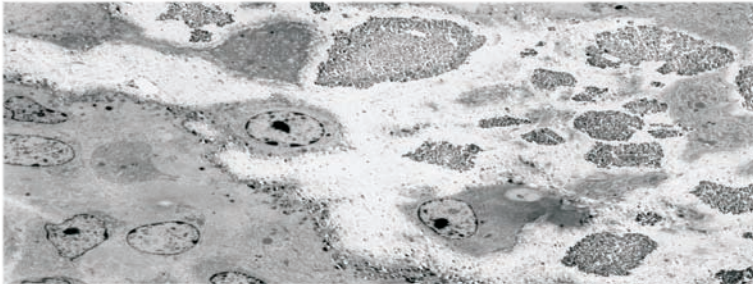


UNTERSUCHUNGEN ZUR KNOCHENDEFEKTHEILUNG  
UNTER EINFLUSS THROMBOZYTÄRER  
WACHSTUMSFAKTOREN NACH IMPLANTATION  
EINES KNOCHENERSATZSTOFFES AUF  
HYDROXYLAPATITBASIS

EINE EXPERIMENTELLE STUDIE AM MINIATURSCHWEIN

FILIP JANU



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



*édition scientifique*  
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

**Das Werk ist in allen seinen Teilen urheberrechtlich geschützt.**

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

1. Auflage 2011

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

1<sup>st</sup> Edition 2011

© 2011 by VVB LAUFERSWEILER VERLAG, Giessen  
Printed in Germany



*édition scientifique*  
**VVB LAUFERSWEILER VERLAG**

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

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

Aus dem Klinikum Veterinärmedizin  
der Justus-Liebig-Universität Gießen  
Betreuerin: Prof. Dr. S. Wenisch

**UNTERSUCHUNGEN ZUR KNOCHENDEFEKTHEILUNG UNTER EINFLUSS  
THROMBOZYTÄRER WACHSTUMSFAKTOREN NACH IMPLANTATION  
EINES KNOCHENERSATZSTOFFES AUF HYDROXYLAPATITBASIS**

-EINE EXPERIMENTELLE STUDIE AM MINIATURSCHWEIN-

**INAUGURAL-DISSERTATION**

zur Erlangung des Grades eines Dr. med. vet.

beim Fachbereich Veterinärmedizin

der Justus-Liebig-Universität Gießen

eingereicht von

**Filip Janu**

Tierarzt aus Brünn

Gießen 2011

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

Dekan: Prof. Dr. M. Kramer

Gutachterin: Prof. Dr. S. Wenisch

Gutachter:: Prof. Dr. M. Kramer

Tag der Disputation: 07.02.2011



Meinen Eltern

## Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung.....	1
2. Literaturübersicht.....	3
2.1 Knochendefekte – Ursachen und Therapiemöglichkeiten.....	3
2.2 Knochendefektheilung.....	4
2.3 Knochenersatzstoffe – Entwicklung, Eigenschaften und Einteilung .....	9
2.4 Plättchenreiches Plasma (PRP) und dessen Einfluss auf die Knochendefektheilung ..	16
2.5 Thrombozytäre Wachstumsfaktoren.....	18
2.5.1 Fibroblast growth factor (FGF).....	18
2.5.2 Insulin-like growth factors (IGFs) .....	18
2.5.3 Platelet-derived growth factor (PDGF) .....	19
2.5.4 Transforming growth factor beta (TGF- $\beta$ ) .....	20
2.5.5 Vascular endothelial growth factor (VEGF).....	20
3. Material und Methoden .....	22
3.1 Versuchstiere .....	22
3.1.1 Spezies und Rasse.....	22
3.1.2 Tierdaten .....	22
3.1.3 Haltung und Fütterung .....	22
3.2 Versuchsaufbau .....	23
3.2.1 Der Hydroxylapatit-Knochenersatzstoff Ostim®.....	23
3.2.2 Plättchenreiches Plasma und die Bestimmung der Thrombozytenzahl .....	24
3.2.3 Das Tierkollektiv .....	25
3.2.3 Implantation.....	25
3.2.3.1 Operation und Operationstechnik.....	25
3.2.3.2 Postoperative Versorgung.....	26
3.3 Gewinnung und Aufbereitung der Präparate .....	27
3.3.1 Explantation und Perfusion.....	27
3.4 Histologie .....	28

## Inhaltsverzeichnis

---

3.4.1 Einbettung in Technovit 7200 .....	28
3.4.2 Trenn-Dünnschliff-Technik.....	28
3.4.3 Toluidinblau-Färbung der Dünnschliff-Präparate .....	29
3.5 Immunhistochemie.....	30
3.5.1 Paraffintechnik.....	30
3.5.1.1 Entkalkung .....	30
3.5.1.2 Einbettung.....	30
3.5.1.3 Schnittanfertigung .....	30
3.5.1.4 Färbung mit Hämatoxylin-Eosin .....	31
3.5.2 Technovittechnik.....	31
3.5.2.1 Einbettung.....	31
3.5.2.2 Schnittanfertigung .....	31
3.5.3 Antigennachweis .....	32
3.6 Dokumentation der Ergebnisse der Histologie und Immunhistochemie .....	34
3.7 Transmissionselektronenmikroskopie .....	34
3.7.1 Epon-Einbettung.....	34
3.7.2 Semidünnschnitte und Elektronenmikroskopie .....	34
3.7.3 Färbung mit Safranin .....	35
3.8 Datenquantifizierung .....	35
4. Ergebnisse.....	37
4.1 Postoperativer Verlauf.....	37
4.2 Wachstumsfaktoren-Konzentrationen im Blut-Plasma und im Thrombozytenkonzentrat .....	37
4.2.1 Thrombozytenkonzentrat .....	37
4.3 Histologie.....	38
4.4 Immunhistochemie ASMA-Nachweis .....	49
4.5 Immunhistochemie Kollagen I-Nachweis.....	52
4.6 Transmissionselektronenmikroskopie .....	57
4.7 Datenquantifizierung .....	65

## Inhaltsverzeichnis

---

5. Diskussion .....	68
6. Zusammenfassung .....	84
7. Summary .....	86
8. Literaturverzeichnis.....	88
9. Danksagung .....	109
10. Erklärung .....	110

## Abbildungsverzeichnis

---

<b>Abbildungsverzeichnis</b>	<b>Seite</b>	
<b>Abbildung 1</b>	Schematische Darstellung der Fibroblast-Myofibroblast Modulation	<b>6</b>
<b>Abbildung 2</b>	Ultrastrukturelle Ansicht Ostim ®	<b>23</b>
<b>Abbildung 3</b>	Dokumentation der Messmethode. Rechteckige Messfelder entlang der Bohrkante des Defektes	<b>36</b>
<b>Abbildung 4</b>	Dokumentation der Messmethode. AOIs innerhalb eines rechteckigen Messfelder	<b>36</b>
<b>Abbildung 5</b>	Defekt in der Übersicht. Dünnschliffhistologie, Gruppe I/PRP-, Toluidinblau-Färbung	<b>40</b>
<b>Abbildungen 6 a,b,c</b>	Strukturelle Details der Defekte, Gruppe I/PRP-	<b>41</b>
<b>Abbildung 7</b>	Strukturelles Detail eines Defektes, Dünnschliffhistologie, Gruppe I/PRP-, Toluidinblaufärbung	<b>42</b>
<b>Abbildung 8</b>	Dünnschliffhistologie, Gruppe II/PRP+, Toluidinblau-Färbung	<b>43</b>
<b>Abbildungen 9 a,b</b>	Dünnschliffhistologie, Gruppe II/PRP+, Toluidinblau-Färbung	<b>44</b>
<b>Abbildungen 10 a,b</b>	Dünnschliffhistologie, Gruppe III/Leerdefekt, Toluidinblaufärbung	<b>46</b>
<b>Abbildung 11</b>	Ausschnitt eines Defektes nahe der Bohrkante, Paraffinschnitt, Gruppe I/PRP-, Immunhistochemie mittels Anti-ASMA-Antikörpern, Kernfärbung mittels Hämatoxylin	<b>49</b>
<b>Abbildungen 12 a,b</b>	Ausschnitt des Granulationsgewebes nahe der Bohrkante - Paraffinschnitt, Gruppe I/PRP -, Immunhistochemie mittels Anti-ASMA-Antikörpern, Kernfärbung mittels Hämatoxylin	<b>50</b>
<b>Abbildung 13</b>	Defekt in der Übersicht. Paraffinschnitt, Gruppe III/Leerdefekte, Immunhistochemie mittels anti-ASMA-Antikörpern	<b>51</b>
<b>Abbildung 14</b>	Ausschnitt eines Defektes nahe der Bohrkante. Paraffinschnitt, Gruppe I/PRP -, Immunhistochemie mittels Anti-Kollagen I-Antikörpern, Gegenfärbung mit Hämatoxylin	<b>52</b>
<b>Abbildung 15</b>	Ausschnitt eines Defektes nahe der Bohrkante. Paraffinschnitt, Gruppe I/PRP -, Immunhistochemie mittels Anti-Kollagen I-Antikörpern, Gegenfärbung mit Hämatoxylin	<b>53</b>

## Abbildungsverzeichnis

---

<b>Abbildungen 16 a,b,c</b>	Ausschnitt des Defektes nahe der Bohrkante. Paraffinschnitt, Gruppe II/PRP +, Immunhistochemie mittels Anti-Kollagen I-Antikörpern, Gegenfärbung mit Hämatoxylin	<b>55</b>
<b>Abbildung 17</b>	Negativkontrolle, Gruppe I/PRP-, Gegenfärbung mit Hämatoxylin	<b>56</b>
<b>Abbildung 18</b>	Transmissionselektronenmikroskopische Übersicht eines peripheren Defektbereiches	<b>59</b>
<b>Abbildungen 19 a,b,c</b>	Transmissionselektronenmikroskopische Details eines peripheren Defektbereiches	<b>60</b>
<b>Abbildung 20</b>	Transmissionselektronenmikroskopische Übersicht von Granulationsgewebe in Nähe des Defektzentrums	<b>61</b>
<b>Abbildungen 21 a,b</b>	Myofibroblasten und Makrophagen innerhalb des Granulationsgewebes in der Übersicht	<b>62</b>
<b>Abbildung 22</b>	Fibronexus – Ultrastrukturelles Detail eines Myofibroblasten	<b>63</b>
<b>Abbildung 23</b>	Myofibroblast und Makrophage	<b>64</b>
<b>Abbildung 24</b>	Darstellung der in den drei Gruppen jeweils gemessenen Kollagen I-positiven Fläche in „% der Gesamtfläche	<b>66</b>
<b>Abbildung 25</b>	Darstellung des Merkmals Kollagen I-positiver Flächenanteil innerhalb eines Untersuchungsfeldes in Prozent	<b>67</b>

## Tabellenverzeichnis

---

<b>Tabellenverzeichnis</b>		<b>Seite</b>
<b>Tabelle 1</b>	Übersicht über die zahlreichen von Myofibroblasten synthetisierten Zytokine, Wachstumsfaktoren und Entzündungsmediatoren.	<b>7</b>
<b>Tabelle 2</b>	Internationale Terminologie der Transplantatart	<b>10</b>
<b>Tabelle 3</b>	Darstellung einer möglichen Einteilung der erhältlichen Knochenersatzstoffe	<b>16</b>
<b>Tabelle 4</b>	Tierversuch: Übersicht der Versuchsgruppen	<b>25</b>
<b>Tabelle 5</b>	Fixation, Einbettung und Untersuchungsmethoden der Knochenscheiben	<b>27</b>
<b>Tabelle 6</b>	Verwendete Antikörper	<b>32</b>
<b>Tabelle 7</b>	Mittels ELISA ermittelte Konzentrationen der Wachstumsfaktoren in den Thrombozytenkonzentrat und dem Blutplasma	<b>37</b>
<b>Tabelle 8</b>	Übersicht der Gruppen I/PRP-, II/PRP+, III/Leerdeckel bezüglich Menge, Vorkommen und Art des neugebildeten Knochens, Größe und Verteilungsmuster der Implantatpartikel und dem Vorkommen von Zellen	<b>48</b>

### Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
µg	Mikrogramm
µm	Mikrometer
§	Paragraph
%	Prozent
AA.	Arteriae
Abb.	Abbildung
ABC	Avidin-Biotin-Complex
Abs.	Absatz
aFGF	acidic Fibroblast Growth Factor
AOI	Area of interest
Aqua dest.	Aqua destillata
Aqua bidest.	Aqua bidestillata
ASMA	Alpha smooth-muscle actin
bFGF	basic Fibroblast Growth Factor
BMP	Bone Morphogenetic Proteins
BSE	Bovine spongiforme Enzephalopathie
bzw.	beziehungsweise
Ca/P-Verhältnis	Kalzium/Phosphor-Verhältnis
ca.	circa
cm	Zentimeter
CO	Kohlenmonoxid
CSF-1	Colony-Stimulating Factor 1
DBCS	Diamond bone cutting system
ECM	Extrazelluläre Matrix
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ED-A-FN	Extra domain A Fibronectin
ED-B-FN	Extra domain B Fibronectin
EGF	Epidermal Growth Factor
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay



## Abkürzungsverzeichnis

---

ENA-78	epithelial neutrophil-activating peptide 78
evtl.	eventuell
FBGC	Foreign Body Giant Cells
FGF	Fibroblast Growth Factor
g	Gramm
GM-CSF	Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor
h	Stunde
HCl	Salzsäure
HETEs	<i>hydroxyeicosatetraenoic acids</i>
HGF	Hepatocyte Growth Factor
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Wasserstoffperoxid
I.E.	internationale Einheiten
IGF	Insulin-like Growth Factor
Il	Interleukin
kDa	Kilo-Dalton
kg	Kilogramm
KG	Körpergewicht
KGF	Keratinocyte Growth Factor
l	Liter
M	Molar
m <sup>2</sup>	Quadratmeter
mg	Milligramm
min	Minuten
MIP	Macrophage Inflammatory Protein
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mRNA	messenger-RNA
NaCl	Natrium-Chlorid
NGF	Nerve Growth Factor
NO	Stickoxid
PBS	Phosphate buffered saline

## Abkürzungsverzeichnis

---

PDGF	Platelet Derived Growth Factor
pg	Pikogramm
PRP	Plättchenreiches Plasma
PVP-Jod	Povidon-Jod
RANTES	regulated, upon activation, normal T cell expressed and secreted
RER	raues endoplasmatisches Retikulum
SCF	Stem Cell Factor
TGF- $\beta$	Transforming growth factor beta
TNF- $\alpha$	Tumor necrosis factor alpha
U	Umdrehungen
V.	Vena
VEGF	Vascular endothelial growth factor
Vol %	Volumenprozent

### 1. Einleitung

Knochendefekte sind häufig die Folge von Knochenzysten, Knochtumoren und schwerwiegenden Trümmerfrakturen (Niedhart und Niethard 1998). Sie werden als Knochendefekte kritischer Größe bezeichnet, wenn sie aufgrund ihrer Ausdehnung nicht mehr aus körpereigener Kraft regenerieren können. Wegen der mangelnden Regenerationskapazität dienen zur Defektauffüllung, zur Wiederherstellung der knöchernen Architektur und der ursprünglichen mechanischen Belastbarkeit des zerstörten Skelettbereiches Knochentransplantate und Knochenersatzstoffe (Härtter et al. 1998).

Mit dem Ziel, eine schnellstmögliche und zuverlässige Defektheilung zu erreichen, wurden verschiedene Füllmaterialien in tierexperimentellen Studien überprüft (Wippermann 1997; Härtter et al. 1998; Schmitt et al. 1998; Knaak et al. 1999; Strauß 1999; Faldini et al. 2001; Hauschild et al. 2001a; Blendinger 2002; Wenz 2002) und in der Veterinärmedizin bereits erfolgreich am Patienten eingesetzt (Gerwing et al. 2001; Hauschild et al. 2001b). Mit der Wahl des Implantates ist jeweils ein unterschiedliches Ausmaß an Osteoinduktion, Osteokonduktion und Vaskularisierung verknüpft (Soldner und Herr 2001).

Seit über 50 Jahren wird die Transplantation autogener Spongiosa als der „goldene Standard“ zur Behandlung von Knochendefekten kritischer Größe angesehen (Fleming et al. 2000; Hauschild et al. 2005). Als Vorteile bei der Verwendung autogenen Materials stehen zum einen der Ausschluss einer möglichen Krankheitsübertragung auf den Empfänger und zum anderen die Vermeidung einer Abstoßungsreaktion im Vordergrund. Die Gewinnung autogener Spongiosa geht jedoch stets mit einem zusätzlichen Eingriff einher, der mit Komplikationen wie Wundheilungsstörungen, Blutverlusten und Nervenirritationen verknüpft sein kann (Ylinen et al. 2002). Des Weiteren besteht aufgrund der geringen Patientengröße vor allem in der Veterinärmedizin bei der Entnahme von autologer Spongiosa häufig die Problematik einer begrenzten Verfügbarkeit (Härtter et al. 1998).

Ergänzend zu der Verwendung autologer Spongiosa stellt der Einsatz allogener Knochentransplantate eine weitere Möglichkeit im Rahmen der Defektfüllung dar. Neben einer verzögerten Vaskularisierung von zwei bis drei Wochen und der Auslösung einer immunologischen Abwehrreaktion (Härtter et al. 1998) birgt der Gebrauch von allogenen Knochen auch die Gefahr der Übertragung infektiösen Materials, z. B. im Rahmen von BSE oder Leukose. Des Weiteren koinzidiert mit der Nutzung allogenen Materials eine kostenintensive Vorbehandlung und die aufwendige Lagerung der Knochentransplantate in der Knochenbank (Schnettler et al. 1998).

Als eine mögliche Alternative zu den genannten Substituten gelten xenogene Materialien. Die der Verwendung vorausgegangene Sterilisation führt zur Zerstörung von Zellen und

Wachstumsfaktoren und damit zu einer Verringerung der osteoinduktiven Potenz des Implantatmaterials (Greenwald et al. 2006). Abstoßungsreaktionen des Empfängers aufgrund antigen wirkender Strukturen kommen bei der Verwendung xenogener Materialien ebenfalls in Betracht (Schnürer et al. 2003). Zusätzlich besteht, wie bei der Verwendung allogener Transplantate, auch das Risiko einer Erregerübertragung auf den Empfänger (Gürtler 1994; Center of Disease Control 1988; Center of Disease Control 1989).

Aufgrund der aufgeführten Nachteile bei der Transplantation von autogenem, allogenen oder xenogenem Material werden zunehmend industriell gefertigte Knochenersatzmaterialien favorisiert. Im Rahmen des Forschungsgebietes *Tissue Engineering* (Gewebezüchtung) unterliegen diese einer schnell fortschreitenden Entwicklung.

Neuere Therapiekonzepte zur Behandlung von Knochendefekten favorisieren zunehmend die Kombination von Knochenersatzmaterialien mit Wachstumsfaktoren (Kilian et al. 2002). Vor dem Hintergrund der Erkenntnis über die zentrale Rolle der Wachstumsfaktoren im Zuge der Knochendefektheilung wurde in der vorliegenden Studie die biodegradierbare Matrix (Ostim®) mit Wachstumsfaktoren, in Form von PRP (plättchenreiches Plasma), kombiniert und in standardisierte Femurkondylendefekte im Bereich des patellaren Gleitlagers implantiert.

Die für diese Versuchszwecke verwendeten Minischweine wurden aufgrund mit dem Menschen vergleichbaren Parametern in Bezug auf die Blutgerinnung und die Knochenstruktur ausgewählt (Schnettler et al. 1998). Der Untersuchungszeitpunkt von 20 Tagen *post operationem* wurde im Rahmen eines Pilotversuches festgelegt (Kilian et al. 2002).

Ziel der vorliegenden experimentellen Studie war es, den Einfluss von Ostim® und von Ostim® in Kombination mit PRP auf die Knochendefektheilung einschließlich der Formierung des Granulationsgewebes sowie die Osseointegration des nanopartikulären Hydroxylapatits alleine sowie in Kombination mit PRP zu untersuchen.

Die im Folgenden dargelegten Ergebnisse der Lichtmikroskopie basieren auf der Trenn-Dünnschlifftechnik und der Immunhistochemie. Im Rahmen der Immunhistochemie wurden mittels Kollagen I-Antikörpern die Knochenneubildungsprozesse visualisiert und quantifiziert. Durch die Verwendung von *α-smooth muscle actin* (ASMA) – Antikörpern erfolgte die Detektion von ASMA-positiven Myofibroblasten des Granulationsgewebes und zudem deren ultrastrukturelle Charakterisierung mittels Transmissionselektronenmikroskopie.

### 2. Literaturübersicht

#### 2.1 Knochendefekte – Ursachen und Therapiemöglichkeiten

Ossäre Defekte haben unterschiedliche Ursachen. Zu unterscheiden sind angeborene, erworbene und durch Operationen verursachte Knochendefekte (Schieker und Mutschler 2006). Knochendefekte entstehen nach der Entfernung von Knochenzysten und -tumoren oder sind die Folge chronischer Osteomyelitiden (Härtter et al. 1998). Darüber hinaus führen Mehrfragment-, Trümmer-, Kompressions- und Berstungsbrüche zu umfangreichen knöchernen Substanzdefekten, die ebenfalls in Folge von Pseudarthrosen, Infektionen und Knochenfehlstellungen entstehen können (Tscherne und Regel 1996). In Abhängigkeit der Ursache und Lokalisation ist die Behandlung der Defekte in den Spezialgebieten der Orthopädie, Unfallchirurgie, Kieferchirurgie, Hals-Nasen-Ohren- sowie der Handchirurgie angesiedelt.

Durch eine massive Zerstörung der knöchernen Integrität kommt es zu sogenannten Defekten „kritischer Größe“ (*critical size defects*). Aufgrund der Defektgröße ist eine physiologische Knochendefektheilung mit ossärer Überbrückung des Defektpaltes auszuschließen (Schmitz und Hollinger 1986).

In der Regel führt die Granulationsgewebebildung im Defektbereich zu einer verminderten Stabilität verbunden mit einer reduzierten Belastbarkeit des betroffenen Knochens. Zur Beschleunigung der knöchernen Rekonstitution werden Biomaterialien therapeutisch zur Unterstützung der Heilung eingesetzt (Schieker et al. 2008).

Ca. 15 % aller Operationen am Skelettsystem des Menschen erfordern den Einsatz von Knochenersatzstoffen (Wissenschaftlicher Beirat der Bundesärztekammer 1996). Als mögliche Einsatzgebiete von Knochenersatzstoffen gelten vor allem große Knochendefekte bei Trümmerfrakturen, die Fixation kleiner Knochensplitter bis zur Kallusbildung, die Wiederherstellung der Knochenkontur nach Knochentumoroperationen, die Auffüllung von Knochenzysten und die Beseitigung von Knochendefekten nach chronischer Osteomyelitis (Härtter et al. 1998). Daneben stellen Arthrodesen und die Frakturprävention bei Osteoporose (Niedhart und Niethard 1998) weitere mögliche Einsatzgebiete von Knochenersatzmaterialien in der Humanmedizin dar.

Die Ursachen von Knochendefekten und die damit verbundenen Indikationen für die klinische Anwendung von Knochenersatzstoffen sind in der Veterinärmedizin nahezu identisch. Vor allem wird in zunehmendem Maße von Patientenbesitzern bei der Diagnose „Knochentumor“ der Erhalt der betroffenen Extremität gewünscht. Die bisher in der Regel durchgeführte Amputation der betroffenen Gliedmaße stellt für viele Patientenbesitzer nicht

mehr das Mittel der Wahl dar (Liptak et al. 2006).

Die mit der Entstehung von Knochendefekten häufig einhergehende Problematik der Destabilisierung des betroffenen Skelettabschnittes und darauf folgende Störungen der Knochenheilung lassen seit Jahren ein steigendes Interesse an der Erforschung und Bereitstellung von Knochenersatzstoffen aufkeimen. Die progredient steigende Entwicklung von Knochenersatzstoffen berücksichtigt die für einen effektiven Ersatzstoff notwendigen Eigenschaften wie unbegrenzte Verfügbarkeit, mechanische Stabilität, Osteokonduktion und Osteoinduktion (Niedhart und Niethard 1998).

### **2.2 Knochendefektheilung**

Im Vergleich zu einer Vielzahl an Veröffentlichungen über die Frakturheilung ist die Menge an vorhandener Literatur zur Knochendefektheilung stark limitiert. Da sich die Vorgänge während der sekundären Frakturheilung als Modell für die Defektheilung durchgesetzt haben, soll im Folgenden näher auf die Frakturheilung eingegangen werden.

Es ist die primäre von der sekundären Frakturheilung zu unterscheiden. Die primäre Frakturheilung erfolgt ohne Kallusbildung im Sinne einer Regeneration (Perren 1981) und setzt voraus, dass eine Stabilität der Knochenfragmente besteht. Der Frakturspalt wird unter Gewährleistung einer guten Vaskularisierung und einer konsequenten Ruhigstellung direkt durch die Aktivität knochenbildender Osteoblasten überbrückt.

Die sekundäre Frakturheilung tritt auf, wenn der Frakturspalt eine Größe von einem Millimeter überschreitet. Sie verläuft in drei aufeinander folgenden Phasen: Entzündung, Reparatur und Remodeling (Cruess und Dumont 1975; Einhorn 2005).

Initial erfolgt die Entzündungsphase charakterisiert durch die Abläufe der Angiogenese, der Matrixproteinsynthese und der Resorption. Mesenchymale pluripotente Zellen migrieren in die Frakturzone. Sie entstammen dem Periost, dem Endost, und dem Knochenmark als auch dem umliegenden Gewebe (Yoo und Johnstone 1998).

Die zweite „Phase der Reparatur“ ist geprägt durch die Tätigkeit von spezialisierten Zellen wie Fibroblasten, Chondroblasten und Osteoblasten, die für die reparativen und regenerativen Prozesse der Knochendefektheilung verantwortlich sind. In dieser „Granulationsphase“ setzen die Bildung und Proliferation des Granulationsgewebes sowie die Formation des Primärkallus bereits nach wenigen Tagen um den Schaft eines jeden Fragments ein (McKibbin 1978). Innerhalb eines Zeitraumes von drei bis vier Wochen ist die bindegewebige Umwandlung des im Rahmen der Fraktur entstandenen Hämatoms

vollzogen. Ebenso sind Osteoblasten und Chondroblasten in den Frakturbereich eingewandert, und ein „weicher“ Kallus ist ausgebildet. Letztlich wird in dieser Phase der Frakturbereich bindegewebig überbrückt.

Die im Bindegewebe des „Granulationsgewebekallus“ ubiquitär vorkommenden Fibroblasten stellen eine hoch mitogene Zellart dar, die der Faserbildung dient und gleichzeitig zur Synthese amorpher Grundsubstanz befähigt ist (Switzer und Summer 1971).

Neben der Prokollagensynthese der Fibroblasten steht die Produktion von interzellulärer Matrix bestehend aus Proteoglykanen, Glykoproteinen und interstitieller Flüssigkeit im Vordergrund, die unter anderem den Stoffaustausch und die mechanischen Eigenschaften der Gewebe beeinflusst (Büsser 2004). Charakteristische morphologische Merkmale der Fibroblasten sind irreguläre zytoplasmatische Fortsätze und große, ovale Zellkerne.

Im Granulationsgewebe, das sich während der Wundheilung ausbildet, spielt ein fibroblastenähnlicher Zelltyp, der ebenfalls im Rahmen der vorliegenden Untersuchung im Granulationsgewebe ossärer Defekte identifiziert werden konnte, eine zentrale Rolle. Es handelt sich hierbei um Fibroblasten, die feinstrukturelle Ähnlichkeiten mit glatten Muskelzellen aufweisen und als Myofibroblasten bezeichnet werden. Des Weiteren wird dieser Zelltypus aufgrund seiner kontraktiven Eigenschaften als *smooth-muscle like cell* oder als aktivierte *smooth-muscle cell* bezeichnet (Powell et al. 1999).

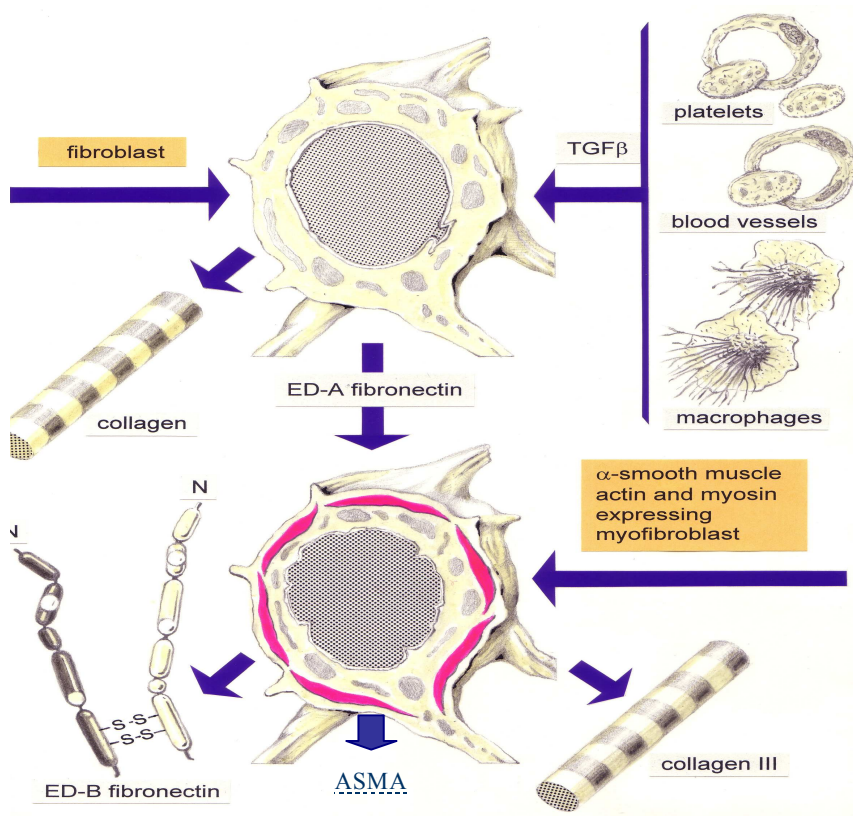
Die Myofibroblasten werden von einigen Autoren morphologisch und immunhistochemisch anhand von den Zellen synthetisierter Proteine identifiziert und charakterisiert (Sappino et al. 1990; Schmitt-Graff et al. 1994).

Fibroblasten differenzieren sich unter Einfluss von *Transforming Growth Factor-β* (TGF-β) und *Platelet Derived Growth Factor* (PDGF) (Kilian et al. 2002) zu den wundheilungsrelevanten Myofibroblasten (Rubbia-Brandt et al. 1991; Serini und Gabbiani 1996; Powell et al. 1999). Neben PDGF und TGFβ-1 scheinen auch Interleukin-4 (IL-4) und *Insulin like Growth Factor-2* (IGF-2) wichtige Faktoren bezüglich der Differenzierung von Fibroblasten zu Myofibroblasten zu sein (Clouthier et al. 1997).

Als Konsequenz einer mittels *Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor* (GM-CSF) vermittelten Aktivierung von Entzündungszellen und Thrombozyten, synthetisieren diese TGF-β1 (Khalil et al. 1989; Khalil et al. 1993; Xing et al. 1997). TGF-β1 aktiviert residente Fibroblasten, welche zur Synthese eines dreidimensionalen extrazellulären Matrix (ECM)-Gerüsts befähigt sind, das *extra domain A Fibronectin* (ED-A FN) als wichtige induktive Komponente der Myofibroblasten-Entstehung enthält. Das Resultat ist eine Myofibroblastenmodulation in Form einer gesteigerten  $\alpha$ - *smooth muscle actin* Synthese

(Abbildung 1).

Hinsichtlich des ECM-Proteins Fibronectin werden ED-A und ED-B Sequenzen unterschieden, die beide während der Wundheilung nachgewiesen werden können. Im Rahmen der Frühphase der Knochendefektheilung konnten Kilian et al. (2002) beide Splicevarianten innerhalb der Granulationsgewebephase nachweisen. ED-A Fibronectin gilt in diesem Zusammenhang als wichtiger Mediator bei der Myofibroblastendifferenzierung (Kilian et al. 2002) und gleichzeitig als Marker für aktives Granulationsgewebe (Kilian et al. 2008). ED-B Fibronectin wurde in hohen Konzentrationen in Osteoblasten nahe von neugebildetem Geflechtknochen nachgewiesen. Diese Splicevariante ist spezifisch für Osteoid-synthetisierende Zellen (Kilian et al. 2008) und kann in der Frühphase der Frakturheilung nachgewiesen werden (Kilian et al. 2005).



**Abbildung 1:**  
Schematische Darstellung der Fibroblast – Myofibroblast Modulation (modifiziert nach Serini und Gabbiani 1999)

**Der, durch Thrombozyten und Entzündungszellen freigesetzte TGF-β, aktiviert residente Fibroblasten. Neben der Kollagensynthese kommt es zu einer Produktion von ED-A Fibronectin, die mit der Differenzierung ASMA-positiver Myofibroblasten koinzidiert. Die anschließende Synthese von ED-B Fibronectin und Kollagen III spielt im Rahmen der Knochendefektheilung eine entscheidende Rolle.**



TGF- $\beta$ 1 gilt als direkter Induktor von Myofibroblasten-Phänotypen, da dieser Faktor in residenten Fibroblasten die Fähigkeit zur Hochregulierung der  $\alpha$ -smooth muscle actin Synthese sowie der Kollagensynthese besitzt (Desmoulière et al. 1993; Ronnov-Jessen und Petersen 1993).

*In vitro* bestätigt sich diese induktive Funktion für alle drei Isoformen der TGF- $\beta$  Familie (TGF- $\beta$ 1-3). Konträrerweise wurden *in vivo* unterschiedliche Rollen der drei TGF- $\beta$  Isoformen in der Myofibroblastenregulation festgestellt. TGF- $\beta$ 1 und - $\beta$ 2 induzierten hier eine Myofibroblastenformation, wohingegen TGF- $\beta$ 3 eine *down-Regulation* der Myofibroblastenformation nach sich zog (Serini und Gabbiani 1999).

Hinsichtlich ihrer entscheidenden Rolle während der Wundheilung muss bei Myofibroblasten neben der Produktion von Matrixmolekülen wie Kollagen, Glykosaminglykanen, Tenascin und Fibronectin die Sekretion (Kilian et al. 2002) von inflammatorischen und nicht inflammatorischen Zytokinen sowie von Chemokinen, Wachstumsfaktoren und Entzündungsmediatoren aufgeführt werden (Powell et al. 1999).

**Tabelle 1: Übersicht über die zahlreichen von Myofibroblasten synthetisierten Zytokine, Wachstumsfaktoren und Entzündungsmediatoren.**

<b>Zytokine</b>	Il-1, IL-6, IL-10, TNF $\alpha$
<b>Wachstumsfaktoren</b>	TGF- $\beta$ , GM-CSF, CSF-1, PDGF-AA, PDGF, bFGF, IGF-I, IGF-II, NGF, KGF, HGF, SCF
<b>Chemokine</b>	Il-8, MCP-1, GRO-1 $\alpha$ , MIP-2, RANTES, ENA-78
<b>Entzündungsmediatoren</b>	Phospholipase A2 aktivierendes Protein, PGE2, Prostacyclin, HETEs, PAF, NO, CO, H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>

IL: Interleukin; TNF- $\alpha$ : tumor necrosis factor- $\alpha$ ; TGF- $\beta$ : transforming growth factor- $\beta$ ; MCP-1: monocyte chemoattractant protein-1; CSF-1: colony-stimulating factor 1; GM-CSF: granulocyte/macrophage colony-stimulating factor; PDGF: platelet-derived growth factor; bFGF: basic fibroblast growth factor; IGF: insuline-like growth factor; NGF: nerve growth factor; KGF: keratinocyte growth factor; HGF: hepatocyte growth factor; SCF: stem cell factor; VEGF: vascular endothelial growth factor; MIP: macrophage protein; RANTES: regulated, upon activation, normal T cell expressed and secreted; GRO-1 $\alpha$ : melanoma growth-stimulatory activity; HETEs: hydroxyeicosatetraenoic acids; PAF: platelet activating factor; ENA-78: Epithelial Neutrophil Activating Peptide-78; NO: Stickoxid; CO: Kohlenmonoxid; H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: Wasserstoffperoxid (Powell et al. 1999).

