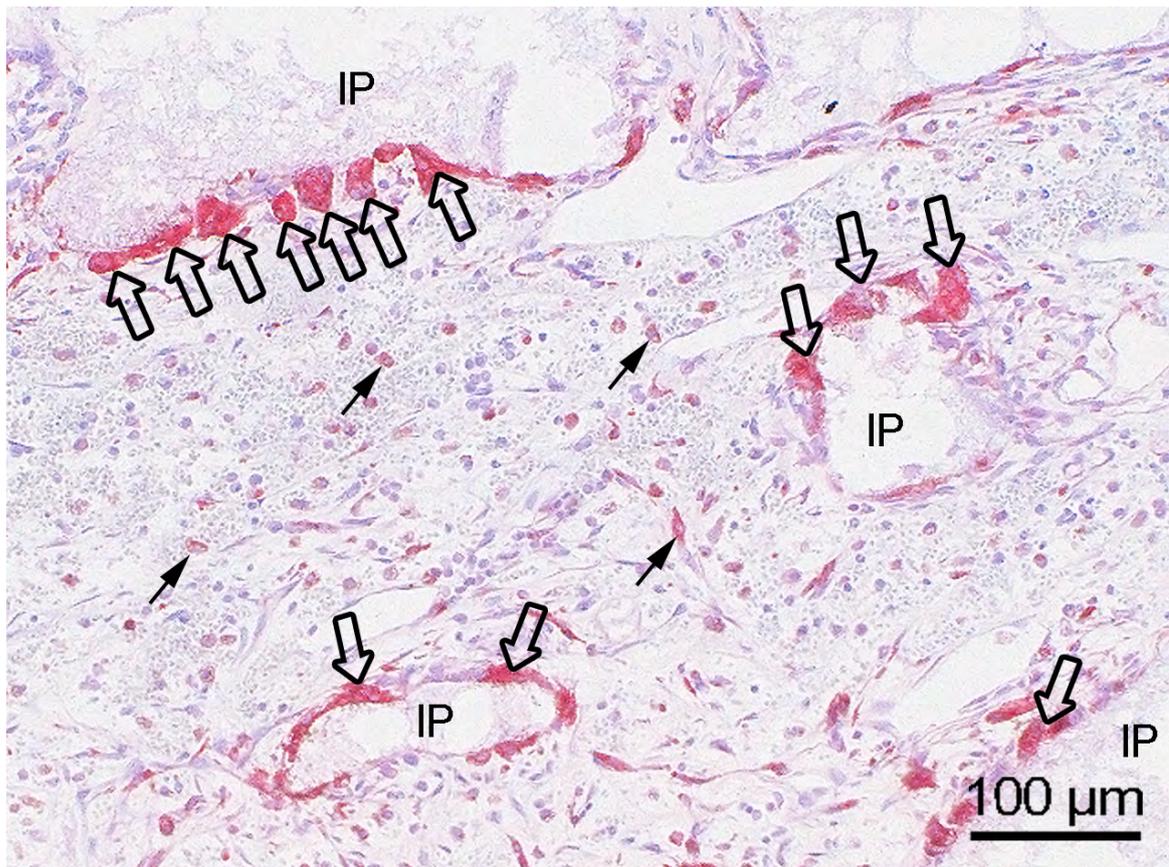


**Abbildung 34:** Ausschnitt aus Abb.33. mehrkernige TRAP-markierte Phagozyten (⇨) liegen Bohrmehlpartikeln (BM) und Bohrkante (↙) an, während der neuformierte Knochen (▼) fast ausschließlich von Osteoblasten (♣) besiedelt ist. Vereinzelt finden sich mononukleäre, markierte Phagozyten (↘). Paraffin, TRAP.

adhärenten Zellen weisen in der Mehrzahl eine abgeflachte, dem Implantat breit anhaftende Form mit weniger als zehn Kernen auf (Abb. 35).

Diesem Bereich folgt nach zentral eine Zone, in der die Zahl an adhärenten, markierten Zellen rasch abnimmt und sich gleichzeitig auch die Zahl der Zellkerne, sichtbar in einer Schnittebene, reduziert. Die Zahl der frei im Granulationsgewebe detektierbaren Makrophagen nimmt ebenso ab, sodass nach diesem Übergangsbereich im Defektzentrum keine TRAP-positiven Zellen mehr detektiert werden können.

Insgesamt zeigt der enzymhistologische Nachweis von TRAP bei den Tieren dieser Gruppe eine Konzentration von TRAP-markierten Zellen im Bereich des Bohrmehls und entlang des Knochenersatzstoffes in der Defektmittle, in der Zone des neu gebildeten Knochens zwischen der Bohrkante und dem Werkstoff sind deutlich weniger markierte Zellen zu detektieren (Abb. 33).



**Abbildung 35:** Ausschnitt aus Abb. 33. Im mittleren Defektbereich sind die Oberflächen der Implantatpartikel (IP) fast vollständig von rot-markierten, TRAP-produzierenden Polykaryen (↗) besetzt, wodurch ein perlschnurartiger Eindruck entsteht. Osteoblasten sind nicht am Implantat zu sehen, im interpartikulären Granulationsgewebe liegen, eingebettet in Fibrozyten, Fibroblasten, Erythrozyten und Lymphozyten, Makrophagen (↖) und wenige Polykaryen. Paraffin, TRAP.

#### 4.4.4 Zusammenfassung der Gruppe II: CaP-Granulat

Die in dieser Versuchsgruppe verwendete Applikationsform eines Granulates erlaubt ein vollständiges Erschließen des Defektes. Dabei sind auch in Gruppe II verschiedene Phasen der Entzündungsreaktion immun- und enzymhistochemisch nachvollziehbar, die räumliche Verteilung der dominanten Entzündungszellen entspricht dem in Gruppe I beschriebenen Verteilungsmuster.

Insgesamt entsteht der Eindruck, als wären die einzelnen Phasen der Entzündung bei den Schafe der Gruppe II weiter fortgeschritten: Im Bereich der Fettgewebnekrosen deutet nur wenig auf eine chronische Entzündung hin, vielmehr liegen nur Zeichen einer Fremdkörperreaktion vor. Ebenso sind im mittleren Defektbereich mehr fusionierte Phagozyten zu erkennen, abhängig vom Vorhandensein von

Lymphozyten. Dieses spricht für eine starke Stimulation zur Phagozytose.

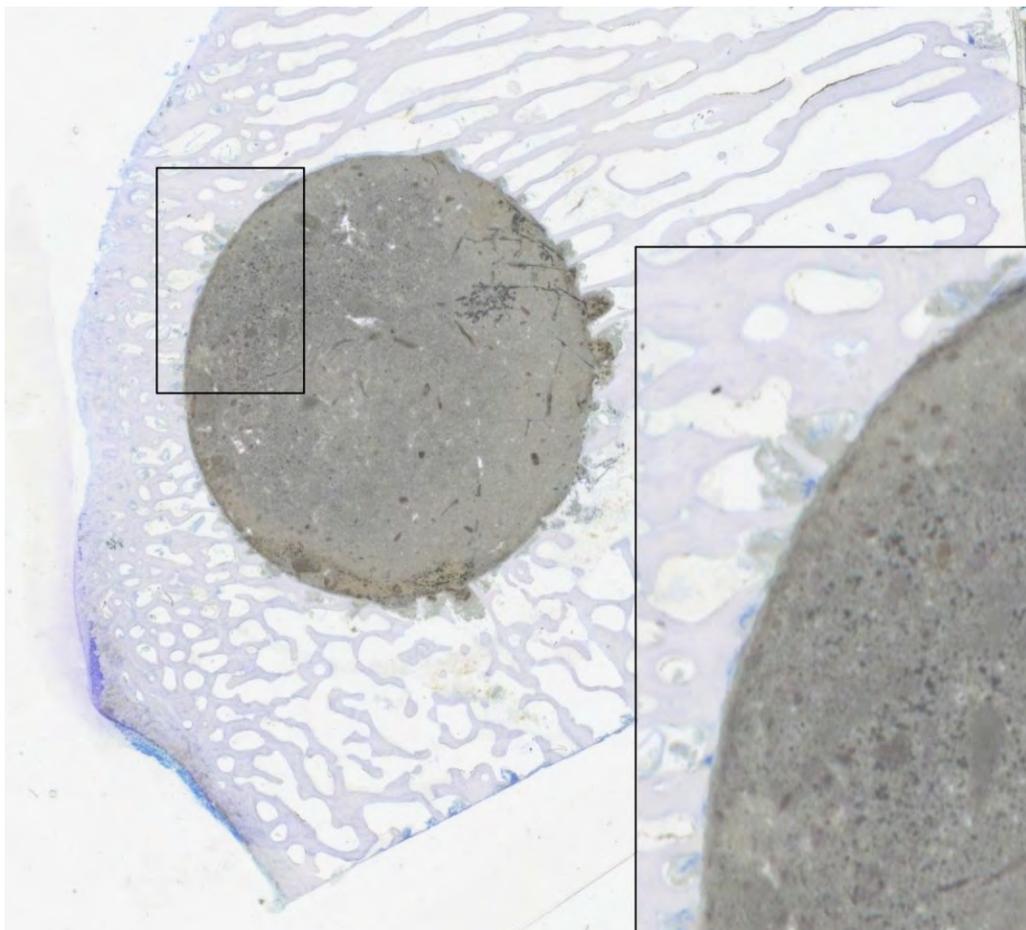
Außerdem liegen deutliche Unterschiede im Bezug auf die Ausprägung der Osteogenese vor. Bei beiden Tieren der Gruppe II ist unabhängig von der Tatsache, dass sich die chronische Entzündungsreaktion zwischen den Individuen in ihrer Intensität unterscheidet, eine deutliche Knochenneubildung im Bereich der Bohrkante festzustellen, die sich zum Teil schon durch das Granulationsgewebe des mittleren Defektbereiches bis auf die äußeren Granulat-Partikel erstreckt. In diesem Bereich findet praktisch kein entzündliches Geschehen statt, die TRAP-Produktion beschränkt sich fast ausschließlich auf frei im Granulationsgewebe vorkommende Zellen. Stellenweise ist auch eine scheinbar isolierte Knochenneubildung um die äußeren Partikel festzustellen. Erst an den Oberflächen von Granulat-Partikeln der Defektmitte, die nicht von Osteoblasten besiedelt sind, finden sich perlschnurartig aufgereiht Polykaryen, die, was die starke TRAP-Markierung zeigt, eine starke resorptive Aktivität zeigen.

Die Prognose für den weiteren Heilungsverlauf ist insgesamt als günstig zu beurteilen, das Implantat der Gruppe II wird schneller knöchern integriert sein als der TCP-Zement der Gruppe I und erst im Verlaufe des normalen Knochen-Remodelings vollständig degradiert werden. Es ist außerdem davon auszugehen, dass das Implantat, was seine physikalischen Eigenschaften zum Beispiel im Bezug auf die Stabilität angeht, auch schneller belastbarer ist, denn es zeigt sich, dass es nicht in dem Maße wie das TCP Lösungsvorgängen unterworfen ist.

## 4.5 Gruppe III: Calciumphosphat-Zement + Phosphoserin

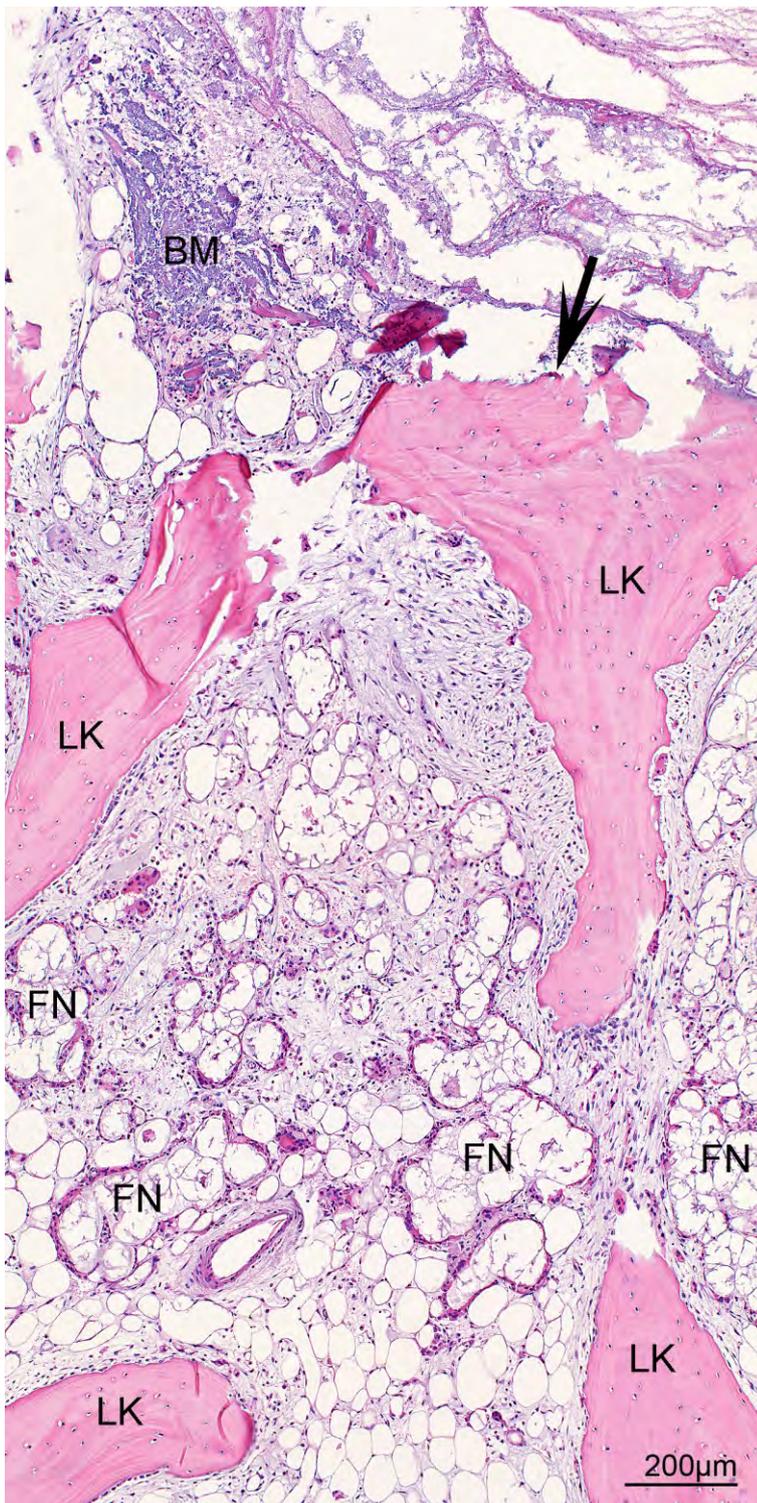
### 4.5.1 Histologie

Bei dem in dieser Gruppe verwendeten Knochenzement werden schon auf den ersten Blick Unterschiede zu den beiden vorangehenden Gruppen deutlich: das Material erscheint sehr kompakt, es sind nur wenige, unregelmäßig kleine Risse von unterschiedlicher Länge zu erkennen, die in der Defektmitte und im Defektzentrum nicht von Zellen erschlossen werden. Es erstreckt sich bis unmittelbar an die Bohrkante, verteilt sich wie das Bohrmehl wolkgig zwischen den spongiösen Knochenbälkchen des peripheren Defektbereiches und lässt somit keinen Raum für die Ausbildung von Granulationsgewebe zwischen Bohrkante und Implantat (Abb. 36).



**Abbildung 36:** Das kompakte, sich grau darstellende Implantat liegt direkt der Bohrkante an und ist zum Teil zwischen die Knochenbälkchen des Lagerknochens in die Defektperipherie eingedrungen. Dünnschliff T7200, Toluidin-Blau. Scan.

Die Übersicht auf die Präparate lässt folgende Strukturierung bei allen Tieren erkennen: Auf den Bereich des intakten Knochenlagers folgen in der Peripherie des Defektes die Zone der Fettgewebsnekrosen an die sich der Bereich bis zur Bohrkante anschließt (Abb. 37). Wie schon erwähnt, schließt sich der implantierte Zement dicht an die Bohrkante an, Granulationsgewebe ist im mittleren Defektbereich nicht, oder nur in sehr geringer Ausprägung vorhanden.



**Abbildung 37:** Übersicht auf den peripheren Defektbereich eines reaktiveren Schafes: beginnend im Bereich der Fettgewebsnekrosen (FN) ist ein bis zum Implantat reichendes Granulationsgewebe zwischen den spongiösen Knochenbälkchen (LK) der Defektperipherie ausgebildet. Bohrmehl (BM), Bohrkante (♣). Paraffin, HE.

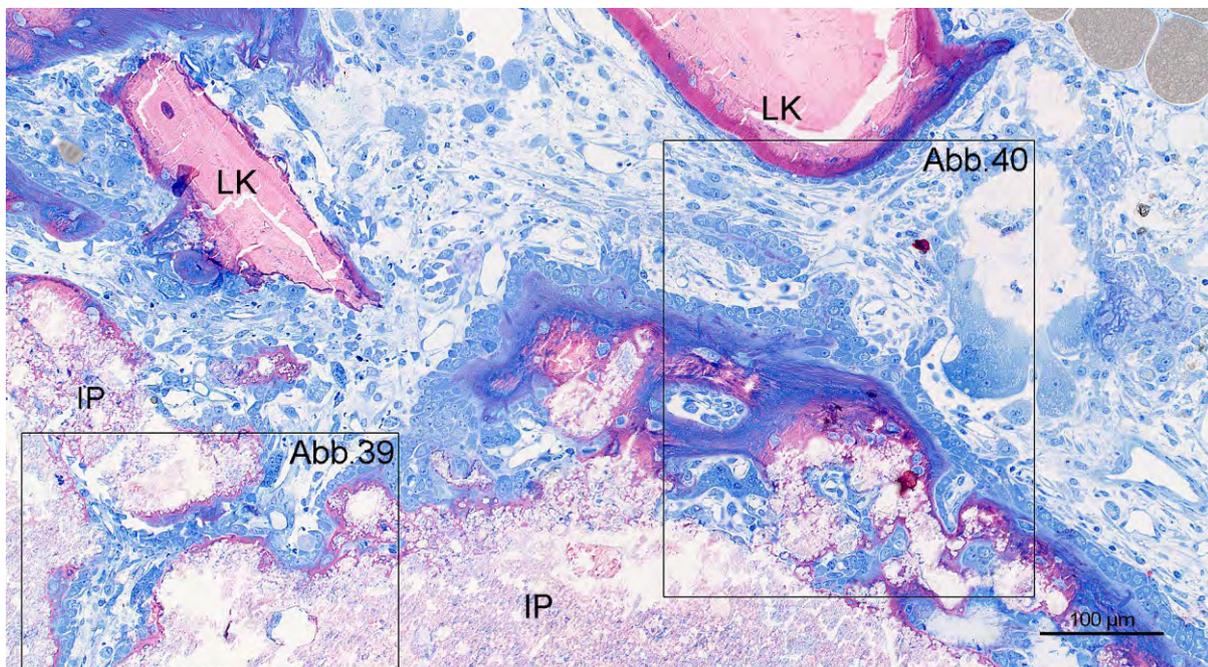
Schon im Bereich des Lagerknochens bietet sich in der Übersicht ein innerhalb der Gruppe sehr unterschiedliches histologisches Bild. Während bei zwei Schafen physiologisches, dem Alter der Tiere entsprechendes Fettmark ohne atypische zelluläre Infiltration zu sehen ist, findet man bei einem Schaf unilateral eine starke Infiltration von neutrophilen Granulozyten, zwischen denen auch mehr- bis vielkernige Zellen zu sehen sind, jedoch keine Ausbildung von Granulationsgewebe im Sinne einer Infiltration von Bindegewebe mit Fibroblasten, Fibrozyten oder einer Neovaskularisation. Bei den zwei übrigen Schafen ist bis tief in das Lager nekrotisches Fettgewebe zu sehen, welchem vor allem Makrophagen und mehrkernige Phagozyten anliegen, welche zum Teil mehr als 10 Zellkerne in der Schnittebene aufweisen. Hier bilden Fibroblasten und Fibrozyten die Grundlage des Granulationsgewebes. Zwischen den Zellen des Fettmarks ist vermehrt Bindegewebe zu sehen, Granulozyten sind dort nur sehr vereinzelt zu finden.

An diesen Bereich innerhalb der Defektperipherie schließt sich bei den beiden reaktionsarmen Tieren wieder intaktes Fettmark an, welches direkt an die Defektmitte mit dem Implantat und Bohrmehlparkeln angrenzt und nur zum Teil von Lymphozyten, Fibroblasten, Makrophagen und vereinzelt vorkommenden Polykaryen infiltriert wird. Knochenaufbau am Implantat ist bei diesen Schafen nicht zu beobachten. Entlang der Bohrkante sowie am Lagerknochen überwiegt ein verstärkter Knochenabbau durch langgestreckt dem spongiösen Knochen anliegende Polykaryen. Auch eine deutliche Knochenneubildung an Bohrmehl und Lagerknochen, so wie es bei den vorangehenden Gruppen I und II zu beobachten war, kann bei diesen Schafen nicht gesehen werden.

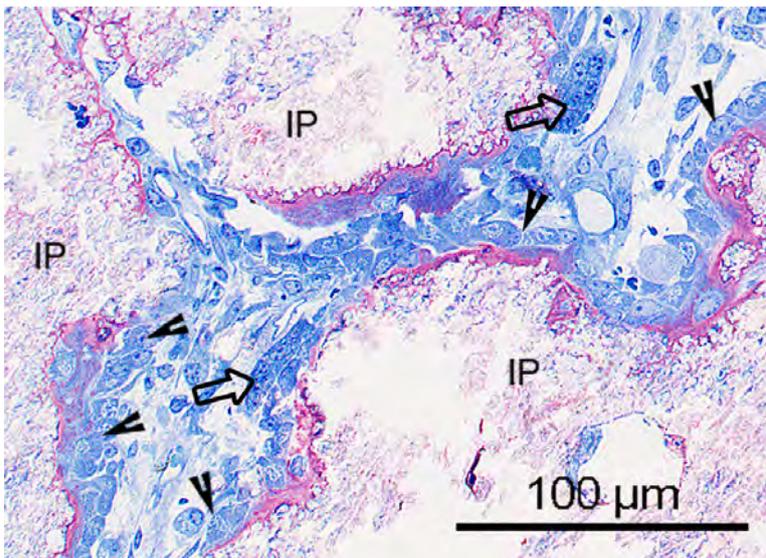
Bei den reaktiveren Tieren der Gruppe ist das verletzte Fettmark eingebettet in zellreiches Granulationsgewebe, dessen Gerüst aus Fibroblasten und Fibrozyten besteht. Dieses erstreckt sich über die gesamte Peripherie des Defektes und findet an der Bohrkante Anschluss an die Defektmitte und das Implantat (Abb. 37). Schon vor der Bohrkante sind intensive Umbauvorgänge am Knochen zu sehen, bei dem örtlich unterschiedlich stark ausgeprägt Auf- und Abbau überwiegen. In dem Granulationsgewebe der Peripherie sind vor allem Zellen monozytären Ursprungs zu sehen, aber auch Lymphozyten und vereinzelt Granulozyten sind vorhanden. Die schon an den Knochenbälkchen zu beobachtenden Umbauvorgänge sind auch am Bohrmehl zu erkennen, Osteoblasten sowie ein- und mehrkernige Phagozyten liegen

diesem in unmittelbarer Nähe zur Bohrkante an. Zwischen Bohrmehl und Zement befindet sich ein schmaler Saum von faserreichem Bindegewebe bestehend aus Fibrozyten, Makrophagen und wenigen Polykaryen.

