



JAN PHILIPP SCHÜTTRUMPF

**EINFLUSS VON AUTOLOGEM PLATELET-RICH-PLASMA
AUF DIE OSTEOGENESE NACH IMPLANTATION
EINES CALCIUMPHOSPHAT-BASIERTEN KNOCHEN-
ERSATZMATERIALS (CALCIBON® GRANULES)**

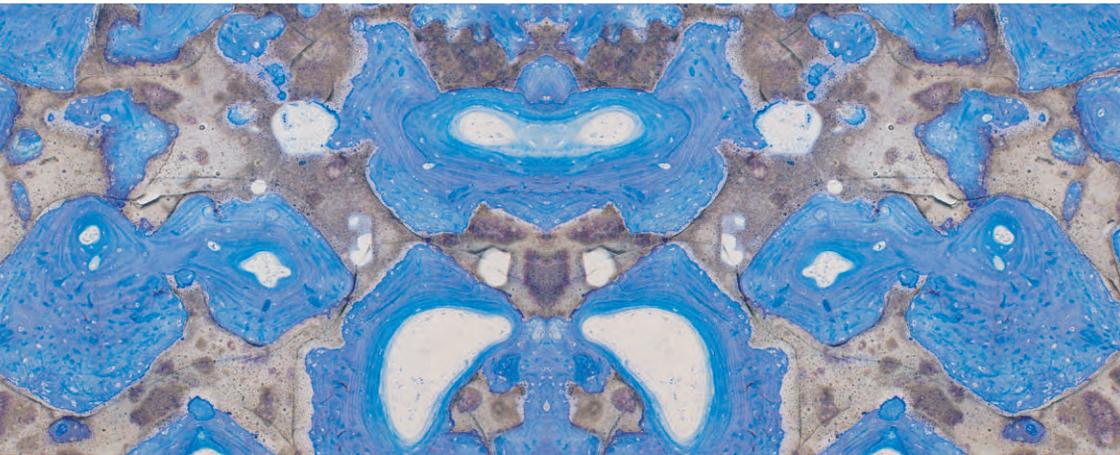
**Tierexperimentelle Untersuchungen am
Bohrlochmodell des Schafes**

INAUGURALDISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Medizin
des Fachbereichs Medizin 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 2010

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

1st Edition 2010

© 2010 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

www.doktorverlag.de

**Einfluss von autologem Platelet-Rich-Plasma auf die
Osteogenese nach Implantation eines Calciumphosphat-
basierten Knochenersatzmaterials (Calcibon[®] Granules)**

Tierexperimentelle Untersuchungen am Bohrlochmodell des
Schafes

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Medizin
des Fachbereichs Medizin der
Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von

Jan Philipp Schüttrumpf

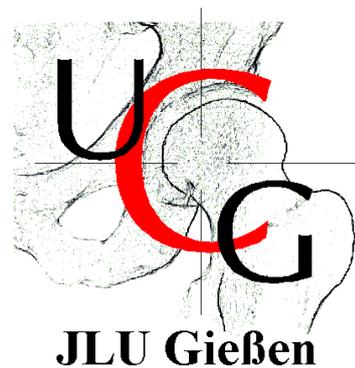
aus
Osnabrück

Gießen 2009

Aus dem Medizinischen Zentrum für Chirurgie, Anästhesiologie und Urologie

Klinik und Poliklinik für Unfallchirurgie
des Universitätsklinikums Gießen und Marburg GmbH
Standort: Gießen

Direktor: **Univ.-Prof. Dr. Dr. Reinhard Schnettler**



1. Gutachter: Univ.-Prof. Dr. Dr. R. Schnettler

2. Gutachter: PD Dr. J. Kordelle

Tag der Disputation: 24.03.2010

Ich widme meine Dissertation meinen lieben Eltern,

Jutta Schüttrumpf und **Dr. Henning Schüttrumpf**,

die mich während meines gesamten Studiums und Lebens

unterstützt und gefördert haben.

INHALTSVERZEICHNIS

1. EINLEITUNG und PROBLEMSTELLUNG.....	1
2. KNOCHENERSATZMATERIALIEN	4
2.1 Autogene und allogene Knochentransplantation	4
2.2 Knochenersatzmaterialien: Definition und Anforderungen	6
2.3 Klassifikation der Knochenersatzmaterialien und ihrer Eigenschaften.....	7
2.3.1 Klasse I: Biologische, organische Substanzen	7
2.3.2 Klasse II: Synthetische, anorganische Materialien	12
2.3.3 Klasse III: Synthetische, organische Verbindungen	16
2.3.4 Klasse IV: Composites	16
2.4 Knochengewebe.....	18
2.4.1 Allgemeiner Aufbau.....	18
2.4.2 Knochenzellen und ihre Funktion	20
2.4.3 Frakturheilung.....	23
3. MATERIAL und METHODEN	27
3.1 Versuchstiere	27
3.1.1 Identität der Versuchstiere.....	27
3.1.2 Gruppeneinteilung.....	27
3.1.3 Haltungs- und Fütterungsbedingungen	28
3.2 Knochenfüllmaterialien	29
3.2.1 Calcibon® Granules.....	29
3.2.2 Platelet-Rich-Plasma (PRP)	30
3.2.3 Herstellung des Composites aus den beiden Einzelkomponenten Calcibon® Granules und PRP	35
3.3 Operative Interventionen	36
3.3.1 Prämedikation und Anästhesie	36
3.3.2 Operationsprotokoll.....	36
3.3.3 Aufwachphase und Operationsnachsorge	40
3.4 Euthanasie, Perfusion und Probenentnahme mit Fixation.....	40
3.4.1 Euthanasie	40
3.4.2 Euthanasie mit Perfusion	40
3.4.3 Probenentnahme mit Fixation	42

3.5 Histologische Präparate	44
3.5.1 Herstellung von Dünnschliff-Präparaten.....	44
3.5.1.1 Einbettung.....	44
3.5.1.2 Schleifvorgang	44
3.5.1.3 Färbung.....	45
3.5.2 Herstellung der immunhistochemischen Präparate.....	45
3.5.2.1 Einbettung.....	45
3.5.2.2 Antikörperapplikation	46
3.5.2.3 Färbung.....	47
3.5.3 Herstellung der Semidünnschnitte	47
3.5.3.1 Einbettung.....	47
3.5.3.2 Schnittvorgang und Färbung	47
3.6 Auswertungsverfahren und -methoden	48
4. ERGEBNISSE	50
4.1 Makroskopische Befunde.....	50
4.2 Mikroskopische (histologische) Befunde	51
4.2.1 Knochenschliffe (Toluidinblau).....	51
4.2.1.1 5-Tages-Tiere	51
4.2.1.2 10-Tages-Tiere	56
4.2.1.3 6-Wochen-Tiere.....	61
4.2.1.4 3-Monats-Tiere	66
4.2.1.5 6-Monats-Tiere	71
4.2.2 Immunhistochemie.....	76
4.2.3 Semidünnschnitte.....	80
4.3 Histomorphometrische Befunde.....	82
5. DISKUSSION	89
6. ZUSAMMENFASSUNG.....	104
7. SUMMARY.....	106
8. ABBILDUNGS- und TABELLENVERZEICHNIS	108
9. LITERATURVERZEICHNIS.....	113
10. DANKSAGUNG	134
11. LEBENS LAUF	135
12. ERKLÄRUNG.....	136

1. EINLEITUNG und PROBLEMSTELLUNG

Problemstellung:

Die Versorgung traumatischer, postinfektiöser, resektionschirurgischer und kongenitaler Knochendefekte stellt ein häufiges Problem in der Medizin dar. Zur Behandlung solcher Defekte gilt die Verwendung von autogenem (körpereigenem) Knochen als „Goldstandard“ (SCHNETTLER et al., 2003).

Trotzdem ist die Verwendung von autogenem Material in den letzten Jahren zurückgegangen (KOMIYA et al., 2003), da diese Methode Nachteile wie z. B. eine begrenzte Verfügbarkeit, Zweitoperation zur Materialgewinnung, Komplikationen während und nach dem Zweiteingriff mit sich bringt (WIPPERMANN et al., 1997).

Allogene Transplantate finden darüber hinaus Verwendung (KNAEPPLER, 1997). Jedoch birgt auch diese Methode einige Nachteile wie z. B. das Risiko der Übertragung von Infektionserregern wie HIV und Hepatitis C, immunologische Reaktionen sowie veränderte osteogene Transplantateigenschaften (LOWENSTAM und WEINER, 1989; KNAEPPLER et al., 1992).

Seit Anfang des 20. Jahrhunderts versuchen Forschungsgruppen aus aller Welt ein Material bzw. einen Ersatzstoff zu finden, welcher anstelle von autogenem oder allogenen Knochen verwendet werden könnte, um knöcherne Defekte zu füllen und wiederherzustellen (REFIOR et al., 1997).

Ein solches Knochenersatzmaterial sollte dabei einige wichtige Eigenschaften aufweisen: eine osteokonduktive, osteoinduktive und osteostimulative Wirkung (ALBREKTSSON und JOHANNSEN, 2001).

Nach SCHNETTLER und DINGELDEIN (2002) sind neben den zuvor genannten Eigenschaften weitere, ergänzende Bedingungen an Knochenersatzmaterialien zu stellen. Dazu zählen die Histokompatibilität, die lokale und systemische Verträglichkeit, die Möglichkeit der kompletten Defektfüllung, eine Resorptionscharakteristik und eine eigene mechanische Stabilität.

Studienziel:

In dieser Arbeit soll im Tierexperiment eine vergleichende Untersuchung zur Wirksamkeit eines autologen Thrombozytenkonzentrats (**Platelet-Rich-Plasma**, PRP) in Kombination mit einem synthetisch hergestellten Knochenersatzmaterial (**Calciumphosphat-Granulat**, CaP) auf die Knochenheilung dargestellt werden.

Dazu wurde ein standardisierter, zylindrischer Defekt im Tibiakopf des Schafes (n = 35 Versuchstiere) gesetzt und dieser mit einem Composite bestehend aus autologem PRP und CaP-Granulat schlüssig gefüllt (Versuchsgruppe).

In der Kontrollgruppe I erfolgt die Defektauffüllung ausschließlich mit CaP-Granulat während die Kontrollgruppe II aus Leerdefekten besteht. In dieser Gruppe sollte die körpereigene de-novo-Osteogenese und Regeneration überprüft werden.

Die Tiere wurden verschiedenen Beobachtungszeiträumen (5 Tage, 10 Tage, 6 Wochen, 3 Monate, 6 Monate) zugeordnet und die Ergebnisse anhand des zeitlichen Verlaufs nach morphologischen, qualitativen und quantitativen Gesichtspunkten ausgewertet.

Das Tierexperiment führt zu in vivo ermittelten Daten. Die Integration des Knochenersatzmaterials kann somit im zeitlichen Verlauf beurteilt werden. Das Schaf bietet mit seiner Größe und anatomischen Verhältnissen sehr gute Voraussetzungen um die Verwendung von Knochenersatzmaterialien zu testen (WISSING et al., 1990). Die Struktur und Stoffelwechselforgänge des Schafsknochens sind aus experimentellen Studien bekannt (GRIFFON et al., 2000 und WENISCH et al., 2003).

Ziel der Studie ist es also, dieses neue Composite bestehend aus den Einzelkomponenten CaP und PRP als Knochenersatzmaterial vergleichend im Hinblick auf mögliche osteostimulative oder osteoinduktive Eigenschaften zu beurteilen.

Das Composite soll die Knochenheilung unterstützen und fördern sowie den oben erwähnten Anforderungen für Knochenersatzmaterial gerecht werden.

Die körpereigene Komponente, das autologe PRP, soll dabei wegen des Gehaltes an Wachstumsfaktoren osteoinduktiv und osteostimulativ wirken.

Das synthetische Calciumphosphat-Granulat dient der Osteokonduktion. Es ist resorbierbar, frei von biologischen Bestandteilen und aufgrund seiner Beschaffenheit komplett im Defekt verteilbar.

Die Verwendung des Composites erfordert eine primäre Stabilität des Defekts. Der in dieser Studie geschaffene knöcherne Defekt weist im spongiösen Knochenlager eine hohe Primärstabilität auf.

Aufgrund der gewählten Operationsmethode mit dem **Diamond-Bone-Cutting-System**[®] (DBCS) lassen sich darüber hinaus artefaktfreie Defekte schaffen. Damit kann eine gute histologische und histomorphometrische Beurteilung des Interfaces erfolgen (Grenzfläche zwischen knöchernem Lager und der Defektzone).

2. KNOCHENERSATZMATERIALIEN

Bevor die einzelnen Knochenersatzmaterialien und ihre Eigenschaften dargestellt und beschrieben werden, soll das Prinzip der autogenen Knochenplastik und der allogenen Knochentransplantation erläutert werden.

2.1 Autogene und allogene Knochentransplantation

Die autogene (körpereigene) Knochenplastik stellt den „Goldstandard“ zur Auffüllung knöcherner Defekte dar (SCHNETTLER et al., 2003).

Unter einer autogenen Knochentransplantation versteht man die Verpflanzung von körpereigenem Knochen, welcher an anderer Stelle entnommen (Beckenkamm, distales Femur, proximale Tibia oder distaler Radius) und zur Füllung des Defektbereiches transferiert wird.

Zur Überbrückung längerer Defektstrecken dienen entnommene Anteile der Fibula bzw. einer Rippe, um mechanische Teilstabilität zu erhalten. Eine weitere Alternative stellt das Verfahren „Fibula pro Tibia“ dar, welches durch die Rekonstruktion der Tibia durch den Fibulaknochen gekennzeichnet ist (SCHNETTLER und STEINAU, 2004).

Spongiosa ist zum Knochenersatz besser geeignet als Kortikalis, da die Vaskularisierung des porösen Spongiosamaterials im Vergleich zur festen Struktur der Kortikalis zehnmal schneller erfolgt (SAILER et al., 2000).

Die Vaskularisierung und die Erschließung der autogenen Ersatzplastik durch neugebildeten Knochen geht in einem standardisierten, zylindrischen Knochendefekt vom Lagerknochen aus (zentripetal) und nicht vom Defektzentrum (zentrifugal) (SCHNETTLER und DINGELDEIN, 1997).

Risiken wie die Übertragung von Infektionserregern wie z. B. Hepatitsviren, HIV, Bakterien oder Prionen oder die Verschleppung von Tumorzellen entfallen bei der Verwendung einer autogenen Knochenplastik (VILMAR und BACHMANN, 2003). Immunologische Abstoßungsreaktionen sind ebenfalls nicht zu erwarten, da die Substanz körpereigen und somit immunologisch identisch ist.

Nachteile des Verfahrens sind der notwendige operative Zweiteingriff zur Materialgewinnung und die begrenzte Materialverfügbarkeit. Komplikationen wie z. B. Hämatome, Nervenläsionen oder Wundheilungsstörungen sind dabei nicht selten

(GERNGROSS et al., 1982 und WIPPERMANN et al., 1997) und sowohl die Operations- als auch die Narkosedauer ist verlängert.

Unter diesen Gesichtspunkten steht der zusätzliche operative Eingriff, der zur Gewinnung des autogenen Materials notwendig ist, in einem Missverhältnis zum erhofften Effekt, nämlich die physiologische Knochenheilung zu fördern und unterstützend zu wirken. Die mindere Spongiosaqualität bei Osteoporosepatienten ist ebenfalls in Betracht zu ziehen.

Die allogene (körperfremde) Knochentransplantation beschreibt die Verpflanzung körperfremden Materials zwischen einem Spender und einem genetisch differenten Empfänger der gleichen Art.

Der operative Zweiteingriff entfällt dabei, jedoch kommen andere Nachteile dieses Verfahrens zum Tragen. Das allogene Transplantat muss speziell aufbereitet, sterilisiert und kryokonserviert werden. Mechanische wie auch biologische Eigenschaften werden durch diese Maßnahmen verändert (DAMBE et al., 1981). Das so zubereitete Transplantat muss in einer nach bestimmten Richtlinien geführten Knochenbank gelagert werden (AMERICAN ASSOCIATION OF TISSUE BANKS, 1979 und WISSENSCHAFTLICHER BEIRAT DER BUNDESÄRZTEKAMMER, 1990). Das Unterhalten einer solchen Institution ist sehr kosten- und arbeitsintensiv. Das Risiko der Übertragung von Infektionserregern wie z. B. HIV, Hepatitis, Bakterien und Prionen sowie die Verschleppung von Tumormaterial zwischen Spender und Empfänger ist ebenfalls nicht sicher auszuschließen (KNAEPPLER et al., 1992 und RÜBSAM-WAIGMANN, 1997 und GÜRTLER 1997). Ein weiteres Problem kann eine sogenannte „host-versus-graft-Reaktion“ darstellen. Dabei wird der transplantierte Knochen (graft) von immunkompetenten Zellen des Wirts (host) als fremd erkannt und abgestoßen.

Allogene Transplantate stehen ebenfalls nur in begrenztem Umfang zur Verfügung und oft stammt das Material von älteren Patienten, welchen z. B. im Rahmen einer Hüftgelenktotalendoprothesenimplantation der Femurkopf entnommen wurde. Das so für die allogene Transplantation gewonnene Material besitzt stark abgeschwächte osteogene Eigenschaften (LOWENSTAM und WEINER, 1989).

2.2 Knochenersatzmaterialien: Definition und Anforderungen

Knochenersatzmittel / -materialien sind Substanzen, die idealerweise für die Indikationen eingesetzt werden sollen, bei denen heute noch autogener bzw. allogener Knochen Verwendung findet.

Definition:

„Knochenersatzmaterialien sind Biomaterialien. Biomaterialien werden definiert als nicht körpereigene Substanzen, die nach der Implantation in den menschlichen Organismus dort vorhandene strukturelle Elemente, ganze Gewebe und deren (Teil-) Funktionen ersetzen.“

(zitiert nach: RUEGER, 1998)

Um die Knochenheilung in Bezug auf die Quantität und Qualität des neu synthetisierten Knochens in einer bestimmten Zeiteinheit zu fördern bzw. positiv zu beeinflussen, sollte ein Ersatzmaterial folgende Eigenschaften aufweisen.

Kriterien und Eigenschaften nach ALBREKTSSON und JOHANNSEN (2001):

Osteokonduktivität:

Eine osteokonduktive Substanz begünstigt das Anwachsen von Knochen aus dem Defektlager und dient somit als Leitschiene für die Osteogenese.

Osteoinduktivität:

Eine osteoinduktive Substanz veranlasst lokale und / oder transplantierte Zellen durch bestimmte Stimuli zur Differenzierung zu Osteoblasten und somit zur Osteogenese.

Osteointegration:

Eine osteointegrative Substanz ist durch die feste und stabile Verankerung im Defektlager gekennzeichnet und schließt somit eine „Brücke“ zwischen Defekt und Lager.

Nach SCHNETTLER und DINGELDEIN (2002) sind folgende Kriterien und Eigenschaften, welche ein Knochenersatzmaterial außerdem erfüllen sollte, ergänzend hinzuzufügen:

- Histokompatibilität
- Verträglichkeit (lokal und systemisch)
- Möglichkeit der kompletten Defektfüllung
- Resorptionscharakteristik und eigene mechanische Stabilität

Faktoren, nach welchen die einzelnen Gruppen der Knochenersatzmaterialien miteinander verglichen werden können, sind nach OSBORN (1979) folgende:

- Biotoleranz, d.h. die Gewebeverträglichkeit
- Bioinertheit, d.h. den Einfluss, welcher ein Stoff auf das Wirtsgewebe hat
- Bioaktivität, d.h. die Reaktion, die ein Stoff in seinem Wirtsgewebe auslöst

2.3 Klassifikation der Knochenersatzmaterialien und ihrer Eigenschaften

Knochenersatzmaterialien sind in einer Klassifikation von RUEGER (1992) nach ihrer Ausgangsverbindung bzw. ihrem Herstellungsverfahren in folgende vier Hauptklassen eingeteilt, die wiederum in Untergruppen gegliedert sind.

- I. biologische, organische Substanzen
- II. synthetische, anorganische Materialien
- III. synthetische, organische Verbindungen
- IV. Composites

2.3.1 Klasse I: Biologische, organische Substanzen

Unter dieser Gruppe werden Substanzen zusammengefasst, die aus einem biologischen Material hergestellt bzw. extrahiert werden. Dies geschieht in der Regel unter der Verwendung von allogenen bzw. xenogenen (von einer anderen Art stammenden) Knochen.

Eine besondere Form der allogenen Knochen transplantation stellt die Verwendung „demineralisierter Knochenmatrix“ (DKM) dar. Bei dieser von URIST umfangreich erprobten Methode wird demineralisierter, kortikaler Knochen verpflanzt. Eine osteoinduktive Wirkung wird beschrieben (URIST 1968 und 1973; URIST et al., 1970 und 1977).

SCHWEIBERER et al. (1986) beschreiben die Osteoinduktion als die Fähigkeit des Knochens und somit in diesem Fall des Transplantates selber neuen Knochen zu bilden.

SCHNETTLER et al. (1998) konnten diesen Effekt der DKM in ihrer tierexperimentellen Untersuchungen nicht bestätigen, THIELEMANN et al. (1991) und RUEGER (1992) ebenfalls nicht. Schon 1985 zeigten KAKIUCHI et al., dass die DKM bei der humanen Applikation keine überzeugenden Ergebnisse liefert.

Knochenmatrixextrakte sind aus der Knochenmatrix stammende, den Knochenstoffwechsel fördernde Proteine. Das **Bone Morphogenetic Protein** (BMP) wurde 1982 erstmals von URIST aus bovinem Knochen teilextrahiert. Schließlich wurde ebenfalls von URIST (1983) humanes BMP isoliert. Durch dessen Proteinsequenzanalyse mittels DNA-mapping konnte Anfang der neunziger Jahre des letzten Jahrhunderts zum ersten Mal rekombinantes humanes BMP hergestellt werden (ROSEN et al., 1989 und SAMPATH et al., 1991).

Es existieren mindestens 17 verschiedene BMPs (VUKICEVIC et al., 2002), die zu einer Familie von Knochenwachstumsfaktoren gehören. Die BMPs stellen dabei eine eigene und besondere Untergruppe der Transforming-Growth-Factor- β -Superfamilie dar (RAMOSHEBI et al., 2002). Diese Knochenproteine binden an transmembranöse Serin-Threonin-Kinase-Rezeptor-Komplexe, bestehend aus einem Rezeptor Typ I und einem Rezeptor Typ II, an der Zelloberfläche (NICKEL 2002). Diese Bindung erfolgt dabei mit nur geringer Affinität an die einzelnen Rezeptoren, mit hoher Affinität jedoch an einen heteromeren Komplex aus Typ I und II Rezeptor (KORCHYNSKY und TEN DIJKE, 2002). Nach Formung dieses heteromeren Komplexes aus den beiden Rezeptortypen zusammen mit den BMPs wird eine intrazelluläre Signaltransduktion, durch die Phosphorylierung des sogenannten Smad-Komplexes, aktiviert (REDDI, 2001).

Der Terminus Smad ist eine Wortkonstruktion aus den folgenden Teilen: dem "Sma-Gen" (small body size), das zuerst in *Caenorhabditis elegans* entdeckt wurde (SAVAGE et al., 1996) und dem "Mad-Gen" (mothers against decapentaplegic), welches aus *Drosophila melanogaster* isoliert werden konnte (SEKELSKY et al., 1995).

Beide Gene sind an der durch BMPs aktivierten Signalübertragung beteiligt. Eine gemeinsame Nomenklatur wurde nach der Identifizierung homologer Gene in Vertebraten definiert. Smad wurde als Bezeichnung für zytoplasmatische Proteine vorgeschlagen, die durch Proteine der TGF- β -Superfamilie aktiviert werden (REDDI 2001; KORCHYNSKY und TEN DIJKE, 2002).

Mittlerweile konnten acht Smad-Proteine isoliert werden. Diese lassen sich in drei Untergruppen einteilen:

- R-Smads (receptor activated Smads),
- Co-Smads (common partner Smads) und
- I-Smads (inhibitory Smads).

Die Smads 1, 2, 3, 5 und 8 gehören zur Gruppe der R-Smads, Smad 4 ist ein Co-Smad und die Smads 6 und 7 sind I-Smads (RUEGER, 2002).

Die aktivierten R-Smads bilden zusammen mit Smad 4, dem im Zytoplasma lokalisierten Co-Smad, trimere Komplexe, welche in den Zellkern eindringen und dort die Transkription verschiedener Zielgene regulieren (CORREIA, 2001; PARALKER et al., 2002).

I-Smads, also die Smads 6 und 7, unterbinden die intrazelluläre Signalübertragung indem sie mit den R-Smads um den aktivierten Komplex aus BMPs und Rezeptortyp I konkurrieren. Zudem wird angenommen, dass Smad 6 mit dem Co-Smad um die Bindung an R-Smads konkurriert und somit die Bildung des trimeren, die Transkription steuernden, Faktors behindert (HATA, 1998).

Zielgene der BMPs sind in der Lage, eine komplette Knochenneubildung durch eine Transformation primär nicht osteogener Zellen in Knochenzellen zu starten (REDDI, 1998 und URIST, 1996). Sie kodieren für Matrixproteine, Wachstumsfaktoren, Enzyme und Transkriptionsfaktoren. Kollagen Typ I wird direkt, Osteocalcin indirekt durch BMPs induziert. Die alkalische Phosphatase, ein für die BMP-induzierte Osteoblastendifferenzierung verwendeter Marker, steigt erst nach längerer Exposition an (LEE et al., 2000).

Untersuchungen konnten zeigen, dass die postnatale Osteoinduktion durch BMPs dem Mechanismus der enchondralen Ossifikation weitestgehend entspricht und somit die Abläufe der embryonalen Skelettentwicklung und der Frakturheilung darstellt (URIST 1981; REDDI 1994; MARTINOVIC et al., 2002).

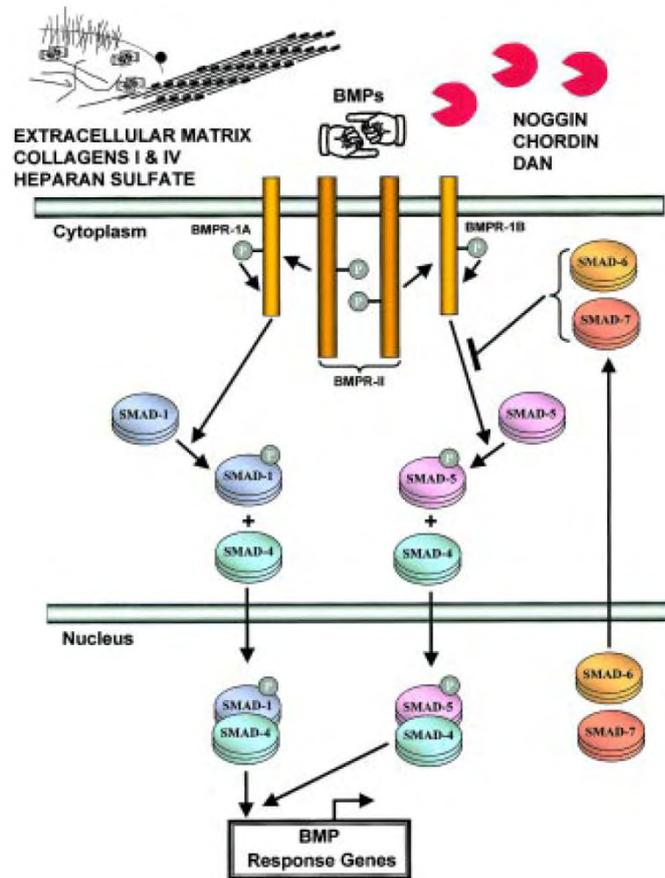


Abb. 1: Skizze: Zusammenspiel von BMPs und Smads.
(REDDI, 2001).

Weitere Wachstumsfaktoren sind zum Beispiel der **Transforming Growth Factor Beta** (TGF- β), welcher zu einer Chemotaxis von potentiell knochenbildenden Zellen führt (JOYCE et al., 1992) und der **basic Fibroblast Growth Factor** (bFGF), welcher die Angiogenese fördert und somit die Erschließung des Defektes ermöglicht (SCHNETTLER et al., 2003). Die Proliferation steuernde Faktoren sind der **Platelet Derived Growth Factor** (PDGF), bFGF, TGF- β wie auch BMP-2 und -3 (RUEGER, 1998).

Ein komplexes Zusammenspiel aus Aktivierungs- und Inhibitionsvorgängen der einzelnen Faktoren führt zu einer, das Knochenwachstum und die Frakturheilung, steuernden Kaskade (MUNDY, 1996).

In tierexperimentellen Versuchen konnte die eindrucksvolle Wirkung verschiedener Knochenwachstumsfaktoren, als Monosubstanzen appliziert, gezeigt werden (WANG et al., 1990; YASKO et al., 1992; GERHARD et al., 1993). Eine genauere Beschreibung der Einzelfaktoren und ihre Eigenschaften spiegelt Tabelle 1 wider (siehe Abschnitt 2.4.3, Seite 21).

In dieser Studie soll nun die Wirkung der einzelnen Wachstumsfaktoren durch die Verwendung des autologen plättchenreichen Plasmas (PRP) kombiniert und somit die physiologische Kaskade im Rahmen der Knochenneubildung bzw. -heilung imitiert werden (GUSTMANN 2000).

Abbildung 2 zeigt den Einfluss der Monosubstanzen auf die Proliferation von Osteoblasten im Vergleich zur Wirkung von Kombinationen verschiedener Wachstumsfaktoren, so wie es durch die Verwendung von autologem PRP gewährleistet wird (WEIBRICH et al., 2002).

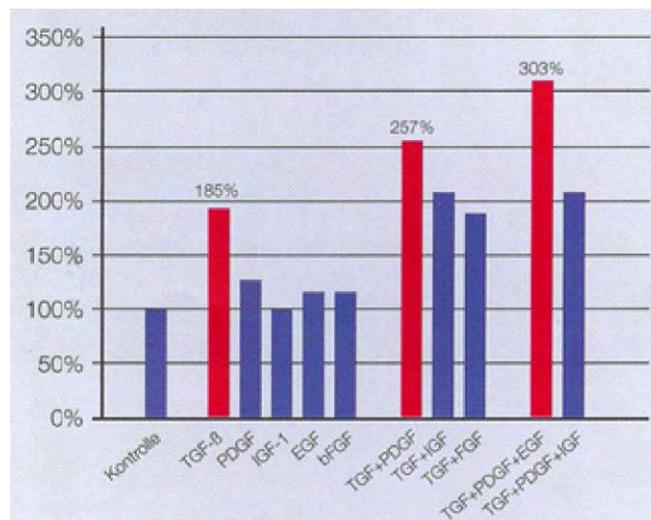


Abb. 2: Proliferation von Osteoblasten in vitro unter dem Einfluss eines oder mehrerer Wachstumsfaktoren (nach WEIBRICH et al., 2002).

Erläuterung: 100 % entspricht der Proliferation der Osteoblasten unter physiologischen Verhältnissen in vitro = Kontrolle; eine Steigerung z.B. auf 185 % mit TGF-β als Monosubstanz entspricht einer Proliferationssteigerung um 85 % in vitro.

Ebenfalls WEIBRICH et al. (2002) konnten in autologem Platelet-Rich-Plasma die höchsten Konzentrationen folgender drei, die Osteogenese maßgeblich beeinflussenden Wachstumsfaktoren feststellen: PDGF, TGF- β und IGF-I (Abbildung 3).

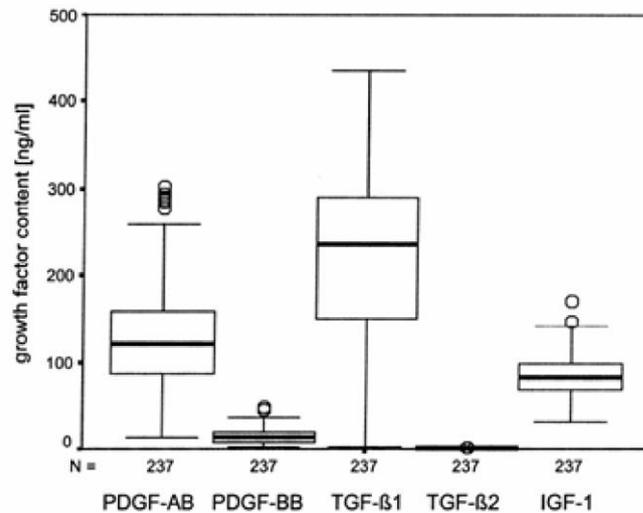


Abb. 3: Wachstumsfaktorenspiegel von PDGF (AB, BB), TGF- β (1, 2) und IGF-1 in Thrombozytenkonzentraten (nach WEIBRICH et al., 2002).

Weitere Informationen über die Gewinnung, Herstellung, Zusammensetzung und Wirkung von Platelet-Rich-Plasma können dem Abschnitt „MATERIAL und METHODEN“ und „DISKUSSION“ entnommen werden.

2.3.2 Klasse II: Synthetische, anorganische Materialien

Unter dieser Gruppe sind Knochenersatzmaterialien zusammengefasst, die aus anorganischen Verbindungen bestehen und / oder synthetisch hergestellt werden.

Biogläser bestehen aus nur einer Glasphase, in der Regel Siliziumoxid, und so genannten Netzwerkmodifikatoren (Alkali-, Erdalkali- und Metalloxiden). Die in Knochen implantierten Gläser enthalten eine mit Calcium- und Phosphatoxiden beschichtete Oberfläche. Über diese „aktive“ Oberfläche kommt es zu mikro- bzw. nanometer dicken vitalen Knochenverbindungen zwischen Implantat und Lagerknochen. Diese Art von Implantaten haben keine hohe Primärstabilität,

zerbrechen somit leicht und verbleiben post implantationem teilweise im Organismus (HENSEL und SCHULZE, 2000).

Eine Modifikation der Biogläser stellen sogenannte Glaskeramiken dar. Diese besitzen neben einer „aktiven“ Oberfläche auch noch eine kristalline Phase in der Matrix. Diese aus der Matrix herausragenden Apatitkristalle führen zu einer Augmentation der Knochen-Implantat-Bindung. Jedoch ist die Primärstabilität auch hier nicht überzeugend, die Glaskeramiken werden nicht vollständig integriert und auch nicht resorbiert (HENCH, 1975).

Korallen verfügen über ein symmetrisch ausgerichtetes Exoskelett, das abhängig von der Spezies über definierte Porositäten und Interkonnektionen verfügt (POOL, 1995). Über einen hydrothermalen Umwandlungsprozess können aus diesen Calciumcarbonat-Exoskeletten Knochenersatzmaterialien hergestellt werden. In einer tierexperimentellen Studie konnten die osteokonduktiven Eigenschaften und die gute Toleranz des Implantats gezeigt werden (SARTORIS et al., 1987).

Das Implantat wird aufgrund seiner „aktiven“ Oberfläche schnell von Knochen überzogen, jedoch entstehen nur osteoimplantäre Einheiten. Das Innere des Implantats wird nicht resorbiert.

Aus Algen kann über bestimmte Umwandlungs- und Extraktionsprozesse ein pflanzliches Calciumphosphat gewonnen werden, welches dem im Knochen vorkommenden Calciumphosphat analog ist. In einer tierexperimentellen Studie konnte eine gute osteoregenerative Wirkung und ein hoher Durchbau des unter dem Handelsnamen Algipore® (Friadent GmbH, Mannheim, Deutschland) zugelassenen Präparates gezeigt werden (SCHLEGEL et al., 2003).

Aus pulverförmigen Ausgangssubstanzen werden monophasische Knochenersatzmaterialien durch verschiedene Arbeitsschritte (Brennen, Verdichtung, Sinterung) gewonnen.

Im klinischen Einsatz befinden sich hauptsächlich monokristalline Beta-Tricalciumphosphat-Keramiken (TCP-Keramiken) und Hydroxylapatit-Keramiken (HA-Keramiken).

Die Keramiken haben ein Calcium-Phosphat-Verhältnis zwischen 1,0 und 2,0. Keramiken mit einem Calcium-Phosphat-Verhältnis innerhalb dieses Intervalls haben in Studien eine gute biologische Integration in den Knochen gezeigt. Hydroxylapatit ist ein komplexes Salz und stellt den Hauptbestandteil der anorganischen Knochenkomponenten dar. Es ist in wässriger Phase die stabilste Form der Calciumphosphate (SCHNÜRER et al., 2003).

RAHN et al. (1986) untersuchten das Einwachsverhalten des Knochengewebes in ein keramisches Implantat sowohl in Bezug auf die Mikro- und Makroporosität als auch auf die Fenestration der Poren. Das schnellste Eindringen von vitalem Knochen war bei einem Porendurchmesser von 80-160 µm und bei 60- bis 80%iger Porosität zu beobachten.

Die osteokonduktiven Eigenschaften dieser Keramiken sind gegeben, es mangelt jedoch an osteoinduktiven und -stimulativen Eigenschaften.

Xenogene Transplantate bovinen Ursprungs sind die am häufigsten in der Praxis verwendeten Hydroxylapatit-Keramiken. Sie werden entweder durch einen Sinterungs- (Endobon[®], Biomet Merck, Darmstadt, Deutschland) oder einen Elutionsprozess (Bio-Oss[®], Geistlich Biomaterials, Wolhusen, Schweiz) gewonnen.

Die mechanischen Eigenschaften sind im hohen Maße vom Fertigungsprozess abhängig (SCHNETTLER, 1993). Die osteokonduktiven Eigenschaften sind hervorragend, jedoch kommt es auch bei dieser Art des Knochenersatzes zu osteoimplantären Einheiten. Das Material wird so gut wie nicht biodegradiert. Eine Osteoinduktion konnte nicht nachgewiesen werden (SCHNETTLER und DINGELDEIN, 1997). Die Biokompatibilität der bovinen HA-Keramiken konnte jedoch in zahlreichen tierexperimentellen Studien gezeigt werden (SCHNETTLER, 1993; DINGELDEIN et al., 1994; BRIEM et al., 2002; SCHNETTLER et al., 2003).

Auch in der klinischen Anwendung konnte mit dem Knochenersatzmaterial Endobon[®] gute Ergebnisse erzielt werden (BRIEM et al., 2003).

Biphasische calciumphosphathaltige Knochenersatzmaterialien liegen in Gestalt von Blöcken, Zylindern, Granulaten und Pulvern vor (SCHNÜRER et al., 2003). Diese Keramiken bestehen aus Hydroxylapatit und Tricalciumphosphat, sind also biphasisch. Sie werden partiell im Organismus abgebaut (HARDOIN et al., 1992). Porosität, mechanische Belastbarkeit und Bioverträglichkeit der verschiedenen

Keramiken sind von Implantat zu Implantat sehr unterschiedlich (LE HUC et al., 1995).