Die Formation und Reparatur der ECM und die gleichzeitige Proliferation und Differenzierung von Epithelien, Parenchym und Gefäßen im Rahmen der Wundheilung wird ebenfalls maßgeblich durch Myofibroblasten beeinflusst. Die Heilung wird zusätzlich durch die kontraktile Eigenschaft der Zellen gefördert, die eine Wundverkleinerung bewirkt (Gabbiani et al. 1972; Powell et al. 1999). Diese kontraktile Eigenschaft beruht auf einem im Vergleich zu Fibroblasten erhöhten Anteil an polymerisiertem Aktin (Gabbiani 1998). Die Fähigkeit der Myofibroblasten, Kalzium zu akkumulieren und abzusondern, stellt eine wichtige Voraussetzung der Kontraktilität dar. Der damit verbundene zyklische Anstieg bzw. die Abnahme der Kalziumkonzentration innerhalb der Zellen vermittelt die Aktin-Myosinkontraktion (Furuya et al. 1997). Durch die die Myofibroblasten verbindenden *gap junctions* werden die elektrischen Impulse innerhalb der Myofibroblastenpopulation weitergeleitet und lösen Kontraktion aus (Sanders 1996; Valentich et al. 1997; Kaneda et al. 1998).

Auf immunohistochemischer Ebene basiert die Myofibroblastendetektion auf Antikörper-Reaktionen gegen zwei von drei Filamentsystemen der eukaryotischen Zelle (Iwasaki et al. 1987; Fuchs und Cleveland 1998). Das innerhalb der Myofibroblasten als Komponente der Mikrofilamente in hohem Maß vorhandene  $\alpha$ - *smooth muscle actin* wird im Granulationsgewebe zeitlich begrenzt exprimiert und verkörpert somit den wichtigsten Zellmarker bei der Detektion von Myofibroblasten (Sappino et al. 1990).

Durch die mittels GM-CSF aktivierten Thrombozyten (**Abbildung 1**) und Makrophagen kommt es zur Freisetzung von TGF- $\beta$ 1, welches seinerseits residente Fibroblasten zur Synthese des EDA-FN enthaltenden ECM-Gerüsts aktiviert. Die ED-A FN Synthese ist für die Induktion der einzelnen Myofibroblastendifferenzierung unerlässlich (Serini und Gabbiani 1999).

In der dritten und gleichzeitig terminalen Phase der Knochenheilung, in welcher der Kallus die Stabilität gewährleistet, kommt es schließlich zum Remodeling, was den balancierten Abbau von Knochen durch osteoklastäre Resorption und den Neuaufbau durch osteoblastäre Formation beschreibt (Amling et al. 2001). Der entstandene Geflechtknochen wird schließlich in lamellären Knochen umgewandelt und die ursprüngliche Architektur des Knochens wieder erreicht.

Die für den Knochenaufbau essentiellen, kuboidal geformten Osteoblasten differenzieren sich aus mesenchymalen Stammzellen. Am Verlauf des bisher nicht bis ins Detail erforschten Differenzierungsprozesses sind eine Vielzahl von Transkriptionsfaktoren und Signalkaskaden beteiligt. Mit der Differenzierung zu Osteoblasten geht gleichzeitig die Synthese von Knochenmatrixproteinen einher. Kollagen I ist hierbei ein in hohem Maße

synthetisiertes Protein. Die Knochenmatrixproteine werden von den Osteoblasten als Osteoid auf die Knochenoberfläche sezerniert und spielen eine entscheidende Rolle bei der Migration, der Proliferation und der Zelladhäsion (Marks und Odgren 2002).

Prinzipiell ist Knochen zu einer *Restitutio ad integrum* befähigt (Braun und Ruter 1998), die von einer Vielzahl von Faktoren abhängig ist. Großen Einfluss auf den Verlauf der Knochenheilung hat neben einer Vielzahl an Hormonen (Löffler und Petrides 1998; Case et al. 2007) und Wachstumsfaktoren die Integrität des Periostes, das neben der nutritiven Versorgung auch die Innervation des Knochens gewährleistet (Eyre-Brook 1984). Daneben wird die Regenerationsfähigkeit des Knochens maßgeblich von der Blutversorgung beeinflusst (Remedios 2002).

Eine Störung der Knochenheilung tritt bei ca. 10-20 % der Frakturen auf (Haas 2000), die sich meist in Form einer Pseudarthrose manifestiert. In diesen Fällen bleibt die Vereinigung der Frakturrenden über einen Zeitraum von über 8 Monaten aus (Runkel und Rommens 2000). Aufgrund ihrer osteogenen, osteoinduktiven und osteokonduktiven Eigenschaften gilt bei der Therapie von Pseudarthrosen weiterhin die Transplantation autologer Spongiosa als „goldener Standard“ (Khan et al. 2005).

Die Gewinnung autologer Spongiosa ist vor allem in der Veterinärmedizin durch die häufig geringe Größe der Patienten deutlich limitiert. Des Weiteren stellt in der Tiermedizin die Problematik einer mangelnden Ruhigstellung der Patienten ein entscheidendes Kriterium bei der Therapiewahl als auch für den Heilungsverlauf von Frakturen dar. Daher wurde bei der Pseudarthrosenbehandlung von Hunden (n=9) und Katzen (n=2) auf den Einsatz autologer Spongiosa verzichtet und stattdessen mit Knochenersatzstoffen therapiert. Sowohl im frakturnahen wie auch im frakturfernen Bereich kam es nach der Therapie zu einem Stillstand der osteolytischen Prozesse, einer gleichzeitigen Zunahme der Kalkdichte und der Entstehung einer homogenen Knochenstruktur (Gerwing et al. 2003).

### **2.3 Knochenersatzstoffe – Entwicklung, Eigenschaften und Einteilung**

Im Rahmen der Behandlung von Knochendefekten werden zunehmend verschiedene Formen von Transplantaten und Implantaten eingesetzt. Im Vorfeld soll kurz auf die häufig im Sprachgebrauch synonym verwendeten Begriffe eingegangen werden.

Der Begriff Transplantat beinhaltet die Herkunft aus einem lebenden Organismus. Hier wird unterschieden zwischen autogenen, allogenen und xenogenen Transplantaten. Autogene Transplanate entstammen dem Körper, in den sie eingebracht werden, wobei allogene aus

einem anderen Körper der gleichen Spezies entstammen. Bei xenogenen Transplantaten ist der Körper einer anderen Spezies der Ursprung des gewonnenen Materials (Hoch 2004).

Im Gegensatz dazu versteht man unter Implantaten nicht lebende und / oder einem nichtlebenden Organismus entnommene Materialien. Vor allem im anglo-amerikanischen Raum wird hierfür der Begriff Alloplastik gebraucht. **Tabelle 2** gibt einen Überblick über die international empfohlenen Begriffe der Transplantationsterminologie.

**Tabelle 2: Internationale Terminologie der Transplantatart**

<b>Begriff</b>	<b>Definition</b>
autogenes Transplantat	Spender = Empfänger
allogenes Transplantat	Transplantation zwischen histokompatiblen Individuen der gleichen Spezies
xenogenes Transplantat	Transplantation zwischen Individuen unterschiedlicher Spezies
alloplastisch / Alloplastik	synthetische Fremdmaterialien

Als Implantate im Sinne von „Biomaterialien“ sind vor allem drei Werkstoffgruppen anzusprechen, die der polymeren Kunststoffe, der Keramiken und der Metalle. Nach dem Entschluss der Konsensus-Konferenz der Europäischen Gesellschaft für Biomaterialien im Jahre 1986, werden heute Fremdstoffe, die nicht vital sind und in den menschlichen Körper eingebracht werden, bevorzugt als „Biomaterialien“ bezeichnet (Berghaus 1992). Eine wichtige Eigenschaft dieser Materialien ist die Biokompatibilität, die die Wechselwirkung zwischen Körpergewebe und Implantat beschreibt.

Im Zusammenhang mit der Implantation von Biomaterialien spielen mehrkernige Riesenzellen eine entscheidende Rolle bei der Degradation und der Bewertung der Biokompatibilität der verwendeten Knochenersatzstoffe. Die dem hämatopoetischen System entspringenden mehrkernigen Riesenzellen stammen von Zellen des Monozyten-Makrophagen-System ab (Roodman 1999; Anderson 2001).

Diese auch als Fremdkörperriesenzellen (FBGC) bezeichneten Zellen entstehen in Folge einer Fusion der zur Oberfläche von implantierten Biomaterialien rekrutierten Makrophagen, mit dem Ziel, eine Population von degradierenden Zellen bereitzustellen. Im Anschluss an die Fusionsprozesse kommt es neben einer Pseudopodienbildung zu einer Elongation der rekrutierten Makrophagen (Steven et al. 2007). Die Formation von FBGC wird als Antwort

des Empfängers auf die Implantation von Biomaterialien angesehen und als Fremdkörperreaktion bezeichnet. Diese Fremdkörperreaktion ist vor allem dort vorherrschend, wo die initiale Phagozytose durch rekrutierte einkernige Makrophagen für einen Degradationsprozess von Implantaten nicht ausreichend ist (Anderson 2001; Xia 2006). Durch die mit der Implantation von Biomaterial verbundenen FBGC-Formierung und die darauf folgende fibröse Abkapselung wird nicht nur die Materialdegradation beschleunigt, sondern es werden auch molekulare Prozesse als auch die Vaskularisierung beeinflusst (Zhao et al. 1991; Anderson 2001).

Neben den FBGC besitzen Osteoklasten physiologischerweise die Fähigkeit, Kalzium-Phosphat-basierte Knochensatzstoffe zu degradieren (Bloemers et al. 2003; Wenisch et al. 2003a; Wenisch et al. 2003b). Die Differenzierung von Osteoklasten und FBGC in Hinblick auf die Beurteilung der Biokompatibilität von Knochensatzstoffen im Empfängerorganismus ist von besonderer Bedeutung, da die Osteoklasten physiologischerweise mit dem Remodeling des Knochens assoziiert sind, und die FBGC in Folge von Entzündungsreaktionen auftreten (Webster et al. 2001). Die Biokompatibilität des Implantatmaterials hängt somit maßgeblich vom Ausmaß der körpereigenen Fremdkörperreaktion ab (Brodbeck et al. 2002).

Die Forschung mit einer Vielzahl an Studien im Bereich der Knochensatzstoffe verfolgt das Ziel, einen „idealen“ Knochensatzstoff zu entwickeln. Wichtige erstrebenswerte Eigenschaften sind der Ausschluss immunologischer Abstoßungsreaktionen, die Abwesenheit toxischer sowie mutagener Nebenwirkungen, Sterilität, eine hohe biologische Eigenpotenz, ein vollständiger knöcherner Ein- und Umbau, keine Mengen- und Lagerungsprobleme, eine Festigkeit entsprechend den jeweiligen Erfordernissen und niedrige Kosten. Jährlich werden in den Vereinigten Staaten von Amerika bereits 1,5 Millionen Operationen unter der Verwendung von Knochensatzmaterialien durchgeführt (Einhorn 2003). Da es bisher nicht gelungen ist, alle wünschenswerten Eigenschaften in einem Knochensatzstoff zu vereinen, wird als „goldener Standard“ bei der Defektauffüllung dennoch weiterhin die autologe Spongiosatransplantation angesehen (Schweiberer et al. 1982). Eigenschaften wie osteoinduktive, osteokonduktive und osteogene Potenzen wie auch das Vorhandensein lebender Zellen, werden autologem Knochenersatz zugeschrieben.

Die nach einer Transplantation auftretenden relevanten Prinzipien werden als Osteogenese, Osteoinduktion und Osteokonduktion bezeichnet. Als Osteogenese wird die von überlebenden Knochenzellen des Transplantates wie Osteoblasten und Osteoprogenitorzellen ausgehende Knochenneubildung verstanden (Katthagen 1986). Die Osteoinduktion wird durch einen vom Transplantat ausgehenden „Reiz“ ausgelöst,

der wiederum im heterotopen Lager eine Differenzierung von mesenchymalen Zellen zu knorpel- und knochenbildenden Zellen verursacht. Unter Osteokonduktion versteht man eine Knochenneubildung, bei der das Gerüst des Transplantates als dreidimensionale Leitschiene dient und somit die Einwanderung von Gefäßen und Osteoprogenitorzellen aus dem Lagerknochen unterstützt (Holmes 1979).

Die in der Literatur erstmalig belegte Transplantation autogenen Knochens wurde durch V. Walter im Jahre 1821 durchgeführt (Walter 1821). Zu Beginn des 20. Jahrhunderts kam es bereits zu einer breiteren klinischen Anwendung (Wolter 1987) mit dem Anspruch die Einheilungsvorgänge ansatzweise wissenschaftlich klären zu wollen. Es wurde gezeigt, dass frische autogene Implantate aufgrund des Überlebens von Osteoblasten als auch der osteoinduktiven Wirkung ihrer Grundsubstanz in der Lage sind, neuen Knochen zu bilden (Auxhausen 1907; Lexer 1911). Auxhausen (1907) postulierte eine zweiphasige Transplantateinheilung, die Initialphase der Osteogenese vermittelt durch überlebende Osteoblasten und eine osteoinduktive Phase, die drei bis vier Wochen nach der Transplantation durch die Umwandlung von mesenchymalen Zellen des Lagergewebes in „osteoproduktive“ Zellen charakterisiert ist.

In weiteren Studien konnte bereits im Jahre 1931 gezeigt werden, dass transplantierte Spongiosa im Vergleich zu Kortikalistransplantaten eine deutlich überlegene Einheilungsdynamik aufweist (Matti 1919). Dies wurde auf die poröse Struktur der Spongiosa und der damit verbundenen beschleunigten Vaskularisierung und ihrer starken osteokonduktiven Potenz zurückgeführt. Diese Ergebnisse werden durch jüngere tierexperimentelle Studien bestätigt. So konnten Laschke et al. (2007) in einer an Goldhamstern durchgeführten Studie nachweisen, dass die Verwendung autologer Spongiosa durch eine hohe biologische Aktivität charakterisiert und im Vergleich zur Verwendung synthetischer Knochenersatzstoffe mit verstärkten Angiogeneseprozessen und einer entsprechend hohen Anzahl an einsprossenden Gefäßen verknüpft ist.

Als die gängigsten Entnahmestellen autologer Spongiosa gelten der Beckenkamm, der Tibiakopf, die distale Tibia, das Trochantermassiv als auch der distale Radius (Lindner und Henry 1992). Die Spongiosaentnahme als autologer Knochenersatz kann aufgrund ihrer limitierten Verfügbarkeit bei der Überbrückung großer Defekte jedoch an ihre Grenzen stoßen (Habibovic und de Groot 2007). Neben dem mit zum Teil hohen Komplikationsraten verbundenen Zweiteingriff (Grob 1989) in Form von Hämatomen (Rueger 1995), Nervenläsionen sowie Infektionen (Garlipp 1979), Frakturen oder gar Organverletzungen und Eingeweideherniationen (Bosworth 1955) stellt die Spongiosaentnahme bei Schwerverletzten, Kindern und Patienten mit schlechtem Allgemeinzustand einen nicht vertretbaren Eingriff dar.

Dennoch stellt die Transplantation autologer Spongiosa zurzeit den „goldenen Standard“ in der Transplantationsmedizin dar. Dies ist vor allem in ihrer hohen biologischen Wertigkeit begründet.

Die erste allogene Knochen transplantation erfolgte im Jahre 1867 durch den Schotten William Macewen (Macewen 1881). Wichtigen Einfluss auf die allgemeine Durchsetzung dieser Methode hatte die von Albee 1915 (Albee 1915) veröffentlichte Publikation über Knochen transplantationen und die in den 40er Jahren eingeführte Tiefkühlkonservierung des allogenen Knochens durch Bush, Garber und Inclan (Inclan 1942; Bush und Garber 1948).

Im Focus der Studien über allogenen Knochenersatz standen schon früh die Einheilungs- und Umbauvorgänge. Hier wurde bei der Transplantation, das Absterben zellulärer Knochelemente und die Leitschiene funktion (Osteokonduktion) des allogenen Transplantates festgestellt (Barth 1893; Curtis 1893; de Boer 1989). Es wurden Vermutungen angestellt, dass bei der vom Wirtsknochen ausgehenden Knochenneubildung und der schleichenden Resorption des allogenen Knochens spezifische osteoinduktive Faktoren aus dessen Grundsubstanz freigesetzt werden. Diesen Faktoren wurde eine Aktivierung der knochenbildenden Zellen im Transplantatlager zugesprochen (Ollier 1867). Anhand weiterer Versuche konnten die Existenz der Faktoren nachgewiesen (Levander 1934; Annersten 1940; Oberdahlhoff 1947) als auch das osteoinduktive Prinzip bestätigt werden (Goldhaber 1961; Segmüller 1967). Die als *Bone Morphologic Proteins* (BMP) bezeichneten Faktoren wurden durch Urist et al. (1967) aus Knochen isoliert und sind nach Applikation in die Muskulatur artfremder Tiere in der Lage, eine heterotope Ossifikation auszulösen.

Der klinische Einsatz kryokonservierten allogenen Knochens wird mit einer Erfolgsrate von 60-95 % angegeben (Ankin et al. 1982; Regel et al. 1992; Südkamp et al. 1993) und ist in zahlreichen Publikationen (Kunner und Hendrich 1984; Börner 1985; Gollwitzer 1986; Contzen 1989; Regel et al. 1992) dokumentiert.

Der Einsatz xenogener Knochen transplantation wurde durch den Chirurgen Job van Meekeren 1668 eingeführt (de Boer 1989). Er rekonstruierte den Schädeldefekt eines Soldaten durch ein vom Hund stammendes Transplantat. In den 40er Jahren des letzten Jahrhunderts kam es vermehrt zu der Verwendung xenogener Transplantate bovinen Ursprungs. Aufgrund der häufigen Abstoßungsreaktionen der Empfänger wurde diese Methode jedoch zunehmend abgelehnt bzw. versucht deren Wert durch Gefriertrocknungen und Bestrahlungen des verwendeten Materials zu verbessern (Soost 1996).

Die Entwicklung von Knochenersatzstoffen führt von gehämmerten Goldplatten der Inkas,

die zur Schädelrekonstruktion genutzt wurden (Soost 1996) im Laufe der Jahrhunderte zu den sich im 18. Jahrhundert entwickelnden aseptischen chirurgischen Techniken. 1892 wurde durch Dressmann Kalziumsulfat zur Defektfüllung eingesetzt (Dressmann 1892). Hydroxylapatitkeramiken fanden durch Osborn 1978 ihre erstmalige Anwendung (Soost 1996).

Der Versuch, Knochendefekte mittels Knochenersatzmaterialien zu heilen, besteht also seit geraumer Zeit. Die zur Knochendefektfüllung verwendeten Biomaterialien unterliegen einer fortschreitenden Entwicklung und stehen seit bereits über 20 Jahren im Mittelpunkt des Interesses von Dentisten und Orthopäden (Gerwing et al. 2001). In der Unfallchirurgie und der orthopädischen Chirurgie stellen sie bereits eine wichtige Alternative zur autogenen Spongiosatransplantation dar (Kilian et al. 2002; Schnettler et al. 2005).

Neben der Nutzen-Kosten Analyse stehen bei der Entwicklung die benötigten biologischen Eigenschaften der Ersatzstoffe im Vordergrund. Darunter fallen in erster Linie die osteogene Aktivität, indem durch Materialeigenschaften körpereigene Zellen zur Differenzierung und Synthese angeregt werden, die osteoinduktive Wirkung durch Freisetzung von Knochenwachstumsfaktoren und die Osteokonduktion durch eine Leitschiene-funktion der Knochenersatzmaterialien (Soldner und Herr 2001).

Osteokonduktive Knochenersatzstoffe dienen dem einwachsenden Knochen als Leitschiene und können bei Bedarf als Trägermaterialien für Antibiotika eingesetzt werden (Härter et al. 1998; Alt et al. 2006). Eine weitere Möglichkeit ist die Kombination mit Bestandteilen der extrazellulären Matrix oder Wachstumsfaktoren. In Abhängigkeit der kombinierten Wirkstoffe kommt es zu einer Beeinflussung der Osteogenese, Angiogenese, Osteokonduktion (Osborn 1985) und dem Entzündungsgeschehen *post operationem*. Degradation und Osseointegration sind maßgeblich durch den verwendeten Ersatzstoff beeinflusst. So konnte bereits in vorausgehenden Studien eine frühzeitige Osseointegration des Knochenersatzstoffes Ostim® ohne stattgefundene Degradation des Hydroxylapatits beobachtet werden (Spies et al. 2008).

Die Einteilung der zur Verfügung stehenden Knochenersatzstoffe wird von zahlreichen Autoren verschiedenartig durchgeführt. Grundsätzlich erfolgt sie jedoch in die Gruppe der abbaubaren und zum anderen in die Gruppe der nicht abbaubaren Knochenersatzstoffe (**Tabelle 3**).

Die zurzeit verfügbaren Knochenersatzmaterialien zeigen somit eine große Variabilität in ihrer Zusammensetzung und ihren Eigenschaften. Häufige Verwendung finden anorganische Kalzium-Phosphate. Dabei handelt es sich fast ausschließlich um Hydroxylapatit-Keramiken



[Ca<sub>10</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>6</sub>(OH)<sub>2</sub>] (Buchholz et al. 1987). Charakteristisch für sie ist eine einfache Handhabung in der Herstellung und die bei Raumtemperatur lange bestehende Formbarkeit des Materials. Diese Knochenersatzmaterialien auf Hydroxylapatitbasis zeigen neben einer großen strukturellen Ähnlichkeit zu dem Hydroxylapatit des Knochens, einen hohen Grad an Biokompatibilität und stehen nach der Implantation im direkten Kontakt zum neugebildeten Knochen (Köster et al. 1976; Holmes et al. 1984), was zu ihrem weitverbreiteten Einsatz in der rekonstruktiven Chirurgie führt (Denissen et al. 1980; Eggli et al. 1988; Hende 1989; Revell et al. 1997). Als wichtiger Faktor für die Verwendung von Knochenersatzstoffen gilt deren Einfluss auf das Einwachsverhalten von Knochengewebe, das wesentlich von der Makroporosität, Porengröße und der Poreninterkonnektion des Implantatmaterials abhängt (de Groot 1980).

Die biologischen Heilungsvorgänge des Knochens können somit durch Knochenersatzstoffe unterstützt und die mechanische Stabilität gefördert werden (Revell et al. 1997). In Abhängigkeit von ihrer Porosität zeigen osteokonduktive Ersatzstoffe auf Hydroxylapatitbasis einen hohen Grad an Degradation und Resorption. Entlang der Implantatoberflächen kann innerhalb von vier bis sechs Wochen *post implantationem* die Bildung von Lamellenknochen beobachtet werden (Schnettler et al. 2004). Die Porengröße wird kontrovers diskutiert. So wird ein Porendurchmesser von 80 – 160 µm bei hoher Gesamtporosität als besonders förderlich für eine schnelle Vaskularisation und knöcherne Durchbauung beschrieben (Rueger 1995). Dagegen empfiehlt Buchholz eine Porengröße von 200 -250 µm (Buchholz et al. 1989), während Flatley 500 µm als günstigste Porengröße angibt (Flatley et al. 1983).

Der nanopartikuläre auf Hydroxylapatit basierende Knochenersatzstoff Ostim® gehört in die Gruppe der degradierbaren Knochenersatzmaterialien. Bei *in vivo* Versuchen an Göttinger Minischweinen konnte nachgewiesen werden, dass der Degradationsprozess von Ostim® nach einem Zeitraum von 6 Wochen eingestellt wird und nach einem Jahr *post implantationem* weiterhin Ostim® - Reste in beträchtlichen Mengen im Bereich der angelegten Tibiadefekte von Schafen detektiert werden konnten. Zu bemerken ist, dass eine *restitutio ad integrum* mit einem vollständigen Abbau des Knochenersatzstoffes nicht beobachtet werden konnte. Als Ursache kommt hier die frühzeitige Osseointegration des Knochenersatzmaterials in Betracht (Spies et al. 2008), die dessen weitere Degradation verhindert. Bezüglich der Neovaskularisierung konnte bei dem Knochenersatzstoff Ostim® im Vergleich zu Hydroxylapatitkeramiken (Cerabone®) eine deutliche Zunahme in den Defekten festgestellt werden. Diese wurde vor allem in Bezirken des Implantatabbaus verzeichnet.

Ostim® stellt einen injizierbaren synthetischen Knochenersatzstoff dar, der innerhalb von Knochendefekten die Vaskularisierung unterstützt und somit die Bedingungen für eine Knochenneubildung optimiert (Laschke et al. 2007).

Neben der großen Vielfalt an einsetzbaren Knochenersatzstoffen bestehen zusätzlich unterschiedliche Darreichungsformen. Hier spielen vor allem solide (Frame 1987; Kent et al. 1987), poröse Formen (Frame 1987; Dingeldein et al. 1994) und Granulate eine Rolle (Günther et al. 1998).

**Tabelle 3: Darstellung einer möglichen Einteilung der erhältlichen Knochenersatzstoffe**

<b>Gruppe der Knochenersatzstoffe</b>	<b>Art des Knochenersatzstoffes</b>	<b>Beispiel für kommerziell erhältlichen Knochenersatzstoff</b>
<b>Nicht abbaubare Knochenersatzstoffe</b>	Hydroxylapatitkeramik	Endobon®
	Polyethylen Polyethylenoxid kohlefaserverstärkter Kunststoff Polymethylmetacrylat	Polyactive®
	Glas, Titan Aluminiumoxidkeramiken	
	Glaskeramiken	Perioglas®
<b>Abbaubare Knochenersatzstoffe</b>	Kalziumsulfat	Osteoset®
	Kalziumphosphatkeramiken Trikalziumphosphat Polyactid und Polyglycolid	Collapat®, Bio-Oss® Cerasorb®, Calciresorb®
	Kalziumphosphatzemente Hydroxylapatitpaste	Biobon® Ostim®

## **2.4 Plättchenreiches Plasma (PRP) und dessen Einfluss auf die Knochendefektheilung**

PRP wird als „Konzentrat autologer Thrombozyten in einem kleinen Plasmavolumen“ (Marx 2004) definiert. Als Quelle thrombozytärer Wachstumsfaktoren findet PRP seit Jahren

klinische Verwendung zur Beschleunigung der Geweberegeneration. Die im PRP enthaltenen Wachstumsfaktoren *Transforming Growth Factor  $\beta$  1,2* (TGF  $\beta$ -1 und  $\beta$ 2), *Insulin-like Growth Factor* (IGF), *Epidermal Growth Factor* (EGF), *Platelet Derived Growth Factor* (PDGF), *acidic- und basic- Fibroblast Growth Factor* (aFGF, bFGF) und *Vascular Endothelial Growth Factor* (VEGF) (Weibrich et al. 2002) werden in Folge der durch Kalziumchlorid und Thrombin (Carlson und Roach 2002) vermittelten Thrombozyten-Degranulation aus den  $\alpha$ -Granula der Thrombozyten freigesetzt.

Neben der *in vitro* durch PRP-Einfluss verstärkten Proliferation osteoblastenähnlicher Vorläuferzellen konnte in Versuchen auch diejenige mesenchymaler Stammzellen mittels PRP gesteigert werden (Weibrich et al. 2002; Gruber et al. 2004).

Der Einfluss des seit Jahren in der Mund- und Kieferchirurgie zum Knochenaufbau eingesetzten PRPs (Thorn et al. 2004) wird sehr kontrovers beurteilt. Wird einerseits ein positiver Effekt des eingesetzten PRPs auf die Knochenneubildung nachgewiesen, dokumentieren andere Studien keinen Effekt oder sogar negative Auswirkungen auf die Gewebeformation.

So beobachten Fontana et al. (2004) in einer tierexperimentellen Studie an Ratten nach dem Einsatz von PRP in Kombination mit Titanimplantaten, im Vergleich zur Kontrollgruppe ohne PRP, ein stark erhöhtes Knochenvolumen. Ebenso wurde am Minischwein nach der Verankerung von dentalen Implantaten und der Verwendung von PRP nach einem Zeitraum von sechs Wochen, im Vergleich zur Kontrollgruppe ohne PRP, eine signifikant höhere Knochenneubildung verzeichnet (Zechner et al. 2003).

Andere Studien zur Beurteilung der Effekte von PRP auf die Knochendichte, Implantatresorption und Knochenheilung in standardisierten Mandibulardefekten von Minischweinen verweisen auf keinerlei Effekte des verwendeten Thrombozytenkonzentrates (Jensen et al. 2005) und schließen sogar negative Auswirkungen auf die Knochenneubildung nicht aus (Ranly et al. 2007). Im Zusammenhang mit autogenen Knochenersatzstoffen weisen Choi et al. (2004) in kaninen Mandibulardefekten eine verringerte Knochenbildung in der mit PRP behandelten Gruppe nach.

In Bezug auf die Wirkung der Wachstumsfaktoren ist jedoch die Tatsache hervorzuheben, dass eine Korrelation zwischen Wachstumsfaktorkonzentration und ihrer Wirkung auf die Knochenbildung beobachtet werden konnte. Die Anwendung von PRP mit einer Thrombozytenkonzentration von unter  $1 \times 10^6$  zeigt keinen Einfluss auf die Knochenneubildung, während höhere Thrombozytenkonzentrationen eine inhibitorische Wirkung aufweisen (Weibrich et al. 2004). Diese unterschiedlichen Wirkungen werden auf

unphysiologisch hohe Konzentrationen der verschiedenen Wachstumsfaktoren zurückgeführt, die zytotoxische und inhibitorische Effekte nach sich ziehen.

### **2.5 Thrombozytäre Wachstumsfaktoren**

Die aus den Blutplättchen gewonnenen Wachstumsfaktoren haben einen wichtigen Einfluss auf die Knochenregeneration und tragen zur Vaskularisation eines heilenden Knochens bei (Aghaloo et al. 2002). Sie werden physiologischerweise während der frühen Frakturheilung freigesetzt (Liebermann et al. 2002). Maßgeblich ist hier der synergistische Effekt der verschiedenen im PRP enthaltenen Wachstumsfaktoren. Durch diverse Versuche sowohl *in vivo* als auch *in vitro* konnten die Effekte der einzelnen Wachstumsfaktoren zum Teil bereits erfolgreich erforscht werden. Sie sollen im Folgenden einzeln dargestellt werden. Die verschiedenen Wechselwirkungen zwischen den einzelnen Faktoren und der daraus resultierende Einfluss auf die Knochendefektheilung sind bisher nicht hinreichend geklärt.

#### **2.5.1 Fibroblast growth factor (FGF)**

Die beiden Isoformen *acidic Fibroblast growth factor* (aFGF) und der *basic Fibroblast growth factor* (bFGF) besitzen eine molekulare Masse zwischen 18-25 kDa (Auguste et al. 2003). Sie hemmen die Aktivität von Osteoklasten und erhöhen gleichzeitig die Fibroblasten-, Osteoblastenproliferation und -differenzierung (Siebert et al. 2003). bFGF besitzt neben den genannten Eigenschaften außerdem die Fähigkeit, die Kollagensynthese in Osteoblastenkulturen zu erhöhen (McCarthy et al. 1989).

Experimentelle Untersuchungen an Kaninchen mit segmentalen Tibiadefekten und segmentalen Femurdefekten (Inui et al. 1998; Kato et al. 1998) als auch an standardisierten Alveolardefekten von Hunden (Hosokawa et al. 2000) belegen positive Einflüsse von bFGF auf Knochenzuwachs und Kallusbildung, während sich eine entsprechend positive Wirkung auf die Defektheilung von Miniaturschweinen (Schnettler et al. 2003) nicht bestätigt.

#### **2.5.2 Insulin-like growth factors (IGFs)**

Unterschieden werden die beiden Isoformen IGF-I und IGF-II, bei denen es sich um Polypeptide handelt, die aus 70 bzw. 67 Aminosäuren bestehen. Sie werden von Osteoblasten synthetisiert und in der Knochenmatrix gespeichert (Hauschka et al. 1986).

Neben dem stimulativen Effekt auf die Differenzierung und Proliferation von Knochenmarkszellen (Martinez-Gonzalez et al. 2002) konnte ein chemotaktisch fördernder Einfluss von IGF-I auf Osteoblasten während des Knochenremodellings beobachtet werden (Hayden et al. 1995). Durch die Steigerung der Osteoblastenzahl wird gleichzeitig eine Anregung der Knochenheilung hervorgerufen (Birnbäum et al. 1995).

Des Weiteren konnte *in vitro* eine proliferationssteigernde Wirkung von IGF-I auf Osteoblasten nachgewiesen werden (Hock et al. 1988). Der synergistische Effekt von Wachstumsfaktoren auf die Steigerung der Knochenneubildung bei Knochendefekten wird durch die Kombination von IGF mit anderen Wachstumsfaktoren wie etwa PDGF oder TGF- $\beta$  erreicht (Blumenfeld et al. 2002).

### **2.5.3 Platelet-derived growth factor (PDGF)**

Bei dem bis 100 °C hitzestabilen Polypeptid PDGF handelt es sich um ein 30 kDa Dimer, das in drei Isoformen vorkommt (PDGF-AA, PDGF-AB, PDGF-BB). Diese entfalten ihre Wirkung auf Zielzellen durch die Bindung an zwei strukturell verbundene Tyrosin-Kinase-Rezeptoren, wobei der  $\alpha$ -Rezeptor mit der A- und B-Kette in Interaktion tritt, und der  $\beta$ -Rezeptor ausschließlich an die B-Kette bindet. Den größten Speicher von PDGF stellen die  $\alpha$ -Granula der Thrombozyten dar. Des Weiteren konnte PDGF in Makrophagen (Shimokado et al. 1985), Endothelzellen (DiCorleto und Bowen-Pope 1983), Monozyten, Fibroblasten (Paulsson et al. 1987) und der Knochenmatrix nachgewiesen werden.

Die Wirkung von PDGF entfaltet sich *in vitro* in Form eines mitogenen Einflusses auf Osteoblasten (Lieberman et al. 2002) und Osteoklasten (Hock und Canalis 1994). Undifferenzierte Osteoblasten werden in diesem Zusammenhang stärker angeregt als bereits ausdifferenzierte (Abdennagy et al. 1992). Des Weiteren konnte eine chemotaktische Wirkung von PDGF auf mesenchymale Stammzellen und Osteoblasten beobachtet werden (Gruber et al. 2004). Daneben weisen Hock und Canalis (1994) im Zusammenhang mit der Applikation von PDGF eine selektive Stimulation von Fibroblasten in Form einer erhöhten Replikation nach (Hock und Canalis 1994).

*In-vivo* Studien belegen einen Knochenzuwachs in Schädeldachdefekten von Ratten nach Applikation von PDGF (Chung et al. 1997). Die fördernde Wirkung auf die Knochenheilung in Kombination mit IGF-1 im Kieferknochen von Makaken ist bestätigt (Giannobile et al. 1996). Im Gegensatz dazu konnte bei der isolierten Anwendung und lokaler Applikation von PDGF in Verbindung mit Hydroxylapatitimplantaten in Rattenfemura kein vermehrter Knocheneinwuchs beobachtet werden (Nash et al. 1994).

Im Rahmen der Granulationsgewebebildung ist die Wirkung von PDGF auf die Differenzierung von Fibroblasten zu Myofibroblasten, die in **Kapitel 2.2** näher erläutert wird, hervorzuheben.

### **2.5.4 Transforming growth factor beta (TGF- $\beta$ )**

Zu der TGF-Superfamilie gehören neben den Inhibinen, den Aktivinen und den *Bone-Morphogenetic-Proteins* (BMPs) auch die 5 Isoformen TGF- $\beta$  1 bis TGF- $\beta$  5. Die TGF- $\beta$  Proteine mit einem Molekulargewicht von 25 kD finden sich hauptsächlich in Knochen- und Knorpelgewebe. Die korrespondierenden Rezeptoren werden in hoher Zahl von Osteoblasten synthetisiert (Massague 1990), was auf die bedeutende Rolle von TGF- $\beta$  im Knochenstoffwechsel hinweist.

Eine mitogene Wirkung auf Osteoblasten-Vorläuferzellen (Baylink et al. 1993) und deren Stimulation zur Kollagenmatrix-Synthese sind ebenso bekannt (Marx et al. 1998).

In einer tierexperimentellen Studie am Kaninchen konnte in Folge einer kontinuierlichen TGF- $\beta$  Applikation eine deutliche Steigerung der mechanischen Stabilität im Zuge der Heilung von Tibiafrakturen festgestellt werden (Lind et al. 1993). Im Zusammenhang mit Knochenersatzmaterialien bestehen in Abhängigkeit des verwendeten Materials unterschiedliche Ergebnisse bezüglich des Knocheneinwuchses. Während der Knocheneinwuchs bei Implantaten aus einer Kombination von TGF- $\beta$  mit einer Hydroxylapatit-Trikalzium-Phosphatbeschichtung im Vergleich zu TGF- $\beta$ -freien Implantaten um ein Vielfaches gesteigert wurde (Sumner et al. 1995), konnte bei der Verwendung von TGF- $\beta$ 1 beschichteten Hydroxylapatitimplantaten nur ein geringer Knochenzuwachs verzeichnet werden (Lind et al. 1993).