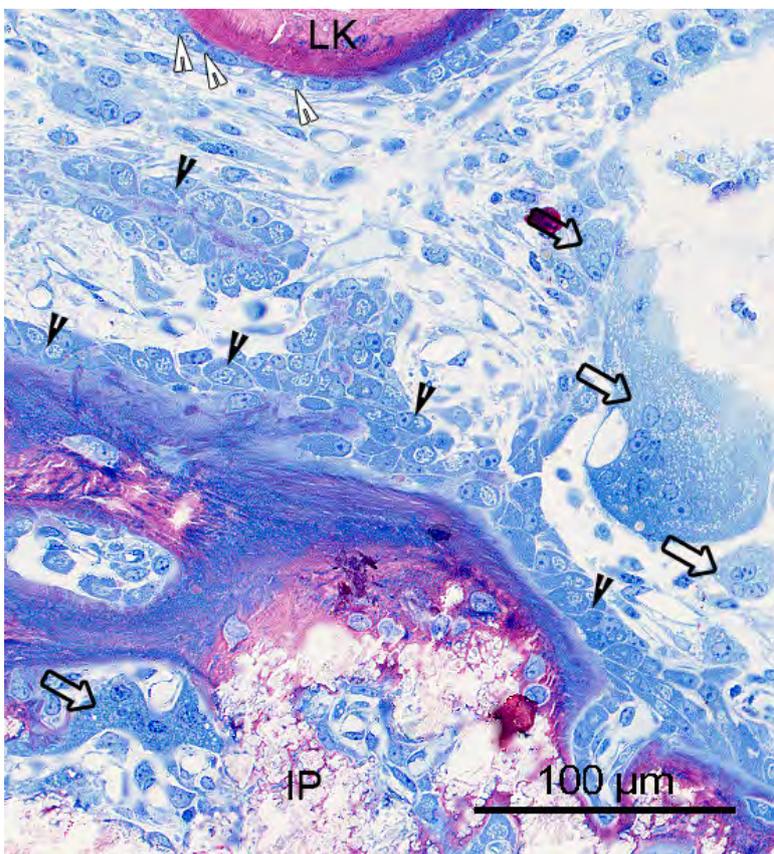
Weil sich aufgrund der kompakten Struktur des Implantates methodisch bedingte Artefakte bei Paraffinschnitten nicht vermeiden lassen, erfolgte die Beurteilung des Interfaces anhand von Dünnschliffen (Abb. 41) und Semi-Dünnschnitten von EPON-fixierten Präparaten. Bei einem Schaf sind weite Teile der äußeren Implantatoberflächen ein- oder mehrschichtig von hoch- bis isoprismatischen Osteoblasten besetzt, dem gegenüber sind am Lagerknochen der Defektperipherie inaktive, spindelförmige Osteoblasten, sogenannte *bone lining cells* zu sehen (Abb. 40). Auch die schmalen Spalten von weniger als 100 µm am Rande des Implantats sind von Osteoblasten, Fibroblasten, Makrophagen und Polykaryen erschlossen (Abb. 38, 39, 40).



**Abbildung 38:** Übergang Defektperipherie zu Defektmittle: zellreiches Granulationsgewebe füllt den Übergang zwischen dem Lagerknochen (LK) und dem Implantat (IP): auch kleine Risse im Zement sind zellulär erschlossen, stellenweise liegen dem Implantat geschlossene Reihen von Osteoblasten an. Semidünnschnitt, Toluidinblau-Safranin O.



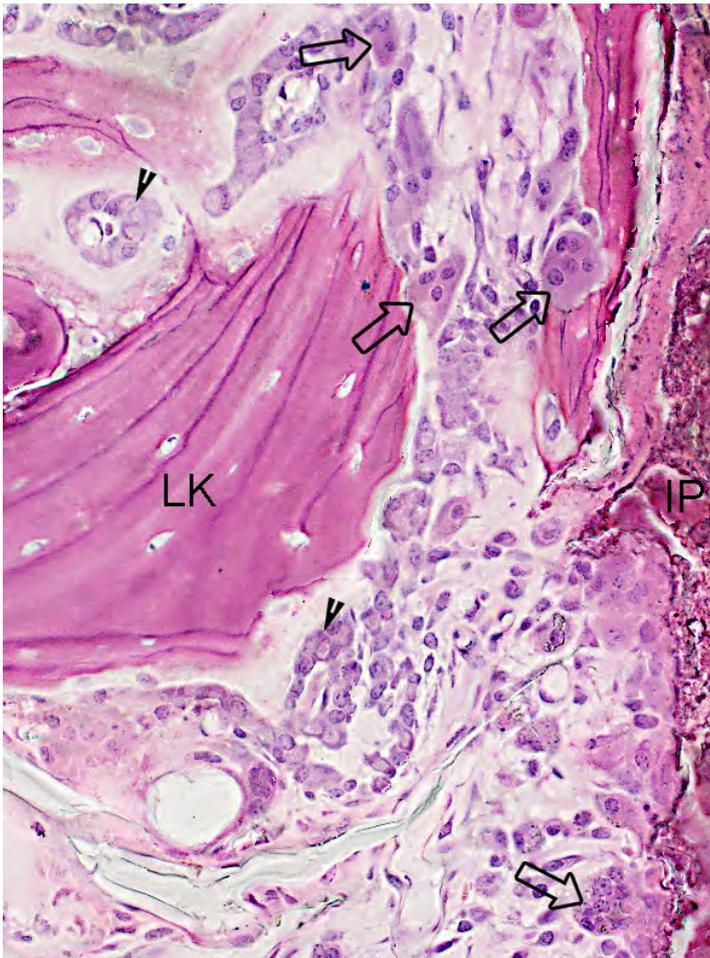
**Abbildung 39:** Ausschnitt aus Abb.38. Spalten mit weniger als 100µm Durchmesser sind zellulär erschlossen. Osteoblasten (▲) und Phagozyten (⇨) liegen den Implantatoberflächen an, ein schmaler Saum Osteoid (dunkel-violett) ist zu erkennen. Semidünnschnitt, Toluidinblau-Safranin O.



**Abbildung 40:** Ausschnitt aus Abb.38. Situation am Interface im Bereich der Bohrkante: die Implantatoberfläche (IP) ist dicht besiedelt mit hoch- bis isoprismatischen Osteoblasten (▼), während dem Lagerknochen (LK) vor allem abgeflachte Osteoblasten anliegen (▲). Polykaryen (⇨) Semidünnschnitt, Toluidinblau-Safranin O.

#### 4.5.2 Immunhistochemie

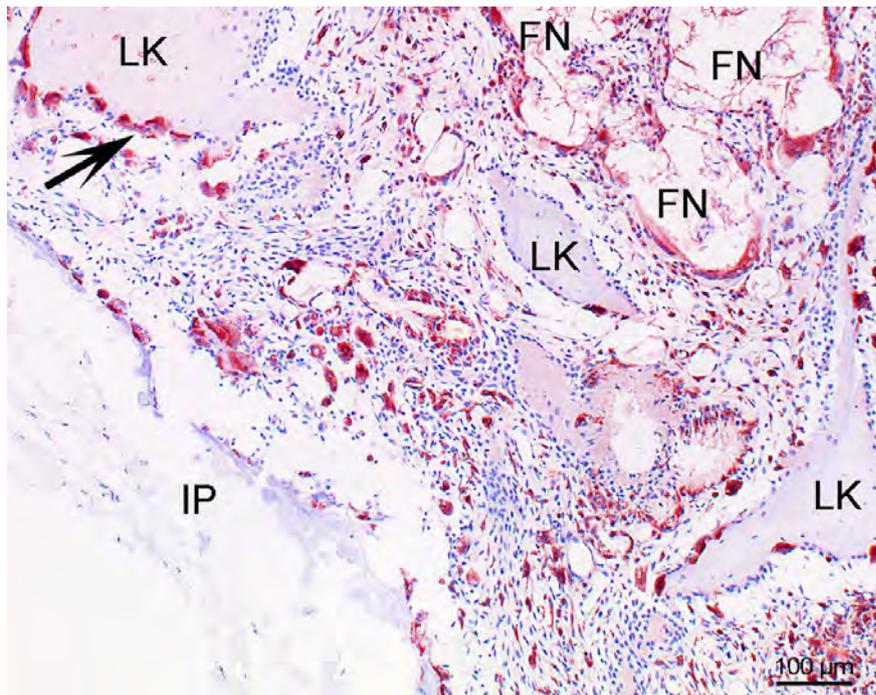
Die zum Nachweis von CD16 durchgeführten immunhistochemischen Untersuchungen führten auch nach thermischer und enzymatischer Antigendemaskierung nur zu unspezifischen Signalen.



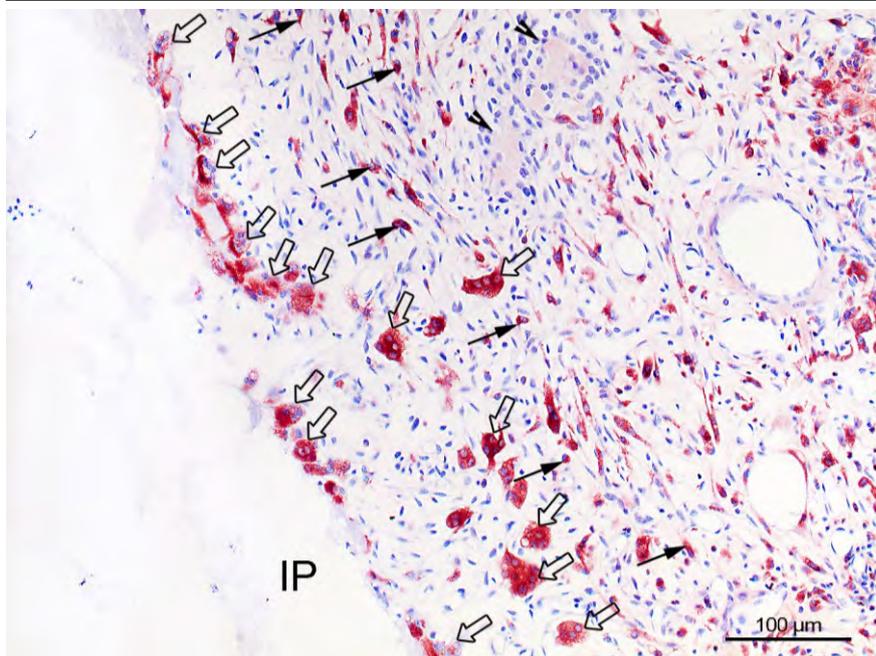
**Abbildung. 41:** Osteoblasten (▼) und Polykaryen (⇨) liegen im Bereich der Bohrkante dem Lagerknochen (LK) und dem Knochenzement (IP) an. Dünnschliff (T9100), HE

#### 4.5.2.1 CD68

Das Auftreten von CD68-markierten Zellen variiert innerhalb der Gruppe: bei den reaktionsarmen Tieren sind vor allem die Osteoklasten anliegend an die spongiösen Knochenbälkchen des Lagers markiert, darüber hinaus ist anliegend an die Fettgewebnekrosen eine Akkumulation markierter Makrophagen und Polykaryen zu sehen. Im Bereich der Bohrkante, des Bohrmehls und des Implantates sind nahezu keine CD68 produzierenden Zellen zu detektieren. Anders verhält es sich bei den reaktiveren Schafen (Abb. 42): Dort sind abgesehen von den Osteoklasten im knöchernen Lager und den positiven Zellen anliegend an die Fettgewebnekrosen auch Ansammlungen von gefärbten multinukleären Phagozyten entlang der Bohrmehlpartikel und der Implantat-Oberflächen zu sehen (Abb. 43). Darüber hinaus sind frei im Granulationsgewebe ebenfalls mono- und multinukleäre Zellen angefärbt.



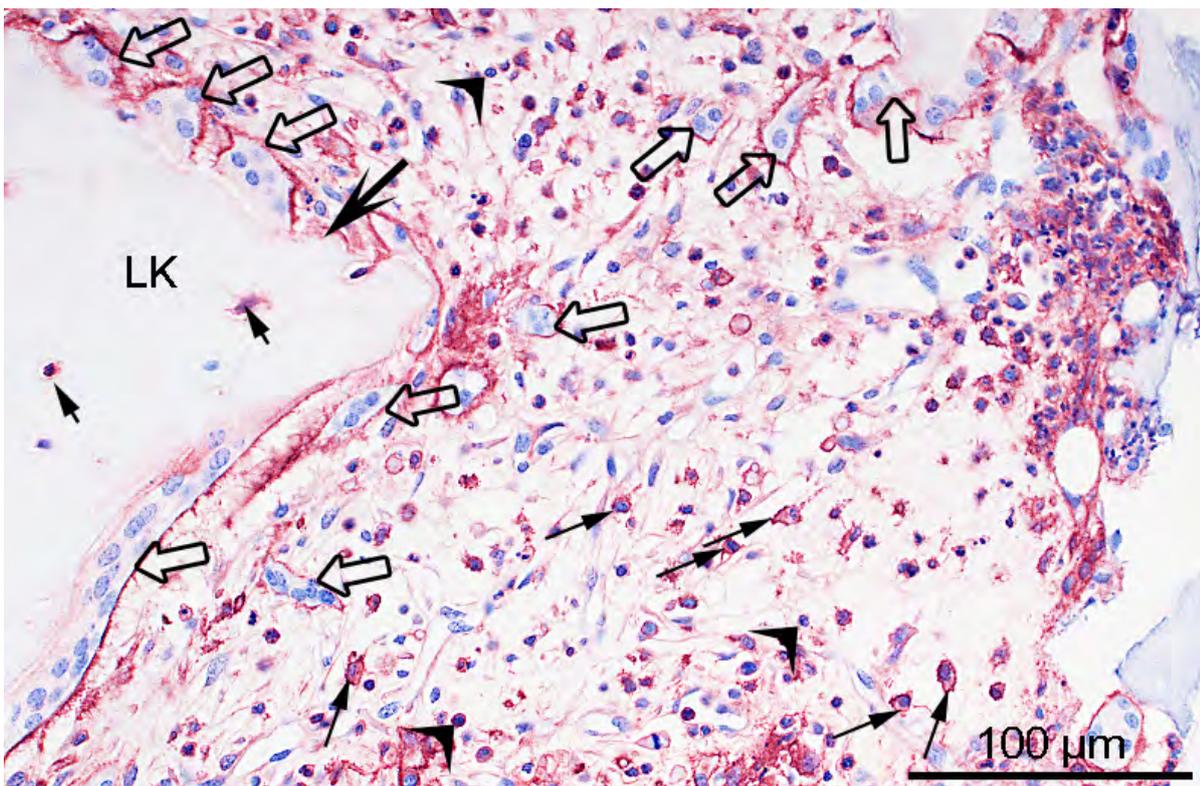
**Abbildung 42:** Situation zwischen peripherem Defektbereich und Implantat (IP): rot markierte Zellen konzentrieren sich um die Fettgewebnekrosen (FN) und entlang von Lagerknochen (LK) und Implantat. Vor allem die Bohrkante (↗) ist dicht mit markierten Zellen besetzt. Paraffin, CD68.



**Abbildung 43:** Anliegend an das Implantat (IP) und im daran angrenzenden Granulationsgewebe sind vor allem Polykaryen (↪) aber auch Makrophagen (→) markiert. Die Polykaryen weisen nie mehr als 10 Zellkerne auf. Osteoblasten (▲) Paraffin, CD68.

#### 4.5.2.2 CD44

Analog der Heterogenität der Verteilung von CD68-positiven Zellen innerhalb dieser Gruppe verhält es sich auch mit der Verteilung der CD44-positiven Makrophagen: Bei den wenig reaktiven Tieren sind neben den Osteozyten nur die Osteoklasten des Lagers und die Makrophagen und Polykaryen in der Umgebung von den Fettgewebnekrosen in typischer Weise markiert, am Implantat oder der Bohrkante ist dieser Zelltyp nur vereinzelt sichtbar. Vereinzelt lassen sich Lymphozyten im intakten Fettmark zwischen Fettgewebnekrosen und dem Implantat nachweisen. Bei den reaktiven Tieren sieht man in der Peripherie des Defektes Makrophagen und Polykaryen gruppenweise assoziiert mit dem Bohrkanten-nahen Knochenlager sowie mit dem Bohrmehl und dem Implantat. (Abb. 44). Dazwischen sind ebenfalls markierte Lymphozyten zu sehen. Die Polykaryen und auch Makrophagen, die nicht direkt dem Implantat anliegen, zeigen zum Teil ein sehr starkes, membrangebundenes Signal, ebenso wie die basolaterale Membran der anliegenden



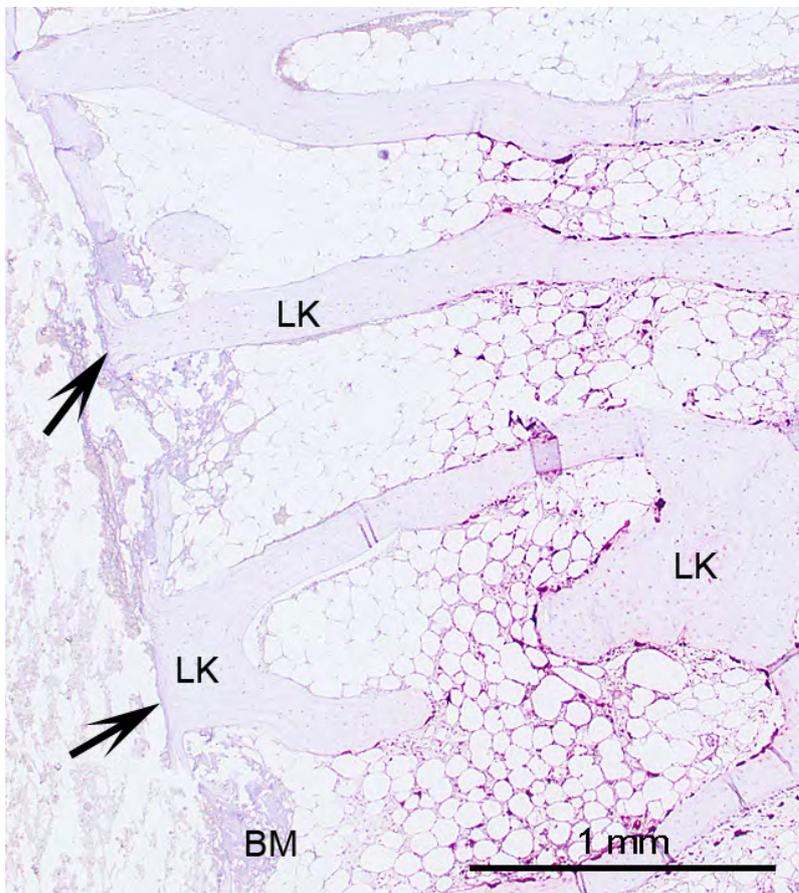
**Abbildung 44:** Übergang der Defektperipherie zur Defektmittle. Die dem Lagerknochen (LK) und der Bohrkante anliegenden Polykaryen (↔) weisen ausnahmslos eine starke Markierung der basolateralen Zellmembran auf, die Membranen frei vorkommender Phagozyten (→) sind zellumfassend markiert. Darüber hinaus sind auch Lymphozyten (↖) und Osteozyten (↗) an ihrer Zellmembran markiert. Paraffin, CD44.

Makrophagen und Polykaryen. Nebeneinander liegende, positive Zellen zeigen ein zum Teil unterbrochenes, relativ schwaches Signal, die Grenzen der Zellen sind in der Schnittebene nicht deutlich zu erkennen.

#### 4.5.3 Enzymhistochemie - TRAP

Auch mithilfe der Enzymhistochemie stellten sich die Unterschiede in der Reaktivität der Schafe auf den Werkstoff deutlich dar. Bei dem Ausschnitt in Abb. 45 handelt es sich um die Defektregion eines nicht reaktiven Schafes. In der Übersicht ist die Verteilung der TRAP-positiven Zellen in der Defektperipherie deutlich nachzuvollziehen. Während anliegend an die Fettgewebsnekrosen und den dortigen Lagerknochen deutlich positive Zellen zu sehen sind, sind in vielen Bereichen der Defektperipherie, der Region der Bohrkante, um das Bohrmehl und am Implantat keine rot angefärbten Zellen zu sehen.

Bei den reaktiven Tieren, die im Bereich der Defektperipherie Granulationsgewebe ausgebildet haben, lässt sich die TRAP in mono- und multinukleären Phagozyten, die dem Lagerknochen und den Fettgewebsnekrosen anliegen, nachweisen wie auch in Phagozyten, die frei im Granulationsgewebe und entlang der Implantatoberflächen

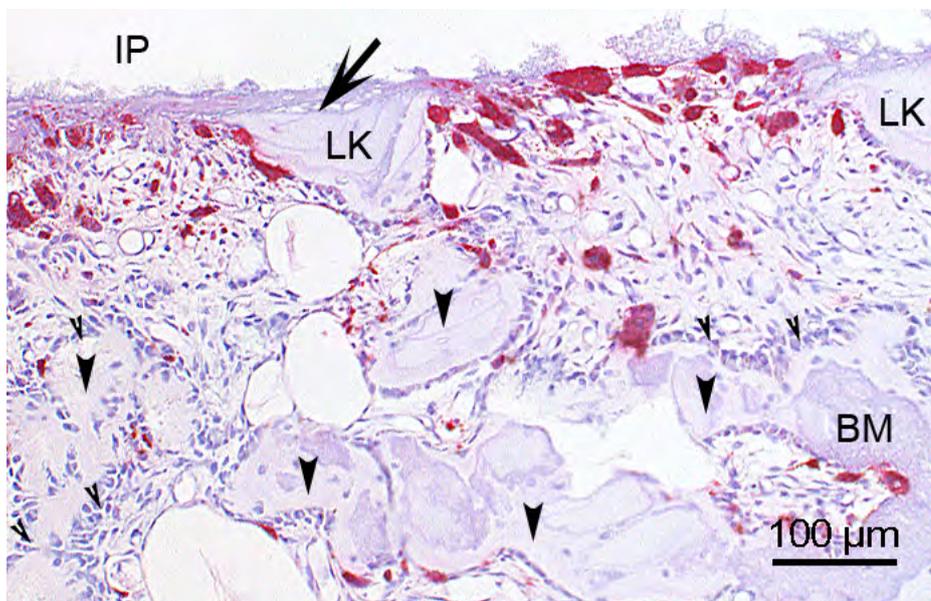


**Abbildung 45:** In der Übersicht lässt sich die Konzentration TRAP-markierter Zellen in der Defektperipherie erkennen. Mit der Bohrkante (↗) und dem Bohrmehls (BM) sind keine rot markierten Zellen assoziiert. Sie konzentrieren sich saumartig um den Defekt im Bereich von Fettgewebsnekrosen und am benachbarten Lagerknochen (LK). Paraffin, TRAP.

lokalisiert sind. Dort sind diese zum Teil perlschnurartig aufgereiht (Abb. 46). In den bereits von Osteoblasten besiedelten Bereichen von Bohrmehl und Implantat ist die Häufigkeit des Auftretens markierter Zellen deutlich geringer. Im Bereich der Fettgewebsnekrosen sind alle anliegenden Makrophagen und Polykaryen gleichmäßig stark positiv angefärbt, nicht gefärbte Polykaryen können nicht identifiziert werden.