Osteokonduktive Eigenschaften sind nachweisbar (MITTELMEIER et al., 1998), jedoch keine die Osteogenese stimulierenden oder induzierenden Effekte.

SCHNETTLER et al. (2004) haben eine umfassende Studie über CaP-haltige Knochenersatzmaterialien und ihrer Eigenschaften durchgeführt und die Vor- und Nachteile aufgezeigt.

Ein häufiges Problem stellt die unzureichende Einbringung der Ersatzmaterialien in großflächige und instabile Defekte dar und gefährdet somit die Primärstabilität. Diese kann entweder durch eine begleitende Osteosynthese oder durch ein Beimischen von autologem bzw. allogenen Knochen gewährleistet werden (SCHNÜRER et al., 2003). Nach der knöchernen Durchbauung des Implantats entstehen andere biomechanische Eigenschaften (SCHNETTLER et al., 2004), die die Stabilität wieder sicherstellen.

Calciumphosphathaltige Knochenzemente entstehen durch das Zusammenwirken der zwei Teilkomponenten Pulver und Wasser. Die Komponenten werden zu einer formbaren Paste vermischt und appliziert. In situ härtet diese Paste unter Sedimentation einer Calciumphosphatverbindung aus (CHENG et al., 1997 und CHOW, 2001).

Der Sedimentationsprozess und somit auch das Sedimentationsprodukt werden durch die Faktoren pH-Wert, Aushärtungstemperatur und Partikelgröße der Teilkomponenten bestimmt (ANDRIANJATOVO et al., 1996; FERNANDEZ et al., 1999; GINEBRA et al. 1995 und 1997).

Die Festigkeit und Stabilität der CaP-Zemente ist durch die Verfilzung der Kristallite während der Aushärtung bedingt. Dieser Vorgang kann mit der Reaktion beim Hartwerden eines Gipses verglichen werden (FERNANDEZ et al., 1998). Die mechanische Stabilität der Zemente ist abhängig von deren Ausgangskomponenten (ISHIKAWA et al., 1995) und der Porosität. Eine hohe Porosität bedingt zwar eine schlechtere mechanische Stabilität, fördert aber den Abbau des Materials und die Osteointegration (TAKAGI und CHOW, 2001).

2.3.3 Klasse III: Synthetische, organische Verbindungen

Die in dieser Gruppe zusammengefassten polymeren Verbindungen werden weiter unterteilt in Polyester, Polyaminosäuren, Polyanhydride, Polyorthoester und Polyphosphazene (BENDIX und LIEDTKE, 1997).

Polymere werden im Organismus abgebaut (Hydrolyse) und können somit nur temporär begrenzte Aufgaben übernehmen. Die Abbaugeschwindigkeit ist je nach Art des verwendeten Polymers unterschiedlich und somit zeitlich vorhersehbar, wenn nicht sogar durch die Kombination verschiedener Polymere steuerbar (RUEGER, 1998).

Die Biokompatibilität ist noch nicht eindeutig geklärt. In Untersuchungen wurde beobachtet, dass Abbauprodukte der Polymere als Entzündungsherde fungieren können (GUTWALD et al., 1994 und MAINIL-VARLET et al., 1996) und sogar Immun- und Fremdkörperreaktionen auslösen können (SANTAVIRA et al., 1990).

Ob Polymere als Knochenersatzmaterialien geeignet sind, muss noch in weiteren Studien geklärt werden. Heute schon finden Polymere in der Praxis unter anderem Verwendung als Nahtmaterial, Platten, Netze, Anker, Clips und Markraumstopper. Resorbierbares, ostesynthetisches Material, bestehend aus Polymeren, wird ebenfalls erprobt (PISTNER et al., 1997).

2.3.4 Klasse IV: Composites

Diese Gruppe umfasst alle denkbaren Kombinationen der unterschiedlichen Knochenersatzmaterialien der Gruppen I bis III.

Auf diese Art und Weise versucht man die Eigenschaften der Einzelkomponenten miteinander zu kombinieren, um somit den Anforderungen eines bzw. des „perfekten“ Knochenersatzmaterials gerecht zu werden (siehe Abschnitt 2.2). Dabei sollen sich die einzelnen Eigenschaften sinnvoll ergänzen.

Knochenersatzmaterialien, welche wie in dieser Studie mit Wachstumsfaktoren kombiniert werden, können somit ebenfalls als Composite angesehen werden (RUEGER, 1998).

In der Literatur sind zahlreiche Kombinationen von Knochenersatzmaterialien aufgelistet, so dass hier nur ein kleiner Auszug exemplarisch dargestellt werden soll:

- Polymer-Calciumphosphat-Composites: Kombinationen von organischen Polymeren mit Calciumphosphatkomponenten (MICKIEWICZ et al., 2002).
- Biphasische Keramiken: Hydroxylapatit (HA) und Tricalciumphosphat (TCP). Gemäß den Eigenschaften von HA und TCP sind die biphasischen Keramiken partiell abbaubar. Die biphasischen Keramiken liegen in Gestalt von nicht formbaren Blöcken, Zylindern, Granulaten oder Pulvern vor (DACULSI et al., 1990).
- Polylaktid- und bioaktive Glaskomponenten (JAAKKOLA et al., 2004).
- Mit autogenen Osteoblasten beschickte Calciumphosphat-Implantate als Knochenersatzmaterial in der Wirbelsäule von Kaninchen (KAI et al., 2003).
- Silikat-Calciumphosphat-Composite als Matrix der Knochenneubildung (PORTER et al., 2003).
- Mit BMP (Bone Morphogenetic Protein) und Kollagen bestückte Tricalciumphosphatzylinder im Segmentdefekt des Schafes (GAO et al., 1996).
- Mit basischem Fibroblastenwachstumsfaktor beschichtete HA-Zylinder (SCHNETTLER et al., 2003).

2.4 Knochengewebe

2.4.1 Allgemeiner Aufbau

Knochen ist ein durch Festigkeit und Härte charakterisiertes Stützgewebe, das folgende vier Hauptfunktionen erfüllt. Knochen dient als:

- mechanische Stütze (z.B. Rippen, Wirbelsäule)
- zur Fortbewegung (z.B. Röhrenknochen samt Muskelmantel)
- als Schutz (z.B. Schädelknochen)
- als Stoffwechselreservoir (z.B. Calciumspeicherung).

Knochen stellt ein plastisches, dynamisches Gewebe dar, welches ständig unter hormoneller Steuerung und abhängig von der körperlichen Belastung umgebaut wird (FROST, 1966). Bei einem Erwachsenen werden pro Jahr zwischen 10 und 15 Prozent der Gesamtknochenmasse erneuert. Dieser komplexe Umbauprozess des Knochens wird durch ein Zusammenspiel der verschiedenen Knochenzellen vollzogen und nennt sich ‚bone remodeling‘.

Osteoblasten dienen dabei dem Knochenaufbau, Osteoklasten dem Knochenabbau und Osteozyten stellen den „ruhenden“ Stoffwechsel dar.

Knochen besteht zu 65 Prozent aus anorganischen Mineralien (hauptsächlich Calcium und Phosphat). Der organische Anteil macht 25 Prozent aus (hauptsächlich Kollagen Typ I) und die restlichen 10 Prozent sind Wasser.

Jeder Knochen ist nach dem Leichtbauprinzip konstruiert, so dass mit einem Minimum an Material ein Maximum an Leistung erreicht wird (ROUX, 1895). Eine feste äußere Schicht, die Kortikalis, und eine innere, durch ein schwammartiges Gerüst aus Knochen trabekeln bestehende Zone, die Spongiosa, lassen sich am Knochen unterscheiden. Die Kortikalis ist außen noch von der Knochenhaut, dem Periost, überzogen. Zwischen den Maschen der trabekulären Spongiosa befindet sich das rote Knochenmark, das den Bildungsort der Blutzellen darstellt. In der Markhöhle der langen Röhrenknochen befindet sich als Speicherfett das gelbe Knochenmark.

Knochen kann auf zwei verschiedenen Wegen gebildet werden und in zwei verschiedenen Formen vorliegen. Es gibt eine desmale (direkte) und eine enchondrale / perichondrale (über knorpelig präformierte Skelettanteile ablaufende) Ossifikation.

Zu den zwei Erscheinungsformen des Knochens gehört der Geflechtknochen, welcher durch eine zufällige Kollagenfaseranordnung charakterisiert ist. Er ist mechanisch schwach. Geflechtknochen ist typisch für embryonalen und fetalen Knochen. Beim Erwachsenen entsteht Geflechtknochen nur bei sehr rascher Knochenbildung im Rahmen der Frakturheilung oder pathologischen Veränderungen wie z. B. beim M. Paget oder bei Knochentumoren.

Die zweite, funktionstüchtigere Form stellt der Lamellenknochen dar. Die funktionelle Baueinheit des Lamellenknochens ist das Osteon, das auch Haver'sches System genannt wird. Ein solches System ist aus bis zu 20 konzentrisch angeordneten Speziallamellen (Haver'sche Lamellen) aufgebaut. Die Verlaufsrichtung der Kollagenfasern ist in jeder Lamelle um circa 90° versetzt. Die Zwickel zwischen benachbarten Osteonen bestehen aus lamellären Resten alter Osteone, den sogenannten Schaltlamellen. Die genauen Grenzstrukturen zwischen den einzelnen Lamellensystemen sind noch nicht komplett aufgeklärt (ZIV et al., 1996). Zwischen den Schaltlamellen befindet sich eine nicht mineralisierte Interzellulärsubstanz, das Osteoid. In dieses Osteoid sind die Osteozyten eingebettet.

Dieser innere Aufbau des Knochens verleiht ihm seine hohe Biege- und Torsionsfestigkeit (MARKS und HERMEY, 1996).

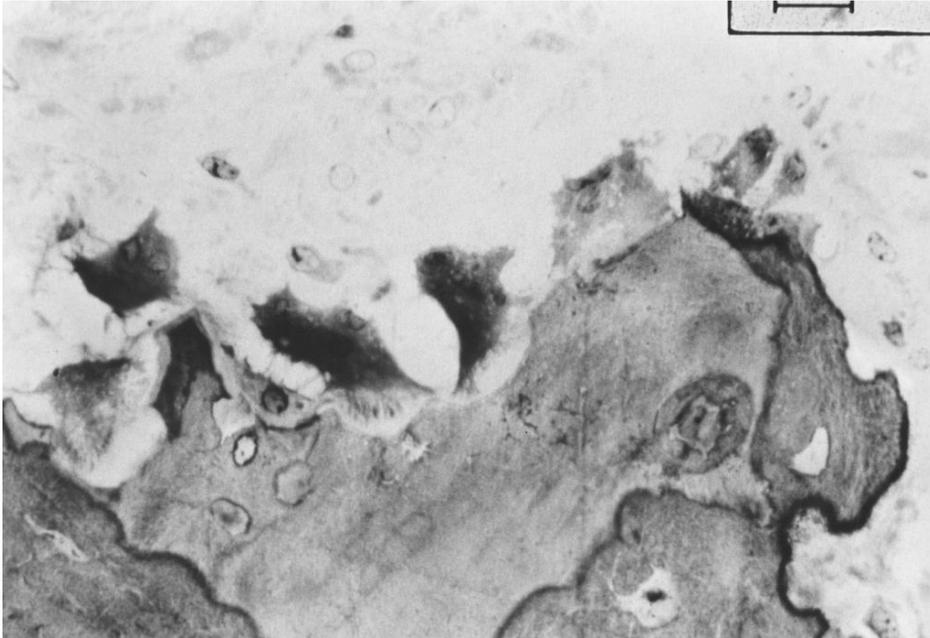


Abb. 4: Histologie: Deutlich zu erkennen ist ein Haver'sches System sowie die verschiedenen Schaltlamellen und die nicht mineralisierte Interzellulärschicht. Quelle: Laboratorium für experimentelle Unfallchirurgie - Gießen.

Die Durchblutung des Knochens wird durch den in der Mitte eines Haver'schen Systems liegenden Haver'schen Kanal (Canalis centralis) gewährleistet, der jeweils eine Arterie samt Begleitvene aufnimmt. Diese Kanäle verlaufen parallel zur Knochenlängsrichtung. Über Volkmann'sche Kanäle (Canales perforantes), die senkrecht dazu verlaufen, sind die einzelnen Osteone miteinander verbunden. Über das Periost erfolgt der Hauptzustrom des Blutes.

2.4.2 Knochenzellen und ihre Funktion

Osteoblasten sind die den Knochen aufbauenden Zellen. Sie entstehen über die Zwischenstufe Osteoprogenitorzellen und Präosteoblasten aus pluripotenten, mesenchymalen Stammzellen. Ihre Lebensdauer liegt zwischen drei Tagen und acht Wochen (SOMMERFELDT und RUBIN, 2001).

Die aktive Form der Osteoblasten ist von kubischer oder polygonaler Gestalt. Inaktive Osteoblasten hingegen sind abgeflacht und von Osteoid umgeben (MACDONALD und GOWEN, 1992). In ihrer aktiven Form liegen sie dem Osteoid perlschnurartig an.

Das Osteoid wird von ihnen selber sezerniert, ist erst unmineralisiert und wird durch die osteoblastäre Calciumabgabe verkalkt. Diese Calciumabgabe geschieht unter dem Einfluss eines Enzyms, der alkalischen Phosphatase (REMEDIOS, 1999).

Ein Osteoblast bleibt entweder an der Knochenoberfläche oder mauert sich selber in die Osteoidmatrix ein und wird über das Stadium eines Präosteozyten zu einem Osteozyten. Die Anzahl der Osteoblasten pro Fläche und deren Aktivierungsgrad bestimmt die tägliche Knochenneubildung und somit auch die Anbaurate. Die mittlere Anbaurate von lamellärem Knochen liegt bei 1-2 μm pro Tag (BENNINGHOFF, 1994).

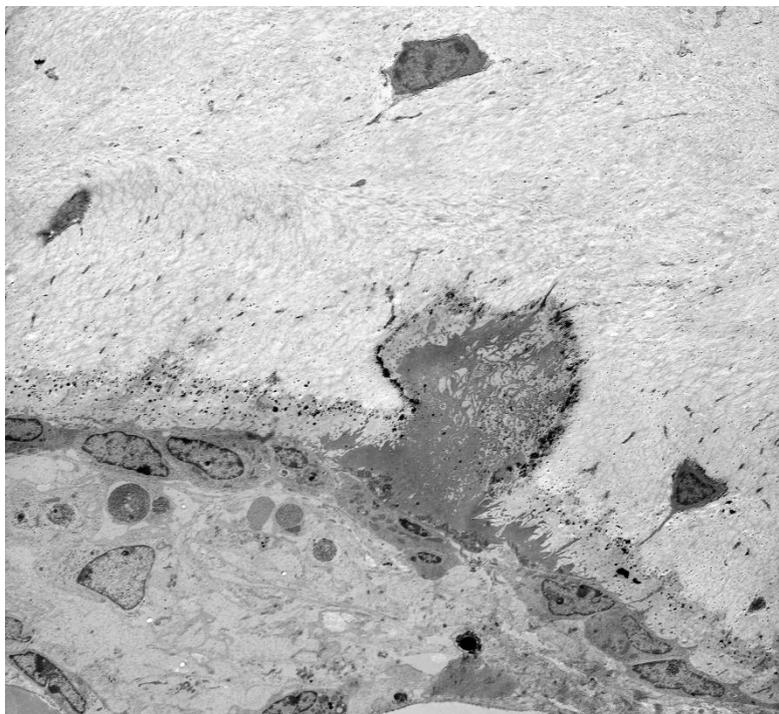


Abb. 5: Trans-Elektronen-Mikroskopisches-Bild: Perlschnurartig und von Osteoid umgebene, dem Knochen aufsitzende Osteoblasten.

Quelle: Laboratorium für experimentelle Unfallchirurgie - Gießen.

Osteozyten sind inaktive, im mineralisierten Knochen eingeschlossene Osteoblasten. Sie nehmen im Knochen 90 Prozent der Gesamtzellzahl ein (KAISER und DELLING, 2002). Ihre Gestalt ist längsoval und sehr flach. Sie liegen in Lakunen und bilden untereinander ein komplexes, dreidimensionales Netzwerk mit Kontakt zu Osteoblasten, Zellen des Markraumes und Endothelzellen. Dieses Netzwerk besteht aus kleinen Kanälen, den Canaliculi. Über diese Fortsätze kann ein Stoffaustausch

stattfinden. Osteozyten sind über dieses „Informationssystem“ besonders an der Calciumabgabe und somit auch an der Mineralisierung der Knochenmatrix beteiligt. Bei starker oder veränderter mechanischer Belastung können die Osteozyten auch an der Oberfläche angeheftete Osteoblasten aktivieren (SKERRY et al., 1989).

Osteoklasten arrodieren mineralisierten Knochen und sind somit für den Knochenabbau verantwortliche Zellen. Es handelt sich um multinukleäre Riesenzellen, die eine Größe von bis zu 100 µm erreichen. Sie stammen von pluripotenten monozytären Progenitorzellen des Knochenmarks ab (SCHNEIDER und RELFSON, 1989). Gemeinsamkeiten mit Makrophagen sind vorhanden (BARON et al., 1985).

Osteoklasten liegen in eigens gebildeten Resorptionshöhlen, den Howship-Lakunen. Die dem Knochen zugewandte Seite ist von einem Bürstensaum („ruffled boarder“) überzogen. Von diesem gefalteten Resorptionssaum werden Proteasen, Kollagenasen und Phosphatasen sezerniert (REMEDIOS, 1999). Diese Enzyme benötigen ein saures Milieu. Osteoklasten verfügen in ihrer Zellmembran über eine ATP-abhängige Protonenpumpe, die den pH-Wert in den sauren Bereich verlagert (SILVER et al., 1988; TEITELBAUM et al., 1997). Die so genannte ‚sealing zone‘ dient der Anheftung an den zu resorbierenden Knochen.

Osteoklasten sind sehr potente Zellen. Ein Osteoklast ist in der Lage pro Zeiteinheit eine Knochenmenge abzubauen, für deren Aufbau 100 bis 150 Osteoblasten benötigt werden. Osteoblasten können die Differenzierung und Aktivierung von Osteoklasten regulieren (KONDO et al., 2001).

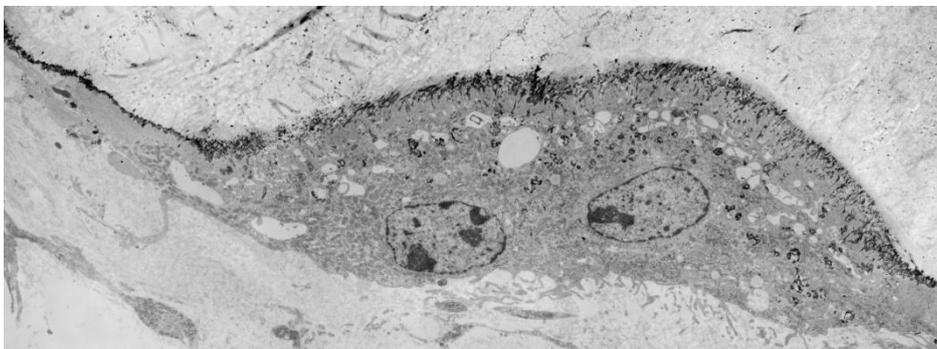


Abb. 6: Trans-Elektronen-Mikroskopisches-Bild: Multinukleäre Riesenzelle in Gestalt eines Osteoklasten. Quelle: Laboratorium für experimentelle Unfallchirurgie - Gießen.

2.4.3 Frakturheilung

Knochengewebe weist eine bemerkenswerte Regenerationsfähigkeit auf, die es möglich macht, Verletzungen im Regelfall vollständig auszuheilen (Restitutio ad integrum).

Eine Fraktur bezeichnet eine vollständige oder auch unvollständige Kontinuitätsunterbrechung eines Knochens. Diese kann sowohl durch direkte wie auch indirekte Gewalteinwirkung hervorgerufen werden und geht mit Schmerzen und einem Funktionsverlust einher (ADLER 1998).

Es wird eine primäre (direkte) von einer sekundären (indirekten) Knochenbruchheilung unterschieden.

Die primäre Knochenbruchheilung wird auch als Kontaktheilung bezeichnet. Eine unerlässliche Voraussetzung für diese Art der Knochenheilung ist die absolute Ruhigstellung und exakte Reposition der Frakturrenden durch eine Osteosynthese. Es findet keine Kallusbildung statt, sondern der Bruchspalt wird direkt von Osteonen längs durchbaut und der Spalt somit überbrückt.

Nach der ARF-Regel von FROST (1966) kommt es nach einer unmittelbaren Aktivierung der fraktur-nahen Zellen über eine etwa einen Monat anhaltende Resorption des angrenzenden Knochengewebes schließlich zu einer Formation neuen Knochens. FROST bezeichnete diesen beteiligten Zellkomplex 1966 als ‚Basic Multicellular Unit of Bone Remodeling‘ (BMU).

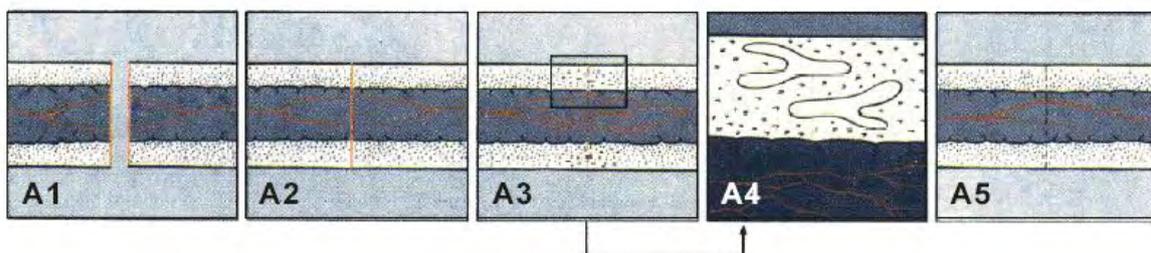


Abb. 7: Schema der primären Frakturheilung (aus: SCHUMPELICK et al., 1999).

A1-A5: Primäre Frakturheilung ohne Kallusbildung durch direktes Vorwachsen der Osteone (Detail A4).

Die sekundäre Knochenbruchheilung geht mit der Bildung eines den Frakturbereich nach und nach stabilisierenden Kallusgewebes einher (siehe Abbildung 8).

Diese Form wird auch als die biologische Knochenheilung bezeichnet (McKIBBIN 1978). Kallus entsteht im Bereich des Frakturhämatoms. In einer frühen Phase der Hämatombildung binden zahlreiche Thrombozyten an das Fibrinnetz des Koagulates. Diese Blutplättchen werden dadurch aggregiert und aktiviert und sezernieren durch den Prozess der Degranulation zahlreiche Wachstumsfaktoren (PROBST und SPIEGEL, 1997).

Durch einsprossende Fibroblasten kommt es zur Organisation und durch die Bildung von Geflechtknochen zur Stabilisierung des Frakturspaltes. Eine ossäre Brücke hat sich gebildet. Der Geflechtknochen wird zu Lamellenknochen umgebaut und das Kallusgewebe weitgehend resorbiert. Die sekundäre Knochenbruchheilung findet bei intramedullären Nagelungen und Gipsbehandlungen als „erwünschte“ biologische Knochenheilungsform statt (RAHN 1982; SARMIENTO et al., 1981) und wird in folgende Stadien unterteilt.

0. Fraktur.
1. Ausbildung eines Frakturhämatoms und Organisation desselben durch einwachsende Fibroblasten und Blutgefäße.
2. Ausbildung einer Knorpelmanschette, die allmählich mineralisiert wird.
3. Knorpelumbau und Ersatz durch Geflechtknochen.
4. Umbau des Geflechtknochens in Lamellenknochen.
5. Teilweise Wiederherstellung der Markhöhle in langen Röhrenknochen.

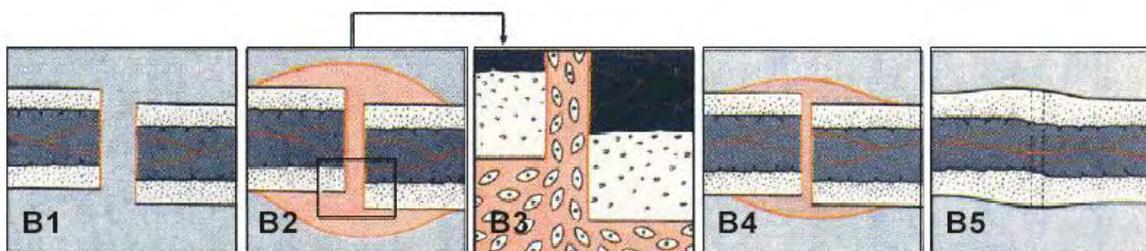


Abb. 8: Schema der sekundären Frakturheilung (aus: SCHUMPELICK et al., 1999).

B1-B5: Sekundäre Frakturheilung mit Auffüllen des Frakturspalts durch ein Hämatom (B2), anschließendes Einsprossen von Fibroblasten und sekundärer Differenzierung zu Geflechtknochen (B3) unter Ausbildung eines Kallusgewebes (B4).

Einen Überblick über die verschiedenen Wachstumsfaktoren und ihre biologischen Wirkungen sowie ihre Expression während der verschiedenen Frakturheilungsstadien geben die Tabellen 1 und 2.

WACHSTUMSFAKTOREN	Proliferation	Differenzierung	Angiogenese
TransformingGrowthFactors TGF-β 1 - 5	+	-	-
Insulin-likeGrowthFactors IGF-I (somatomedin) IGF-II (skeletal)	+	-	-
FibroblastGrowthFactors acidic-FGF (1) basic-FGF (2)	+	-	+
PlateletDerivedGrowthFactors PDGF AA PDGF BB	+	-	-
BoneMorphogeneticProteins BMP (1 – 17)	+ / -	+	?

Tabelle 1: Darstellung der verschiedenen Knochenwachstumsfaktoren und ihre biologischen Funktionen auf den Knochenstoffwechsel (Proliferation, Differenzierung, Angiogenese).
Nach: MUNDY (1996).

FAKTOR	Stadium I	Stadium II	Stadium III	Stadium IV
TGF- β (1-3)	0	++	++++	+++
aFGF	+	+	++	+
bFGF	+	+	+	+
PDGF BB	0	++	++	++
IGF-I	-	+	+	-
IGF-II	-	+	+	-
BMP	+	++	+++	+

Tabelle 2: Expression der verschiedenen Knochenwachstumsfaktoren während der sekundären Frakturheilung (Stadien I, II, III, IV).

Modifiziert nach: ANDREW et al. (1993) und WANG (1996).

3. MATERIAL und METHODEN

3.1 Versuchstiere

3.1.1 Identität der Versuchstiere

Die experimentellen Untersuchungen wurden an 35 weiblichen Merino-Fleischschafen aus der Gut Bendeleben GbR (Sitz: 99706 Bendeleben) durchgeführt. Die Tiere waren bei Versuchsbeginn circa zwei Jahre alt, nicht trächtig und ihr Körpergewicht betrug 50,1 (+ / - 8,6) kg (Mittelwert +/- Standardabweichung). Die Ethik-Kommission der Justus-Liebig-Universität zu Gießen stimmte der Studie zu und das Versuchsvorhaben wurde nach § 8a Absatz 1 und 2 des Tierschutzgesetzes in der Fassung vom 17.02.1993, BGBl I, 254 beim zuständigen Regierungspräsidenten angezeigt und genehmigt.

Eine Genehmigung zur Durchführung von Tierversuchen in der Einrichtung „Fördergemeinschaft für Innovative Medizin“ in Beichlingen (Sitz: 99625 Beichlingen) vom 17.08.1994 lag vor Beginn der Experimente ebenfalls vor.

3.1.2 Gruppeneinteilung

Für das Versuchsvorhaben wurde die Stichprobe von 35 Schafen in fünf weitere Untergruppen, mit unterschiedlichen Beobachtungszeiträumen, eingeteilt. Alle diese Zuteilungen erfolgten randomisiert, also rein zufällig.

Nach der Zuteilung erhielten alle Tiere eine Kunststoff-Ohrmarke in das rechte Ohr und eine aufgemalte Rückennummer.

Gruppe	Postoperative Standzeit	Schaf mit der Nummer
1	5 Tage	27 bis 31
2	10 Tage	32 bis 35
3	6 Wochen	7 bis 16
4	3 Monate	17 bis 26
5	6 Monate	1 bis 6

Tabelle 3: Gruppeneinteilung der Versuchsobjekte; n = 35.

Innerhalb der fünf Untergruppen erfolgte eine weitere Zuteilung nach der Art der Defektfüllung.

Art der Defektfüllung	Schaf mit der Nummer
Calcibon® Granules	1, 2, 3, 7, 8, 9, 17, 18, 19, 27, 28, 32, 33
Composite: Calcibon® Granules + Platelet-Rich-Plasma	4, 5, 6, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 29, 30, 34, 35
Leerdefekt (<u>keine</u> Füllung)	16, 26, 31

Tabelle 4: Darstellung der verschiedenen Defektfüllungen und den zugehörigen Schafen.

3.1.3 Haltungs- und Fütterungsbedingungen

Präoperativ wurden alle 35 Schafe auf einer 150x50 Meter großen Weide und einem 25x25 Meter großen angegliederten Stall der „Fördergemeinschaft für Innovative Medizin“ in Beichlingen (Leitung: Dr. med. vet. Pölzing) gehalten. Diese artgerechte Haltung ermöglichte den Tieren zu allen Jahreszeiten ausreichend Bewegungsmöglichkeit. Wasser, Heu und Krafftutter diente als Nahrung und stand ad libitum zur Verfügung.

Postoperativ wurden die Tiere unter denselben Bedingungen gehalten und erhielten die gleiche, oben beschriebene, Alimentierung. Außerdem erfolgte am ersten und dritten Tag, sowie eine und zwei Wochen nach der Operation eine Kontrolle der Operationswunde durch einen Tiermediziner, welcher bis zur Probenentnahme täglich die Tiere betreute.

Alle in die Studie aufgenommenen Schafe waren sowohl prä- als auch postoperativ unauffällig, zeigten keinerlei Anzeichen für irgendwelche Infektionen oder Erkrankungen und ihr Gangbild war artgerecht. Des Weiteren erfolgten regelmäßige parasitologische Untersuchungen des Kotes gefolgt von Entwurmungen unter tiermedizinischer Federführung.

3.2 Knochenfüllmaterialien

3.2.1 Calcibon® Granules

Hierbei handelt es sich um ein synthetisches, poröses biokompatibles und biodegradierbares Granulat, das als Knochenersatzmaterial der Auffüllung von knöchernen Defekten dient.

Das Ausgangsmaterial wird aus Calcium- und Phosphatsalzen synthetisiert. Durch eine spezielle Herstellungsmethode wird ein poröses Granulat mit Mikro- ($<10\ \mu\text{m}$) und Makroporen ($150\text{-}550\ \mu\text{m}$) bei einer Korngröße von 2-4 Millimetern gewonnen. Das Granulat besteht aus mikrokristallinem, karbonisiertem, calciumdefizientem Hydroxylapatit. Die chemische Zusammensetzung und kristalline Struktur entspricht im Wesentlichen der Calciumkomponente des natürlichen Knochens.

Die Granula sind frei von biologischen Materialien, Konservierungsmitteln oder anderen Wirkstoffen. Die Kompressionsfähigkeit des Granulats beträgt, limitiert durch die poröse Struktur, 4-7 Mega-Pascal.



Abb. 9: Calcibon® Granules.

3.2.2 Platelet-Rich-Plasma (PRP)

Dieses spezielle, aus venösem autologen Blut gewonnene, plättchenreiche Plasmakonzentrat wurde unter Zuhilfenahme des GPS™-Systems (Gravitational-Platelet-Separation-System; Biomet Merck) hergestellt.

Man erhält durch dieses Trennverfahren unter Beimischung eines Antikoagulans (54ml autologes Vollblut mit 6ml Natriumcitrat 3,13 %; B. Braun AG, Melsungen, Deutschland) eine gelartige Flüssigkeit, das PRP, welches eine hohe Konzentration an Thrombozyten (Engl.: platelets) und somit auch die für das Knochenwachstum und die Wundheilung notwendigen, körpereigenen Wachstumsfaktoren in hoher Konzentration enthält (DUGRILLON et al., 2002 und SLATER et al., 1995).

Die folgenden Abbildungen und Erläuterungen erklären das System und die einzelnen Arbeitsschritte der PRP-Separation.



Abb. 10:

Befüllen der GPS™-Tubes mit autologem Blut

→ benötigtes Blutvolumen: 54 ml.



Abb. 11:
Mit autologem Blut befüllte GPS™ -Tubes.



Abb. 12:
Nach Zentrifugation der befüllten Tubes bei 3200 rpm
für 12 Minuten kommt es zu einer typischen 3-Phasenbildung:

OBEN:	Platelet-Poor-Plasma (PPP)
MITTE:	„Buffy Coat“
UNTEN:	Erythrozytenfraktion



Abb. 13 (links):

Herabdrücken des integrierten „Bojen-Filter-Systems“.



Abb. 14 (rechts):

Entnahme des Platelet-Poor-Plasmas (PPP) über den seitlichen Entnahmekanal.



Abb. 15 und 16:

Beide Abbildungen zeigen die Entnahme des Platelet-Rich-Plasmas (PRP) über den zentralen Entnahmekanal.

Laut Herstellerangaben enthält das nach dem oben beschriebenen Prinzip hergestellte PRP im Vergleich zu zwei anderen Zellseparationssystemen anderer Hersteller folgende Konzentrationen an Thrombozyten.

Produkt	Thrombozytenzahl im Blut (μl^{-1})	Thrombozytenzahl im PRP (μl^{-1})	X-faches des Ausgangswertes	Thrombozyten- Fraktion (%)
GPS™	279.500	2.613.800	8 x	85,71
PCCS™	222.500	1.600.000	7 x	78,34
HSPCS™	222.500	674.200	3 x	60,54

Tabelle 5: Vergleich verschiedener Thrombozyten-Trenn-Systeme.

Die Angaben über das GPS™-System stammen aus Untersuchungen der Firma Biomet Merck. Die Daten über das PCCS™ (Platelet-Concentrate-Collecting-System; Implant Innovations, Palm Beach Gardens, USA) und das HSPCS™ (Harvest-Smart-Prep-Platelet-Concentrate-System; Harvest Technologies, Plymouth, UK) stammen aus einer Studie von GEMMEL und CHOW (2001).

Im PRP aus Schafsblut konnten folgende Wachstumsfaktoren in unterschiedlichen Konzentrationen gefunden werden. Die Gewinnung des Thrombozytenkonzentrats erfolgte wieder nach der oben beschriebenen Methode unter Zuhilfenahme des GPS™-Systems aus 54 ml Schafsblut.

Es wurden dazu sechs Schafe des Gesamtkollektivs (N = 35) nach dem Zufallsprinzip (Randomisierung) ausgewählt. Siehe dazu bitte Tabelle 6 auf Seite 34.

Wachstumsfaktoren im PRP des Schafes	Höchste Extinktion (Optical Density)	Niedrigste Extinktion (Optical Density)	Mittlere Extinktion (Optical Density)
PDGF-AB	2,79	0,21	1,08
PDGF-BB	1,64	0,03	0,77
FGF	2,70	0,13	0,43
VEGF	0,30	0,01	0,12
TGF-β1	0,10	0,06	0,08

Tabelle 6: Optical Density (Extinktion) der verschiedenen Wachstumsfaktoren im PRP des Schafes unter Verwendung des QUANTIKINE® Colorimetric sandwich ELISAs (R&D Systems GmbH, Wiesbaden-Nordenstadt, Deutschland) und photometrischer Messung.

3.2.3 Herstellung des Composites aus den beiden Einzelkomponenten Calcibon® Granules und PRP

Zur Herstellung des aus zwei Komponenten bestehenden Composites wurden die CaP-Granula über 3 Minuten in einem „PRP-Thrombin-Komplex“ getränkt. Das autologe Thrombin wurde separat gewonnen und dient als „Starter“ der Wachstumsfaktorensekretion aus den alpha-Granula der Blutplättchen (CARTER et al., 2003). Nach dieser Inkubationszeit ergab sich ein gelartiges Composite bestehend aus autologem PRP / Thrombin und den synthetisch hergestellten CaP-Granula (Calcibon® Granules).



Abb. 17 (links):

Applikationssystem für die autologen Komponenten PRP und Thrombin.



Abb. 18 (rechts):

Gefülltes und zusammengesetztes Applikationssystem.



Abb. 19:

Gelartiges Gemisch aus autologem PRP, autologem Thrombin und CaP-Granula.

3.3 Operative Interventionen

3.3.1 Prämedikation und Anästhesie

Präoperativ wurden die Schafe bei freiem Wasserzugang über 12 Stunden nüchtern gehalten. Die Prämedikation erfolgte durch intramuskuläre Gabe von 1 ml Xylazin[®] 2% (Bayer, Leverkusen, Deutschland) und 0,5 mg Atropinum sulfuricum[®] (Eifelfango, Bad Neuenahr-Ahrweiler, Deutschland) subkutan. Nach Einsetzen der sedierenden Wirkung hat ein Transportwagen die Tiere in den OP-Vorbereitungsraum gebracht.

Dort wurden die Tiere in Rückenlage gelagert, ein Pulsoxymeter am Ohr befestigt, ein EKG zur Rhythmuskontrolle abgeleitet und ein Venenverweilkatheter in die rechte Vena jugularis interna gelegt. Als Vorbereitung zur Intubation wurden über den Katheter 6 ml Ursotamin[®] 10% (Serumwerk Bernburg AG, Bernburg, Deutschland) und 20 ml Myolaxin[®] 5% (Vetoquinol Chassot GmbH, Ravensburg, Deutschland) verabreicht. Daraufhin erfolgte die Intubation und die kombinierte Inhalationsnarkose mit Sauerstoff (Air Liquide, Kerspleben, Deutschland), Isoba[®] (Essex Pharma GmbH, München, Deutschland) und Lachgas (Air Liquide). Die Vitalparameter wurden kontinuierlich überwacht. Perioperativ wurde den Tieren eine prophylaktische Antibiose, Marbocyl[®] 5% (Vetoquinol Chassot GmbH, Deutschland), verabreicht. Außerdem erfolgte bei allen Tieren eine Ableitung von Mageninhalt und -gasen über einen Pansenschlauch, der zugleich dem Aspirationsschutz diente.