Der natürlicherweise in Blutplättchen vorkommende TGF- $\beta$  hemmt die Knochenresorption, die Osteoklastenformation und deren Aktivität (Aghaloo et al. 2002). Des Weiteren ist TGF- $\beta$  in der Lage, die  $\alpha$ -smooth muscle actin-Expression und die Kollagen-Expression in kultivierten Fibroblasten zu induzieren (Gabbiani 1998). Die durch TGF- $\beta$  modulierten Fibroblasten differenzieren sich in Bezug auf die ECM-Synthese und die Aktinfilament-Expression zu Myofibroblasten (Vyalov et al. 1993).

### **2.5.5 Vascular endothelial growth factor (VEGF)**

Der in 4 Isoformen vorkommende VEGF wird verstärkt unter hypoxischen Bedingungen exprimiert und hat ein Molekulargewicht von 46 – 48 kDa (Kilian et al. 2005). Wichtige Funktionen hat er bei der Stimulation der Reifung von Granulozyten-Makrophagen-

Vorläuferzellen (Broxmeyer et al. 1995; Kilian et al. 2005), daneben gilt er als potenter Stimulator der Angiogenese (Watanabe et al. 2007).

Wachstumsfaktoren wie TGF- $\beta$  (Saadeh et al. 1999), IGF (Poulaki et al. 2003), bFGF (Saadeh et al. 2000) und PDGF (Wang et al. 1996) erhöhen die VEGF-Expression in Osteoblasten. Die Kombination dieser Wachstumsfaktoren kann im Hinblick auf die VEGF-Expression zu synergistischen Effekten führen (Kilian et al. 2005).

VEGF interagiert mit VEGF-1 und VEGF-2 Rezeptoren, die auf der Oberfläche von Endothelzellen und Osteoblasten exprimiert werden (Clauss et al. 1996; Deckers et al. 2000). Beide Rezeptortypen werden durch VEGF selbst sowie unter hypoxischen Bedingungen hochreguliert (Wilting et al. 1996).

Immunhistochemisch konnte das VEGF-Protein in einem Rattenmodell in proliferierenden Osteoblasten nahe des Osteotomieendes detektiert werden (Saadeh et al. 1999). Des Weiteren stellten Saadeh et al. (1999) eine erhöhte VEGF mRNA-Expression während der Frakturheilung von Mandibular-Frakturen dar. Auch Kilian et al. (2005) weisen eine VEGF-1 Rezeptor-Expression in Osteoblasten und multinukleären Riesenzellen in standardisierten, mit Hydroxylapatit befüllten Defekten von Mischweinen nach und unterstützen damit die Ergebnisse von zahlreichen *in-vitro* Versuchen (Deckers et al. 2000; Nakagawa et al. 2000; Sawano et al. 2001).

Die Schlüsselfunktion von VEGF bei der Interaktion von Osteoblasten und Endothelzellen, deutet neben seiner Relevanz bei der Frakturheilung sowie der Knochenneubildung (Street et al. 2002) auf seine wichtige Rolle bei der Osseointegration von Knochenersatzmaterialien hin (Kilian et al. 2005).

### 3. Material und Methoden

#### 3.1 Versuchstiere

##### 3.1.1 Spezies und Rasse

Durch eine Rotationspaarung von Vietnamesischen Hängebauchschwein, der Deutschen Landrasse und dem Sattelschwein entstand die Rasse der verwendeten Versuchstiere. Es handelt sich um Miniaturschweine der Rasse Mini-Lewe, die sich von einem Züchtungsvorhaben der Humboldt-Universität Berlin (Außenstelle Berlin-Lehnitz) und dem Vermehrungsbetrieb Gut Wendefeld ableitet. 1996 erfolgte die Kreuzung zwischen Mini-Lewe und Trollschwein, um eine genetische Enge in einer geschlossenen Population zu vermeiden, wodurch Konstitution und Vitalität der Tiere deutlich verbessert werden konnten.

##### 3.1.2 Tierdaten

Bei den Versuchstieren handelt es sich um 26 männliche kastrierte Tiere im Alter von neun Monaten, deren Körpergewicht zum Operationszeitpunkt 41,0 (+/- 11,0) kg und zum Zeitpunkt der Tötung 42,2 (+/- 11,1) kg betrug.

Die Wahl der Tiere fiel auf Miniaturschweine, da diese in Bezug auf die Knochenstruktur, Thrombozytenzahl und Gerinnungsparameter eine große Homologie zum Menschen aufweisen (Hönig und Merten 1993).

Das Regierungspräsidium Gießen genehmigte das Versuchsvorhaben auf Antrag gemäß §8 Abs.1 des Tierschutzgesetzes (Aktenzeichen VI 25.3 – 19 c 20/15 c GI 20/14).

##### 3.1.3 Haltung und Fütterung

Die Einstallung der Miniaturschweine erfolgte in Einzelboxen des Tierstalles des physiologischen Institutes des Fachbereiches Humanmedizin der Justus-Liebig-Universität Gießen. Es handelte sich um ca. vier m<sup>2</sup> große Boxen mit Gummimatten. Den Tieren wurde Wasser *ad libitum* zur Verfügung gestellt, und sie wurden zweimal täglich mit einer Mischung aus Weizenkleie, Hafer und Mais versorgt. Die Einstallung erfolgte drei Tage vor Versuchsbeginn bei einer Umgebungstemperatur von 24 (+/- 1) °C.



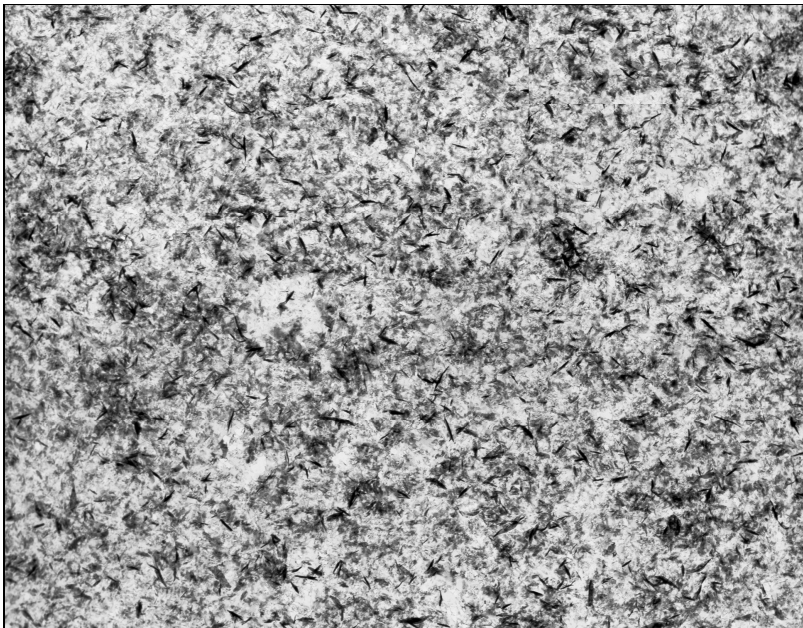
### 3.2 Versuchsaufbau

#### 3.2.1 Der Hydroxylapatit-Knochenersatzstoff Ostim®

Ostim® ist eine aus vollsynthetischem Hydroxylapatit bestehende plastische Knochenmatrix. Es handelt sich um phasenreinen Hydroxylapatit, der in Gestalt nadelförmiger Nanokristalle vorliegt (**Abbildung 2**). Diese entsprechen in Form und Größe den Hydroxylapatitkristallen von Knochengewebe. Mit der geringen Kristallgröße korreliert eine sehr große reaktive Oberfläche von  $\geq 100 \text{ m}^2/\text{g}$ , die Proteine und Kalzium-Ionen bindet. Die Löslichkeit in Wasser beträgt  $2,6 \text{ mg}/100 \text{ g}$  Wasser, das Ca/P-Verhältnis 1,675 bei einem pH-Wert von ca. 7,5.

Ostim® ist laut Herstellerangaben volumenstabil und kommt als nicht aushärtende visköse Paste bereits vielfältig in Bereichen der Orthopädie, Kieferchirurgie und Traumatologie zum Einsatz. Vorausgegangene präklinische Studien wurden an der „Russian State Medical University“ durchgeführt.

In der Gruppe I/PRP– kam Ostim® 25 (Feststoffanteil von 25% in Wasser) und in der Gruppe II/PRP+ Ostim® 35 (Feststoffanteil von 35% in Wasser) zur Anwendung (siehe Kap. 3.2.2.1).



**Abbildung 2: Ultrastrukturelle Ansicht Ostim®**

**Das Implantatmaterial weist eine elektronenhelle Matrix mit elektronendichten nadelförmigen Hydroxylapatitkristallen auf. (Vergrößerung x15870)**

### 3.2.2 Plättchenreiches Plasma und die Bestimmung der Thrombozytenzahl

Die Isolierung des plättchenreichen Plasmas (PRP) wurde mittels einer standardisierten Methode unter Verwendung eines vollautomatischen Blutkomponenten-Separationssystems (Baureihe Compact A, Dideco/Sorin Biomedica, Puchheim) in der Berufsgenossenschaftlichen Unfallchirurgie Tübingen durchgeführt.

Unter Zugabe eines Antikoagulanzen mit den Bestandteilen Phosphat, Dextrose und Natriumcitrat (Fürst et al. 2003; Aghaloo et al. 2004) wurden sechs zufällig ausgewählten Tieren jeweils 250 ml Vollblut entnommen. Es folgte eine erste Zentrifugation für 10 min bei 5600 U/min, um das plättchenarme Plasma von Erythrozyten und dem *buffy coat* (Thrombozyten und Leukozyten) zu separieren. Um eine Trennung von Erythrozyten, Leukozyten und PRP zu erreichen, erfolgte eine zweite, niederfrequente Zentrifugation bei 2400 U/min für ebenfalls zehn min.

Die für die Gewinnung der thrombozytären Wachstumsfaktoren nötige Degranulation der im Thrombozytenkonzentrat enthaltenen Thrombozyten wurde mittels der Zugabe von zehn ml 8,4 %igem Kalziumglukonat (Braun, Melsungen) und 1000 I. E. Thrombin (Gentrac Inc., Middleton, USA) erreicht. Die Aufbewahrung des so hergestellten PRP erfolgte in zwei ml fassenden Kartuschen bei - 20 °C.

Anschließend wurde eine Konzentrationsbestimmung der enthaltenen Wachstumsfaktoren im vorliegenden PRP und im Blutplasma der entsprechenden Proben mittels des *Quantikine™ Elisa-Testkits* (R&D Systems Inc., Minneapolis, USA) durchgeführt. Sieben Verdünnungsstufen zwischen 32,2 pg/ml und 2000 pg/ml dienten als Messstandard, um die Konzentration der Wachstumsfaktoren *Vascular endothelial growth factor* (VEGF), *Platelet-derived growth factor-AB* (PDGF-AB), *Platelet-derived growth factor-BB* (PDGF-BB), *Transforming growth factor beta 1* (TGF-β1) und *basic-Fibroblast growth factor* (bFGF) zu bestimmen.

Das PRP mit der höchsten Konzentration an thrombozytären Wachstumsfaktoren wurde zur Implantation in die Knochendefekte der Gruppe II/PRP+ verwendet.

Zur Bestimmung der Thrombozytenzahl sowie im Vollblut als auch im Thrombozytenkonzentrat der jeweiligen Probe wurde das Zellzählgerät System 9000 (Serono, USA) verwendet.

### 3.2.3 Das Tierkollektiv

Das Kollektiv der Versuchstiere (n=26) wurde wie in der unten aufgeführten Tabelle (**Tabelle 4**) in drei Gruppen aufgeteilt. Die Knochendefekte wurden bei allen 26 Tieren angelegt.

**Tabelle 4: Tierversuch: Übersicht der Versuchsgruppen**

Gruppe I	PRP – (n=11)
Gruppe II	PRP + (n=11)
Gruppe III	Leerdefekt (n=4)

### 3.2.3 Implantation

Bei Gruppe I/PRP- (n=11) erfolgte die Defektfüllung mit dem Knochenersatzstoff Ostim® 25 bei der Gruppe II/PRP+ (n=11) mit Ostim® 35 und PRP, während bei Gruppe III/Leerdefekte im Sinne einer Leerdefektkontrolle die Defekte nicht aufgefüllt wurden.

#### 3.2.3.1 Operation und Operationstechnik

Die Operationen erfolgten im Institut für Physiologie der Justus-Liebig-Universität Gießen.

Die Prämedikation der Tiere erfolgte mittels intramuskulärer Injektion von 2 mg/kg KG Azaperon (Stresnil®, Janssen-Cilag Neuss) und 20 mg/kg KG Ketamin (Ketavet®, Pharmacia-Upjohn). Zur Narkoseeinleitung wurden 2 mg/kg KG Propofol (Propofol-Lipuro®, Braun-Melsungen) in die Venenverweilkanüle der *V. auricularis intermedia* appliziert. Die Narkoseerhaltung wurde durch Inhalation eines Sauerstoff-Isfluran-Gemisches (Forene-1-chlor-2,2,2-trifluorethyl-difluormethylether, Abbott Diagnostics, Wiesbaden) durch einen Endotrachealtubus erreicht. Es handelte sich um ein halbgeschlossenes System mit Isofluranverdampfer (0,1 – 0,4 Vol.%).

Unter sterilen Bedingungen wurden zunächst die Knochendefekte bei den Tieren angelegt, die mit dem Knochenersatzstoff ohne Wachstumsfaktoren befüllt wurden (Gruppe I/PRP-). Zuvor wurden bei sechs der zu operierenden Tieren jeweils 250 ml Vollblut aus der *V. jugularis* entnommen. Das aus diesem Blut gewonnene PRP wurde den Tieren der zweiten Gruppe (Gruppe II/PRP+) zusammen mit Ostim® 35 in den Knochendefekt implantiert. Es

wurde das PRP des Tieres verwendet, das die höchste Konzentration an Wachstumsfaktoren aufwies.

Die narkotisierten und mit Gurten am Operationstisch fixierten Tiere wurden in Rückenlage operiert. Nach dem Scheren der rechten Hintergliedmaße und der mehrmaligen Desinfektion des Operationsbereiches mit Jod-PVP-Lösung wurden die Tiere steril abgedeckt.

Einer fünf cm langen mediopatellaren Inzision der Haut folgte eine Präparation der Unterhaut, der Faszien und der Muskulatur. Schließlich wurde die Gelenkkapsel freipräpariert, durchtrennt und gleichzeitig die Patella nach lateral luxiert. Der 20 mm tiefe und im Durchmesser 7 mm betragende Knochendefekt wurde in der Intercondylarregion des Femurs in Höhe des patellaren Gleitlagers mittels eines *Diamond Bone Cutting Systems* (DBCS, Stryker) angelegt.

Nach der Entfernung des entstandenen Knochenzylinders mittels eines Extraktors wurde das bei der Bohrung entstandene Knochenmehl durch Spülung mit steriler Kochsalzlösung entfernt.

Im Anschluss erfolgte eine Füllung des Defektes mit dem Knochenersatzmaterial mittels einer Applikationskartusche. Um externe Einflüsse auf das eingefügte Material zu reduzieren, wurde der Defekt schließlich mit einem speziell gefertigten Kunststoffdeckel (Osartis, Odernburg) *press fit* verschlossen. Der Rücklagerung der Patella folgte ein schichtweiser Wundverschluss und schließlich eine Versorgung der Hautnaht mit Silberspray (Silberspray, Heiland, Hamburg).

### **3.2.3.2 Postoperative Versorgung**

Nach der Operation erfolgte eine regelmäßige Überwachung bezüglich der Belastung der betroffenen Gliedmaße, der Wundheilung und des Allgemeinbefindens der Tiere. Es wurden jeweils einmalig eine analgetische Behandlung mit 0,01 mg/kg KG Buprenorphin (Temgesic®, Boehringer Ingelheim) und zusätzlich eine antiphlogistische Behandlung mit 4 mg/kg KG Carprofen (Rimadyl®, Pfizer) durchgeführt.

### 3.3 Gewinnung und Aufbereitung der Präparate

#### 3.3.1 Explantation und Perfusion

Die Explantationsoperation erfolgte nach einem Zeitraum von 20 Tagen. Um eine rasche Fixierung des zu gewinnenden Gewebes zu erreichen, wurde bei jeweils sechs Tieren der Gruppen I/PRP- und II/PRP+ eine Perfusionsfixierung mit 4 %igem Paraformaldehyd durchgeführt. Abgesehen der Proben von zwei Tieren, die in flüssigem Stickstoff tiefgefroren wurden und nicht in die Auswertung mit einbezogen wurden, wurde bei den übrigen Gewebeproben eine Immersionsfixierung durchgeführt.

Im Vorfeld der Perfusionsfixierung wurde den narkotisierten Minischweinen in der Medianen die Bauchhöhle eröffnet und das Darmkonvolut nach lateral verlagert. Der Präparation der *V. cava caudalis* und der *Aorta abdominalis* folgte eine Ligatur der Aorta kranial der Aufzweigung in die *Aa. iliaci externae* und eine Ligatur der *V. cava caudalis* ebenfalls kranial ihrer Aufzweigung. Nach einer kleinen Inzision der Arterie und der Vene wurde jeweils ein dünner Silikon-Katheter mit Spritzenansatz in die Gefäße eingeführt. Durch den Katheter im arteriellen Gefäßsystem wurde die Gliedmaße mit einer sterilen Ringer-Laktat-Lösung gespült, bis die abfließende Flüssigkeit klar und frei von Blutbeimengungen war. Die Tiere wurden zu diesem Zeitpunkt mittels einer Applikation von T61 über einen Venenverweilkatheter in der *V. auricularis intermedia* euthanasiert. Eine Perfusion mit 4 %igem Paraformaldehyd erfolgte anschließend. Nach der Aushärtung der Gliedmaßen wurden die distalen Femura mittels einer Knochensäge abgesetzt, von Muskeln, Sehnen und Faszien befreit und entsprechend in drei mm breite Scheiben zertrennt. Die Schnittrichtung hierbei war sagittal. Die so gewonnenen planparallelen Gewebescheiben (Scheibe A – D) wurden zum Abschluss der Explantation in einer der Untersuchungsmethode angepassten Lösung für 24 Stunden fixiert (**Tabelle 5**).

**Tabelle 5: Fixation, Einbettung und Untersuchungsmethoden der Knochenscheiben**

Gewebescheibe	Fixation	Einbettungsmedium	Untersuchungsmethode
Scheibe A	Karnovsky	Technovit 7200	Histologie
Scheibe B	4 % Paraformaldehyd	Paraffin	Histologie
Scheibe C		Technovit 9100	Immunhistochemie
Scheibe D	Yellow Fix	Epon	Transmissions- elektronenmikroskopie

### 3.4 Histologie

#### 3.4.1 Einbettung in Technovit 7200

Die planparallelen unentkalkten und in Karnowskylösung fixierten Gewebescheiben (Scheibe A) wurden nach gründlichem Spülen in *phosphate buffered saline* (PBS) jeweils für 48 h in Ethanol verschiedener Konzentrationen dehydriert und anschließend in Ethanol und Technovit 7200 VLC verschiedener Mischverhältnisse überführt. Danach schloss sich eine Inkubation in mit 1% Dibenzoylperoxid (BPO, Heraeus-Kulzer, Wehrheim) versetztem Technovit 7200 VLC für einen Zeitraum von neun Tagen an. Um eine optimale Penetration mit Flüssigkunststoff erzielen zu können, wurden die Präparate jede Stunde für 15 min unter Vakuum gesetzt. Ein Abheben des Gewebes der kunststoffinfiltrierten Knochenscheiben vom Einbettmuldenboden wurde durch eine Fixierung mit dem Fixationskleber Technovit 7230 VLC (Heraeus-Kulzer, Wehrheim) verhindert. Es folgte eine Überschichtung mit Technovit T 7200 VLC BPO.

Im Histolux (Kulzer Exakt, Norderstedt) folgte die Auspolymerisierung des Kunststoffes bei 40 °C und Blaulicht. Spannungsrisse wurden hierbei durch eine zweistündige Vorpolymerisation bei einer Gelblichtbestrahlung vermieden.

Dem endgültigen Ausblocken ging eine abschließende 16 h dauernde Aushärtung bei 40 °C in einem Wärmeschrank voraus.

#### 3.4.2 Trenn-Dünnschliff-Technik

Mittels der Trenn-Dünnschliff-Technik ist es möglich, histologische Präparate aus nicht schneidbaren kalzifizierten und extrem harten Geweben wie etwa Knochen oder Zähnen herzustellen.

Um die Dicke des Dünnschliffes berechnen zu können, wurde vor der eigentlichen Herstellung des Dünnschliffes mit einer Mikrometerschraube die Dicke des Glasobjektträgers bestimmt.

Schließlich wurde der polymerisierte Gewebekblock aus der Einbettmulde entfernt und mit der vom Präparat weiter entfernten Fläche mittels Vakuumklebepresse (EXAKT Apparatebau, Norderstedt) auf einem Objektträger (EXAKT Apparatebau, Norderstedt) befestigt, in das Mikroschleifsystem (EXAKT Apparatebau, Norderstedt) eingesetzt und die dem Präparat nähere Fläche mit einem Schleifpapier der Körnung 1200 angeschliffen. Schleifpapier der Körnung 4000 diente der Nachbehandlung des Gewebekblockes, um evtl. vorhandene

Schleifspuren zu beseitigen und eine möglichst glatte Oberfläche zu erzielen.

Auf die so entstandene glatte planparallele Oberfläche konnte nun ein Objektträger mittels 7210 VLC-Präzisionskleber (Heraeus-Kulzer, Wehrheim) aufgebracht werden. Um die Kleberdicke rechnerisch bestimmen zu können, wurde mit Hilfe einer Mikrometerschraube die Dicke des Präparatblockes vor der Beklebung und die Dicke des Objektträgers gemessen. Die Kleberstärke ergab sich aus der Differenz der Gesamtdicke, also Präparatblock, Kleber und Objektträger, abzüglich der im Vorfeld bestimmten Gewebblockstärke und Objektträgerstärke. Aus dem Präparat-Objektträger-Konstrukt konnten nun mit Hilfe eines Trenn-Schleifsystems (EXAKT Apparatebau, Norderstedt) Schriffe von ca. 100 µm Dicke hergestellt werden. Das Gerät durchtrennte das angefertigte Konstrukt unter permanenter Wasserkühlung mittels eines diamantbeschichteten Trennbandes unter einer definierten Kraft, die das Präparat gegen das Trennband presste.

Die gewünschte Dicke von 100 µm konnte nun eingestellt werden und der Gewebblock mittels eines mit Sandpapier beschichteten Schleiftellers des EXAKT-Mikro-Schleifsystems (EXAKT Apparatebau, Norderstedt) auf die gewünschte Dicke abgeschliffen werden.

Die Herstellung des Dünnschliffes wurde mit einer letzten Bearbeitung mit feinkörnigem Sandpapier abgeschlossen, um vorhandene Schleifspuren zu beseitigen.

### **3.4.3 Toluidinblau-Färbung der Dünnschliff-Präparate**

Zur Herstellung der Toluidinblau-Lösung wurden unter 15 minütigem Rühren eine Lösung aus 200 µg Pyronin G (Merck, Darmstadt) und 200 ml *Aqua dest.* und eine zweite Stammlösung aus 800 µg di-Natriumtetraborat (Merck, Darmstadt), 800 µg Toluidin-O (Chroma, Köngen) und 80 ml *Aqua dest.* hergestellt. Dem Vermischen der Lösungen folgte ein 15 minütiger Rührvorgang und eine zweimalige Filtration.

Um ein verbessertes Färbeergebnis zu erhalten, erfolgte vor der eigentlichen Färbung der Präparate mit Toluidinblau, eine Anätzung der Präparatoberfläche mit einer 10 %igen Wasserstoffperoxid-Lösung für zehn Minuten. Einer Spülung mit *Aqua dest.* schloß sich eine zehn minütige Färbung mit Toluidinblau an, sowie eine erneute Spülung und das Eindeckeln der angefertigten Präparate mit Technovit 7200.

### 3.5 Immunhistochemie

#### 3.5.1 Paraffintechnik

##### 3.5.1.1 Entkalkung

Im Vorfeld der Paraffineinbettung mussten die für die Immunhistochemie vorgesehenen Gewebelöcke (Scheibe B) über einen Zeitraum von 21 Tagen einer schonenden aber dennoch gründlichen Entkalkungsprozedur unterzogen werden. Die Erhaltung der Gewebestruktur sowie der Antigenität im Zuge der sich anschließenden Immunhistochemie standen als Kriterien bei der Wahl des Entkalkungsmediums im Vordergrund. In zahlreichen Vorversuchen stellte sich die folgende Rezeptur als Methode der Wahl heraus:

50 g Ethylendiamintetraessigsäure (Titriplex III, Merck, Darmstadt) und 17 g Trishydroxymethylaminomethan (Tryzma-Base, Sigma, St.Louis, USA) in 500 ml *Aqua dest.* und einem pH-Wert von 7,4.

##### 3.5.1.2 Einbettung

Im Anschluss an die Entkalkung folgte die Spülung der Proben mit *Aqua dest.*, und deren Dehydrierung in der aufsteigenden Alkoholreihe. Der Infiltrierung der Proben mit reinem Xylol schloss sich die Paraffineinbettung in metallenen Einbettmulden (Tissue Tek, Leica, Bensheim) an. Die Ausbettung der erstarrten Präparate folgte nach einer 16 h dauernden Lagerung bei einer Temperatur von 8 °C.

##### 3.5.1.3 Schnitthanfertigung

Mittels eines *Microtome Blades* (Feather R35 Type, Japan) im Rotationsmikrotom (Leica RM 2155, Bensheim) wurde die Paraffinschicht in 11 µm dicken Schichten bis zu dem zu untersuchenden Präparat stufenweise abgetragen. Im Anschluss konnten aus den Paraffinblöcken Schnitte einer Dicke von 4 bis 5 µm angefertigt werden. Die so gewonnenen in einem 45 °C Wasserbad schwimmenden Präparate wurden schließlich auf mit 3-Aminopropyl-triethoxysilan beschichtete Objektträger (SuperFrost®Plus, Menzel-Gläser, Deutschland) übertragen und luftgetrocknet.

Die Entparaffinierung der Paraffinschnitte erfolgte mittels Xylol, Aceton reinst. und Aceton/Waschpuffer im Verhältnis 1:1. Im Anschluss wurden die Schnitte für zwei min einem Waschpuffer ausgesetzt.



### 3.5.1.4 Färbung mit Hämatoxylin-Eosin

Die entparaffinierten Gewebeschnitte wurden durch die absteigende Alkoholreihe geführt und anschließend mit *Aqua dest.* gespült. Eine fünfminütige Färbung in Hämalaunlösung (Mayers Hämalaunlösung, 9249, Merck, Darmstadt) schloß sich an. Nach einem weiteren Spülschritt mit *Aqua dest.* und der Behandlung mit Leitungswasser wurden die Schnitte 30 s lang in eine 1%ige Eosin-Lösung (Certistain®, Eosin G, Merck, Darmstadt) überführt. Bevor die Schnitte mit Entellan® (Schnelleinschlußmedium, Merck, Darmstadt) eingedeckt wurden, wurden sie erneut einem Spülschritt mit *Aqua dest.*, der aufsteigenden Alkoholreihe und einer abschließenden Xylolbehandlung unterzogen.

### 3.5.2 Technovittechnik

#### 3.5.2.1 Einbettung

Bei Technovit 9100® handelt es sich um ein Polymerisierungsgemisch auf Methyl-Methacrylat-Basis, das aus folgenden Komponenten zusammengesetzt ist: Härtemittel 1 und 2, Polymerisierungsregler, PMMA-Puder, stabilisierter Basislösung und PMMA-Granulat.

Die in 4 %igem Paraformaldehyd fixierten unentkalkten Knochenpräparate (Scheiben B und C) wurden in 0,1 M Natriumphosphatpuffer für 48 h gespült. Vor der endgültigen Einbettung in Technovit 9100® kam es zu einer Dehydratation in einer aufsteigenden Alkoholreihe und einer Infiltrierung mit Xylol als Zwischenlösung.

Die Immersion der Gewebeproben erfolgte in drei Stufen. Der Präinfiltration I mit Xylol und stabilisierter Basislösung folgte die Präinfiltration II mit Härter 1 und stabilisierter Basislösung. Die Infiltration wurde schließlich mittels Härter I, PMMA-Puder und entstabilisierter Basislösung durchgeführt. Im Anschluss wurden die Präparate bei vier °C für zwei Tage inkubiert. Die infiltrierten Proben wurden auf Einbettformen (EXAKT, Oststeinbeck) übertragen, die Polymerisierung mit einem Polymerisierungsgemisch auf Eis folgte. Die auspolymerisierten Kunststoffblöcke konnten nach zwei Tagen ausgebettet werden.

#### 3.5.2.2 Schnitthanfertigung

Aus den Technovitblöcken wurde mittels eines Hartmessers (Leica, Nußloch GmbH) die Technovitschicht abgetragen, bis das zu untersuchende Knochenpräparat zu sehen war. Die Oberfläche des verwendeten Technovitblockes wurde während des Schneidevorgangs regelmäßig mit Schneideflüssigkeit (30%iger Alkohol) befeuchtet. Anschließend wurden die

Schnitte auf einen mit 3-Aminopropyl-triethoxysilan beschichteten Objektträger (SuperFrost®Plus, Menzel-Gläser, Deutschland) übertragen und mit einer Streckflüssigkeit (70 %iger Alkohol) benetzt.

Die so gewonnenen Präparate wurden mittels einer Polyethylenfolie (Heraeus Kulzer, Hanau) bedeckt und bei 50 °C über Nacht in einem Wärmeschrank gelagert.

Im Vorfeld der Immunhistochemie mußten die in Technovit eingebetteten Schnitte entplastet werden. Entsprechend erfolgte eine Behandlung dreimalig für 20 min mit 2-MEA (Merck-Schuchardt, Hohenbrunn) und zweimalig für fünf min in reinem Aceton und Aceton/Waschpuffer im Verhältnis 1:1.

### 3.5.3 Antigennachweis

Paraffin- und Technovit-Schnitte dienen der Markierung mittels des monoklonalen Antikörpers *Anti-Human Smooth Muscle Actin* (Dako, Glostrup, Dänemark). Der verwendete Antikörper wird zur farblichen Darstellung von myoepithelialen Zellen, Myofibroblasten und glatten Muskelzellen verwendet.

Des Weiteren fanden die Schnitte Verwendung zur Darstellung von Kollagen I, das mittels des polyklonalen Antikörpers Anti-Kollagen I (Biomex, Germany) detektiert wurde. **Tabelle 6** gibt einen Überblick der verwendeten Antikörper.

**Tabelle 6: Verwendete Antikörper**

Primärantikörper	<i>Anti-Smooth Muscle Actin</i>	<i>Anti-Kollagen I</i>
<b>Hersteller</b>	Dako Glostrup Dänemark	Biomex
<b>Verdünnung</b>	1:200	1:750
<b>monoklonal / polyklonal</b>	Monoklonal	Polyklonal
<b>Speziesreaktivität</b>	Mensch	Mensch
<b>sekundärer Antikörper</b>	Kaninchen-Anti-Maus	Ziege-Anti-Kaninchen
<b>Hersteller</b>	Dako, Glostrup Dänemark	Dako, Glostrup Dänemark
<b>Verdünnung</b>	1:400	1:800

Zur erfolgreichen Darstellung antigener Strukturen, war es notwendig eine Antigen-Demaskierung mittels 0,05 M Tris / HCl mit 0,05 % Pronase (Dako, Dänemark) bei einem

pH-Wert von 7,2 durchzuführen, die mit 0,1 M Tris-NaCl-Puffer abgestoppt wurde.

Die zur immunhistochemischen Untersuchung gewählte Avidin-Biotin-Complex-Methode (ABC-Methode) beinhaltet die Verwendung von einem Primärantikörper, der gegen ein spezifisches Antigen gerichtet ist, einem biotinyliertem Sekundärantikörper und dem Avidin-Biotin-Komplex. Im Verlauf der Reaktion bindet das Avidinmolekül des Peroxidase-konjugierten Avidin-Biotin-Komplexes an das im Sekundärantikörper enthaltene Biotin.

Zur Sichtbarmachung des Enzyms Peroxidase und somit des Antigen-Antikörperkomplexes wurde das Chromogen (NovaRED™ Substrate Kit for Peroxidase, Vector Laboratories, Burlingame, USA) verwendet.

Nach der Entparaffinierung bzw. der Entplastung wurden die Schnitte zur Unterbindung der endogenen Peroxidase für fünf min in 0,3 %iges Wasserstoffperoxid (Merck, Darmstadt) überführt und anschließend in eine Waschpuffer-Lösung mit 3% Schweineserum (Dako, Glostrup/ Denmark) verbracht. Die Folge war eine Blockierung von unspezifischen Antikörperbindungsstellen, mit dem Ziel, falsch positive Untersuchungs-Ergebnisse zu verhindern. Es folgten zwei weitere Spülschritte, und wie in **Tabelle 6** dargestellt, die Inkubation mit den jeweiligen in *Antibody-Diluent* (Dako, Denmark) verdünnten Primärantikörpern (*Anti-Smooth Muscle Actin*, Anti-Kollagen I) bei einer Temperatur von acht °C für 16 h.

Daraufhin folgte nach dem Abspülen der Primärantikörper, wie in **Tabelle 6** dargestellt, die Inkubation mit dem Sekundärantikörper (*smooth Muscle Actin* = Kaninchen Anti-Maus, Kollagen I = Ziege Anti-Kaninchen) bei 20 °C für eine h.

Nach einer erneuten Spülung mit Waschpuffer wurden die Präparate in dem mit 0,05 M Tris-NaCl-Puffer verdünnten Avidin-Biotin-Complex (ABComplex/HRP, K0355, Dako, Denmark) 30 min lang bei 20 °C inkubiert. Im Anschluss an einen weiteren Spülgang kam es zur Visualisierung der Reaktion durch Zugabe des Chromogens (NovaRed™ Substrate Kit for Peroxidase, Vector Laboratories, USA) und zur Heamatoxylin-Kernfärbung (Shandon Scientific Ltd., UK). Die Dehydratation erfolgte nach Spülung in *Aqua bidest.* und dem 10 minütigen Bläuen in Leitungswasser durch eine aufsteigende Alkoholreihe. Nach der Xylol-Behandlung folgte die Eindeckung der Paraffinschnitte mit Entellan® (Schnelleinschlussmedium, Merck, Darmstadt) und die der Technovitschnitte mit Technovit T 7200 (Heraeus Kulzer, Wehrheim).

Durch Inkubation der Präparate in einem Verdünnungsmedium ohne Primärantikörper wurden die benötigten Negativkontrollen erstellt.

### 3.6 Dokumentation der Ergebnisse der Histologie und Immunhistochemie

Zur lichtmikroskopischen Auswertung wurde das Lichtmikroskop Zeiss Axioplan (Carl Zeiss, Jena) verwendet. Die mittels des Bildmanagementsystems Leica IM 1000, Version 4,0 (Leica Microsystems Digital Imaging, Cambridge, UK) bearbeiteten Bilder konnten mit Hilfe des Axiophot 2 Mikroskop-Fotoaufsatzes (Carl Zeiss Jena) digital durch die Kamera DC 500 (Leica, Microsystems, Wetzlar) aufgenommen werden.

### 3.7 Transmissionselektronenmikroskopie

#### 3.7.1 Epon-Einbettung

Die in Yellow-Fix fixierten Knochenscheiben (Scheibe D) (**Tabelle 5**) wurden für 48 h in 0,1 M Natriumphosphatpuffer verbracht, um das verwendete Fixierungsmittel zu entfernen. Anschließend wurde mit 1 %iger Osmiumtetroxidlösung (Platinum GmbH, Wiesbaden) kontrastiert, 24 h mit 0,1 M Natriumphosphatpuffer inkubiert und in einer aufsteigenden Alkoholreihe dehydriert. Es folgte die Einbettung der Proben bei einer Temperatur von vier °C in einem aufsteigenden Verhältnis eines Epon-Xylol-Gemisches, bis hin zu reinem Epon 812 (Serva, Heidelberg). Das hier verwendete Einbettungsmedium auf Epoxidharzbasis zeigte in vorausgegangenen Studien aufgrund der guten Ultrastrukturerhaltung eine gute Eignung für die Transmissionselektronenmikroskopie. Die Einbettung erstreckte sich über drei Tage unter Unterdruck. Im Anschluss polymerisierten die Präparate für zehn min im Wärmeschrank, für 15 min im Exsikkator und schließlich bei 48 °C für drei h im Wärmeschrank. Die Polymerisation wurde durch eine Inkubation bei 60 °C für weitere 20 h im Wärmeschrank abgeschlossen.