#### 4.5.4 Zusammenfassung der Gruppe III: CaP-Zement + Phosphoserin

Wie schon in der Übersicht festzustellen ist, unterscheiden sich die Ergebnisse der Gruppe III sowohl im Hinblick auf den Knochenersatzstoff als auch hinsichtlich der Ausbildung und der Zusammensetzung des Granulationsgewebes deutlich untereinander und von denen der vorangegangenen Gruppen I und II. Das in Zementform applizierte Material ist bei keinem der Schafe *in situ* fragmentiert. Es haben zum Zeitpunkt der Untersuchung keine Lösungsvorgänge stattgefunden, die ein Migrieren der Zellen in Richtung Defektzentrum erlauben würden, lediglich kleine Risse an den äußeren Rändern des Implantates konnten zellulär erschlossen werden. Damit ist eine der zentralen Anforderungen an diese Therapieform nicht gegeben: das Material kann nicht wie gefordert osteokonduktiv wirken und damit dem sich regenerierenden



**Abbildung 46:** Bei den reaktiven Tieren ist am Implantat (IP) eine Aufreihung von roten, TRAP-positiven Polykaryen zu sehen. An Bohrmehl (BM) und Lagerknochen (LK) liegt neu formierter Knochen (▼). Zusammenhängende, meist einreihige Osteoblastenlayer (▼) produzieren Osteoid. Paraffin, TRAP.

Knochen nicht als Leitschiene dienen.

Die zelluläre entzündliche Reaktion innerhalb dieser Gruppe ist sehr heterogen. Die unilaterale, starke Infiltration des peripheren Defektbereiches mit neutrophilen Granulozyten deutet auf eine subklinische Infektion hin. Dieses Schaf ist im Hinblick auf die Biokompatibilitäts-Untersuchung des eingebrachten Materials daher nicht weiter berücksichtigt worden. Bei weiteren 2 Schafen ist keine nennenswerte zelluläre Reaktion auf das Implantat zu verzeichnen. Die Reaktion beschränkt sich auf die Reparatoren der durch den Bohrvorgang entstandenen Läsionen am Lagerknochen und Fettmark. Bei den übrigen Schafen ist eine deutlich von Zellen monozytären Ursprungs dominierte entzündliche Reaktion im peripheren Bereich des Defektes zu sehen. Die vielkernigen Zellen erstrecken sich gleichermaßen an Knochen, Bohrmehl und entlang des Knochenersatzstoffes. Sie erscheinen am Lagerknochen nahe der Bohrkante gegenüber den knochenbauenden Osteoblasten dominant, sodass es im weiteren Heilungsverlauf zu Osteolysen kommen könnte. Dieses würde zu einer Lockerung und Abkapselung des Implantates führen, das therapeutische Ziel wäre verfehlt. Die perlschnurartige Anordnung der Polykaryen an dem modifizierten Zement könnte jedoch ebenso in einem sehr langsamen zentripetalen Material-Abbau resultieren. Die stellenweise starke Besiedelung des Implantat-Randes mit Osteoblasten ist als ein Hinweis auf eine gute Biokompatibilität des Implantates zu werten. Entscheidend für den Fortgang der Heilung wird die Entwicklung der Entzündung im Bereich der Bohrkante sein. Der Nachweis von Lymphozyten ist in diesem Zusammenhang ein Indiz für das Stadium der chronischen Entzündung und führt zu weiteren Fusionsvorgängen, die in einer Steigerung der Phagozytose-Leistung im Rahmen der Fremdkörperreaktion resultiert. Dieses könnte zu einem beschleunigten zentripetalen Abbau des CaP-Komposites führen. Der Abbau wird jedoch in jedem Fall langsamer von statten gehen als bei osteokonduktiveren Knochenzementen.

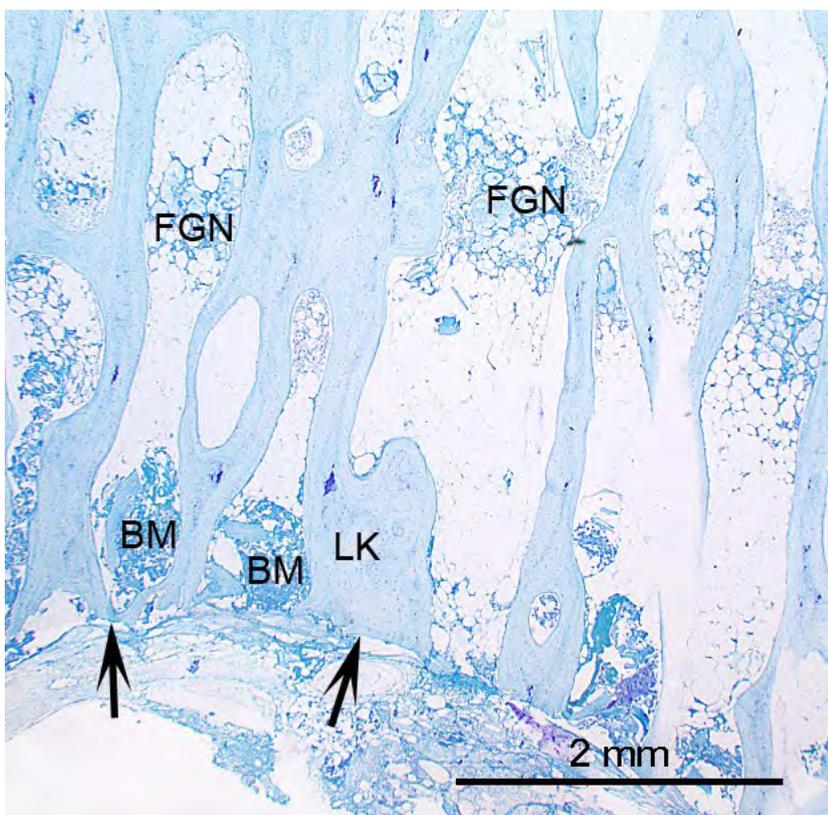
## 4.6 Gruppe IV: Leerdefekte

### 4.6.1 Histologie

In der Übersichtsvergrößerung zeigen die Leerdefekte von den der Gruppe IV angehörenden Schafen angefüllt mit Erythrozyten-reicher, Fibrin-dominiertes Matrix.

In stärkeren Vergrößerungen sieht man auch in dieser Gruppe in der Peripherie des Defektes Bereiche von Fettgewebsnekrosen, denen Gruppen-bildende, ein- und mehrkernige Phagozyten anliegen. Diese Polykaryen haben bis zu 20 Zellkerne. Insgesamt ist die Ausdehnung der Fettgewebsnekrosen im Vergleich zu den vorhergehenden Gruppen vergleichbar stark ausgeprägt. An einigen Stellen ist eine vom Lagerknochen ausgehende Osteogenese innerhalb der Peripherie zu beobachten, diese erstreckt sich nicht in Richtung des Defektes sondern zwischen den spongiösen Knochenbälkchen.

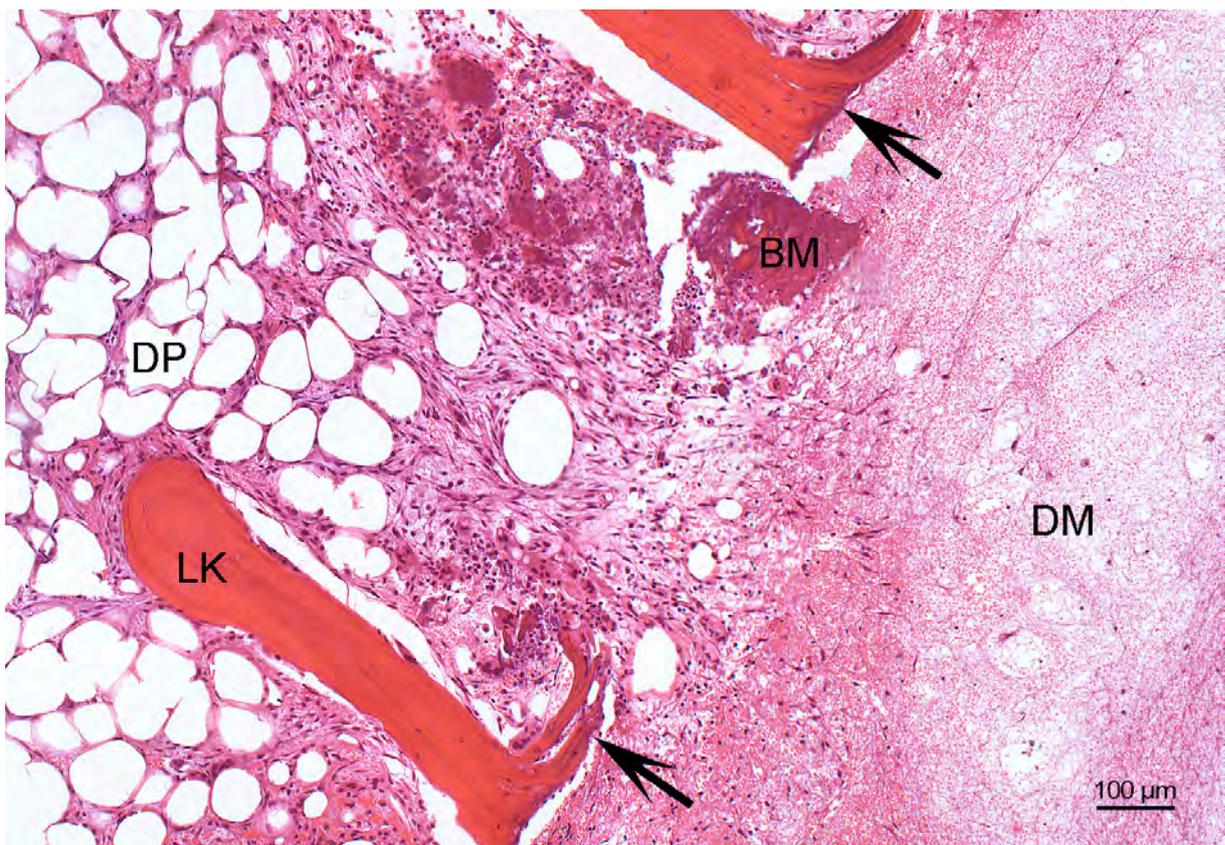
An den Bereich der Fettgewebsnekrosen schließt sich innerhalb der Peripherie wieder Fettmark an (Abb. 47), welches vor allem von Erythrozyten aber auch durch Fibrozyten und -blasten infiltriert ist und zunehmend in Richtung der Bohrkante in Granulationsgewebe übergeht. Die meist einkernigen Phagozyten orientieren sich



**Abbildung 47:** Der periphere Defektbereich lässt in regelmäßigem Abstand zur Bohrkante ( $\uparrow$ ) einen Saum von Fettgewebsnekrosen (FGN) zwischen den Bälkchen des Lagerknochens (LK) erkennen, auf den wieder intaktes Fettmark folgt. Dieses erstreckt sich bis zur Bohrkante, wo Bohrmehl (BM) lokalisiert ist. Dünnschliff (T7200), Toluidinblau.

dabei entlang des Lagerknochens sowie um das Bohrmehl, sind aber auch frei zwischen den Spongiosabälkchen zu erkennen. Die Zahl der Makrophagen innerhalb der Defektperipherie nimmt mit zunehmender Annäherung an die Bohrkante zu. Im Bereich der Bohrkante sind auch Polykaryen zu detektieren.

Im mittleren Bereich des Defektes ist nur in der Nähe der Bohrkante ein Erschließen des Defektraumes von Fibroblasten und Fibrozyten zu erkennen, dort sind wenige Makrophagen und Lymphozyten sowie Anschnitte von Gefäßen zu sehen. Innerhalb von Defektmitte und Defektzentrum dominieren Erythrozyten in einem dichten Netzwerk von Fibrin, es sind auch vereinzelt Granulozyten und Lymphozyten zu sehen (Abb. 48).



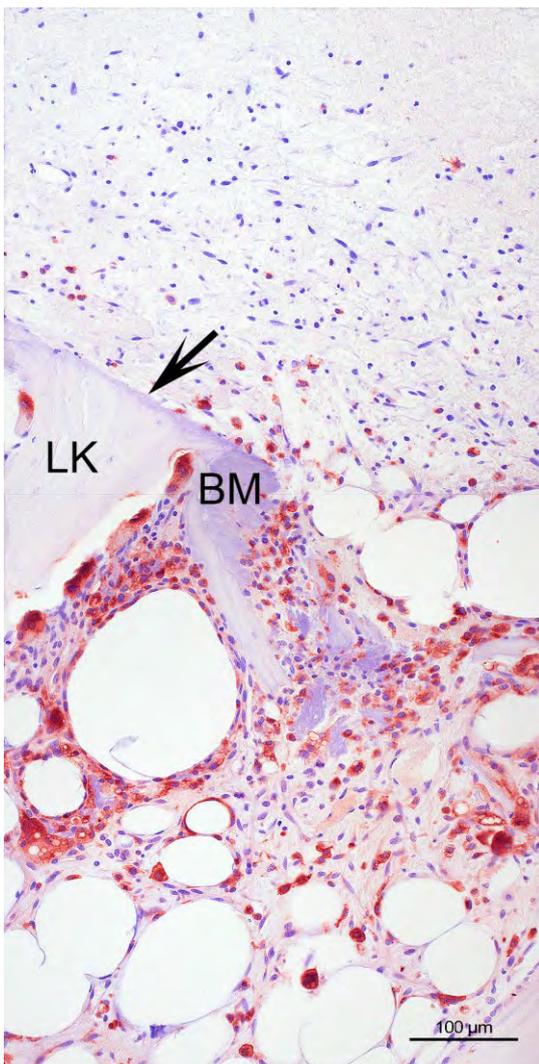
**Abbildung 48:** Übergang Defektperipherie (DP) zur Defektmitte (DM). Nur wenige Zellen dringen ausgehend vom Granulationsgewebe nahe der Bohrkante ( ↘ ) in das Erythrozyten-reiche Fibrin-Netzwerk vor. Das Granulationsgewebe ist besonders dort ausgebildet, wo zwischen den spongiosen Knochenbälkchen des Lagerknochens (LK) Bohrmehl (BM) zu liegen gekommen ist. Paraffin, HE.

## 4.6.2 Immunhistochemie

Die zum Nachweis von CD16 durchgeführten immunhistochemischen Untersuchungen führten auch nach thermischer und enzymatischer Antigendemaskierung nur zu unspezifischen Signalen.

### 4.6.2.1 CD68

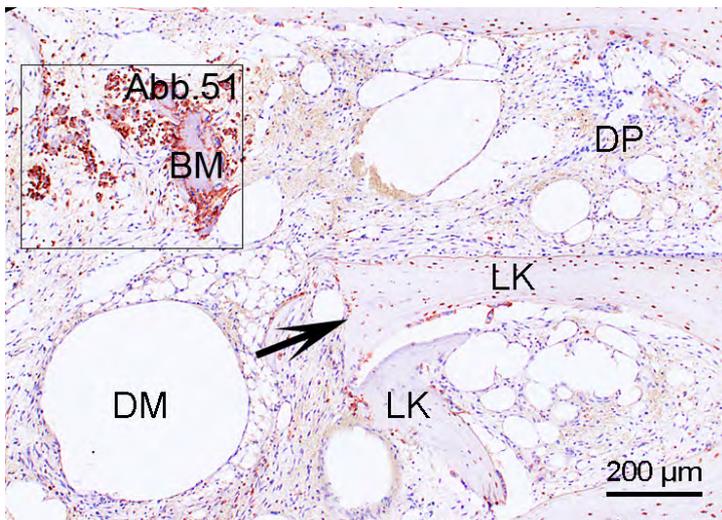
CD68 markierte Zellen finden sich fast ausschließlich im Bereich der Defektperipherie. Sie sind gruppenweise um die Fettgewebsnekrosen und das Bohrmehl sowie frei im Granulationsgewebe der nahe der Bohrkante angeordnet, nur vereinzelt sind sie in dem von Fibroblasten erschlossenen Teil des mittleren Defektbereiches zu sehen. Dort sowie nahe der Bohrkante sind sie einkernig, während sich anliegend an das Bohrmehl und das nekrotische Fettgewebe auch vielkernige Zellen anfärben lassen (Abb. 49). Auch die dem Lagerknochen anliegenden Osteoklasten sind markiert, ihre Zahl nimmt in Richtung Bohrkante zu.



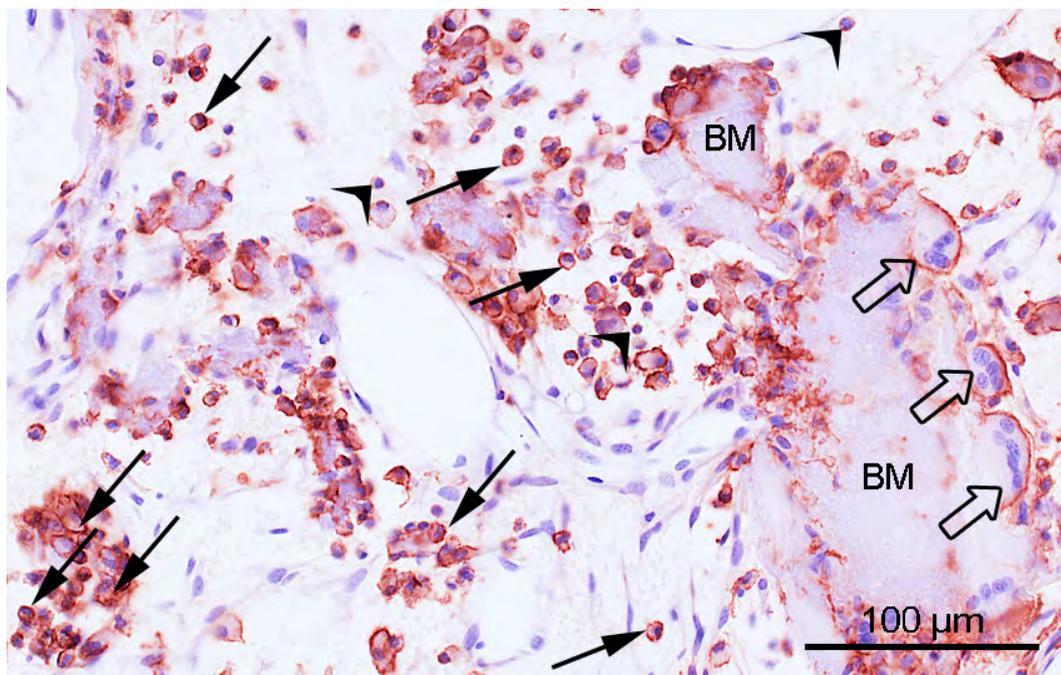
**Abbildung 49:** Übergang der Defektperipherie in die Defektmitte: Konzentration der CD68-markierten Zellen (rot) entlang des Lagerknochens (LK) und des Bohrmehls (BM). Im mittleren Defektbereich sind nur einzelne mononukleäre Zellen markiert. Diese sind vor allem in der unmittelbaren Umgebung der Bohrkante (↙) zu finden. Paraffin, CD68.

#### 4.6.2.2 CD44

Wie bei den anderen Gruppen können die Phänomene der starken basolateralen Präsentation von CD44 bei Bohrmehl-adhärenenten mono- und multinukleären Phagozyten und deren Gruppenbildung (Abb. 50) auch bei den unbefüllten Defekten nachvollzogen werden. Die markierten Lymphozyten sind im Bereich des Bohrmehls in Nachbarschaft zu den Phagozyten sowie vereinzelt im mittleren Defektbereich zu finden. Insgesamt ist jedoch ihr Vorkommen zahlenmäßig geringer ausgeprägt als bei den vorangehenden Gruppen.



**Abbildung 50:** Übergang Defektperipherie (DP) zu Defektmitte (DM): markierte Zellen konzentrieren sich am Bohrmehl (BM). Lagerknochen (LK); Bohrkante (↗). Paraffin, TRAP.



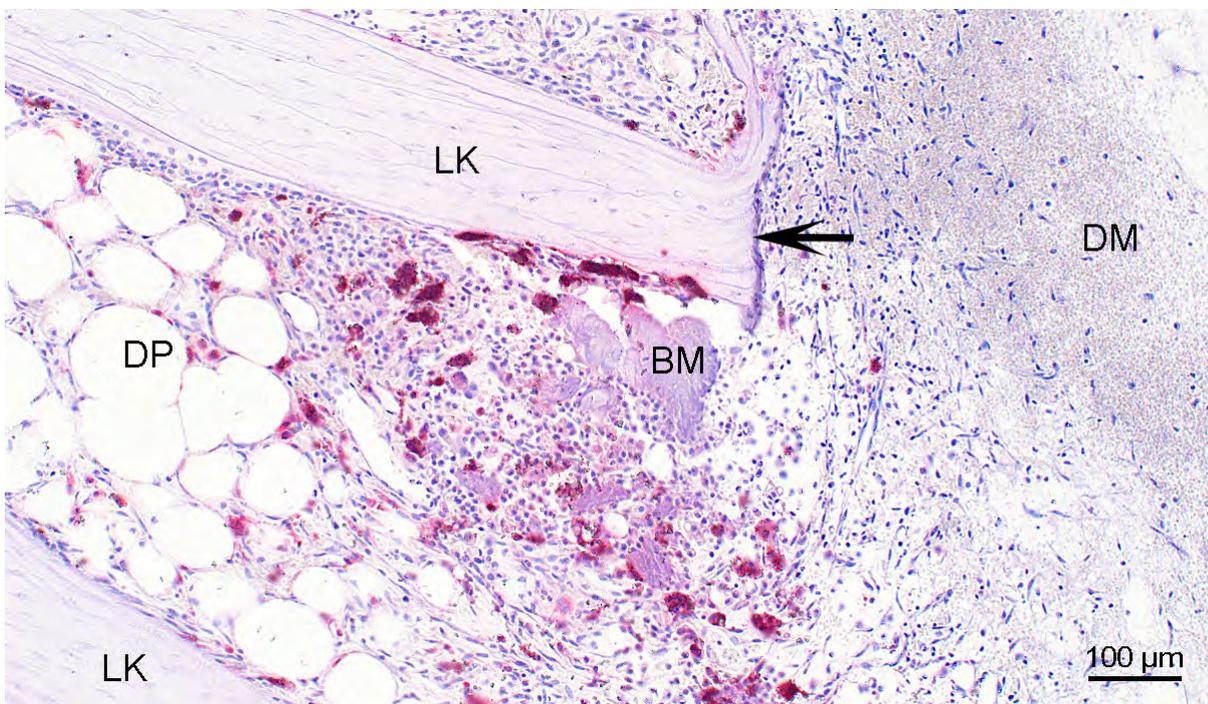
**Abbildung 51:** Ausschnitt aus Abb.49: Gruppen bildende Makrophagen (↘) sowie Polykaryen (↗) sind im Granulationsgewebe und am Bohrmehl (BM) zu identifizieren, dazwischen einzelne Lymphozyten (↖). Paraffin, CD44.