3.3.2 Operationsprotokoll

Alle operativen Maßnahmen wurden in oben beschriebener Intubationsnarkose durchgeführt. Nach Rasur des linken Hinterlaufes in einem Bereich von 10x10 Zentimetern proximal und distal des medialen Tibiakopfplateaus wurde die Haut großflächig desinfiziert. Danach erfolgte die sterile Abdeckung des Operationsgebietes.

Vor dem Beginn invasiver Maßnahmen wurde die richtige Positionierung mittels eines Bildwandlers (Philips BV 25 System; Philips Medizinsysteme GmbH, Hamburg, Deutschland) kontrolliert, um später den standardisierten Defekt optimal im Tibiakopf platzieren zu können.

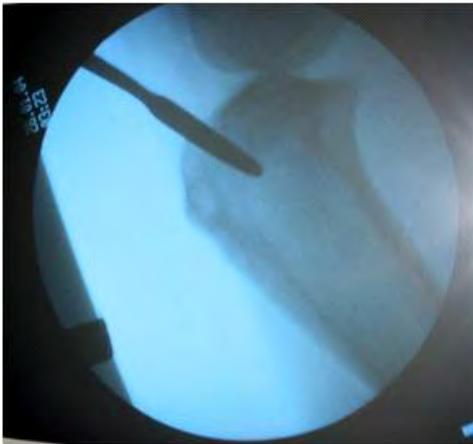


Abb. 20:

Präoperative Bildwandlerkontrolle zur späteren korrekten Platzierung des Bohrlochdefekts im Tibiakopfplateau. (Ansicht von medial; mediolateraler Strahlengang).

Über einen ventromedialen Zugang erfolgte ein circa 4 cm langer Hautschnitt distal des Kniegelenkspaltes in Längsrichtung der linken, hinteren Extremität. Zur Darstellung des Periostes am Tibiakopf wurde stumpf durch das Subkutangewebe präpariert ohne das Kniegelenk zu eröffnen, das Periost dabei scharf inszidiert und zur Seite geschoben.

Nun erfolgte das Fräsen und die Entnahme eines standardisierten Knochenzylinders aus dem medialen Tibiakopfplateau circa 5 mm distal der Gelenkfläche. Dazu wurde das spezielle Instrumentarium **DiamondBoneCuttingSystem**[®] (DBCS) (Biomet Merck) verwendet und während des Fräsvorganges permanent mit einer salinen Lösung gespült, um Hitzenekrosen zu vermeiden und abgeschliffenes Material zu entfernen (SCHNETTLER, 1993). Die Entwicklung dieses Spezialinstrumentariums geht auf DRAENERT (1987) zurück.



Abb. 21:

DBCS

DiamondBoneCuttingSystem[®]

Die innengespülten Hohlschleifen sind außen mit einem Diamantschleifkranz besetzt und ermöglichen eine standardisierte, artefaktfreie Defektsetzung.

Nach Entfernung des Knochenzylinders mit einem Extraktor erfolgte die Säuberung des Defektes (Durchmesser: 12 mm, Tiefe: 30 mm) von Blut und Weichteilgewebe. Bei 13 Tieren wurde der zylindrische Defekt unter Kompression vollständig mit dem CaP-basierten Knochenersatzmaterial (Calcibon[®] Granules) und bei 19 Schafen mit in autologem PRP getränktem Knochenersatzmaterial gefüllt. Bei 3 Tieren wurde der zylindrische Defekt in situ belassen und nicht gefüllt (siehe Tabelle 4).

Der Verschluss des Defektes erfolgte durch eine 3 mm dicke Scheibe (Spongiosa) vom zuvor entnommenen Knochenzylinder, die mit einem Meißel abgetrennt und nach der „press-fit-Methode“ als Deckel eingebracht worden war. Der Rest des entnommenen Knochenzylinders wurde verworfen.

Als nächster Schritt erfolgte das Zurückklappen des Periosts und die Kontrolle des Operationsgebietes auf Fremdmaterial wie z. B. überzählige Granulatpartikel.

Daraufhin wurde das subkutane Gewebe mittels einer resorbierbaren Vicryl[®]-Naht (Ethicon GmbH, Norderstedt, Deutschland) adaptiert und der Hautverschluss durch eine fortlaufende, resorbierbare Intrakutannaht (Vicryl[®], Ethicon GmbH) durchgeführt. Nach einer weiteren Säuberung und Desinfektion der Haut erfolgte die Versorgung der Operationswunde mit einem Nobecutan[®]-Spray-Pflaster (Astra, Wedel, Deutschland).

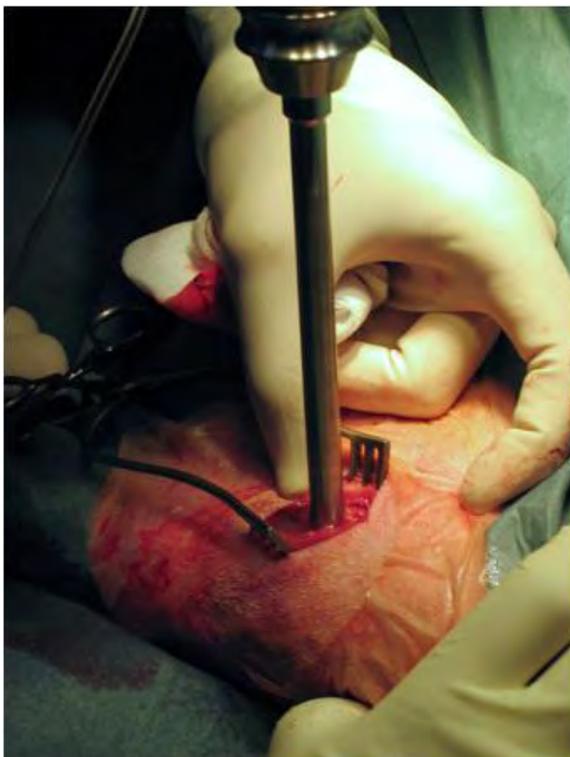


Abb. 22:

Fräsung des standardisierten Defektes im Tibiakopfplateau (medial) unter Verwendung des DBCS mit kontinuierlicher Wasserspülung an der linken, hinteren Extremität.

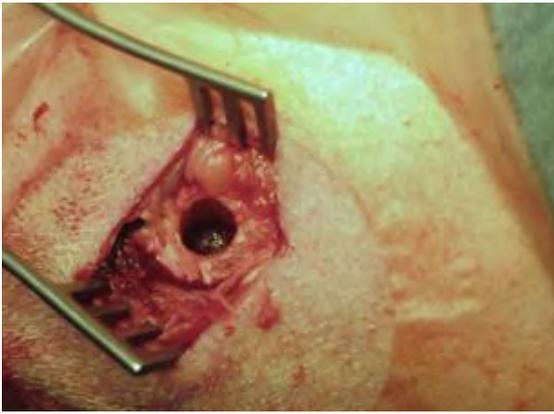


Abb. 23:

Aufsicht auf den gefrästen Defekt im Tibiakopfplateau von medial.

Durchmesser: 12mm.

Tiefe: 30 mm.



Abb. 24:

Von links nach rechts:

- Stößel
- entnommener Knochenzylinder
- Extraktor mit Innenprofil

(Der Extraktor mit dem Innenprofil dient der Bergung des Knochenzylinders nach dem Bohrvorgang und mit dem Stößel wird der Knochenzylinder aus dem Extraktor ausgeschlagen.)

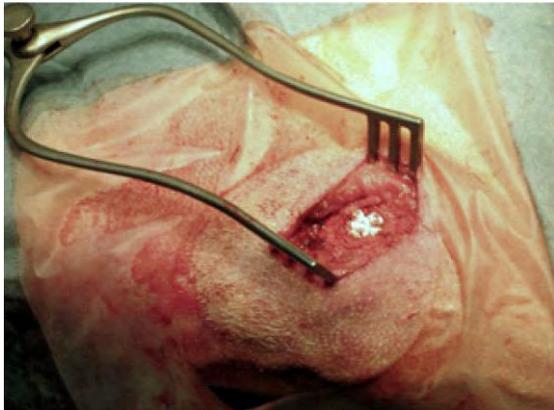


Abb. 25:

Mit CaP-Granula gefüllter Defekt.



Abb. 26:

Füllung des Defektes mit dem Gemisch aus autologem PRP und CaP-Granula. Die gelartige Konsistenz des Gemisches ist deutlich zu erkennen.

3.3.3 Aufwachphase und Operationsnachsorge

Nach oben beschriebener Hautnaht und Versorgung der Operationswunde wurden die Tiere extubiert und unter Kontrolle und Überwachung eines Tierarztes mit einem Transportwagen zurück auf die Weide gebracht. Dort folgte eine kontrollierte Aufwachphase. Zur Schmerzprophylaxe wurde den Tieren 4ml einer 50%igen Metamizol-Lösung (Metapyrin[®], Serumwerk Bernburg, Deutschland) subkutan verabreicht.

Nach zehn Minuten standen die Schafe schon wieder und trotteten langsam mit ihren Artgenossen über die Weide. Eine, zwei und fünf Stunden nach OP-Ende kontrollierte nochmals ein Tierarzt die operierten Schafe und protokollierte deren Verhalten in Bezug auf Bewegungsaktivität und Nahrungsaufnahme.

Alle Versuchstiere wurden in dem Zeitraum bis zur Probenentnahme unter den gleichen Bedingungen, die auch präoperativ vorlagen (siehe Abschnitt 3.1.3), gehalten.

3.4 Euthanasie, Perfusion und Probenentnahme mit Fixation

3.4.1 Euthanasie

Ein Teil der Tiere wurde nach Erfüllung der vorgeschriebenen Standzeiten wieder mit 1ml Xylazin[®] 2% prämediziert und dann unter tierärztlicher Kontrolle mit T61[®] (Intervet, Unterschleißheim, Deutschland) eingeschläfert.

3.4.2 Euthanasie mit Perfusion

Einige Tiere wurden auf die gleiche Art und Weise prämediziert und intubiert wie bei den Operationen im Rahmen der Implantationen (siehe Abschnitt 3.3.1).

Diese Tiere wurden nach Erfüllung der vorgeschriebenen Standzeiten mit Speziallösungen (siehe unten: Karnowsky- und Paraformaldehydlösung sowie Yellow-Fix) perfundiert, um optimale Konservierungsvoraussetzungen des Knochengewebes zu erhalten.

Technik:

Nach Palpation des Pulses in der linken Leiste erfolgte die Eröffnung der Leistenregion und operative Freilegung der Arteria et Vena femoralis sinistra.

Nach lockeren Ligaturen um die Arterie (2x) und die Vene (1x) wurde die Blutzufuhr durch Zuziehen der proximalen, um die Arterie geschlungenen Ligatur abgedrosselt und die Arterie distal dieser Ligatur durch eine kleine Inszision eröffnet. Durch die Öffnung wurde eine Metall-Knopf-Kanüle mit Spritzenansatz nach distal eingeführt und durch Zuziehen der zweiten, distalen Ligatur befestigt.

Nach Zuziehen der um die Vene geschlungenen Ligatur und Inszision der gleichen distal davon, wurden 3000 ml handwarme heparinisierte Ringer-Lösung (Hoffmann-La Roche, Grenzach-Wyhlen, Deutschland und Baxter, Unterschleissheim, Deutschland) über die Kanüle infundiert, bis die aus der Vene austretende Flüssigkeit wasserklar, also makroskopisch frei von Blutbestandteilen, wurde.

Anschließend erfolgte das Einschläfern der Tiere mit T61[®] und die Perfusion des linken Hinterlaufes über die liegende Kanüle. Die Tiere wurden mit einer speziellen Karnowsky-, Paraformaldehyd-Lösung oder gar nicht perfundiert (Tabelle 7).

Implantat		Anzahl der Tiere	Karnowsky-Lösung	PFA-Lösung	keine Perfusion
5 d	CaP	2	0	1	1
	CaP + PRP	2	0	1	1
	Leer	1	0	0	1
10 d	CaP	2	0	1	1
	Cap + PRP	2	0	1	1
	Leer	1	0	0	1
6 Wo	CaP	3	0	1	2
	CaP + PRP	6	1	1	4
	Leer	1	0	1	0
3 Mo	CaP	3	1	1	1
	CaP + PRP	6	2	2	2
	Leer	1	0	1	0
6 Mo	CaP	3	1	1	1
	CaP + PRP	3	1	1	1
	Leer	0	0	0	0

Tabelle 7: Perfusions-Schema: Karnowsky-Lösung, PFA-Lösung und keine Perfusion.
(Erläuterung und Zusammensetzung der Lösungen → siehe Text).

Karnowsky-Lösung: 2%iges Glutardialdehyd + 4%iges Paraformaldehyd
in 0,2 molarem Natriumphosphatpuffer → pH-Wert 7,3.
(alle Bestandteile: Biomet Merck)

Die Perfusion führte zu einer Extension der Extremität unter Aushärtung des Gewebes. Auf diese Art können auch schlecht vaskularisierte Gewebeareale ausreichend fixiert werden.

PFA-Lösung: 4%ige Paraformaldehyd-Lösung diente der einfachen Fixierung des Gewebes.
(Biomet Merck)

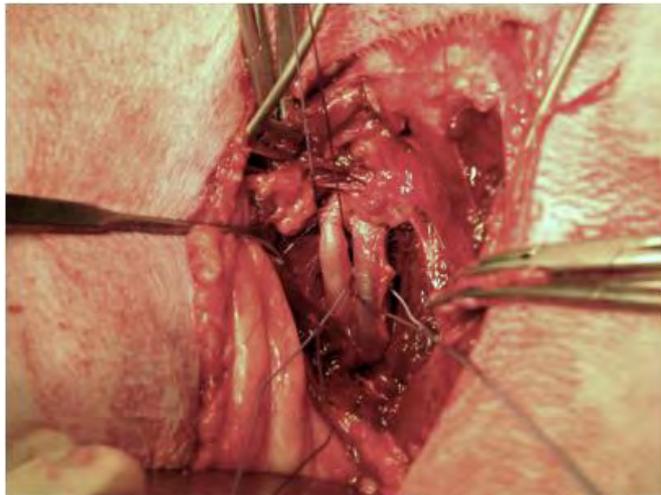


Abb. 27:
Präparierte linke Leistenregion und Vorbereitung zur Perfusion → die beiden Leistengefäße sind freipräpariert und angeschlossen.

Links: Arteria femoralis sinistra
Rechts: Vena femoralis sinistra

3.4.3 Probenentnahme mit Fixation

Nach der Euthanasierung wurde allen Tieren unter sterilen Bedingungen das linke Kniegelenk eröffnet, exartikuliert, der Tibiakopf freipräpariert und das proximale Drittel der Tibia von Weichteilen (Kapsel, Menisken, Bändern, Muskeln) gesäubert. Danach erfolgte die Durchtrennung der Tibia mit einer Handsäge, so dass man das proximale Drittel samt Implantatzone erhält.

Direkt nach der Entnahme wurden die Proben mit einer speziellen Knochenbandsäge (Exakt Apparatebau, Norderstedt, Deutschland) sagittal, senkrecht zur Defektachse (transversal) unter saliner Kühlung in Scheiben gesägt.

Der Zuschnitt ergab 8 planparallele 2-3 mm dicke Scheiben (Deckel (D) und Scheibe 1-7 (S 1-7)) (siehe Abbildung 28).

Der Sägeschnitt erfolgte senkrecht zum Implantat von außen (mediale Tibia) in die Tiefe des Defektes (in Richtung lateral).

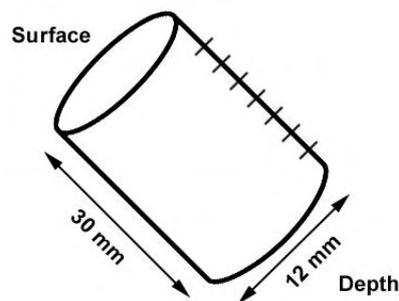


Abb. 28: Schemazeichnung: Zuschnitt der planparallelen Knochenscheiben aus dem entnommenen Knochenzylinder.

Nach der Aufteilung des Tibiakopfes samt Defektzone in die planparallelen Scheiben wurden diese über 24 Stunden nach folgendem Schema in den verschiedenen Lösungen fixiert.

Einbettungs- medium	Fixierung (in Lösung)	Zeit (in Std.)	Temperatur (in Grad Celsius)
Technovit® 7200	Karnowsky	24	4 -7
Technovit® 9100	4 % PFA	24	4 -7
Paraffin	4 % PFA	24	4 -7
Epon®	Yellow-Fix *	24	4 -7

Tabelle 8: Überblick: Einbettung, Fixierung mit Zeitangabe und Temperatur der verschiedenen Knochenschnitte.

* Bestandteile des Yellow-Fix: 2% Paraformaldehyd, 2% Glutardialdehyd, 0,02% Picrinsäure (alle Reagenzien: Biomet Merck).

3.5 Histologische Präparate

3.5.1 Herstellung von Dünnschliff-Präparaten

Diese Art der Herstellung histologischer Präparate nach DONATH (1989) dient speziell der Fertigung dünner Schliffe aus nicht schneidbaren Geweben.

3.5.1.1 Einbettung

Eine weitere Inkubation der Knochenscheiben über nochmals 24 Stunden in 4% Paraformaldehyd erfolgte zur optimalen Gewebeerhaltung. Durch eine aufsteigende Alkoholreihe wurden die Scheiben dehydriert und danach mit dem reinen Kunststoff Glycolmethacrylat Technovit[®] 7200 (Heraeus Kulzer, Wehrheim, Deutschland) in einer aufsteigenden Glycolmethacrylatreihe und einem Einbettmedium (Alkohol) unter einem temporären Vakuum für drei Tage infiltriert. Der Fixierungskleber Technovit[®] 7230 (Heraeus Kulzer), der in die Einbettmulden (Exakt Apparatebau) appliziert wurde, diente der Fixierung der Knochenscheiben in den Mulden. Es folgte die Auffüllung der beladenen Mulden mit Technovit[®] 7200 und die Auspolymerisation des Kunststoffs ist durch Blaulicht im Histolux[®] (Exakt) bei 40° Celsius gewährleistet worden.

3.5.1.2 Schleifvorgang

Nach der erfolgreichen Einbettung wurden die polymerisierten Gewebelöcke aus den Mulden entnommen und über die der histologisch zu untersuchenden, entgegengesetzten Fläche mit Technovit[®] 4000 (Heraeus Kulzer) unter Zuhilfenahme einer Vakuumklebepresse (Exakt) auf einem Objektträger befestigt.

Die Einspannung des Gewebelöck-Objektträger-Systems in ein Mikroschleifsystem (Exakt) dient der Detektierung der zu untersuchenden Schicht. Danach wurden die Kunststoffblöcke mittels einer Präzisionsklebepresse (Exakt) auf mit Alkohol gereinigten Objektträgern durch einen Präzisionskleber (Exakt) fixiert. Die Polymerisation des Klebers fand wieder unter der Verwendung von Blaulicht statt.

Zur Herstellung der etwa 100µm dünnen Trennschnitte mittels eines Trennschleifsystems (Exakt) erfolgte zuerst die Berechnung der Kleberstärke und des Ausgangswertes für das System. Nach der Justierung des Nullpunktes und der Schnittdicke von 100µm wurde der Gewebelöck durch Unterdruck am Mikroschleifgerät fixiert und bis zur eingestellten Dicke abgeschliffen.

3.5.1.3 Färbung

Nach abgeschlossenem Schleifvorgang erfolgte die Färbung der Schnitte mit Safranin-Rot und Toluidin-Blau (alle Farbstoffe: Biomet Merck).

- Bearbeitung der Oberfläche mit 10%iger H₂O₂-Lösung für 10 Minuten
- Spülung mit Aqua dest. und Trocknung
- Färbung mit dem entsprechenden Farbstoff über 15 Minuten
- Spülung und Trocknung
- Eindeckung in Technovit[®] 7200 und Polymerisation unter Blaulicht

3.5.2 Herstellung der immunhistochemischen Präparate

3.5.2.1 Einbettung

Zur immunhistochemischen Aufbereitung wurden die Knochenscheiben in zwei unterschiedliche Medien eingebettet, Paraffin und Technovit[®] 9100 (beide: Heraeus Kulzer).

Technovit[®] 9100:

Die schon in 4%iger Paraformaldehyd-Lösung fixierten Knochenscheiben wurden über weitere 48 Stunden in 0,1 M Natriumphosphatpuffer-Lösung inkubiert. Nach dieser Inkubationsphase erfolgte die Dehydrierung der Scheiben durch eine aufsteigende Alkoholreihe und Einbettung in Technovit[®] 9100.

Technovit[®] 9100 ist ein auf Methyl-Methacrylat (MMA) basierendes Polymerisationsgemisch bestehend aus den folgenden Einzelbestandteilen: PMMA-Puder, Polymerisierungsregler, stabilisierende Basislösung, Härtemittel 1 und 2 und PMMA-Granulat.

Nach der Infiltration mit Technovit[®] 9100 wurden die Proben in Einbettmulden (Exakt) gelegt und mit einem Polymerisationsgemisch aus zwei Stammlösungen (A und B) polymerisiert. Die Stammlösungen waren nach dem Verhältnis von 9 Teilen der Lösung A und 1 Teil der Lösung B gemischt. Eine genauere Beschreibung der beiden Stammlösungen können der Herstellerbeschreibung entnommen werden (Heraeus Kulzer).

Die beschriebene Polymerisation erfolgte auf Eis über zwei Tage und endete mit der Ausbettung der ausgehärteten Kunststoffblöcke.

Paraffin:

Auch bei dieser Aufbereitungsmethode folgte der Fixierung in Paraformaldehyd eine weitere Inkubation über 21 Tage in Tris-EDTA (Triplex[®], Merck; Trizma[®]base, Sigma, Steinheim) zur Entkalkung der Schnitte. Der pH-Wert lag dabei zwischen 7,0 und 7,4. Wieder diente eine sich anschließende aufsteigende Alkoholreihe der Dehydrierung. Eingebettet wurden die entkalkten Schnitte mit Paraffin in speziellen Mulden (Leica, Bensheim, Deutschland). Danach folgte die Polymerisation der Scheiben über fünf Minuten im Kühlschrank bei 4° Celsius.

Die Kunststoff- und Paraffinblöcke wurden nach oben beschriebener Einbettung mit einem Rotationsmikrotom (Leica) geschnitten und auf Objektträgern mit Technovit[®] 7200 eingedeckelt.

3.5.2.2 Antikörperapplikation

Zuerst wurden die Paraffin- und Kunststoffschnitte entparaffiniert bzw. entplastet. Danach erfolgte die Applikation der Antikörper wie in Tabelle 9 beschrieben.

Antikörper	Hersteller	Verdünnung
KOLLAGEN I	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, USA	1 : 50
	Cemicon International Inc., Temecula, USA	1 : 50
OSTEOCALCIN	Chemicon International Inc., Temecula, USA	1 : 100

Tabelle 9: Antikörperapplikation.

3.5.2.3 Färbung

Nach der Antikörperapplikation wurden die Schnitte gesäubert, mit Haematoxylin-Farbstoff (Heraeus Kulzer) gegengefärbt und eingedeckelt.

3.5.3 Herstellung der Semidünnschnitte

3.5.3.1 Einbettung

In 0,1 M Natriumphosphatpuffer-Lösung wurden die fixierten Knochenscheiben über 48 Stunden gereinigt und anschließend in 1%iger Osmiumtetroxid-Lösung (Platinum, Wiesbaden, Deutschland) kontrastiert und nachfixiert.

Wieder diente eine aufsteigende Alkoholreihe der Dehydrierung. Danach wurden die Knochenscheiben mit Xylol-Epon-Gemischen (Serva, Heidelberg, Deutschland) in einem Exsikator (Schott Medica GmbH, Wertheim, Deutschland) infiltriert. Nach 48 Stunden erfolgte die Einbettung der Scheiben bei 4° Celsius in reinem Epon (Serva). Eine aufwendige Inkubationskaskade schloss sich, nach der Einbettung der Epon-Knochenscheiben in ellipsoiden Mulden (Exakt) und Auffüllung dieser mit reinem Epon zur Polymerisation, an:

- 10 Minuten im Wärmeschrank bei 48° Celsius,
- 15 Minuten im Exsikator,
- 3 Stunden im Wärmeschrank bei 48° Celsius und
- 20 Stunden im Wärmeschrank bei 60° Celsius

3.5.3.2 Schnittvorgang und Färbung

Mit dem Ultracut® (Leica, Bensheim, Deutschland) und einem speziellen Histodiamantmesser (Diatome, Biel, Schweiz) wurden von den ellipsoiden Kunstharzblöcken 0,5 bis 1 µm dicke Semidünnschnitte abgetrennt und diese auf einen mit APES (3-Aminopropyl-triethoxysilan) beschichteten Objektträger (Fluka, Buchs, Deutschland) übertragen.

Nach einer Trockenphase bei 70° Celsius auf einer Heizplatte erfolgte die Anfärbung der Semidünnschnitte mit einer Lösung aus 1% Toluidinblau und 1% Borax (beide: Heraeus Kulzer). Eine weitere Trockenphase endete mit der Eindeckelung der gefärbten Semidünnschnitte mit Epon®.

3.6 Auswertungsverfahren und -methoden

Die Auswertung der Versuchsergebnisse gliedert sich in drei unterschiedliche Teile.

1. Teil:

Morphologische Beschreibung der makroskopischen Befunde der einzelnen Defektgebiete im Tibiakopfplateau nach Erfüllung der jeweiligen Standzeiten.

2. Teil:

Qualitative Beschreibung (Morphologie) der mikroskopischen (histologischen) Befunde anhand der hergestellten Präparate nach Erfüllung der jeweiligen Standzeiten.

3. Teil:

Quantitative Bestimmung (Histomorphometrie) und statistische Auswertung der de-novo-Osteogenese im Defektbereich anhand histologischer Präparate nach Erfüllung der jeweiligen Standzeiten.

Auswertungsart	Methoden und Hilfsmittel
<p style="text-align: center;">QUALITATIV</p>	<p>Makroskopische Befunde:</p> <p>Reine, deskriptive Beschreibung der Heilung und Integration des Defektbereichs</p> <p>Lichtmikroskopie:</p> <p>Beschreibung und Darstellung histologischer Ergebnisse mit Hilfe eines Lichtmikroskops (Axioskop-2-plus, Carl Zeiss Jena GmbH, Jena, Deutschland).</p> <ul style="list-style-type: none"> → Gefärbte Nativpräparate → Immunhistologie
<p style="text-align: center;">QUANTITATIV</p>	<p>Histomorphometrische Messungen:</p> <p>Messung des neu gebildeten Knochens nach den unterschiedlichen Standzeiten unter besonderer Berücksichtigung der unterschiedlichen Defektfüllungen.</p> <p>(Image-Pro[®] Plus, Media Cybernetics Inc., Silver Spring, USA)</p>

Tabelle 10: Auswertungsmethoden.

4. ERGEBNISSE

4.1 Makroskopische Befunde

Bei keinem der 35 Tiere konnten postoperativ Anzeichen für einen Wundinfekt nachgewiesen werden. Die Operationsnarbe war in allen Fällen reizlos, gut verheilt und das resorbierbare Nahtmaterial hatte sich vollständig aufgelöst (nur bei den 5 und 10 Tagestieren war das Nahtmaterial aufgrund der kurzen Zeitspanne zwischen Operation und Probenentnahme noch vorhanden). Alle Schafe belasteten die operierte Extremität voll und ihr Gangbild war nach Angaben des überwachenden Tiermediziners (Dr. med. vet. Pölzing) unbehindert.

Die Implantationsstelle war bei den 5- und 10-Tages- sowie den 6-Wochen-Tieren noch eindeutig von der angrenzenden Kortikalis abgrenzbar und der Knochendeckel fest in seiner Umgebung verankert. Hingegen war bei den 3 und 6 Monatstieren nur noch eine Verdickung der Kortikalis an der Implantationsstelle zu finden.

Am Implantatlager waren ebenfalls bei keinem der Tiere makroskopische Hinweise für eine Infektion zu erkennen.

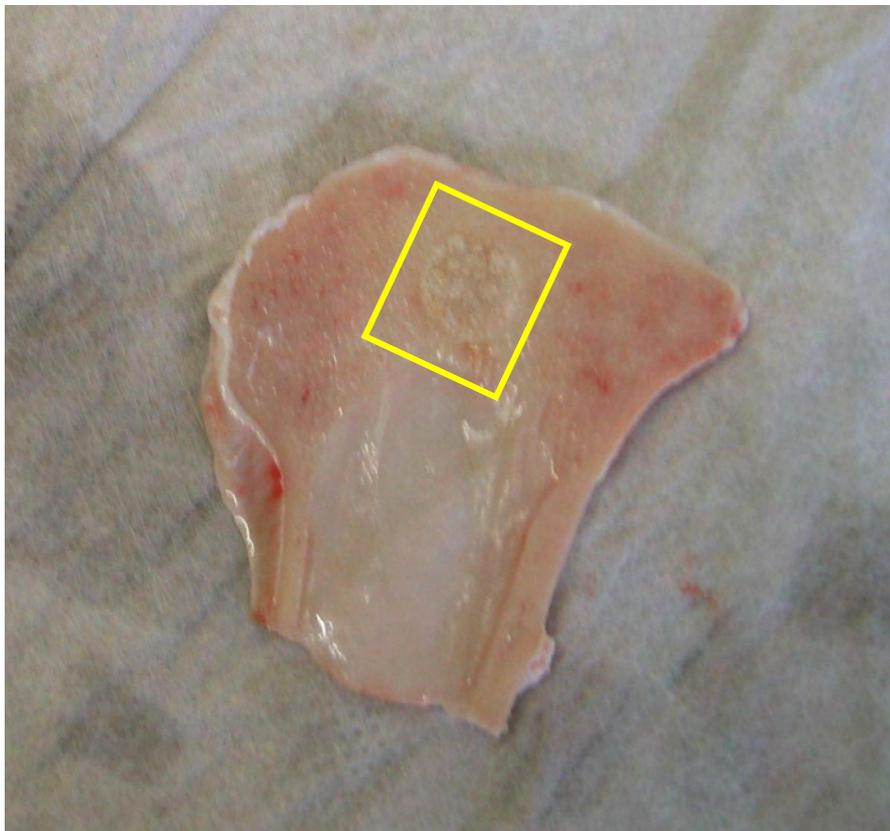


Abb. 29:

Mit CaP-Granula gefüllter Defekt im Tibiakopfplateau.

4.2 Mikroskopische (histologische) Befunde

4.2.1 Knochenschliffe (Toluidinblau)

4.2.1.1 5-Tages-Tiere

CaP-Gruppe:

Eine Knochenneubildung ist lichtmikroskopisch fünf Tage post implantationem weder in lagernahen Bereichen noch im Defektzentrum erkennbar.

Lichtmikroskopisch hat sich zwischen den CaP-Granula ein bindegewebig strukturiertes Granulationsgewebe ausgebildet.

Der Knochen ist blau angefärbt und die CaP-Granula erscheinen braun-schwarz. Das Granulationsgewebe ist hellblau bis grau gefärbt (Abbildung 30).

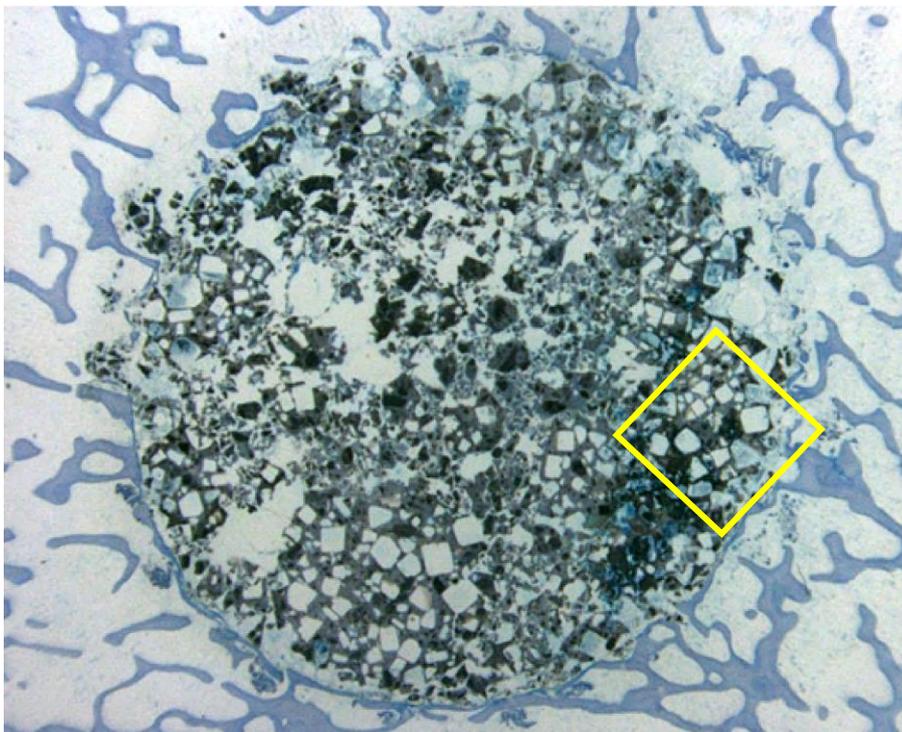


Abb. 30:

Übersicht (Kasten in Abbildung 29): Mit CaP-Granula gefüllter Knochendefekt. Es ist zu diesem frühen Zeitpunkt kein neu gebildeter Knochen zu erkennen. Zwischen dem Granulat hat sich ein bindegewebig strukturiertes Granulationsgewebe ausgebildet (siehe Abbildung 31).

An einigen Stellen ist ein Fibrinnetzwerk zu sehen, welches das CaP-Granulat umschließt und mit dem Lagerknochen verbindet. Entzündungszellen, besonders in Gestalt von Leukozyten, sind in den Defektbereich eingewandert. Makrophagen bzw. Riesenzellen sind ebenfalls präsent.

Primitive mesenchymale (Vorläufer-) Zellen bilden einen wichtigen Bestandteil des Granulationsgewebes. Diese stellen die bindegewebige Komponente dar und bilden stellenweise in den Defekt ziehende „Straßen“ (Abbildung 31).

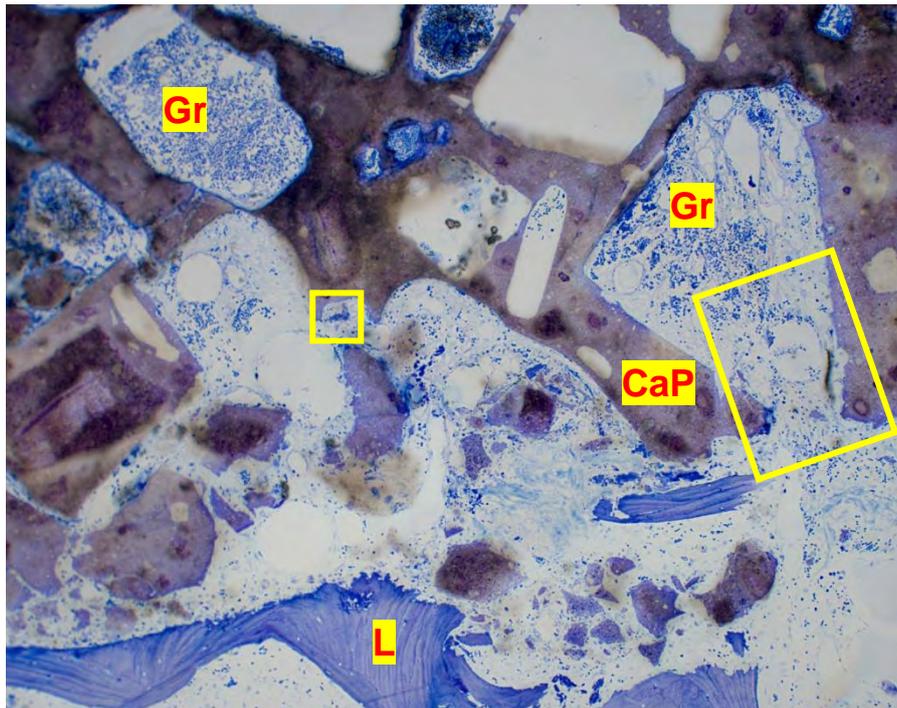


Abb. 31:

Detailansicht aus Abbildung 30 (Kasten).

Das zwischen den Makroporen des CaP-Granulats eingeschlossene Granulationsgewebe ist zu erkennen. Dieses Granulationsgewebe ist hauptsächlich bindegewebig strukturiert.

L = Lagerbereich / Lagerknochen

CaP = Calcium-Phosphat-Granula

Gr = Granulationsgewebe

großer gelber Kasten = in den Defekt ziehende Vorläuferzellen-„Straßen“

kleiner gelber Kasten = Riesenzelle

CaP / PRP-Gruppe:

Auch in dieser Gruppe ist fünf Tage post implantationem lichtmikroskopisch keine Knochenneubildung nachweisbar.

Es hat sich ebenfalls ein Granulationsgewebe zwischen den Granulatporen ausgebildet (Abbildung 32).

Dieses Granulationsgewebe scheint allerdings insgesamt zellreicher zu sein als das der Kontrollgruppe.

Die in den Defekt laufenden „Zellstraßen“ sind dichter gepackt und es überwiegen mesenchymale Vorläuferzellen in Gestalt von Prä-Fibroblasten. Außerdem ist die strangartige, in den Defekt hineinziehende, Struktur dieser „Zellstraßen“ zu sehen. Entzündungszellen in Form von Leukozyten sind ebenfalls zahlreich vorhanden.

Zur Darstellung dieser Gegebenheiten dient Abbildung 33 (unentkalkter Knochenschnitt, Toluidinblaufärbung).