#### 3.7.2 Semidünnschnitte und Elektronenmikroskopie

Aus den angefertigten Kunststoffblöcken wurden mit Diamantmessern an einem Ultramikrotom (Reichert-Jung, Wien, Österreich) 0,5 - 1 µm dicke Semidünnschnitte hergestellt. Es folgte die Übertragung auf einen Objektträger, die Trocknung auf einer Heizplatte und die Färbung mit Safranin (Merck, Darmstadt). Nach einer Spülung mit *Aqua dest.* wurde eine Gegenfärbung mit Toluidinblau durchgeführt, der ein erneuter Spülgang und das Eindeckeln folgten.

Nach Auswahl der zu untersuchenden Bereiche auf den Semidünnschnitten konnten Ultradünnschnitte mit einem Diamantmesser eines Ultramikrotoms (Reichert und Jung, Nußloch) angefertigt werden. Mit Hilfe einer Mikropinzette wurden die Ultradünnschnitte auf Kupfernetze (Bal-tec, Witten) aufgezogen und getrocknet. Anschließend wurde durch

Schnittkontrastierung mit Bleiacetat und Uranylacetat durchgeführt.

Die Untersuchung und Dokumentation der Ultradünnschnitte wurde mittels des Elektronenmikroskops EM 109 (Carl Zeiss, Jena) durchgeführt.

### 3.7.3 Färbung mit Safranin

Durch Lösen von einem Gramm di-Natriumtetraborat (Merck, Darmstadt) und einem Gramm Safranin (Merck, Darmstadt) in 100 ml *Aqua bidest.* wird die Safranin - Färbelösung hergestellt. Einem 30 minütigen Rührvorgang folgt die Entplastung der Semidünnschnitte und das Spülen mit *Aqua dest.*. Die anschließende Färbung dauert fünf s. Nach einem weiteren Spülschritt mit *Aqua dest.*, der Gegenfärbung mit Toluidinblau und einem finalen Spülgang mit *Aqua dest.* werden die Präparate eingedeckelt.

### 3.8 Datenquantifizierung

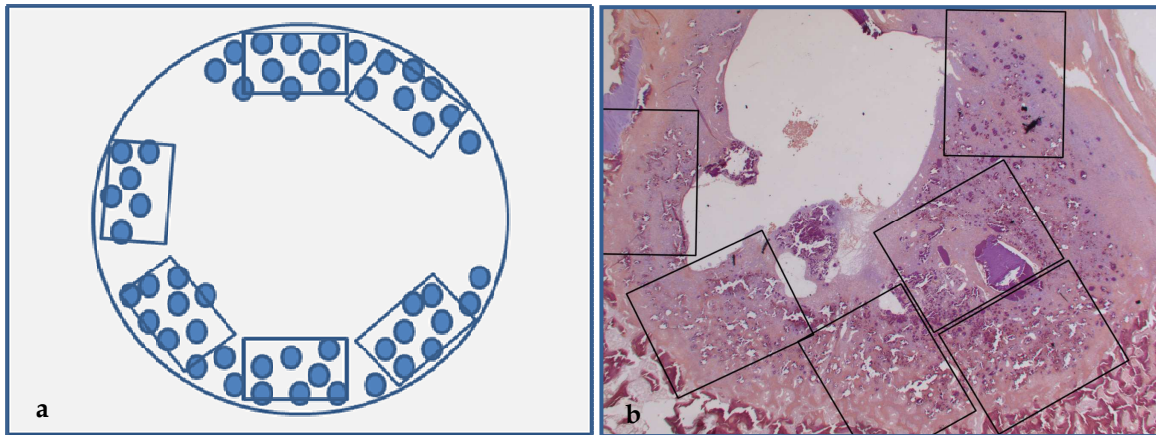
Zur Datenquantifizierung der mittels Immunhistochemie visualisierten Kollagen I-positiven Areale wurden Paraffin - Schnitte verwendet. Diese dienten dazu die Flächenausdehnung der Kollagen I-positiven Osteoid- bzw. Geflechtknochenareale innerhalb der Defekte der Tiere von den Gruppen I/PRP-, II/PRP+ und III/Leerdefekte zu untersuchen.

Voraussetzung für die optische Erfassung der zu quantifizierenden Osteoid- bzw. Geflechtknochenareale war ein durch das Computerprogramm Image Pro Plus, Version 4.5 (Media Cybernetics Inc., Silver Spring, USA) deutlich erkennbarer Farbunterschied der Kollagen I-positiven Areale zum umliegenden nicht oder nur mäßig markierten Gewebe. Mittels des genannten Programmes wurde die Farbnuance der Kollagen I-Färbung detektiert und gespeichert. Die durch das Chromogen deutlich gefärbten Kollagen I-positiven Areale konnten so erfasst werden.

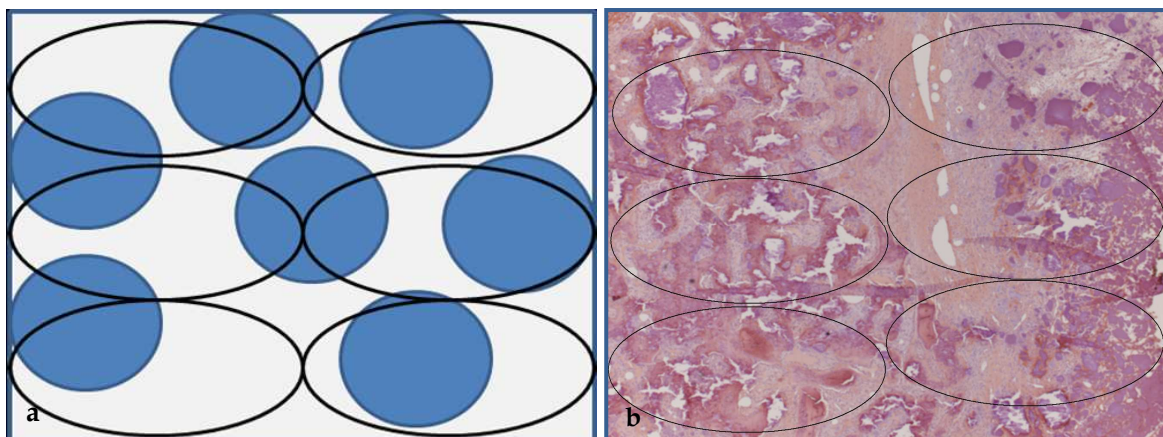
Es wurden jeweils vier Schnitte pro Tier der Gruppe I/PRP-, Gruppe II/PRP+ und der Gruppe III/Leerdefekte untersucht. Zur Untersuchung der Schnitte wurden entlang der Bohrkante des kreisförmigen Defektbereiches jeweils rechteckige Messfelder mit einer Fläche von jeweils 5,94 mm<sup>2</sup> angelegt (**Abbildungen 3a, b**). Die Anzahl der verwendeten Rechtecke schwankte zwischen zwei und sechs pro Präparat. Diese Messfelder wurden anschließend mittels ellipsenförmigen AOIs (*area of interest*) mit einer Fläche von jeweils 0,695 mm<sup>2</sup> aufgefüllt (**Abbildungen 4a, b**). Hier lag die Anzahl der AOIs zwischen zwei und sechs in einem Rechteck.

Die Kollagen I-positiven Areale wurden durch das Computerprogramm als rote Flächen auf

dem Bildschirm dargestellt und in „% pro Gesamtfläche“ umgerechnet. Somit konnte für jedes einzelne Tier der drei genannten Gruppen ein Mittelwert errechnet werden, woraus die jeweiligen Mittelwerte der Gruppen I/PRP-, II/PRP+ und III/Leerdekte abgeleitet wurden.



**Abbildung 3: Dokumentation der Messmethode. Rechteckige Messfelder entlang der Bohrkante des Defektes. a: Schema des Defektes und der angelegten Messfelder. Die Kollagen I-positiven Areale sollen durch die blauen Kreise symbolisiert werden. b: Paraffinschnitt, Kollagen I-Immunhistochemie, Gegenfärbung mit Hämatoxylin, (Vergrößerung x12,5).**



**Abbildung 4: Dokumentation der Messmethode. AOIs innerhalb eines rechteckigen Messfeldes. a: Schema eines Defektanschnitts. Die Kollagen I-positiven Areale sollen durch die blauen Kreise symbolisiert werden. b: Paraffinschnitt, Kollagen I-Immunhistochemie, Gegenfärbung mit Hämatoxylin (Vergrößerung x50).**

Mittels eines Kruskal – Wallis Tests wurde die statistische Auswertung der Mittelwerte pro Tier in den Gruppen I/PRP-, der Gruppe II/PRP+ und der Gruppe III/Leerdekte durchgeführt.

## 4. Ergebnisse

### 4.1 Postoperativer Verlauf

Abgesehen von einem Tier aus der Gruppe I/PRP-, bei dem eine Patellaluxation auftrat, verlief die postoperative Phase bei allen Tieren komplikationslos. Die operierten Gliedmaßen wurden nach einer Woche bereits wieder belastet. Gewebeproben des Tieres mit der Patellaluxation wurden von den Untersuchungen ausgeschlossen.

### 4.2 Wachstumsfaktoren-Konzentrationen im Blut-Plasma und im Thrombozytenkonzentrat

Die mittels ELISA-Verfahren ermittelten Werte von PDGF-BB stiegen, im Vergleich zu den Werten im Blutplasma, im Thrombozytenkonzentrat um den Faktor 7 an. Im Vergleich zum Blutplasma erhöhte sich außerdem der Konzentrationswert von TGF- $\beta$ 1 um den Faktor 1,6. Der größte Konzentrationsanstieg im Thrombozytenkonzentrat um den Faktor 24,4 konnte bei bFGF verzeichnet werden.

Die PDGF-AB Konzentration konnte aufgrund der fehlenden Antikörperbindung nicht ermittelt werden, während die VEGF-Konzentrationen unter der Detektionsgrenze lagen.

**Tabelle 7: Mittels ELISA ermittelte Konzentrationen der Wachstumsfaktoren im Thrombozytenkonzentrat und dem Blutplasma**

Wachstumsfaktor	Thrombozytenkonzentrat (pg / ml)	Blutplasma (pg / ml)
VEGF	< 10	< 10
PDGF-AB	Keine Ak-Reaktion	Keine Ak-Reaktion
PDGF-BB	2.452,1	343,45
TGF- $\beta$ 1	11.129,0	6.678,1
bFGF	334,1	13,69

#### 4.2.1 Thrombozytenkonzentrat

Die Thrombozytenzahl der sechs Spendertiere betrug im Mittel 267.000 +/- 33.000 Thrombozyten / l Vollblut.

Im Thrombozytenkonzentrat wurde ein Konzentrationsanstieg um den Faktor vier verzeichnet, was einer Konzentration von 1.300.000 +/- 700.000 Thrombozyten / l PRP entsprach.

### 4.3 Histologie

#### Gruppe I/PRP-

In Hinsicht auf Anzahl und Verzweigungsgrad der Knochenbälkchen werden die Symbole (+) für eine niedrige Anzahl und einen geringen Verzweigungsgrad, (++) für eine mäßige Anzahl mit mäßigem Verzweigungsgrad und (+++) für eine große Anzahl von Knochenbälkchen mit starkem Verzweigungsgrad verwendet.

In der Übersichtsvergrößerung kann in allen Schliffpräparaten eine breite Zone aus Ostimpartikeln, neugebildetem Knochen und Granulationsgewebe in der Peripherie des Defektes, entlang der Bohrkante beobachtet werden (**Abbildungen 5, 6a**).

Der neugebildete Geflechtknochen ist von dem Lamellenknochen des Knochenlagers durch die stärkere Anfärbbarkeit, die unregelmäßige Textur, vor allem aber durch das Fehlen von Osteonen und damit von Speziallamellen und Schaltlamellen zu unterscheiden (**Abbildungen 6a, b, c**).

Die Defektzentren sind häufig durch das Fehlen von Granulationsgewebe und Knochenersatz gekennzeichnet. Sie sind stets frei von neugebildetem Knochen (**Abbildung 5**).

Die Zonen zwischen den einzelnen unregelmäßig verteilten Implantatpartikeln und dem Geflechtknochen werden durch Granulationsgewebe mit einer Vielzahl an Zellen, einwachsenden Gefäßen und zum Defektrand parallel verlaufenden Fasern aufgefüllt (**Abbildung 6a**). Das Zellbild des Granulationsgewebes wird von den in großer Anzahl vorhandenen Fibroblasten, spindelförmigen Fibrozyten, multinukleären Zellen und zum Teil einzeln oder gruppenweise angeordneten polymorphen mononukleären Zellen dominiert. Osteoblasten liegen dem Geflechtknochen, der die Oberfläche des Knochenersatzes umgibt, auf (**Abbildung 6b**), dort wo sie fehlen, sind in der Regel multinukleäre Zellen mit zytoplasmatischen Einschlüssen anzutreffen.

Der Knochenersatzstoff Ostim® liegt partikulär im Granulationsgewebe vor. Die Partikelgröße des verwendeten Knochenersatzstoffes variiert von 0,07 mm bis zu 1,37 mm, der schwach grau bis hellblau angefärbt ist (**Abbildung 5**).

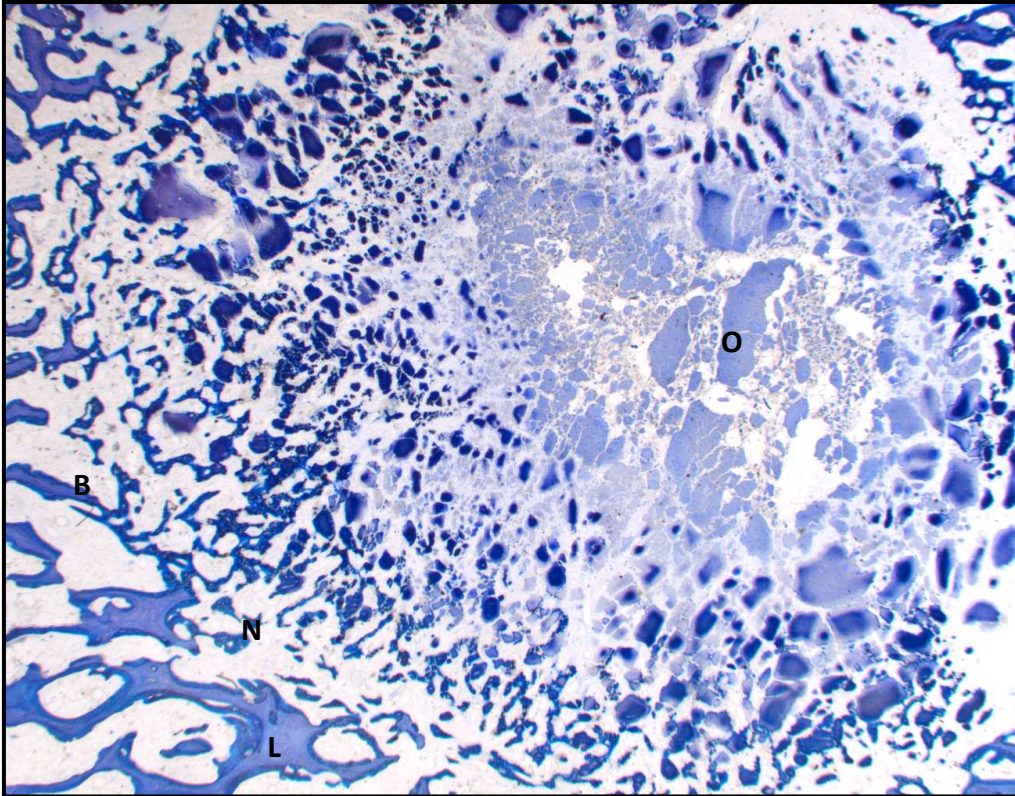
Um das Implantatmaterial, das sich bei dem überwiegenden Anteil der untersuchten Präparate vermehrt in der Peripherie des Defektes befindet und eine zur Bohrkante hin zunehmende Auflockerung der Materialdichte aufweist, sind deutlich neugebildete Geflecht - Knochenbälkchen zu erkennen (**Abbildung 6b**).



Knochenneubildungsprozesse manifestieren sich besonders entlang der Oberflächen des Lagerknochens (**Abbildung 6c**). Sie sind an den zahlreich vorhandenen und deutlich verzweigten (+++) Knochenbälkchen zu erkennen (**Abbildungen 5, 6a, b**). Bei dem Großteil der Versuchstiere der Gruppe I (n=6) ist ein gleichmäßiger und starker (+++) Einwuchs zu erkennen. Der Bereich der Bohrkante ist hier annähernd vollständig von neugebildetem Knochen flankiert, der ca. 1/5 des Flächenanteils des Bohrloch-Defektes bedeckt (**Abbildung 5**). Bei den übrigen Tieren (n=2) sind starke individuelle Schwankungen zu verzeichnen. Der neugebildete Knochen ist in Bezug auf die Menge und den Verzweigungsgrad als gering (+) bis mäßig (++) einzustufen und variiert in Bezug auf die Gleichmäßigkeit des Einwuchses. So zeigen sich entlang der Bohrkante Bereiche mit mäßiger Knochenneubildung bis hin zu Arealen mit geringer oder fehlender Knochenneubildung.

Neben dem neugebildeten Knochen sind im Granulationsgewebe aller Tiere zusätzlich mäßig basophile straßenähnlich verlaufende faserreiche Strukturen zu erkennen, die von perlschnurartig aufgereihten Osteoblasten flankiert werden. Die kubisch geformten Zellen orientieren sich in Verlängerung der Osteoidsäume in Richtung Defektzentrum (**Abbildung 7**).

Zusammenfassend ist in dieser Gruppe eine überwiegend starke (+++) Knochenbälkchenbildung im Bereich der Bohrkante und um die Implantatpartikel zu verzeichnen. Die Granulationsgewebekonstruktion zeigt eine kontinuierliche Abnahme von der Bohrkante zum Defektzentrum hin. Es findet keine vollständige knöchernerne Konsolidierung der Defekte statt (**Abbildung 5**).

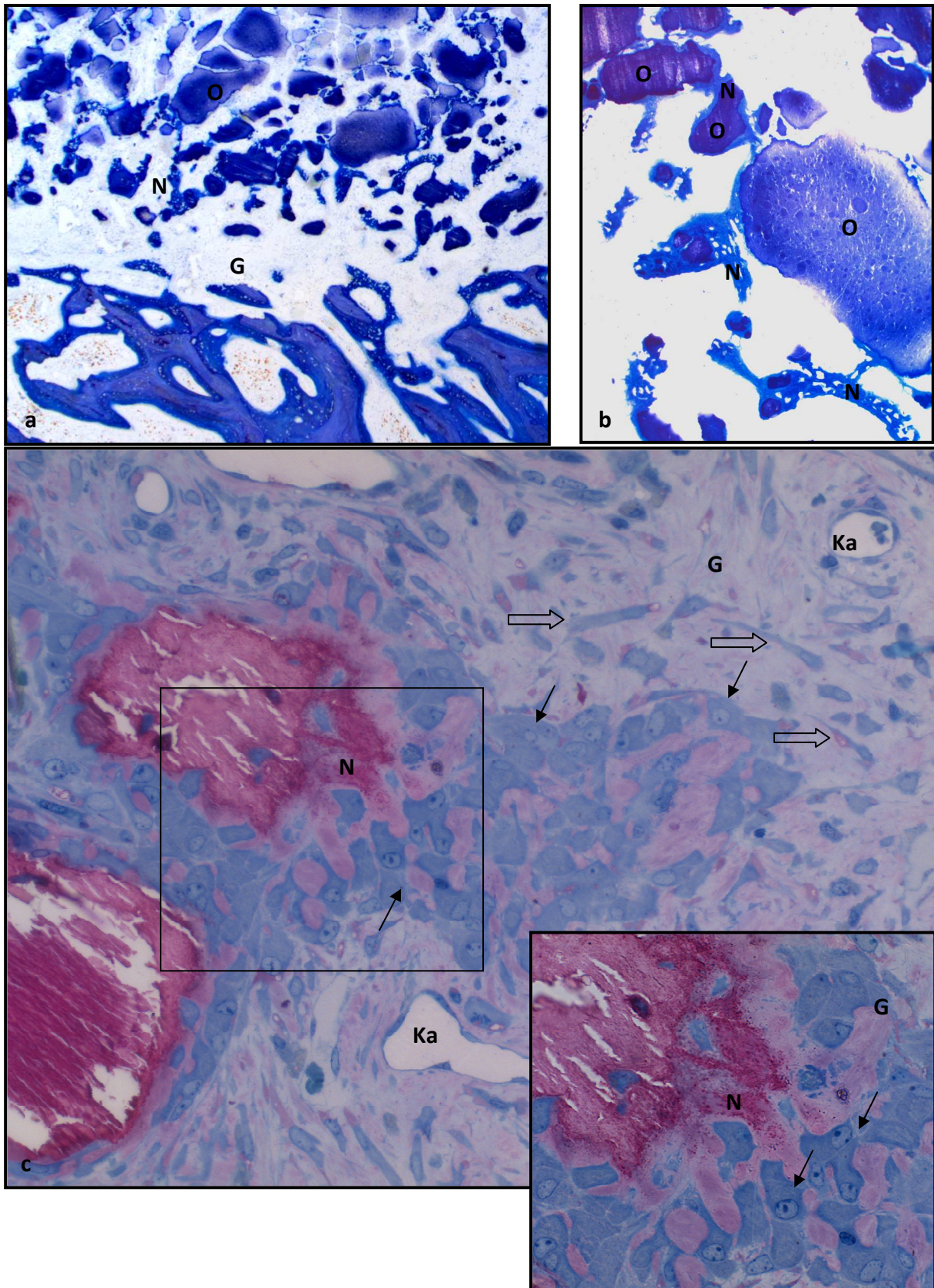


**Abbildung 5: Defekt in der Übersicht, Gruppe I/PRP-, Dünnschliffhistologie, Toluidinblau-Färbung (Vergrößerung x 12,5)**

**Neugebildete Knochenbälkchen (N) in hoher Anzahl und hohem Verzweigungsgrad füllen die Defektperipherie. Sie stehen über den Bereich der Bohrkante (B) mit dem Lagerknochen (L) in Verbindung. Die Implantatpartikel (O) sind als mäßig basophile Konglomerate innerhalb des Defektes zu erkennen.**



# Ergebnisse



**Abbildung 6: Strukturelle Details der Defekte, Gruppe I/PRP-**  
a, b: Dünnschliffhistologie, Toluidinblau-Färbung (a: Vergrößerung x 25;  
b: Vergrößerung x 100)

c: Semidünnschnitt, Safranin O und Toluidinblau-Färbung (Vergrößerung x400; Inset: Vergrößerung x 1000)

a, b: In der Defektperipherie ist neben Granulationsgewebe (G), Implantatpartikeln (O) neugebildeter Knochen (N) zu sehen. b: Dieser (N) umschließt einige der Implantatoberflächen (O) bereits vollständig. c: Mineralisierte Geflechtknochenareale (N) sind intensiv rot angefärbt, während sich das Osteoid nur mäßig rot anfärbt. Kubisch geformte Osteoblasten (Pfeile) liegen dem Osteoid an. Im Granulationsgewebe (G) sind Fibroblasten (transparente Blockpfeile) und Kapillaren (Ka) zu erkennen.

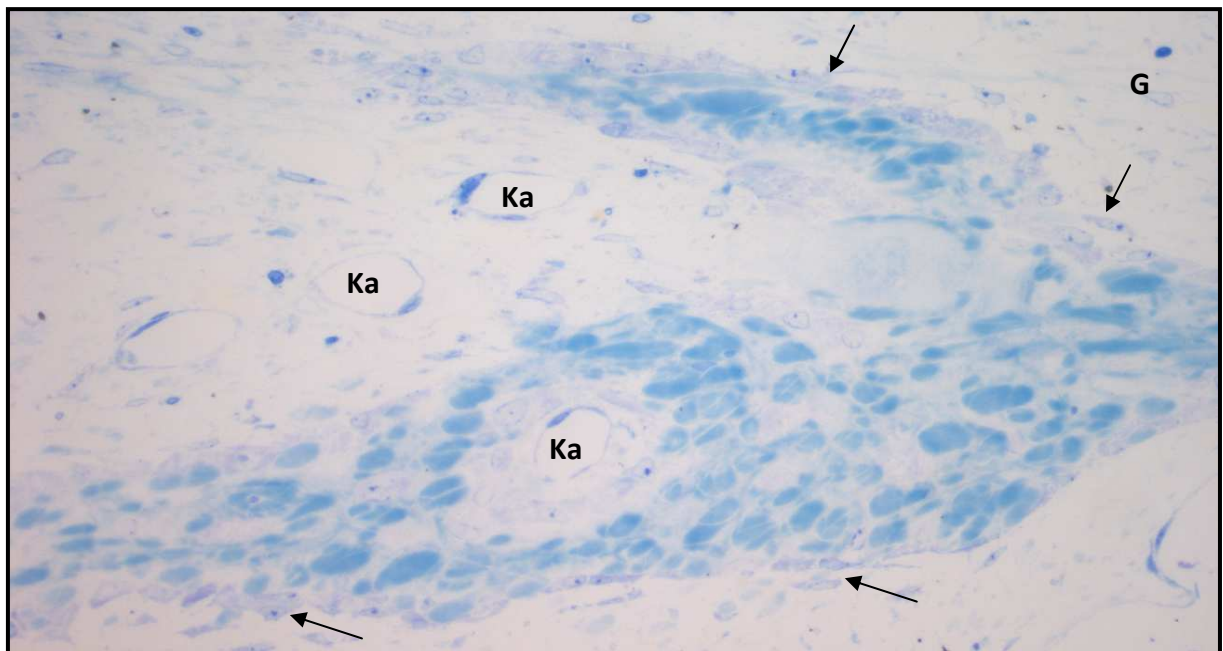


Abbildung 7: Strukturelles Detail eines Defektes, Dünnschliffhistologie, Gruppe I/PRP-, Toluidinblau-Färbung (Vergrößerung x100)

Innerhalb des Granulationsgewebes (G) sind perlschnurartig aufgereihte Osteoblasten (Pfeile) zu sehen, die mäßig basophile Faseranschnitte flankieren. Ka = Kapillare.

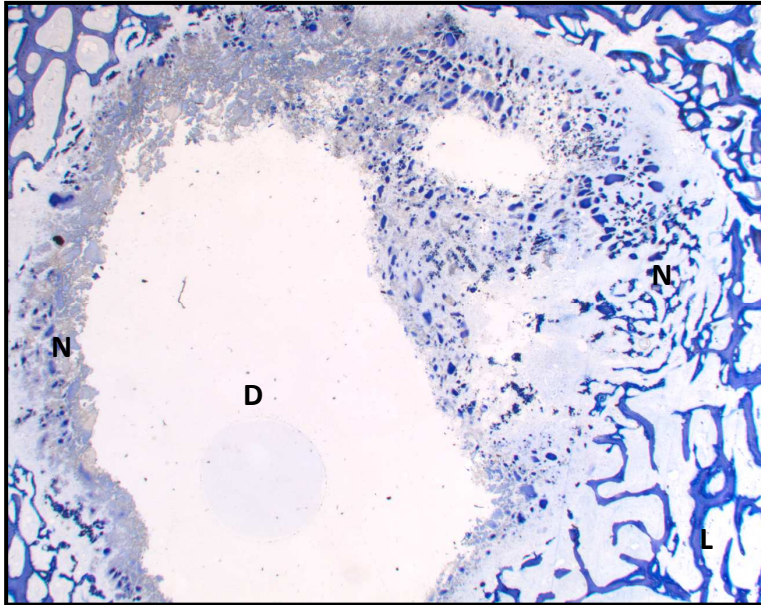
### Gruppe II/PRP+

Bei der Beurteilung des Implantatmaterials fällt auf, dass in der Gruppe II/PRP+ deutlich kleinere Partikel dominieren als in den Defekten der Gruppe I/PRP-. Die Größe der Knochenersatzpartikel variiert hier von 0,01 mm bis zu 0,89 mm.

Wie in der Gruppe I/PRP- findet auch bei den Tieren dieser Gruppe nach 20 Tagen keine vollständige knöcherne Konsolidierung der Defekte statt. Bei dem neugebildeten Knochengewebe handelt es sich wie in der Gruppe I/PRP- ausschließlich um Geflechtknochen.



Die Defektzonen der Tiere weisen große individuelle Schwankungen in Bezug auf Anzahl und Verzweigungsgrad der Knochenbälkchen auf. Bei fünf Tieren ist entlang der Bohrkante ein geringer (+) Knochenzuwachs ausgehend vom Bereich des Lagerknochens zu verzeichnen. Bei einem weiteren Teil der Versuchstiere (n=2) ist ein starker (+++) Zuwachs an Knochen zu erkennen, der bis in etwa 1/5 der Defektfläche hineinragt. Ein Tier zeigt eine mäßige (++) Knochenneubildung, ebenfalls ausgehend vom Lagerknochen.



**Abbildung 8:**  
Dünnschliffhistologie,  
Gruppe II/PRP+, Toluidinblau-  
Färbung (Vergrößerung x12,5)

Vom Lagerknochen (L) geht stellenweise eine spärliche Knochenneubildung (N) aus (linker Bildrand), während benachbarte Areale einen starken Einwuchs aufzeigen (rechter Bildausschnitt). Das Defektzentrum (D) ist frei von Granulationsgewebe und Implantatpartikeln.

Auffällig sind (n=5) an der Bohrkante auftretende unregelmäßige Oberflächen des Lagerknochens, die nicht von neugebildetem Knochen bedeckt sind, und an Resorptionslakunen von Osteoklasten erinnern (**Abbildung 9a**).

Des Weiteren kommt es bei allen Tieren dieser Gruppe zu individuellen Schwankungen bezogen auf die Gleichmäßigkeit des Knocheneinwuchses. Es fallen immer wieder Bereiche an der Bohrkante auf, die frei oder annähernd frei von neugebildetem Geflechtknochen sind, während benachbarte Areale innerhalb des gleichen Präparates einen starken (+++) Knochenzuwachs aufzeigen (**Abbildungen 8, 9b**).

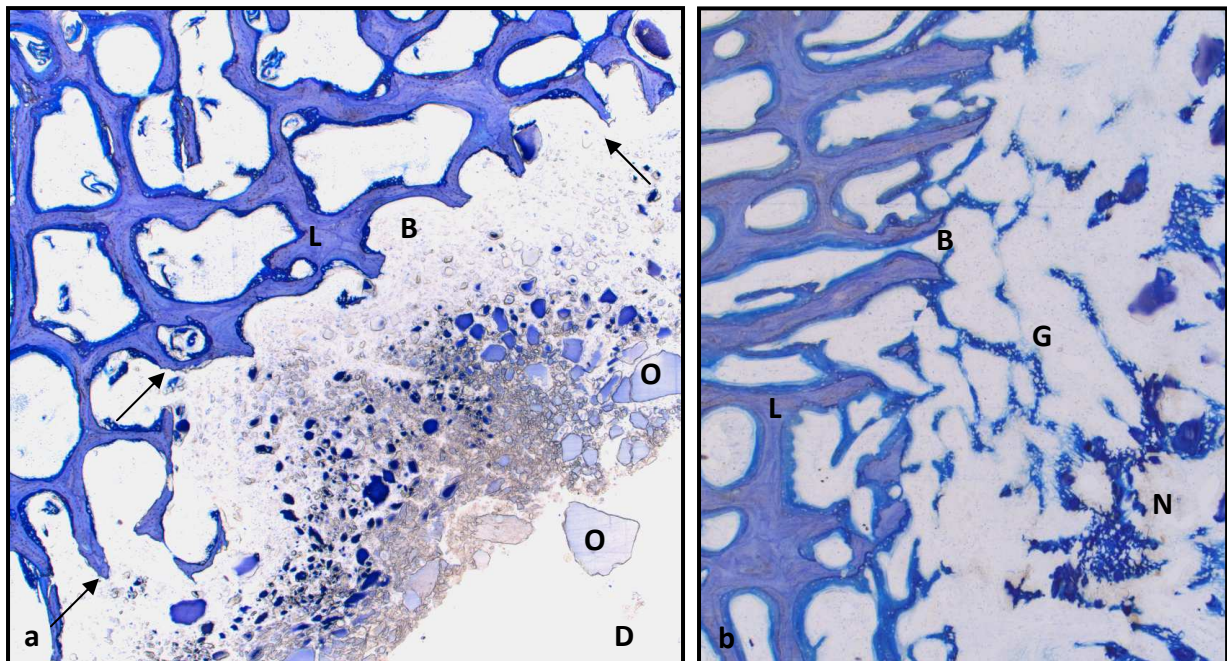
In den Defekten der Gruppe II/PRP+ sind die straßenähnlichen Anordnungen von Osteoblasten innerhalb des Granulationsgewebes seltener vorhanden und in ihrer Flächenausdehnung geringer ausgeprägt als in der Gruppe I/PRP-.

Des Weiteren werden Unterschiede in der Verteilung und Menge des neugebildeten Knochens deutlich. Die Oberflächen der Knochenersatzstoff-Partikel sind in dieser Gruppe nur ca. zu 1/3 von neugebildetem Knochen bedeckt. Die von neugebildetem Knochen nicht

bedeckten Implantatoberflächen sind von multinukleären Riesenzellen besetzt. Entlang der Implantatoberflächen sind sie als Zellen mit bis zu 20 Zellkernen in der Schnittebene zu identifizieren, die teilweise intrazytoplasmatische Einschlüsse in der gleichen Farbe und Struktur wie das Implantatmaterial aufweisen.

Zusammenfassend ist somit festzustellen, dass neben dem verminderten Vorkommen von neugebildetem Knochen in Bereichen um die Implantatpartikel im Vergleich zu Gruppe I/PRP- ein in Anzahl und Verzweigungsgrad geringerer Anteil an ungleichmäßig eingewachsenem Geflechtknochen entlang der Bohrkante vorhanden ist.

Identisch sind hier die von Knochenneubildung, Granulationsgewebe und Knochenersatz ausgesparten Zentren der Defekte.



**Abbildung 9 a, b: Dünnschliffhistologie, Gruppe II/PRP+, Toluidinblau-Färbung  
(a: Vergrößerung x 25; b: Vergrößerung x 12,5)**

**a: Der Lagerknochen (L) zeigt entlang der Bohrkante (B) eine unregelmäßig gestaltete Oberfläche (Pfeile), die frei von Knochenneubildung ist. D = Defektzentrum; O = Implantatpartikel**

**b: Ausschnitt der Bohrkante (B), der durch starke Knochenneubildungsprozesse (N) gekennzeichnet ist. Zwischen den Geflechtknochenbälkchen befindet sich Granulationsgewebe (G). L = Lagerknochen.**

### **Gruppe III/Leerdekte**

Bei allen Leerdekten (n=4) geht eine mäßige (++) bis starke (+++) Knochenneubildung von der Bohrkante aus. Die Knochenbälkchen beschränken sich auf die Peripherie des Defektes und nehmen in Bezug auf die Querschnittsgesamtfläche des Defektes ca. 1/5 der Fläche ein (**Abbildungen 10 a, b**). Die Defekte sind bis in das Defektzentrum mit zellreichem Granulationsgewebe aufgefüllt (**Abbildung 10a**).

Neben zahlreichen Gefäßanschnitten ist in dem zellreichen Granulationsgewebe eine große Zahl an Fibroblasten zu erkennen. Die Fasern des Granulationsgewebes sind in allen drei Ebenen des Raumes angeordnet (**Abbildung 10b**). Multinukleäre Zellen treten nicht in Erscheinung.