### 4.6.3 Enzymhistochemie - TRAP

Abgesehen von den in der Peripherie anliegend an den Lagerknochen markierten Osteoklasten konzentrieren sich die Zellen, in denen eine TRAP-Aktivität nachgewiesen werden kann auf die Defektperipherie nahe der Bohrkante (Abb. 52). Die dort dem Bohrmehl und dem Lagerknochen anliegenden Polykaryen sowie die frei im Granulationsgewebe liegenden Makrophagen und Polykaryen sind ausnahmslos markiert, die in die Defektmittle vorgedrungenen Makrophagen zeigen kein oder nur ein sehr schwaches Signal im Vergleich zu den Polykaryen im Bereich des Bohrmehls.

### 4.6.4 Zusammenfassung der Gruppe IV: Leerdefekte

Bei allen Tieren, denen nach dem Bohrvorgang kein Knochenersatzmaterial implantiert wurde zeigte sich ein einheitliches Bild: Es findet zum Untersuchungszeitpunkt eine zelluläre Reaktion auf das durch den Bohrvorgang gesetzte Trauma statt, die sich auf das nekrotische Fettmark sowie auf moderate Umbauprozesse im Bereich des Bohrmehls und der Bohrkante beschränkt. Die



**Abbildung 52:** Übergangsbereich Defektperipherie (DP) zu Defektmittle (DM) mit Bohrkante (←). Die rot angefärbten, TRAP-markierten Zellen sind vor allem am Bohrmehl (BM) im Bereich der Bohrkante zu finden. In dem äußeren Randbezirk der Defektmittle sind nur vereinzelt positive Zellen nachweisbar. Paraffin, TRAP.

Defekte sind nur in direkter Nachbarschaft zu der Bohrkante von Fibroblasten erschlossen. Eine Tendenz zur gerichteten Osteogenese ist nicht festzustellen. Das Stadium einer akuten Entzündung ist bei keinem der Schafe festzustellen. Die geringe Zahl an Lymphozyten spricht für das Vorliegen einer milden chronisch-entzündlichen Antwort als Reaktion auf das Operations-Trauma.

#### **4.7 Vergleichende Beurteilung**

Die Tiere aller Versuchsgruppen weisen innerhalb der Defektperipherie in annähernd übereinstimmendem Abstand zur Bohrkante Fettgewebsnekrosen auf, welche traumatisch durch den Bohrvorgang entstanden sind. Diese Bereiche sind durch eine Fremdkörperreaktion charakterisiert: dem nekrotischen Fettgewebe liegen Polykaryen an, in deren Nachbarschaft auch einkernige Makrophagen und Lymphozyten zu finden sind (Tab. 3). Die Zellen der monozytären Linie weisen eine deutliche Synthese von CD44 auf. Die Bereiche der Fettgewebsnekrosen sind bei allen Tieren – bis auf zwei Tiere der Gruppe III – zugleich als die Anfangsabschnitte des Granulationsgewebes zu betrachten.

Während bei den Tieren der Gruppe I sowohl in der Defektperipherie als auch im Bereich der Defektmittle noch deutliche Anzeichen einer chronischen Entzündung zu sehen sind, sind in der Gruppe II bis zur Defektmittle nur wenige Hinweise auf das Vorliegen eines chronischen Entzündungsgeschehens festzustellen, hier dominieren die Merkmale einer Fremdkörperreaktion. Die chronische Entzündungsphase wird in Gruppe II erst im Granulationsgewebe der Defektmittle am Übergang zum Defektzentrum offenbar, in Form von Makrophagen, Lymphozyten sowie wenigen mehrkernigen Zellen (Tab. 3). Bohrkante, Bohrmehl und die äußeren CaP-Partikel der Defektmittle sind bereits mit einem geschlossenen, unterschiedlich breiten Saum aus Osteoblasten und neu gebildetem Osteoid sowie dazwischen liegenden mehrkernigen Phagozyten umgeben (Abb. 24, 25).

Anders und sehr heterogen stellen sich die Tiere der Gruppe III dar. Hier sind einerseits Defektareale zu sehen, die keine Reaktion auf das implantierte Material zeigen. Auch am Bohrmehl und der Bohrkante finden keine zellulären Reaktionen statt. Im Gegensatz dazu weisen zwei weitere Schafe dieser Gruppe eine deutliche Reaktion auf den verwendeten Werkstoff auf. Es ist eine deutlich von Zellen der monozytären Linie geprägte Entzündungsreaktion im Bereich des Lagers zu sehen,

welche sich auf die Implantatoberflächen fortsetzt: Hier überwiegen die Abbauprozesse durch vielkernige Zellen, die im Sinne einer Fremdkörperreaktion sowohl in Richtung auf den Lagerknochen als auch entlang der Implantatoberflächen resorptiv beziehungsweise degradierend aktiv sind. Bei diesen Schafen ist auch eine beginnende Osteogenese am Implantat in Form von mehrschichtigen hochprismatischen Osteoblastensäumen zu sehen (Abb. 40). Gemein ist allen Schafen der Gruppe III, dass sich das Implantat als Zylinder, bestehend aus eng gepackten Kristallen darstellt, welcher aufgrund des Fehlens von Poren ein Erschließen des Defektzentrums unmöglich macht.

Die akute Phase der Entzündung findet bei den Tieren der Gruppe I und II im Defektzentrum statt. Hier dominieren segmentkernige, zum Teil pyknotische Granulozyten in den zellulär erschlossenen Poren des Implantates. Lediglich in Gruppe II sind schon erste Lymphozyten als erstes Zeichen einer aufkommenden chronischen Entzündung zu sehen (Tab. 3). Diese Phase der Entzündung ist bei den reaktiveren Tieren der Gruppe III nur in wenigen Bereichen unmittelbar angrenzend an den Knochenzement nachvollziehbar.

Die vor allem bei den Tieren der Gruppen I und II erkennbare Staffelung der unterschiedlichen Phasen der Entzündung von peripher in Richtung Defektzentrum ist als Ausdruck der zeitlichen Abfolge der zellulären Besiedelung des Defektes zu werten: Die vorgeformten Makroporen des in Gruppe II verwendeten Granulates erlauben ein schnelleres zelluläres Erschließen des Defektzentrums, sodass die Phase der akuten Entzündung zentraler zu finden ist als bei den mit TCP-Zement befüllten Defekten, wo erst durch Fragmentierungs- und Lösungsvorgänge nach der Implantation Poren im Material entstehen, die nachfolgend erschlossen werden können. Diese zeitliche Abfolge lässt sich bei den reaktiven Tieren der Gruppe III nicht nachvollziehen. Hier beschränkt sich die zelluläre Reaktion aufgrund der fehlenden Porosität auf die Defektperipherie. Der Kontakt der Zellen zur Oberfläche des kompakten Zementes ist vergleichsweise geringer als in den Gruppen I und II. Verschiedene Phasen der Entzündung lassen sich auf dem engen Raum nicht nachweisen, jedoch dominiert die durch die Polykaryen gekennzeichnete Fremdkörperreaktion das Entzündungsgeschehen.

Zusammenfassend zeigt die vorliegende Studie, dass der verwendete Versuchsaufbau und der Untersuchungszeitpunkt gut geeignet sind, um die Biokompatibilität von Knochenersatzstoffen in der frühen Heilungsphase zu überprüfen.

Das CaP-Granulat weist die besten osteokonduktiven Eigenschaften auf, bei einer in der Defektperipherie und den äußeren Abschnitten der Defektmitte nur (noch) schwach ausgeprägten Fremdkörperreaktion, und führt zu einer deutlich überlegenen Knochenneubildung in der Frühphase *p.i.* (Tab. 4). Auch der TCP-Zement zeigt gute osteokonduktive Eigenschaften. Allerdings fällt das Ausmaß der Knochenneubildung im direkten Vergleich zum CaP-Granulat deutlich geringer aus und die chronisch entzündliche Reaktion stellt sich am Übergang zur Defektmitte noch ausgeprägter dar (Tab.3, Tab.4). Der mithilfe von Phosphoserin modifizierte CaP-Zement bietet sich sowohl aufgrund seiner fehlenden Porosität und damit unterlegenen Osteokonduktivität und Stimulus zur Osteogenese als auch der heterogenen entzündlichen Reaktion auf das Implantat in dieser Form der Anwendung nicht an (Tab.4).

Vergleichende Übersicht: Entzündungszellen und deren räumliche Verteilungsmuster												
Gruppe:	I			II			III			IV		
Material:	TCP-Zement			CaP-Granulat			CaP-PS-Zement			Leerdefekt		
Lokalisation	DP	DM	DZ	DP	DM	DZ	DP	DM	DZ	DP	DM	DZ
Granulozyten	+	+	++	-	+	++	+/+	-	-	-	-	-
Lymphozyten	+	++	-	+	+	+	+/++	-	-	+	(+)	-
Makrophagen	++	++	(+)	++	++	(+)	+/++	-/+	-	+	(+)	-
Polykaryen	++	+	-	++	+++	-	+/++	-/+	-	+	(+)	-

Tabelle 3: Entzündungszellen und deren räumliche Verteilungsmuster  
 -: keine      (+): vereinzelt      +: einige      ++: viele      +++: sehr viele  
 DP: Defektperipherie      DM: Defektmitte      DZ: Defektzentrum

Vergleichende Übersicht: Defektfüllung, Ausmaß der Osteogenese und der Fremdkörperreaktion						
Gruppe	I:	II:	III:	IV:		
Material	TCP-Zement	CaP-Granulat	CaP-PS-Zement	Leerdefekt		
Defekt-Füllung	<i>In situ</i> fragmentierter Zement	Granulat-Partikel mit intra- partikulären Poren	Kompakter Zement-Block	Erythrozyten- reiche, Fibrin- dominierte Matrix		
Knochen- neubildung	LK (DP):	+	LK (DP):	+	LK (DP):	+
	BM:	++	BM:	++	BM:	+ / -
	BK:	+	BK :	+++	BK:	+ / -
	TCP:	+	CaP:	++	CaP-PS:	+ / -
Fremd- körper- reaktion	DP:	++	DP:	++	DP:	++ / +
	BK:	++	BK:	+	BK:	++ / -
	DM:	+	DM:	+++	DM:	-
	DZ:	-	DZ:	-	DZ:	-

Tabelle 4: Defektfüllung, Ausmaß der Osteogenese und der Fremdkörperreaktion  
 -: keine      +: mäßig      ++: deutlich      +++: stark  
 LK: Lagerknochen      DP: Defektperipherie      BK: Bohrkante      DM: Defektmitte  
 DZ: Defektzentrum

## 5 Diskussion

Ziel dieser Arbeit ist es, in der Frühphase der Entzündungsreaktion, 10 Tage nach der Implantation, drei verschiedene osteokonduktive Knochenersatzstoffe auf CaP-Basis anhand eines standardisierten Operations-Modells im Hinblick auf den jeweiligen Grad der Fremdkörperreaktion zu untersuchen. Es handelt sich um eine vergleichende Studie, wie sie unter anderem auch von Hak (2007) gefordert wird.

### 5.1 Tier- und Operationsmodell

Weil Nager im Vergleich zum Menschen einen deutlich beschleunigten Knochenstoffwechsel aufweisen, und Kaninchen eine dreifach schnellere Knochendegradation und -neubildung besitzen als der Mensch (Flautre et al., 1999), wurde das Schaf als Versuchstier gewählt. In Verknüpfung mit dem Tibiaboehrlochdefekt können die experimentell gewonnenen Erkenntnisse hinreichend auf die beim Menschen zu erwartenden Verhältnisse zu übertragen werden:

- Die organische und anorganische Zusammensetzung des ovinen Knochens ist nahezu identisch mit der von humanem Knochengewebe (Rehman et al., 1995).
- Die Tibia des Schafes ist in Form, Größe und Knochenstruktur mit menschlichem Knochen vergleichbar (Stünzle et al., 1998).
- Die Tibia des Schafes lässt sich mit gebräuchlichem humanmedizinischem Instrumentarium bearbeiten (Wissing et al., 1990).
- Sie liegt wie die menschliche Tibia in der Tragachse der Gliedmaße und erfährt ein ähnliches Belastungsmoment (Wissing et al., 1990).
- Die Geschwindigkeit der ablaufenden Regenerationsprozesse lassen sich am ehesten mit der menschlichen Knochenregeneration vergleichen (Wissing et al., 1990; Stünzle et al., 1998).

Das Bohrlochmodell erlaubt die Schaffung von standardisierten Knochendefekten, welche die systematische Untersuchung verschiedener Werkstoffe unter vergleichbaren Bedingungen ermöglicht (Stünzle et al., 1998). Dies beruht zum Einen auf der Tatsache, dass aufgrund des stabilen Lagers keine zusätzliche Osteosynthese zur Stabilisierung des Defektes notwendig ist. Zum Anderen ist das

Lager im Bereich des Tibiakopfes ersatzstark: Aufgrund der guten Vaskularisation wird ein rasches Einwachsen von Granulationsgewebe ermöglicht. Zudem hat der Defekt ein kritisches Ausmaß, was nach Gosain et al. (2000) bedeutet, dass dieser Defekt nicht durch körpereigene Regeneration knöchern durchbaut werden kann.

Das gewählte Operationsmodell dient der Identifizierung der Zellen am Implantationsort der Knochenersatzmaterialien. Die Zellcharakterisierung erlaubt es, Rückschlüsse auf das jeweilige Ausmaß der Entzündungssituation 10 Tage *p.i.* und damit auf die Biokompatibilität zu ziehen.

## 5.2 CaP-basierte Werkstoffe

Eingang in die Untersuchung fand ein durch Zugabe von Phosphoserin modifizierter CaP-Zement, der mit einem etablierten, nicht modifizierten CaP-Granulat gleicher chemischer Zusammensetzung und einem Zement auf  $\beta$ -TCP-Basis mit Blick auf die Fremdkörperreaktion und das knöcherne Einwachsverhalten verglichen wurde. Der Ausgangszement, welcher in Gruppe III mit Phosphoserin modifiziert verwendet wurde, basiert auf dem von Driessens et al. (1997) entwickelten injizierbaren Knochenzement. Er besteht aus einem Gemisch von  $\alpha$ -Tricalciumphosphat ( $\alpha$ -TCP), anhydriertem Dicalciumphosphat ( $\text{Ca}_2\text{HPO}_4$ ), Calciumcarbonat ( $\text{CaCO}_3$ ) und präzipitiertem Hydroxylapatit (pHA) mit einer wässrigen Lösung, welche Natriumhydrogenphosphat ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ) enthält. Ooms et al. (2003b) beobachteten übereinstimmend mit Driessens et al. (1997), dass die passive Resorption durch Lösungsprozesse bei diesem Zement eine untergeordnete Rolle spielt, und davon ausgegangen werden kann, dass die Degradation des Materials durch resorptiv aktive Zellen wie zum Beispiel Osteoklasten vorgenommen wird. Die Studie von Driessens (1997) zeigt, dass der Zement biokompatibel und osteokonduktiv ist, jedoch aufgrund seiner fehlenden Porosität einem rein zentripetalen Abbau unterliegt. Del Real et al. (2003) zeigten, dass durch das Erzeugen von Gasblasen im Zement geschaffene Makroporen tatsächlich zu einer deutlich beschleunigten zellulären Resorption des Zementes führt. Allerdings wurde die Porosität im Vorfeld geschaffen, das heißt es wurde nicht der ursprünglich injizierbare Zement eingebracht, sondern der ausgehärtete Zement als bereits geformter, poröser Körper. Bei den Tieren der Gruppe II wurde das auf dem Markt befindliche Calcibon-Granules<sup>®</sup> (Fa. Biomet Merck, Darmstadt) verwendet. Dieses entspricht in seiner

Zusammensetzung dem Zement der Gruppe III, jedoch wurden bei der Herstellung durch spezielle Verfahren Makro- (150-550  $\mu\text{m}$ ) sowie Mikroporen ( $<10\mu\text{m}$ ) im Granulat erzeugt, die das Wandern von Zellen des Granulationsgewebes und das Einsprossen von Blutgefäßen ermöglichen.

Da die Verbesserung der Biokompatibilität von Werkstoffen bei gleichzeitiger Optimierung der biomechanischen Eigenschaften von großem klinischen Interesse ist, haben sich eine Reihe von Wissenschaftlern der Modifikation von Werkstoffen gewidmet, indem Materialien aus allen Kategorien der Knochenersatzmaterialien auf unterschiedliche Weise mit Matrixproteinen wie OPN, OC, bFGF, BMP oder Coll I versetzt wurden (Knepper-Nicolai et al., 2003; Niedhart et al., 2003, 2004; Rammelt et al., 2004, 2005). Gegen ein kommerzielles Anbieten dieser Modifikationen sprechen aber die schlechte Verfügbarkeit von speziesspezifischem Protein und die damit verbundenen hohen Kosten (Reinstorf et al., 2004).

Daher hatten die Arbeiten von Reinstorf et al. (2004) zum Ziel, eine schnelle zelluläre Resorption ohne Anzeichen einer chronischen Entzündung bei gleichzeitiger Formation von neuem Knochen auf eine andere Art und Weise zu erreichen. Weil sich ein Granulat abhängig von dem Ort der Applikation in das umliegende Gewebe verlagern kann und auch keinen mechanischen Halt für das umliegende Gewebe bietet (Ooms et al., 2003a), wurde ein Zement gewählt und so modifiziert, dass sich dessen Interaktion mit den Zellen der Wirtsumgebung verbessert und gleichzeitig die biomechanischen Eigenschaften optimiert werden.

Unter Zugrundelegung der Erkenntnis, dass vor allem phosphorylierte Serinreste in Knochenmatrix-Proteinen wie BSP oder OPN mit Hydroxylapatit interagieren (Hunter et al., 1994 a,b; Ganss et al., 1999; Sodek et al., 1999; Benaziz et al., 2001), wurde O-Phospho-L-Serin (Phosphoserin, PS) in einer Konzentration von 10 mg/g zu dem in der vorliegenden Studie verwendeten Zement hinzugefügt.

### **5.3 Zellnachweis und -identifizierung**

Um die Phasen der Entzündung im Rahmen der Beurteilung der Biokompatibilität der implantierten Materialien richtig einschätzen zu können, ist es notwendig die beteiligten Zellen sicher identifizieren zu können. Gelingt dieses durch histologische Standardfärbungen wie der Hämatoxylin-Eosin-Färbung oder der Toluidinblau-

Färbung von Paraffinschnitten oder Dünnschliffpräparaten bei einigen Zell- Populationen wie den Granulozyten oder auch der Lymphozyten aufgrund des eindeutigen Phänotyps zuverlässig, so gestaltet sich die Zuordnung bei den ein- und mehrkernigen Zellen monozytären Ursprungs wegen des wechselnden Erscheinungsbildes im Zuge unterschiedlicher Differenzierungsgrade schwierig. Die sichere Charakterisierung der multinukleären Zellen als Osteoklasten oder FKRZ (sowie ihrer mononukleären Progenitorzellen) ist nur schwierig anhand ihrer im Lichtmikroskop zu erkennenden Morphologie sicher zu treffen. Um die mono- und multinukleären Zellen in ihrer Gesamtheit identifizieren zu können, wurden sie mit Hilfe eines gegen das Epitop EBM-11 des CD68-Antigens gerichteten Antikörpers immunhistochemisch detektiert.

CD68 ist ein mit Lysosomen assoziiertes Glykoprotein (110 kDa) und wird als spezifisch für Monozyten, Makrophagen und ihre Polykaryen inklusive der Osteoklasten angesehen (Athanasou et al., 1990, 1992, 1996, 1999). Im Rahmen der eigenen Untersuchungen erwies sich der EBM11-Klon des Anti-CD68-monoklonalen Antikörpers (mAK) ohne die Notwendigkeit der Antigendemaskierung als zuverlässiger Marker der monozytären Zelllinie an Paraffin-eingebetteten Schnitten. Die von Kunisch et al. (2004) beschriebene Reaktivität von aktivierten Endothelzellen mit dem EBM11-mAK kann an den im Rahmen dieser Untersuchung angefertigten Schnitte nicht bestätigt werden, wohl aber die Beobachtung, dass wenige Fibroblasten ebenfalls ein schwach markiertes Zytoplasma aufweisen. Dies könnte auf das Vorkommen von CD68-haltigen Lysosomen in den entsprechend markierten Zellen zurückzuführen sein.

Weil sowohl der Multinukleation von FKRZ als auch der von Osteoklasten ein Fusionsvorgang der mononukleären Zellen vorausgeht, wurde die immunhistologische Identifizierung des Membranproteins CD44 angestrebt. Wie in der Literaturübersicht (Kap. 2.2, S.21) beschrieben, geht der Fusion von kompetenten Makrophagen eine verstärkte Synthese von CD44 voraus (Sterling, 1998), welche nach dem Fusions-Modell von Vignery (2005) die Annäherung der Plasmamembranen der fusionierenden Zellen zur Folge hat. CD44 ist ein ubiquitäres, vor allem ein bei allen migrierenden Zellen und Osteozyten nachweisbares Membranprotein, wird jedoch auch von Makrophagen synthetisiert. Die Colokalisation von CD44 mit CD68 in Zellen der Monozyten/Makrophagen-Linie

wurde in der Gruppe II exemplarisch durch Doppelinkubation aufgezeigt.

Bei dem verwendeten, gegen porcines CD44 gerichteten Antikörper der Firma Serotec (MCA1449) ist sowohl eine Kreuzreaktivität gegen die ovine Form als auch die Verwendbarkeit auf Paraffin-eingebetteten Schnitten beschrieben. Wie die Ergebnisse der vorliegenden Untersuchung zeigen, hinterlassen der eingesetzte Antikörper und das verwendete Detektionssystem ein differenziertes, auf die Zellmembran beschränktes Färbemuster.

Zusätzlich wurde in enzymhistochemischen Untersuchungen die TRAP-Aktivität der mono- und multinukleären Phagozyten in allen Gruppen überprüft. Diese gilt als ein charakteristisches, sogenanntes Markerenzym von Osteoklasten, wurde jedoch auch bei Makrophagen, Fremdkörperriesenzellen und Dendritischen Zellen nachgewiesen (Kadoya et al., 1994; Athanasou et al., 1996; Gauthier et al., 1999; Hayman et al., 2000, 2001). Sie gilt allgemein als Indikator für das Ausmaß zellvermittelter Degradation von Knochen und Knochenersatzmaterialien. Halleen et al. (2002) konnten *in vivo* die Korrelation der Serum-Konzentration von TRAP-5b mit der Knochenresorptionsrate nachweisen. Kirstein et al. (2006) zeigten, dass TRAP nur von resorptiv aktiven Osteoklasten auf die Knochenoberfläche sekretiert wird, und vermuten, dass dieses resorptive Verhalten der Osteoklasten von einem bislang unbekanntem „Mineral“-Rezeptor abhängig sei. Für die Funktion der TRAP innerhalb des Resorptionsprozesses existieren verschiedene Ansätze. Es wird angenommen, dass das Enzym von Osteoklasten auf die Knochenoberfläche sekretiert wird, anschließend durch Endozytose wieder aufgenommen und durch Transzytose zu der basolateralen Oberfläche transportiert wird (Halleen et al., 2003, Vääräniemi et al., 2004, Ljusberg et al., 2005). In den Vesikeln generiert das Enzym freie Sauerstoff-Radikale, welche zum Auflösen des durch Kathepsin K freigesetzten Kollagens benötigt werden (Halleen et al., 1999, 2003; Vääräniemi et al., 2004, Ljusberg et al., 2005). Darüber hinaus agiert die TRAP auch als Phosphatase welche in der Howship'schen Lakune OPN und BSP dephosphoryliert. In dieser Funktion wirkt das Enzym auch regulatorisch, denn dephosphoryliertes OPN dient den Osteoklasten nicht mehr als Bindungspartner und verhindert somit deren Haftung am Knochen (Ek-Rylander et al., 1994).