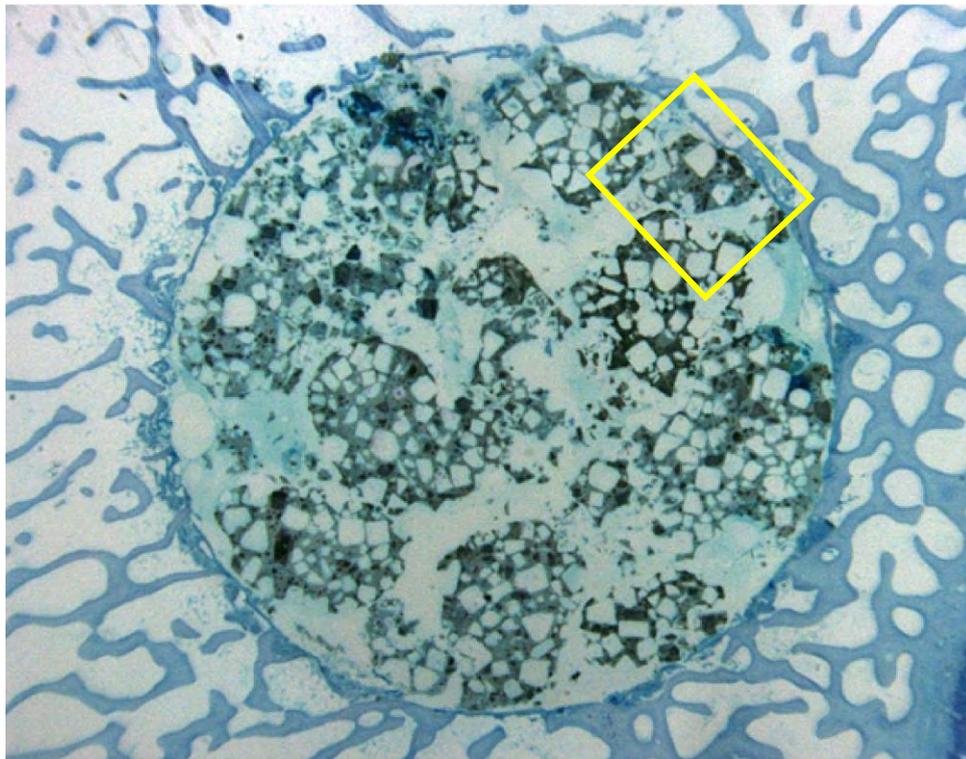


Abb. 32:

Die Übersichtsaufnahme zeigt den mit CaP-Granula und PRP gefüllten Defekt. Fünf Tage post implantationem hat sich noch kein neuer Knochen gebildet.

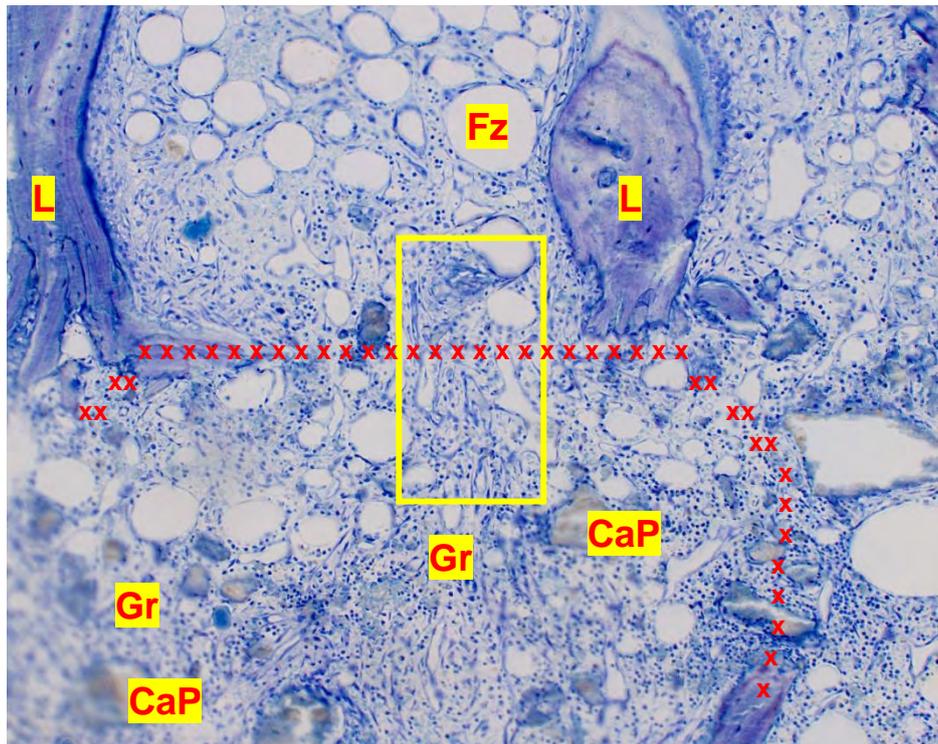


Abb. 33:

Die Detailansicht zeigt das Granulationsgewebe im lagernahen Defektbereich. Die in den Defekt ziehenden „Zellstraßen“ sind eindeutig zu detektieren (unentkalkter Knochenschnitt).

L = Lagerbereich / Lagerknochen

CaP = Calcium-Phosphat-Granula

Gr = Granulationsgewebe

gelber Kasten = in den Defekt ziehende Vorläuferzellen-„Straßen“

Fz = Fettzelle

xxx = Defektrand

Leerdefekt:

Die Abbildung 34 zeigt einen in situ belassenen, nicht gefüllten, Defekt.

Es hat sich weder Knochen gebildet, noch sind Zellen in den Defektbereich eingewandert. Ein Granulationsgewebe ist ebenfalls nicht nachweisbar.

Der Defektbereich ist lediglich durch eine fibrinreiche Plaque erschlossen, die durch die Einblutung in den Defekt zustande gekommen ist.

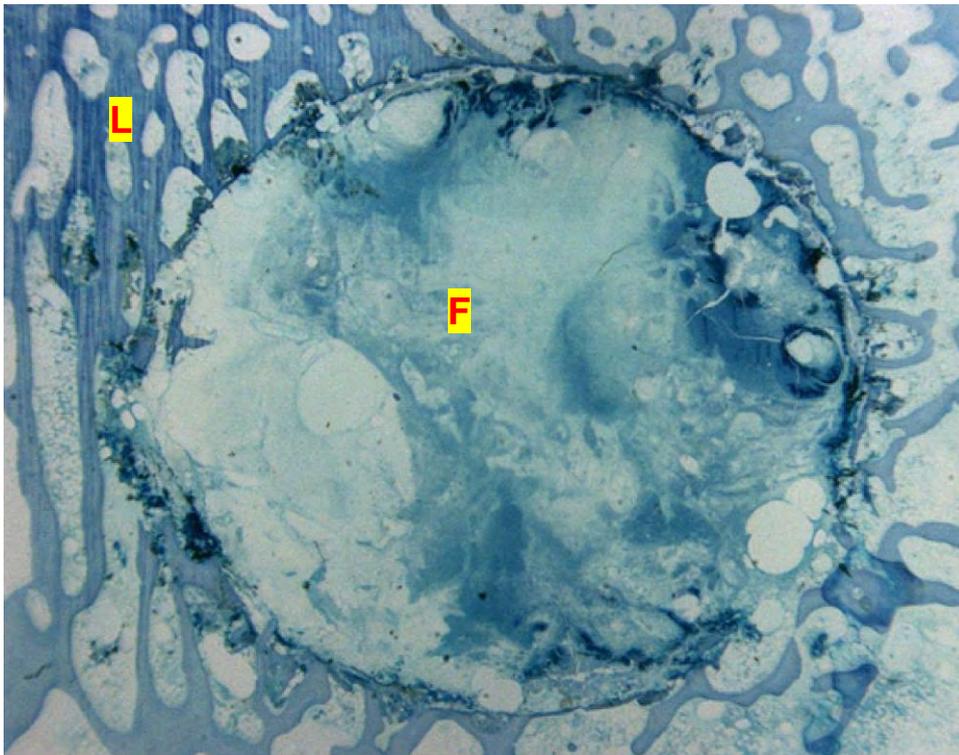


Abb. 34:

Übersichtsaufnahme eines Leerdefektes fünf Tage post implantationem. Im Defektbereich ist lediglich Fibrin (Plaque) zu detektieren. Das Fibrin (= F) hat sich „blau“ angefärbt. L = Lagerknochen.

4.2.1.2 10-Tages-Tiere

CaP-Gruppe:

Zu diesem frühen Zeitpunkt der Defektheilung sind nur wenige Unterschiede im Vergleich zur 5-Tages-CaP-Gruppe zu erkennen.

Abbildung 35 zeigt eine Übersicht über die Verhältnisse im Defektbereich. Weiterhin liegt ein zellreiches Granulationsgewebe vor, das allerdings organisierter erscheint. In der Detailansicht (Abbildung 36) sind in lagernahen Bereichen knöchern umschlossene Granulatpartikel lichtmikroskopisch nachweisbar.

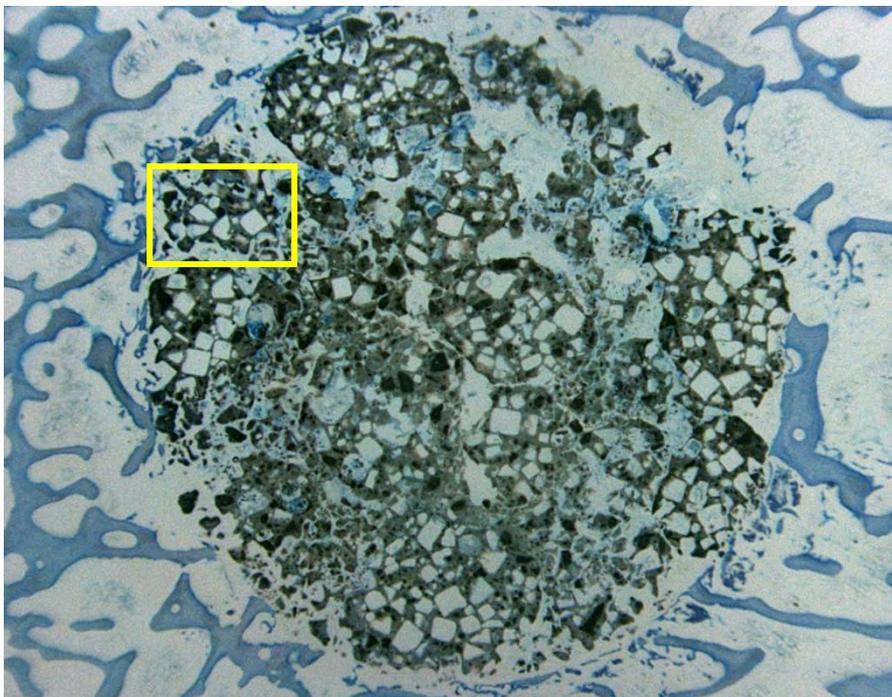


Abb. 35:

Übersicht 10 Tage post implantationem: Der gesamte Defektbereich ist mit CaP-Granulat gefüllt.

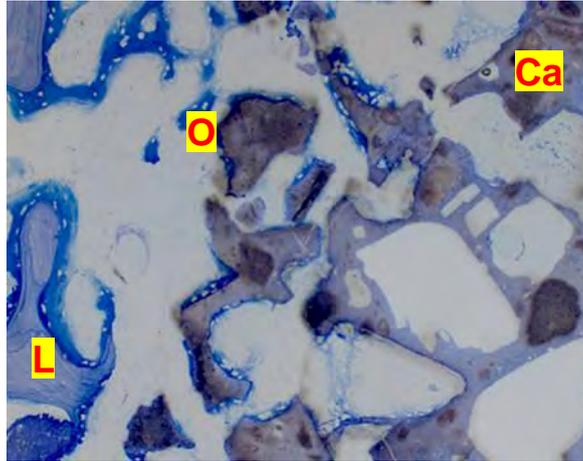


Abb. 36:

Detailansicht aus Abbildung 35 (Kasten): Im hier dargestellten lagernahen Defektbereich sind einige Granulatpartikel (CaP) von neu gebildetem Knochen umschlossen. Die de-novo-Osteogenese schreitet zentripetal, zur Defektmitte hin, fort.

O = Osteoblasten. L = Lagerknochen.

CaP / PRP-Gruppe:

Diese Gruppe entspricht im Wesentlichen der CaP-Gruppe nach einem Beobachtungszeitraum von zehn Tagen. Die Übersicht (Abbildung 37) zeigt den komplett mit Granulat und PRP gefüllten Defekt.

Neu gebildeter Knochen wächst auch in diesem Fall wieder vom Lager her in den Defekt. Der Defekt wird also zentripetal von neuem Knochen erschlossen. Im Zentrum ist nach 10 Tagen Standzeit kein Knochen nachweisbar.

Im Vergleich zur CaP-Gruppe sind in lagernahen Bereichen mehr Granula von Knochen ummauert (Abbildung 38). Die Abbildungen 39 und 40 zeigen eine stärkere Vergrößerung neu gebildeter Knochenbälkchen im Randbereich des Defektes. Der Kontakt dieser zarten Knochenbspangen zum Lagerknochen ist ebenfalls zu erkennen.

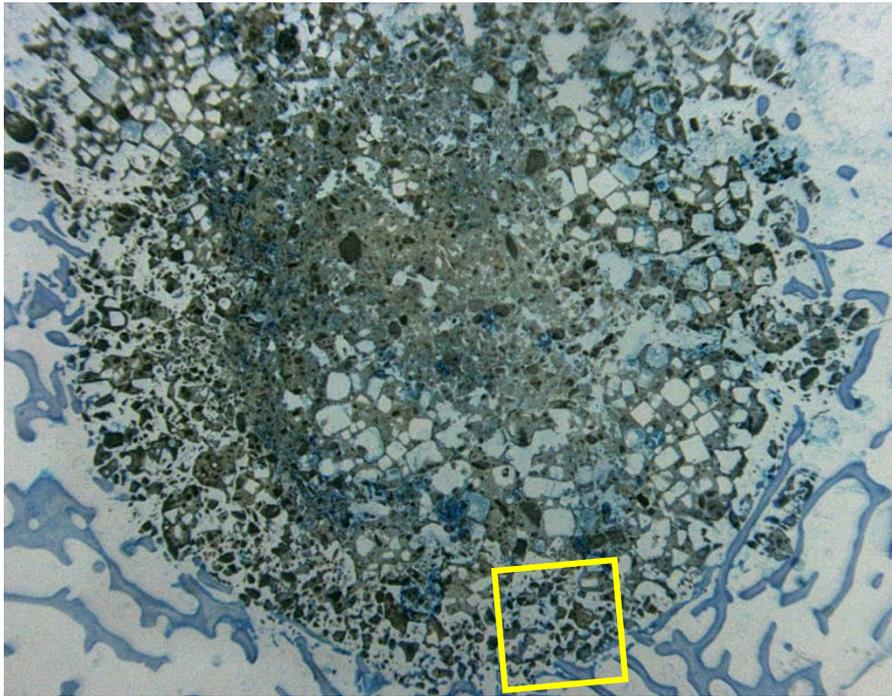


Abb. 37:

Übersicht 10 Tage post implantationem: Der gesamte Defektbereich ist mit CaP-Granulat und PRP gefüllt. In den Randbereichen des Defektes sind vereinzelt zarte, neu gebildete Knochenbälkchen erkennbar.

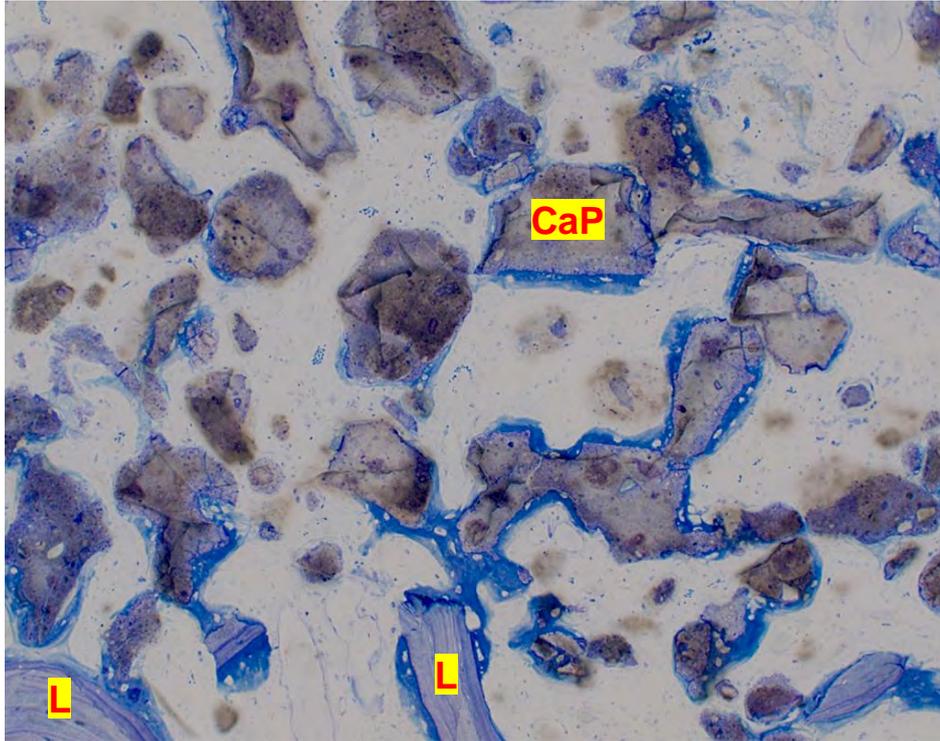


Abb. 38:

Detailansicht aus Abbildung 37 (Kasten):

Am unteren Bildrand sind Knochen trabekel des Lagerknochens erkennbar. Von diesem lamellären Knochen ziehen neu gebildete, zarte Knochenbälkchen in den Defekt und ummauern das CaP-Granulat. Neben diesen Strukturen ist zwischen den Granula noch ein zellreiches Granulationsgewebe detektierbar. In den Säumen von Geflechtknochen um die Granula sind die Osteoblasten als kuboide, perlschnurartig aufgereichte Zellen zu sehen.

CaP = Calcium-Phosphat-Granula

L = Lagerknochen

(Weitere Details sind den Abbildungen 39 und 40 zu entnehmen.)

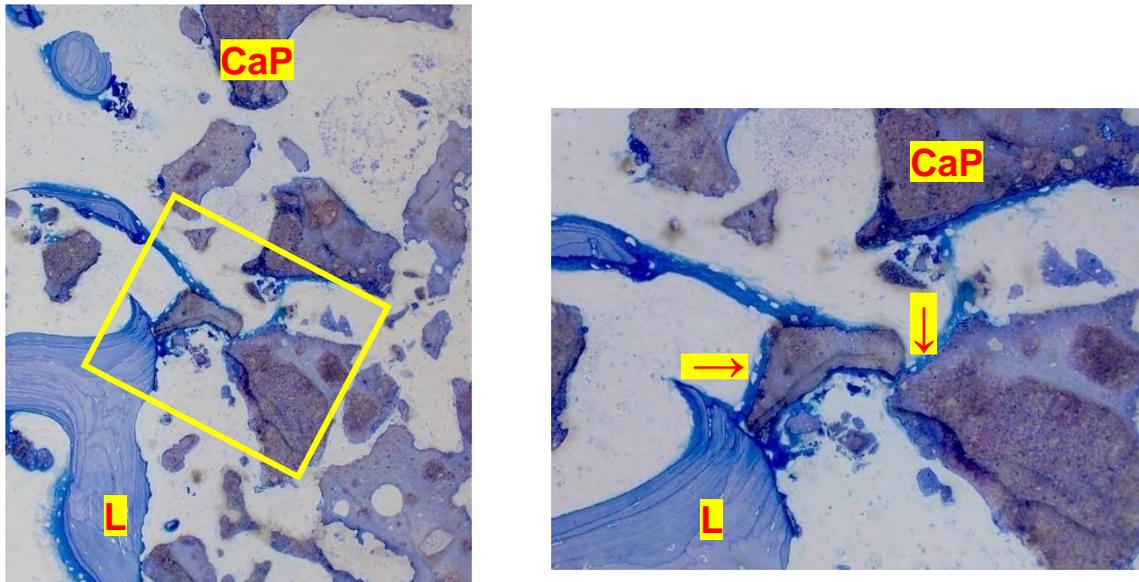


Abb. 39 (links):

Detailansicht:

Die osteokonduktiven Eigenschaften des CaP-Granulats werden durch den an dieser Leitstruktur entlang wachsenden, neuen Knochen deutlich.

Abb. 40 (rechts):

Detailansicht aus Abbildung 39 (Kasten):

Die neu gebildeten Knochenbälkchen sind noch deutlicher zu erkennen. Links im Bild ist eine Knochenspanne des Lagers zu sehen. Von dieser Struktur ausgehend werden mehrere CaP-Partikel knöchern erfasst und eingemauert.

Die den Knochen aufbauenden Osteoblasten liegen aufgereiht auf der Oberfläche der eingeschlossenen Granula.

CaP = Calcium-Phosphat-Granula

L = Lagerknochen

→ bzw. ↓ = aufgereichte Osteoblasten

4.2.1.3 6-Wochen-Tiere

CaP-Gruppe:

In der Übersicht (Abbildung 41) ist die knöcherne Erschließung des CaP-Granulats bis in das Defektzentrum fortgeschritten. Der Defekt ist knöchern durchbaut und das Knochenersatzmaterial in seine Umgebung integriert. Sowohl der neu gebildete als auch der Lagerknochen sind blau angefärbt. Die CaP-Granula erscheinen braunschwarz.

Die Grenze zwischen Lager und Defekt ist noch eindeutig abgrenzbar. Diese ‚Interface-Zone‘ stellt die Verbindung zwischen dem Implantat und dem Lagerknochen dar. Der Lagerknochen besteht aus Lamellenknochen.

Abbildung 42 stellt eine Ausschnittsvergrößerung aus Abbildung 41 dar und zeigt im unteren Bilddrittel die ‚Interface-Region‘ und in den oberen zwei Dritteln die knöcherne Integration und Verteilung vom Defektrand zum Defektzentrum hin. Die in Richtung Defektzentrum lokalisierten CaP-Granula sind stellenweise noch nicht knöchern erschlossen bzw. ummauert.

Die Oberflächen dieser Granula sind frei von einem blaugefärbten Knochensaum. Die Knochenbildung schreitet zentripetal fort.

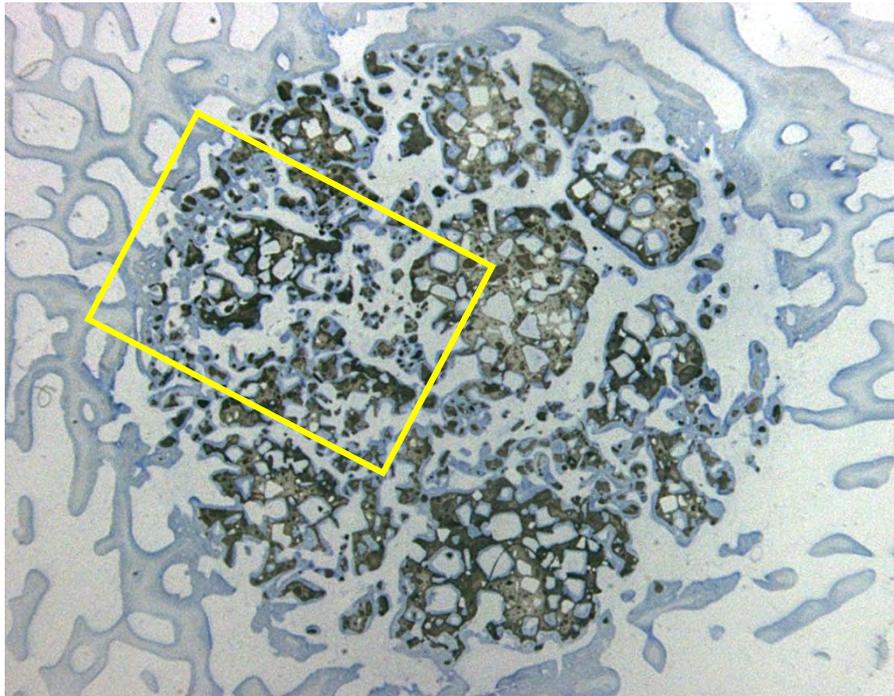


Abb. 41:

Übersicht 6 Wochen post implantationem: Die knöcherne Erschließung des Defektes ist bis in das Defektzentrum fortgeschritten. Der Lagerknochen ist eindeutig von dem mit CaP-Granula und neu gewachsenem Knochen gefüllten Defekt abgrenzbar.

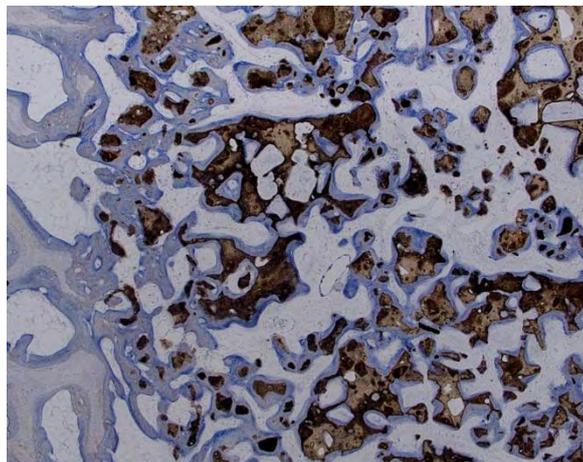


Abb. 42:

Detailansicht aus Abbildung 41 (Kasten):

Bei dieser stärkeren Vergrößerung ist zu erkennen, dass stellenweise noch freie, nicht knöchern integrierte, CaP-Granula vorliegen.

CaP / PRP-Gruppe:

In den Übersichtsaufnahmen (Abbildung 43 und 44) ist zu erkennen, dass eine zellreiche Granulationsgewebeschicht stellenweise die knöchernen Formationen im Defektbereich vom lamellären Lagerknochen trennt.

Die CaP-Granula sind teilweise von neu gebildetem Knochen eingerahmt. Osteokonditiv erschlossene Implantatverbände sind nachweisbar. Die neu gebildeten Knochenstränge sind zum Teil sehr dick und erscheinen breiter als die Trabekel des Lagerknochens.

Abbildung 45 ist eine Detailaufnahme aus Abbildung 44 und dokumentiert die vom Lager ausgehende Osteogenese (zentripetal). Die CaP-Granula sind stellenweise von neuem Knochen umwachsen. Zwischen den Knochen-Implantat-Formationen ist zellreiches Granulationsgewebe erkennbar.

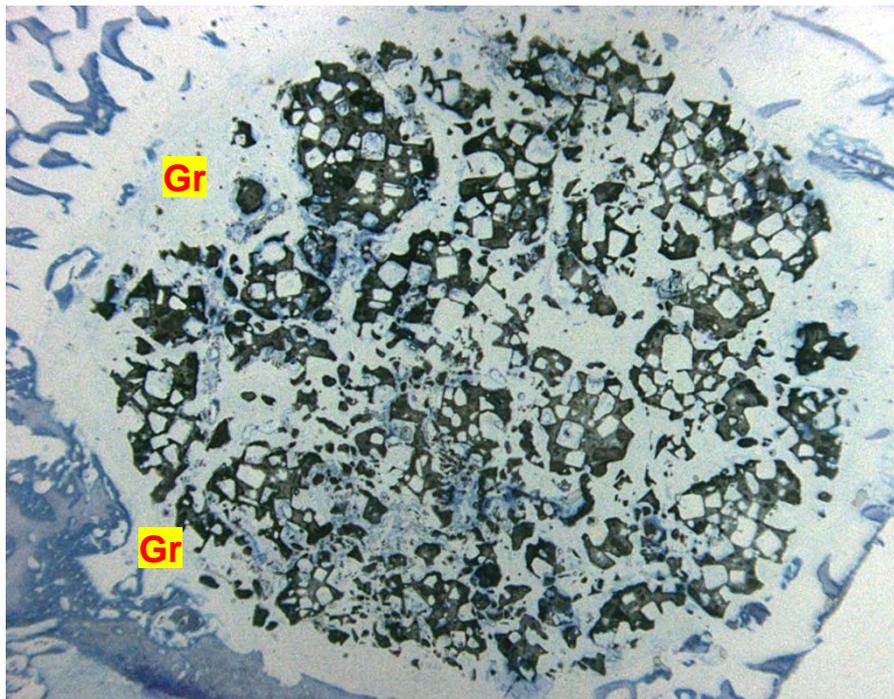


Abb. 43:

Übersicht 6 Wochen post implantationem: Stellenweise ist das osteokonditiv erschlossene CaP-Granulat durch ein zellreiches Granulationsgewebe vom Lagerknochen getrennt.

Gr = **G**ranulationsgewebe

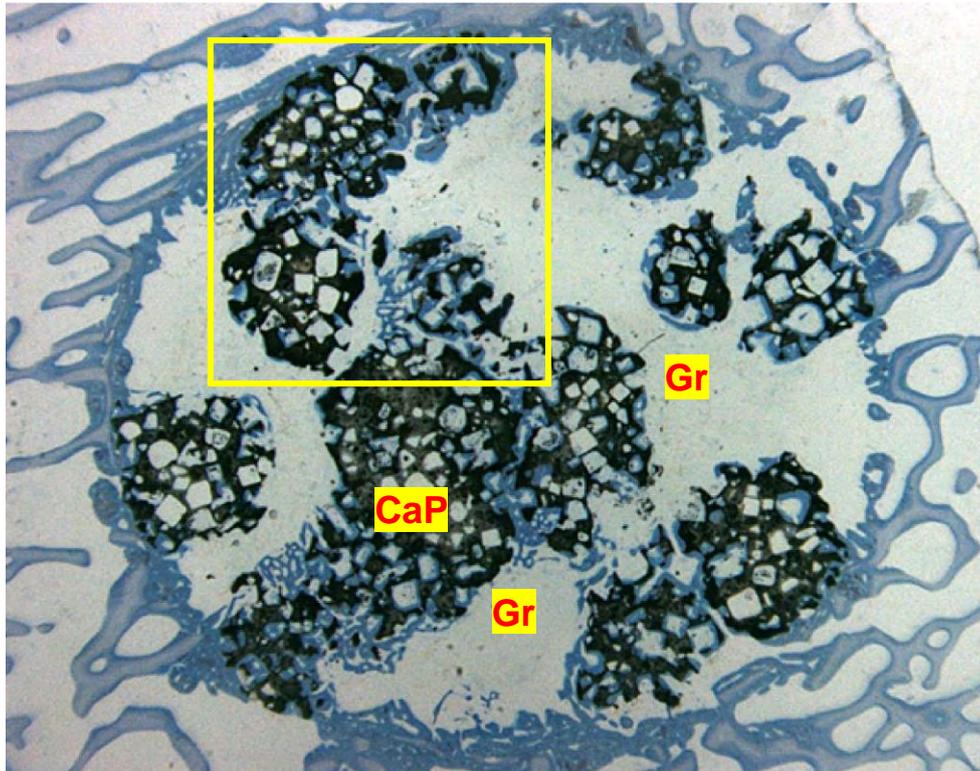


Abb. 44:

Die Übersichtsaufnahme zeigt das stellenweise zwischen Implantat und Lager liegende zellreiche Granulationsgewebe noch deutlicher als Abbildung 40.

Die osteoimplantären Verbände sind untereinander durch Knochenspangen verbunden.

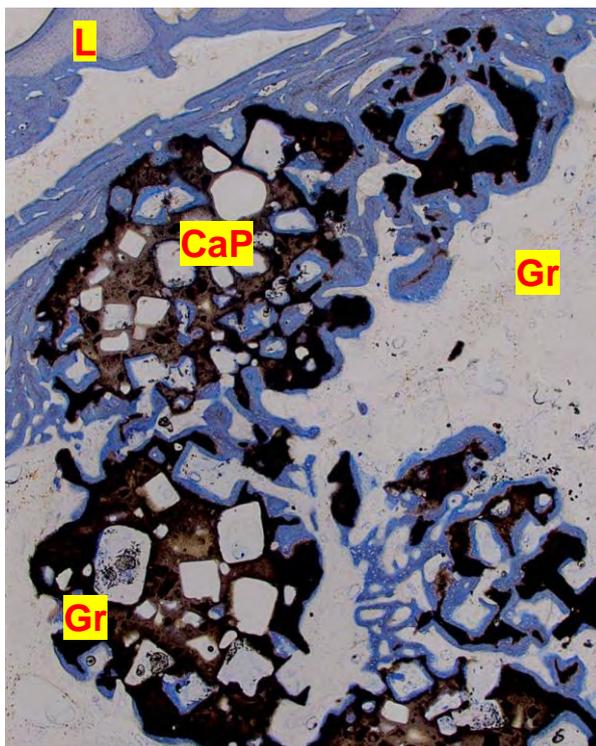


Abb. 45:

Die Detailansicht (Kasten in Abbildung 44) dokumentiert die vom Lager ausgehende Osteogenese (zentripetal). Stellenweise hat der neugebildete Knochen die CaP-Granula vollständig eingemauert. Zwischen diesen osteoimplantären Verbänden ist das zellreiche Granulationsgewebe zu sehen.

CaP = Calcium-Phosphat-Granula

L = Lagerknochen

Gr = Granulationsgewebe

Leerdefekt:

In Abbildung 46 ist ein nicht mit CaP-Granula oder „CaP-Granula + PRP“ gefüllter Defekt dargestellt.

Am Defektrand sind vereinzelt Knochenschollen detektierbar. Im übrigen Defekt und in Richtung Defektzentrum hat sich kein neuer Knochen gebildet. Hingegen ist der Defekt mit Fett- und Bindegewebe gefüllt.

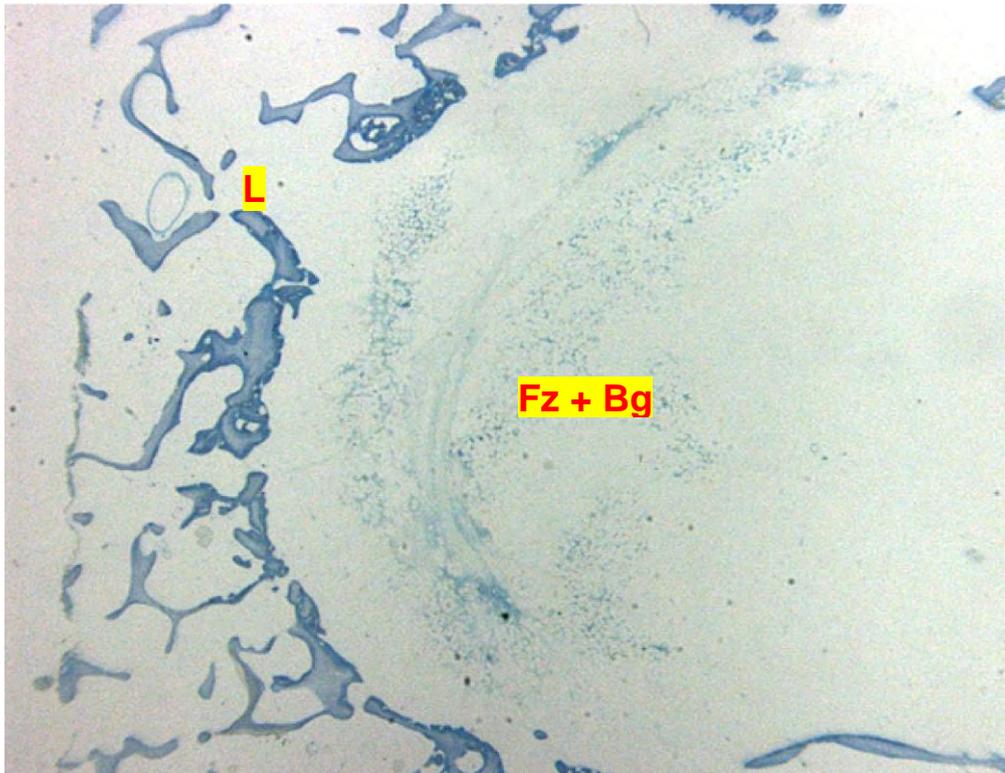


Abb. 46:

Übersicht: Leerdefekt nach 6 Wochen Standzeit. Der Defekt ist mit Bindegewebe und Fettzellen gefüllt. Eine knöcherne Durchbauung hat nicht stattgefunden. Lediglich an der Grenze zwischen Lagerknochen und Defektbereich ist es zum Anbau von etwas neuem Knochen gekommen. Man erkennt daran den sogenannten „critical size defect“.

Fz = Fettzellen

L = Lagerknochen

Bg = Bindegewebe

4.2.1.4 3-Monats-Tiere

CaP-Gruppe:

Die Knochenschliff-Übersicht in Abbildung 47 zeigt die osteokonditiv erschlossene Defektregion. Es sind teilweise schon trabekelartige Formationen erkennbar, die denen im Lagerbereich ähneln. Die schlanken Trabekel bilden ein gleichmäßig durchflochtenes Netzwerk. Die knöchern umschlossenen CaP-Granula sind noch deutlich erkennbar.

Nahezu alle CaP-Granula sind erschlossen und es ist ein kontinuierlicher Verbund zwischen Lagerknochen und neugebildetem Knochen zu sehen (Abbildung 48). Ein zwischen den einzelnen knöchernen Strukturen liegendes, intaktes Fettmark ist deutlich zu erkennen und der neue Knochen weist eine lamelläre Struktur auf (Abbildung 49).

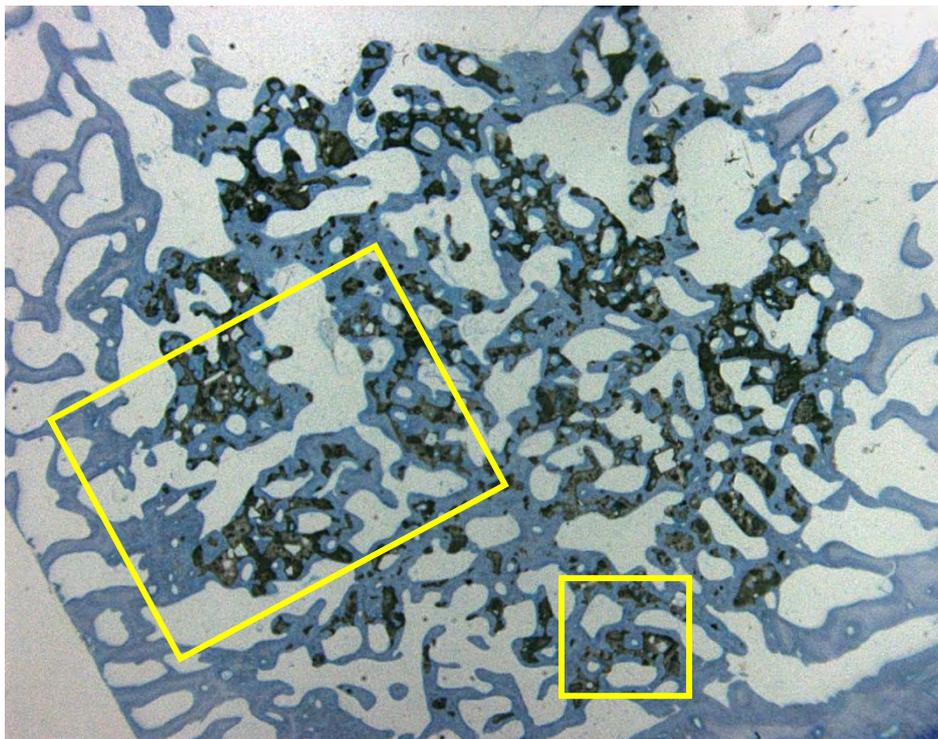


Abb. 47:

Die Übersicht zeigt die osteokonditiv erschlossene Defektregion 3 Monate post implantationem. Die Struktur der Knochenbälkchen im Defekt entspricht teilweise der Trabekelstruktur im Lagerbereich.