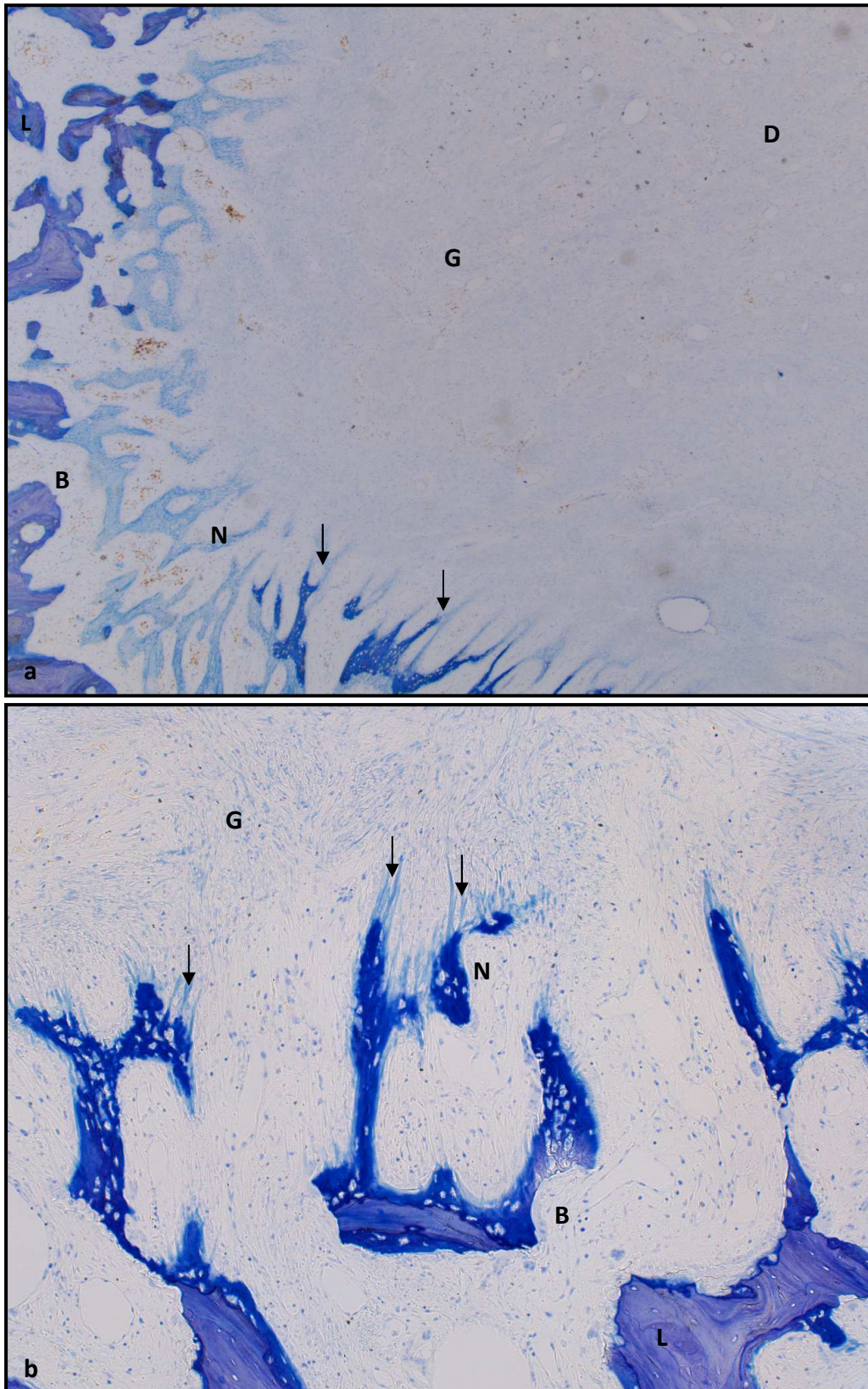


Abbildung 10 a, b: Dünnschliffhistologie, Gruppe III/Leerdekt, Toluidinblau-Färbung Knochenneubildung und Granulationsgewebe eines Leerdektes, (a: Vergrößerung x10; b: x25)



**a, b: Von der Bohrkante (B) ausgehende Knochenneubildung (N).**

**Der Grad der Mineralisierung des Geflechtknochens spiegelt sich in den Nuancen der Blaufärbung der Knochenmatrix wider. So färbt sich der mineralisierte Geflechtknochen nahe der Bohrkante intensiv an, während in Richtung Granulationsgewebe auswachsende Bälkchen aufgrund noch nicht erfolgter Mineralisierung nur schwach blau angefärbt sind. Dichte Kollagenfaserbündel (Pfeile) orientieren sich in Verlängerung der Geflechtknochenareale in Richtung auf das Defektzentrum (D). Die Lamellenstruktur des Lagerknochens (L) ist deutlich erkennbar. Die gesamte Querschnittsfläche des Defektes wird von Granulationsgewebe (G) ausgefüllt.**

## Ergebnisse

**Tabelle 8: Übersicht der Gruppen I/PRP-, II/PRP+, III/Leerdefekte bezüglich Menge, Vorkommen und Art des neugebildeten Knochens, Größe und Verteilungsmuster der Implantatpartikel und dem Vorkommen von Zellen**

	<b>Gruppe I/PRP-</b>	<b>Gruppe II/PRP+</b>	<b>Gruppe III/Leerdefekte</b>
<b>Menge des neugebildeten Knochens</b>	(+++) n = 6  (+) bis (++) n = 2	(+++) n = 2  (++) n = 1  (+) n = 5	(++) bis (+++) n = 4
<b>Vorkommen des neugebildeten Knochens</b>	entlang der Bohrkante (n=8)  entlang der Oberfläche der Implantatpartikel (n=8)	entlang der Bohrkante  partiell entlang der Oberfläche der Implantatpartikel	entlang der Bohrkante
<b>Art des neugebildeten Knochens</b>	Geflechtknochen	Geflechtknochen	Geflechtknochen
<b>Durchschnittliche Größe der Ostimpartikel</b>	0,07 mm bis 1,37 mm	0,01 mm bis 0,89 mm	-----
<b>Verteilungsmuster der Ostimpartikel</b>	Im Granulationsgewebe v.a. in der Peripherie des Defektes	Im Granulationsgewebe v.a. in der Peripherie des Defektes	-----
<b>Vorkommen von Zellen</b>	Fibroblasten  spindelförmige Fibrozyten  Osteoblasten  polymorphe mononukleäre Zellen  multinukleäre Riesenzellen	Fibroblasten  spindelförmige Fibrozyten  Osteoblasten  polymorphe mononukleäre Zellen  zahlreiche multinukleäre Riesenzellen	Fibroblasten  vereinzelt Lymphozyten  Osteoblasten

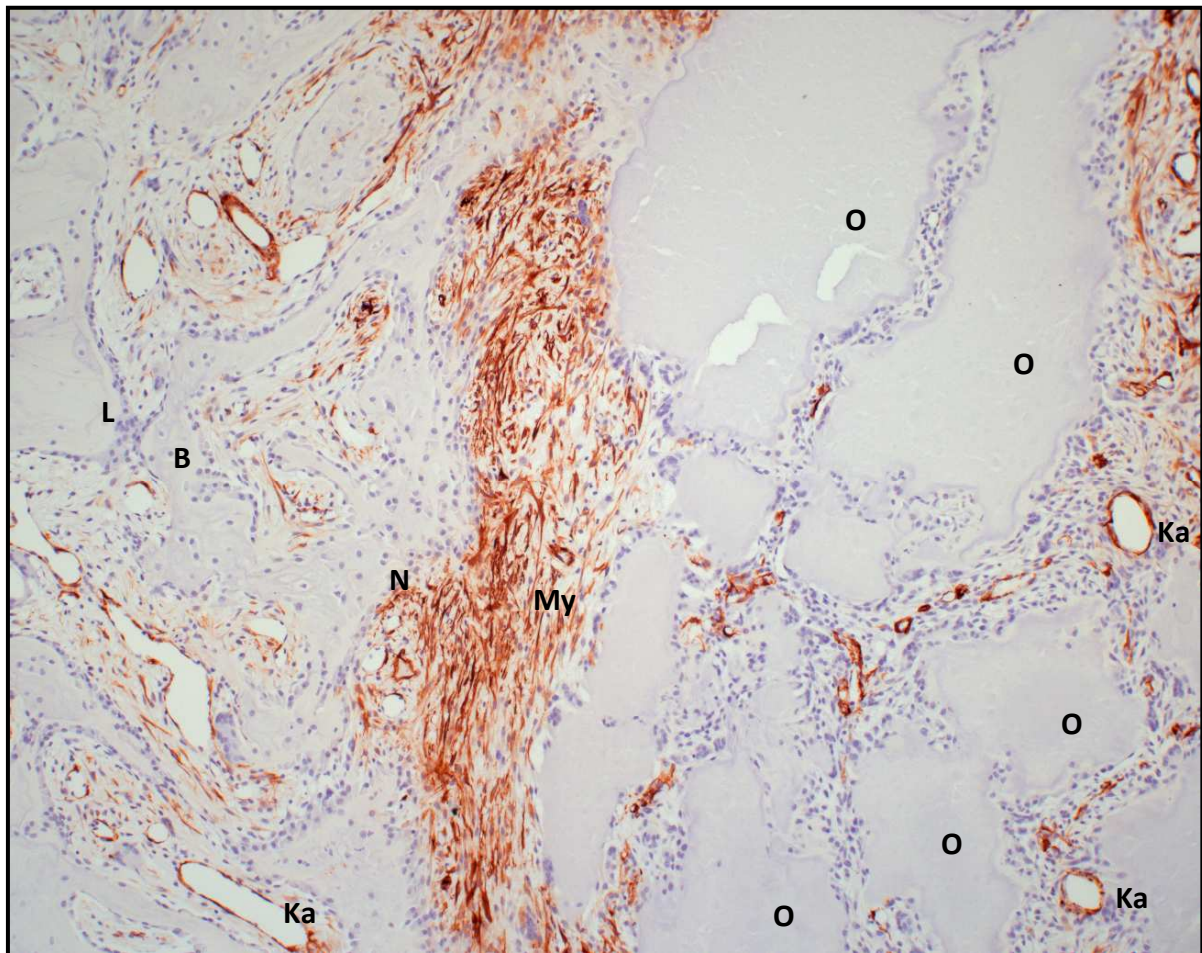
Knochenbälkchen: (++) große Anzahl mit starkem Verzweigungsgrad  
 (++) mäßige Anzahl mit mäßigem Verzweigungsgrad  
 (+) niedrige Anzahl und einen geringen Verzweigungsgrad

#### 4.4 Immunhistochemie ASMA-Nachweis

##### Gruppe I/PRP-

Die mittels Anti-ASMA-AK markierten Zellen sind häufig spindelförmig geformt und besitzen lang auslaufende Fortsätze. Sie zeigen ein vermehrtes Vorkommen innerhalb des Granulationsgewebes nahe der Bohrkante des Defektes (**Abbildung 11**). In Richtung auf das Defektzentrum treten die AK-markierten Zellen mit fibroblastenähnlichem Aussehen nur vereinzelt auf. Sie zeigen eine gleichmäßige Braunfärbung ihres Zytoplasmas, während die Zellkerne keine Reaktivität aufweisen. Zusätzlich treten im Wandbereich von Kapillaren ASMA-positive Perizyten in Erscheinung (**Abbildungen 11, 12 a, b**).

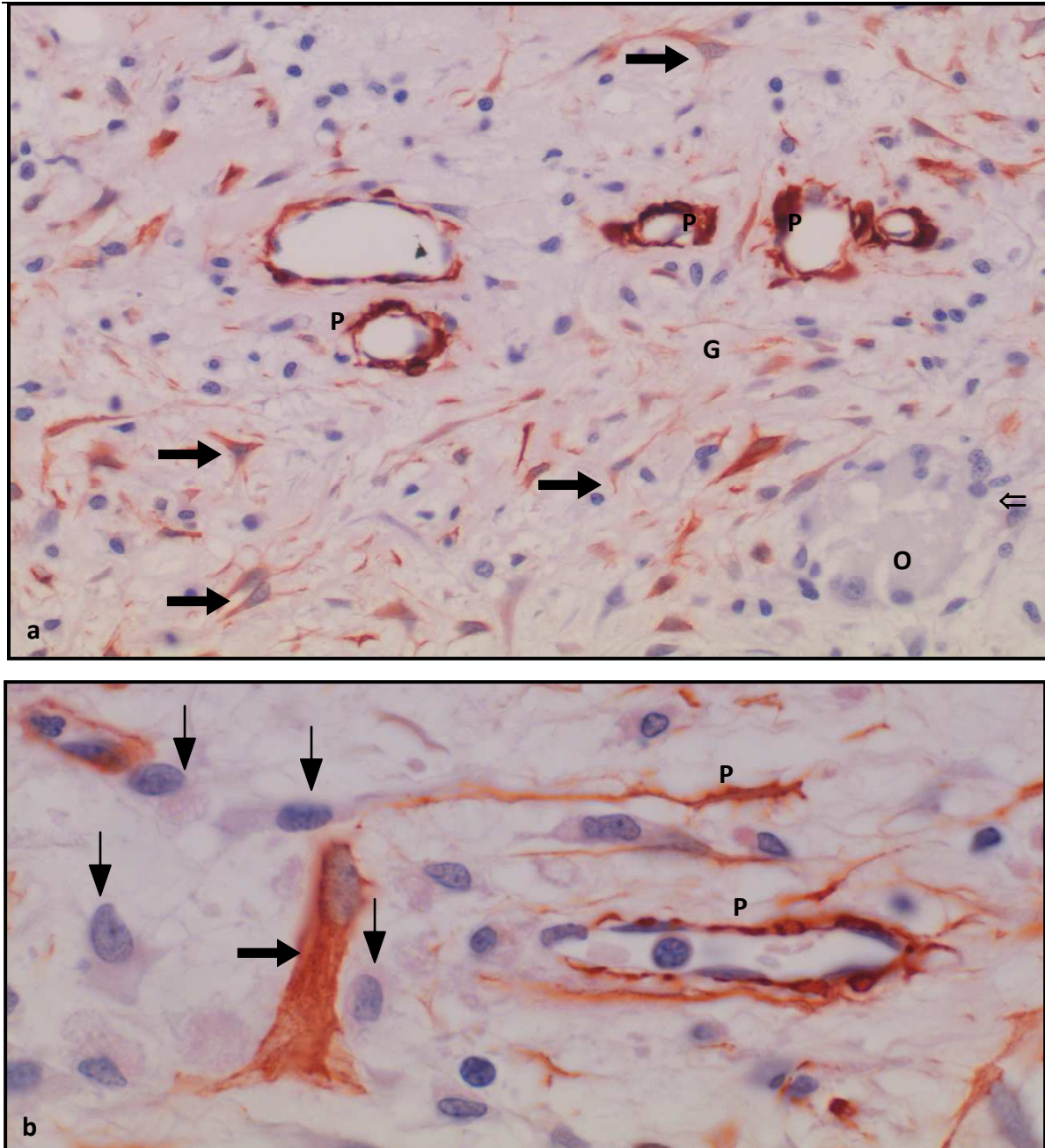
Aufgrund der Fibroblasten-Morphologie und ASMA-Reaktivität sind die entsprechend markierten Zellen des Granulationsgewebes als Myofibroblasten anzusprechen.



**Abbildung 11: Ausschnitt eines Defektes nahe der Bohrkante, Paraffinschnitt, Gruppe I/PRP-, Immunhistochemie mittels Anti-ASMA-Antikörpern, Kernfärbung mittels Hämatoxylin (Vergrößerung x100)**

**Ansammlung von ASMA-positiven Myofibroblasten (My) entlang der Bohrkante (B).  
L = Lagerknochen; O = Implantatpartikel; Ka = Kapillare; N = neugebildeter Knochen**

## Ergebnisse



**Abbildung 12 : Ausschnitt des Granulationsgewebes nahe der Bohrkante, Paraffinschnitt, Gruppe I/PRP-, Immunhistochemie mittels Anti-ASMA-Antikörpern, Kernfärbung mittels Hämatoxylin**

**a: Die detektierten Myofibroblasten (dicke Pfeile) liegen innerhalb des zellreichen Granulationsgewebes (G). Die Zellausläufer sind je nach Schnittebene über unterschiedlich weite Wegstrecken zu verfolgen. ASMA-positive Perizyten (P) begrenzen die Wandung der in dieser Abbildung querschnittenen Gefäße. O = Implantatpartikel; ⇒ = multinukleäre Riesenzelle (Vergrößerung x400)**

**b: Das Zytoplasma des Myofibroblasten (dicker Pfeil) zeigt eine deutliche ASMA-Reaktivität, ebenso wie zahlreiche Myofibroblastenfortsatzanschnitte innerhalb des Granulationsgewebes. Benachbarte Fibroblasten (dünne Pfeile) des Granulationsgewebes zeigen dagegen keine Reaktivität gegenüber den**



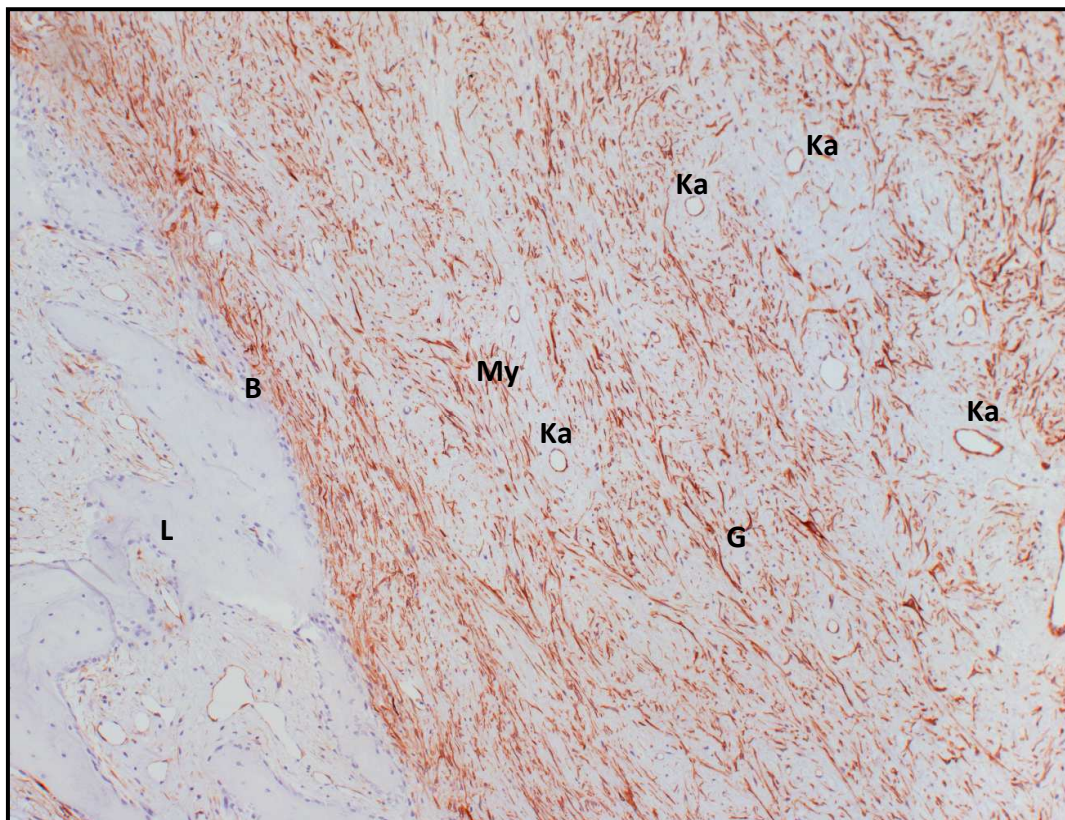
**Anti-ASMA-Antikörpern. Zirkulär um Gefäßanschnitte sind ASMA-positive Perizyten (P) angeordnet (Vergrößerung x1000)**

### **Gruppe II/PRP+**

In der Gruppe II/PRP+ sind, gegenüber den beschriebenen Verhältnissen im Granulationsgewebe der Defekte von Gruppe I/PRP-, keine Unterschiede im räumlichen Verteilungsmuster, der intrazytoplasmatischen Reaktivität sowie der Anzahl und der Morphologie der ASMA-positiven Zellen festzustellen.

### **Gruppe III/Leerdefekte**

Im Granulationsgewebe der Leerdefekte sind ASMA-positive Zellen gleichmäßig verteilt und entsprechen in ihrer Morphologie und Reaktivität den in den Gruppen I/PRP- und der Gruppe II/PRP+ vorkommenden ASMA-positiven Myofibroblasten. ASMA-reaktive Perizyten treten entlang der Blutgefäßwänden ebenso in Erscheinung (**Abbildung 13**).



**Abbildung 13: Defekt in der Übersicht, Paraffinschnitt, Gruppe III/Leerdefekte, Immunhistochemie mittels anti-ASMA-Antikörpern. Innerhalb des Granulationsgewebes (G) sind zahlreiche ASMA-synthesisierende Myofibroblasten (My) markiert. (Vergrößerung x100)**

**B = Bohrkante; L = Lagerknochen; Ka = Kapillaren**

### Negativkontrollen

In den Negativkontrollen sind keine Immunoreaktivitäten nachweisbar.

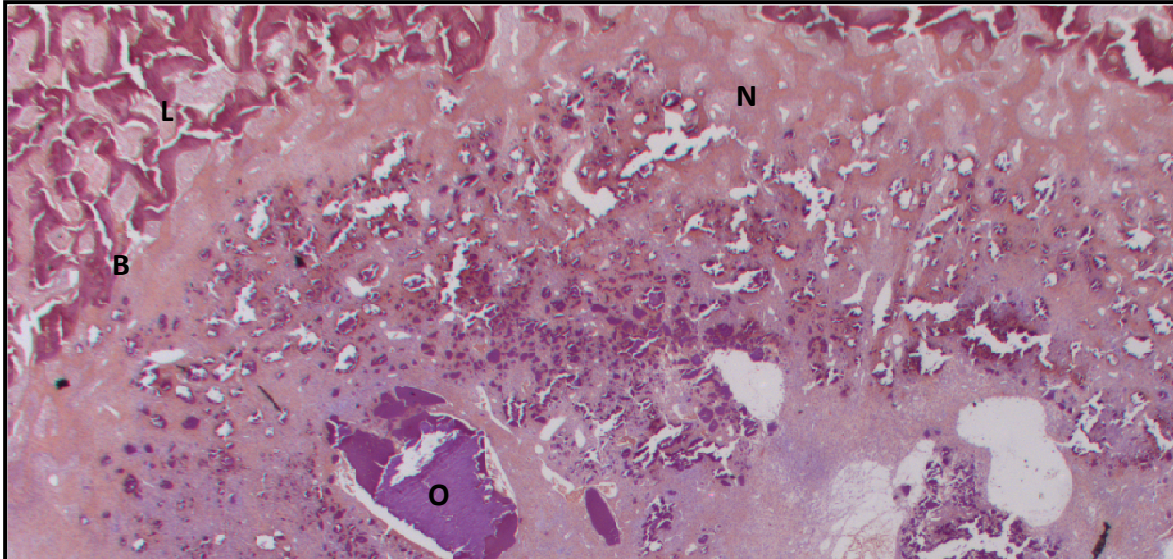
### 4.5 Immunhistochemie Kollagen I-Nachweis

#### Gruppe I/PRP-

Durch die Markierung mittels des Kollagen I-Antikörpers sind die Kollagen I enthaltenden Areale der Knochenmatrix als braungefärbte Bereiche in den Präparaten visualisiert.

Die als Geflechtknochen detektierten Areale korrespondieren räumlich mit dem neugebildeten Knochen, der in Lagernähe lokalisierte Implantatpartikel umgibt und entlang der Bohrkante ausgeprägt ist (**Abbildung 14**).

In den Bereichen zwischen neugebildetem Knochen, Ostimplantaten und Lagerknochen sind innerhalb des Granulationsgewebes Kollagen I-positive Fasern detektiert. Diese jedoch nur mäßig braungefärbten Fasern sind in allen drei Ebenen des Raumes angeschnitten, was auf die Ausbildung eines Kollagen-I Fasernetzes innerhalb des Granulationsgewebes verweist. (**Abbildung 15**).

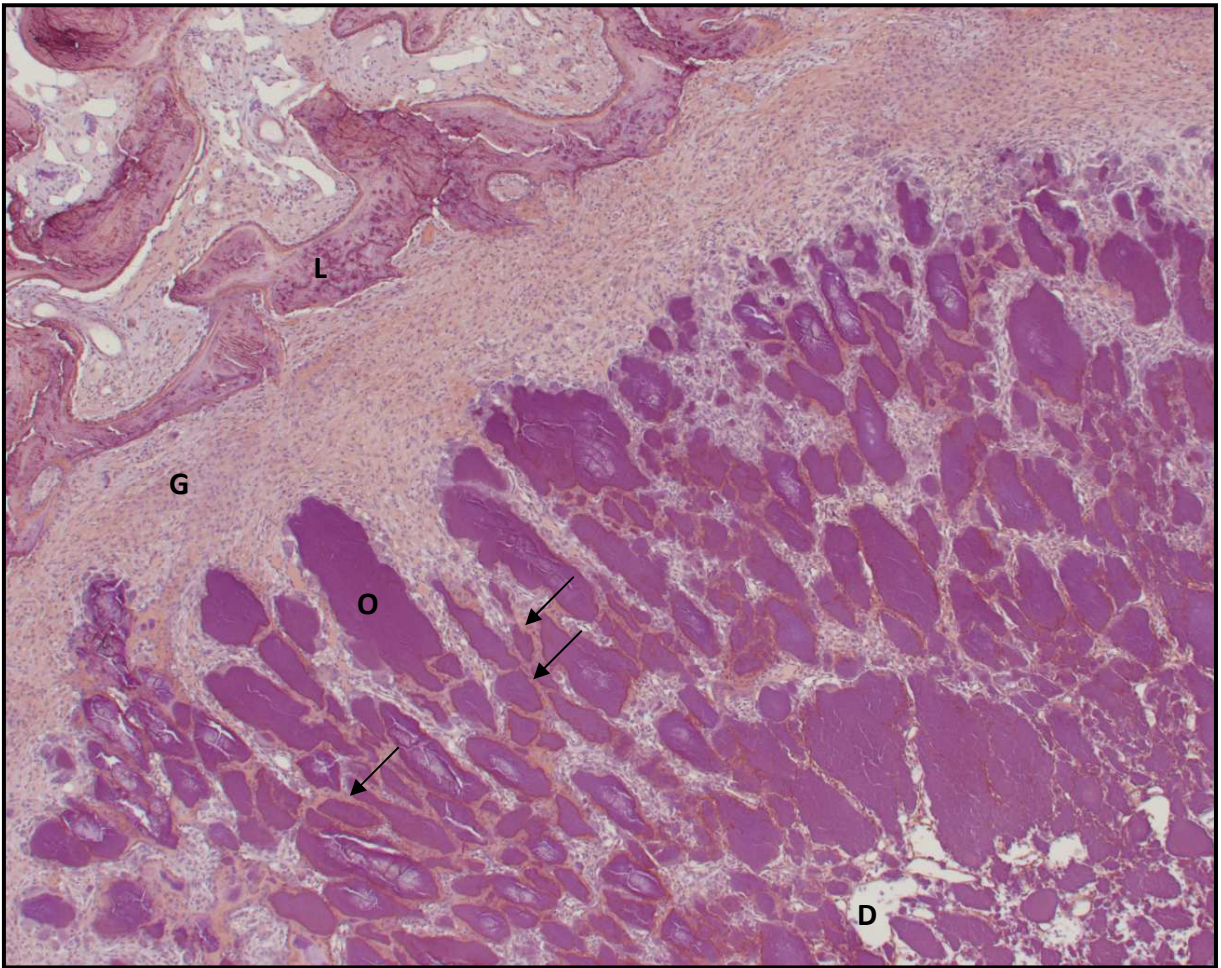


**Abbildung 14: Ausschnitt eines Defektes nahe der Bohrkante, Paraffinschnitt, Gruppe I/PRP-, Immunhistochemie mittels Anti-Kollagen I-Antikörpern, Gegenfärbung mit Hämatoxylin (Vergrößerung x50).**

Während der Lagerknochen (L) intensiv gefärbt ist, sind die Kollagenfasern des Geflechtknochens (N) und des Granulationsgewebes nur mäßig angefärbt. Die Implantatpartikel (O) sind aufgrund der Gegenfärbung mit Hämatoxylin blau angefärbt.

**B = Bohrkante**





**Abbildung 15: Ausschnitt eines Defektes nahe der Bohrkante, Paraffinschnitt, Gruppe I/PRP-, Immunhistochemie mittels Anti-Kollagen I-Antikörpern, Gegenfärbung mit Hämatoxylin (Vergrößerung x50)**

Zwischen Lagerknochen (L) und Ostimpartikeln (O) ist ein breiter Granulationsgewebesaum (G) lokalisiert. Mäßig braungefärbte Kollagenfasern sind hier in allen drei Richtungen des Raumes angeschnitten. Die Knochenersatzpartikel (O) sind in der Peripherie des Defektes von schmalen Kollagen I positiven Säumen umgeben (Pfeile). Während zentral positionierte Partikel keine Osteoid - Umhüllung aufweisen. In diesen zentralen Bereichen des Defektes (D) ist ebenfalls kein Granulationsgewebe vorhanden.

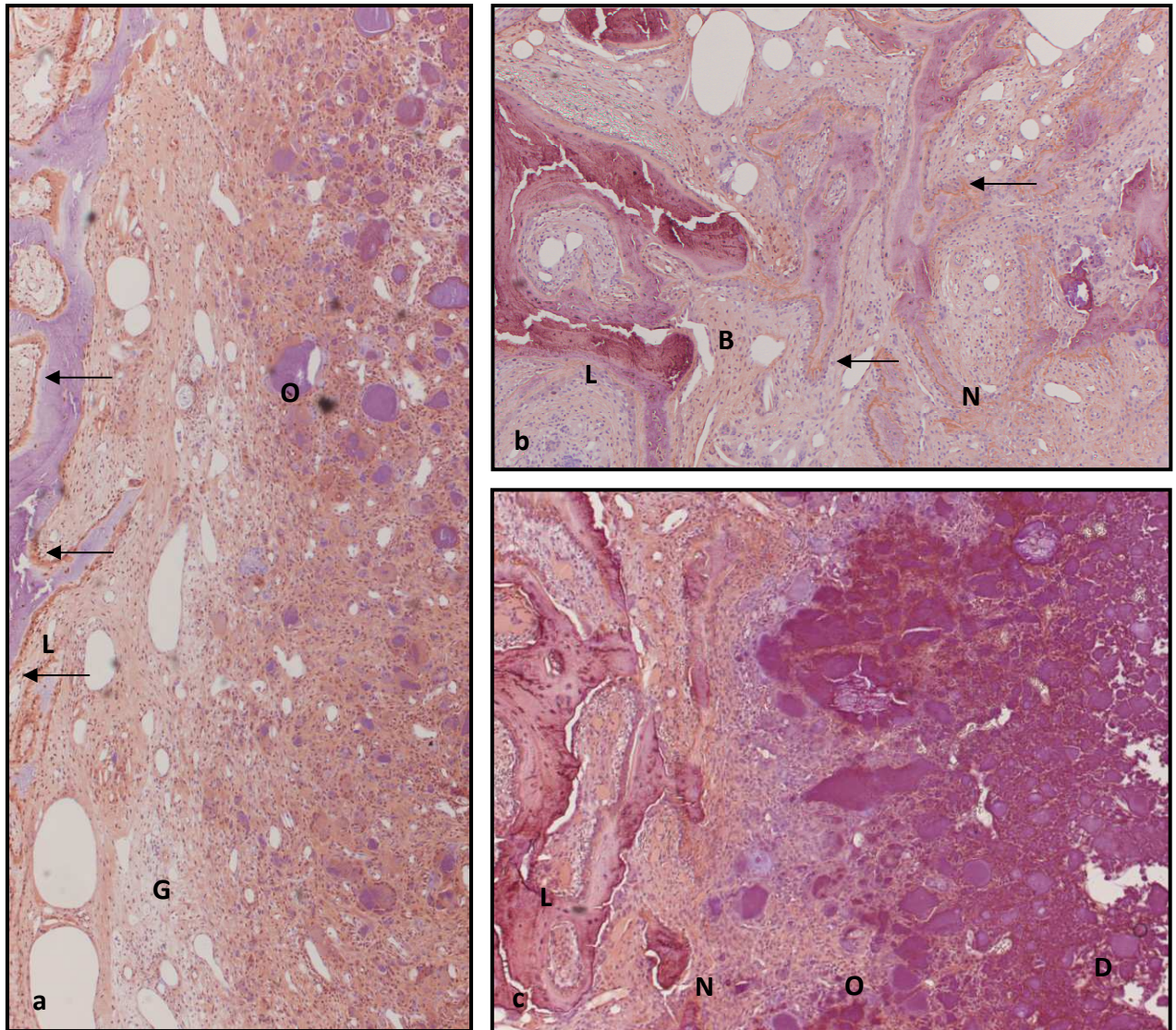
### **Gruppe II/PRP+**

Der überwiegende Anteil der Tiere (n=6) zeigt einen Kollagen I-positiven Saum in Form von Granulationsgewebe zirkulär entlang des Lagerknochens (**Abbildung 16a**). Die detektierten Fasern sind in ihrer Verlaufsrichtung parallel zu der Bohrkante angeordnet. Nur bei wenigen Individuen (n=2) zeigt sich Kollagen I-positiver Geflechtknochen zirkulär entlang der Bohrkante (**Abbildung 16b**).

Markierte Osteoid - Areale entlang der Ostimpartikel fehlen oder sind nur schwach ausgeprägt. In Übereinstimmung mit den Befunden der Histologie ist auch auf Ebene der Immunhistochemie die knöcherne Integration der Implantatpartikel in der Gruppe II/PRP+ deutlich schwächer ausgeprägt als in der Gruppe I/PRP-.

Zusammenfassend sind folgende Befunde hervorzuheben: Bei dem überwiegenden Anteil der Tiere befindet sich „parallelfaseriges“ Granulationsgewebe entlang der Bohrkante. Eine in Anzahl und Verzweigung deutlich geringere Geflechtknochenbildung (n=6) entlang der Bohrkante als auch um die Oberflächen der Implantatpartikel sind festzustellen (**Abbildung 16a, b, c**).





**Abbildung 16: Ausschnitt des Defektes nahe der Bohrkante, Paraffinschnitt, Gruppe II/PRP+, Immunhistochemie mittels Anti-Kollagen I-Antikörpern, Gegenfärbung mit Hämatoxylin**

**a: Repräsentativ für den überwiegenden Anteil der Tiere ist ein breiter Granulationsgewebesaum (G) zwischen Knochenlager (L) und Knochenersatzpartikeln (O), in dem detektierte Kollagen I-Fasern dominieren. Die Osteoidsäume des Lagerknochens sind deutlich zu erkennen (Pfeile). (Vergrößerung x50)**

**b: Neugebildeter Geflechtknochen (N) entlang der Bohrkante (B) ausgehend vom Knochenlager (L). Das Osteoid des Geflechtknochens ist mäßig braun gefärbt (Pfeile) (Vergrößerung x50).**

**c: Bezirke spärlicher Knochenneubildung (N) entlang des Lagerknochens (L). In Richtung Defektzentrum (D) fallen zahlreiche in unterschiedlicher Größe vorkommende Knochenersatzpartikel (O) auf (Vergrößerung x50).**

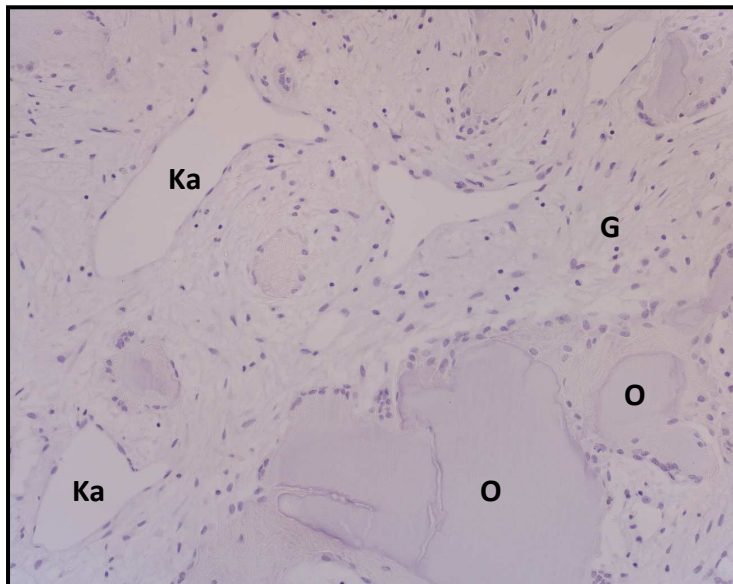
### Gruppe III/Leerdefekte

Die Leerdefekte (n=4) sind bis hin zum Defektzentrum mit Granulationsgewebe ausgefüllt, in dem detektierte Kollagenfasern in unterschiedlichen Verlaufsrichtungen zu erkennen sind. Entlang der Bohrkante färben sich die Osteoidsäume des Lagerknochens und des neugebildeten Knochens deutlich an.

Von den Bohrkanten der Leerdefekte (n=4) geht eine mäßige (++) bis starke (+++) Knochenneubildung aus.