## 5.4 Fremdkörperreaktion als Indikator der Biokompatibilität

Durch das Trauma, welches bei der Implantation von Biomaterialien entsteht, kommt es zunächst zur Interaktion von Blut mit dem eingebrachten Material sowie zur Ausbildung einer provisorischen Matrix. Nach dem Schema von Anderson et al. (2008) folgt auf die akute Entzündung, welche sich nach wenigen Tagen auflöst, die chronische Entzündung und die Fremdkörperreaktion mit Ausbildung von Granulationsgewebe und einer fibrösen Kapsel. Diese Entzündungssequenzen sind *in vivo* nicht scharf voneinander abgesetzt und je nach Untersuchungszeitpunkt und Werkstoff können verschiedene Phasen dieser Kaskade nebeneinander existieren beziehungsweise in einander übergehen.

Wie die Ergebnisse der vorliegenden Untersuchung zeigen, dominieren bei den Tieren der Gruppen I und II vom Defektzentrum bis zu dem Übergang zur Defektmitte neutrophile Granulozyten das Zellbild. Dieser Defektbereich ist bei der Gruppe III aufgrund des fehlenden interkonnektierenden Porengefüges nicht von Zellen erschlossen, bei den Tieren mit unbefüllten Defekten liegt eine Fibrin-dominierte Matrix vor. Im Zentrum der Defekte von Gruppe II sind jedoch im Unterschied zu denen der Gruppe I bereits erste Anzeichen einer chronischen Entzündung in Form von Lymphozyten nachweisbar.

Nähert man sich der Fragestellung, ob die bei den Tieren der Gruppen I und II festzustellende akute Phase der Entzündung über die gesamten 10 Tage Standzeit aufrechterhalten wurde, so muss bedacht werden, dass neutrophile Granulozyten von kurzer Lebensdauer sind und schon nach 24-48 Stunden untergehen. Darüber hinaus ist die Phase der Emigration von Neutrophilen nur von kurzer Dauer, denn die chemotaktischen Faktoren für diese Population werden kurzfristig aktiviert (Anderson, 2001). Histologisch ist bei beiden Gruppen auffällig, dass eine Vielzahl von Zellen nicht mehr intakt ist (Abb. 30), sondern Karyopyknosen als Zeichen eines Zelluntergangs zeigen. Daraus lässt sich schließen, dass in Gruppe I und II die Bereiche, in denen sich zum Untersuchungszeitpunkt noch neutrophile Granulozyten nachweisen lassen, erst vor etwa 24-48 Stunden von diesen erschlossen wurden. Dies kann zum Einen durch Lösungs- und Fragmentierungsprozesse der Werkstoffe *p.i.* erklärt werden: Diese Vorgänge setzen sich noch Tage nach der Implantation fort und so kommt es immer wieder zu Oberflächenvergrößerungen, Blut-Material-Interaktionen und somit zu einem chemotaktischen Stimulus, welcher die

Rekrutierung der Granulozyten aufrecht erhält. Zum anderen ist 10 Tage *p.i.* bereits eine Neovaskularisation der Defektmittle erfolgt, sodass die Evasation der Granulozyten nicht, wie unmittelbar nach der Implantation, nur aus der Defektperipherie erfolgt, sondern nunmehr auch von der inzwischen vaskularisierten Defektmittle. Dieses hat eine wesentlich verminderte Migrationsdistanz zur Folge.

Vergleicht man die Gruppen I und II miteinander, so ist ihnen gemeinsam, dass sowohl in der Defektperipherie als auch in der Defektmittle zahlreiche Makrophagen identifiziert werden können. Allerdings unterscheidet sich die Verteilung der Polykaryen deutlich voneinander: Bei der Gruppe I (TCP) sind zahlreiche Polykaryen im Bereich der Fettgewebsnekrosen und des Granulationsgewebes der Defektperipherie nahe der Bohrkante zu finden. In der Defektmittle sind Polykaryen nur anliegend an den Fragmenten des TCP-Zementes nahe der Bohrkante zu detektieren. Bei der Gruppe II (CaP-Granulat) hingegen ist eine ringförmige Konzentration von Polykaryen entlang der Fettgewebsnekrosen und des Bohrmehls zu sehen. Dieser schließt sich eine Zone der Osteogenese lokalisiert zwischen der Bohrkante und den ersten Granulat-Partikeln an, wo verhältnismäßig wenige Zellen monozytären Ursprungs zu sehen sind. Der Grund hierfür ist in der Tatsache zu sehen, dass durch das Osteoid auf dem Werkstoff und dessen Besiedelung mit Osteoblasten keine freien Granulatoberflächen zur Verfügung stehen. In den Bereichen der Defektmittle, wo die Granulat-Oberfläche noch nicht mit Osteoblasten besetzt ist, sind dagegen viele CD68-markierte Polykaryen und Makrophagen im Granulationsgewebe und entlang der Granulat-Oberflächen perlschnurartig aufgereiht. Bei zwei Tieren innerhalb der Gruppe III konzentrieren sich die markierten Zellen in der Defektperipherie im Granulationsgewebe, an den Fettgewebsnekrosen und dem Lagerknochen nahe der Bohrkante. In der Defektmittle liegen die markierten Polykaryen und Makrophagen entlang der Werkstoffoberfläche. Zwei weitere Schafe dieser Gruppe zeigten keine Reaktion auf die Implantation des Zementes. Die detektierten Zellen beschränken sich auf die ringförmig um den Defekt sichtbaren Fettgewebsnekrosen der Defektperipherie. Auch bei den Tieren der Gruppe IV stellen sich die Zellen der monozytären Linie durch eine deutliche Markierung von CD68 dar. Sie sind fast ausschließlich innerhalb der Defektperipherie entlang der Fettgewebsnekrosen und dem Bohrmehl lokalisiert. Einige wenige sind in den Bohrkanten-nahen Bereichen der Fibrin-Matrix innerhalb der Defektmittle zu

erkennen. Im Vergleich zu den übrigen Gruppen ist die „zelluläre Situation“ bei den Tieren der Gruppe IV als physiologische Reaktion auf das operationsbedingte Trauma anzusehen. Die Fremdkörperreaktion als Reaktion des Körpers auf einen implantierten Werkstoff ist hier auszuschließen. Diese Beobachtung legt nahe, dass die bei allen Gruppen nachgewiesene Fremdkörperreaktion an den Fettgewebse nekrosen der Defektperipherie vor allem traumatisch bedingt ist und sich unabhängig von dem implantierten Material vollzogen hat. Zwei Tiere der Gruppe III zeigen ein ähnliches reaktionsloses Zellbild. Dieses Phänomen kann viele Ursachen haben: Abweichende Bedingungen *intra operationem*, wie zum Beispiel die Notwendigkeit von vermehrtem Spülen des Defektbereiches oder das dichte Packen des Defektes mit dem Werkstoff, sodass keinerlei Bewegung zwischen dem Zement und dem Knochenlager möglich ist. Weitere mögliche Ursachen wären chirurgische Fehler in der Wahl des Zuganges: Eine Verbindung zum Kniegelenk und damit das Eindringen von Synovialflüssigkeit in den Defektbereich sind in Betracht zu ziehen, auch wenn in den histologischen Untersuchungen ein solche Abweichung nicht nachvollziehbar ist. Auch individuelle Ursachen, wie verminderte Durchblutung des Defektbereiches, wären denkbar.

Die anderen beiden Schafe der Gruppe III wiesen ähnlich wie die Tiere der Gruppen I und II eine von CD68-positiven Zellen dominierte Reaktion auf. Weil am Zement und innerhalb der Defektperipherie multinukleäre Zellen vorherrschen (Abb. 42), ist hier von einer Fremdkörperreaktion zu sprechen. Entsprechend spiegelt bei den Tieren der Gruppe II die große Zahl an Polykaryen innerhalb der Defektmitte den Vorgang einer Fremdkörperreaktion in diesem Bereich wider. Lediglich am Übergang zum Defektzentrum herrscht noch die chronisch entzündliche Antwort vor.

Bei den Tieren der Gruppe I sind hauptsächlich monohistiozytäre Zellen im Granulationsgewebe der Defektmitte vorhanden. Diese sind vor allem Ausdruck einer chronischen Entzündung. Das Vorkommen von Polykaryen im Bereich der Defektperipherie und an den äußeren TCP-Fragmenten weist jedoch auf das Einsetzen der Fremdkörperreaktion hin. Diese Verteilung der Entzündungszellen unterstreicht die für die zentralen Bereiche der Gruppe I aufgestellte These der zeitabhängigen Besiedelung der Defekte, die mit den sich vollziehenden Lösungs- und Fragmentierungsvorgängen koinzidieren.

Anhand dieser Ergebnisse lässt sich sagen, dass die Progression der Entzündungs-

vorgänge bei porösen Knochenersatzstoffen nach der Implantation von peripher nach zentral fortschreitet und die Geschwindigkeit dieser Progression abhängig ist von der Löslichkeit des Werkstoffes und der Ausprägung der Poren: Sukzessive entstehende Poren erlauben eine langsamere Progression als präformierte, interkonnektierende Poren.

Athanasou (1990) verweist mit Blick auf die immunphänotypische Identifikation von Zellen monozytären Ursprungs auf die Synthese von CD68. Eine Differenzierung zwischen Osteoklasten, ihren Vorläufern und Makrophagen sowie FKRZ kann aufgrund der Tatsache, dass auch die Osteoklasten und ihre Vorläufer der monozytären Linie entstammen, mit Hilfe der CD68-Immunhistochemie nicht vorgenommen werden. Mithilfe des immunhistochemischen Nachweises von CD68 wurden daher in den vier Gruppen zuverlässig alle Zellen der monozytären Linie markiert. Dabei zeigten alle dem Knochen, dem Bohrmehl und dem Implantat anliegenden Polykaryen ein ebenso positives zytoplasmatisches Färbesignal wie die frei im Granulationsgewebe vorkommenden Polykaryen und einkernigen Makrophagen/Monozyten.

Um die Aktivität der CD68-positiven Zellen einschätzen zu können, wurde enzymhistochemisch die Produktion der TRAP untersucht. Im Falle des TCP-Zementes und des CaP-Granulates ist gleichermaßen festzustellen, dass sich einige Polykaryen im Bereich der Fettgewebsnekrosen nicht oder nur schwach anfärben ließen. Benachbarte, dem Knochen anliegende Osteoklasten sind dagegen deutlich angefärbt (Abb. 20). Im Gegensatz zu Osteoklasten, welche stets eine starke TRAP-Synthese aufweisen, sind FKRZ nicht immer durch eine TRAP-Aktivität gekennzeichnet. In Anlehnung an Kadoya et al. (1994) sind FKRZ zwar in der Lage TRAP zu produzieren, tun dieses jedoch vor allem bei Kontakt zu Knochen oder anderem mineralisiertem Material. Aufgrund dessen ist davon auszugehen, dass es sich bei den an die Fettgewebsnekrosen anliegenden Polykaryen mit schwacher TRAP-Aktivität um Fremdkörperriesenzellen handelt.

Bei der enzymhistochemischen Auswertung der Gruppe II fällt weiterhin auf, dass zahlreiche mononukleäre Zellen vor allem innerhalb der Defektmittelpunkte TRAP-positiv sind (Abb. 35). Anders verhält es sich bei den Tieren der Gruppe I: Zwar zeigen auch hier die Polykaryen, welche sich an Knochen, Bohrmehl oder an den äußeren TCP-Fragmenten befinden TRAP-Synthese, jedoch weisen die mononukleären Zellen der

Defektmittle, welche sich auf anderen Schnitten mithilfe von CD68 markieren ließen, keine TRAP-Aktivität auf. Daraus ergibt sich die Frage, ob es sich bei den mononukleären, CD68-positiven Zellen innerhalb der Defektmittle von Gruppe I und II um verschiedene Zellen der monohistiozytären Linie handelt, oder ob es sich um verschiedene Differenzierungsgrade der gleichen Population handelt. So synthetisieren aktivierte Makrophagen TRAP (Kadoya et al., 1994; Hayman, 2008), während nach Boyle und Simonett (2003) der mononukleäre Osteoklasten-Vorläufer keine TRAP produziert. Allerdings wurde auch schon der Nachweis mononukleärer, TRAP-positiver Osteoklasten geführt: Lassus et al. (1998) berichten, dass Osteoklasten-Vorläufer während bestimmter Differenzierungsstadien sowohl Makrophagen-typische (non-spezifische Esterase) als auch Osteoklasten-typische Merkmale (CTR, TRAP) ausbilden. Yagi et al. (2005) konnten nachweisen, dass DC-STAMP-/- knockout-Mäuse zwar keine multinukleären Osteoklasten aufweisen, eine Fusion also unterbunden wird, jedoch sind die mononukleären Osteoklasten TRAP-positiv und resorptiv aktiv, wenn auch weniger effektiv. Diese Beobachtung wird von Ishii et Saeki (2008) bestätigt. Sie stellten ebenfalls fest, dass die Fusion für die Resorption nicht essentiell ist, jedoch deren Effizienz erhöht.

Zur immunphänotypischen Differenzierung zwischen Osteoklasten und proinflammatorischen Makrophagen beziehungsweise FKRZ wurden immunhistochemische Untersuchungen an Paraffinschnitten mit einem gegen CD16 gerichteten, monoklonalen Antikörper (Klon 2H7) durchgeführt. Die Ergebnisse von Komano et al. (2006) zeigen, dass sich Osteoklasten aus einer CD16-negativen Subpopulation der peripheren Monozyten entwickeln, während proinflammatorische Makrophagen als Bestandteil chronischer Entzündungen, wie zum Beispiel der rheumatoiden Arthritis, CD16-positiv sind (Kawanaka et al., 2004). Der einzige kommerziell erhältliche Antikörper ist gegen das CD16-Epitop des Menschen gerichtet und zeigte in der vorliegenden Untersuchung auch nach diversen Verfahren zur Antigendemaskierung kein spezifisches Signal. Dies könnte auf eine nicht vorhandene Kreuzreaktivität des Anti-CD16-Antikörpers zwischen den Spezies Mensch und Schaf hindeuten. Aufgrund der unspezifischen Färbesignale konnte die Herkunft und die Zuordnung der mononukleären Zellen zur Makrophagen- oder Osteoklasten-Linie im Rahmen der vorliegenden Untersuchung nicht geklärt werden. Weitere Versuche zur Unterscheidung von Osteoklasten-Vorläufern und Makrophagen sollten jedoch

unternommen werden.

Um die Fusionsbereitschaft der CD68 positiven Zellen zu überprüfen, wurde ein immunhistochemischer Nachweis von CD44 geführt. Die Doppelinkubation zum Beweis der Colokalisation von CD68 und CD44 in Zellen monozytären Ursprungs wurde repräsentativ bei den Tieren der Gruppe II durchgeführt (Abb. 32). Die 1998 veröffentlichte Untersuchung von Sterling zeigt, dass zu Beginn der Fusion die Expression von CD44 in mononukleären Makrophagen stark hochreguliert wird. Nachfolgend konnten Cui et al. (2006) zeigen, dass die zu Beginn der Fusion abgespaltene intrazelluläre Domäne von CD44 zum Zellkern transloziert und dort NFκB aktiviert. Auffallend stark ist das Signal vor allem bei Polykaryen und nicht adhärenen mononukleären Zellen in unmittelbarer Nachbarschaft zueinander. Dieses ist nach Auffassung von Vignery (2005) als Zeichen von Fusionsvorbereitung und -bereitschaft anzusehen. Der Zweck dieser Fusion ist die Vergrößerung der Zelloberfläche zur Steigerung der Resorptionseffizienz (Ishii et Saeki, 2008). Bei den an den Knochenersatzmaterialoberflächen anhaftenden Zellen konzentriert sich CD44 auf die basolateralen Anteile der Zellmembran. Häufig finden sich entlang dieser Membrandomänen Gruppen von mononukleären Zellen. Diese könnten künftige Fusionspartner repräsentieren (Abb. 31, 32, 43, 50). Den Grund für die basolaterale Verteilung von CD44 bei adhärenen Zellen sieht Vignery (2005) in der Verdrängung durch Integrine, die über die apikale Domäne die Haftung gewähren.

Eine weitere Erklärung für die Detektion von CD44 in den Membranen der Makrophagen/Polykaryen liefert die Untersuchung von Weber et al. (1996). Diese konnte zeigen, dass sich CD44 zusammen mit OPN an der Rekrutierung von Makrophagen und Osteoklasten beteiligt. Demnach ist nicht nur Hyaluronsäure ein potentieller Ligand für CD44, sondern auch das in der Knochenmatrix ubiquitäre extrazelluläre OPN (Weber et al., 1996). Weber konnte beweisen, dass OPN eine CD44-abhängige Chemotaxis bei Makrophagen bewirkt, während Hyaluronsäure als klassischer Ligand von CD44 die Aggregation der rekrutierten Zellen und deren nachfolgende Aktivierung bewirkt. Vor dem Hintergrund der Tatsache, dass die Oberfläche von implantierten Biomaterialien unmittelbar nach der Implantation sofort von verschiedenen Proteinen überzogen wird und so erst durch die Zellen „lesbar“ wird (Anderson, 1988; Wilson et al., 2005), ist eine mögliche Erklärung, dass Biomaterialien, welche aufgrund ihrer chemischen Eigenschaften und ihrer

Oberflächenstruktur vermehrt OPN adsorbieren, starken chemotaktischen, migrationsfördernden Einfluss auf Makrophagen und Polykaryen ausüben. Daraus resultiert der schnelle Übergang zur Fremdkörperreaktion, welcher zu einer beschleunigten zellulären Degradation des Implantates führt. Diese Hypothese wird von der Tatsache untermauert, dass OPN auch als Opsonin für Makrophagen dient und die Phagozytose von mineralisierten Partikeln deutlich erleichtert (Pedraza et al., 2008).

Anderson et al. (1988, 2001, 2008) unterscheiden zwischen einer von mononukleären Zellen (Makrophagen, Lymphozyten, Plasmazellen) gekennzeichneten chronischen Entzündungsreaktion und einer von Riesenzellen und der Ausbildung von Granulationsgewebe (Fibroblasten, Makrophagen, Neovaskularisation) charakterisierten Fremdkörperreaktion. Betrachtet man das Zellbild vor diesem Hintergrund, dann gilt für die Tiere der Gruppe II, dass die Fremdkörperreaktion weit in die Defektmitte vorgedrungen ist und nur am Übergang zum Defektzentrum noch Anzeichen der chronischen Entzündung wahrzunehmen sind. In den Bohrkantenahen Bereichen der Defektmitte, wo bereits eine ausgeprägte Osteogenese stattgefunden hat, ist auch die Fremdkörperreaktion schwächer ausgeprägt. Bei den Tieren der Gruppe I findet die Fremdkörperreaktion, charakterisiert durch das Vorkommen mehrkerniger Riesenzellen, innerhalb der Defektmitte nahe der Bohrkante statt. Weiter zentral herrschen Makrophagen, Lymphozyten und Plasmazellen vor (Abb. 13, 17), die Anderson et al. (1988, 2001, 2008) als Charakteristikum der chronischen Entzündung angeben. Um aus diesem Zellbild Rückschlüsse auf den zum Untersuchungszeitpunkt herrschenden *status quo* der Heilung ziehen zu können, wird im Folgenden auf die Funktion der Lymphozyten eingegangen.

Brodbeck et al. (2005) untersuchten die Interaktionen von Lymphozyten und adhärennten Makrophagen und stellten fest, dass 82,2% der gesamten Lymphozyten-Population in Nachbarschaft zu adhärennten Makrophagen von T-Lymphozyten repräsentiert werden, wobei die Population zu etwa gleichen Teilen aus zytotoxischen (CD8+)-T-Zellen und (CD4+)-T-Helferzellen besteht. (CD4+)-T-Helferzellen werden durch die von Makrophagen gebildeten Cytokine (wahrscheinliche Kandidaten sind IL-2 und IL-6) rekrutiert und aktiviert, um vor Ort ihrerseits IL-4 und IL-13 zu produzieren. Diese Cytokine aktivieren die Makrophagen

alternativ und stimulieren deren Fusion (Jenney et al., 1998; DeFife et al., 1999; Gordon 2003; Martinez et al., 2009; Gordon et Martinez, 2010). Eine weitere Funktion von IL-4 ist die Verhinderung der Apoptose bei adhärennten Makrophagen (Brodbeck et al., 2002). Insgesamt entscheidend für die Förderung der Fusion ist das Verhältnis von Lymphozyten zu Makrophagen: Bei einem Verhältnis von 2,5:1 beeinflussen die Lymphozyten die Makrophagen maximal, während ab einem Verhältnis kleiner als 1:1 kein Effekt mehr beobachtet wurde (Brodbeck et al., 2005).

Bei den Tieren der Gruppe I herrscht in der Defektmittle ähnlich wie im Defektzentrum, verglichen mit den Schafen der Gruppe II, ein früheres Stadium der Heilung vor. Auch die Defektmittle wurde bei den Tieren der ersten Gruppe sukzessive von peripher nach zentral, parallel zu den zeitgleich fortschreitenden Lösungs- und Fragmentierungsvorgängen des Werkstoffes durch Zellen erschlossen. Es liegt hier noch die Situation einer chronischen Entzündung vor, welche im Übergang zur Fremdkörperreaktion begriffen ist. Dafür spricht auch die starke Tendenz der mononukleären Zellen zur Fusion, welche durch die CD44-Synthese verdeutlicht wurde. Ferner sind die an den äußeren Fragmenten lokalisierten schmalen Osteoblastensäume Hinweis für eine sich etablierende Osteogenese am Implantat. Diese Situation ist als Zeichen einer guten Biokompatibilität zu werten.

Ein Zusammenhang zwischen lymphozytärer Infiltration des Granulationsgewebes und der Bildung von Polykaryen respektive deren Kernzahl lässt sich anhand der Ergebnisse der Gruppe II ableiten: Bei dem Schaf, welches eine deutlich ausgeprägte lymphozytäre Infiltration zeigte, wiesen die Polykaryen eine höhere Zahl an Zellkernen auf als bei dem Schaf mit weniger ausgeprägter lymphozytärer Besiedelung.