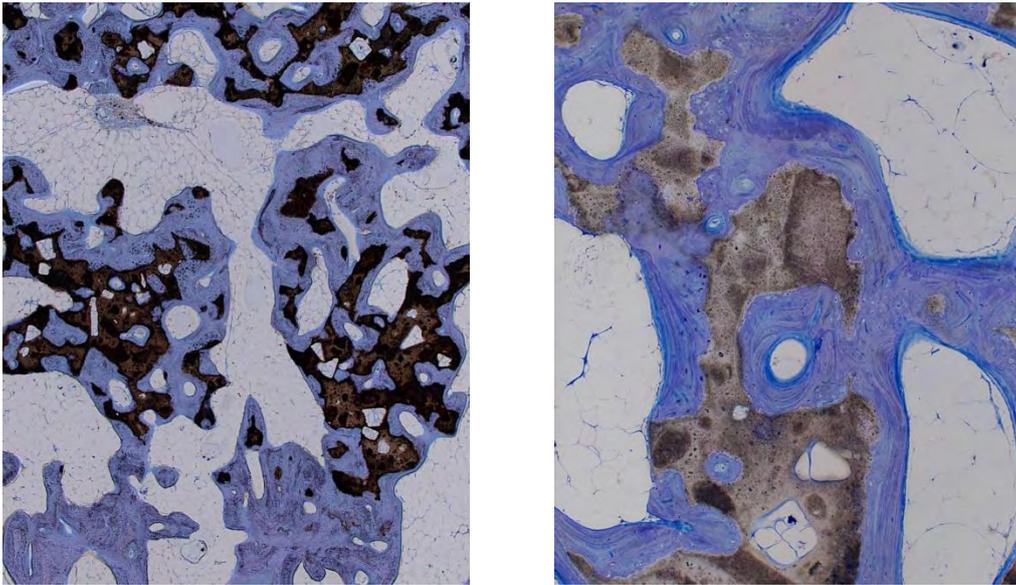


Abb. 48 (links):

Die Detailansicht aus Abbildung 47 (großer Kasten) zeigt den kontinuierlichen knöchernen Verbund zwischen Lager- und Defektknochen. Nahezu alle CaP-Granula sind knöchern umlagert und es hat sich ein durchflochtenes Netzwerk ausgebildet.

Abb. 49 (rechts):

Detailansicht aus Abbildung 47 (kleiner Kasten): Es hat sich Lamellenknochen gebildet und zwischen den Trabekeln liegt ein intaktes Fettmark.

CaP / PRP-Gruppe:

Die Übersicht in Abbildung 50 zeigt die komplette knöcherne Durchbauung des Defektbereiches. Die trabekelartigen, fast platten- bzw. schollenartigen Knochen-CaP-Formationen sind sehr breit und massiv gepackt. Die Verzweigung ist nur mäßig und das räumliche Verteilungsmuster knöcherner Strukturen ist sehr ungleichmäßig. Es hat sich im Vergleich zur CaP-Gruppe kein so stark ausgeprägtes und durchflochtenes Netzwerk ausgebildet.

Die Detailansicht (Abbildung 51) zeigt ein intaktes Fettmark und Granulationsgewebe zwischen den massiven Knochenbälkchen.

Stellenweise sind organisierte Osteone detektierbar, es hat sich Lamellenknochen ausgebildet (Abbildung 52).

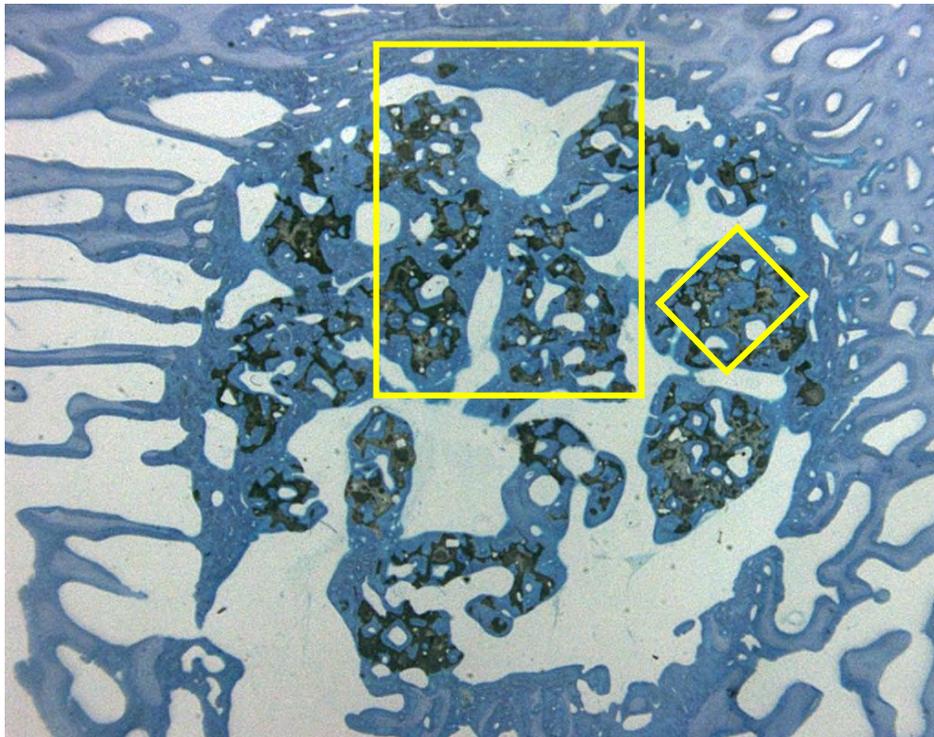


Abb. 50:

Die Übersicht zeigt die knöcherne Erschließung der Defektregion 3 Monate post implantationem. Die Knochenspannen sind schollenartig verdickt und tragen noch erkennbare CaP- Granula im Inneren.

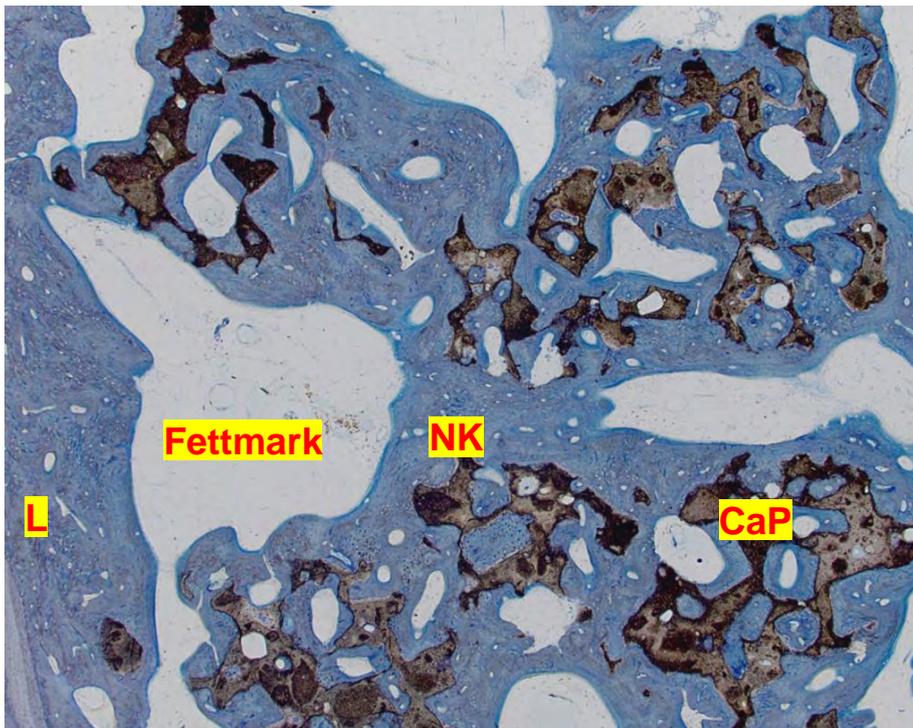


Abb. 51:

Die Detailansicht (großer Kasten in Abbildung 50) verdeutlicht die „Schollenstruktur“ der neu gebildeten **K**nochenspangen, die die CaP-Granula (CaP) umschließen. Zwischen den knöchernen Strukturen ist ein intaktes Fettmark und ein zellreiches Granulationsgewebe zu sehen.

L = Lagerknochen. NK = **N**euer **K**nochen.

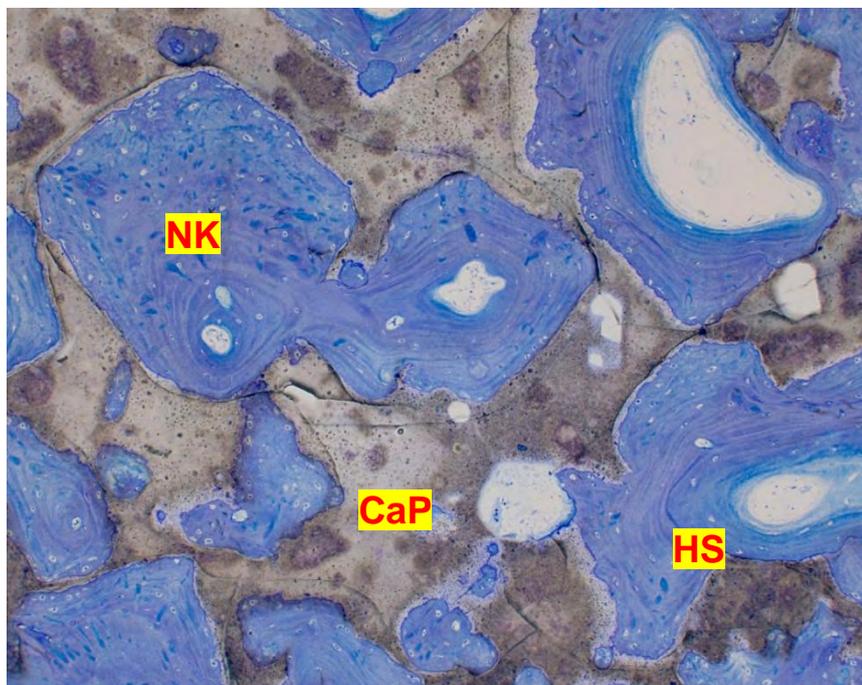


Abb. 52:

Diese Detailansicht (kleiner Kasten in Abbildung 50) zeigt die lamellenartige Struktur des Knochens und die Formierung von Osteonen (**H**aver'schen **S**ystemen = HS).

Leerdefekt:

Der Leerdefekt zeigt nach 3 Monaten einen von Fettzellen gefüllten Defekt. In den Randbereichen hat sich neuer Knochen gebildet. Der Defekt ist ansonsten nicht knöchern erschlossen und auch nicht durchbaut (Abbildung 53).

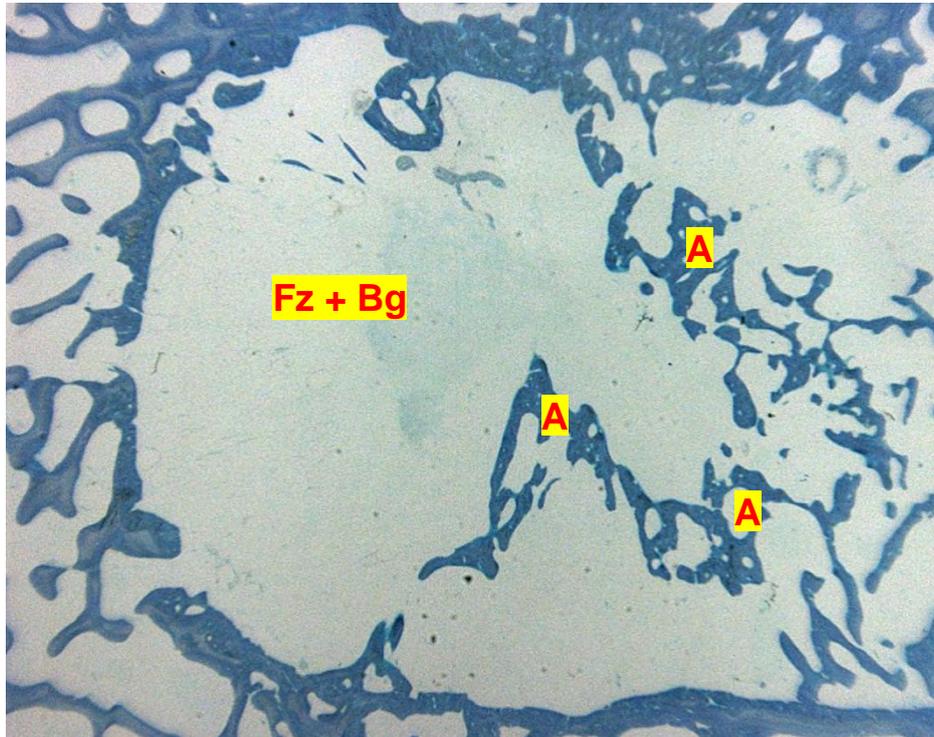


Abb. 53:

Übersicht: Leerdefekt nach 3 Monaten Standzeit. Der Defekt wurde nicht von Knochen durchbaut.

Nur die Zone direkt am Defektrand ist durch neu gebildeten Knochen verbreitert. Im Defektbereich befindet sich lediglich Fett- und Bindegewebe.

Die Knochenbälkchen im rechten Bildbereich sind beim Schleifen in den Defektbereich gerutscht. Es handelt sich somit um ein **Artefakt** (= A).

Fz = **F**ettzellen.

Bg = **B**indegewebe

4.2.1.5 6-Monats-Tiere

CaP-Gruppe:

Ein Granulationsgewebe ist nach 6 Monaten nicht mehr detektierbar. Die Räume zwischen den Knochen trabekeln sind nun ubiquitär von einem intakten Fettmark erschlossen. Die osteokonditiv umgebenden CaP-Granula sind zum Teil noch lichtmikroskopisch identifizierbar (Abbildung 54).

Es fallen Unterschiede in der knöchernen Erschließung des Defektes auf. Bei Betrachtung der differenten Defektebenen zeigt sich, dass oberflächennahe Bereiche vollständig knöchern durchbaut sind (Abbildung 54). Über mittlere Schichten (Abbildung 55) hin zu in der Tiefe gelegenen Ebenen (Abbildung 56) wird diese knöcherne Durchbauung immer spärlicher.

Hinweis: Zum besseren Verständnis der einzelnen Schichten siehe Abbildung 28 auf Seite 43.

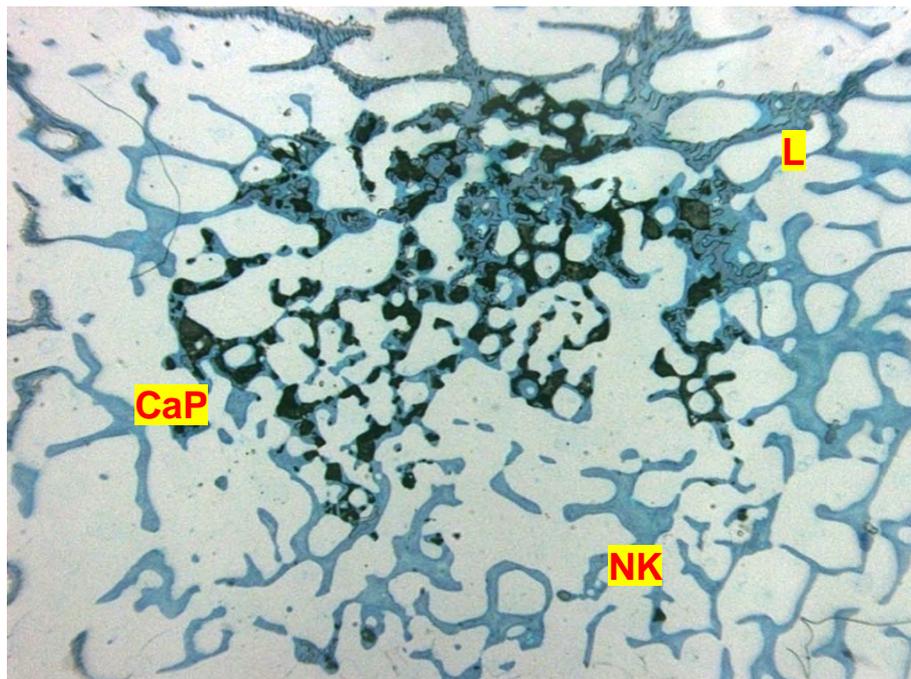


Abb. 54:

Übersicht: Die Abbildung zeigt eine oberflächennahe Schicht (Scheibe 1) nach 6 Monaten Standzeit. Der Defekt ist knöchern durchbaut, es sind CaP-Reste nachweisbar und die Trabekelarchitektur entspricht der des Lagerknochens.

NK = **N**euer **K**nochen

CaP = **C**alcium-**P**hosphat-Granula

L = **L**agerknochen

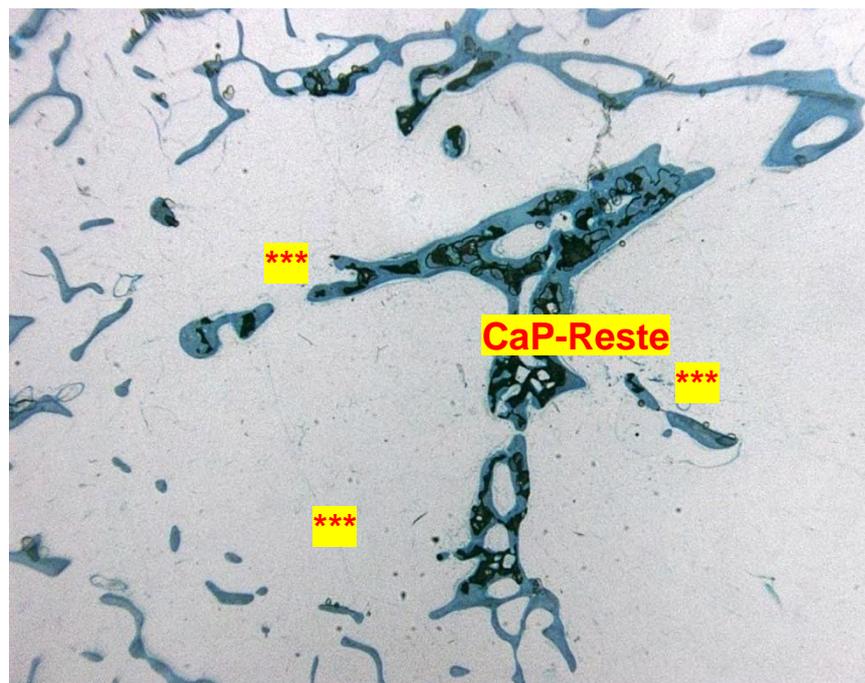
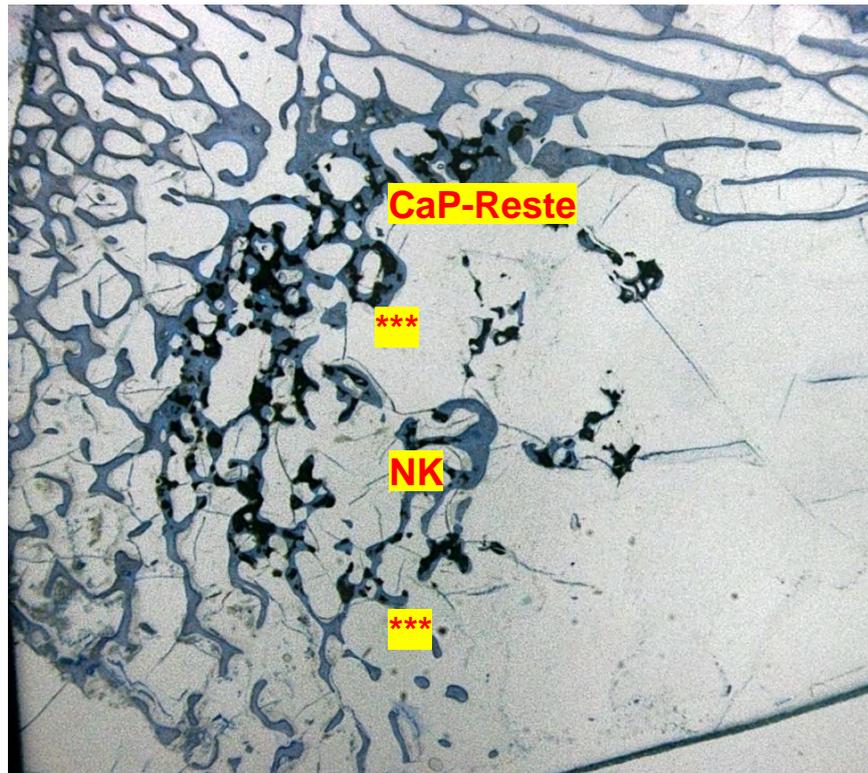


Abb. 55 (oben) und 56 (unten):

Übersicht (oben): Die Abbildung zeigt eine mittlere Schicht (Scheibe 3). Der Defekt ist weniger knöchern durchbaut und konsolidiert (***) .

Übersicht (unten): Es ist eine in der Tiefe des Defekts gelegene Schicht (Scheibe 6) abgebildet. Der osteokonduktive Durchbau der Defektregion ist weniger fortgeschritten als in den beiden vorherigen, aus mittleren und oberflächlichen Ebenen stammenden Schichten.

NK = **N**euer **K**nochen. CaP = **C**alcium-**P**hospat-Granula.

CaP / PRP-Gruppe:

Bei der lichtmikroskopischen Betrachtung erscheint die Defektregion von einem Netzwerk neu gebildeter Knochenbälkchen durchbaut zu sein (Abbildung 57). Es sind zu jeder Zeit und in jeder Defektebene Reste von CaP-Granula nachweisbar.

Die räumliche Erschließung des Defektes weist ähnliche Gegebenheiten wie in der CaP-Gruppe auf (Abbildung 57, 58 und 59).

Die in der CaP / PRP-Gruppe nach 3 Monaten zu sehenden dicken und massiven Trabekel (vergleiche Abbildung 50) sind jedoch nach 6 Monaten im Rahmen des physiologischen ‚Remodelings‘ wieder schmaler geworden und ähneln den Trabekeln im Lagerbereich (Abbildung 58).

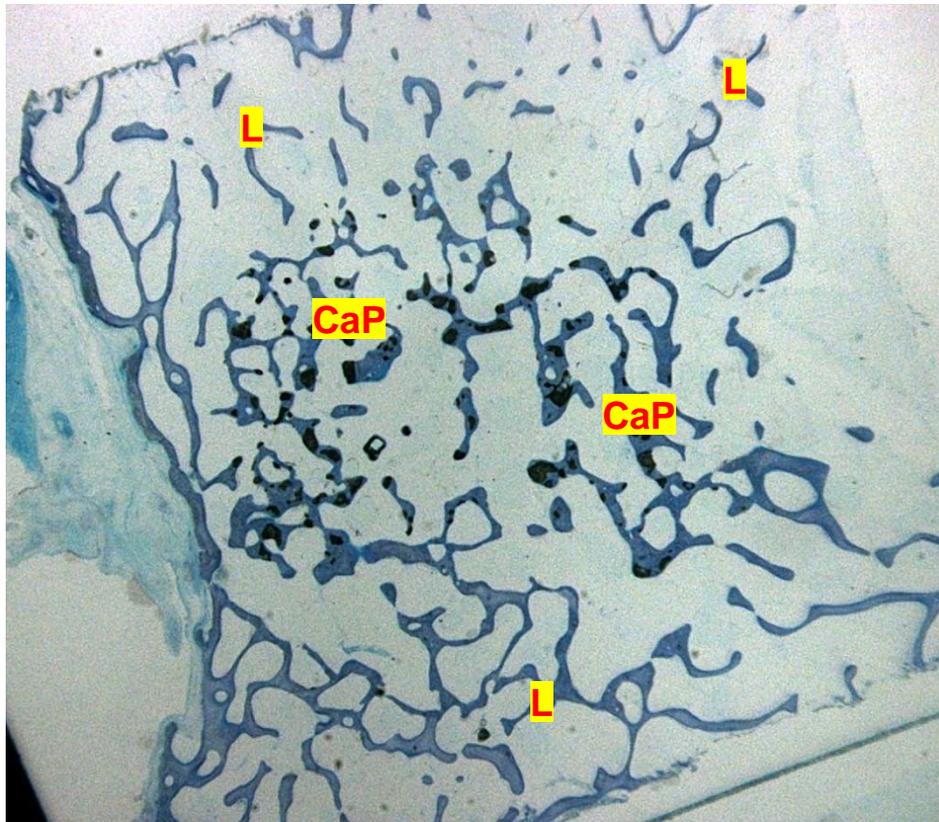


Abb. 57:

Übersicht 6 Monate post implantationem: Die Defektregion ist knöchern durchbaut, die räumliche Verteilung des neu gebildeten Knochens und der CaP-Bestandteile nachweisbar. Es ist eine oberflächlich gelegene Schicht dargestellt (Scheibe 1).

CaP = Calcium-Phosphat-Granula

L = Lagerknochen

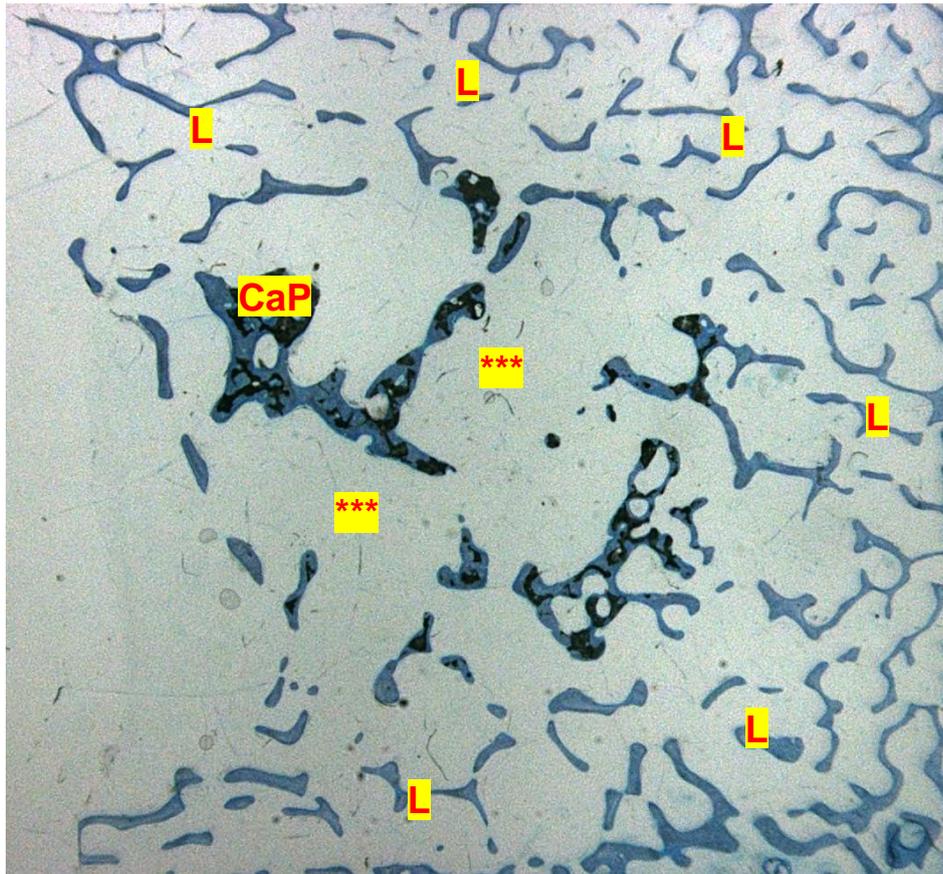


Abb. 58:

Übersicht: Die Defektregion ist knöchern durchbaut, die räumliche Verteilung des neu gebildeten Knochens und der CaP-Bestandteile nachweisbar. Es ist eine mittig gelegene Defektebene (Scheibe 3) dargestellt.

CaP = Calcium-Phosphat-Granula

L = Lagerknochen

*** = kein knöcherner Durchbau

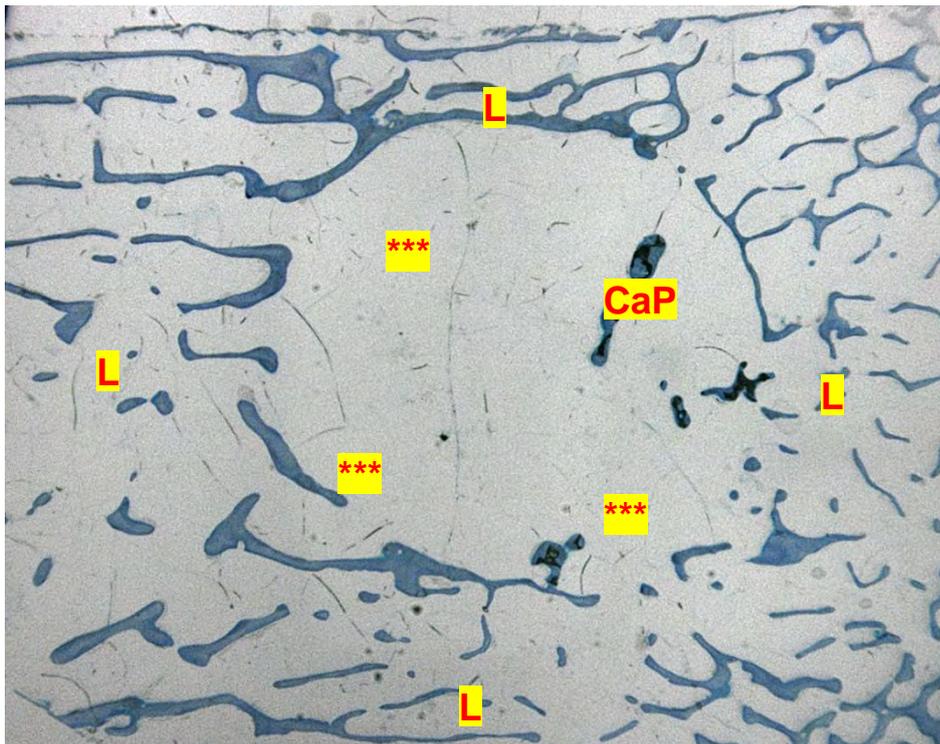


Abb. 59:

Übersicht: Eine aus der Tiefe des Defekts stammende Ebene (Scheibe 6) ist dargestellt. Die knöcherne Integration des Defekts ist ausgeblieben (***) und die CaP-Granula fast vollständig abgebaut (vergleiche Abbildung 54 und 55).

CaP = Calcium-Phosphat-Granula

L = Lagerknochen

*** = kein knöcherner Durchbau

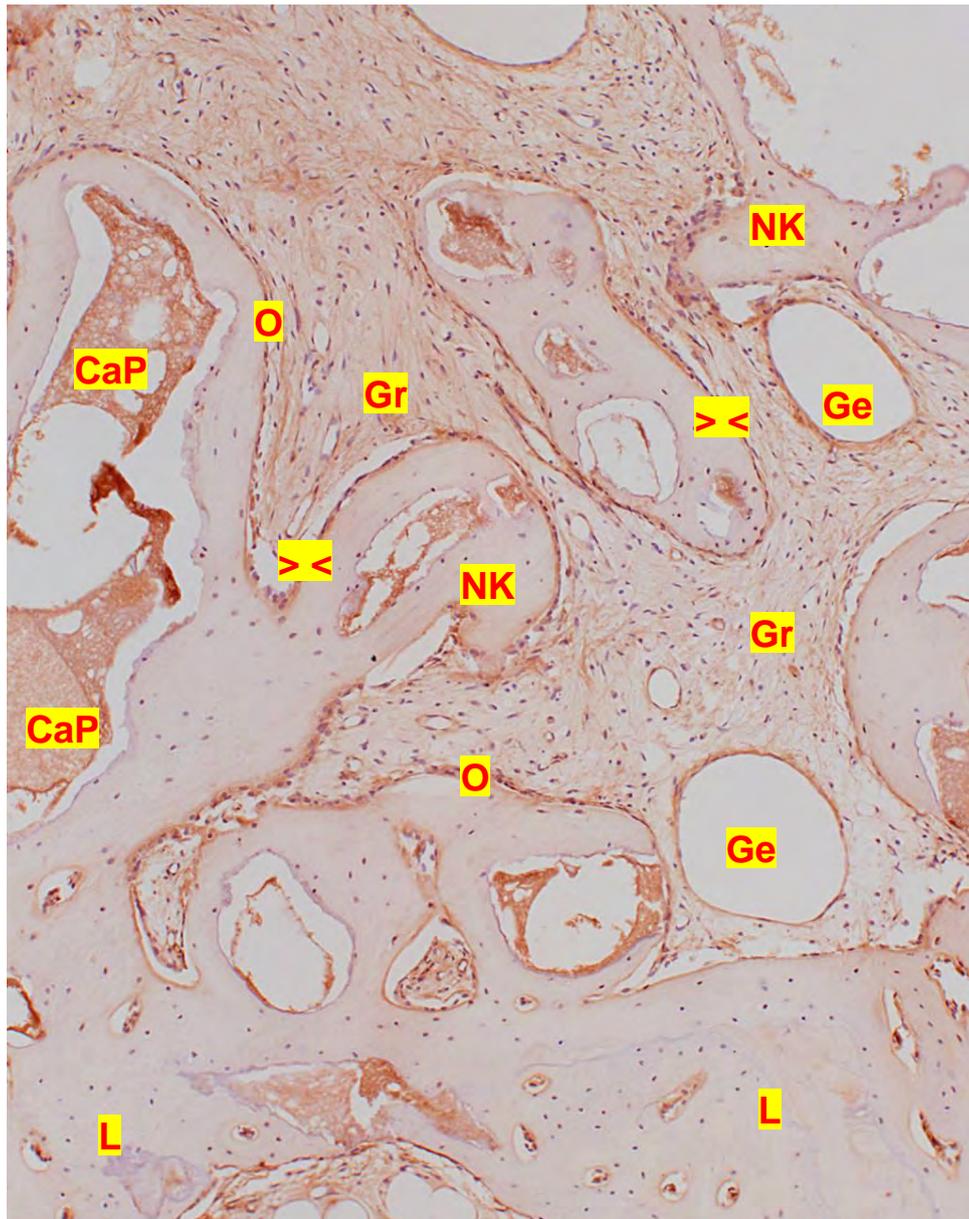


Abb. 61:

Diese Detailansicht aus dem Defektbereich ist mit einem Antikörper gegen Osteocalcin angefärbt. Osteocalcin ist ein Protein, das im menschlichen Organismus nur im Knochen und dort speziell in den dieses Protein bildenden Osteoblasten zu finden ist.

In der Abbildung sind die Osteoblasten aufgrund der Antigen-Antikörper-Reaktion braun angefärbt. Sie liegen dem neu gebildeten Knochen perlchnurartig auf. Zwischen den neu gebildeten Knochenbälkchen sind Granulationsgewebe und CaP-Partikel nachweisbar.

Die Verteilung des extrazellulären Matrixproteins Osteocalcin ist auch im Granulationsgewebe zu sehen.

CaP = **C**alcium-**P**hosphat-Granula. L = **L**agerknochen. NK = **N**euer **K**nochen.

O = **O**steoblasten. Gr = **G**ranulationsgewebe. > < = **O**steoidsaum. Ge = **G**efäß.

CaP / PRP-Gruppe (6-Wochen-Tiere):

Nach 6 Wochen Standzeit ist zwischen der Untersuchungsgruppe (CaP / PRP-Gruppe) und der Kontrollgruppe (CaP-Gruppe) im Bezug auf den neu gewachsenen Knochen im Defektbereich kein klarer Unterschied nachzuweisen (siehe Abschnitt 4.2.1.3).

Abbildung 62 zeigt einen mit Kollagen-Typ-I gegengefärbten Knochenausschnitt aus dem Defektbereich. Die das Kollagen vom Typ I exprimierenden Osteoblasten sind braun angefärbt und liegen perlschnurartig um den neu gebildeten Knochen. Zwischen den Knochenbälkchen ist ein zellreiches Granulationsgewebe wie auch Fettgewebe und CaP-Partikelanteile zu erkennen.

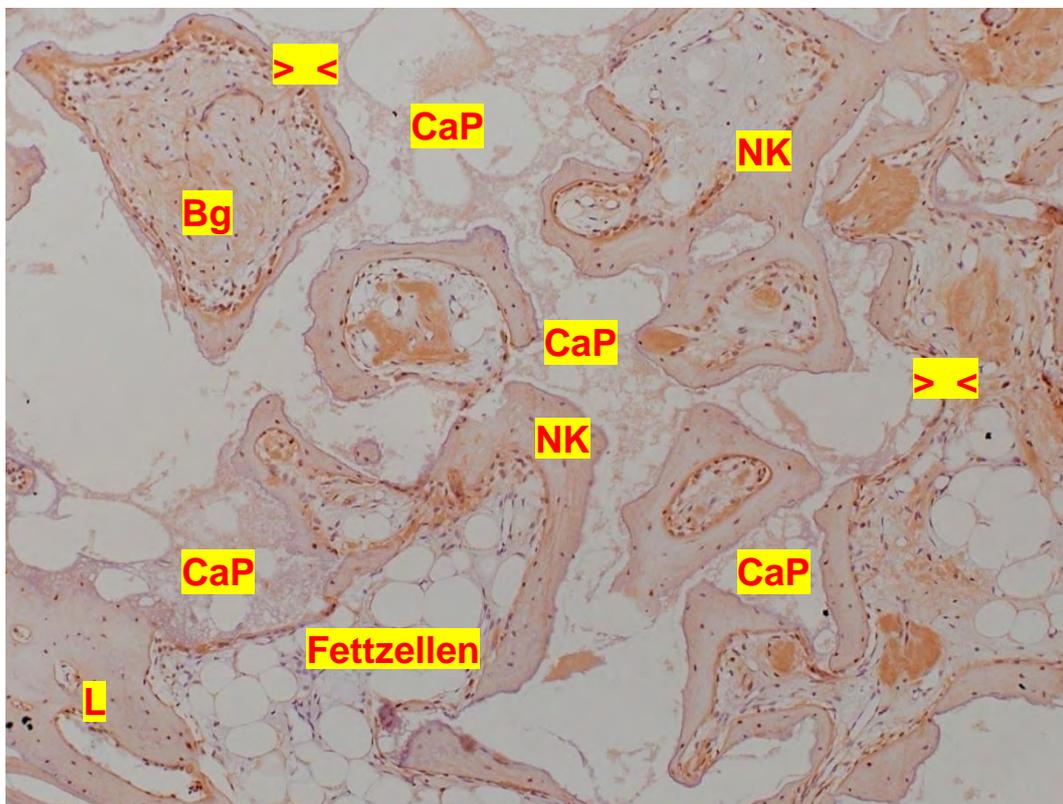


Abb. 62:

Detailansicht aus dem Defektbereich: Nach Applikation eines gegen Kollagen-Typ-I gerichteten Antikörpers werden die perlschnurartig dem neuen Knochen anliegenden Osteoblasten deutlicher sichtbar. Fettzellen, CaP-Reste und Bindegewebe sind zwischen den neu gebildeten Knochenbälkchen zu sehen.