### Negativkontrollen

In den Negativkontrollen sind keine Immunoreaktivitäten nachweisbar (**Abbildung 17**).



**Abbildung 17: Negativkontrolle Gruppe I/PRP-, Gegenfärbung mit Hämatoxylin (Vergrößerung x200).**

**Im Granulationsgewebe sind keine Kollagen I-positiven Strukturen markiert. Die leichte Blaufärbung resultiert aus der Kernfärbung mittels Hämatoxylin.**

**G = Granulationsgewebe**

**O = Implantatpartikel**

**Ka = Kapillare**

### 4.6 Transmissionselektronenmikroskopie

Im Rahmen der ultrastrukturellen Untersuchung zeigen die Gruppen I/PRP- und II/PRP+ auf qualitativer Ebene keine Unterschiede im Hinblick auf die Art und Morphologie der in den Defektregionen dominierenden Zellen. Daher werden die ultrastrukturellen Merkmale der peripheren und zentralen Defektbereiche im Folgenden für beide Gruppen gemeinsam dokumentiert. Darüber hinaus stimmen die ultrastrukturellen Merkmale der Myofibroblasten bei allen drei Gruppen überein.

Ultrastrukturelle Details peripherer Defektregionen entsprechen Bereichen entlang der Bohrkante, in denen bereits lichtmikroskopisch Knochenneubildungsprozesse zu erkennen sind.

Neugebildete Geflechtknochenareale sind als elektronenhelle Bezirke zu identifizieren. Innerhalb des Geflechtknochens sind in ihrer Struktur aufgelockerte Implantatpartikel unterschiedlicher Größe zu sehen, die sich als mäßig elektronendichte Areale von dem elektronenhellen Geflechtknochen deutlich abgrenzen. Die Implantatoberflächen stehen lückenlos in engem räumlichen Kontakt zu dem neugebildeten Geflechtknochen, was auf die vollständige Osseointegration der Partikel verweist. Des Weiteren fallen in den elektronenhellen Geflechtknochen eingebettete Zellen auf, deren rundovaler, morphologisch intakter Zellkern entlang seiner Kernmembran durch das elektronendichte Heterochromatin gesäumt wird. Es handelt sich um ausdifferenzierte Osteozyten, von denen stellenweise nur die Zytoplasmaanschnitte in der Schnittebene liegen (**Abbildung 18**).

Die zum Granulationsgewebe hin gerichteten, mäßig elektronendichten, noch nicht mineralisierten Oberflächen des Geflechtknochens werden von kubisch geformten Osteoblasten gesäumt (**Abbildungen 18, 19a**). Die den neugebildeten Knochen flankierenden Osteoblasten besitzen große elektronenhelle Zellkerne von rundlich-ovaler Gestalt. Das kontrastreiche Heterochromatin konzentriert sich vor allem entlang der inneren Kernmembran. In Abhängigkeit der Schnittebene lassen sich stellenweise Kernkörperchen identifizieren.

Im organellenreichen Zytoplasma dominiert das raue endoplasmatische Retikulum (rER). Es verläuft meanderförmig, und seine Zisternen sind mit einer homogenen, mäßig elektronendichten Substanz aufgefüllt (**Abbildung 19b**).

Die in Nähe des Defektzentrums gelegenen Bereiche bestehen aus Granulationsgewebe. Neugebildete Geflechtknochenareale sind nicht ausgebildet.

Der Interzellularraum des Granulationsgewebes besteht aus Fasern unterschiedlicher

Verlaufsrichtungen, in deren unmittelbarer Nähe stellenweise elektronendichte punktförmige Strukturen lokalisiert sind (**Abbildungen 20a, 22**). Diese sind als Mineralisationspunkte zu bezeichnen. Sie befinden sich gehäuft am Übergang des Granulationsgewebes in den Geflechtknochen. Die mehrere Mikrometer langen, zum Teil zu Bündeln zusammengefassten Fasern zeigen im Längsschnitt bei sehr hoher Vergrößerung eine deutliche Querstreifung (**Abbildung 22**), was sie als Kollagenfasern charakterisiert. Der Raum zwischen den Fasern wird von einer granulierten, mäßig elektronendichten Substanz (ECM) gefüllt, deren Kontinuität immer wieder von elektronenhellen optisch leeren Arealen unterbrochen wird (**Abbildung 22**).

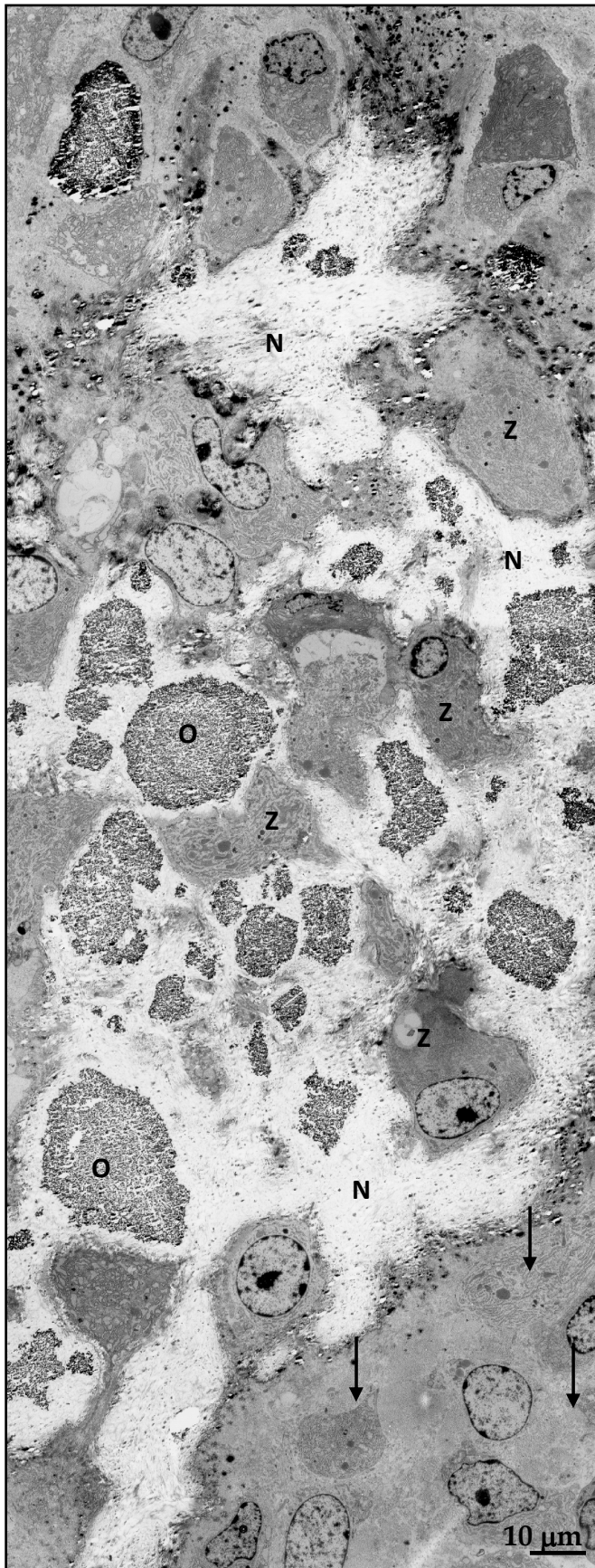
Bei den in den Interzellularraum eingebetteten Zellen dominieren zwei Zelltypen: einerseits treten Myofibroblasten in Erscheinung, andererseits Makrophagen unregelmäßiger Gestalt und Elektronendichte des Zytoplasmas (**Abbildungen 20a, b**).

Die langgestreckten, fibroblastenähnlichen Zellen enthalten typischerweise große helle Zellkerne unregelmäßiger Gestalt mit einem elektronendichten Saum entlang der inneren Kernmembran, vergleichbar mit der Chromatinverteilung in den Zellkernen von Osteoblasten. In Erscheinung treten außerdem in Form, Größe und Elektronendichte variierende intrazytoplasmatische Einschlüsse (**Abbildungen 21a, b**).

Neben dem Golgiapparat, bestehend aus hintereinander gelagerten zusammengefalteten Doppelmembransäckchen, dominieren im Zytoplasma der Myofibroblasten meanderförmig verlaufende Schläuche des rauen endoplasmatischen Retikulums (rER), die abschnittsweise ein erweitertes Lumen aufweisen, das mit einer homogen mäßig elektronendichten Substanz gefüllt ist (**Abbildung 22**). Ein auffälliges Merkmal der fibroblastenähnlichen Zellen stellen die parallel zur Längsachse der Zellen angeordneten Aktin-Filamente dar, die einerseits direkt unterhalb der Zellmembran verlaufen und sich andererseits bis in die Spitzen der dünnen Zytoplasmaausläufer verfolgen lassen (**Abbildungen 21a, b, 22**). Die Zytoplasmaausläufer werden mit zunehmender Entfernung vom Zelleib immer schlanker und stehen teilweise in engem Kontakt zu umgebenden Erythrozyten oder umgreifen benachbarte Makrophagen tentakelartig (**Abbildung 23**). Diese Momentaufnahme erinnert an einen Phagozytosevorgang.

Bei der Betrachtung der Myofibroblasten fallen subplasmalemmal lokalisierte Filamentplaques auf. An diesen Stellen kommt es neben Kontinuitätsunterbrechungen der Zellmembran zu Anhäufungen von Filamenten, die in transmembranöser Ausrichtung bis in die ECM des Interzellularraumes zu verfolgen sind. Bei diesen von intra- nach extrazellulär ausgerichteten Filamentstrukturen handelt es sich um sogenannte *Fibronexus* (**Abbildung 22**).



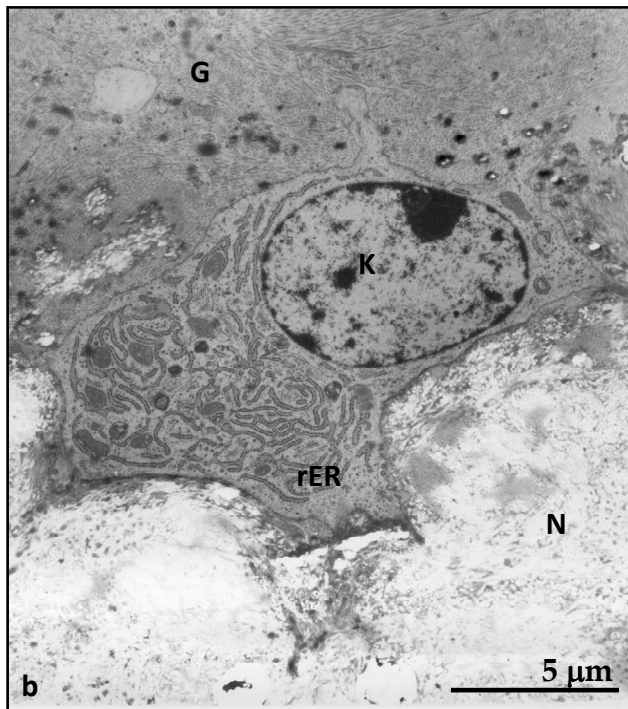
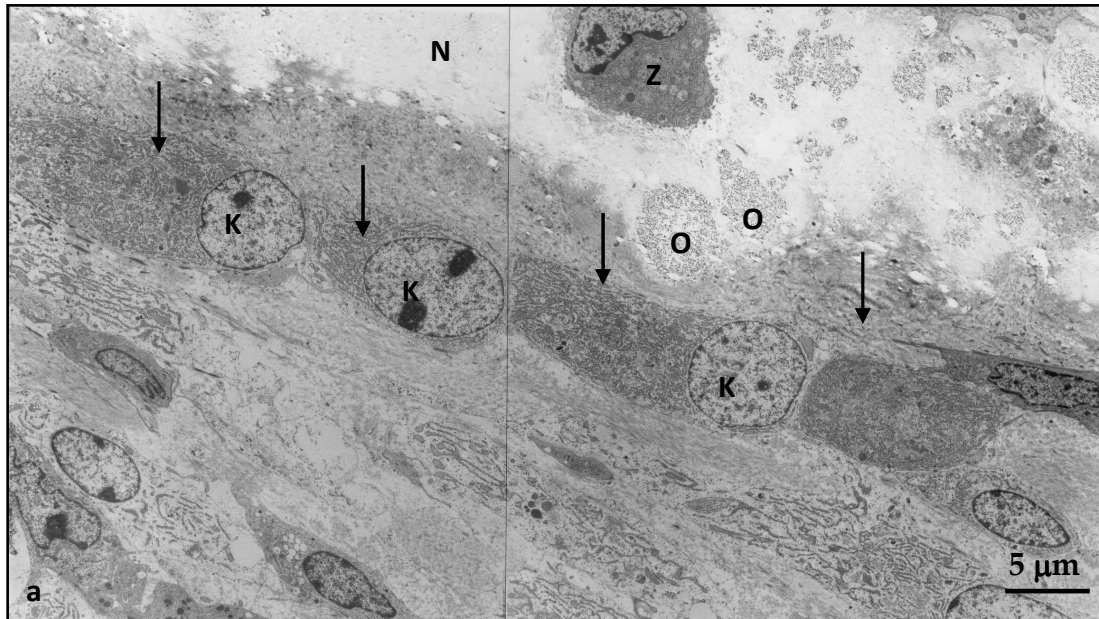


**Abbildung 18:**

**Transmissionselektronen-  
mikroskopische Übersicht eines  
peripheren Defektbereiches.**

**Der neugebildete elektronenhelle  
Geflechtknochen (N) ist deutlich  
von den umliegenden kubisch  
geformten Osteoblasten und deren  
Zytoplasmaanschnitten (Pfeile) im  
rechten unteren Bildabschnitt  
abzugrenzen. Innerhalb des  
Geflechtknochens befinden sich  
neben Implantatpartikeln (O)  
verschiedener Größe Osteozyten  
(Z), von den stellenweise nur  
Zytoplasmaanschnitte zu erkennen  
sind.**

Neben den Myofibroblasten dominieren innerhalb des Granulationsgewebes Zellen, die durch ihre vielgestaltige Erscheinungsform und einen unregelmäßigen, mäßig elektronendichten Zellkern charakterisiert sind. Hervorstechend sind hier die in Elektronendichte, Gestalt und Größe variierenden Zytoplasmainklusionen. Als weiteres wichtigstes Merkmal können die typischen pseudopodienartigen Zytoplasmaausläufer angesehen werden, die zum Teil in engem Kontakt zu benachbarten Myofibroblasten stehen und diesen Zelltyp als Makrophagen kennzeichnen (**Abbildungen 20a, 21 a, b, 23**).



**Abbildung 19:**  
Transmissionselektronen-  
mikroskopische Details eines  
peripheren Defektbereiches.

**a:** Die Oberfläche des  
Geflechtknochens (N) wird durch  
hintereinander angeordnete  
organellenreiche Osteoblasten (Pfeile)  
flankiert.

K = Zellkern; O = Implantatpartikel; Z =  
Osteozyt

**b:** Der Osteoblast wird im unteren  
Abschnitt von elektronenhellem  
Geflechtknochen (N) begrenzt und im  
oberen Bereich von  
Granulationsgewebe (G) umgeben.

K = Zellkern; rER = raues  
endoplasmatisches Retikulum





**Abbildung 20: Transmissionselektronenmikroskopische Übersicht von Granulationsgewebe in Nähe des Defektzentrums**

**a:** Im zellreichen Granulationsgewebe liegen unregelmäßig geformte Makrophagen (Ma) mit diversen intrazytoplasmatischen Inklusionen. Darüber hinaus treten Myofibroblasten (My) in Erscheinung. Die Pfeile weisen auf elektronendichte Mineralisationskerne.

**b:** Myofibroblast (My) des Granulationsgewebes (G). K = Zellkern.

Ka = Kapillare; E = Erythrozyt



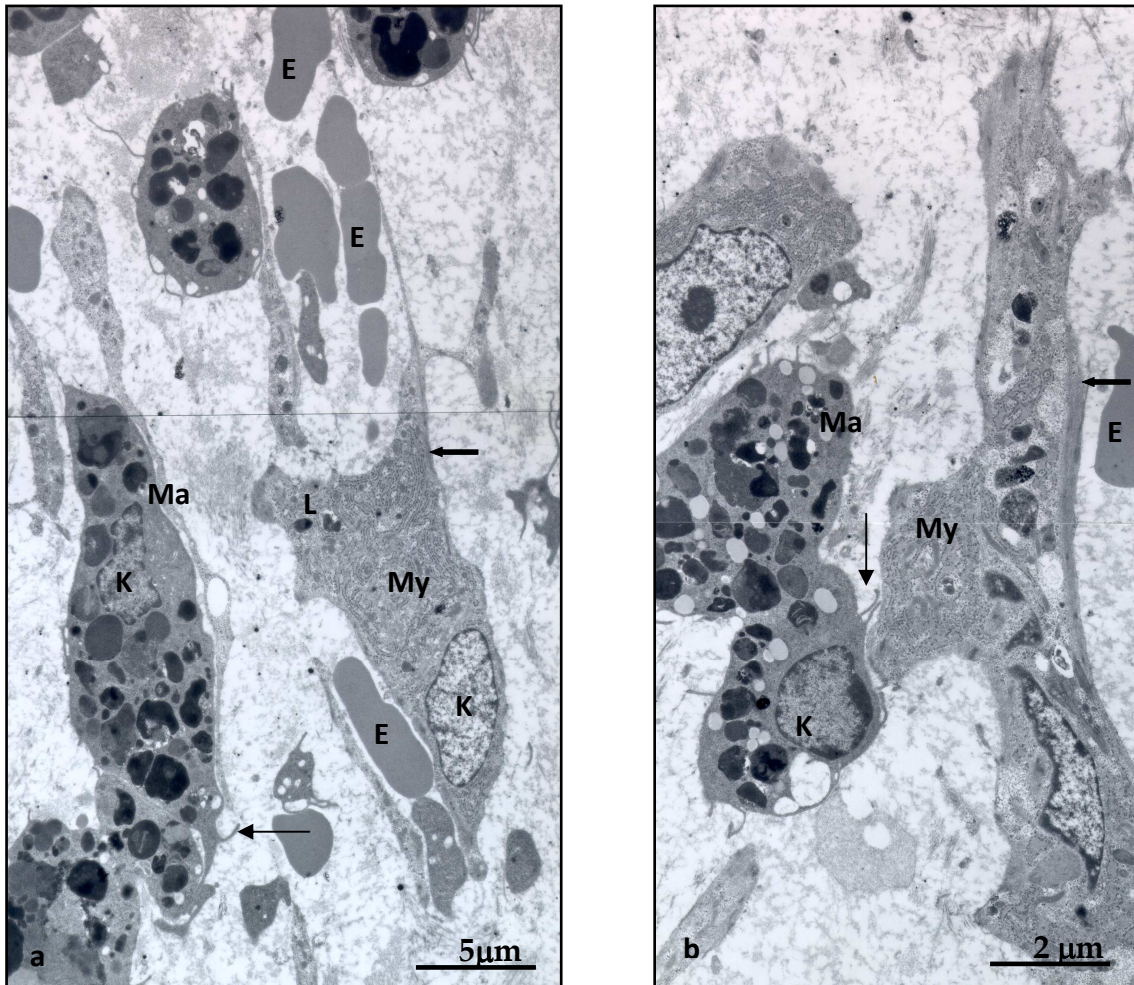
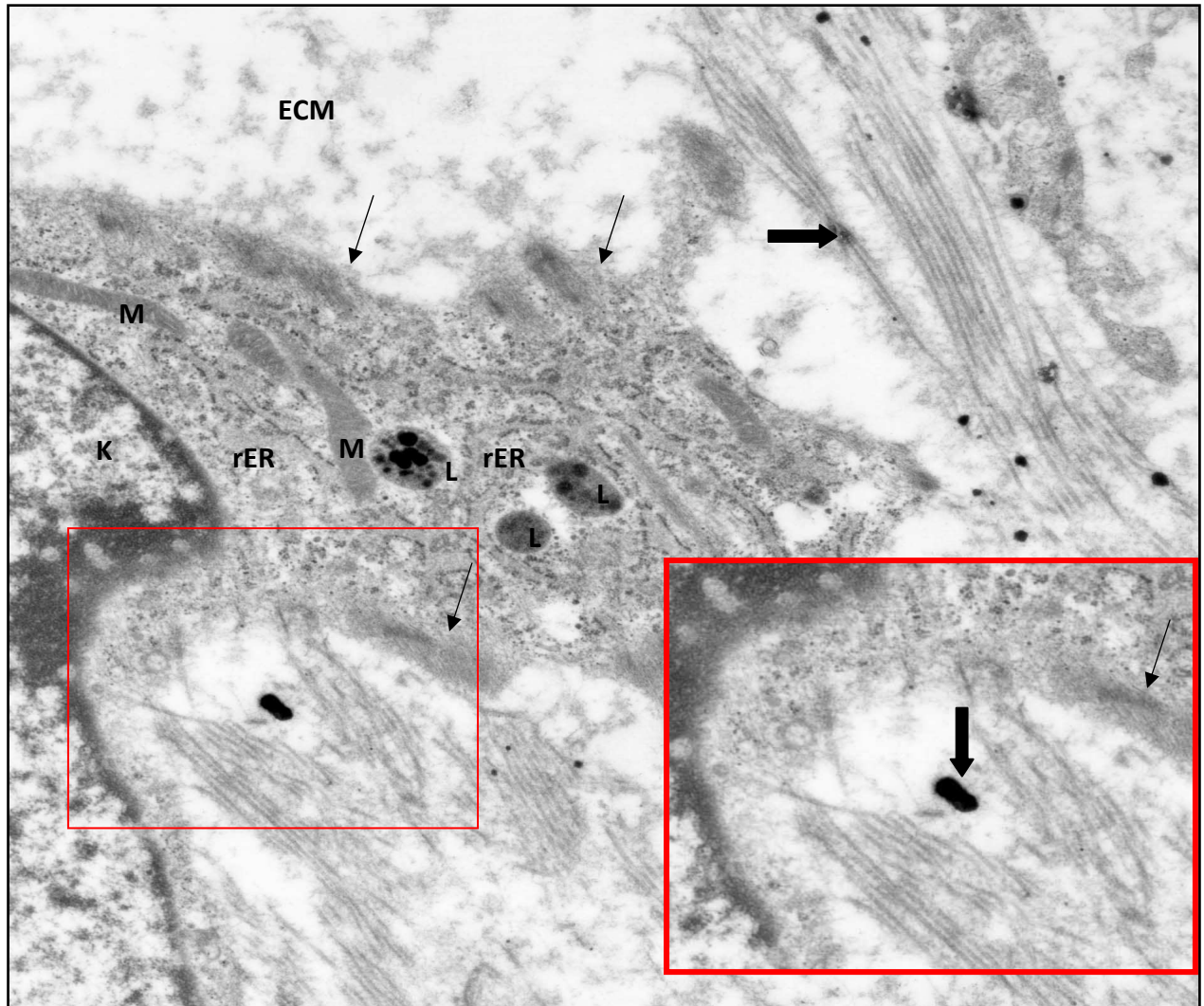


Abbildung 21: Myofibroblasten und Makrophagen innerhalb des Granulationsgewebes in der Übersicht.

a, b: Die Myofibroblasten (My) besitzen subplasmalemmale Aktinfilamentbündel (Pfeile), die sich bis in die Zellfortsätze erstrecken. Das organellenreiche Zytoplasma enthält lysosomale Einschlüsse (L). Die Makrophagen (Ma) sind durch zahlreiche intrazytoplasmatische Inklusionen variierender Elektronendichte und zarte pseudopodienartige Ausläufer gekennzeichnet (dünne Pfeile). E = Erythrozyt; K = Zellkern

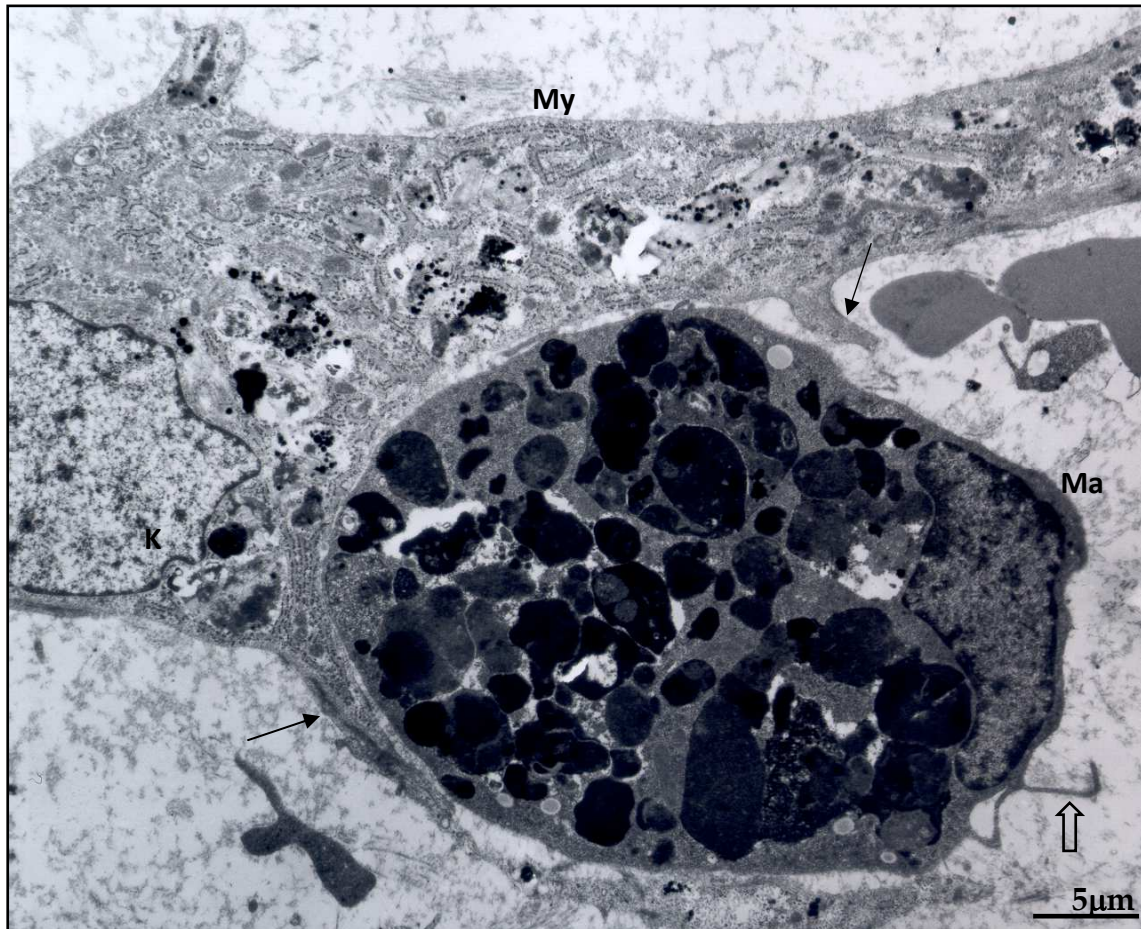




**Abbildung 22: Fibronexus - Ultrastrukturelles Detail eines Myofibroblasten**

Die dünnen Pfeile weisen auf unterhalb der Zellmembran lokalisierte Aktinfilamentbündel. Fibronexus (rote Rechtecke) sind durch transmembranös orientierte Aktinfilamente charakterisiert. Das Lumen des rauhen ER (rER) ist mit mäßig elektronendichtem Inhalt gefüllt. Im Interzellularraum sind kollagene Fasern zu erkennen, denen sich stellenweise Mineralisationskerne anschmiegen (Blockpfeile).

ECM = extrazelluläre Matrix; L = Lysosom; M = Mitochondrium; K = Zellkern



**Abbildung 23: Myofibroblast und Makrophage**

Ein Myofibroblast (My) umschließt mit schlanken Zytoplasmaausläufern (Pfeile) den eng benachbarten Makrophagen (Ma).

In Form, Größe und Elektronendichte variierende Zytoplasmainklusionen sind im Zytoplasma des Makrophagen angereichert. Zelltypspezifisch sind die pseudopodienartigen Zytoplasmafortsätze (transparenter Pfeil).

K = Zellkern

### **4.7 Datenquantifizierung**

#### **Gruppe I/PRP-**

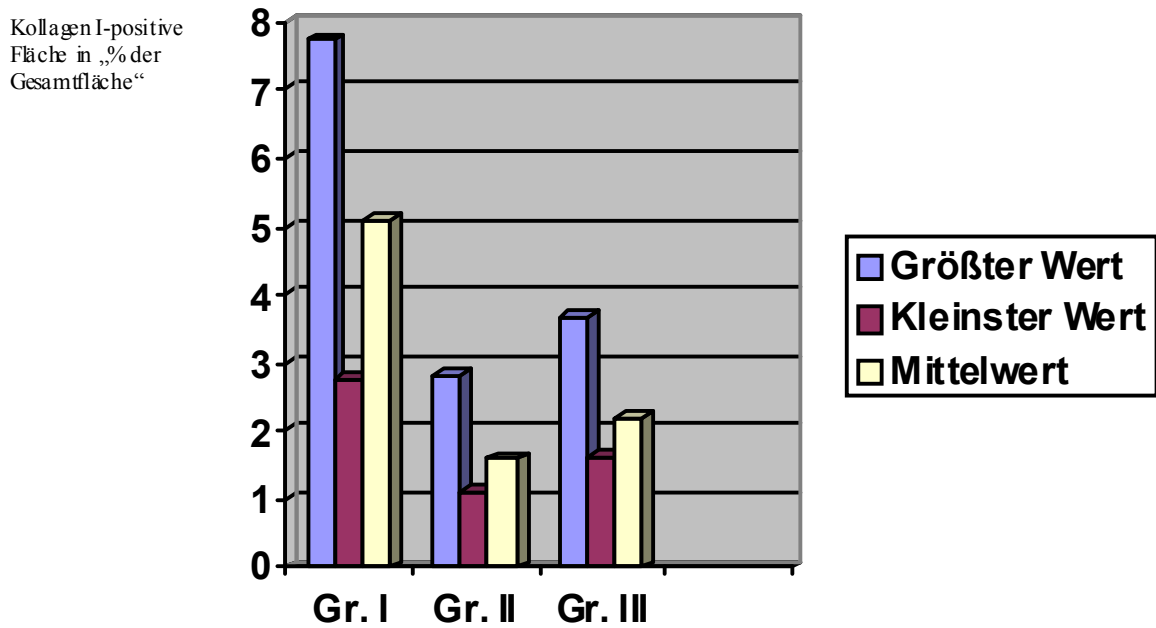
Die Werte der gemessenen Kollagen I-positiven Osteoid- bzw. Geflechtknochenareale bezogen auf die Gesamtfläche der untersuchten Messfelder pro Tier variieren in der Gruppe I/PRP- von 2,74 % bis zu 7,74 %. Der errechnete Gesamtmittelwert der Gruppe liegt bei 5,11 %.

#### **Gruppe II/PRP+**

In der Gruppe II/PRP+ kommt es hinsichtlich der gemessenen Kollagen I-positiven Osteoid- bzw. Geflechtknochenareale zu Werten von 1,07 % bis hin zu 2,38 %. Der errechnete Mittelwert der Gruppe beträgt 1,58 % der untersuchten Gesamtfläche.

#### **Gruppe III/Leerdefekte**

Die in den Leerdefekten gemessenen positiven Areale zeigen eine Varianz von 1,63 % bis zu 3,67 %, mit einem Gesamtmittelwert von 2,20 % der Kollagen I-positiven Fläche.

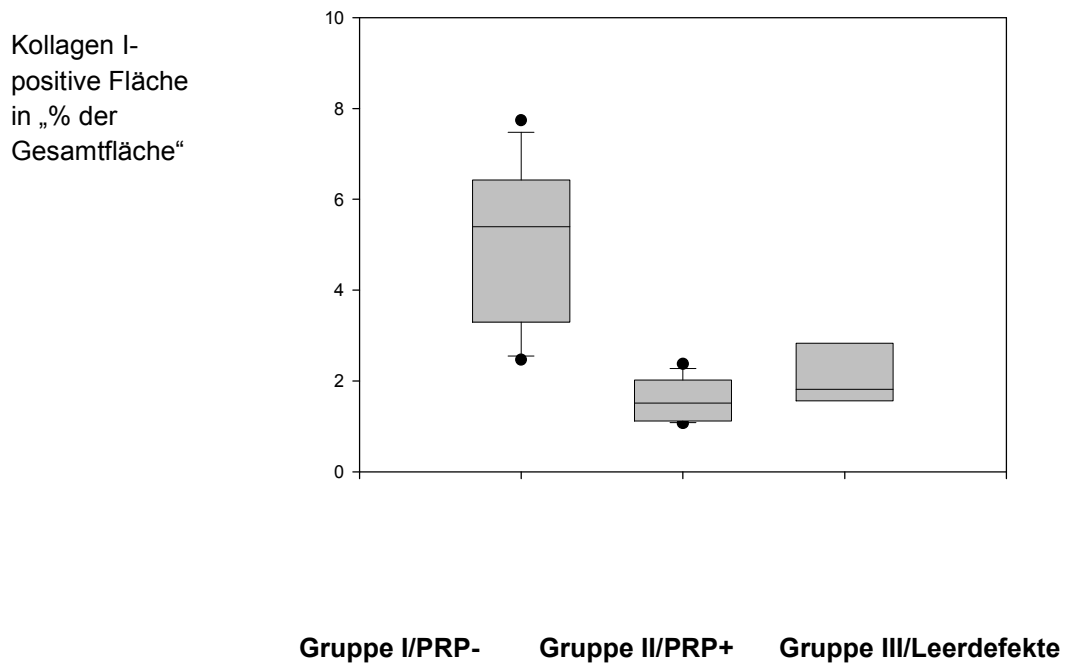


**Abbildung 24:** Darstellung der in den drei Gruppen jeweils gemessenen Kollagen I-positiven Fläche in „% der Gesamtfläche“

Gr. I = Gruppe I/PRP-; Gr. II = Gruppe II/PRP+; Gr. III = Gruppe III/Leerdefekte

Wie **Abbildung 24** zu entnehmen ist, konnte in der Gruppe I/PRP- der größte gemessene Mittelwert und somit die größte Kollagen I-positive Fläche bezogen auf die Defektgesamtfläche ermittelt werden. Da die als Osteoid- bzw. Geflechtknochen detektierten Areale räumlich mit dem neugebildeten Knochen korrespondieren, kann in der Gruppe ohne Zusatz von Wachstumsfaktoren der stärkste Zuwachs an Knochenneubildung festgestellt werden.

Die Datenverteilung wird mittels Box- and Whisker Plot in der **Abbildung 25** dargestellt.



**Abbildung 25: Darstellung des Merkmals Kollagen I-positiver Flächenanteil innerhalb eines Untersuchungsfeldes in Prozent. •: Ausreißer.**

Die statistische Auswertung erfolgt mittels des Kruskal - Wallis Tests für drei unverbundene Stichproben, da die Messwerte keine Normalverteilung zeigen. Ein hochsignifikanter Einfluss ( $p < 0,01$ ) von PRP auf die Größe Kollagen I-positiver Areale wird deutlich.

### 5. Diskussion

Ziel dieser tierexperimentellen Studie war es, die Osseointegration von Ostim® - einer Hydroxylapatit-basierten Paste - in Kombination mit plättchenreichem Plasma (PRP) sowie von Ostim® ohne Zusatz von PRP im spongiösen Knochenlager zu untersuchen, um Erkenntnisse über die Auswirkungen von PRP auf die Granulationsgewebebildung und auf die Knochenneubildung in der Frühphase der Knochendefektheilung zu gewinnen. Die am 20. Tag *post implantationem* durchgeführten histologischen, immunhistochemischen und ultrastrukturellen Untersuchungen spiegeln in Bezug auf den Verlauf der Knochenheilung bei allen tierexperimentellen Gruppen die zweite Phase der Knochenheilung wider, die sich an die initiale Entzündungsphase anschließt. Im Rahmen dieser „Granulationsphase“ kommt es neben der Bildung und Proliferation des Granulationsgewebes zu der Formation des Primärkallus (McKibbin 1978; Pfeil 2005; Schindeler et al. 2008). Innerhalb dieses Granulationsgewebes konnten im Rahmen der Knochendefektheilung spezialisierte Zellen in Form von Myofibroblasten identifiziert werden.

Die Ergebnisse der histologischen und immunhistochemischen Untersuchungen im Rahmen dieser Studie zeigen in der Gruppe I/PRP- eine, im Vergleich zur Gruppe II/PRP+, deutlich stärkere Knochenneubildung.