Auch bei den reaktiven Tieren der Gruppe III konnten im Granulationsgewebe Lymphozyten nachgewiesen werden, die bei den beiden Tieren mit ausbleibender Fremdkörperreaktion nicht vorhanden waren. In diesen Fällen fand initial sehr wahrscheinlich keine monozytäre Infiltration der Defektperipherie statt, damit wurden auch keine auf Lymphozyten chemotaktisch wirkenden Cytokine freigesetzt. Somit ist bei diesen Tieren zum Untersuchungszeitpunkt keine Fremdkörperreaktion zu erkennen und keine Zement-Degradation vollzogen.

Über die Rolle von Makrophagen und Fremdkörperriesenzellen nach Implantation

von Biomaterialien herrscht in der Literatur Uneinigkeit. Es wurde gezeigt, dass Makrophagen, die Partikel phagozytiert haben, in der Lage sind, zu Osteoklasten zu differenzieren (Sabokbar et al., 1997, 1998). Diese sind Teil des physiologischen Remodelings im Knochen und somit nicht als Indikatoren einer Entzündung anzusehen, sofern gleichzeitig die Osteogenese stattfindet.

Anderson (2004) unterscheidet zwischen einer chronischen Entzündung und der Fremdkörperreaktion: Eine anhaltende Präsenz von mononukleären Zellen einschließlich Lymphozyten und Plasmazellen gelten als Zeichen einer unerwünschten, persistierenden, chronischen Entzündung. Die Fremdkörperreaktion mit der Ausbildung von Granulationsgewebe und der zellvermittelten Degradation des eingebrachten Materials ist jedoch als physiologischer Vorgang im Rahmen der Defektheilung anzusehen. Eine ähnliche Meinung vertritt Lassus (1998), der Makrophagen als Bestandteil des normalen Degradationsprozesses ansieht. Jedoch darf es im Rahmen der Ausbildung von Granulationsgewebe nicht zur Ausbildung einer Kapsel um das eingebrachte Material kommen. Diese ist zwar ebenfalls eine physiologische Reaktion des Körpers auf ein Fremdmaterial, jedoch verhindert sie die Osseointegration des Knochenersatzstoffs und ist als Zeichen einer Inkompatibilität zu werten. Bei dem in Gruppe III verwendeten Zement ist eine Kapselbildung im weiteren Heilungsverlauf nicht auszuschließen, denn das Granulationsgewebe kann sich aufgrund der fehlenden Porosität nur um den Zement herum ausbilden. Die Ausbildung von inter- und intrapartikulärem Granulationsgewebe ist im Unterschied dazu erwünscht, weil es die Grundlage der knöchernen Heilung darstellt und die Grundlage für die zelluläre Degradation des eingebrachten Materials bildet. Liegt der Knochenersatzstoff nach Implantation, unabhängig von der ursprünglichen Applikationsform, in poröser Form vor, so ist die Fremdkörperreaktion bei schwacher, nachlassender chronisch-entzündlicher Antwort als Ausdruck von physiologischem Degradationsverhalten im Rahmen der Defektheilung anzusehen. Bei degradierbaren Materialien wie dem TCP-Zement und dem CaP-Granulat führt die Fremdkörperreaktion nicht zu einem Versagen des Implantates. Nuss fasst 2008 zusammen, dass nicht das Ausbleiben einer Zellreaktion im Wirtsgewebe des Patienten von Wichtigkeit ist, sondern deren angemessenes Ausmaß.

## 5.4 Einfluss der Applikationsform

Die Art und Verteilung von Zellen im Zusammenhang mit der Applikationsform der implantierten Knochenersatzmaterialien zeigt, dass sowohl im Hinblick auf die osteokonduktiven Eigenschaften als auch auf die Fremdkörperreaktion das verwendete Granulat auf CaP-Basis den beiden anderen Materialien überlegen ist. Es sind bei diesem Werkstoff zwar Anzeichen einer Fremdkörperreaktion festzustellen, diese wird jedoch begleitet von einer ausgeprägten Knochenneubildung entlang der Knochenersatzstoffoberflächen, was bei einer Standzeit von 10 Tagen für eine gute Osseointegration spricht. Übereinstimmend mit diesem Befund werden poröse Granulate insgesamt als biokompatibel und osteokonduktiv beschrieben (Chow 2009). Der guten Biokompatibilität liegen auch die chemischen Eigenschaften des Werkstoffes zugrunde: Das Ausbleiben von Lösungsvorgängen (Ooms 2002, Driessens 1997) und die ausgeprägte Adhäsion von TRAP-positiven Polykaryen entlang der Werkstoffoberflächen favorisiert die Annahme einer rein zellvermittelten Degradation des Knochenersatzstoffes. Die Neubildung von Knochen entlang der Werkstoffoberflächen verweist auf die Umwandlung des Materials in körpereigenen Knochen im Rahmen des Remodelings. Dem gegenüber stehen allerdings alle Nachteile, die mit der Applikationsform des Granulates verbunden sind. Granulate neigen dazu, vom Ort der Applikation abzudriften (Schnürer et al., 2003), zudem sind sie nicht injizierbar.

Nach der Auffassung von Nuss (2008) ist die Verwendbarkeit von  $\beta$ -TCP eingeschränkt durch eine unvorhersehbare Resorptionsrate und die Tatsache einer äußerst kontrovers beschriebenen Biokompatibilität. Andere Autoren sind hingegen von der guten Biokompatibilität und Osteokonduktivität des von ihnen verwendeten TCP-Granulates überzeugt (LeHeuc et al., 1997; Muschik et al., 2001). Zur Dauer der Resorption liegen allerdings sehr unterschiedliche Angaben vor. Während Muschik et al. (2001) eine abgeschlossene Resorption im Mittel nach acht Monaten feststellen konnten, war der Prozess, den Ergebnissen von LeHuec et al. (1997) zufolge, erst nach zwei Jahren abgeschlossen. Koepp et al. (2004) stellten sogar fest, dass zwischen dem sechsten und dem zwölften Monat *p.i.* keine weitere Degradation mehr stattgefunden hat, und wiesen nach zwölf Monaten noch  $\beta$ -TCP nach.

Der TCP-Zement ruft in der vorliegenden Untersuchung eine stärker ausgeprägte

zelluläre Reaktion als das CaP-Granulat hervor. Dabei ist zu berücksichtigen, dass nach 10 Tagen der Zement nicht mehr wie ursprünglich kompakt, den Defekt vollständig ausfüllend vorliegt, sondern fragmentiert ist. Zwischen den Fragmenten sind breite, in weiten Teilen zellulär erschlossene interpartikuläre Gewebestraßen zu sehen. Es stellt sich somit die Frage, wann die zu Grunde liegenden Lösungs- und Fragmentierungsvorgänge stattgefunden haben. Sind sie sukzessive erfolgt so erklären sie die protrahierte akute und chronische Entzündung wie sie in dieser Gruppe zu beobachten ist. Durch die chemisch-morphologischen Veränderungen sind vor allem die zentralen Bereiche des Defektes später zellulär erschlossen worden als im Falle des CaP-Granulates, bei dem die Poren innerhalb der Partikel schon im Herstellungsprozess geschaffen wurden und von konstanter Größe sind. Lösungs- und Fragmentierungsvorgänge führen immer wieder zu Matrix-Material-Interaktionen, welche einen wiederkehrenden chemotaktischen Stimulus zur Folge haben. Sie erklären das Vorhandensein von neutrophilen Granulozyten im Defektzentrum.

Jedoch ist auch bei dem TCP-Zement die Ausbildung eines interfragmentären Granulationsgewebes mit Makrophagen und deutlichen Anzeichen zellulärer Degradation des Werkstoffes erkennbar. In einigen Regionen ist eine vom Bohrmehl auf den Zement übergreifende Osteogenese zu konstatieren, die eine nachfolgende Osseointegration der Fragmente nach sich ziehen kann. Diese entspricht in ihrer Ausprägung zwar noch nicht den um die CaP-Granulate zu identifizierenden Osteoidsäumen, ist jedoch, aufgrund der kubischen, auf hohe Aktivität hinweisenden Form der Osteoblasten, sehr wahrscheinlich. Dieser Ablauf deckt sich auch mit den Beobachtungen von Koepp et al. (2004), denn sobald die Osteoblasten Osteoid auf einer Biomaterialoberfläche produziert haben, ist diese für degradierende Zellen nicht mehr zugänglich. Der weitere Abbau erfolgt im Rahmen des physiologischen Remodelings durch Osteoklasten.

Ziel der Entwicklung des mit PS modifizierten Zementes war ein beschleunigtes Remodeling *in vivo*, also ein schneller Abbau des Implantates bei zeitgleich stattfindender Osteogenese. Verschiedene Arbeitsgruppen (Ganss 1999, Soldek 1999, Hunter 1994a,b) haben gezeigt, dass bei Knochenmatrix-Proteinen wie OPN oder BSP die phosphorylierten Serin-Reste die spezifische Interaktion mit der Knochenmatrix-Komponente HAP vermitteln und die Nukleation beeinflussen (Baht

et al., 2010). Dafür verantwortlich ist die hohe Affinität zwischen CaP und den Phosphat- und Carboxylgruppen des PS (Mai et al., 2008). Diese verhindern das Wachstum der HAP-Kristalle (Hunter et al., 1994, 1996; Pampena et al., 2004) und führen zur Bildung von Nanokristallen, welche dicht gepackt vorliegen. Daraus resultieren verbesserte chemische und biomechanische Eigenschaften des Werkstoffes: Die Löslichkeit der kleineren Kristalle steigt an, und die eng gepackten Kristalle führen zu einer Verbesserung der Kompressionsfestigkeit und damit zu einer höheren mechanischen Belastbarkeit *in situ* (Reinstorf et al., 2004, 2006). Auch die spezifische Oberfläche wird durch die Modifikation mit PS erhöht (Reinstorf et al. 2004), was eine vermehrte Protein-Adsorption und damit eine vermehrte Zell-Adhäsion zur Folge haben soll (Li et al., 2008). Diese Hypothese wird durch die Beobachtungen von Reinstorf et al. (2004, 2006) bekräftigt, die zeigen konnten, dass die Aktivität von kultivierten Osteoblasten und Monozyten auf einem derart modifizierten Material deutlich erhöht ist, und die Formation von Osteoklasten respektive FKRZ nicht gestört wird. Darüber hinaus konnten mittels Röntgen-Diffraktions-Analyse im ausgehärteten Zement Einschlüsse von  $\alpha$ -TCP nachgewiesen werden. Es handelt sich hierbei um Partikel des Ausgangspulvers, welche durch die Zugabe von PS nicht transformiert wurden. Das zugefügte PS scheint hierbei das Lösen des Ausgangsstoffes zu verhindern.

Es ist jedoch kritisch zu hinterfragen, inwiefern die Addition von PS einen unmittelbaren positiven Effekt auf das *cell-attachment* hat. Die Matrix-Proteine wie OPN oder BSP dienen, nach Adsorption auf dem Apatit mittels ihrer Serin-Reste, als Anker für Zellen. Jedoch ist für die Interaktion der Zellen mit dem Protein nicht der phosphorylierte Serin-Rest verantwortlich, sondern das in diesen Proteinen präsente RGD-Motiv (Sodek et al., 1999). Dieses dient den von Osteoklasten und Makrophagen/FKRZ synthetisierten Integrinen als Anker und vermittelt die zelluläre Interaktion.

Vor diesem Hintergrund ist der Zusatz von PS nicht mit dem Zusatz eines vollständigen Knochenmatrix-Proteins oder der RGD-Sequenz zu vergleichen. Im Unterschied zu derartigen Modellen werden die gewünschten „Biokompatibilitäts-Effekte“ nicht über eine unmittelbare Interaktion des Komposites mit Zellen der Wirtsumgebung erreicht, sondern vielmehr mittelbar durch Modifikation von chemischen und strukturellen Eigenschaften des Zementes.

In ersten *in vivo*-Versuchen am Großtier (Mai et al., 2008) wurden kritische Defekte im Unterkiefer von Miniatur-Schweinen mit PS-modifizierten CaP-Zement befüllt. Diese zeigten neben guten Applikations-Eigenschaften und einer zufriedenstellenden Aushärtungszeit eine beschleunigte Resorption und Knochen-Regeneration im Vergleich zu dem Komposit ohne PS. Dieses Ergebnis konnte in der hier vorliegenden Arbeit an dem Defekt in der proximalen Tibia von Schafen nicht bestätigt werden. Zwar erwies sich das „Handling“ des Zementes auch hier als anwendungsfreundlich und die Aushärtungszeit betrug weniger als 10 Minuten. Allerdings konnten die beschleunigte Resorption und ossäre Regeneration nicht bestätigt werden. Dies könnte zum Einen an den unterschiedlichen Tiermodellen und der abweichenden Defekt-Lokalisation liegen, zum Anderen wurde dem Knochenzement im Falle der Minipig-Studie zusätzlich Coll-I hinzugefügt, was in der vorliegenden Untersuchung nicht der Fall war. Nach den Untersuchungen von Rammelt et al. (2004) resultiert der Zusatz von Coll-I zu einem Werkstoff auf CaP-Basis in einer deutlichen Beschleunigung der Osteokonduktivität, Phagozytose und Osteogenese. Auch in der Untersuchung von Mai (2008) wurde eine deutliche Beschleunigung des Remodelings bei den Minipigs nach Verwendung des Coll-I-Komposit festgestellt. Dieses konnte durch Hinzufügen von PS (25 mg/g) nochmals verbessert werden. Coll-I ist demnach eine entscheidende Komponente, die die Wirkung von PS potenziert. Für die Nutzung der positiven Effekte von PS *in vivo* muss ein Zement oder Komposit verbesserte osteokonduktive Eigenschaften aufweisen als es der in dieser Untersuchung eingesetzte CaP-Zement vorweisen kann.

Nach Cornell und Lane (1998) ist Grundvoraussetzung für Osteokonduktion, dass der eingebrachte Knochenersatzstoff von fibrovaskulärem Gewebe erschlossen wird, denn dieses Gewebe bildet die Grundlage für die gewünschte Osseointegration (Albreksson und Johansson, 2001). Bei der Verwendung des CaP-Granulates ist davon auszugehen, dass neben dem interpartikulären Raum, welcher zwangsläufig bei der Verwendung eines Granulates entsteht, auch die Makro- und Mikroporen ein schnelles zelluläres Erschließen des Defekt-Zentrums ermöglichen (del Real et al, 2003). Anders ist der TCP-Zement zu beurteilen: Hier kam es erst *in situ* nach Fragmentierungs- und Lösungsprozessen zu dem gewünschten Einsprossen von Granulationsgewebe in das Implantat. Allerdings sind rein chemisch ablaufende

Lösungsvorgänge schwer zu kontrollieren und laufen unter Umständen schneller ab als die Osteogenese folgen kann. Dieses kann zu Instabilitäten im Defektbereich führen und die Osteokonduktion gefährden.

Mit der Zugabe von Phosphoserin zu einem ohnehin schon nach Driessens et al. (1997) als kompakt einzustufenden Zement zeigen die Ergebnisse dieser Untersuchung, dass sich die in Zellkultur und den Defekten von Minipigs (Reinstorf et al., 2006; Mai et al., 2008) beobachtete schnelle Resorption nicht einstellt, sondern dass der Zement sehr kompakt vorliegt und zum Zeitpunkt der Untersuchung keine Lösungsvorgänge stattgefunden haben. Jedoch konnte bei keinem der Schafe außer jenem, welches Anzeichen einer Infektion aufwies, eine progrediente akute Entzündung nachgewiesen werden, was grundsätzlich für eine gute Biokompatibilität spricht. Daher gilt es in weiteren Arbeiten zu untersuchen, wie sich ein solcher Zement *in vivo* darstellt, wenn zum Beispiel Gasblasen (del Real et al., 2003) oder wasserlösliche Kristalle (Takagi et Chow, 2001) zugegeben werden, um ein interkonnektierendes Porengefüge zu gewährleisten. Chow (2009) schlägt vor, nichttoxische wasserlösliche Kristalle wie zum Beispiel Natrium-Bicarbonat oder Mannitol in den Zement zu integrieren. Dies führt auch nach seiner Auffassung zu einem erleichterten Einwachsen von Knochen und einem beschleunigten Abbau des Zementes im Rahmen des Remodelings.

## 6 Zusammenfassung

Ziel der vorliegenden tierexperimentellen Studie war es, am Tibiakopf-Bohrlochmodell des Schafes drei CaP-basierte Knochenersatzstoffe unter besonderer Berücksichtigung der Fremdkörperreaktion in der Frühphase *p.i.* zu untersuchen.

Hierzu wurden 2 Jahre alte Merino-Schwarzkopfschafe in 4 Versuchsgruppen aufgeteilt und an der linken Tibia operiert. Von medial wurde ein Knochenzylinder von 12 mm Durchmesser und 20 mm Tiefe entnommen. Im Anschluss wurden die Defekte bei den Tieren der ersten Gruppe mit Tricalciumphosphat (TCP)-Zement (Gruppe I / TCP; n=3), bei den Tieren der zweiten Gruppe mit einem Calciumphosphat (CaP)-Granulat (Gruppe II / CaP; n=2) und bei den Tieren der dritten Gruppe mit einem Calciumphosphat (CaP)-Zement modifiziert mit 10 mg/g Phosphoserin (PS) (Gruppe III / CaP-PS; n=5) gefüllt. Mittels eines Knochendeckels, der aus den jeweils entnommenen Knochenzylindern passgenau gesägt wurde, erfolgte der Defektverschluss. Bei den als Kontrolle dienenden Tieren der vierten Gruppe (Gruppe IV / leer; n=3) wurde der unbefüllte Defekt mit einem Knochendeckel verschlossen. 10 Tage *post operationem* wurden die Tiere euthanasiert und nach Perfusion der linke Tibiakopf entnommen.

Der lichtmikroskopischen Untersuchung dienten Paraffinschnitte, Dünnschliffe und Semidünnschnitte. Dazu wurden die Proben in unterschiedliche Medien eingebettet (Paraffin, Kunststoff (Technovit T7200 und Technovit T9100), Harz (EPON)). Die Schnitte und Schliffe wurden zur histomorphologischen Untersuchung gefärbt (Hämatoxylin-Eosin, Toluidin-Blau, Safranin O) oder der Immun- (CD68/CD44) sowie der Enzymhistochemie (TRAP) zugeführt.

Um das räumliche Muster der Fremdkörperreaktion deskriptiv erfassen zu können, erfolgte eine ringförmige Einteilung der Defekte in 3 Zonen: Die Defektperipherie beinhaltet das Knochenlager und begrenzt mit der Bohrkante den Defekt. Dieser wurde weiter unterteilt in die Defektmitte, welche nach zentral an das Defektzentrum angrenzt.

Die drei Knochenersatzstoffe unterscheiden sich schon in der Übersichtshistologie erheblich voneinander: Während der TCP-Zement der Gruppe I *in situ* fragment und

die Defekte so bis in das Defektzentrum für Zellen erschließbar werden, wird der mit CaP-Granulat versorgte Defekt nicht nur entlang der Granulatoberflächen erschlossen, sondern auch innerhalb der Poren der Granulat-Partikel, was eine zusätzliche Oberflächenvergrößerung und damit einen Vorteil im Bezug auf die gewünschte Osteokonduktivität darstellt. Der durch Zugabe von PS modifizierte Zement der Gruppe III füllt die Defekte jeweils als kompakter Block. Es können keine Lösungs- und Fragmentierungsprozesse zum Untersuchungszeitpunkt festgestellt werden. Diese Kompaktheit bietet keine Osteokonduktivität und verhindert die zelluläre Erschließung der Defekte. In der Kontrollgruppe IV sind die Leerdefekte mit Erythrozyten-reicher, Fibrin-dominierter Matrix gefüllt, eine gerichtete Osteogenese findet nicht statt.

Bei den Tieren der Gruppe I ist die Knochenneubildung vor allem entlang von Bohrmehloberflächen und entlang von peripher in den Defekten lokalisierten TCP-Fragmenten zu erkennen. Im Hinblick auf die Fremdkörperreaktion kann ein Gradient von der Defektperipherie, mit einer großen Zahl von Polykaryen, bis zum Übergang der Defektmitte in das Defektzentrum, wo nur noch sehr vereinzelt mononukleäre Phagozyten enthalten sind, nachgewiesen werden.

Bei den Schafen der Gruppe II prägen bereits deutliche Knochenneubildungsprozesse das histologische Bild. Knochenbälkchen überbrücken die äußeren Bereiche der Defektmitte und integrieren das Granulat bereits knöchern. Fremdkörperreaktionen sind an Bohrmehlfragmenten in der Defektperipherie und am Knochenersatzstoff in der Defektmitte zu beobachten. Sie schwächen sich bis zum Übergang in das Defektzentrum ab. Dominiert noch am Übergang von der Defektmitte zum Defektzentrum die chronische Entzündung, sind im Defektzentrum noch Anzeichen einer späten akuten Entzündung zu sehen.

Das histologische Bild bei den Tieren der Gruppe III (CaP-PS) ist sehr heterogen. Nur zwei Schafe zeigen eine ausgeprägte Fremdkörperreaktion im Bereich der Bohrkante. Ein zelluläres Erschließen der Defekte ist aufgrund der Materialeigenschaften nicht möglich. Daher konzentriert sich die Fremdkörperreaktion in Form von multinukleären, TRAP-positiven Zellen auf den äußeren Rand des Knochenersatzstoffes sowie auf den Lagerknochen der Defektperipherie nahe der Bohrkante. In diesem Bereich ist auch die Besiedlung des Zementes mit Osteoblasten zu beobachten.

In dieser Form ist das mit PS modifizierte Material ausreichend biokompatibel, jedoch muss in weiteren Untersuchungen geklärt werden, ob durch weitere Zusätze wie beispielsweise Coll-I oder eine veränderte Applikationsform (präformiertes Porengefüge) eine ausreichend verbesserte Osteokonduktivität erreicht werden kann. Insgesamt ist das CaP-Granulat dem TCP-Zement im Hinblick auf die Osteokonduktivität und die Osseointegration bei vergleichbarer entzündlicher Antwort deutlich überlegen und sollte, sofern die Applikationsform eines Granulates für die jeweilige chirurgische Fragestellung in Betracht kommt, vorgezogen werden.

## 7 Summary

The aim of this study was to evaluate three CaP based bone graft materials especially regarding foreign body reaction during early stage (ten days) after surgery using critical size drill hole defects in the proximal tibia of sheep.

For this purpose two year old black head sheep were divided into four groups and underwent surgery using the left tibia. A medial approach was used to cut a bone cylinder of 12mm diameter and 20mm in depth out of the tibia head. Subsequent the defects of the animals representing the first group were filled with Tricalcium-Phosphate (TCP) Cement (group I / TCP; n=3), the defects of the animals representing the second group were filled with Calcium-Phosphate (CaP)-Granules (group II / CaP; n=2) and those of the animals forming the third group were filled with a CaP-cement modified with 10 mg/g Phosphoserine (PS) (group III / CaP-PS; n=5). The defect was sealed by a bony slice which has been taken from the extracted cylinder. The animals of the fourth group provide as control, their defects were not filled, but closed with the bony slice. Ten days after surgery, the sheep were sacrificed and the left tibia head was explanted after perfusion.

Paraffine sections, "sawing-grinding" samples and semi-thin sections were used for lightmicroscopical examination. Therefore the specimens were embedded in paraffine, methyl-methacrylate (Technovit T7200, Technovit T9100) and resin (EPON). All samples were stained for histomorphometrical examination (Haematoxylin-Eosin, Toluidin-blue, Safranin O) or exposed to immuno- (CD68/CD44) and enzyme-histochemistry (TRAP), respectively.