Die räumliche Koinzidenz von Kollagen I und Osteoidsäumen ist deutlich zu erkennen.

CaP = Calcium-Phosphat-Granula. L = Lagerknochen. NK = Neuer Knochen.

Gr = Granulationsgewebe. > < = Osteoidsaum. Bg = Bindegewebe.

Leerdefekt (6-Wochen-Tiere):

Der Leerdefekt, also in situ belassene Defekt, zeigt nach 6 Wochen keine knöcherne Durchbauung (siehe Abschnitt 4.2.1.3).

In Abbildung 63 ist eine Detailansicht aus dem lagernahen Bereich dargestellt. Die Applikation des gegen das von den Osteoblasten gebildete Kollagen Typ I färbt lediglich im Lagerbereich liegende Osteoblasten an (braun). Im Defektbereich sind keine Osteoblasten und somit auch kein Kollagen Typ I nachweisbar. Hier findet keine de-novo-Osteogenese statt.

Im Defektareal ist nur ein ausgeprägtes Netzwerk aus Fettzellen mit vereinzelt bindegewebigen Anteilen zu sehen.

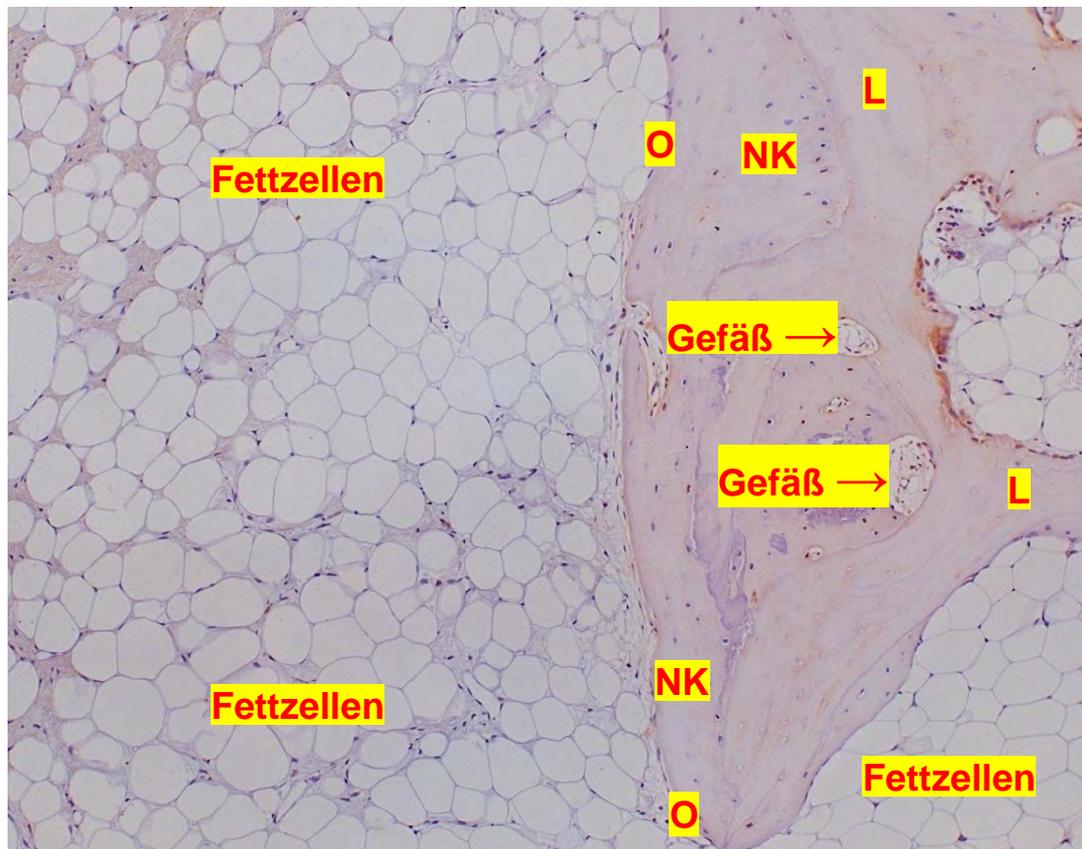


Abb. 63:

Detailansicht aus dem lagernahen Bereich:

Nach der Applikation von „Anti-Kollagen-Typ-I“ färben sich lediglich Osteoblasten im Lagerbereich braun an. Zur Defektmittle hin findet keine Osteogenese statt, es sind keine Osteoblasten vor Ort und die typische Braunfärbung bleibt aus.

Fettzellen und Granulationsgewebe sind im Defektbereich eindeutig differenzierbar.

L = Lagerknochen. NK = Neuer Knochen. O = Osteoblasten.

4.2.3 Semidünnschnitte

Die Semidünnschnitte der 6-Wochen-Tiere sollen die den Knochen aufbauenden zellulären Gegebenheiten verdeutlichen. Die Schnitte sind 0,5 bis 1 µm dick und können bei starker Vergrößerung zelluläre Details genauer beleuchten.

CaP-Gruppe (6-Wochen-Tiere):

Die Abbildungen 64 und 65 zeigen zelluläre Details der Osteoblasten.

Diese Zellen liegen als syntheseaktive Knochenbelegzellen perlschnurartig entlang der neu gebildeten Knochenbälkchen. Das von ihnen abgegebene Osteoid stellt sich als die knochenbauenden Zellen umgebender, hellblauer Saum dar. Der neu gebildete, schon mineralisierte Knochen erscheint dunkelblau.

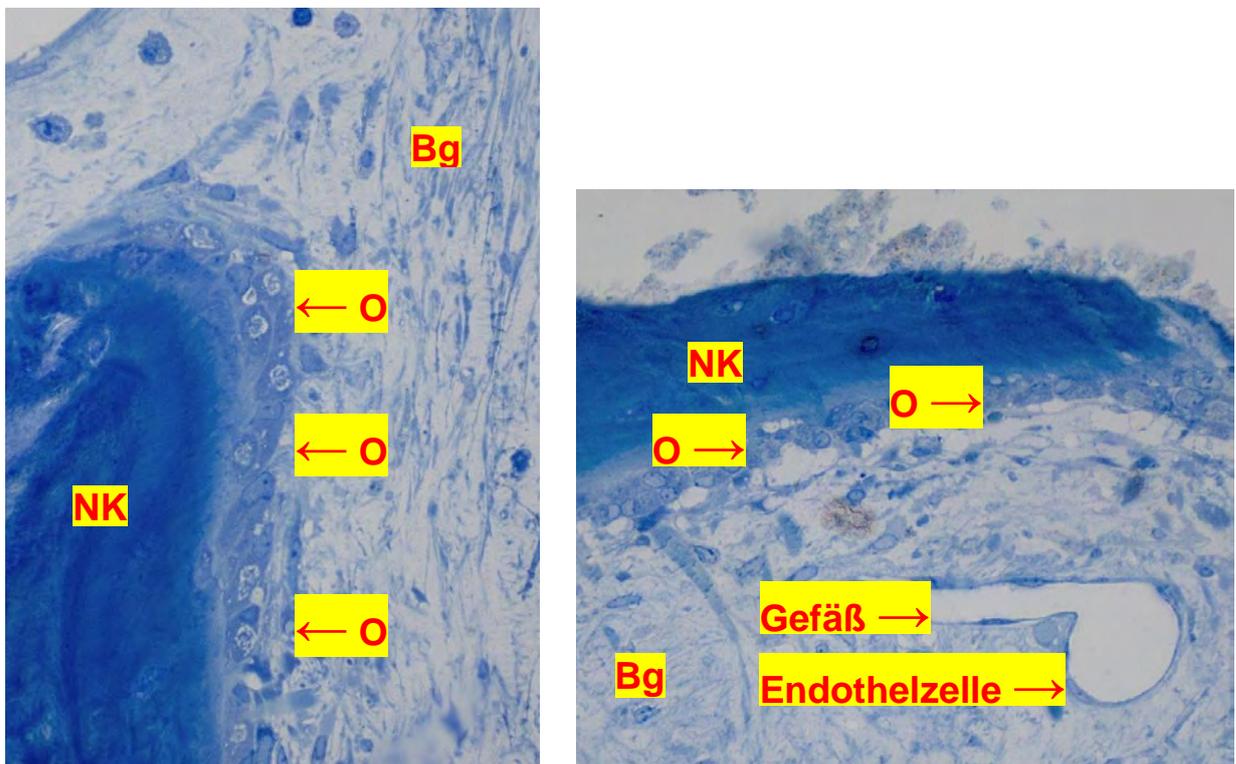


Abb. 64 (links) und Abb. 65 (rechts):

Detailaufnahmen: Die beiden Semidünnschnitte stellen Oberflächendetails von neu gebildeten Knochenbälkchen aus dem Defektbereich dar. Die Osteoblasten liegen als syntheseaktive, den Knochen bildende Zellen an der Oberfläche der neu entstandenen Trabekel. Die Zellen sind perlschnurartig hintereinander gelegen.

NK = **N**eu**e**r **K**no**ch**en. O = **O**steoblasten. Bg = **B**indegewebe.

CaP / PRP-Gruppe (6-Wochen-Tiere):

Die Applikation von PRP führt zwischen der Untersuchungs- und Kontrollgruppe zu keinen Unterschieden, die durch die genauere Betrachtung der Knochenoberflächen in Form von Semidünnschnitten eventuell nachweisbar wären.

Die Abbildung 66 spiegelt das gleiche zelluläre Geschehen wider, das auch Abbildung 64 und 65 zeigen.

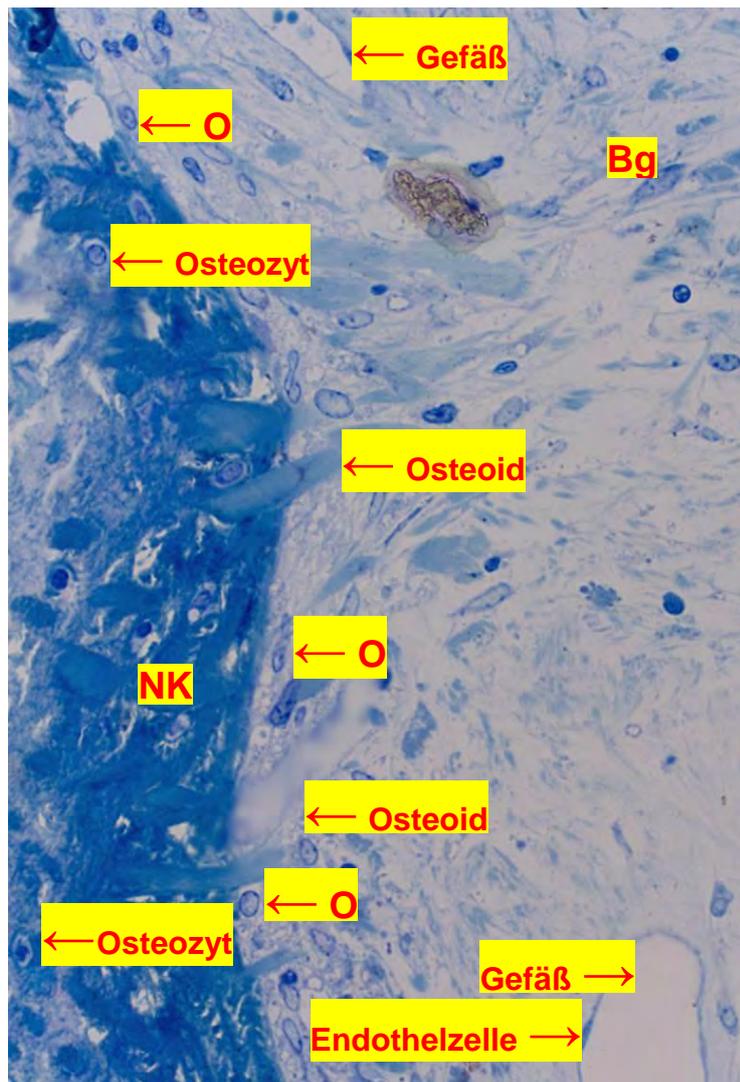


Abb. 66:

Die Detailaufnahme zeigt an der Oberfläche des neu gebildeten Knochens sitzende Osteoblasten, die Osteoid (hellblau) sezernieren. Der neue, schon mineralisierte Knochen ist dunkelblau angefärbt.

NK = **N**euer **K**nochen. O = **O**steoblasten. Bg = **B**indegewebe.

4.3 Histomorphometrische Befunde

Um den neu gebildeten Knochen nach Erfüllung der verschiedenen Standzeiten auch quantitativ beurteilen zu können, wurde die Computersoftware „Image-Pro® Plus“ (Media Cybernetics Inc., Silver Spring, USA) zur Hilfe genommen.

Die Knochenschliffe (Toluidinblau) wurden mittels dieser speziellen Software und unter Verwendung eines an einen Computer (Betriebssystem: Microsoft® WINDOWS 2000) angeschlossenen Lichtmikroskops (Zeiss Stemi SV 11, Carl Zeiss Jena GmbH) vermessen und der prozentuale Anteil neuen Knochens im Defektbereich bestimmt → Histo-morpho-metrie.

Vorgehensweise:

1. Einscannen des entsprechenden Knochenschliffes.
→ siehe Abbildung 67.
2. Erstellen und Anpassen des interessierenden Bereiches, in diesem Fall des Defektbereiches (AOI = **A**rea **O**f **I**nterest).
→ siehe Abbildung 68.
3. Markierung des Knochens (blau angefärbt) im gesamten Bildausschnitt mit einer Gegenfarbe, in diesem Fall rot.
→ siehe Abbildung 69.
4. Verrechnung mittels Computer und Erstellen eines rekonstruierten Bildes → rote Gegenfarbe (= Knochen) auf weißem Hintergrund (= „Rest“ im Defekt: CaP-Partikel, Bindegewebe, Blutgefäße, Fettmark, etc.) und wieder anlegen des AOIs.
→ siehe Abbildung 70.

Innerhalb des AOI wird der rote Anteil an der Gesamtfläche des AOI bestimmt. Dieser in Prozent angegebene Wert entspricht dem im Defektbereich neu gebildeten Knochen. Der weiße Flächenanteil vertritt alle weiteren im Defekt befindlichen Strukturen wie CaP-Partikel, Bindegewebe, Blutgefäße, Fettmark, etc.

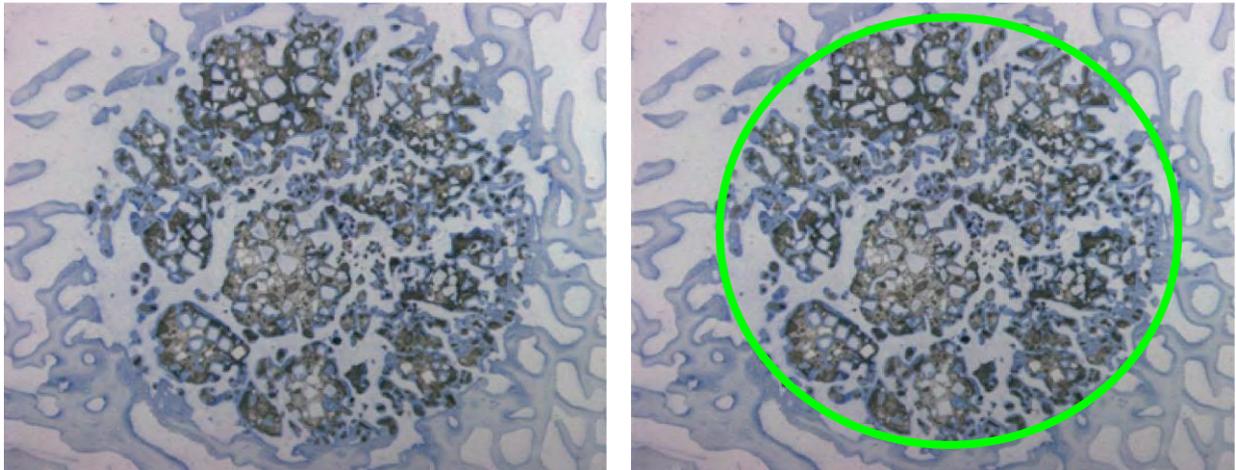


Abb. 67 (links):

Eingescannter Knochenschliff (nativ).

Abb. 68 (rechts):

Anpassen des zu messenden Bereichs, der dem Defektbereich entspricht = **Area Of Interest (AOI)**.

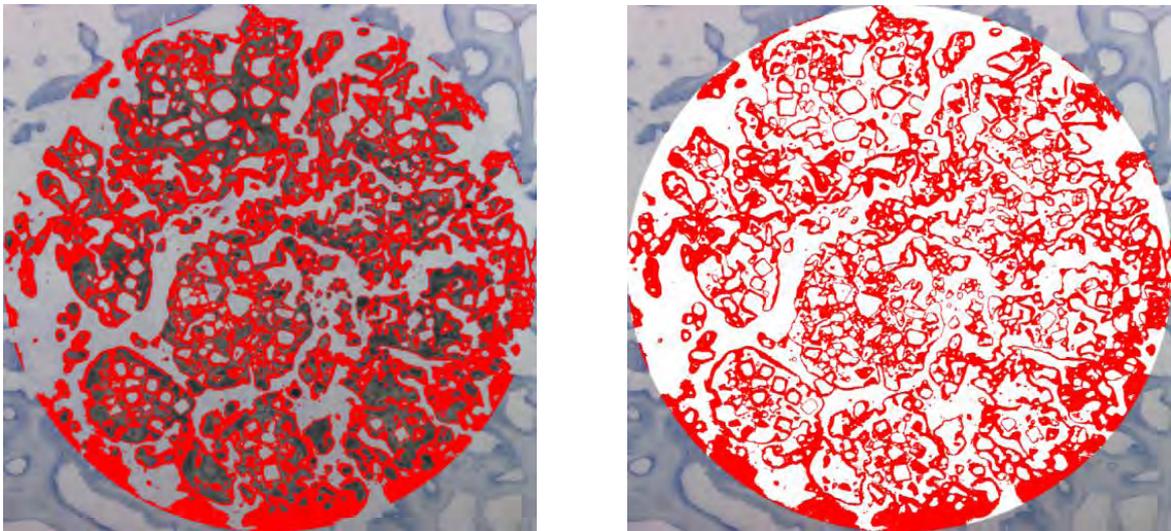


Abb. 69 (links):

Markierung des neu gebildeten Knochens (blau) mit einer Gegenfarbe (rot).

Abb. 70 (rechts):

Rekonstruiertes Bild: Rote Farbe (= Knochen) auf weißem Hintergrund (= „Rest“ im Defektbereich wie z. B. CaP-Partikel, Bindegewebe, Fettmark, etc.).

Zur statistischen Auswertung der Ergebnisse wurde eine zweifaktorielle Varianzanalyse durchgeführt, da diese für die Art der Untersuchung am besten geeignet erscheint (BOEDECKER, 2005).

Als Signifikanzniveau wurde ein Wert von $p \leq 0,005$ festgelegt. Verwendung fand das Statistikprogramm SAS® V8 (Cary, North Carolina, USA).

Für die Knochenschicht K1 konnte leider keine statistisch gesicherte Analyse durchgeführt werden, da der in dieser oberflächlichen Schicht neu gebildete Knochen schon nach kurzer Zeit schwer bzw. gar nicht vom Deckel zu unterscheiden ist, da dieser aus autologer Spongiosa besteht. Aufgrund dessen könnte eine Analyse somit zu falsch positiven Ergebnissen bezogen auf die quantitative Erfassung des neu gebildeten Knochens führen.

Die „Behandlung“ Leerdefekt kann ebenfalls nicht in die statistische Analyse einbezogen werden, da nicht ausreichend Individuen des Gesamtkollektivs in dieser zweiten Kontrollgruppe vertreten sind.

Eine Legende zu den einzelnen Parametern ist in Form von Tabelle 11 wiedergegeben.

Standzeit (S)	Knochenschicht (K)	Behandlung (B)
1 = 5 Tage	1 = superfizial	1 = CaP
2 = 10 Tage	2 = mittig	2 = CaP + PRP
3 = 6 Wochen	3 = profund	3 = Leerdefekt
4 = 3 Monate		
5 = 6 Monate		

Tabelle 11: Legende für die einzelnen Parameter: Standzeit, Knochenschicht und Behandlung.

Verteilung der Knochenschicht K 2 getrennt nach Standzeit (S) und Behandlung (B):

S	B	n	Missings	Minimum	1.Quartil	Median	3.Quartil	Maximum	Mittelwert	Standard- abweichung (STD)
1	1	2	0	9,47	9,47	9,77	10,07	10,07	9,77	0,42
1	2	2	0	10,30	10,30	12,27	14,24	14,24	12,27	2,79
2	1	2	0	7,10	7,10	9,23	11,35	11,35	9,23	3,01
2	2	2	0	15,52	15,52	16,96	18,40	18,40	16,96	2,04
3	1	3	0	11,82	11,82	14,50	18,01	18,01	14,78	3,10
3	2	6	0	11,48	13,45	17,65	22,20	24,45	17,81	4,96
4	1	3	0	27,46	27,46	32,95	34,57	34,57	31,66	3,73
4	2	6	0	31,77	36,67	38,72	41,67	48,58	39,36	5,67
5	1	3	0	11,12	11,12	17,12	17,80	17,80	15,35	3,68
5	2	3	0	12,05	12,05	16,30	39,71	39,71	22,69	14,90

Tabelle 12: Verteilung des Knochens in K 2 in Prozent (%).

Verteilung der Knochenschicht K 3 getrennt nach Standzeit (S) und Behandlung (B):

S	B	n	Missings	Minimum	1.Quartil	Median	3.Quartil	Maximum	Mittelwert	Standard- abweichung (STD)
1	1	2	0	9,18	9,18	9,71	10,23	10,23	9,71	0,74
1	2	2	0	13,85	13,85	14,92	15,99	15,99	14,92	1,51
2	1	2	0	8,31	8,31	8,77	9,23	9,23	8,77	0,65
2	2	2	0	7,60	7,60	11,59	15,58	15,58	11,59	5,64
3	1	2	0	12,70	12,70	14,50	16,29	16,29	14,50	2,54
3	2	6	0	10,82	12,76	16,50	23,89	24,78	17,54	5,72
4	1	3	0	15,75	15,75	28,28	31,44	31,44	25,16	8,30
4	2	5	1	20,38	25,10	38,82	43,81	46,73	34,97	11,64
5	1	3	0	11,57	11,57	22,05	22,05	22,05	18,56	6,05
5	2	3	0	9,48	9,48	22,59	25,57	25,57	19,21	8,56

Tabelle 13: Verteilung des Knochens in K 3 in Prozent (%).

Ergebnisse der zweifaktoriellen Varianzanalyse

Knochenschicht K2 unter Berücksichtigung der Standzeit:

Standzeit	K 2 mean square	95-%-Konfidenz-Intervall	
1	11,020000	4,677987	17,362013
2	13,092500	6,750487	19,434513
3	16,295000	11,810520	20,779480
4	35,507500	31,023020	39,991980
5	19,016667	13,838435	24,194899

Tabelle 14: Statistische Auswertung der Knochenschicht K 2 bezogen auf die unterschiedlichen Standzeiten. Das Ergebnis ist signifikant: $p \leq 0,001$.

Einfluss der Behandlung auf den neu gebildeten Knochen in der Knochenschicht K2:

Behandlung	K 2 mean square	95-%-Konfidenz-Intervall	
1	16,155667	12,568082	19,743251
2	21,817000	18,541999	25,092001

Tabelle 15: Ein Einfluss der Behandlung kann der Tabelle entnommen werden. Eine Wechselwirkung, d.h. der Einfluss der Behandlung (1 bzw. 2) ist zu den verschiedenen Standzeiten unterschiedlich, kann nicht beobachtet werden. Keine Signifikanz: $p \leq 0,0244$.

Eine Wechselwirkung, das heißt der Einfluss der Standzeit ist in den beiden Behandlungen unterschiedlich, kann nicht beobachtet werden.

Es besteht keine Signifikanz: $p(B * S) \leq 0,8934$.

Knochenschicht K 3 unter Berücksichtigung der Standzeit:

Standzeit	K 3 mean square	95-%-Konfidenzintervall	
1	12,312500	4,562727	20,062273
2	10,180000	2,430227	17,929773
3	16,018333	9,690670	22,345996
4	30,062333	24,402700	35,721967
5	18,885000	12,557337	25,212663

Tabelle 16: Ein Einfluss der Standzeit kann der Tabelle entnommen werden.
Das Ergebnis ist signifikant: $p \leq 0,0015$.

Es kann jedoch in der Schicht K 3 kein Einfluss der Behandlung auf die Osteogenese festgestellt werden.

Es besteht keine Signifikanz: $p \leq 0,1558$.

Eine Wechselwirkung, das heißt der Einfluss der Behandlung ist in den beiden Standzeiten unterschiedlich, kann auch hier nicht beobachtet werden.

$p(B * S) \leq 0,8282$.

5. DISKUSSION

Übertragbarkeit der im Tierversuch gewonnenen Daten auf den Menschen

Um neue, zuverlässige, hilfreiche und gesicherte Erkenntnisse in der medizinischen Forschung zu gewinnen, muss häufig auf das Tier als Versuchsobjekt zurückgegriffen werden (SCHWEIBERER und EITEL, 1977).

Um eine Übertragbarkeit der gewonnenen Erkenntnisse auf den Menschen zu gewährleisten, wird ein standardisiertes Defektmodell gefordert (DRAENERT und DRAENERT, 1987). Die vorliegende Studie erfüllt durch das verwendete standardisierte Bohrlochmodell an der Tibia des Schafes diese geforderten Bedingungen und führt zu einem ausreichend großen, standardisierten, reproduzierbaren und stabilen Defekt im ersatzstarken Knochenlager (SCHNETTLER et al., 1998). Eine stabilisierende Osteosynthese würde die Blutversorgung des Knochens verschlechtern und am Knochen, somit auch im Implantationsgebiet, zu unterschiedlichen Ausgangsbedingungen führen, was nicht zur Standardisierung des Modells beitragen würde. Die Primärstabilität des geschaffenen, zylindrischen Defekts gilt jedoch als gegeben, da dieser an allen Seiten von intakten Knochen trabekeln umgeben ist und somit im ersatzstarken Lager liegt.

Die Kompressionsfestigkeit der CaP-Granula wurde im Rahmen dieser Studie nicht untersucht, beträgt jedoch laut Herstellerangaben 4 – 7 Mega-Pascal und ist durch die hohe Porosität des Materials bedingt (Biomet Merck).

Alle Operationen wurden zur Fehlerminimierung von ein und demselben Operateur durchgeführt, alle Defekte mit dem Diamond-Bone-Cutting-System[®] sorgfältig gebohrt und der Defekt immer an der ventromedialen linken Tibia und in gleicher Position und Größe geschaffen (Durchmesser: 12 mm, Tiefe: 30 mm).

Diese Defektgröße entspricht einem so genannten ‚critical-size-defect‘. Man spricht von einem solchen kritischen Defekt, wenn der Organismus die geschaffene Knochenlücke nicht spontan überbrücken und konsolidieren kann (SCHMITZ und HOLLINGER, 1986; GOSAIN et al., 2000). Ein ebenfalls im Tibiakopf des Schafes geschaffener Defekt von 12 mm Durchmesser zeigte nach 60 Tagen keine spontane Durchbauung (SCHNETTLER et al., 2000).

In der vorliegenden Arbeit war keiner der drei untersuchten Leerdefekte (5 Tage, 6 Wochen und 3 Monate post operationem) knöchern durchbaut, sondern lediglich mit Bindegewebe und Fettzellen gefüllt. Nach drei Monaten zeigte sich eine schmale Zone neuen Knochens, der dem Lagerknochen aufsitzt, jedoch keine Defektüberbrückung. Da in der 6- Monatsgruppe kein Leerdefekt gebohrt wurde, kann zur Konsolidierung zu diesem späten Zeitpunkt keine Aussage getroffen werden. Mit einer knöchernen Defekterschließung ist jedoch auch zu diesem späten Zeitpunkt nicht mehr zu rechnen.

Laut MANDELKOW et al. (1990) ist das Schaf aufgrund seiner Größe und Knochenstruktur besonders gut für die Erprobung von artifiziellen Knochenersatzmaterialien geeignet. Die Struktur des Schafsknochens ist der des menschlichen Knochens entsprechend und auch der Knochenstoffwechsel läuft ungefähr mit gleicher Geschwindigkeit ab (REHMAN et al. 1995).

In der Literatur finden sich oft Nagetiere als verwendete Versuchsobjekte zur Erprobung von Knochenersatzmaterialien, deren Einwachsverhalten und Biodegradierbarkeit. Nager weisen jedoch einen beschleunigten Knochenstoffwechsel auf (FROST 1966; THIELEMANN und ETTER 1989). Aus diesem Grund ist die Übertragung von an Nagerknochen gewonnenen Ergebnissen auf den Menschen nicht sinnvoll und entspricht auch nicht den geforderten Ansprüchen und Voraussetzungen (SCHWEIBERER und EITEL, 1977).

Die anatomischen Verhältnisse, die Tragachse und die Beanspruchung der ovinen Tibia sind mit den beim Menschen vorliegenden Gegebenheiten vergleichbar (WISSING et al., 1990).

Geforderte Ansprüche an das verwendete Knochenersatzmaterial

Ein für den klinischen Einsatz gebräuchliches Knochenersatzmaterial sollte den folgenden Anforderungen entsprechen:

Osteokonduktive, osteoinduktive / -stimulative und osteointegrative Gegebenheiten sollten erfüllt sein (ALBREKTSSON und JOHANNSEN, 2001).

Außerdem sollte das verwendete Material histokompatibel, lokal und systemisch verträglich, den gesamten Defekt deckend, resorbierbar und mechanisch stabil sein (SCHNETTLER und DINGELDEIN, 2002).

Die in dieser Studie verwendeten Calciumphosphat-Granula sind biokompatibel, bestehen aus mikrokristallinem, karbonisierten, calciumdefizientem Hydroxylapatit und ihre chemische Zusammensetzung entspricht im Wesentlichen der Calcium- und Phosphatkomponente des menschlichen Knochens.

Neben dieser Gegebenheit ist das Granulat frei von biologischen Materialien, Konservierungsmitteln oder anderen Wirkstoffen und ist somit lokal als auch systemisch verträglich.

Da es sich um Granulat handelt können verschiedenartigste Defektformen und -größen vollständig aufgefüllt werden. Falls dabei die mechanische Stabilität durch die gegebene Defektform gefährdet ist und die Primärstabilität des Granulats diese nicht ausreichend gewährleisten kann (Kompressionsfähigkeit bis zu 7 Mega-Pascal), muss auf eine begleitende Osteosynthese zurückgegriffen werden.

Das Ersatzmaterial ist aufgrund der Granulatgröße (2 bis 4 mm) und seiner porösen Beschaffenheit (Mikroporen von kleiner 10 µm und Makroporen von 100 bis 150 µm) besonders osteokonduktiv und dient als Leitschiene für den einsprossenden, neu gebildeten Knochen. Da das Material fest am Defektrand anliegt und somit eine Brücke zwischen Lagerknochen und Defektzone darstellt, ist auch das Kriterium der Osteointegration gegeben.

Das Material wird artifiziell hergestellt und steht in unbegrenztem Ausmaße zur Verfügung, was einen eindeutigen Vorteil gegenüber autologem Knochen zur Defektfüllung darstellt.

Viel versprechende Ergebnisse liefern Studien, in denen verschiedene calciumphosphat-basierte Ersatzmaterialien inklusive der in dieser Studie verwendeten Calcibon[®] Granules untersucht wurden (SCHNETTLER et al., 2004; LINHART et al., 2004; OOMS et al., 2003; DRIESSENS et al., 2000).

Osteostimulative bzw. –induktive Eigenschaften sollen durch die Kombination mit dem autologen Thrombozytenkonzentrat (PRP) geschaffen werden, da ein auf Calciumphosphat basierendes Material diese Eigenschaft nicht bietet.

GOSAIN et al. (2000) implantierten derartige Implantate in Muskelgewebe von Schafen und konnten keine osteoinduktion Effekte nachweisen, eine Knochenneubildung blieb aus.

Platelet-Rich-Plasma – Wie wirkt das Thrombozytenkonzentrat bzw. wie könnte es zur Augmentation der Knochenheilung beitragen?

Geschichtlicher Überblick

Im Jahre 1964 publizierten SCHULTE et al. einen Artikel, in welchem zum ersten Mal die Rede von autologen Blutprodukten zur Förderung der Knochenheilung war. Damals wurde zentrifugiertes Blut zur Füllung von Knochenzysten verwendet. Durch die Zentrifugation sollte ein Großteil des Plasmas entfernt werden, damit die Regeneration nicht behindert wird.

Erst viele Jahre später veröffentlichten WHITMAN et al. und GREEN (1997) Verfahren zur Herstellung von Thrombozytenkonzentraten (PRP).

1998 wurde von MARX et al. die erste klinische Studie über die Verwendung von PRP publiziert. Die Verumgruppe erhielt autologen Knochen in Kombination mit PRP, die Kontrollgruppe nur autologen Knochen transplantiert. Die Arbeitsgruppe konnte dabei eine Steigerung der Knochendichte in der PRP-Gruppe um 19 % feststellen.

Seit 1998 gibt es viele Studien und Versuche, die den Einfluss von PRP auf die Knochenheilung untersuchen. Viele Arbeitsgruppen postulieren dabei einen positiven Effekt des plättchenreichen Konzentrats auf die Knochenregeneration (WHITMAN et al., 1997; MARX et al., 1998; ANITUA, 1999 und 2001; TISCHLER, 2002; RODRIGUEZ et al., 2003; CAMARGO et al., 2005).

Andere Experimente zeigen jedoch keinen oder sogar einen negativen, die Knochenheilung hemmenden Effekt (SANCHEZ et al., 2003; COULTHARD et al., 2003; FREYMILLER und AGHALOO, 2004; HUANG et al., 2005; MONOV et al., 2005).

Der klinische Einsatz und die Wirksamkeit von PRP sind nach wie vor umstritten. SANCHEZ et al. (2003) kommen nach einer umfassenden Literaturrecherche bezüglich der Wirksamkeit von PRP zu folgendem Schluss:

„This literature review demonstrates a lack of scientific evidence to support the current use of PRP in combination with bone grafts during augmentation procedures“.

(zitiert nach: SANCHEZ et al., 2003)

Wirkungsprinzip des Platelet-Rich-Plasmas (PRP)

Das plättchenreiche Plasma, Thrombozytenkonzentrat oder Platelet-Rich-Plasma (PRP) wird durch Zentrifugation von autologem Vollblut, das zuvor mit Calciumcitrat versetzt wurde, gewonnen. Es gibt zahlreiche verschiedene Herstellungsverfahren wie z. B. das PCCS™ = Platelet-Concentrate-Collecting-System, das HSPCS™ = Harvest-Smart-Prep-Platelet-Concentrate-System, etc. In dieser Studie wurde das Gravitational-Platelet-Separation®-System (GPS®-System; Biomet Merck) verwendet. All diese Verfahren dienen jedoch dem gleichen Zweck, der Anreicherung eines thrombozytenreichen Plasmas.

Die Thrombozyten haben in ihren alpha-Granula zahlreiche Wachstumsfaktoren gespeichert (GEMMEL und PARK, 2000; FÜRST et al., 2003). Im Fall einer Verletzung verändern die kernlosen Blutplättchen ihre Form, aggregieren zu einem Blutkoagel (ISHII-WATABE et al., 2000) und setzen über eine durch Calcium bzw. Thrombin aktivierte Degranulation zahlreiche Wachstumsfaktoren frei (GAWAZ, 1999; AUKHIL, 2000).

In humanen Thrombozyten und somit auch im menschlichen PRP, dort jedoch in höherer Konzentration, sind folgende Wachstumsfaktoren vorhanden:

TGF-beta (Transforming growth factor beta):

reguliert die Aktivität von Osteoblasten, Osteoklasten, Chondrozyten und mesenchymalen Zellen (BORDER und NOBLE, 1994; JIANG et al., 1999; MEHRARA et al., 1999); der Effekt ist dosisabhängig (GRAINGER et al., 2000).

PDGF (Platelet derived growth factor):

erster Wachstumsfaktor, der in den alpha-Granula gefunden wurde (KINGSLEY et al., 2002); es gibt die Isoformen AA, BB und AB (ANITUA, 2001); regt die Proliferation von Osteoblasten an; chemotaktische Wirkung auf Präosteoblasten und Fibroblasten (MANNAIONI, 1997; LIND, 1998).

VEGF (Vascular endothelial growth factor):

Erhöhung der Permeabilität von Gefäßen und Stimulierung der Angiogenese (LAWRENCE, 1998; HOM 2002).

IGF (Insulin-like growth factor):

zwei Formen I und II; beide Formen sind im Knochen anzutreffen und werden hauptsächlich von Osteoblasten gebildet; IGF-I ist der quantitativ am häufigsten in der Knochenmatrix vertretende Wachstumsfaktor (SOLHEIM, 1998; SUGIMOTO et al., 1998).

EGF (Epidermal growth factor); bFGF (basic Fibroblast growth factor), IL-1 (Interleukin-1):

Wachstumsfaktoren, die von aktivierten Thrombozyten freigesetzt werden; wichtige Rolle in der Wundheilung durch die Förderung der Proliferation von Osteoblasten und Fibroblasten (LAUWRENCE, 1998; TATSUYAMA et al., 2000).