Deutlich wird dies durch den in der Dünnschliffhistologie der Gruppe I/PRP- größeren Anteil von einwachsendem Geflechtknochen entlang der Bohrkante und dem erhöhten Vorkommen von neugebildetem Knochen in Bereichen um die Implantatpartikel im Vergleich zur Gruppe II/PRP+.

Die stärkere Ausprägung der knöchernen Integration der Implantatpartikel in der Gruppe I/PRP- im Vergleich zur Gruppe II/PRP+ wird mittels Kollagen I-Antikörper detektierten Geflechtknochenareale im Rahmen der immunhistochemischen Untersuchung in Übereinstimmung mit den Befunden der Histologie dargestellt. Zur optischen Erfassung der Kollagen I-positiven Osteoid- bzw. Geflechtknochenareale diente hier das Computerprogramm Image Pro Plus, Version 4.5 (Media Cybernetics Inc., Silver Spring, USA).

In der histologischen Untersuchung der Leerdefekte wird deutlich, dass sich die Geflechtknochenareale auf die Peripherie der Defekte beschränken. Im Vergleich zur Gruppe I/PRP- zeigen die Leerdefekte auf immunhistochemischer Ebene einen geringeren Osteoid- bzw. Geflechtknochenanteil innerhalb der Untersuchungsfelder. Dagegen liegt der errechnete Gesamtmittelwert der Osteoid- bzw.

Geflechtknochenareale der Leerdefekte um 0,62 % über dem errechneten Gesamtmittelwert der Gruppe II/PRP+.

Ein stimulativer Einfluss von PRP auf die Granulationsgewebekonstruktion und Knochenneubildung war nicht feststellbar. Die Granulationsgewebekonstruktion betrachtend, ist auffällig, dass in den Gruppen I/PRP- und II/PRP+ eine kontinuierliche Abnahme von der Bohrkante zum Defektzentrum hin erfolgt. Die Defektzentren in der Gruppe III/Leerdefekte dagegen weisen eine vollständige Füllung mit zellreichem Granulationsgewebe auf.

### 5.1 Der Knochenersatzstoff Ostim®

Der nanopartikuläre Knochenersatzstoff Ostim® ist als eine biodegradierbare, osteokonduktive Matrix auf Hydroxylapatitbasis (Kilian et al. 2002), die dem Knochen in chemisch-physikalischen Eigenschaften sehr nahe kommt. In ausgedehnten Untersuchungen wurde die Biokompatibilität dieses neuartigen Knochenersatzmaterials bereits *in vitro* und *in vivo* nachgewiesen (Breusch 2005; Kilian 2005).

Neben seiner Biodegradierbarkeit und osteokonduktiven Wirkung stellt die formschlüssige Applikation der Paste einen Vorteil bei der Auffüllung von Knochendefekten dar. Das Material kann aufgrund seiner weichen Konsistenz direkt in die Knochenhöhle eingebracht werden. Ein bündiger Abschluss zur knöchernen Begrenzung der Knochenhöhle ist so zu gewährleisten (Gerlach und Niehues 2007). Laut Herstellerangaben wirkt das bioaktive Material Ostim® sogar osteoinduktiv (Heraeus Kulzer Hanau).

In der vorliegenden Studie wurde in der Gruppe I/PRP- eine im Vergleich zur Gruppe II/PRP+ stärkere Knochenneubildung in den Bereichen um die Ostimpartikel festgestellt. In der Gruppe III/Leerdefekte zeigte sich bezogen auf die Knochenneubildung ein geringeres Ausmaß als in Gruppe I/PRP-.

Breusch (2005) wies in einer tierexperimentellen Untersuchung am Göttinger Miniaturschwein nach, dass der Knochenersatzstoff Ostim® nur in den ersten sechs Wochen degradiert wird und die fibrotische Gewebereaktion im Knochenlager der Schienbeinmetaphysen die ossäre Integration nicht behindert. Allerdings wurde ein Jahr *post operationem* eine ausgeprägte Persistenz des Knochenersatzstoffes innerhalb der Knochendefekte beobachtet.



In Bezug auf die Ergebnisse der vorliegenden Untersuchungen kann daher nicht ausgeschlossen werden, dass eine *Restitutio ad integrum* im weiteren Verlauf der Knochendefektheilung aufgrund der Persistenz von Ostimpartikeln innerhalb der Defekte der Gruppen I/PRP- und Gruppe II/PRP+ behindert werden könnte.

### **5.2 Gewinnung und Einsatz von plättchenreichem Plasma**

Der Einsatz von plättchenreichem Plasma (PRP) als Quelle thrombozytärer Wachstumsfaktoren wurde bereits im Rahmen von zahlreichen klinischen Studien untersucht und findet seit einigen Jahren im Bereich der Transplantationsmedizin klinische Verwendung (Wiltfang et al. 2003; Fontana et al. 2004; Thorn et al. 2004). Flankierende Einsätze von PRP in der Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie (Whitman et al. 1997; Marx et al. 1998) bestätigten *in-vitro* Studien, die einen proliferativen Einfluss von PRP auf Zellen ossären Ursprungs aufzeigen (Weibrich et al. 2002).

Die Methodik der PRP-Gewinnung hat maßgeblichen Einfluss auf den Gehalt von Thrombozyten im PRP. So erzielten Schlegel et al. (2003) in Übereinstimmung mit den Ergebnissen der vorliegenden Studie eine vierfache Konzentrierung der Thrombozyten im PRP, Arpornmaeklong et al. (2004) eine achtfache und Dugrillon et al. (2002) sogar eine zwölfwache Konzentrierung.

Zur direkten Gewinnung durch den Anwender finden, als Ergänzung zu einer diskontinuierlichen Zellseparation, zur Zeit zwei standardisierte Methoden Verwendung (Weibrich et al. 2002). Zum einen erfolgt die Gewinnung mittels Platelet-Concentrate-Collection-System (PCCS Kit, 3i Implant Innovations, Palm Beach Gardens, FL, USA 3i) zum anderen unter Verwendung der Curasan-Methode (PRP kit, Curasan, Kleinostheim, Germany).

Die Gewinnung des PRP in vorliegender Studie erfolgte bei sechs Tieren durch die Entnahme von Vollblut. Dieses wurde vor einer ersten Zentrifugation bei 5600 Umdrehungen / min mittels Citrat-Phosphat-Dextrose-Antikoagulans ungerinnbar gemacht (Aghaloo et al. 2004), um schließlich das plättchenarme Plasma von den Erythrozyten und dem *buffy coat*, der die Leukozyten und Thrombozyten enthält, zu trennen. Vor der Freisetzung der Wachstumsfaktoren mittels Kalziumchlorid und Thrombin (Carlson und Roach 2002) wurde der von dem plättchenarmen Plasma getrennte Anteil mit 2600 Umdrehungen / min erneut zentrifugiert, um Erythrozyten, Leukozyten und das PRP voneinander zu trennen. Im Anschluss wurden mittels ELISA die Konzentrationen der einzelnen Wachstumsfaktoren im PRP der sechs zur



Blutentnahme verwendeten Tiere bestimmt. Verwendung fand das PRP des Tieres mit der höchsten gemessenen Konzentration an Wachstumsfaktoren.

In Abhängigkeit von der gewählten Methode kommt es jedoch zur unterschiedlichen Konzentrierung an Wachstumsfaktoren. So konnten Weibrich et al. (2002), im Vergleich zur Curasan-Methode, mittels PCCS im PRP einen deutlich höheren Gehalt an TGF- $\beta$ 1, PDGF-AB und IGF-I sowie eine höhere Anzahl an Thrombozyten nachweisen.

Dass hohe Thrombozytenkonzentrationen entsprechend hohe Konzentrationen an Wachstumsfaktoren nach sich ziehen, ist umstritten. Während Dugrillon et al. (2002) und Landesberg et al. (2000) einen Zusammenhang von Thrombozytenzahl und Wachstumsfaktorenausschüttung feststellen, wird dies von Zimmermann et al. (2001), Kevy und Jacobson (2004) und Weibrich et al. (2004) bestritten.

Ob das Ausmaß der Konzentrierung der Wachstumsfaktoren im Rahmen dieser Studie mit den Ergebnissen anderer Untersuchungen zu vergleichen ist, ist schwer zu beurteilen, da in diesen Untersuchungen keine Ausgangskonzentrationen sondern nur Endkonzentrationen angegeben werden, die Herstellung mittels unterschiedlicher Methoden (Dugrillon et al. 2002; Schlegel et al. 2003) erfolgte und zum anderen unterschiedliche Spezies verwendet wurden (Jakse et al. 2003; Choi et al. 2004). Die im ELISA ausbleibende Nachweisreaktion von PDGF-AB ist unter Umständen auf die fehlende Kreuzreaktivität des verwendeten, gegen humanes Antigen gerichteten, Antikörpers zurück zu führen. Es ist unwahrscheinlich, dass der Faktor im verwendeten PRP nicht vorhanden ist. Möglicherweise sind die Konzentrationen aber auch so gering, dass sie unterhalb der Detektionsgrenze liegen.

Die Verwendung von PRP ist in der Regel mit dem Einsatz von Knochenersatzmaterialien oder Implantaten kombiniert. Zahlreiche Darreichungsformen sowie eine Vielzahl an unterschiedlichen Knochenersatzstoffen und Implantaten erschweren jedoch eine einheitliche Aussage über den potenziellen Erfolg von PRP. Des Weiteren sind Spezies-Unterschiede und individuelle Unterschiede der Patienten bei der Beurteilung zu berücksichtigen.

Im Folgenden wird dargelegt, warum der klinische Einsatz von PRP bislang kontrovers diskutiert wird.

Die Ergebnisse klinischer und therapeutischer Studien divergieren von positiven Effekten des PRPs auf die Knochenneubildungsrate über nicht feststellbare Effekten bis hin zu negativen Auswirkungen auf die Knochenneubildung.

So verzeichnen Wiltfang et al. (2003) nach der Verwendung von PRP und  $\beta$ -Trikalziumphosphat in humanen Maxillar-Defekten eine, im Vergleich zur Kontrollgruppe,

um acht bis zehn Prozent erhöhte Knochenneubildungsrate. Auch Aghaloo et al. (2004) beobachteten in Schädeldefekten von Kaninchen eine signifikant erhöhte Knochendichte in der mit PRP behandelten Tiergruppe. Beim Auffüllen von Radiusdefekten von Kaninchen mit einer Kalzium-defizienten Hydroxylapatit (CDHA)-Keramik in Kombination mit PRP konnte, im Vergleich zur Gruppe ohne PRP, ebenfalls eine verbesserte Knochenneubildung erreicht werden (Szalay et al. 2006).

Keine Effekte auf die Knochenneubildung von PRP in Kombination mit anorganischem bovinen Knochen als auch in Kombination mit autologem Knochenersatz waren in Mandibulardefekten von Ratten zu verzeichnen (Rolden et al. 2004).

Auch Schlegel et al. (2003) konnten, den innerhalb der Gesamtbeobachtungszeit von 26 Wochen bei der Gruppe „autogener Knochen ohne PRP-Zusätze“ festgestellten maximalen Mineralisationswert, in den beiden Gruppen mit PRP-Zusatz nicht bestätigen. Terheyden et al. (2002) dokumentieren im Rahmen eines *Sinus - Lifts* am Minischwein-Modell sogar einen statistisch signifikant negativen Effekt von PRP auf die Knochen-Implantat-Kontaktrate. Daneben tritt jedoch eine auf 70 % signifikant erhöhte Steigerung der Knochendichte nach PRP-Applikation auf. Die scheinbare Diskrepanz zwischen deutlich gesteigerter Knochendichte und gleichzeitig verminderter Knochen-Implantat Kontaktrate ist derzeit noch nicht geklärt.

Vergleichbar mit den vorliegenden Ergebnissen beobachteten Choi et al. (2004) eine verminderte Knochenneubildung sechs Wochen nach Auffüllung von Mandibulardefekten von Hunden mit autogenem Knochen in Kombination mit PRP. Als mögliche Ursache führen die Autoren die Konzentration des verwendeten PRP an.

Ebenso kann sich der Einfluss einzelner Wachstumsfaktoren negativ auf die Knochendefektheilung auswirken. So hat die Konzentration des im PRP enthaltenen PDGF maßgeblichen Einfluß auf den Verlauf der Knochendefektheilung (Lee 1997). Bereits Marden et al. (1993) berichteten, dass PDGF-BB appliziert in Kraniotomiedefekte von Ratten die Knochendefektheilung verzögert.

Des Weiteren muss der Verlauf des operativen Eingriffes berücksichtigt werden. So konnte in der vorliegenden Studie während der Eingriffe die Entstehung von Bohrmehl nicht verhindert werden. Als Folge waren individuell unterschiedliche Mengen an Rückständen innerhalb der entstandenen Defekte zu erkennen. Die Degradation der Bohrmehlrückstände hat Einfluss auf die Freisetzung von Wachstumsfaktoren aus der Knochenmatrix (Cornell und Lane 1992) und damit auf die konsekutive Heilung einschließlich der Knochenneubildung.

Diese variierte zwischen den Gruppen I/PRP- und II/PRP+. Immunhistochemisch und im Rahmen der Quantifizierung der Kollagen I-positiven Flächen zeigte sich in der Gruppe II/PRP+ deutlich weniger neugebildeter Knochen. Die mittels Kollagen I-Antikörper

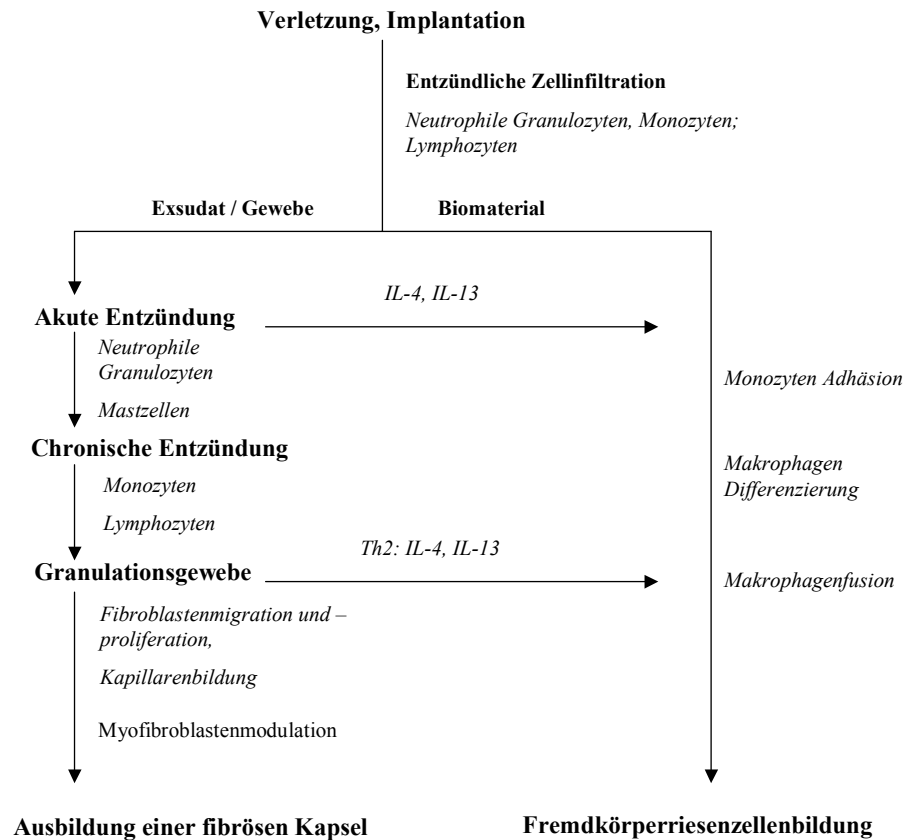
detektierten Flächen innerhalb der Defekte korrespondieren räumlich mit dem neugebildeten Geflechtkochen, somit kann hier von einer in der Gruppe II/PRP+ unter PRP-Einfluss deutlich geringeren Knochenneubildung im Unterschied zur Gruppe I/PRP- gesprochen werden. Da die Verwendung von PRP den Ausschlag gebenden methodologischen Unterschied darstellte, kann diese Abnahme auf das verwendete PRP zurückgeführt werden.

Als mögliche Ursache für eine verminderte Knochenneubildung in der Gruppe II/PRP+ muss die Herkunft des verwendeten PRPs berücksichtigt werden. Es handelt sich um ein homologes Konzentrat. Als „goldener Standard“ gilt jedoch die Verwendung von autologem Thrombozytenkonzentrat (Sanchez et al. 2003), was das Risiko einer Immunreaktion im Empfängerorganismus ausschließt (Marx 2004) und gleichzeitig die Möglichkeit einer Krankheitsübertragung ausschließt.

Da jedoch keine morphologischen Anzeichen für das Auftreten von Zellen der selektiven Abwehr, wie Lymphozyten, in der vorliegenden Studie beobachtet werden konnten, ist eine immunologische Reaktion der Empfängertiere zum Untersuchungszeitpunkt unwahrscheinlich. Allerdings kann das Vorkommen entsprechender Zellen während früherer Phasen nicht ausgeschlossen werden. Zum Zeitpunkt der Untersuchung befinden wir uns innerhalb der chronischen Entzündungsphase. Ein Auftreten von aktivierten Lymphozyten und deren Umwandlung in Plasmazellen oder Gedächtniszellen könnte sich bereits vor dem 20. Tag vollzogen haben.

Das um den Faktor zwei vermehrte Auftreten multinukleärer Riesenzellen im Defektbereich der Gruppe II/PRP+ (Lauer 2006) im Unterschied zur Gruppe I/PRP- weist jedoch darauf hin, dass die Applikation exogen zugeführter homologer thrombozytärer Wachstumsfaktoren einen maßgeblichen Einfluss auf das Ausmaß der Entzündungsphase hat und sich in einer Stimulation der unspezifischen Abwehr und der damit verbundenen Makrophagenrekrutierung und Makrophagenfusion manifestiert. Im Zusammenhang mit der Applikation thrombozytärer Wachstumsfaktoren stellten Wiltfang et al. (2003) bei der Kombination von autologem PRP und TCP-Keramiken ein vermehrtes Auftreten multinukleärer Riesenzellen fest.

In **Abbildung 23** ist die Abfolge der einzelnen Phasen der Gewebereaktion, die im Rahmen der Implantation von Knochenersatzstoffen ablaufen, dargestellt.



**Abbildung 23: Darstellung der Abfolge der im Rahmen von Knochenersatzstoff – Implantationen ablaufenden Phasen, die in der Bildung von Fremdkörperriesenzellen gipfeln (modifiziert nach Anderson et al. 2007).**

Die als Folge der Implantation von Knochenersatzstoffen auftretende Fremdkörperreaktion, wie sie in der Gruppe II/PRP+ zu beobachten ist, führt zur Aktivierung von Makrophagen und Fremdkörperriesenzellen. Sie stellt das finale Stadium der Gewebeantwort auf die Implantation von Biomaterialien dar. Die Oberflächenbeschaffenheit des implantierten Materials ist für das Ausmaß und die Modulation der Aktivität von Fremdkörperriesenzellen von entscheidender Bedeutung (Anderson et al. 2007).

Zu den möglichen Gewebereaktionen des Empfängers, ausgelöst durch die im Rahmen der Implantation erfolgte Zerstörung der Gewebeintegrität, gehören Interaktionen von aus dem Blut stammenden Zellen und Faktoren, die Ausbildung eines Blutgerinnsels, die akute sowie chronische Entzündungsreaktion, die Fremdkörperreaktion und schließlich die Ausbildung einer fibrösen Kapsel (Anderson 2000; Anderson 2001; Gretzer et al. 2006; Luttikhuisen et al. 2006) (**Abbildung 23**). Das Ausmaß der Entzündungsreaktionen wird maßgeblich von dem Grad der im Rahmen der Implantation verursachten

Verletzung, dem betroffenen Gewebe und dem gebildeten Blutgerinnsel beeinflusst. Innerhalb des, das Implantatmaterial umgebenden Blutgerinnsels, ist eine Vielzahl an Zytokinen und Wachstumsfaktoren lokalisiert, die in der Lage sind, die Aktivität von Makrophagen zu beeinflussen.

Die sich innerhalb der ersten Tage nach der Implantation vollziehende Bildung von Granulationsgewebe schließt eine Infiltration mit Fibroblasten, eine Neovaskularisation, das Vorkommen von Myofibroblasten und die Anwesenheit von Makrophagen ein. Abhängig von dem Ausmaß der Granulationsgewebebildung kann diese als die Vorstufe der fibrösen Abkapselung angesehen werden (Anderson et al. 2007). Aufgrund des Vorkommens von Fibroblasten, Myofibroblasten, Kapillaren und Makrophagen in den untersuchten Defekten befinden sich diese innerhalb der Granulationsphase.

Die durch Makrophagen freigesetzten Wachstumsfaktoren wie PDGF, TNF- $\alpha$ , FGF und Zytokine haben großen Einfluss auf die Fibroblastenproliferation und auf das Einsprossen neuer Gefäße (Anderson 2001). In den Defektbereich rekrutierte Zytokin-sezernierende einkernige Makrophagen sind in der Lage PDGF, TNF- $\alpha$  und GM-CSF zu produzieren, wodurch weitere Makrophagen rekrutiert werden (Anderson et al. 2007). Neben der Zytokinproduktion durch Makrophagen ist die Zytokinproduktion der Fremdkörperriesenzellen zu berücksichtigen, wodurch sie in der Lage sind aktiv eine Entzündungsreaktion zu beeinflussen (Anderson et al. 2007). Die Zytokinausschüttung korreliert mit dem Ausmaß der Entzündung und gilt als aussagekräftiger Parameter bezüglich der Einschätzung des Entzündungspotentials (Warmuth 2005). Die Entzündungsreaktion in der Gruppe II/PRP+ wird durch das zugegebene PRP forciert, was eine Behinderung der Knochendefektheilung in ihrem weiteren Verlauf zur Folge haben kann.

Nach der Verwendung von Knochenersatzmaterialien können unterschiedliche Komplikationen auftreten. Neben einer mangelnden Osseointegration, die vereinzelt in den Gruppen I/PRP- und II/PRP+ verzeichnet werden kann und sich in einem geringeren Ausmaß von Geflechtknochen zirkulär um die Ostimpartikel manifestiert, steht als mögliche Komplikation eine, der chronisch verlaufenden Entzündung folgende, fibröse Abkapselung des implantierten Materials im Vordergrund (Tang und Eaton 1995). Im Verlauf einer solchen Gewebereaktion können unterschiedliche Ausmaße unterschieden werden, es kann zu leichten osteolytischen Veränderungen bis zu granulomatös entzündlichen Reaktionen kommen (Böstmann et al. 1992; Fraser und Cole 1992; Frokjaer und Moller 1992; Pelto-Vasenius et al. 1997; Böstmann und Pihlajamaki 1998; Nordström et al. 1998), was jedoch in der vorliegenden Untersuchung nicht beobachtet werden konnte.

Die aufeinander folgenden Phasen der Gewebereaktion im Rahmen der Implantation von Biomaterialien gehen fließend ineinander über und stehen in unmittelbarem Zusammenhang miteinander (Warmuth 2005). So führen zusätzlich applizierte homologe thrombozytäre Wachstumsfaktoren in der Gruppe II/PRP+ über eine verstärkte Fremdkörperreaktion zu einer verringerten Knochenneubildung innerhalb der Defekte. Eine beginnende, der Granulationsphase folgende, fibröse Abkapselung in der Gruppe II/PRP+ zeichnet sich durch die parallel zur Bohrkante verlaufende Ausrichtung der im Granulationsgewebe lokalisierten Fasern ab. Hieraus ist abzuleiten, daß das Ausmaß der Fremdkörperreaktion des Empfängerorganismus Einfluss auf den Verlauf der Defektheilung nimmt.

So haben die exogen zugeführten Wachstumsfaktoren die Fremdkörperreaktion so stark forciert, dass der naturgemäße Verlauf der Knochenneubildung unterdrückt wurde. Die beginnende Ausbildung einer fibrösen Kapsel im Bereich der Bohrkante der Gruppe II/PRP+ könnte eine räumliche Barriere für einwandernde Osteoblasten – Präkursoren darstellen.

### **5.3 Der Einfluss relevanter Wachstumsfaktoren**

Basierend auf den mittels ELISA ermittelten Konzentrationen der im PRP maßgeblich angereicherten Wachstumsfaktoren soll im Folgenden auf die Wirkung von TGF- $\beta$  1 (im PRP um den Faktor 1,6 konzentriert), PDGF-BB (im PRP um den Faktor 7,1 konzentriert) und bFGF (im PRP um den Faktor 24,4 konzentriert) näher eingegangen werden.

### **Transforming growth factor beta 1 (TGF- $\beta$ 1)**

*In vivo* Untersuchungen über die Wirkung von dem zu der TGF-Superfamilie gehörenden TGF- $\beta$  1 zeigten am Hund einen stimulativen Effekt auf die Knochenneubildung (Sumner et al. 1995). Des Weiteren dokumentieren *in vivo* Untersuchungen am Kaninchen einen im Vergleich zur Kontrollgruppe größeren Knochenzuwachs bei mit TGF- $\beta$ 1 beschichteten Hydroxylapatitimplantaten (Lind et al. 1993). Wichtige Funktionen besitzt TGF- $\beta$  1 innerhalb des Knochenstoffwechsels, da er unter anderem eine mitogene Wirkung auf Osteoblasten-Vorläuferzellen (Baylink et al. 1993) hat, die Knochenresorption, die Osteoklastenformation und die osteoklastäre Aktivität hemmt (Aghaloo et al. 2002). Des Weiteren ist für TGF- $\beta$  1 eine anti-inflammatorische Wirkung bekannt, die in der Proliferationshemmung von Lymphozyten und Makrophagen begründet liegt (Lee 2000). Entsprechend wäre in der Gruppe II/PRP+ ein vermindertes Auftreten entsprechender Zellen zu erwarten. Das vermehrte Vorkommen von Makrophagen in der Gruppe II/PRP+ kann zum einen mit dem homologen Ursprung des verwendeten PRPs zusammenhängen. Des Weiteren kann es durch die als Fremdkörper verstandenen Implantatpartikel innerhalb der Defekte zu einer zusätzlichen Zytokinbildung durch rekrutierte Makrophagen gekommen sein, die den beschriebenen anti-inflammatorischen Einfluss von TGF- $\beta$  aufgehoben haben könnte.

In Bezug auf die Knochenneubildung ist die Wirkung von TGF- $\beta$  1 zum einen maßgeblich von der verwendeten Trägersubstanz, der Konzentration sowie der Einflusdauer abhängig. So konnten Yamamoto et al. (2000) nachweisen, dass der positive Effekt von TGF- $\beta$  1 auf die Knochenneubildung von einer kontinuierlichen Freisetzung und der Degradierbarkeit eines geeigneten Trägermaterials abhängt. Eine zu schnelle Degradation des verwendeten TGF- $\beta$  1 enthaltenden Hydrogels würde zu einer Verkürzung der TGF- $\beta$  1 Wirkung führen und somit den positiven Effekt auf die Knochenneubildung unterbinden. Mit dem zahlreichen Vorkommen von Makrophagen in der Gruppe II/PRP+ könnte eine beschleunigte Degradation des Implantatmaterials einhergegangen sein, was der Entfaltung der TGF- $\beta$  Wirkung entgegengewirkt haben kann. Die im Vergleich zur Gruppe I/PRP- deutlich geringere Größe der Ostimplantatpartikel in der Gruppe II/PRP+ scheint diese Hypothese zu unterstützen.

Hinsichtlich des Einflusses auf die Granulationsgewebebildung ist TGF- $\beta$  in der Lage, die  *$\alpha$ -smooth muscle actin*-Expression und die Kollagen-Expression in kultivierten Fibroblasten zu induzieren (Gabbiani 1998). Die durch TGF- $\beta$  modulierten Fibroblasten differenzieren sich zu Myofibroblasten (**Abbildung 1**). Bezüglich Ultrastruktur, räumlichem Verteilungsmuster und der Morphologie der Myofibroblasten, konnten keine



Unterschiede zwischen den Gruppen I/PRP-, II/PRP+ und III/Leerdefekte ermittelt werden. Möglicherweise hängt die fehlende Wirksamkeit von TGF- $\beta$  auch hier mit seinem homologen Ursprung und der durch den zu schnellen Abbau verringerten Wirkungsdauer zusammen. Exogen zugeführtes TGF- $\beta$  scheint in diesem Zusammenhang offensichtlich ohne Wirkung auf die Myofibroblasten zu sein.

Der konzentrationsabhängige Einfluss auf die Knochenneubildung, des in dieser Studie um 1,6 erhöhten Faktors, wird in der Literatur kontrovers diskutiert. In Kombination mit Kalziumphosphat-Keramiken konnten konzentrationsabhängige Effekte auf die Knochenneubildung festgestellt werden. Als optimale Konzentration für einen knochenneubildungsfördernden Effekt von TGF- $\beta$  1 wurde die Dosis von 1,0  $\mu$ g angegeben (Szivek et al. 2004). In älteren Studien wird erwähnt, dass niedrige TGF- $\beta$  1 Konzentrationen die DNA-Synthese von Osteoblasten erhöhen, wohingegen hohe Konzentrationen des Wachstumsfaktors die mitogene Aktivität reduzieren (Sporn et al. 1987; Centrella et al. 1991).

Ein positiver Einfluss von TGF- $\beta$  1 auf die Knochenneubildung konnte in der vorliegenden Studie nicht beobachtet werden. Allerdings muss berücksichtigt werden, dass TGF- $\beta$  1 nicht isoliert appliziert wurde, was die Beurteilung eines Faktorspezifischen Einflusses auf die Knochenneubildung erschwert. Ausschlaggebend für das Ausmaß der Wirkungen von TGF- $\beta$  1 auf die einzelne Zielzelle sind weiterhin neben seiner eigenen Konzentration, Parameter wie Zelltyp, Grad der Differenzierung und Anwesenheit anderer Wachstumsfaktoren (Sporn et al. 1987; Centrella et al. 1991).

### **Platelet-derived growth factor (PDGF-BB)**

PDGF-BB, eine der drei bekannten Isoformen des hitzestabilen Polypeptids PDGF, wirkt mitogen auf Osteoblasten (Lieberman et al. 2002), aktiviert Osteoblasten sowie Osteoklasten (Hock und Canalis 1994) und hat eine chemotaktische Wirkung auf mesenchymale Stammzellen und Osteoblasten (Gruber et al. 2004).

Der in vorliegender Studie, im PRP um den Faktor 7,1 konzentrierte PDGF, gilt ebenfalls als ein die Reifung und Chemotaxis von Makrophagen fördernder Faktor (Lee 2000; Sanchez et al. 2003). So konnte Lauer (2006) eine, im Vergleich zur Gruppe ohne PRP, signifikant erhöhte Anzahl an Makrophagen sowie Fremdkörperriesenzellen feststellen. Neben der direkten Wirkung von PDGF auf Makrophagen könnte die Wechselwirkung mit weiteren thrombozytären Wachstumsfaktoren eine entscheidende Rolle bei der Wirkung auf Zellen wie Osteoblasten, Osteoklasten und Makrophagen spielen (Yazawa et al. 2003).

Die durch PDGF-BB zu erwartende mitogene Wirkung auf Osteoblasten konnte im Rahmen der vorliegenden Studie nicht durch eine verstärkte Knochenneubildungsrate bestätigt werden. Da zur Zeit keine aussagefähigen Studien zur konzentrationsabhängigen Wirkung von PDGF vorliegen, kann vermutet werden, dass die starke Konzentrierung des Wachstumsfaktors eine Forcierung der Entzündungsreaktion zur Folge hat und sich durch vielfältige Wechselwirkungen auf humoraler und zellulärer Ebene die osteoblastenstimulierenden Effekte aufheben.

### **basic Fibroblast growth factor (bFGF)**

Der hemmende Einfluss von bFGF auf Osteoklasten sowie eine gleichzeitige Erhöhung der Fibroblasten-, Osteoblastenproliferation und -differenzierung *in vitro* ist bekannt (Masaki und Vogel 1986; Siebert et al. 2003). Bezüglich des Einflusses des Wachstumsfaktors auf Knochenzuwachs und Kallusbildung im Rahmen der Defektheilung wurden bisher unterschiedliche Ergebnisse veröffentlicht (Inui et al. 1998; Hosokawa et al. 2000; Schnettler et al. 2003). So konnten Bland et al. (1995) nach der Applikation von bFGF in Tibiadefekte von Kaninchen keine beschleunigte Frakturheilung feststellen.

In Abhängigkeit von der Applikationsmenge zeigten Nagai et al. (1995), dass der Faktor neben einer proliferationsfördernden Wirkung in hohen Dosierungen, inhibitorisch auf die Osteoblastendifferenzierung einwirkt. Von Okumura et al. (1996) durchgeführte Dosisfindungsuntersuchungen zeigten die beste Wirkung von bFGF bei lokaler Applikation von 20 µg.

bFGF wird in Abhängigkeit der Konzentration sogar eine potenzielle Toxizität zugeschrieben (Sprutacz 2005). Die im Rahmen der Knochendefektheilung ablaufenden Heilungs- und Regenerationsprozesse können somit negativ beeinflusst werden. In seiner Studie konnte Sprutacz (2005) am Rattenmodell eine dosisabhängige Steigerung der Infektionsrate im Rahmen von Frakturen mit Weichteilschäden feststellen. Die verwendete höchste Konzentration von bis zu 100 ng bFGF korreliert in seiner Studie mit der höchsten Infektionsrate.

Die Ergebnisse der beschriebenen Studien betrachtend, wird deutlich, dass bisher keine einheitliche Aussage über konzentrationsabhängige Effekte von bFGF getroffen werden kann. Die von Okumura et al. (1996) ermittelte Konzentration von 20 µg ist in der vorliegenden Studie nicht erreicht worden, was als eine mögliche Ursache für den fehlenden positiven Effekt von bFGF auf die Knochenneubildung gesehen werden kann.

Letztlich kann die isolierte Wirkung von bFGF aufgrund potenzieller Interaktionen mit anderen gleichzeitig applizierten Wachstumsfaktoren und intrinsisch freigesetzten Faktoren nicht ausreichend differenziert werden. Außerdem ist die positive Wirkung aufgrund der homologen Aufbereitung fragwürdig.

### 5.4 Defektheilung

Im Verlauf der Knochendefektheilung *post implantationem* sind drei aufeinander folgende Phasen zu unterscheiden: Die innerhalb der ersten Tage eintretende Entzündungsphase wird gefolgt von der drei Wochen bis vier Monate dauernden Reparaturphase, die schließlich in die Phase des *Remodellings* mündet (Cruess und Dumont 1975; Einhorn 2005).

20 Tage *post implantationem* finden sich in den untersuchten Defekten der Mini-Schweine neben Osteoblasten und multinukleären Riesenzellen, die im Granulationsgewebe lokalisierten Fibroblasten. Aufgrund des zum Untersuchungszeitpunkt vorliegenden charakteristischen Zellbildes findet die Untersuchung der Defekte innerhalb der Reparaturphase statt. Diese wird durch die Tätigkeit von spezialisierten Zellen, die für die reparativen und regenerativen Prozesse der Knochendefektheilung verantwortlich sind, geprägt (McKibbin 1978; Barnes et al. 1999). Dazu zählen außer Osteoblasten, Chondroblasten die zahlreich im Granulationsgewebe lokalisierten Fibroblasten (Schindeler et al. 2008). Im Gegensatz zu Chondroblasten konnten sowohl Osteoblasten als auch Fibroblasten in der vorliegenden Studie nachgewiesen werden. Das Vorhandensein von Geflechtknochen und das gleichzeitige Fehlen von Chondroblasten zum Untersuchungszeitpunkt spricht für den Prozess der desmalen Ossifikation im Bereich der Defektregion. Charakteristisch für das im Rahmen der desmalen Ossifikation eintretende direkte Entstehen von Knochen ohne vorherige Knorpelbildung ist die Differenzierung mesenchymaler Progenitorzellen zu knochenbildenden Osteoblasten (Konrads 2008). Die Osteoblasten produzieren zunächst eine unverkalkte Knochenmatrix, in der die groben, ca. 30 µm dicken Kollagenfaserbündel irregulär angeordnet sind (Weiner und Wagner 1998). Der gebildete Geflechtknochen stellt eine temporäre Struktur dar, die im weiteren Verlauf der Knochendefektheilung durch den stabileren Lamellenknochen ersetzt wird (Einhorn 2005).