In order to describe the spatial distribution of the foreign body reaction, the defects were divided into circular areas: the defect periphery includes the outer circle of the host bone around the defect. The border of the host bone represents the beginning of the defect area which has been subdivided into a middle and a central part.

Looking at the histological overview, the three bone graft materials differ notably from each other: the TCP-cement used in group I forms fragments *in situ*. This enables the cells to migrate into the center of the defects. The defects filled with CaP-Granules reveal cells not only along the surfaces of the granule particles but also within the preformed porous system, which causes an increase of the surfaces of the implant material and improves osteoconductivity. The modified cement containing PS used in

group III fills the defect as a compact block with tight contact to the osseous border of the host bone. No dissolution or fragmentation processes become obvious at the moment of examination. The compact material does not reveal any signs of osteoconductivity and prevents cellular migration into the defect areas. Defects of group IV are filled with fibrin-dominated matrix rich in erythrocytes, newly formed bone can not be detected.

Looking at the animals of group I, newly formed bone is located around the remaining debris localized next to the host bone and the adjacent TCP-fragments. Concerning the foreign body reaction, there is a gradient which is characterized by a high number of multinucleated giant cells localized within the periphery of the defects. Their number decreases within the middle part of the defects, while in the central part of the area there are only a few mononuclear phagocytes.

The animals of group II are characterized by broad osteogenesis. Trabecles of newly formed bone are located in the periphery of the middle areas and osseous integration of CaP granules has already occurred. Foreign body reaction is visible around the debris and the bone graft material localized within the middle defect area. The reaction decreases towards the central area, at the transition between the middle and the central area, signs of chronic inflammation predominate. Later phase of acute inflammation can still be seen in the central areas of the defects.

Heterogenous histological features become evident within group III as only two animals reveal distinct signs of the foreign body reaction. Due to the material properties, the absence of cells within the defects is a common feature. Multinucleated, TRAP-stained cells characterizing the foreign body reaction are localized around the outer border of the bone graft material and in close vicinity to the host bone.

The cement combined with PS which was used in group III reveals biocompatibility sufficiently without providing for osteoconductivity. Further studies have to elucidate, whether other additives such as Coll I or modification of the structure such as creation of a porous labyrinth can achieve osteoconduction sufficiently. As seen in group II, the CaP Granules are superior to the TCP-cement concerning osteoconductivity and osseointegration whereas the extent of inflammation is comparable after the use of both bone substitutes. Therefore the use of the CaP-granules should be considered when the use of granules is viable for the surgery which has to be performed.

## 8 Literaturverzeichnis

- Albrektsson T, Johansson C.** *Osteoinduction, osteoconduction and osseointegration.* Eur Spine J. **2001**; (10): 96-101.
- Ancuta P, Rao R, Moses A, Mehle A, Shaw SK, Luscinskas FW, Gabuzda D.** *Fractalkine Preferentially Mediates Arrest and Migration of CD16+ Monocytes.* J Exp Med. **2003**; 12: 1701-1707.
- Anderson HC.** *Introduction to the Second Conference on Matrix Vesicle Calcification.* Metab Bone Dis Rel Res. **1978**; 1 (2): 83-87.
- Anderson JM.** *Inflammatory response to implants.* ASAIO Trans. **1988**; 34 (2): 101-107.
- Anderson JM.** *Multinucleated Giant Cells.* Curr Opin Hematol. **2000**; (7): 40-47.
- Anderson JM.** *Biological Responses to Materials.* Annu Rev Mater Res. **2001**; 31: 81-110.
- Anderson JM.** *Inflammation, Wound Healing and the Foreign Body Response.* In: *Biomaterials science: an introduction to biomaterials in medicine.* Ratner B, Hoffman A, Schoen FJ, Lemons JE, Eds, pp 296-203. Elsevier Academic Press: San Diego, CA, **2004**.
- Anderson JM, Jones JA.** *Phenotypic dichotomies in the foreign body reaction.* Biomaterials. **2007**; 28 (34): 5114-5120.
- Anderson JM, Rodriguez A, Chang DT.** *Foreign body reaction to biomaterials.* Semin Immunol. **2008**; 20 (2): 86-100.
- Arrington ED, Smith WJ, Chambers HG, Bucknell AL, Davino NA.** *Complications of Iliac Crest Bone Graft Harvesting.* Clin Orthop Relat Res. **1996**; (329): 300-309.
- Aspenberg P, Lohmander LS.** *Fibroblast growth factor stimulates bone formation. Bone induction studied in rats.* Acta Orthop Scand. **1989**; 60 (4): 473-476.
- Athanasou NA, Quinn J.** *Immunophenotypic differences between osteoclasts and macrophage polykaryons: immunohistological distinction and implications for osteoclast ontogeny and function.* J Clin Pathol. **1990**; 43 (12): 997-1003.

- Athanasou NA, Alvarez JI, Ross FP, Quinn JM, Teitelbaum SL.** *Species differences in the immunophenotype of osteoclasts and mononuclear phagocytes.* Calcif Tissue Int. **1992**; 50 (5): 427-432.
- Athanasou NA, Path FRC.** *Cellular Biology of Bone-Resorbing Cells.* J Bone Joint Surg Am. **1996**; 78 A (7): 1096-1112.
- Athanasou NA, Sabokbar A.** *Human osteoclast ontogeny and pathological bone resorption.* Histology and Histopathology. **1999**; 14: 635-647.
- Banwart JC Asher MA Hassanein RS.** *Iliac crest bone graft harvest donor site morbidity. A statistical evaluation.* Spine. **1995**; 20 (9): 1055-1060.
- Baht GS, O'Young J, Borovina A, Chen H, Tye CE, Karttunen M, Lajoie GA, Hunter GK, Goldberg HA.** *Phosphorylation of Ser136 is critical for potent bone sialoprotein-mediated nucleation of hydroxyapatite crystals.* Biochem J. **2010**; 428 (3): 385-395.
- Bajammal SS, Zlowodzki M, Lelwica A, Tornetta P 3rd, Einhorn TA, Buckley R, Leighton R, Russell TA, Larsson S, Bhandari M.** *The use of calcium phosphate bone cement in fracture treatment. A meta-analysis of randomized trials.* J Bone Joint Surg Am., **2008**; 90 (6): 1186-1196.
- Bauer TW, Muschler GF.** *Bone Graft Materials. An Overview of the Basic Science.* Clin Orthop Relat Res. **2000**; 371: 10-27.
- Bauer TW.** *An overview of the histology of skeletal substitute materials.* Arch Pathol Lab Med. **2007a**; 131 (2): 217-224.
- Bauer TW.** *Bone graft substitutes.* Skeletal Radiol. **2007b**; 36 (12): 1105-1107.
- Belitsos PC, Hildreth JE, August JT.** *Homotypic cell aggregation induced by anti-CD44(Pgp-1) monoclonal antibodies and related to CD44(Pgp-1) expression.* J Immunol. **1990**; 144 (5): 1661-1670.
- Benaziz L, Barroug A, Legrouri A, Rey C, Lebugle A.** *Adsorption of O-Phospho-L-Serine and L-Serine onto Poorly Crystalline Apatite.* J Colloid Interface Sci. **2001**; 238 (1): 48-53.
- Berton G, Lowell CA.** *Integrin signalling in neutrophils and macrophages.* Cell Signal. **1999**; 11 (9): 621-635.

- Blair HC.** *How the osteoclast degrades bone.* BioEssays. **1998**; 20: 837-846.
- Block JE, Thorn MR.** *Clinical indications of calcium-phosphate biomaterials and related composites for orthopedic procedures.* Calcif Tissue Int. **2000**; 66 (3): 234-238.
- Bloemers FW, Blokhuis TJ, Patka P, Bakker FC, Wippermann BW, Haarman HJ.** *Autologous bone vs. calcium-phosphate ceramics in treatment of experimental bone defects.* J Biomed Mater Res B Appl Biomater. **2003**; 66 (2): 526-531.
- Bohner M.** *Physical and chemical aspects of calcium phosphates used in spinal surgery.* Eur Spine J. **2001**; 10 (Suppl.2): 114-121.
- Boyce T, Edwards J, Scarborough N.** *Allograft bone. The influence of processing on safety and performance.* Orthop Clin North Am. **1999**; 30 (4): 571-581.
- Boyce BF, Xing L.** *The RANKL/RANK/OPG pathway.* Curr Osteoporos Rep. **2007**; 5 (3): 98-104.
- Boyle WJ, Simonet WS, Lacey DL.** *Osteoclast differentiation and activation.* Nature. **2003**; 423 (6937): 337-342.
- Brodbeck WG, Shive MS, Colton E, Nakayama Y, Matsuda T, Anderson JM.** *Influence of biomaterial surface chemistry on the apoptosis of adherent cells.* J Biomed Mater Res. **2001**; 55 (4): 661-668.
- Brodbeck WG, Shive MS, Colton, Ziats NP, Anderson JM.** *Interleukin-4 inhibits tumor necrosis factor-alpha-induced and spontaneous apoptosis of biomaterial-adherent macrophages.* J Lab Clin Med. **2002**; 139 (2): 90-100.
- Brodbeck WG, Macewan M, Colton E, Meyerson H, Anderson JM.** *Lymphocytes and the foreign body response: lymphocyte enhancement of macrophage adhesion and fusion.* J Biomed Mater Res A. **2005**; 74 (2): 222-229.
- de Broughton G 2nd.** *The basic science of wound healing.* Plast Reconstr Surg. **2006**; 117 (7 Suppl): 12-34.
- Brown WE, Chow LC.** *Dental restorative cement pastes; US- Patent no.:4518430.*
- Bundesärztekammer.** *Richtlinien zum Führen einer Knochenbank.* Dtsch Arztebl. **2001**; 98(15): A-1011 / B-841 / C-786.

- Burchardt H.** *The biology of bone graft repair.* Clin Orthop Relat Res. **1983**; (174): 28-42.
- Chappard D, Fressonnet C, Genty C, Baslé MF, Rebel A.** *Fat in bone xenografts: importance of the purification procedures on cleanliness, wettability and biocompatibility.* Biomaterials. **1993**; 14 (7): 507-512.
- Chow LC.** *Calcium Phosphate Cements.* Monogr Oral Sci. **2001**; 18: 148-163.
- Chow LC.** *Next generation calcium phosphate-based biomaterials.* Dent Mater J. **2009**; 28 (1): 1-10.
- Claes L, Hoellen I, Ignatius A.** *Resorbierbare Knochenzemente.* Orthopäde. **1997**; 26 (5): 459-462.
- Cornell CN, Lane JM.** *Current understanding of osteoconduction in bone regeneration.* Clin Orthop Relat Res. **1998**; (355 Suppl): 267-273.
- Cui W, Ke JZ, Zhang Q, Ke HZ, Chalouni C, Vignery A.** *The intracellular domain of CD44 promotes the fusion of macrophages.* Blood. **2006**; 107 (2): 796-805.
- DeFife KM, Jenney CR, McNally AK, Colton E, Anderson JM.** *Interleukin-13 induces human monocyte/macrophage fusion and macrophage mannose receptor expression.* J Immunol. **1997**; 158 (7): 3385-3390.
- del Real RP, Ooms E, Wolke JGC, Vallet-Regí M, Jansen JA.** *In vivo bone response to porous calcium phosphate cement.* J Biomed Mater Res A. **2003**; 65 (1): 30-36.
- von Dörnberg MC.** *Evaluation of the Biodegradation Behaviour of  $\beta$ -TCP Cylinders with Four Different Pore Diameters. An in vivo Study.* Inaugural-Dissertation **2005**, Vetsuisse-Fakultät Universität Zürich
- Donath K, Breuner G.** *A method for the study of undecalcified bones and teeth with attached soft tissues. The Säge-Schliff (sawing and grinding) technique.* J Oral Pathol. **1982**; 11 (4): 318-326.
- Dorozhkin SV, Epple M.** *Biological and medical significance of calcium phosphates.* Angew Chem Int Ed Engl. **2002**; 41 (17): 3130-3146.

- Draenert K, Wiese FG, Garde U, Draenert Y, Helber U.** *Synthetische Knochenersatzwerkstoffe auf HA- und TCP-Basis.* Trauma Berufskrankh. **2001**; 3 (4): 293-300.
- Driessens FC, Boltong MG, Zapatero MI, Verbeek RM, Bonfield W, Bermúdez O, Fernández E, Ginebra MP, Planell JA.** *In vivo behaviour of three calcium phosphate cements and a magnesium phosphate cement.* J Mater Sci Mater Med. **1995**; 6 (5): 272-278.
- Driessens FC, Khairoun I, Boltong MG, et al.** *Design of calcium phosphate bone cement suitable for fixation of metal endoprostheses.* Bioceramics 10, SedelJ, ReyC (eds). Elsevier Science: Paris, **1997**, 279-281.
- Ebraheim NA, Elgafy H, Xu R.** *Bone-graft harvesting from iliac and fibular donor sites: techniques and complications.* J Am Acad Orthop Surg. **2001**; 9 (3): 210-218.
- Einhorn TA.** *Clinical Applications of Recombinant Human BMPs: Early Experience and Future Development.* J Bone Joint Surg Am. **2003**; 85A (Suppl 3): 82-88.
- Ek-Rylander B, Flores M, Wendel M, Heinegård D, Andersson G.** *De-phosphorylation of osteopontin and bone sialoprotein by osteoclastic tartrate-resistant acid phosphatase. Modulation of osteoclast adhesion in vitro.* J Biol Chem. **1994**; 269 (21): 14853-14856.
- Esche C, Stellato C, Beck LA.** *Chemokines: key players in innate and adaptive immunity.* J Invest Dermatol. **2005**; 125 (4): 615-628.
- Fernandez E Gil FJ Ginebra MP Driessens FCM Planell JA Best SM.** *Calcium phosphate bone cements for clinical applications. Part I: Solution chemistry.* J Mater Sci Mater Med. **1999a**; 10: 169-176.
- Fernandez E, Gil FJ, Ginebra MP, Driessens FCM, Planell JA, Best SM.** *Calcium phosphate bone cements for clinical applications. Part II: Precipitate formation during setting reactions.* J Mater Sci Mater Med. **1999b**; 10: 177-183.
- Flautre B, Delecourt C, Blary MC, van Landuyt P, Lemaître J, Hardouin P.** *Volume effect on biological properties of a calcium phosphate hydraulic cement: experimental study in sheep.* Bone. **1999**; 25 (2 Suppl): 35-39.

- Flören M, Kappe T, Reichel H.** *Effektivitätsanalyse einer klinikinternen allogenen Knochenbank.* Orthopäde. **2007**; 36 (7): 667-672.
- Fujikawa Y, Quinn JM, Sabokbar A, McGee JO, Athanasou NA.** *The human osteoclast precursor circulates in the monocyte fraction.* Endocrinology. **1996a**; 137 (9): 4058-4060.
- Fujikawa Y, Sabokbar A, Neale S, Athanasou NA.** *Human osteoclast formation and bone resorption by monocytes and synovial macrophages in rheumatoid arthritis.* Ann Rheum Dis. **1996b**; 55 (11): 816-822.
- Ganss B, Kim RH, Sodek J.** *Bone sialoprotein.* Crit Rev Oral Biol Med. **1999**; 10 (1): 79-98.
- Gauthier O, Bouler JM, Aguado E, Pilet P, Daculsi G.** *Macroporous biphasic calcium phosphate ceramics: influence of macropore diameter and macroporosity percentage on bone ingrowth.* Biomaterials. **1998**; 19 (1-3): 133-139.
- Gauthier O, Bouler JM, Weiss P, Bosco J, Daculsi G, Aguado E.** *Kinetic study of bone ingrowth and ceramic resorption associated with the implantation of different injectable calcium-phosphate bone substitutes.* J Biomed Mater Res. **1999**; 47 (1): 28-35.
- Geissmann F, Jung S, Littman DR.** *Blood monocytes consist of two principal subsets with distinct migratory properties.* Immunity. **2003**; 19 (1): 71-82.
- Gerard C, Rollins BJ.** *Chemokines and disease.* Nat Immunol. **2001**; 2 (2): 108-115.
- Giannoudis PV, Dinopoulos H, Tsiridis E.** *Bone substitutes: An update.* Injury. **2005**; 36 S: 20-27.
- Gordon S.** *Alternative activation of macrophages.* Nat Rev Immunol. **2003**; 3 (1): 23-35.
- Gordon S, Martinez FO.** *Alternative activation of macrophages: mechanism and functions.* Immunity. **2010**; 32 (5): 593-604
- Gosain AK, Song L, Yu P, Mehrara BJ, Maeda CY, Gold LI, Longaker MT.** *Osteogenesis in cranial defects: reassessment of the concept of critical size and the expression of TGF-beta isoforms.* Plast Reconstr Surg. **2000**; 106 (2): 360-371.

- Günther KP, Scharf HP, Pesch HJ, Puhl W.** *Einwachsverhalten von Knochenersatzstoffen - Tierexperimentelle Untersuchung.* Orthopäde. **1998**; 27 (2): 105-117.
- Hak DJ.** *The use of osteoconductive bone graft substitutes in orthopaedic trauma.* J Am Acad Orthop Surg. **2007**; 15 (9): 525-536.
- Halleen JM, Räisänen S, Salo JJ, Reddy SV, Roodman GD, Hentunen TA, Lehenkari PP, Kaija H, Vihko P, Väänänen HK.** *Intracellular fragmentation of bone resorption products by reactive oxygen species generated by osteoclastic tartrate-resistant acid phosphatase.* J Biol Chem. **1999**; 274 (33): 22907-22910.
- Halleen JM, Ylipahkala H, Alatalo SL, Janckila AJ, Heikkinen JE, Suominen H, Cheng S, Väänänen HK.** *Serum tartrate-resistant acid phosphatase 5b, but not 5a, correlates with other markers of bone turnover and bone mineral density.* Calcif Tissue Int. **2002**; 71(1): 20-25.
- Halleen JM, Räisänen SR, Alatalo SL, Väänänen HK.** *Potential function for the ROS-generating activity of TRACP.* J Bone Miner Res. **2003**; 18 (10): 1908-1911.
- Han X, Sterling H, Chen Y, Saginario C, Brown EJ, Frazier WA, Lindberg FP, Vignery A.** *CD47, a ligand for the macrophage fusion receptor, participates in macrophage multinucleation.* J Biol Chem. **2000**; 275 (48): 37984-37992.
- Hattersley G, Chambers TJ.** *Generation of osteoclastic function in mouse bone marrow cultures: multinuclearity and tartrate-resistant acid phosphatase are unreliable markers for osteoclastic differentiation.* Endocrinology. **1989**; 124 (4): 1689-1696.
- Hayman AR, Bune AJ, Bradley JR, Rashbass J, Cox TM.** *Osteoclastic tartrate-resistant acid phosphatase (Acp 5): its localization to dendritic cells and diverse murine tissues.* J Histochem Cytochem. **2000**; 48 (2): 219-228.
- Hayman AR, Macary P, Lehner PJ, Cox TM.** *Tartrate-resistant acid phosphatase (Acp 5): identification in diverse human tissues and dendritic cells.* J Histochem Cytochem. **2001**; 49 (6): 675-684.
- Hayman AR.** *Tartrate-resistant acid phosphatase (TRAP) and the osteoclast/immune cell dichotomy.* Autoimmunity. **2008**; 41 (3): 218-223.

- Helming L, Gordon S.** *Molecular mediators of macrophage fusion.* Trends Cell Biol. **2009**; 19 (10): 514-522.
- Henson PM.** *The immunologic release of constituents from neutrophil leukocytes. II. Mechanisms of release during phagocytosis, and adherence to non-phagocytosable surfaces.* J Immunol. **1971a**; 107 (6): 1547-1557.
- Henson PM.** *The immunologic release of constituents from neutrophil leukocytes. I. The role of antibody and complement on nonphagocytosable surfaces or phagocytosable particles.* J Immunol. **1971b**; 107 (6): 1535-1546.
- Henson PM.** *Mechanisms of exocytosis in phagocytic inflammatory cells. Parke-Davis Award Lecture.* Am J Pathol. **1980**; 101 (3): 494-511.
- Heymann D, Guicheux J, Rousselle AV.** *Ultrastructural evidence in vitro of osteoclast-induced degradation of calcium phosphate ceramic by simultaneous resorption and phagocytosis mechanisms.* Histol Histopathol. **2001**; 16 (1): 37-44.
- Hillmeier J, Meeder PJ, Nöldge G, Kock HJ, Da Fonseca K, Kasperk HC.** *Balloon kyphoplasty of vertebral compression fractures with a new calcium phosphate cement.* Orthopäde. **2004**; 33 (1): 31-39.
- Holmes R, Mooney V, Bucholz R, Tencer A.** *A coralline hydroxyapatite bone graft substitute. Preliminary report.* Clin Orthop Relat Res. **1984**; 188: 252-62
- Horbett TA.** *The Role of Adsorbed Proteins in Tissue Response to Biomaterials.* In: *Biomaterials science: an introduction to biomaterials in medicine.* Ratner B, Hoffman A, Schoen FJ, Lemons JE, Eds., pp 237-246. Elsevier Academic Press: San Diego, CA, **2004**.
- Horch H-H, Sader R, Kolk A.** *Synthetische, phasenreine Beta-Trikalziumphosphat-Keramik (Cerasorb) zur Knochenregeneration bei der rekonstruktiven Chirurgie der Kiefer. Eine klinische Langzeitstudie mit Literaturübersicht.* Dtsch zahnärztl Z. **2004**; 59 (12): 680-683.
- Horch H-H, Pautke C.** *Regeneration statt Reparatur.* Mund Kiefer Gesichtschir. **2006**; 10: 213-220.

- Hunter GK, Kyle CL, Goldberg HA.** *Modulation of crystal formation by bone phosphoproteins: structural specificity of the osteopontin-mediated inhibition of hydroxyapatite formation.* Biochem J. **1994a**; 300 (Pt 3): 723-728.
- Hunter GK, Goldberg HA.** *Modulation of crystal formation by bone phosphoproteins: role of glutamic acid-rich sequences in the nucleation of hydroxyapatite by bone sialoprotein.* Biochem J. **1994b**; 302 (Pt 1): 175-179.
- Hunter GK, Hauschka PV, Poole AR, Rosenberg LC, Goldberg HA.** *Nucleation and inhibition of hydroxyapatite formation by mineralized tissue proteins.* Biochem J. **1996**; 317 (Pt 1): 59-64.
- Hynes RO.** *Integrins: versatility, modulation, and signaling in cell adhesion.* Cell. **1992**; 69 (1): 11-25
- Ishii M, Saeki Y.** *Osteoclast cell fusion: mechanisms and molecules.* Mod Rheumatol. **2008**; 18 (3): 220-227.
- Jäger M, Westhoff B, Wild A, Krauspe R.** *Knochenspanentnahme am Becken: Techniken und Probleme.* Orthopäde. **2005**; 34: 976-994.
- Jalkanen S, Jalkanen M.** *Lymphocyte CD44 binds the COOH-terminal heparin-binding domain of fibronectin.* J Cell Biol. **1992**; 116 (3): 817-825.
- Jenney CR, DeFife KM, Colton E, Anderson JM.** *Human monocyte/macrophage adhesion, macrophage motility, and IL-4-induced foreign body giant cell formation on silane-modified surfaces in vitro.* J Biomed Mater Res. **1998**; 41 (2): 171-184.
- Johnson P, Ruffell B.** *CD44 and its role in inflammation and inflammatory diseases.* Inflamm Allergy Drug Targets. **2009**; 8 (3): 208-220.
- Kadoya Y, al-Saffar N, Kobayashi A, Revell PA.** *The expression of osteoclast markers on foreign body giant cells.* Bone Miner. **1994**; 27 (2): 85-96.
- Kawanaka N, Yamamura M, Aita T, Morita Y, Okamoto A, Kawashima M, Iwahashi M, Ueno A, Ohmoto Y, Makino H.** *CD14+,CD16+ blood monocytes and joint inflammation in rheumatoid arthritis.* Arthritis Rheum. **2002**; 46 (10): 2578-2586.