Die im PRP enthaltenen Wachstumsfaktoren können nur mitogen wirken. Mitogene brauchen zu ihrer Wirkungsentfaltung präexistente vitale Zellen und deren Vorläufer und können nicht wie die Bone Morphogenetic Proteins (BMPs) morphogen wirken (MARX et al., 1998; URIST, 1980; WILTFANG et al., 2002a und 2002b).

Einige der genannten Wachstumsfaktoren können ihre Effekte nur in Gegenwart anderer Wachstumsfaktoren erbringen, andere hingegen wirken auch alleine. Das Zusammenspiel der verschiedenen Wachstumsfaktoren in Bezug auf die Knochenregeneration ist bis heute noch nicht ausreichend verstanden und unterliegt einer komplexen Kaskade (WEIBRICH et al., 2002; TOLGA und BURAK, 2003; SCHLEGEL et al., 2003).

Hervorzuheben ist, dass in der vorliegenden Arbeit im PRP des Schafes nur Spuren einzelner Wachstumsfaktoren nachgewiesen werden konnten. Ob die Nachweismethode mittels Elisa-Testung aufgrund der Verwendung humaner Antikörper nicht suffizient genug ist oder ob nur einige bestimmte Wachstumsfaktoren im Schafsblut vorhanden sind, sollte Gegenstand weiterer molekularbiologischer Studien sein. Schafs-Antikörper gegen die einzelnen Wachstumsfaktoren sind gegenwärtig nicht existent.

Bewertung der in dieser Studie gewonnenen Ergebnisse vor dem Hintergrund bisher veröffentlichter Daten anderer Arbeitsgruppen

Histologie

Alle histologischen Präparate wurden nach einer speziellen und für nicht schneidbare Gewebe weltweit anerkannten Methode geschnitten, eingebettet und gefärbt (DONATH, 1989).

5-Tages Tiere:

Fünf Tage post implantationem ist weder in der Verumgruppe (CaP + PRP) noch in der Kontrollgruppe (CaP) mit den Möglichkeiten der Lichtmikroskopie neu synthetisierter Knochen nachweisbar (Abbildung 30 und 32). In beiden Gruppen hat sich ein Granulationsgewebe zwischen den Granula des Knochenersatzmaterials gebildet. Dieses erscheint in der Verumgruppe dichter und zellreicher (siehe Abbildung 31 und 33).

Nach WILTFANG et al. (2003) reguliert das PRP die de-novo-Knochensynthese nur in der Frühphase der Heilung und andere Studien besagen sogar, dass die mitogenen Eigenschaften der aus PRP freigesetzten Wachstumsfaktoren nur in den ersten zwei bis fünf Tagen wirken (MALVAL et al., 1994; KESSLER et al., 2000).

Diese Beobachtungen stimmen mit den in dieser Studie gewonnenen Ergebnissen überein und man könnte das PRP als eine Art „Booster“ bzw. „Jump starter“ zu Beginn der Knochenregeneration bezeichnen.

Die Bildung neuen Knochens beginnt auf einem höheren und aktiveren Niveau. CHOI et al. (2004) berichten, dass die Wirkungsdauer der Blutplättchen und der

direkte Einfluss sekretierter Wachstumsfaktoren auf das umliegende Gewebe, in diesem Fall Knochen, Knochenzellen und Knochenersatzmaterial, weniger als fünf Tage beträgt. Nach ROSS (1987) ist mit einem Effekt der Faktoren in einem Zeitfenster von sieben Tagen zu rechnen.

Festzuhalten bleibt, dass das PRP in der unmittelbaren, frühen Phase der Knochenheilung wirkt und zu besseren Ausgangs- und Startbedingungen führt.

10-Tages Tiere:

Bei den zehn Tage post operationem euthanasierten Tieren findet sich zwischen der Verum- und der Kontrollgruppe die Fortführung der nach fünf Tagen vorliegenden Gegebenheiten.

In beiden Gruppen sind einige, lagernahe CaP-Granula von neu gebildetem Knochen und kubischen, aktiven, wie auf eine Perlenschnur gereihten Osteoblasten umgeben (siehe Abbildung 36 und 38). Die Knochenregeneration erfolgt also zentripetal, vom Defektrand zum Defektzentrum hin (siehe Abbildung 35 und 37). Zum gleichen Ergebnis kamen auch SCHNETTLER et al. (2003).

In der CaP-Gruppe sind jedoch weniger Granula von Knochen ummauert als in der PRP-Gruppe. Dies zeigt wiederum, dass die Osteogenese rascher und aktivierter beginnt und auf diesem Niveau fortschreitet.

Die osteokonduktiven Eigenschaften als Leitschiene für den neuen Knochen sind deutlich erkennbar. Der neue Knochen bildet, vom Lagerknochen ausgehend, spangenartige Knochen trabekel hin zu den CaP-Granula in lagernahen Arealen.

SCHLEGEL et al. (2003) fanden bei der Kombination autologer Spongiosa mit PRP im Vergleich zu einem reinem Spongiosatransplantat nach 14 Tagen das gleiche Resultat. Die Kombination verschiedener Knochenersatzmaterialien (Algipore® und Biogran®) mit PRP führte jedoch zu keiner größeren Knochendichte als die Verwendung des Ersatzmittels alleine. Als weiteren, dem PRP zuzuschreibenden Effekt wird eine Vorverlagerung der initialen Mineralisation beschrieben.

6-Wochen Tiere:

Nach sechs Wochen ist es zu einem Ausgleich zwischen der Verum- und der Kontrollgruppe gekommen. Das heißt, dass man anhand der lichtmikroskopischen Untersuchungen keinen Unterschied in Bezug auf den neu gebildeten Knochen in den beiden Gruppen erkennen kann (siehe Abbildung 41 und 43).

SCHLEGEL et al. (2003) beschreiben diesen Ausgleich 12 Wochen post implantationem in diversen Gruppen (autologer Knochen, autologer Knochen mit PRP, verschiedene Knochenersatzmaterialien, verschiedene Knochenersatzmaterialien mit PRP). Eine Aussage zum Status quo nach 6 Wochen wird nicht gemacht.

In der ‚Interface-Zone‘ (Bereich zwischen Lager- und Defektbereich) ist der Lagerknochen noch eindeutig vom neu gebildeten Knochen, der teilweise dickere Trabekel aufweist, zu unterscheiden (siehe Abbildung 42 und 45). Die Knochenneubildung geht demnach während der Regeneration erst über das natürliche Ausmaß hinaus. Zu den gleichen Ergebnissen kamen auch SCHLEGEL et al. (2003). In ihrer Studie war nach der Verpflanzung eines autologen Knochentransplantats nach vier Wochen eine höhere Mineralisation als nach zwölf Wochen Standzeit nachweisbar.

Auch zu diesem Zeitpunkt ist die zentripetale Erschließung der Defektzone erkennbar. Der Defekt ist zwar bis in das Zentrum knöchern erschlossen, die das Granulat umgebenden Knochentrabekel erscheinen jedoch lagernah dicker und in der Defektmittle zarter. Einige der sich im Defektzentrum befindlichen CaP-Partikel sind noch gar nicht knöchern umbaut.

3-Monats Tiere:

Drei Monate post implantationem ist der gesamte Defektbereich knöchern erschlossen und die neu gebildeten Knochentrabekel der CaP-Gruppe ähneln, bis auf die in diese Formationen eingeschlossenen und eindeutig zu detektierenden CaP-Partikel, dem Lagerknochen.

Die nach sechs Wochen beobachtete „Knochenüberproduktion“ ist somit wieder auf ein normales Level zurückgegangen (SCHLEGEL et al., 2003).

In der PRP-Gruppe sind einige der neu gebildeten Knochen trabekel schollenartig verdickt und somit weniger interdignierend verzweigt als in der CaP-Gruppe. Sowohl in der Verum- als auch in der Kontrollgruppe ist nach drei Monaten Lamellenknochen mit formierten Osteonen zu erkennen.

Nahezu alle CaP-Granula sind in beiden Gruppen knöchern erschlossen und das Knochenersatzmaterial ist an einigen Stellen bereits resorbiert und komplett durch neuen Knochen ersetzt worden. Ob die CaP-Keramik und seine Bestandteile dabei direkt in den neuen Knochen eingebaut wurden, ist in der vorliegenden Studie nicht untersucht worden.

LE HUC et al. (1998) zeigten, dass etwa 25 % eines in die Femurkondyle von Kanninchen eingebrachten CaP-Implantates im neu synthetisierten Knochen derselben Region gefunden werden konnte. Das CaP war dabei radioaktiv markiert worden, jedoch war die Aktivität nicht hoch genug, um die restlichen Implantatbestandteile im Körper nachzuweisen bzw. festzustellen ob diese überhaupt im Organismus verblieben sind.

Auch nach drei Monaten Standzeit ist kein Unterschied zwischen der Verum- und der Kontrollgruppe bezüglich des neu gebildeten Knochens zu erkennen (siehe Abbildung 46).

Es hat keine Verschiebung der de-novo-Osteogenese zugunsten einer der beiden Gruppen stattgefunden, es liegt also immer noch ein „Leveling“ wie nach sechs Wochen Standzeit vor.

6-Monats Tiere:

In dieser Gruppe zeigt sich sowohl in der Verum- wie auch in der Kontrollgruppe eine Besonderheit. In oberflächlich gelegenen Schichten ist der Defekt in beiden Gruppen knöchern durchbaut und die noch teilweise vorhandenen CaP-Granula sind knöchern integriert. In mittleren bzw. tief gelegenen Defektebenen ist der Defektbereich jedoch teilweise nicht knöchern erschlossen.

Im oberflächennahen Defektareal müssen also die Knochenheilung begünstigende Faktoren vorhanden sein. Der eingebrachte, aus autologer Spongiosa bestehende Deckel könnte eine Erklärung dafür geben. In der eingebrachten Spongiosa befinden sich präexistente, vitale Knochenzellen und deren Vorläufer. Diese Zellen können in das als Leitstruktur dienende Calciumphosphat einwandern und neuen Knochen

bilden. Auch die Nähe zum Periost und damit verbundene bessere vaskuläre Versorgung könnten zu einer erhöhten Ossifikationsrate beitragen.

Da die im PRP enthaltenen Wachstumsfaktoren aus Proteinen bestehen und somit nur in der Frühphase der Regeneration wirken können (MALVAL et al., 1994; KESSLER et al., 2000; CHOI et al. 2004), ist zwischen der Versuchs- und der Kontrollgruppe kein eindeutiger Unterschied im Bezug auf den Knochenzuwachs festzustellen.

Histomorphometrie

Wie bereits erläutert worden ist (siehe Ergebnisse), ist die superfiziell gelegene Knochenschicht K 1 nicht in die histomorphometrische Auswertung einbezogen worden, da es aufgrund der Nähe zum den Defekt abschließenden autologen Deckel zu falsch positiven Ergebnissen kommen würde. Der in dieser Defektebene prozentual neu entstandene Knochen würde zu groß angegeben (falsch positiv). Das Ergebnis wäre weder zuverlässig noch wissenschaftlich vertretbar.

Die Leerdefekte konnten ebenfalls nicht in die histomorphometrische Auswertung einbezogen werden, da diese aus Gruppen unterschiedlicher Standzeiten stammen und ihre Anzahl (n = 3) für eine statistische Analyse zu gering ist.

Die Leerdefekte wurden gebohrt, um zu zeigen, dass der Defekt nicht durch die körpereigene Regeneration knöchern überbrückt werden kann, es sich also um einen so genannten ‚critical-size-defect‘ handelt (SCHMITZ und HOLLINGER, 1986; GOSAIN et al., 2000).

Knochenschicht K 2:

Die Standzeit ist ein eindeutiger Faktor, der den Knochenzuwachs signifikant beeinflusst ($p \leq 0,001$). Die mittlere prozentuale Fläche neuen Knochens im Defekt ist wie folgt verteilt (Tabelle 17).

CaP (B = 1)			CaP + PRP (B = 2)		
S = 1	9,77%	(+/- 0,42%)	S = 1	12,27%	(+/- 2,79%)
S = 2	9,23%	(+/- 3,01%)	S = 2	16,96%	(+/- 2,04%)
S = 3	14,50%	(+/- 3,10%)	S = 3	17,65%	(+/- 4,96%)
S = 4	32,95%	(+/- 3,73%)	S = 4	38,72%	(+/- 5,67%)
S = 5	17,12%	(+/- 3,68%)	S = 5	16,30%	(+/- 14,90%)

Tabelle 17: Abhängigkeit des Knochenzuwachses in der mittleren Knochenschicht (K = 2) von der Standzeit (S = 1, 2, 3, 4, 5) in den beiden unterschiedlichen Gruppen (B = 1 bzw. 2).

Über die verschiedenen Standzeiten gemittelt, lässt sich keine Signifikanz in Bezug auf die Behandlung, sprich mit oder ohne PRP-Zusatz, eruieren ($p \leq 0,0244$). Die Verteilung sieht demnach wie folgt aus:

CaP	B = 1	16,16%	(+/- 3,59%)
CaP + PRP	B = 2	21,82%	(+/- 3,28%)

Eine Wechselwirkung, das heißt die Standzeit und die Behandlungsart beeinflussen sich gegenseitig, kann nicht beobachtet und somit keine Signifikanz erreicht werden ($p(S * B) \leq 0,8934$).

Knochenschicht K 3:

Die Standzeit ist ein eindeutiger Faktor, der den Knochenzuwachs signifikant beeinflusst ($p \leq 0,0015$). Die mittlere prozentuale Fläche neuen Knochens im Defekt ist wie folgt verteilt (Tabelle 18).

CaP (B = 1)			CaP + PRP (B = 2)		
S = 1	9,71%	(+/- 0,74%)	S = 1	14,92%	(+/- 1,51%)
S = 2	8,77%	(+/- 0,65%)	S = 2	11,59%	(+/- 5,64%)
S = 3	14,50%	(+/- 2,54%)	S = 3	16,50%	(+/- 5,72%)
S = 4	28,28%	(+/- 8,30%)	S = 4	38,82%	(+/- 11,64%)
S = 5	22,05%	(+/- 6,05%)	S = 5	22,59%	(+/- 8,56%)

Tabelle 18: Abhängigkeit des Knochenzuwachses in der tiefen Knochenschicht (K = 3) von der Standzeit (S = 1, 2, 3, 4, 5) in den beiden unterschiedlichen Gruppen (B = 1 bzw. 2).

Über die verschiedenen Standzeiten gemittelt, lässt sich auch in der tiefen Knochenschicht (K 3) keine Signifikanz in Bezug auf die Behandlung, sprich mit oder ohne PRP-Zusatz, eruieren ($p \leq 0,1558$).

Eine Wechselwirkung, das heißt die Standzeit und die Behandlungsart beeinflussen sich gegenseitig, kann ebenfalls nicht beobachtet und somit keine Signifikanz erreicht werden ($p(S * B) \leq 0,8282$).

Resumée:

Wie oben erläutert hat die Standzeit einen eindeutigen Einfluss auf den Knochenzuwachs, sowohl in der mittleren (K 2) als auch in der tiefen Knochenschicht (K 3). Gleiche Ergebnisse zeigt eine Studie von KASTEN et al. (2008) am distalen Radius des Kaninchens.

Die unterschiedliche Behandlung (mit oder ohne PRP) führt über einen Zeitraum von sechs Monaten zu keinem signifikanten Vorteil in einer der beiden Gruppen

(Versuchs- und Kontrollgruppe I). Nach sechs Monaten ist der prozentuale Knochenanteil in der Schicht K 2 sowohl mit PRP (17,12%) als auch ohne PRP (16,30%) annähernd gleich groß („Leveling“). In der Schicht K 3 gestaltet sich das Ergebnis ähnlich, mit PRP (22,59%) und ohne (22,05%). GRIFFIN et al. (2009) kommen in ihrer systematischen Übersichtsarbeit und MESSORA et al. (2008) in ihren Versuchen am Rattenknochen zum gleichen Ergebnis.

Auch die Wechselwirkung beider Variablen (Standzeit und Behandlung) ist nicht statistisch relevant.

Auffällig ist, dass ein Maximum an neu gebildetem Knochen in der Verum- und der Kontrollgruppe nach einer Standzeit von drei Monaten erreicht wird. Die Knochenmasse nimmt also innerhalb der letzten drei Monate wieder stark ab. Die Trabekel erscheinen nach sechs Monaten zarter und auch die Histomorphometrie stützt diese Befunde. In einer Studie von MONOV et al. (2005) sind ähnliche Rückgänge der Knochenmasse bei längeren Untersuchungszeiten beschrieben. Eine Erklärung kann nicht gegeben werden und es wird eine hemmende Wirkung der hohen Thrombozyten- und Wachstumsfaktorenzahlen im PRP postuliert.

Ob dieser Knochenumbau (bzw. -abbau) im Rahmen des physiologischen ‚Remodelings‘ als normal anzusehen oder pathologisch gesteigert ist, aus welchen Gründen auch immer, wurde in der vorliegenden Studie nicht untersucht und kann deshalb nicht bewertet werden.

Verbesserungsvorschläge für zukünftige Studien

Um den Verlauf der Knochenregeneration in der Zeitachse besser darzustellen, könnte unter Verwendung eines High-Resolution-Computertomographen (HR-CT) der gefüllte Defektbereich der Versuchstiere in festen Zeitabschnitten bis hin zur Materialentnahme gescannt werden. Auf diese Art und Weise könnten zusätzlich Aussagen über intra- als auch interindividuelle Unterschiede über den gesamten Beobachtungszeitraum getroffen werden.

Eine wichtige Voraussetzung für die histomorphometrische Auswertung und eine erleichterte Durchführung liegen in der Herstellung von exakten histologischen Schnitten bzw. Schliffen.

Ein Scannen der Defektzone mittels eines Mikro-Computertomographen (mikro-CT) nach der Probeentnahme, jedoch vor dem Schneiden bzw. Schleifen der histologischen Präparate, würde ein präziseres Justieren des Knochen-Implantat-Blockes gewährleisten. Das Zusägen der Knochenscheiben könnte nun exakt senkrecht zur Defektachse erfolgen. Das Ergebnis wären kreisrunde und nicht etwa längsovale Defektzonen im histologischen Präparat.

Schlussfolgerung und Ausblick in die Zukunft

Die Verwendung von autologem Platelet-Rich-Plasma (PRP) stellt eine potentielle Möglichkeit dar, die Knochenregeneration zu fördern.

Weitere standardisierte Studien sind jedoch notwendig, um die exakte Konzentration des plättchenreichen Plasmas, welche fördernd wirkt, zu eruieren (SEHER et al., 2004).

Auffällig ist, dass das PRP in Kombination mit autologem Knochen seine größte Wirksamkeit zeigt (WEIBRICH et al., 2002; SCHLEGEL et al., 2003). Eine Kombination autologen Knochens mit einem artifiziellen Ersatzmaterial und PRP könnte diesen Effekt nachahmen, da somit die mitogenen Eigenschaften des PRP besser zum Tragen kommen könnten. Bei einer Verwendung dieser „Dreierkombination“ müsste man zwar immer noch autologen Knochen gewinnen, jedoch in geringerem Ausmaß als bei der Durchführung einer singulären Spongiosaplastik.

Außerdem muss die Kaskade der Wachstumsfaktoren und ihren biochemischen Wirkprinzipien genauer erforscht und verstanden werden, damit das PRP in Zukunft bei der Augmentation und Füllung knöcherner Defekte nur noch klinische Verwendung aufgrund eindeutiger, wissenschaftlicher Grundlagen und Beweise findet.

6. ZUSAMMENFASSUNG

Die Behandlung und Füllung knöcherner Defekte stellt ein häufiges Problem in der Orthopädie, Unfallchirurgie und Zahnmedizin dar. Forschungsgruppen aus aller Welt versuchen deshalb seit Beginn des 20. Jahrhunderts ein künstliches Füllmaterial zu finden, das den heutigen Goldstandard, die autogene Spongiosaplastik, ersetzen soll und kann.

In dieser Studie wurde ein aus autologem Blut gewonnenes plättchenreiches Plasma (Platelet-Rich-Plasma, PRP) mit einem auf Calciumphosphat-basierten Granulat (CaP) kombiniert und nach unterschiedlichen Beobachtungszeiträumen post implantationem untersucht (makroskopisch, mikroskopisch und histomorphometrisch).

Die Implantation erfolgte in einen standardisierten zylindrischen Bohrlochdefekt im Tibiakopf des Schafes. Der geschaffene Defekt hatte dabei einen Durchmesser von 12 mm und eine Tiefe von 30 mm. Die 35 weiblichen Merino-Fleischschafe wurden als Versuchstier gewählt, da die Anatomie und die Geschwindigkeit des Knochenstoffwechsels den menschlichen Gegebenheiten stark ähneln. Die Tiere wurden nach verschiedenen Beobachtungszeiträumen unterteilt (Standzeiten: 5 Tage, 10 Tage, 6 Wochen, 3 Monate, 6 Monate) und dann wiederum der Versuchsgruppe (CaP kombiniert mit PRP) oder der Kontrollgruppe (CaP) zugeteilt. Bei einigen Tieren wurde der Defekt in situ belassen („Kontrollgruppe II“, Leerdefekte), um zu überprüfen, ob die körpereigenen Regenerationsfähigkeiten ausreichen, den Defekt knöchern zu überbrücken.

Die Erschließung der Defektzone erfolgt vom Lagerknochen ausgehend hin zur Defektmitte (zentripetal). Das Zentrum des Defektes ist bereits nach 6 Wochen erreicht. In der Versuchsgruppe startet die Knochenregeneration auf einem höheren und aktiveren Niveau als in der Kontrollgruppe. Die Leerdefekte sind zu keinem Zeitpunkt knöchern überbrückt (Kontrollgruppe II).

Nach sechs Wochen kommt es jedoch zu einer Niveauangleichung des Knochenzuwachses zwischen der Versuchs- und Kontrollgruppe. Diese Ergebnisse zeigen, dass das PRP insbesondere in der Frühphase der de-novo-Osteogenese wirksam ist.

Auch die histomorphometrischen Ergebnisse untermauern diese Annahme. Nach sechs Wochen Standzeit kann kein Unterschied zwischen der Test- und Kontrollgruppe festgestellt werden.

Die Experimente konnten über den Zeitraum von sechs Monaten keinen signifikanten Vorteil des autologen Thrombozytenkonzentrats (CaP + PRP) im Vergleich zur alleinigen Verwendung des Knochenfüllmaterials (CaP) zeigen.

Um die Eigenschaften des PRPs in Bezug auf die Regeneration knöcherner Defekte genauer zu verstehen, sind weitere standardisierte experimentelle Studien erforderlich. Der Einfluss des PRP in der Frühphase der Knochenregeneration sollte dabei besondere Beachtung finden und die Kaskade der Wachstumsfaktoren weiter entschlüsselt werden, damit die Ergebnisse verglichen und die Verwendung von PRP auf gesicherten wissenschaftlichen Erkenntnissen beruht.

7. SUMMARY

The treatment and filling of bony defects is a very frequent problem in Orthopaedics, Trauma Surgery and Dental Surgery. Since the beginning of the 20th century, groups of medical investigators from all over the world have been trying to find an artificial replacement material that can be used instead of the current golden standard, the transplantation of autologous cancellous bone.

In this study, a platelet-rich-plasma (PRP) gained from autologous blood was combined with a calciumphosphate-based bone substitute (CaP) and examined after certain amounts of time after implantation (macroscopical, microscopical and histomorphometrical examination).

The implantation was carried out in a standardized cylindrical drill hole in the tibial plateau of sheep. The produced defect had a diameter of 12 mm and a depth of 30 mm. The 35 female sheep ("Merino-Fleischschafe") were chosen as an animal model, because their anatomy and bone metabolism is similar to the one of human beings. The sheep were divided into groups with different periods of time of observation (5 days, 10 days, 6 weeks, 3 months, 6 months) and then allocated to the test group (CaP + PRP) or control group (CaP). In some animals the defect was not filled to see whether the body's own mechanisms of regeneration are strong enough to bridge the bony defect ("control group II").

New bone develops from the margin of the defect towards the centre of the implanted CaP-ceramic (centripetal ingrowth). Six weeks after implantation, the centre is reached by newly formed bone. The unfilled defects show no bony bridging at any time (control group II).

In the test group, the bony regeneration starts on a higher and more active level than in the control group. Anyway, after six weeks the newly built bone is on the same level in both groups, the test- and control group ('leveling'). These results show that PRP and its mechanisms have an effect in the early stage of regeneration, mainly.

The results of the histomorphometrical examinations could not show a difference between the test- and control group after six weeks regarding the bone ingrowth. This emphasizes that PRP acts in the early phase of regeneration, too.

After a period of six months, the outcome of these experiments cannot show a significant advantage of the autologous platelet-rich-plasma (PRP + CaP) in comparison with the single use of the bone substitute material (CaP).

To get to know more about PRP, its capacity and qualities, more well designed and standardized studies are to be obtained. Especially, the influence of PRP in the early stage of bone regeneration should be investigated.

8. ABBILDUNGS- und TABELLENVERZEICHNIS

Abbildung 1 (Seite 10)

Skizze: Zusammenspiel von BMPs und Smads. (REDDI, 2001)

Abbildung 2 (Seite 11)

Proliferation von Osteoblasten in vitro unter dem Einfluss eines oder mehrerer Wachstumsfaktoren (nach WEIBRICH et al., 2002).

Abbildung 3 (Seite 12)

Wachstumsfaktorenspiegel von PDGF (AA, BB), TGF- β (1, 2) und IGF-1 in Thrombozytenkonzentraten (nach WEIBRICH et al., 2002).

Abbildung 4 (Seite 20)

Histologie: Haver'sches System

Abbildung 5 (Seite 21)

Trans-Elektronen-Mikroskopisches-Bild: Perlschnurartig aufgereichte Osteoblasten.

Abbildung 6 (Seite 22)

Trans-Elektronen-Mikroskopisches-Bild: Osteoklast.

Abbildung 7 (Seite 23)

Schema der primären Frakturheilung (aus: SCHUMPELICK et al., 1999).

Abbildung 8 (Seite 24)

Schema der sekundären Frakturheilung (aus: SCHUMPELICK et al., 1999).

Tabelle 1 (Seite 25)

Darstellung der verschiedenen Knochenwachstumsfaktoren und ihre biologische Funktion auf den Knochenstoffwechsel.

Tabelle 2 (Seite 26)

Expression der verschiedenen Knochenwachstumsfaktoren während der sekundären Frakturheilung.

Tabelle 3 (Seite 27)

Gruppeneinteilung der Versuchsobjekte.

Tabelle 4 (Seite 28)

Darstellung der verschiedenen Defektfüllungen und den zugehörigen Schafen.

Abbildung 9 (Seite 29)

Calcibon[®] Granules.

Abbildung 10 (Seite 30)

Befüllen der GPS[™]-Tubes mit autologem Blut.

Abbildung 11 (Seite 31)

Befüllte GPS[™]-Tubes.

Abbildung 12 (Seite 31)

Typische 3-Phasenbildung nach der Zentrifugation.

Abbildung 13 (Seite 32)

Herabdrücken des integrierten „Bojen-Filter-Systems“.

Abbildung 14 (Seite 32)

Entnahme des Platelet-Poor-Plasmas (PPP).

Abbildung 15 und 16 (Seite 32)

Entnahme des Platelet-Rich-Plasmas (PRP).

Tabelle 5 (Seite 33)

Vergleich verschiedener Thrombozyten-Trenn-Systeme.

Tabelle 6 (Seite 34)

Wachstumsfaktoren im Schafs-PRP.

Abbildung 17 (Seite 35)

Applikationssystem für die autologen Komponenten: PRP + Thrombin.

Abbildung 18 (Seite 35)

Gefülltes und zusammengesetztes Applikationssystem.

Abbildung 19 (Seite 35)

Gelartiges Gemisch aus PRP, Thrombin und CaP-Granula.

Abbildung 20 (Seite 37)

Präoperative Bildwandlerkontrolle.

Abbildung 21 (Seite 37)

DCBS (DiamondBoneCuttingSystem).

Abbildung 22 (Seite 38)

Fräsung des standardisierten Defektes im Tibiakopfplateau.

Abbildung 23 (Seite 39)

Aufsicht auf den Bohrlochdefekt im Tibiakopfplateau.

Abbildung 24 (Seite 39)

Darstellung des entnommenen Knochenzylinders, des Stößels und des Extraktors.

Abbildung 25 (Seite 39)

Mit CaP-Granula gefüllter Defekt.

Abbildung 26 (Seite 39)

Füllung des Defektes mit dem Gemisch aus autologem PRP und CaP-Granula.

Tabelle 7 (Seite 41)

Perfusions-Schema.

Abbildung 27 (Seite 42)

Präparierte linke Leistenregion und Vorbereitung zur Perfusion.

Abbildung 28 (Seite 43)

Schemazeichnung: Zuschnitt der planparallelen Knochenscheiben aus dem entnommenen Knochenzylinder.

Tabelle 8 (Seite 43)

Überblick: Einbettung, Fixierung mit Zeitangabe und Temperatur.

Tabelle 9 (Seite 46)

Antikörperapplikation.

Tabelle 10 (Seite 49)

Auswertungsmethoden.

Abbildung 29 (Seite 50)

Makroskopie: Mit CaP-Granula gefüllter Defekt im Tibiakopfplateau.

Abbildung 30 (Seite 51)

Histologie: Übersicht: Mit CaP-Granula gefüllter Knochendefekt (5 Tage post implantationem).

Abbildung 31 (Seite 52)

Histologie: Detailansicht aus Abbildung 30.

Abbildung 32 (Seite 53)

Histologie: Die Übersichtsaufnahme zeigt den mit CaP-Granula und PRP gefüllten Defekt (5 Tage post implantationem).

Abbildung 33 (Seite 54)

Histologie: Die Detailansicht zeigt das Granulationsgewebe im lagernahen Defektbereich (5 Tage post implantationem).

Abbildung 34 (Seite 55)

Histologie: Übersichtsaufnahme eines Leerdefektes (5 Tage post implantationem).

Abbildung 35 (Seite 56)

Histologie: Übersicht: Der gesamte Defektbereich ist mit CaP-Granulat gefüllt (10 Tage post implantationem).

Abbildung 36 (Seite 57)

Histologie: Detailansicht aus Abbildung 35.

Abbildung 37 (Seite 58)

Histologie: Übersicht: Mit CaP-Granulat und PRP gefüllter Defektbereich (10 Tage post implantationem).

Abbildung 38 (Seite 59)

Histologie: Detailansicht aus Abbildung 37.

Abbildung 39 (Seite 60)

Histologie: Detailansicht aus Abbildung 38.

Abbildung 40 (Seite 60)

Histologie: Detailansicht aus Abbildung 39.

Abbildung 41 (Seite 62)

Histologie: Mit CaP-Granula gefüllter Defekt (6 Wochen post implantationem).

Abbildung 42 (Seite 62)

Histologie: Detailansicht aus Abbildung 41.

Abbildung 43 (Seite 63)

Histologie: Mit CaP-Granulat und PRP gefüllter Defektbereich (6 Wochen post implantationem).

Abbildung 44 (Seite 64)

Histologie: Mit CaP-Granulat und PRP gefüllter Defektbereich (6 Wochen post implantationem).

Abbildung 45 (Seite 64)

Histologie: Detailansicht aus Abbildung 44.

Abbildung 46 (Seite 65)

Histologie: Übersichtsaufnahme eines Leerdefektes (6 Wochen post implantationem).

Abbildung 47 (Seite 66)

Histologie: Übersichtsaufnahme: Mit CaP-Granulat gefüllter Defektbereich (3 Monate post implantationem).

Abbildung 48 (Seite 67)

Histologie: Detailansicht aus Abbildung 47 (Großer Kasten).

Abbildung 49 (Seite 67)

Histologie: Detailansicht aus Abbildung 47 (kleiner Kasten).

Abbildung 50 (Seite 68)

Histologie: Übersichtsaufnahme: Mit CaP-Granulat und PRP gefüllter Defektbereich (3 Monate post implantationem).

Abbildung 51 (Seite 69)

Histologie: Detailansicht aus Abbildung 50 (großer Kasten).

Abbildung 52 (Seite 69)

Histologie: Detailansicht aus Abbildung 50 (kleiner Kasten).

Abbildung 53 (Seite 70)

Histologie: Übersichtsaufnahme eines Leerdefektes (3 Monate post implantationem).

Abbildung 54 (Seite 71)

Histologie: Übersichtsaufnahme: Mit CaP-Granulat gefüllter Defektbereich → Scheibe 1 (6 Monate post implantationem).

Abbildung 55 (Seite 72)

Histologie: Übersichtsaufnahme: Mit CaP-Granulat gefüllter Defektbereich → Scheibe 3 (6 Monate post implantationem).

Abbildung 56 (Seite 72)

Histologie: Übersichtsaufnahme: Mit CaP-Granulat gefüllter Defektbereich → Scheibe 6 (6 Monate post implantationem).

Abbildung 57 (Seite 73)

Histologie: Übersichtsaufnahme: Mit CaP-Granulat und PRP gefüllter Defektbereich → Scheibe 1 (6 Monate post implantationem).

Abbildung 58 (Seite 74)

Histologie: Übersichtsaufnahme: Mit CaP-Granulat und PRP gefüllter Defektbereich → Scheibe 3 (6 Monate post implantationem).

Abbildung 59 (Seite 75)

Histologie: Übersichtsaufnahme: Mit CaP-Granulat und PRP gefüllter Defektbereich → Scheibe 6 (6 Monate post implantationem).

Abbildung 60 (Seite 76)

Immunhistochemie: Kollagen I: Detailansicht: Mit CaP-Granulat gefüllter Defektbereich (6 Wochen post implantationem).

Abbildung 61 (Seite 77)

Immunhistochemie: Osteocalcin: Detailansicht: Mit CaP-Granulat gefüllter Defektbereich (6 Wochen post implantationem).

Abbildung 62 (Seite 78)

Immunhistochemie: Kollagen I: Detailansicht: Mit CaP-Granulat und PRP gefüllter Defektbereich (6 Wochen post implantationem).

Abbildung 63 (Seite 79)

Immunhistochemie: Kollagen I: Detailansicht: Leerdefekt (6 Wochen post implantationem).

Abbildung 64 (Seite 80)

Semidünnschnitt: Detailansicht: Mit CaP-Granulat gefüllter Defektbereich (6 Wochen post implantationem).

Abbildung 65 (Seite 80)

Semidünnschnitt: Detailansicht: Mit CaP-Granulat gefüllter Defektbereich (6 Wochen post implantationem).

Abbildung 66 (Seite 81)

Semidünnschnitt: Detailansicht: Mit CaP-Granulat und PRP gefüllter Defektbereich (6 Wochen post implantationem).

Abbildung 67 (Seite 83)

Histomorphometrie: Eingescannter Knochenschliff.

Abbildung 68 (Seite 83)

Histomorphometrie: Erstellen des ‚Area of interest‘.

Abbildung 69 (Seite 83)

Histomorphometrie: Der Schliff ist mit einer Gegenfarbe markiert.

Abbildung 70 (Seite 83)

Histomorphometrie: Rekonstruiertes Bild: Rote Gegenfarbe auf weißem Hintergrund.

Tabelle 11 (Seite 84)

Legende der einzelnen Parameter: Standzeit, Knochenschicht und Behandlung.

Tabelle 12 (Seite 85)

Prozentuale Verteilung des Knochens in der Knochenschicht K 2.

Tabelle 13 (Seite 86)

Prozentuale Verteilung des Knochens in der Knochenschicht K 3.

Tabelle 14 (Seite 87)

Einfluss der Standzeit in der Knochenschicht K 2.

Tabelle 15 (Seite 87)

Einfluss der Behandlung in der Knochenschicht K 2.

Tabelle 16 (Seite 88)

Einfluss der Standzeit in Knochenschicht K 3.

Tabelle 17 (Seite 100)

Abhängigkeit des Knochenzuwachses in der mittleren Knochenschicht (K 2) von der Standzeit in den beiden Behandlungsgruppen.

Tabelle 18 (Seite 101)

Abhängigkeit des Knochenzuwachses in der tiefen Knochenschicht (K 3) von der Standzeit in den beiden Behandlungsgruppen.

9. LITERATURVERZEICHNIS

Adler CP. Diagnostik makroskopischer, histologischer Knochenkrankheiten und radiologischer Strukturveränderungen des Skeletts.

Springer 1998; 6-25.

Albrektsson T, Johansson C. Osteoinduction, osteoconduction and osseointegration.

Eur Spine J 2001; 10 Suppl 2: 96-101.

American Association of Tissue Banks. Guidelines for the banking of musculoskeletal tissues. Am Assn Tissue Banks Newslett 1979; 3: 2.

Andrew JG, Hoyland J, Andrew SM, Freemont AJ, Marsh D. Demonstration of TGF- β 1 mRNA by in situ hybridisation in normal human fracture healing.

Calcif Tissue Int 1993; 53: 74-78.

Andrew JG, Hoyland J, Andrew SM, Freemont AJ, Marsh D. Insuline-like growth factor gene expression in human fracture callus. Calcif Tissue Int 1993; 53: 97-102.

Andrianjatovo H, Jose F, Lemaitre J. Effect of β -TCP granularity on setting time and strength of calcium phosphate hydraulic cements.

J Mater Sci Mater Med 1996; 7: 34-39.

Anitua E. Plasma rich in growth factors: Preliminary results of use in the preparation of future sites for implants. Int J Oral Maxillofac Implants 1999; 14: 529-535.

Anitua E. A new approach to bone regeneration: Plasma Rich in Growth Factors. 2001.

Aukhil I. Biology of wound healing. Plast Reconstr Surg 2000; 22: 44-50.

Baron R, Neff L, Louvard D, Courtoy PJ. Cell-mediated extracellular acidification and bone resorption: evidence for a low pH in resorbing lacunae and localization of a 100-kD lysosomal membrane protein at the osteoclast ruffled border.

J Cell Biol 1985; 101: 2210-2222.

Bendix D, Lietke H. Resorbierbare Polymere: Zusammensetzung, Eigenschaften und Anwendung. In: Claes L, Ignatius A (Hrsg). Biodegradierbare Implantate und Materialien. Hefte Unfallchir 1997; 265: 3-10.

Benninghoff A. Anatomie: makroskopische Anatomie, Embryologie und Histologie des Menschen. In: Drenckhahn D und Zenker (Hrsg), Urban & Schwarzenberg, 1994; 15 (Band 1): 130-159.