- Kirstein B, Chambers TJ, Fuller K.** *Secretion of tartrate-resistant acid phosphatase by osteoclasts correlates with resorptive behavior.* J Cell Biochem. **2006**; 98 (5): 1085-1094.
- Knepper-Nicolai B, Reinstorf A, Hofinger I, Flade K, Wenz R and Pompe W.** *Influence of osteocalcin and collagen I on the mechanical and biological properties of Biocement D.* Biomol Eng. **2003**; 19 (2-6): 227-231.
- Koepp HE, Schorlemmer S, Kessler S, Brenner RE, Claes L, Günther K-P, Ignatius AA.** *Biocompatibility and osseointegration of beta-TCP: histomorphological and biomechanical studies in a weight-bearing sheep model.* J Biomed Mater Res Part B Appl Biomater. **2004**; 70 (2): 209-217.
- Komano Y, Nanki T, Hayashida K, Taniguchi K, Miyasaka N.** *Identification of a human peripheral blood monocyte subset that differentiates into osteoclasts.* Arthritis Res Ther. **2006**; 8 (5): R152.
- Konttinen YT, Takagi M, Mandelin J, Lassus J, Salo J, Ainola M, Li TF, Virtanen I, Liljestrom M, Sakai H, Kobayashi Y, Sorsa T, Lappalainen R, Demulder A, Santavirta S.** *Acid attack and cathepsin K in bone resorption around total hip replacement prosthesis.* J Bone Miner Res. **2001**; 16 (10): 1780-1786.
- Kunisch E, Fuhrmann R, Roth A, Winter R, Lungershausen W, Kinne RW.** *Macrophage specificity of three anti-CD68 monoclonal antibodies (KP1, EBM11, and PGM1) widely used for immunohistochemistry and flow cytometry.* Ann Rheum Dis. **2004**; 63 (7): 774-784.
- Kurz LT, Garfin SR, Booth RE Jr.** *Harvesting autogenous iliac bone grafts. A review of complications and techniques.* Spine. **1989**; 14 (12): 1324-1331.
- Lassus J, Salo J, Jiranek WA, Santavirta S, Nevalainen J, Matucci-Cerinic M, Horák P, Konttinen Y.** *Macrophage activation results in bone resorption.* Clin Orthop Relat Res. **1998**; 352: 7-15.
- LeHuec JC, Lesprit E, Delavigne C, Clement D, Chauveaux D, Rebeller A.** *Tricalcium phosphate ceramics and allografts as bone substitutes for spinal fusion in idiopathic scoliosis as bone substitutes for spinal fusion in idiopathic scoliosis: comparative clinical results at four years.* Acta Orthop Belg. **1997**; 63 (3): 202-211.

- Lesley J, Schulte R, Hyman R.** *Binding of hyaluronic acid to lymphoid cell lines is inhibited by monoclonal antibodies against Pgp-1.* Exp Cell Res. **1990**; 187 (2): 224-233.
- Li X, van Blitterswijk CA, Feng Q, Cui W, Watari F.** *The effect of Calcium Phosphate microstructure on bone-related cells in vitro.* Biomaterials. **2008**; 29 (23): 3306-3316.
- Lind M.** *Growth factors: Possible new clinical tools: A review.* Acta Orthop Scand. **1996**; 67 (4): 407–417.
- Linhart W, Briem D, Peters A, Lehmann W, Windolf J, Rueger JM.** *Resorbierbare Kalziumphosphatzemente.* Trauma Berufskrankh. **2004**; 6 (4): 277–284.
- Ljusberg J, Wang Y, Lang P, Norgard M, Dodds R, Hultenby K, Ek-Rylander B, Andersson G.** *Proteolytic excision of a repressive loop domain in tartrateresistant acid phosphatase by cathepsin K in osteoclasts.* J Biol Chem. **2005**; 280 (31): 28370-28381.
- Ma YL, Cain RL, Halladay DL, Yang X, Zeng Q, Miles RR, Chandrasekhar S, Martin TJ, Onyia JE.** *Catabolic effects of continuous human PTH (1--38) in vivo is associated with sustained stimulation of RANKL and inhibition of osteoprotegerin and gene-associated bone formation.* Endocrinology. **2001**; 142 (9): 4047-4054.
- MacEwan W.** *Observations concerning transplantation of bone: illustrated by a case of inter-human osseous transplantation, whereby over two-thirds of the shaft of a humerus was restored.* Proc Royal Soc. (London) **1881**; 32: 232–247.
- Mai R, Lux R, Proff P, Lauer G, Pradel W, Leonhardt H, Reinstorf A, Gelinsky M, Jung R, Eckelt U, Gedrange T, Stadlinger B.** *O-phospho-L-serine: a modulator of bone healing in calcium-phosphate cements.* Biomed Tech. (Berl.) **2008**; 53 (5): 229-233.
- Mai R, Reinstorf A, Pilling E, Hlawitschka M, Jung R, Gelinsky M, Schneider M, Loukota R, Pompe W, Eckelt U, Stadlinger B.** *Histologic study of incorporation and resorption of a bone cement-collagen composite: an in vivo study in the minipig.* Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod. **2008**; 105 (3): e9-e14

- Martinez FO, Helming L, Gordon S.** *Alternative activation of macrophages: an immunologic functional perspective.* Annu Rev Immunol. **2009**; 27: 451-483.
- McHugh KP, Kitazawa S, Teitelbaum SL, Ross FP.** *Cloning and characterization of the murine  $\beta(3)$  integrin gene promoter: identification of an IL-4 re-sponsive element and regulation by STAT-6.* J Cell Biochem. **2001**; 81 (2): 320-332.
- McNally AK, DeFife KM, Anderson JM.** *Interleukin-4-induced macrophage fusion is prevented by inhibitors of mannose receptor activity.* Am J Pathol. **1996**; 149 (3): 975-985.
- McNally AK, Anderson JM.** *Beta1 and beta2 integrins mediate adhesion during macrophage fusion and multinucleated foreign body giant cell formation.* Am J Pathol. **2002**; 160 (2): 621-630.
- Merten HA, Wiltfang J, Hönig JF, Funke M, Luhr HG.** *Intraindividuellem Vergleich von  $\alpha$ - und  $\beta$ -TCP-Keramik im Tierexperiment.* Mund Kiefer Gesichtschir. **2000**; 4 (Suppl 2): 509-515.
- Merten HA, Gruber RM, Nitsch A, Ludwig A, Schliephake H.** *Evaluation oral-chirurgischer Augmentationsmaterialien - Ein tierexperimentell-histomorphologischer Vergleich.* Implantologie. **2003**; 11 (3): 215–236.
- Miyake K, Underhill CB, Lesley J, Kincade PW.** *Hyaluronate can function as a cell adhesion molecule and CD44 participates in hyaluronate recognition.* J Exp Med. **1990**; 172 (1): 69-75.
- Moore WR, Graves SE, Bain GI.** *Synthetic bone graft substitutes.* ANZ J Surg. **2001**; 71 (6): 354-361.
- Murakami T, Cardones AR, Hwang ST.** *Chemokine receptors and melanoma metastasis.* J Dermatol Sci. **2004**; 36 (2): 71-78.
- Muschik M, Ludwig R, Halbhübner S, Bursche K, Stoll T.** *Beta-tricalcium phosphate as a bone substitute for dorsal spinal fusion in adolescent idiopathic scoliosis: preliminary results of a prospective clinical study.* Eur Spine J. **2001**; 10 (Suppl 2): 178-184.
- Nicholson GC, Moseley JM, Sexton PM, Mendelsohn FA, Martin TJ.** *Abundant calcitonin receptors in isolated rat osteoclasts. Biochemical and autoradiographic characterization.* J Clin Invest. **1986**; 78 (2): 355-360.

- Niedhart C, Pingsmann A, Jürgens C, Marr A, Blatt R, Niethard FU.** *Komplikationen nach Entnahme autologen Knochens aus dem ventralen und dorsalen Beckenkamm – eine prospektive, kontrollierte Studie.* Z Orthop Ihre Grenzgeb. **2003**; 141 (4): 481-486.
- Niedhart C, Maus U, Redmann E, Schmidt-Rohlfing B, Niethard FU, Siebert CH.** *Stimulation of bone formation with an in situ setting tricalcium phosphate /rhBMP-2 composite in rats.* J Biomed Mater Res A. **2003**; 65 (1): 17-23.
- Niedhart C, Maus U, Miltner O, Gräber HG, Niethard FU, Siebert CH.** *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 A. **2004**; 69 (4): 680-685.
- Nuss KMR, von Rechenberg B.** *Biocompatibility issues with modern implants in bone - a review for clinical orthopedics.* Open Orthop J. **2008**; 2: 66-78.
- Ooms EM, Egglezos EA, Wolke JG, Jansen JA.** *Soft-tissue response to injectable calcium phosphate cements.* Biomaterials. **2003**; 24 (5): 749-757.
- Ooms EM, Wolke JG, Heuvel MT, Jeschke B, Jansen JA.** *Histological evaluation of the bone response to calcium phosphate cement implanted in cortical bone.* Biomaterials. **2003**; 24 (6): 989-1000.
- Pampena DA, Robertson KA, Litvinova O, Lajoie G, Goldberg HA, Hunter GK.** *Inhibition of hydroxyapatite formation by osteopontin phosphopeptides.* Biochem J. **2004**; 378 (Pt 3): 1083-1087.
- Pedraza CE, Nikolcheva LG, Kaartinen MT, Barralet JE, McKee MD.** *Osteopontin functions as an opsonin and facilitates phagocytosis by macrophages of hydroxyapatite-coated microspheres: implications for bone wound healing.* Bone. **2008**; 43 (4): 708-716.
- Pool R.** *Coral chemistry leads to human bone repair.* Science. **1995**; 267 (5205): 1772.
- Quinn JM, Morfis M, Lam MH, Elliott J, Kartsogiannis V, Williams ED, Gillespie MT, Martin TJ, Sexton PM.** *Calcitonin receptor antibodies in the identification of osteoclasts.* Bone. **1999**; 25 (1): 1-8.

- Rammelt S, Schulze E, Witt M, Petsch E, Biewener A, Pompe W, Zwipp H.** *Collagen type I increases bone remodelling around hydroxyapatite implants in the rat tibia.* Cells Tissues Organs. **2004**; 178 (3): 146-157.
- Rammelt S, Neumann M, Hanisch U, Reinstorf A, Pompe W, Zwipp H, Biewener A.** *Osteocalcin enhances bone remodeling around hydroxyapatite/collagen composites.* J Biomed Mater Res A. **2005** ; 73 (3): 284-294.
- Rehman I, Smith R, Hench LL, Bonfield W.** *Structural evaluation of human and sheep bone and comparison with synthetic hydroxyapatite by FT-Raman spectroscopy.* J Biomed Mater Res. **1995**; 29 (10): 1287-1294.
- Reinstorf A, Ruhnow M, Gelinsky M, Pompe W, Hempel U, Wenzel KW, Simon P.** *Phosphoserine- a convenient compound for modification of calcium phosphate bone cement collagen composites.* J Mater Sci Mater Med. **2004**; 15 (4): 451-455.
- Reinstorf A, Hempel U, Olgemöller F, Domaschke H, Schneiders W, Mai R, Stadlinger B, Rösen-Wolff A, Rammelt S, Gelinsky M, Pompe W.** *O-Phospho-L-Serine modified calcium phosphate cements- material properties, in vitro and in vivo investigations.* Mat-wiss u Werkstofftech. **2006**; 37 (6): 491-503.
- Roodman GD.** *Regulation Of Osteoclast Differentiation.* Ann N Y Acad Sci. **2006**; 1068: 100-109.
- Ross FP, Christiano AM.** *Nothing but skin and bone.* J Clin Invest. **2006**; 116 (5): 1140-1149.
- Ross FP.** *M-CSF, c-Fms, and signaling in osteoclasts and their precursors.* Ann N Y Acad Sci. **2006**; 1068: 110-116.
- Rueger JM.** *Knochenersatzmittel.* Hefte Unfallheilkd. **1992**; 213: 32-35.
- Rueger JM.** *Knochenersatzmittel. Heutiger Stand und Ausblick.* Orthopäde. **1998**; 27 (2): 72-79.
- Sabokbar A, Fujikawa Y, Neale S, Murray DW, Athanasou NA.** *Human arthroplasty derived macrophages differentiate into osteoclastic bone resorbing cells.* Ann Rheum Dis. **1997**; 56 (7): 414-420.

- Sabokbar A, Pandey R, Quinn JM, Athanasou NA.** *Osteoclastic differentiation by mononuclear phagocytes containing biomaterial particles.* Arch orthop traum surg. **1998**; 117 (3): 136-140.
- Schieker M, Heiss C, Mutschler W.** *Knochenersatzmaterialien.* Unfallchirurg. **2008**; 111 (8): 613-619.
- Schneider U.** *Die autogene Knochenzelltransplantation.* Orthopäde. **1998**; 27 (2): 143-146.
- Schneiders W, Reinstorf A, Pompe W, Grass R, Biewener A, Holch M, Zwipp H, Rammelt S.** *Effect of modification of hydroxyapatite/collagen composites with sodium citrate, phosphoserine, phosphoserine/RGD-peptide and calcium carbonate on bone remodelling.* Bone. **2007**; 40 (4): 1048-1059.
- Schnürer SM, Gopp U, Kühn KD, Breusch SJ.** *Knochenersatzwerkstoffe.* Orthopäde. **2003**; 32(1): 2-10.
- Shen Z, Crotti TN, McHugh KP, Matsuzaki K, Gravallesse EM, Bierbaum BE, Goldring SR.** *The role played by cell-substrate interactions in the pathogenesis of osteoclast-mediated peri-implant osteolysis.* Arthritis Res Ther. **2006**; 8 (3): R70.
- Sodek J, Ganss B, McKee MD.** *Osteopontin.* Crit Rev Oral Biol Med. **2000**; 11 (3): 279-303.
- St John TA, Vaccaro AR, Sah AP, Schaefer M, Berta SC, Albert T, Hilibrand A.** *Physical and monetary costs associated with autogenous bone graft harvesting.* Am J Orthop. **2003**; 32 (1): 18-23.
- Stamenkovic I, Aruffo A, Amiot M, Seed B.** *The hematopoietic and epithelial forms of CD44 are distinct polypeptides with different adhesion potentials for hyaluronate-bearing cells.* EMBO J. **1991**; 10 (2): 343-348.
- Sterling H, Saginario C, Vignery A.** *CD44 Occupancy Prevents Macrophage Multinucleation.* J Cell Biol. **1998**; 143 (3): 837-847.
- Stützle H, Hallfeldt K, Mandelkow H, Kessler S, Schweiberer L.** *Knochenneubildung durch Knochenersatzmaterialien.* Orthopäde. **1998**; 27 (2): 118-125.

- Suzuki K, Zhu B, Rittling SR, Denhardt DT, Goldberg HA, McCulloch CA, Sodek J.** *Colocalization of intracellular osteopontin with CD44 is associated with migration, cell fusion, and resorption in osteoclasts.* J Bone Miner Res. **2002**; 17 (8): 1486-1497.
- Sy MS, Guo YJ, Stamenkovic I.** *Distinct effects of two CD44 isoforms on tumor growth in vivo.* J Exp Med. **1991**; 174 (4): 859-866.
- Takagi S, Chow LC.** *Formation of macropores in calcium phosphate cement implants.* J Mater Sci Mater Med. **2001**; 12 (2): 135-139.
- Tang L, Jennings TA, Eaton JW.** *Mast cells mediate acute inflammatory responses to implanted biomaterials.* Proc Natl Acad Sci USA. **1998**; 95 (15): 8841-8846.
- Teti A, Migliaccio S, Baron R.** *The role of the alphaVbeta3 integrin in the development of osteolytic bone metastases: a pharmacological target for alternative therapy?* Calcif Tissue Int. **2002**; 71 (4): 293-299.
- Urist MR, O'Connor BT, Burwell RG.** *Bone Grafts, Derivatives and Substitutes.* Butterworth and Heinemann: Oxford, **1994**.
- Vääräniemi J, Halleen JM, Kaarlonen K, Ylipahkala H, Alatalo SL, Andersson G, Kaija H, Vihko P, Väänänen HK.** *Intracellular machinery for matrix degradation in bone-resorbing osteoclasts.* J Bone Miner Res. **2004**; 19 (9): 1432-1440.
- Vereecke G, Lemaître J.** *Calculation of the solubility in the system Ca(OH)<sub>2</sub>-H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>-KOH-HNO<sub>3</sub>-CO<sub>2</sub>-H<sub>2</sub>O.* J Crystal Growth. **1990**; 104: 820-832.
- Vingery A.** *Osteoclasts and Giant Cells: Macrophage-Macrophage fusion mechanism.* J Exp Pathol. **2000**; (81): 291-304.
- Vignery A.** *Macrophage fusion: the making of osteoclasts and giant cells.* J Exp Med. **2005**; 202 (3): 345-351.
- Weber GF, Ashkar S, Glimcher MJ, Cantor H.** *Receptor-ligand interaction between CD44 and osteopontin (Eta-1).* Science. **1996**; 271 (5248): 509-512.
- Welch RD, Zhang H, Bronson DG.** *Experimental tibial plateau fractures augmented with calcium phosphate cement or autologous bone graft.* J Bone Joint Surg Am. **2003**; 85-A (2): 222-231.

- Wenisch S, Stahl JP, Horas U, Heiss C, Kilian O, Trinkaus K, Hild A, Schnettler R.** *In vivo mechanisms of hydroxyapatite ceramic degradation by osteoclasts: fine structural microscopy.* J Biomed Mater Res A. **2003a** ;67 (3): 713-718.
- Wenisch S, Stahl JP, Horas U, Kilian O, Heiss C, Schnettler R.** *Ultrastructural examination of cell-mediated degradation of a calcium phosphate ceramic.* Unfallchirurg. **2003b**; 106 (5): 387-391.
- Wilson CJ, Clegg RE, Leavesley DI, Percy MJ.** *Mediation of biomaterial-cell interactions by adsorbed proteins: a review.* Tissue Eng. **2005**; 11 (1-2): 1-18.
- Wiltfang J, Merten HA, Schlegel KA, Schultze-Mosgau S, Kloss FR, Rupprecht S, Kessler P.** *Degradation characteristics of alpha and beta tri-calcium-phosphate (TCP) in minipigs.* J Biomed Mater Res. **2002**; 63 (2): 115-121.
- Wippermann BW, Schrott HE, Steeg S, Tscherne H.** *Komplikationen der Spongiosaentnahme am Beckenkamm.* J Mater Sci Mater Med. **1997**; 68 (12): 1286-1291.
- Wissing H, Stürmer KM, Breidenstein G.** *Die Wertigkeit verschiedener Versuchstierspezies für experimentelle Untersuchungen am Knochen.* Hefte Unfallheilkd. **1990**; 212: 479-488.
- Yagi M, Miyamoto T, Sawatani Y, Iwamoto K, Hosogane N, Fujita N, Morita K, Ninomiya K, Suzuki T, Miyamoto K, Oike Y, Takeya M, Toyama Y, Suda T.** *DC-STAMP is essential for cell-cell fusion in osteoclasts and foreign body giant cells.* J Exp Med. **2005**; 202 (3): 345-351.
- Yagi M, Miyamoto T, Toyama Y, Suda T.** *Role of DC-STAMP in cellular fusion of osteoclasts and macrophage giant cells.* J Bone Miner Metab. **2006**; 24 (5): 355-358.
- Zdolsek J, Eaton JW, Tang L.** *Histamine release and fibrinogen adsorption mediate acute inflammatory responses to biomaterial implants in humans.* J Transl Med. **2007**; 5:31.

## Danksagung

Mein erster Dank gilt Frau Prof. Dr. Wenisch für die Überlassung des Promotions-themas, ihre kompetente und konstruktive Unterstützung bei der Anfertigung der Arbeit.

Bei Herrn Prof. Schnettler möchte ich mich für die Möglichkeit bedanken, die für die Anfertigung der Dissertation nötigen Untersuchungen im Labor für experimentelle Unfallchirurgie der JLU Gießen durchführen zu können.

Ein besonderer Dank gebührt den Mitarbeitern des Laboratoriums für Experimentelle Unfallchirurgie der JLU Gießen. Die nervenstarke Einführung von Iris Schütz, Ida Oberst, Anne Hild und Rainer Braun in die histologische Methodik waren mir eine große Hilfe. Darüberhinaus möchte ich Frau Offer, Frau Dipl. Biol. Hartmann, Frau Dr. Sommer, Frau Dr. Trinkhaus und Frau Prof. Dr. Lips für den kompetenten fachlichen Dialog danken. Sie alle haben mir stets mit Rat und Tat zur Seite gestanden.

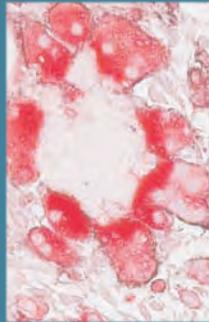
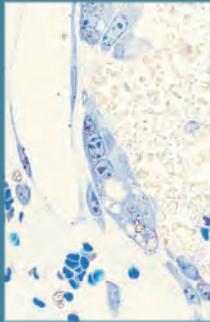
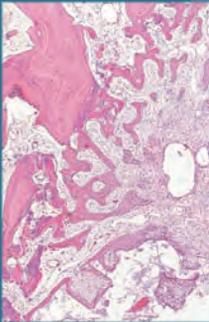
Meiner Familie danke ich für ihre Unterstützung und ihr Verständnis, die es mir ermöglicht haben meinen beruflichen Werdegang zu verfolgen und mich dabei vertrauensvoll begleitet haben.

Dr. Kerstin Amort danke ich für ihre Geduld, ihr Verständnis und ihre liebevolle Unterstützung in allen Belangen. Ohne sie wäre mir die Umsetzung der Arbeit nicht möglich gewesen.

## Erklärung

Ich erkläre: Ich habe die vorgelegte Dissertation selbständig und ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit 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 Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten.

Tassilo Graf von Pückler von Schwichow



*edition scientifique*  
**VVB LAUFERSWEILER VERLAG**

VVB LAUFERSWEILER VERLAG  
STAUFENBERGRING 15  
D-35396 GIESSEN

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

ISBN: 978-3-8359-5797-8



9 783835 195797 8