Boedecker RH. Persönliches Beratungsgespräch im Rahmen der statistischen Sprechstunde am Institut für medizinische Biomathematik der JLU Gießen. 2005.

Border WA, Noble NA. Transforming growth factor beta in tissue fibrosis. The New England Journal of Medicine 1994; 331: 1286-1892.

Briem D, Linhart W, Lehmann W, Meenen NM, Rueger JM. Langzeitergebnisse nach Anwendung einer porösen Hydroxylapatitkeramik (Endobon) zur operativen Versorgung von Tibiakopffrakturen. Unfallchirurg 2002; 105 (2): 128-133.

Burwell RG. A study of homologous cancellous bone combined with autologous red marrow after transplantation to a muscular site. J Anat 1961; 95: 613.

Camargo PM, Lekovic V, Weilaender M, et al. A reentry study on the use of bovine porous bone mineral, GTR and platelet-rich plasma in the regenerative treatment of intrabony defects in humans. Int J Periodontics Restorative Dent 2005; 25 (1): 49-59.

Cheng A, Takagi S, Chow LC. Effects of hydroxypropyl methylcellulose and other gelling agents on the handling properties of calcium phosphate cement.

J Biomed Mater Res 1997; 35: 273-277.

Choi BH, Im CJ, Huh JY, Suh JJ, Lee SH. Effect of platelet-rich plasma on bone regeneration in autogenous bone graft. *Int J Oral Maxillofac Surg* 2004; 33: 56-59.

Chow LC. Calcium-Phosphat-Zemente: Eigenschaften und Verwendungen. *Biomaterialien* 2001; 2: 11-18.

Correia JJ, Chacko BM, Lam SS, Lin K. Sedimentation studies reveal a direct role of phosphorylation in Smad3:Smad4 homo- and hetero-trimerization. *Biochemistry* 2001; 40: 1473-1482.

Coulthard P, Esposito M, Jokstad A, Worthington HV. Interventions for replacing missing teeth: Surgical techniques for placing dental implants. *Cochrane Database Syst Rev* 2003; 1: CD003606.

Curasan AG (Kleinostheim). Platelet Rich Plasma und Cerasorb: Wund- und Knochenheilung verbessern – höhere Qualität in kürzerer Zeit. Produktinformation.

Daculsi G, Passuti N, Martin S, Deudon C, LegerosRZ, Rahe S. Macroporous calcium phosphate ceramic for long bone surgery in humans and dogs. Clinical and histological study. *J Biomed Mater Res* 1990; 24 (3): 379-996.

Dambe LT, Saur K, Eitel F, Schweiberer L. Morphologie der Einheilung von frischen autologen und homologen Spongiosatransplantaten in Diaphysendefekte. *Unfallheilk* 1981; 84: 115.

Dingeldein E, Donath K, Wahlig H, Bauer HJ. Einheilung einer porösen Hydroxylapatitkeramik biologischer Herkunft im spongiösen Knochenlager von Kaninchen. *Osteo Trauma Care* 1994; 2: 112-116.

Donath B. Die Trenn-Dünnschliff-Technik zur Herstellung histologischer Präparate von nicht schneidbaren Geweben und Materialien. *Exakt-Kulzer-Druckschrift*, Norderstadt, 1989; 1-16.

Draenert K, Draenert Y. Ein neues Verfahren für die Knochenbiopsie und die Knorpel-Knochen-Transplantation. Sandorama 2 1987; 31-38.

Driessens FCM, Boltong MG, Wenz R. Calcium phosphate bone cements: State of the art 2000. 12th Conference of the European Society of Biomechanics, Dublin, Ireland, 27-30th August 2000.

Dugrillon A, Eichler H, Kern S, Kluter H. Autologous Concentrated Platelet-rich Plasma (cPRP) for Local Application in Bone Regeneration.

International Journal of Oral & Maxillofacial Surgery 2002;31 (6): 615–619.

Fernandez E, Gil FJ, Best SM, Ginebra MP, Driessens FCM, Planell JA. Improvement of the mechanical properties of new calcium phosphate bone cements in the $\text{CaHPO}_4\text{-}\alpha\text{-Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ system: compressive strength and microstructural development. J Biomed Mater Res 1998; 41: 560-567.

Fernandez E, Gil FJ, Ginebra MP, Driessens FCM, Planell JA, Best SM. Production and characterization of new calcium phosphate bone cements in the $\text{CaHPO}_4\text{-}\alpha\text{-Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ system: pH, workability and setting times. J Mater Sci Mater Med 1999; 10: 23-30.

Freymiller EG, Aghaloo TL. Platelet-rich plasma: Ready or not?

J Oral Maxillofac Surg 2004; 62 (4): 484-488.

Friedel R, Markgraf E. Vergleichende histomorphometrische Untersuchungen von Keramikkompositen zum Knochenersatz. In: Schnettler R, Markgraf E, editors. Knochenersatzmaterialien und Wachstumsfaktoren. Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 1997: 74-77.

Frost HM. Bone dynamics in metabolic bone disease.

J Bone Joint Surg Am 1966; 48 (6): 1192-1203.

Fürst G, Gruber R, Tangl S, Zechner W, Haas R, Mailath G, Sanroman F, Watzek G. Sinus grafting with autogeneous platelet-rich plasma and bovine hydroxyapatite. A histomorphometric study in minipigs. Clin Impl Res 2003; 14: 500-508.

Gao TJ, Lindholm TS, Kommonen B, Ragni P, Paronzini A, Lindholm TC, Jamsa T, Jalovaara P. Enhanced healing of segmental tibial defects in sheep by a composite bone substitute composed of tricalcium phosphate cylinder, bone morphogenetic protein, and type IV collagen. *J Biomed Mater Res* 1996; 32 (4): 505-512.

Gawaz M. *Das Blutplättchen*. Thieme, Stuttgart New York 1999.

Gemmel C, Chow E. Comparative performance of two platelet-concentrating cell separators. Published on: www.biometmerck.de (2001).

Gemmel CH, Park JY. Initial blood interactions with endosseous implant materials. In: Davies JE, ed. *Bone engineering*. Based on the Proceedings of the Bone Engineering Work-shop. Toronto 2000.

Gerhart TN, Kirker-Head CA, Kriz MJ et al. Healing segmental femoral defects in sheep using recombinant human bone morphogenetic protein. *Clin Orthop* 1993; 293: 317-322.

Gerngross H, Burri C, Kinzl L et al. Komplikationen an der Entnahmestelle autologer Spongiosatransplantate. *Akt Traumatol* 1982; 3; 146.

Ginebra MP, Boltong MG, Fernandez E, Planell JA, Driessens FCM. Effects of various additives and temperature on some properties of an apatitic calcium phosphate cement. *J Mater Sci Mater Med* 1995; 6: 612-616.

Ginebra MP, Fernandez E, De Maeyer EAP et al. Setting reaction and hardening of an apatitic calcium phosphate cement. *J Dent Res* 1997; 76: 507-512.

Gosain AK, Song L, Yu P, Mehrara BJ, Maeda CY, Gold LI, Longaker T. Osteogenesis in cranial defects: reassessment of the concept of critical size defects and the expression of TGF- β isoforms. *Plast Reconstr Surg* 2000; 106: 360-371.

Grainger DJ, Mosedale DE, Metcalfe JC. TGF-beta in blood: A Complex Problem. Cytokine & Growth Factor Reviews 2000; 11: 133-145.

Green DM. Platelet gel as an operatively procured platelet-based alternative to fibrin-glue. Plast Reconstr Surg 1997; 101: 1161-1162.

Griffin XL, Smith CM, Costa ML. The clinical use of platelet-rich plasma in the promotion of bone healing: A systematic review. Injury 2009; 40(2): 158-162.

Griffon DJ, Dunlop DG, Howie CR, Pratt JN, Gilchrist TJ, Smith N. An ovine model to evaluate the biologic properties of impacted morselized bone graft substitutes. J Biomed Mater Res 2001; 56(3): 444-451.

Gürtler L. Übertragbarkeit von Infektionserregern über allogene Knochentransplantate. In: Schnettler R, Markgraf E, editors. Knochenersatzmaterialien und Wachstumsfaktoren. Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 1997; 8-11.

Gustmann J. Mit plättchenreichem Plasma Knochen schneller und sicher regenerieren Teil2. Cerasorb in Verbindung mit PRP – der neue Goldstandard zum neuen Jahrtausend. Orale Implantol 2000; 2: 68-78.

Gutwald R, Pistner H, Reuther J, Mühling J. Biodegradation and tissue-reaction in a long-term implantation study of poly (L-lactide). J Mater Sci Mater Med 1994; 5: 585-590.

Hardoin P, Chopin D, Devyver B, Flautre B, Blary MC, Guigui P, Anselme K. Quantitative histomorphometric evaluation of spinal arthrodesis after biphasic calcium phosphate ceramic implantation in sheep. J Mater Sci Mater Med 1992; 3: 212-218.

Hata A, Lagna G, Masegué J, Haemmati-Brivanlou A. Smad6 inhibits BMP/Smad1 signaling by specifically competing with Smad4 tumor suppressor.

Genes Dev 1998; 12: 186-197.

Hench LL. Ceramic implants. Glass Ceramic Bulletin 1975; 22: 82-109.

Hensel MJ, Schulze KJ. Entwicklung und tierexperimentelle Testung neuentwickelter poröser Biogläser / Bioglaskeramik als resorbierbarer Knochenersatz.

Vortrag im Rahmen beim Deutschen Orthopädenkongreß, Wiesbaden, 2000.

Hom DB, Thatcher G, Tibesar R. Growth factor Therapy to Improve Soft Tissue Healing. Facial Plastic Surgery 2002; 18: 41-51.

Huang LH, Neiva RE, Soehren SE, et al. The effect of platelet-rich plasma on the coronally advanced flap root coverage procedure: A pilot human trial. J Periodontol 2005; 76 (10): 1768-1777.

Ishii-Watabe A, Uchida E, Mizuguchi H, Hayakawa T. On the mechanism of plasmin-induced platelet aggregation. Biochem Pharmacol 2000; 59: 1345-1355.

Ishikawa K, Takagi S, Chow LC, Ishikawa Y. Properties and mechanisms of fast-setting calcium phosphate cements.

J Mater Sci Mater Med 1995; 6: 528-533.

Jaakkola T, Rich J, Tirri T, Narhi T, Jokinen M, Seppala J, Yli-Urpo A. In vitro Ca-P precipitation on biodegradable thermoplastic composite of poly (epsilon-caprolactone-co-DL-lactide) and bioactive glass (S53P4).

Biomaterials 2004; 25 (4): 575-581.

Jeppson C, Astrand J, Tägil M, Aspenberg P. A combination of bisphosphonate and BMP additives in impacted bone allografts.

Acta orthopaedica Scandinavica 2003; Vol 74 (4): 483-489.

Jiang D, Dziak R, Lynch SE, Stephan EB. Modification of an osteoconductive anorganic bovine bone mineral matrix with growth factors. J Periodontol 1999; 70: 834-839.

Joyce ME, Bolander ME. Role of transforming growth factor-beta. In: Habal MB, Reddi AH (eds). Bone grafts and bone substitutes. Saunders, Philadelphia, 1992; 99-111.

Kai T, Shao-qing G, Geng-ting D. In vivo evaluation of bone marrow stromal-derived osteoblasts-porous calcium phosphate ceramic composites as bone graft substitute for lumbar intervertebral spinal fusion. Spine 2003; 28 (15): 1653-1658.

Kaiser E, Delling G. Osteozyten - ein Organ im Aufwind morphologischer und zellbiologischer Forschung!
Osteologie 2002; 11 / 4: 219-236.

Kakiuchi M, Hosoya T, Takaoka K, Amitani K, Ono K. Human bone matrix gelatine as a clinical alloimplant. Int Orthop 1985; 9: 181-192.

Kasten P, Vogel J, Geiger F, Niemeyer P, Luginbühl R, Szalay K. The effect of platelet-rich plasma on healing in critical-size long-bone defects.
Biomaterials 2008; 29: 3983-3992.

Kessler S, Kastler S, Mayr-Wohlfahrt U, Puhl W, Gunther KP. Stimulation of primary osteoblast cultures with rh-TGF-beta, rh-bFGF, rh-BMP 2 and rx-BMP 4 in an in vitro model. Orthopädie 2000; 29: 107-111.

Kingsley K, Rust WL, Huff JL, Smith RC, Plopper GE. PDGF-BB enhances expression of and reduces adhesion to laminin-5 in vascular smooth muscle cells. Biochem Biophys Res Commun 2002; 294 (5): 1017-1022.

Knaepler H. Thermische Behandlung allogener Knochentransplantate – experimentelle Ergebnisse. In: Schnettler R, Markgraf E, editors. Knochenersatzmaterialien und Wachstumsfaktoren. Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 1997: 118-122.

Knaepler H, Garrel T von, Seipp HM, Ascherl R. Experimentelle Untersuchungen zur thermischen Desinfektion und Sterilisation allogener Knochentransplantate und deren Auswirkung auf die biologische Wertigkeit. Unfallchirurg 1992; 95: 477.

Korchynsky O, ten Dijke P. Bone morphogenetic protein receptors and their nuclear effectors in bone formation.

In: Vukicevic S, Sampath KT (Hrsg.): Bone Morphogenetic Proteins. From Laboratory to Clinical Practice. Birkenhäuser Verlag, Basel 2002: 31-60.

Komiya K, Nasuno S, Uchiyama K, Takahira N, Kobayashi N, Minehara H, Watanabe S, Itoman M. Tatus of bone allografting in Japan – Nation-wide survey of bone grafting performed from 1995 through 1999. Cell Tissue Bank 2003; 4(2-4): 217-220.

Kondo Y, Irie K, Ikegame M, Ejiri S, Hanada K, Ozawa H. Role of stromal cells in osteoclast differentiation in bone marrow. J Bone Miner Metab 2001; 19 (6): 352-358.

Lawrence WT. Physiology of the acute wound. Clinics in Plastic Surgery 1998; 25: 321-339.

Lee KS, Kim HJ, Li QL, Chi XZ, Ueta C, Komori T, Wozney JM, Kim EG, Choi JY, Ryoo HM et al.

Runx2 is a common target of transforming growth factor β 1 and bone morphogenetic protein 2, and cooperation between Runx2 and Smad5 induces osteoblast-specific gene expression in the pluripotent mesenchymal precursor cell line C2C12.

Mol Cell Biol 2000; 20: 8783-8792.

Le Huc JC, Clement D, Brouillaud B, Barthe N, Dupuy B, Foliguet B, Basse-Cathalinat B. Evolution of the local calcium content around irradiated beta-tricalcium phosphate ceramic implants: In vivo study in the rabbit. Biomaterials 1998; 19 (7-9): 733-738.

Le Huc JC, Schaefferbeke T, Clement D, Faber J, Le Rebeller A. Influence of porosity on the mechanical resistance of hydroxyapatite under compressive stress. Biomaterials 1995; 16: 113-118.

Lind M. Growth factor stimulation of bone healing. Effects on osteoblasts, osteotomies and implant fixation. Acta Orthopaedia Scandinavica 1998; 2 (37): 283.

Linhart W, Briem D, Peters A, Lehmann W, Windolf J, Rueger JM. Resorbierbare Kalziumphosphatzemente. *Trauma Berufskrankheit* 2004; online: 29. Oktober 2004.

Lowenstam HA, Weiner S. *On Biomineralization*. Oxford University Press New York, Oxford 1989.

Macdonald BR, Gowen M. *The cell biology of bone*.

Baillieres Clin Rheumatol 1992; 7n (3): 421-443.

Mainil-Varlet P, Gogolewski S, Nieuwenhuis P. Long-term soft tissue reaction to various polylactides and their in vivo degradation. *J Mater Sci Mater Med* 1996; 7: 713-721.

Malaval L, Modrowski D, Gupta AK, Aubin JE. Cellular expression of bone-related proteins during in vitro osteogenesis in rat bone marrow stromal cell cultures. *Journal of Cell Physiology* 1994; 158: 555-572.

Mandelkow HK, Hallfeldt KK, Kessler SB, Gayk M, Siebeck M, Schweiberer L. Knochenneubildung nach Implantation verschiedener Hydroxylapatitkeramiken. Tierexperimentelle Studie am Bohrlochmodell der Schafstibia. *Unfallchirurg* 1990; 93 (8): 376-379.

Mannaioni PF, Di Bello MG, Masini E. Platelets and inflammation: Role of Platelet-derived growth factor, adhesion molecules and histamine. *Inflammation Res* 1997; 46: 4-18.

Marks SC, Hermey DC. The structure and development of bone. In: Bilezikian JP, Raisz LG, Rodan GA (eds). *Principles of bone biology*. Academic Press, San Diego, 1996; 3-14.

Martinovic S, Borovecki F, Sampath KT, Vukicevic S. Biology of bone morphogenetic proteins.

In: Vukicevic S, Sampath KT (Hrsg.): *Bone Morphogenetic Proteins. From Laboratory to Clinical Practice*. Birkenhäuser Verlag, Basel 2002: 87-119.

Marx RE, Carlson ER, Eichstaedt RM, Schimmele SR, Strauss JE, Georgeff KR. Platelet-rich plasma: Growth factor enhancement for bone grafts. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 1998; 85 (6): 638-646.

McKibbin B. The biology of fracture healing in long bones. *J Bone Joint Surg Br.* 1978; 6: 150.

Mehrra BJ, Rowe NM, Steinbrech DS, Dudziak ME, Saadeh PB, McGarthy JG et al. Rat mandibular distraction osteogenesis: II. Molecular analysis of transforming growth factor beta-1 and osteocalcin gene expression. *Plast Reconstr Surg* 1999; 103 (2): 536-547.

Messora MR, Nagata MJH, Dornelles RCM, Bomfim SRM, Furlaneto FAC, de Melo LGN, Deliberador TM, Bosco AF, Carcia VG, Fucini SE. Bone healing in critical-size defects treated with platelet-rich plasma activated by two different methods. A histologic and histometric study in rat calvaria. *J Periodont Res* 2008; 43: 723-729.

Mickiewicz RA, Mayes AM, Knaack D. Polymer-calcium phosphate cement composites for bone substitutes. *J Biomed Mater Res* 2002; 61 (4): 581-592.

Monov G, Fuerst G, Tepper G, et al. The effect of platelet-rich plasma upon implant stability measured by resonance frequency analysis in the lower anterior mandibles. *Clin Oral Implants Res* 2005; 16 (4): 461-465.

Mundy GR. Regulation of bone formation by bone morphogenetic proteins and other growth factors. *Clin Orthop* 1996; 323: 24-28.

Nickel J, Dreyer M, Sebald W. Deciphering the binding code of BMP-receptor interaction.

In: Vukicevic S, Sampath KT (Hrsg.): *Bone Morphogenetic Proteins. From Laboratory to Clinical Practice.* Birkenhäuser Verlag, Basel 2002: 61-85.

Ooms EM, Wolke JGC, van de Heuvel MT, Jeschke B, Jansen JA. Histological evaluation of the bone response to calcium phosphate implanted in cortical bone. *Biomaterials* 2003; 24: 989-1000.

Osborn JF. Biowerkstoffe und ihre Anwendung bei Implantaten. *SchwMschrZahnheilk* 1979; 89: 1138-1139.

Paralker VM, Grasser WA, Baumann AP, Castleberry TA, Owen TA, Vukicevic S. Prostate-derived factor and growth differentiation factor-8: newly discovered members of the TGF- β superfamily.

In: Vukicevic S, Sampath KT (Hrsg.): *Bone Morphogenetic Proteins. From Laboratory to Clinical Practice*. Birkenhäuser Verlag, Basel 2002: 19-30.

Pistner H, Gutewald R, Schwartz G, Mühling J, Reuther J. Vollständige Biodegradation von spritzgegossenen Polylactid-Osteosynthesematerialien in Hart- und Weichteilgewebe in vivo im Langzeitversuch bis 36 Monaten. In: Claes L, Ignatius A (Hrsg). *Biodegradierbare Implantate und Materialien*. Hefte Unfallchir 1997; 265: 133-145.

Pool R. Coral chemistry leads to human bone repair. *Science* 1995; 267 (5205):1772.

Porter AE, Patel N, Skepper JN, Best SM, Bonfield W. Comparison of in vivo dissolution processes in hydroxyapatite and silicon-substituted hydroxyapatite bioceramics. *Biomaterials* 2003; 24 (25): 4609-4620.

Probst A, Spiegel HU. Cellular mechanisms of bone repair. *J Invest Surg* 1997; 10: 77-86.

Rahn BA. Bone healing: histologic and physiologic concepts. *Bone in clinical orthopaedics: a study in comparative osteology*. W.B. Saunders Philadelphia. 1982: 235.

Rahn BA, Neff J, Leutenegger A et al. Integration of synthetic apatite of various pore size and density in bone. In: Christel P, Meunier A, Lee AJC (eds). Biological and biomechanical performance of biomaterials. Elsevier, Amsterdam, 1986.

Ramoshebi LN, Matsaba T, Teare J, Renton L, Patton J, Ripamonti U. TGF- β superfamily members and delivery systems in bone regeneration.

Tissue engineering Exp. Rev. Mol. Med. 2002; 2: 1-11.

Reddi AH. Bone Morphogenetic Proteins: From Basic Science to Clinical Applications. J Bone Joint Surg (Am) 2001; 83A: 1-6.

Reddi AH. Initiation of fracture repair by bone morphogenetic proteins.

Clin Orthop 1998; 355: 66-72.

Reddi AH. Bone and cartilage differentiation.

Curr Opin Genet Dev 1994; 4 (5): 737-744. Review.

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.

Remedios A. Bone and bone healing.

Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice 1999; Volume 29 (5): 1029-1044.

Rodriguez A, Anastassov GE, Lee H, Buchbinder D, Wettan H. Maxillary sinus augmentation with deproteinated bovine bone and platelet-rich plasma with simultaneous insertion of endosseous implants. Journal of Oral and Maxillofacial Surgery 2003; 61: 157-163.

Roldan JC, Jepson S, Miller J, Freitag S, Rueger DC, Acil Y, Terheyden H. Bone formation in the presence of platelet-rich-plasma vs. bone morphogenetic protein-7.

Bone 2004; Vol 34 (1): 80-90.

Rosen V, Wozney JM, Wang EA, Cordes P, Celeste A, Mc Quaid D, Kurtberg L. Purification and molecular cloning of a novel group of BMPs and localization of BMP mRNA in developing bone. *Connec Tissue Res* 1989; 20: 313-319.

Ross R. Platelet derived growth factor. *Annu Rev Med* 1987; 13: 71-79.

Roux W, (1895). In: Waldeyer A, Mayet A (Hrsg).

Anatomie des Menschen 1. De-Gruyter-Verlag, Berlin, 1993; 16 (Band 1): 39-40.

Rübsamen-Waigmann H. Virussicherheit von Blutspenden und Knochentransplantaten.

In: Schnettler R, Markgraf E, editors. *Knochenersatzmaterialien und Wachstumsfaktoren*. Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 1997; 1-7.

Rueger DC. Biochemistry of bone morphogenetic proteins.

In: Vukicevic S, Sampath KT (Hrsg.): *Bone Morphogenetic Proteins. From Laboratory to Clinical Practice*. Birkenhäuser Verlag, Basel 2002: 1-18.

Rueger JM. Knochenersatzmittel.

Hefte Unfallheilk 1992; 213.

Rueger J. Knochenersatzmaterial. Heutiger Stand und Ausblick.

Orthopäde 1998; 27: 72-79.

Sailer HF, Weber FE. Knochenersatzmaterialien.

Mund Kiefer Gesichtschir 2000; 4 Suppl 1: 384-391.

Sampath TK, Özkaynak E, Jones WK et al. Recombinant human osteogenic protein (hOP-1) induces new bone formation with a specific activity comparable to that of natural bone bovine osteogenic protein. *J Bone Min Res* 1991; 6: 155-167.

Sanchez A, Sheridan P, Kupp L. Is Platelet-rich Plasma the Perfect Enhancement Factor? A Current Review. *The International Journal of Oral & Maxillofac. Impl.* 2003; 18 (1): 93-103.

Santavira S, Konttinen YT, Saito T, Grönblad M, Partio EK, Kemppinen P, Rokkanen P. Immune response to polyglycolic acid implants. *J Bone Joint Surg Br* 1990; 72: 597-600.

Sarmiento A, Latta LL. Closed functional treatment of fractures. Springer. Berlin Heidelberg New York. 1981.

Sartoris DJ, Holmes RE, Bucholz RW, Mooney V, Resnick D. Coralline hydroxyapatite bone-graft substitutes in a canine diaphyseal defect model. Radiographic-histometric correlation. *Invest Radiol* 1987; 22 (7): 590-596.

Savage C, Das P, Finelli AL, Townsend SR, Sun CY, Baird SE, Padgett RW. *Caenorhabditis elegans* genes *sma-2*, *sma-3* and *sma-4* define a conserved family of transforming growth factor β pathway components. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; 93: 790-794.

Schlegel KA, Kloss FR, Schultze-Mosgau S, Neukam FW, Wiltfang J. Tierexperimentelle Untersuchung zum Einfluss verschiedener Thrombozytenkonzentrate auf die Defektregeneration mit autogenem Knochen und Kombination von autogenem Knochen und Knochenersatzmaterialien (Biogran und Algipore). *Mund Kiefer Gesichtschir* 2003; 7 (2): 112-118.

Schmitz JP, Hollinger JO. The critical size defect as an experimental model for craniomandibular nonunion. *Clinical Orthopaedics and Related Research* 1986; 205: 299-308.

Schneider GB, Relfson M. Pluripotent hemopoietic stem cells give rise to osteoclasts in vitro: effects of rGM-CSF. *Bone Miner* 1989; 5: 129-138.

Schnettler R. Experimentelle Untersuchungen zum Einwachsverhalten von autogenen und allogenen Spongiosatransplantaten im Vergleich zu Keramik, DBM und basischem Fibroblastenwachstumsfaktor. Habilitationsschrift, Jena, 1993.

Schnettler, R. Persönliche Mitteilung an Herrn Dr. Nikolaj Wieghorst, Gießen, 2000.

Schnettler R, Alt V, Dingeldein E, Pfefferle HJ, Kilian O, Meyer C, Heiss C, Wenisch S. Bone ingrowth in bFGF-coated hydroxyapatite ceramic implants.

Biomaterials 2003; 24 (25): 4603-4608.

Schnettler R, Dingeldein E. Untersuchungen zur knöchernen Integration einer Hydroxylapatitkeramik (HAK) (Endobon[®]) und bFGF im Vergleich zu autogenen Spongiosazylindern. In: Schnettler R, Markgraf E, editors. Knochenersatzmaterialien und Wachstumsfaktoren. Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 1997; 31-42.

Schnettler R, Dingeldein E. Inorganic bone substitutes. In: Lewandrowski K-U, editor. Tissue Engineering and Biodegradable Equivalents. Scientific and Clinical Applications. New York, Basel: Dekker M. Inc., 2002: 401-432.

Schnettler R, Dingeldein E, Herr G. Defektaufbau mit demineralisierter Knochenmatrix. Experimentelle Untersuchungen am Minischwein.

Orthopäde 1998; 27: 80-88.

Schnettler R, Stahl JP, Alt V, Pavlidis T, Dingeldein E, Wenisch S. Calcium Phosphate-Based Bone Substitutes. Eur J Trauma 2004; 30 (4): 219-229.

Schnettler R, Steinau HU. Septische Knochenchirurgie. Georg Thieme Verlag. Stuttgart, New York 2004.

Schnürer SM, Gopp U, Kühn K-D, Breusch SJ. Knochenersatzwerkstoffe.

Orthopäde 2003; 32 (1): 2-10.

Schulte W. Zentrifugiertes Eigenblut zur Füllung großer Knochendefekte: Eine Modifikation der Eigenblutmethode. Journal of Oral and Maxillofacial Surgery 2001; 59: 1119-1121.

Schumpelick V, Bleese NM, Mommsen U.

Chirurgie. Enke Ferdinand Verlag 1999. 4. Auflage. Thieme.

Schweiberer L, Hallfeldt K, Mandelkow H. Osteoinduktion.
Orthopäde 1986; 15(1): 3-9.

Schweiberer L, Eitel F. Bone transplantation in animals and man. In: Altman H, Büchner F, Cottier H, Grundmann E, Holle G, Letterer E et al. (Hrsg.) Handbuch der allgemeinen Pathologie, VI edn. Springer Heidelberg New York, S 617-654.

Silver IA, Murrills RJ, Etherington DJ. Microelectrode studies on the acid microenvironment beneath adherent macrophages and osteoclasts.
Experimental Cell Research 1988; 175: 266-276.

Seher, GA. In-vitro-Untersuchungen zur Zellstimulation von Thrombozytenkonzentraten (PRP). Dissertationsschrift, Tübingen, 2004.

Sekelsky JJ, Newfield SJ, Raftery LA, Chartoff EH, Gelbart WM. Genetic characterization and cloning of mothers against dpp, a gene required decapentaplegic function in *Drosophila melanogaster*.
Genetics 1995; 139: 1347-1358.

Skerry TM, Bitensky L, Chayen J, Lanyon LE. Early strain-related changes in enzyme activity in osteocytes following bone loading in vivo.
J Bone Miner Res 1989; 4: 783-788.

Slater M, Patava J, Kingham K, Mason RS. Involvement of Platelets in Stimulating Osteogenic Activity. *Journal of Orthopaedic Research* 1995;13 (5): 655–663.

Sohlheim E. Growth factors in bone. *Int Orthop* 1998; 22: 410-416.

Sommerfeldt DW, Rubin CT. Biology of bone and how it orchestrates the form and function of the skeleton. *Eur Spine J* 2001; 10 Suppl 2:86-95.

Sugimoto T, Kanatani M, Kano J, Kobayashi T, Yamaguchi T, Fukase M, Chihara K. Growth factors in bone. *Int Orthop* 1998; 22: 410-416.

Takagi S, Chow LC. Formation of macropores in calcium phosphate cement implants.

J Mater Sci Mater Med 2001; 12: 135-139.

Tatsuyama K, Maezawa Y, Baba H, et al. Expression of various growth factors for cell proliferation and cytodifferentiation during fracture repair of bone. Eur J Histochem 2000; 44: 269-278.

Teitelbaum SL, Tondravi MM, Ross FP. Osteoclasts, macrophages and the molecular mechanisms of bone resorption. J Leukoc Biol 1997; 61 (4): 381-388.

Thielemann FW, Etter C,. Evaluation of experimental osteoinduction in different animal models. In: Aebi M, Reazzoni P, editors. Bone transplatio. Springer, Berlin Heidelberg New York, 1989.

Thielemann FW, Schmid U, Holz U, Herr G. Vergleich des Einbaverhaltens von allogener Knochenmatrix mit autogener Spongiosa am Defektmodell der Hundetibia. Chirurgisches Forum 1991; 209-213.

Tischler M. Platelet rich plasma. The use of autologous growth factors to enhance bone and soft tissue grafts. N Y State Dent J 2002; 68 (3): 22-24.

Tolga FT, Burak D. Platele-Rich Plasma: A promising innovation in Dentistry. J Can Dent Assoc 2003; 69 (10): 664.

Urist MR. Surface-decalcified allogenic bone (SDAB) implants. A preliminary report of 10 cases and 25 comparable operations with undecalcified lyphilized bone implants. Clin Orthop 1968; 56: 37-50.

Urist MR. A bone morphogenetic system in residues of bone matrix in the mouse. Clin Orthop 1973; 91: 210-220.

Urist MR. Fundamental and clinical bone physiology. Lippincott 1980. Philadelphia.

Urist MR. New bone formation induced in postfetal life by bone morphogenetic protein.

In: Becker RO (hrsg.): Mechanisms of growth control. Springfield. Illinois 19981: 406-434.

Urist MR. Human bone morphogenetic protein.

Proc Soc Exp Biol Med 1983; 173: 194-201.

Urist MR. Bone morphogenetic protein in biology and medicine. In: Lindholm TS (ed). Bone morphogenetic proteins: biology, biochemistry and reconstructive surgery. Academic Press, London, 1996: 7-27.

Urist MR, Granstein R, Nogami H, Svenson L, Murphy R. Transmembrane bone morphogenesis across multiple-walled diffusion chambers. New evidence for a diffusible bone morphogenetic property. Arch Surg 1977; 112(5): 612-619.

Urist MR, Lietze A, Mitzutani H. A bovine low molecular weight bone morphogenetic protein (BMP) fraction. Clin Orthop 1982; 162: 272-281.

Urist MR, Urist JM, Dubuc FL, Strates BS. Quantitation of new bone formation in intramuscular implants of bone matrix in rabbits. Clin Orthop 1970; 68: 279-293.

Vimar K, Bachmann KD. Bekanntmachungen: Wissenschaftlicher Beirat der Bundesärztekammer zum Führen einer Knochenbank.

Deutsches Ärzteblatt 1993; 34-35: A-2166, B-1872, C-1748.

Vukicevic et al (eds). Bone morphogenetic proteins: From laboratory to clinical practice. Birkhäuser 2002.

Wang EA, Rosen V, D'Alessandro JS. Recombinant human bone morphogenetic protein induces bone formation. Proc Natl Acad Sci USA 1990; 87: 2220-2227.

Wang JS. Basic fibroblast growth factor for stimulation of bone formation in osteoinductive or conductive implants. *Acta Orthop Scand* 1996; (Suppl 269) 67: 1-33.

Weibrich G, Buch RSR, KleisWKG, HafnerG, Hitzler We, Wagner W. Quantification of thrombocyte growth factors in platelet concentrates produced by discontinuous cell separation.

Growth Factors 2002; 20: 332-333.

Weibrich G, Kleis WKG, Hafner G. Growth factor levels in the platelet-rich plasma produced by two different methods: Curasan-type PRP kit versus PCCS PRP system. *Int J Oral maxillofac implants* 2002; 17: 184-190.

Wenisch S, Stahl J-P, Horas U, Kilian O, Heiss C, Schnettler R. Ultrastrukturelle Untersuchungen zum zellvermittelten Abbau einer Calciumphosphatkeramik.

Unfallchirurg 2003; 106: 387-391.

Whitman DH, Berry RL. Platelet gel: An autologous alternative to fibrin glue with applications in oral and maxillofacial surgery. *Journal of Maxillofacial Surgery* 1997; 55: 1294-1299.

Wiltfang J, Kloss FR, Kessler P, Nkenke E, Schultze-Mosgau S, Zimmermann R, Schlegel KA. Effects of platelet-rich plasma on bone healing in combination with autogenous bone and bone substitutes in critical-size defects. An animal experiment. *Clin Oral Impl Res* 2004; 15: 187-193.

Wiltfang J, Kloss F, Kessler P, Zimmermann R, Schultze-Mosgau S, Neukam FW, Schlegel KA. Tierexperimentelle Studie zum Einsatz von Knochenersatzmaterialien und thrombozytenreichen Plasma in klinisch relevanten Defekten. *Dtsch Zahnärztl Z* 2002; 57: 307-311. (a)

Wiltfang J, Schlegel KA, Zimmermann R, Merten H, Kloss F, Neukam FW, Schultze-Mosgau S. Beurteilung der Knochenreparation nach kombinierter Anwendung von platelet-rich-plasma und Knochenersatzmaterialien im Rahmen der Sinuselevation. Dtsch Zahnärztl Z 2002; 57: 1-5. (b)

Wippermann BW, Schrott HE, Steeg S, Tscherne. Komplikationen der Spongiosaentnahme am Beckenkamm. Eine retrospektive Analyse von 1191 Fällen. 1997; 68(12): 1286-1291.

Wissenschaftlicher Beirat der Bundesärztekammer. Richtlinien zum Führen einer Knochenbank. Dtsch Ärzteblatt 1990; 87: 41.

Wissing H, Stürmer KM, Breidenstein G. Die Wertigkeit verschiedener Versuchstierspezies für experimentelle Untersuchungen am Knochen. Hefte zur Unfallheilkunde, Heft 212 1990; 479-488.

Yasko AJ, Lane JM, Fellingner EJ, Rosen V, Wozney JM, Wang EA. The healing of segmental bone defects, induced by recombinant human bone morphogenetic protein (rh-BMP-2). Bone Joint Surg Am 1992; 74: 659-665.

Ziv V, Wagner HD, Weiner S. Microstructure-Microhardness relation in parallel fibered and lamellar bone. Bone 1996; 18 (5): 417-428.

10. DANKSAGUNG

Ich möchte Herrn Univ.-Prof. Dr. Dr. Reinhard Schnettler für die Überlassung des interessanten Themas, die Bereitstellung und Nutzung des „Labors für experimentelle Unfallchirurgie“ und die Betreuung der Promotion als Doktorvater herzlich danken.

Mein ganz besonderer Dank gilt meinem Betreuer Herrn Dr. Theodoros Pavlidis, ohne dessen Hilfe die Operationen und Experimente nicht hätten durchgeführt werden können.

Bedanken möchte ich mich weiterhin beim gesamten Laborteam des „Labors für experimentelle Unfallchirurgie“ für die Herstellung der zahlreichen histologischen Präparate und für die Hilfe bei wichtigen Entscheidungen und Fragestellungen.

Die Arbeit mit dem Team um Frau Privatdozentin Dr. Sabine Wenisch hat mir sehr viel Spaß gemacht und ich möchte mich besonders bei Frau Ida Schütz und Frau Anne Hild für ihre tatkräftige Unterstützung bedanken.

Ich danke weiterhin Herrn Dr. Bödecker (Institut für medizinische Informatik) für die statistische Auswertung meiner Ergebnisse.

Meinen Eltern, besonders meinem Vater, möchte ich für die moralische und geistige Unterstützung beim Erstellen dieser Promotion und die Unterstützung während meines gesamten Studiums danken.

Danken möchte ich außerdem meiner Freundin Katrin, die mir die gesamte Zeit Mut zugesprochen hat und auch allzu oft vor der Arbeit an dieser Promotion zurückstecken musste.

Allen nicht namentlich erwähnten Personen, die in irgendeiner Art und Weise zum Gelingen dieser Doktorarbeit beigetragen haben, möchte ich hiermit ebenfalls DANKE sagen.

**Der Lebenslauf wurde aus der elektronischen
Version der Arbeit entfernt.**

**The curriculum vitae was removed from the
electronic version of the paper.**

12. ERKLÄRUNG

Ich erkläre:

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

(Jan Philipp Schüttrumpf)



edition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

VVB LAUFERSWEILER VERLAG
STAUFBENBERGRING 15
D-35396 GIESSEN

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

ISBN: 978-3-8359-5583-7



9 783835 955837