In den Gruppen I/PRP- und II/PRP+ umgibt der neugebildete Geflechtknochen die Oberflächen des Hydroxylapatits. Die Ostimoberflächen dienen dem neugebildeten Knochen somit als räumliche Leitschiene, was für die osteokonduktive Eigenschaft des Knochenersatzstoffes spricht. Ein großer Teil des neugebildeten Knochens ist entlang

der Bohrkante zu identifizieren. Hier lagert sich der Geflechtknochen dem lamellären Knochen an. Die Knochenneubildung erfolgt somit ausgehend vom vaskularisierten Knochenlagen und kann als eine Art appositionelles Wachstum bezeichnet werden.

Neben den im Bindegewebe ubiquitär vorkommenden Fibroblasten konnten im Granulationsgewebe der Knochendefekte der Gruppen I/PRP-, II/PRP+ und III/Leerdeckel Myofibroblasten beobachtet werden.

Im Rahmen der vorliegenden Untersuchung erfolgte die Detektion der Myofibroblasten auf immunhistochemischer Ebene basierend auf der Antikörper-Reaktion gegen  $\alpha$ -*smooth muscle actin* (Iwasaki et al. 1987; Fuchs und Cleveland 1998). Diese Mikrofilament – Komponente der Myofibroblasten wird zeitlich begrenzt synthetisiert (Sappino et al. 1990).

Als morphologische Merkmale der wundheilungsrelevanten Myofibroblasten gelten, neben ihrer spindelförmigen Gestalt, lang auslaufende Fortsätze, die parallel zur Längsachse angeordnete Aktinfilamente besitzen. Bei der ultrastrukturellen Untersuchung fallen darüber hinaus subplasmalemmal lokalisierte Filamentplaques auf, die in transmembranöser Ausrichtung bis in die extrazelluläre Matrix des Interzellularraumes zu verfolgen sind. Diese werden als *Fibronexus* bezeichnet und stellen ein wichtiges ultrastrukturelles Charakteristikum der Myofibroblasten dar (**Abbildung 22**). Ihre Funktion ist die Zell – Matrix Verbindung, durch die sie befähigt werden mechanische Kräfte auf ihre Umgebung zu übertragen (Dustmann 2007). In Kombination mit der Eigenkontraktilität der Myofibroblasten bewirkt diese Zell – Matrix Verbindung eine Förderung der Wundheilung, indem eine Wundverkleinerung erzielt wird. Gleichzeitig wird die Formation und Reparatur der extrazellulären Matrix sowie Proliferation und Differenzierung von Epithelien, Parenchym, Gefäßen und Nervengewebe im Rahmen der Wundheilung beeinflusst (Gabbiani et al. 1972; Powell et al. 1999).

Des Weiteren steht die Produktion von Matrixmolekülen wie Kollagen, Glykosaminoglykanen, Tenascin und Fibronectin durch die Myofibroblasten, die Sekretion inflammatorischer Zytokine sowie von Chemokinen, Wachstumsfaktoren und Entzündungsmediatoren im Vordergrund der knöchernen Defektheilung (Powell et al. 1999) (**Tabelle 1**).

Das Auftreten der Myofibroblasten könnte aber auch in einer, im Rahmen der Phylogenese auftretenden Homologie der Knochendefektheilung zur Wundheilung begründet liegen. Dies würde für einen phylogenetisch konservierten Ablauf der Heilung, unabhängig von dem betroffenen Gewebe, sprechen.

In Bezug auf das räumliche Verteilungsmuster konnte in den Gruppen I/PRP- und II/PRP+ ein vermehrtes Vorkommen von Myofibroblasten innerhalb des Granulationsgewebes nahe der Bohrkante der Defekte beobachtet werden. Im Unterschied dazu sind die detektierten Myofibroblasten in der Gruppe III/Leerdefekte gleichmäßig innerhalb des Granulationsgewebes verteilt. Die externe Zuführung von homologen thrombozytären Wachstumsfaktoren kommt in diesem Zusammenhang nicht als Ursache in Betracht. Möglicherweise bildet der in die Defekte implantierte Knochenersatzstoff eine mechanische Barriere für das sich bildende Granulationsgewebe und die einsprossenden Gefäße, so dass sich Myofibroblasten innerhalb des Granulationsgewebes nur nahe des Lagerknochens ansiedeln. Das Fehlen von Granulationsgewebe in den Defektzentren der untersuchten Präparate der Gruppen I/PRP- und II/PRP+ und das gleichzeitige, bis in das Defektzentrum reichende, Vorkommen von Granulationsgewebe in der Gruppe III/Leerdefekte stützt die Annahme über den maßgeblichen Einfluss des Knochenersatzstoffes als räumliche Barriere und in Bezug auf das räumliche Verteilungsmuster der im Granulationsgewebe detektierten Myofibroblasten.

Das vermehrte Auftreten der Myofibroblasten im Bereich der Bohrkante in den Gruppen I/PRP- und II/PRP+ korrespondiert räumlich mit den immunhistochemisch detektierten Kollagen-I positiven Arealen. Eine Stimulation der extrazellulären Matrix Produktion und der Vaskularisierung scheint somit in Zusammenhang mit dem Auftreten der Myofibroblasten zu stehen.

TGF- $\beta$  und PDGF stellen bezüglich der Differenzierung von Fibroblasten zu Myofibroblasten wichtige Faktoren dar (Rubbia-Brandt et al. 1991, Serini und Gabbiani 1996; Clouthier et al. 1997; Powell et al. 1999). So wurde die induktive Funktion von TGF- $\beta$  1 auf die Myofibroblastendifferenzierung bereits *in vitro* gezeigt (Desmoulière et al. 1993; Ronnov-Jessen und Petersen 1993). Die Myofibroblastenformation induziert durch TGF- $\beta$ 1 und - $\beta$ 2 wurde durch *in vivo* Untersuchungen ebenfalls bestätigt (Serini und Gabbiani 1999).

### 5.5 Schlussfolgerungen

Die im Vergleich zu der Gruppe I/PRP-, deutlich geringere Knochenneubildung der Gruppe II/PRP+ am 20. Tag *post implantationem* kann auf die Applikation der im homologen PRP enthaltenen Wachstumsfaktoren zurückgeführt werden. Die mit einer verstärkten Fremdkörperreaktion einhergehende reduzierte Knochenneubildung in der Gruppe II/PRP+ gibt Hinweis auf eine verzögerte Knochendefektheilung. Bezüglich der Granulationsgewebebildung kann auf qualitativer Ebene kein Unterschied zwischen den untersuchten Gruppen festgestellt werden.

Aufgrund der Ergebnisse der vorliegenden Studie sollte der Verwendung von autologem PRP der Vorzug gegeben werden. Unter Verwendung von autologem PRP konnte in zahlreichen Studien ein die Knochenneubildung fördernder Einfluss beobachtet werden (Zechner et al. 2003; Fontana et al. 2004).

Dennoch sollte der Einsatz von PRP, unabhängig seines Ursprungs, aufgrund der nicht vorhersehbaren langfristigen Auswirkungen kritisch betrachtet werden. Eine eventuelle Schädigung des Patienten, in Form einer gestörten Knochendefektheilung kann als Folge der Applikation von Wachstumsfaktoren im Rahmen der Therapie von Knochendefekten nicht ausgeschlossen werden. Ein toxisches Potenzial von, in hohen Dosen applizierten Wachstumsfaktoren, ist dokumentiert (Sprutacz 2005; Ranly et al. 2007).

### 6. Zusammenfassung

In der vorliegenden tierexperimentellen Studie am Miniaturschwein wurde die Osseointegration eines nanopartikulären Knochenersatzstoffes auf Hydroxylapatitbasis alleine und in Kombination mit homologen thrombozytären Wachstumsfaktoren in der Frühphase der Knochendefektheilung untersucht.

Dazu wurde bei 26 männlichen Miniaturschweinen der Rasse Mini-Lewe jeweils ein standardisierter Knochendefekt mit dem DBCS-System (Diamond Bone Cutting System) in der Interkondylarregion des femoropatellaren Gleitlagers angelegt. Es wurden drei Gruppen gebildet. In der Gruppe I/PRP-, bestehend aus 11 Tieren, erfolgte die Defektauffüllung jeweils mit dem Knochenersatzstoff Ostim®. Die Defekte der Gruppe II/PRP+ (n=11) wurden mit einer Kombination aus Ostim® und PRP befüllt, während die dritte Gruppe (n=4) als Kontrollgruppe diente, und die Defekte nicht befüllt wurden. Die Explantation der operierten distalen Femura wurde am 20. Tag *post implantationem* durchgeführt.

Der Entnahme von jeweils 250 ml Vollblut von 6 zufällig ausgewählten Tieren folgte mittels fraktionierter Zentrifugation die Gewinnung von Plasma, aus dem das im vorliegenden Versuch verwendete homologe PRP hergestellt wurde. Zu den mittels ELISA nachgewiesenen Wachstumsfaktoren zählten TGF  $\beta$ -1, bFGF und PDGF-BB.

Die nach der Explantation aufbereiteten Gewebe-Implantat-Proben fanden Eingang in histologische, immunhistochemische und transmissionselektronenmikroskopische Untersuchungen.

Hinsichtlich der Art und der Morphologie der in den Defektregionen lokalisierten Zellen konnten in den Gruppen I/PRP- und II/PRP+ lichtmikroskopisch als auch transmissionselektronenmikroskopisch keine Unterschiede festgestellt werden. Innerhalb der Gruppe III/Leerdeffekte konnten im Gegensatz zu den Gruppen I/PRP- und II/PRP+ weder Makrophagen noch mehrkernige Riesenzellen beobachtet werden. Der gewählte Untersuchungszeitpunkt 20 Tage *post implantationem* spiegelt in allen drei Gruppen die Phase der Reparatur wider.

Die vergleichende lichtmikroskopische Untersuchung der Gruppen I/PRP- und II/PRP+ dokumentierte hinsichtlich der Knochenneubildung einen deutlich höheren Anteil und Verzweigungsgrad an neugebildeten Knochenbälkchen in der Tiergruppe ohne einen Zusatz von homologem PRP (Gruppe I/PRP-). Bestätigt wird das Ergebnis der lichtmikroskopischen Untersuchung durch die computergestützte quantitative Auswertung immunhistochemisch mittels Kollagen I detektierten Geflechtknochen-Areale.



Als mögliche Ursache für die verzögerte Knochenneubildung in der Gruppe II/PRP+ muss der homologe Ursprung des verwendeten PRPs in Betracht gezogen werden. Eine durch das PRP forcierte Entzündungsreaktion innerhalb der Defektbereiche scheint sich negativ auf den Verlauf der Knochendefektheilung auszuwirken. Die innerhalb der Defekte der Gruppe II/PRP+ vermehrt lokalisierten Makrophagen untermauern das verstärkte Ausmaß der Entzündungsreaktion innerhalb dieser Gruppe. Das Vorliegen eines *Circulus vitiosus* im Sinne einer weiteren sich anschließenden Makrophagenrekrutierung und Zytokinausschüttung liegt nahe.

Innerhalb des untersuchten Granulationsgewebes im Bereich der Defektregionen der drei Gruppen konnten Myofibroblasten nachgewiesen werden, die bisher im Zuge der Wundheilung beschrieben wurden. Als ein entscheidendes Charakteristikum dieses fibroblastenähnlichen Zelltypes gelten auf ultrastruktureller Ebene von intra- nach extrazellulär ausgerichtete Filamentstrukturen, die als *Fibronexus* bezeichnet werden. Ein weiteres Merkmal der Myofibroblasten stellen die parallel zur Längsachse angeordneten Aktin-Filamente dar.

Die immunhistochemische Untersuchung mittels Anti *smooth-muscle actin*-Antikörpern zeigte in den Gruppen I/PRP- und II/PRP+ keinen Unterschied im räumlichen Verteilungsmuster der detektierten Myofibroblasten, die sich in der Defektperipherie konzentrierten. In Gruppe III/Leerdefekte wurde im Unterschied zu den Gruppen I/PRP- und II/PRP+ eine homogene Verteilung der Myofibroblasten innerhalb des Granulationsgewebes verzeichnet.

### 7. Summary

The current experimental study in Minipigs analyses the osseointegration of a nanoparticulate hydroxyapatite alone and in combination with homologous platelet-rich plasma (PRP) during the early phase of bone defect healing.

Using the DBCS-System (Diamond Bone Cutting System) standardized bone defects were created in the intercondylar region of twenty-six male "Lewe" minipigs. Forming three groups, the defects of group I/PRP- (n=11) were filled with Ostim®, the defects of group II/PRP+ (n=11) were filled with Ostim® in combination with PRP. The defects of group III/control group (n=4) were left empty. The explantation of the treated distal femura followed 20 days later.

By using several centrifugation steps PRP was isolated from 250 ml blood from six randomly selected minipigs (250 ml each). Detection of growth factors such as TGF- $\beta$ -1, VEGF, bFGF, PDGF AB and BB was performed by ELISA.

After explantation of the tissue implant specimen light microscopical, immunohistochemical and transmission electron microscopical methods were performed.

Regarding cell-types and their morphology in the defects of group I/PRP- and II/PRP+ during the phase of repair, no difference was shown. In contrast, in group III/control group neither macrophages nor giant cells were seen.

Comparative light microscopical examination, underlined by immunohistochemical analysis, of group I and II showed a large increase of newly formed bone in group I.

It cannot be excluded that the delayed formation of new bone in group II/PRP+ is related to the origin of the homologous PRP. Forced inflammation by PRP seems to affect the ingrowth of new formed bone adversely. Regarding the increase of the population of macrophages in group II, the forced inflammation in this group seems to be distinct. Expecting a following recruitment of macrophages combined with the expression of interleukines a vicious circle is to be suspected.

Within the granulation tissue of the created defects myofibroblasts could be detected. As yet this cell type was associated preferentially with wound healing. Ultrastructural details called fibronexus and actin-filaments located parallel to the centre line of the cell characterize this type of cells.

## Summary

---

Regarding the formation of myofibroblasts, the immunohistochemical examination using anti smooth-muscle actin-antibodies demonstrates no difference in the groups I and II. By contrast Myofibroblasts in group III/control group were located homogeneously within the granulation tissue.

## 8. Literaturverzeichnis

**Abdennagy B., Hott M., Marie P. J. (1992).** Effects of platelet-derived growth factor on human and mouse osteoblastic cells isolated from the trabecular bone surface. *Cell. Biol. Int. Rep.* 16(3):235-247.

**Aghaloo T. L., Moy P. K., Freymiller E. G. (2002).** Investigations of platelet-rich plasma in rabbit cranial defects: a pilot study. *J. Oral Maxillofac. Surg.* 60:1176-1181.

**Aghaloo T. L., Moy P. K., Freymiller E. G. (2004).** Evaluation of platelet-rich plasma in combination with anorganic bovine bone in the rabbit cranium: a pilot study. *Int. J. Oral Maxillofac. Implants* 19:59-56.

**Albee F. H. (1915).** *Bone-Graft Surgery*, W. B. Saunders Company, Philadelphia, Pennsylvania, S. 145, 165-166, 171, 368-369.

**Alt V., Bitschnau A., Österling J., Sewing A., Meyer C., Kraus R., Meissner S. A., Wenisch S., Domann E., Schnettler R. (2006).** The effects of combined gentamicin-hydroxyapatite coating for cementless joint prostheses on the reduction of infection rates in a rabbit infection prophylaxis model. *Biomaterials* 17:4627-4634.

**Amling M., Schilling A. F., Haberland M., Rueger J. M. (2001).** Leptin: factor in the central nervous system regulation of bone mass. Development of a new understanding of bone remodeling, skeletal reconstruction, skeletal preservation, and skeletal repair. *Orthopäde.* 30(7):418-24.

**Anderson J. M. (2000).** Multinucleated giant cells. *Curr. Opin. Hematol.* 7:40-47.

**Anderson J. M. (2001).** Biological responses to materials. *Annu. Rev. Mater. Res.* 31:81-110.

**Anderson J. M., Rodriguez A., Chang D. T. (2007).** Foreign body reaction to biomaterials. *Semin. Immunol.* 1:1-2.

**Ankin H. J., Doppelt S. H., Sullivan T. R. (1982).** Osteoarticular and intercalary allograft transplantation in the management of malignant tumors of bone. *Cancer* 50:613.

**Annersten S. (1940).** Experimentelle Untersuchungen über die Osteogenese und die Biochemie des Frakturkallus. *Acta. Chir. Scand.* 84:60.

- Arpornmaeklong P., Kochel M., Depprich R., Kübler N. R., Würzler K. K. (2004).** Influence of platelet-rich plasma on osteogenic differentiation of rat bone marrow stromal cells. An in vitro study. *Int. J. Oral Maxillofac. Surg.* 33:60-70.
- Auguste P., Javerzat S., Bikvalvi A. (2003).** Regulation of vascular development by fibroblast growth factors. *Cell. Tissue Res.* 314(1):157-166.
- Auxhausen G. (1907).** Histologische Untersuchungen bei Knochentransplantationen am Menschen. *Dtsch. Z. Chir.* 91:388.
- Barnes G. L., Kostenuik P. J., Gerstenfeld L. C., Einhorn T. A. (1999).** Growth Factor Regulation of Fracture Repair. *J. Bone Miner. Res.* 14:1805-1815.
- Barth A. (1893).** Über histologische Befunde nach Knochenimplantationen. *Langenbecks Arch. klin. Chir.* 46:409.
- Baylink D. J., Finkelmann R. D., Mohan S. (1993).** Growth factors to stimulate bone formation. *J. Bone Miner. Res.* 8:565-572.
- Berghaus A. (1992).** Alloplastische Implantate in der Kopf- und Halschirurgie. *Eur. Arch. Otorhino.* 53-95.
- Birnbaum R. S., Bowsher R. R., Wiren K. M. (1995).** Changes in IGF-I and -II expression and secretion during the proliferation and differentiation of normal rat osteoblasts. *J. Endocrinol.* 144: 251- 259.
- Bland Y. S., Critchlow M. A., Ashhurst D. E. (1995 ).** Exogenous fibroblast growth factors - 1 and - 2 do not accelerate fracture healing in the rabbit. *Acta. Orthop. Scand.* 66:543-548.
- Blendinger C. (2002).** Experimentelle Untersuchungen zur Überbrückung eines knöchernen Defekts beim Kaninchen mit einer Hydroxylapatitkeramik in Kombination mit oder ohne Wachstumsfaktor bFGF (basic Fibroblast Growth Factor). Justus-Liebig-Universität Gießen, Fachbereich Veterinärmedizin.
- Bloemers F. W., Blokhuis T. J., Patka P., Bakker F. C., Wippermann B. W., Haarmann H. J. (2003).** Autologous bone versus calcium-phosphate ceramics in treatment of experimental bone defects. *J. Biomed. Mater. Res.* 66 B:526-531.
- Blumenfeld I., Srouji S., Lanir Y., Laufer D., Livne E. (2002).** Enhancement of bone defect healing in old rats by TGF-beta and IGF-1. *Exp. Gerontol.* 37(4):553-65.

**Börner M. (1985).** Experimentelle Grundlagen und klinische Erfahrungen bei der Anwendung allogener Spongiosa. *Akt. Traumatol.* 15:210-218.

**Böstman O., Pääväranta U., Partio E. K. (1992).** Degradation and tissue replacement of an absorbable polyglycolic screw in the fixation of rabbit femoral osteotomies. *J. Bone Joint Surg. Am.* 74:1021-1031.

**Böstman O. M., Pihlajamäki H. K. (1998).** Late foreign-body reaction to an intraosseous bioabsorbable polylactic acid screw. A case report. *J. Bone Joint Surg. Am.* 80:1791-1794.

**Bosworth D. M. (1955).** Repair of hernia through iliac-crest defects. *J. Bone J. Surg.* 37A(5):1069-1073.

**Braun W., Ruter A. (1998).** Fracture healing. Morphologic and physiologic aspects. *Unfallchirurg* 99:59-67.

**Breusch S. (2005).** Tierexperimentelle Untersuchung der Wirksamkeit zweier Kalziumphosphat Knochenersatzstoffe im knöchernen Lager. Ruprecht-Karls Universität Heidelberg. Fachbereich Humanmedizin. Diss. 2005.

**Brodbeck W. G., Shive M. S., Colton E., Ziats N. P., Anderson J. M. (2002).** Interleukin-4 inhibits tumor necrosis factor-alpha induced and spontaneous apoptosis of biomaterial-adherent macrophages. *J. Lab. Clin. Med.* 139:90-100.

**Broxmeyer H. E., Cooper S., Li Z. H., Lu, Song H. Y., Kwon B. S., Warren R. E., Donner D. B. (1995).** Myeloid progenitor cell regulatory effects of vascular endothelial cell growth factor. *Int. J. Hematol.* 62:203-215.

**Buchholz R., Carlton A., Holmes R. (1987).** Hydroxylapatite and tricalcium phosphate bone graft substitutes. *Orthop. Clin. North. Am.* 18(2):323-334.

**Buchholz R., Carlton A., Holmes R. (1989).** Interporous hydroxyapatite as a bone graft in tibial plateau fractures. *Clin. Orth. Rel. Res.* 240:53-62.

**Büsser F. (2004).** Bestimmung der Expression von Adhäsionsmolekülen auf Fibroblasten aus Granulationsgewebe regulär heilender und chronischer Wunden mittels Fluoreszenz Aktiviertem Cell Sorting. Medizinische Fakultät der Universität des Saarlandes. Diss. 2004.

**Bush L. F., Garber C. Z. (1948).** The bone bank. *JAMA* 588-594.

- Carlson N. E., Roach R. B. Jr. (2002).** Platelet-rich plasma: clinical applications in dentistry. *J. Am. Dent. Assoc.* 133:1383-1386.
- Case R. M., Eisner D., Gurney A., Jones O., Muallem S., Verkhatsky A. (2007).** Evolution of calcium homeostasis: From birth of the first cell to an omnipresent signalling system. *Cell Calcium.* 42:345-50.
- Center of Disease Control Georgia/Atlanta (1988).** Transmission of HIV through bone transplantation: case report and public health recommendations. 37:597-599.
- Center of Disease Control Georgia/Atlanta (1989).** Creutzfeldt-Jacob disease in a second patient who received a cadaveric dura mater graft. *JAMA* 261 (8).1118.
- Centrella M., McCarthy T. L., Canalis E. (1991).** Transforming growth factor-beta and remodeling of bone. *J. Bone Joint. Surg. Am.* 9:1418-1428.
- Choi B. H., Im C. J., Huh J. Y., Suh J. J., Lee S. H. (2004).** Effect of platelet-rich plasma on bone regeneration in autogenous bone graft. *Int. J. Oral Maxillofac. Surg.* 33:56-59.
- Chung C. P., Kim D. K., Park Y. J., Nam K. H., Lee S. J. (1997).** Biological effects of drug-loaded biodegradable membranes for guided bone regeneration. *J. Periodontal Res.* 32:172-175.
- Clauss M., Weich H., Breier G., Knies U., Röckl W., Waltenberger J., Risau W. (1996).** The vascular endothelial growth factor receptor Flt-1 mediates biological activities. Implications for a functional role of placenta growth factor in monocyte activation and chemotaxis. *J. Biol. Chem.* 271:17629-17634.
- Clouthier D. E., Comerford S. A., Hammer R. E. (1997).** Hepatic fibrosis, glomerulosclerosis, and a lipodystrophy-like syndrome in PEPCK-TGF- $\beta$ 1 transgenic mice. *J. Clin. Invest.* 100:2697-2713.
- Contzen H. (1989).** Knochentransplantation – Indikation und Technik. *Unfallchirurg* 15:184-188.
- Cornell C. N., Lane J. M. (1992).** Newest factors in fracture healing. *Clin. Orthop.* 277:297-311.
- Cruess R. L., Dumont J. (1975).** Fracture healing. *Can. J. Surg.* 18:403-413.
- Curtis B. F. (1893).** Cases of bone implantation and transplantation for cyst of tibia osteomyelitis cavities and ununited fractures. *Am. J. Med.* 106:30.



- De Boer H. (1989).** Early research on bone transplantation. In: Aebi M, Regazzoni P (eds) Bone transplantation. Springer, Berlin Heidelberg New York Tokyo. 7-19.
- Deckers M. M., Karperien M., van de Bent C., Yamashita T., Papapoulos S. E., Lowik C. W. (2000).** Expression of vascular endothelial growth factors and their receptors during osteoblast differentiation. *Endocrinology*. 141:1667-1674.
- De Groot K. (1980).** Bioceramics consisting of calcium phosphate salts. *Biomater.* 1:47-50.
- Denissen H. W., Van Dijk H. J. A., De Groot K. (1980).** Mechanical properties of biomaterials. Hastings GW, Williams DF, eds. Mechanical properties of biomaterials. Chichester: Wiley & Sons. 1988:55-61.
- Desmoulière A., Geinoz A., Gabbiani F., Gabbiani G. (1993).** Transforming growth factor- $\beta$ 1 induces  $\alpha$ -smooth muscle actin expression in granulation tissue myofibroblasts and in quiescent and growing cultured fibroblasts. *J. Cell. Biol.* 122:103-111.
- DiCorleto P. E., Bowen-Pope D. F. (1983).** Cultured endothelial cells produce a platelet-derived growth factor-like protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 80(7):1919-1923.
- Dingeldein E., Donath K., Wahlig H., Bauer H. J. (1994).** Einheilung einer porösen Hydroxylapatit-Keramik biologischer Herkunft im spongiösen Knochenlager von Kaninchen. *Osteosynthese Internat.* 2:112-116.
- Dressmann H. (1892).** Ueber Knochenplombierung bei hohlförmigen Defekten des Knochens. *Beitr. Klin. Chir.* 9:804- 810.
- Dugrillon A., Eichler H., Kern S., Klüter H. (2002).** Autologous concentrated platelet-rich plasma (CPRP) for local application in bone regeneration. *Int. J. Oral. Maxillofac. Surg.* 31:615-619.
- Dustmann M. (2007).** Histologische und immunhistologische Untersuchungen zum Transplantat-Remodeling nach Ersatz des vorderen Kreuzbandes mit freiem autologen und allogenen Sehnen transplantat. Medizinische Fakultät Charité– Universitätsmedizin Berlin. Diss. 2007.
- Eggl P.S., Muller W., Schenk R. K. (1988).** Porous hydroxyapatite and tricalcium phosphate cylinders with two different pore size ranges implanted in the cancellous bone of rabbits. A comparative histomorphometric and histologic study on bony ingrowth and implant substitution. *Clin. Orthop.* 232:127-38.

**Einhorn T. A. (2003).** Clinical Applications of Recombinant Human BMPs: Early Experience and Future Development. *J. of Bone and Joint Surg.* 85:82-88.

**Einhorn T. A. (2005).** The science of fracture healing. *J. Orthop. Trauma.* 19: S4-6.

**Eyre-Brook A. L. (1984).** The periosteum: its function reassessed. *Clin. Orthop. Relat. Res.* 300-307.

**Faldini C., Moroni A., Rocca M. (2001).** The effect of blood contact on the setting and the osteointegration ability of the calcium phosphate bone cement. Experimental study in rabbits. *Bioceramics.* 13:805-8.

**Flatley T., Lynch K., Benson M. (1983).** Tissue response to implants of calciumphosphate ceramic in the rabbit spine. *Clin. Orthop. Rel. Res.* 179:246-252.

**Fleming J. E., Cornell C. N., Muschler G. F. (2000).** Bone cells and matrices in orthopedic tissue engineering. *Orthop. Clin. North. Am.* 31:357- 374.

**Fontana S., Olmedo D. G., Linares J. A., Guglielmotti M. B., Crosa M. E. (2004).** Effect of platelet-rich plasma on the peri-implant bone response. An experimental study. *Implant. Dentistry.* 13(1):73-78.

**Frame J. W. (1987).** Ridge augmentation using solid and porous hydroxylapatite with and without autogenous bone or plaster. *J. Oral. Maxillofac. Surg.* 45:771-777.

**Fraser R. K., Cole W. G. (1992).** Osteolysis after biodegradable pin fixation of fractures in children. *J. Bone Joint. Surg.* 74:929-930.

**Frokjaer J., Moller B. N. (1992).** Biodegradable fixation of ankle fractures. Complications in a prospective study of 25 cases. *Acta. Orthop. Scand.* 63:434-436.

**Fuchs E., Cleveland D. W. (1998).** A structural scaffolding of intermediate filaments in health and disease. *Science.* 279:514-519.

**Furuya S., Nagata R., Ozaki Y., Furuya K., Nakayama T., Nagahama M. (1997).** A monoclonal antibody to astrocytes, subepithelial fibroblasts of small intestinal villi and interstitial cells of the myometric plexus layer. *Anat. Embryol.* 195:113-126.

**Gabbiani G., Hirschel B. J., Ryan G. B., Statkov P. R., Majno G. (1972).** Granulation tissue as a contractile organ: A study of structure and function. *J. Exp. Med.* 135:719-734.

- Gabbiani G. (1998).** Evolution and clinical implications of the myofibroblast concept. *Cardiovascular Research.* 38:545-548.
- Garlipp M. (1979).** Spongiosaentnahme am Beckenkamm und Meralgia paraesthetica. *Zentralbl. Chir.* 104(10):658-660.
- Gerlach K. L., Niehues D. (2007).** Die Behandlung der Kieferzysten mit einem neuartigen nanopartikulären Hydroxylapatit. *Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie.* 11:131-137.
- Gerwing M., Michele U., Wenz R., Schminke E. (2001).** Experiences with nanocrystalline calcium-phosphate-cement in mediumgraded and extreme bone defects in dogs and cats. *Abstracts FECAVA Congress.* 30.
- Gerwing M., Michele U., Wenz R. (2003).** Erfahrungen und Perspektiven beim Einsatz von Kalziumphosphat-Zement zur Förderung der Frakturheilung bei Problempatienten. *Tierärztl. Praxis.* 31(K):1-8.
- Giannobile W. V., Hernandez R. A., Finkelmann R. D., Ryan S., Kiritsy C. P., D'Andrea M., Lynch S. E. (1996).** Comparative effects of platelet-derived growth factor-BB and insulin-like growth factor-1, individually and in combination, on periodontal regeneration in *Macaca fascicularis*. *J. Perodontal Res.* 31(5):301-312.
- Goldhaber P. (1961).** Osteogenic induction across millipore filters in vivo. *Scienc.* 133:2065.
- Gollwitzer M. (1986).** Homologe Spongiosatransplantation. *Akt. Traumatol.* 16:153-157.
- Greenwald A. S., Boden S. D., Goldberg V. M., Yaszemski M., Heim C. (2006).** Bone-Graft Substitutes: Facts, Fictions & Applications. *American Academy of Orthopaedic Surgeons, 73rd Annual Meeting, Chicago Illinois.*
- Gretzer C., Emanuelsson L., Liliénsten E., Thomsen P. (2006).** The inflammatory cell influx and cytokines changes during transition from acute inflammation to fibrous repair around implanted materials. *J. Biomater. Sci. Polym.* 17(6): 669–687.
- Grob D. (1989).** Autologous bone grafts: problems at the donator site. In: Aebi M, Regazzoni P (Hrsg.) *Bone transplantation.* Springer , Berlin Heidelberg New York.

- Gruber R., Karreth F., Kandler B., Fuerst G., Rot A., Fischer M. B., Watzek G. (2004).** Platelet-released supernatants increase migration and proliferation, and decrease osteogenic differentiation of bone marrow-derived mesenchymal progenitor cells under in vitro conditions. *Platelets*. 15:29-35.
- Günther K. P., Scharf H.-P., Pesch H.-J., Puhl W. (1998).** Osteointegration of different bone substitute materials in an experimental model. *Orthopäde*. 23:106-117.
- Gürtler L. (1994).** Blood-borne viral infections. *Blood Coagulation and Fibrinolysis*. Center of Disease Control Atlanta/Georgia. 5(3):5-10.
- Haas N. P. (2000).** Callus modulation fiction or eality? *Chirurg*. 71:987-988.
- Habibovic P., de Groot K. (2007).** Osteoinductive biomaterials – properties and relevance in bone repair. *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*. 1:25–32.
- Härtter S., Dingeldein E., Bonath K. H. (1998).** Knochenersatzstoffe - Therapeutika der Zukunft in der Kleintierpraxis. *Kleintierpraxis*. 11:803-870.
- Hauschild G., Bader A., Uhr G., Fehr M. (2001a).** Bioartificial bone grafting using  $\beta$ -Tricalciumphosphate ad modum Cerasorb® - First clinical experiences. Abstract FECAVA Congress. 37.
- Hauschild G., Uhr G., Bader A. (2001b).** Einsatz des bioartifiziiellen Knochenersatzstoffes  $\beta$ -Tricalciumphosphat zur chirurgischen Konsolidierung einer Pseudarthrose. *Kleintierpraxis*. 46:497-505.
- Hauschild G., Merten H.-A., Uhr G., Deivick A., Meyer-Lindenberg A., Fehr M. (2005).** Bioartificial bone grafting: Tarsal joint fusion in a dog using a bioartificial composite bone graft consisting of  $\beta$ -tricalciumphosphate and platelet rich plasma – a case report. *Vet. Comp. Orthop. Traumatol*. 18:1-3.
- Hauschka P. V., Mavrakos A. E., Lafrati M. D. (1986).** Growth factors in bone matrix, isolation of multiple types by affinity chromatography on heparin-sepharose. *J. Biol. Chem*. 261:12665-12674.
- Hayden J. M., Mohan S., Baylink D. J. (1995).** The insulin-like growth factor system and the coupling of formation to resorption. *Bone* 17 (Suppl):93-98.
- Hende L. L. (1989).** Bioceramics and the origin of life. *J. Biomed. Mater. Res*. 23:685-703.

**Hoch D. (2004).** Verkleinerung von Ohrdikaloperationshöhlen mit phasenreiner  $\beta$ -Trikalziumphosphatkeramik. Medizinische Fakultät der Ruhr-Universität-Bochum. Diss. 2004.

**Hock J. M., Centrella M., Canalis E. (1988).** Insulin-like growth factor 1 has independent effects on bone matrix formation and cell replication. *Endocrinology*. 122:245-260.

**Hock J. M., Canalis E. (1994).** Platelet-derived growth factor enhances bone cell replication, but not differentiated function of osteoblasts. *Endocrinology*. 134(3):1423-1428.

**Holmes R. E. (1979).** Bone regeneration within a coralline hydroxylapatite implant. *Plast. Reconstr. Surg.* 63:626-633.

**Holmes R., Mooney V., Buchholz R. (1984).** Porous hydroxylapatite as a bone graft substitute in metaphyseal defects: a histometric study. *Clin Orthop.* 188:252-262.

**Hosokawa R., Kikuzaki K., Kimoto T., Matsuura T., Chiba D., Wadamato M., Sato Y., Maeda M., Sano A., Akagawa Y. (2000).** Controlled local application of basic fibroblast growth factor (FGF-2) accelerates the healing of GBR. *Clin. Oral Implants Res.* 11:345-353.

**Inclan A. (1942).** The use of preserved bone graft in orthopaedic surgery. *J. Bone Jt. Surg. A.* 24:81.

**Inui K., Maeda M., Sano A., Fujioka K., Yutani Y., Sakawa A., Yamano Y., Kato Y., Koike T. (1998).** Local application of basic fibroblast growth factor minipellets induces the healing of segmental bony defects in rabbits. *Calcif. Tissue Int.* 63:490-495.

**Iwasaki H., Isayama T., Ichiki T., Kikuchi M. (1987).** Intermediate filaments of myofibroblasts. Immunochemical and immunocytochemical analyses. *Pathol. Res. Pract.* 182:248-254.

**Jakse N., Tangl S., Gilli R., Berghold A., Lorenzoni M., Eskici A., Haas R., Pertl C. (2003).** Influence of PRP on autogenous sinus grafts. *Clin. Oral Implants Res.* 14:578-583.

**Jensen S. S., Broggini N., Weibrich G., Hjorting-Hansen E., Schenk R., Buser D. (2005).** Bone regeneration in standardised bone defects with autografts or bone substitutes in combination with platelet concentrate: a histologic and histomorphometric study in the mandible of minipigs. *Int. J. Maxillofac. Implants.* 20:703-712.

**Kaneda K., Ekataksin W., Sogawa M., Matsumura A., Cho A., Kawada N. (1998).** Endothelin-1-induced vasoconstriction causes a significant increase in portal pressures of rat liver: localized constrictive effect on the distal segment of preterminal portal venules as revealed by light and electron microscopy and serial reconstruction. *Hepatology*. 27:735-747.

**Kato T., Kawaguchi H., Hanada K., Aoyama I., Hiyama Y., Nakamura T., Kuzutani K., Tamura M., Kurokawa T., Nakamura K. (1998).** Single local injection of recombinant fibroblast growth factor-2 stimulates healing of segmental bone defects in rabbits. *J. Orthop. Res.* 16:654-659.

**Katthagen B. D. (1986).** Knochenregeneration mit Knochenersatzmaterialien. *Hefte zur Unfallheilkunde*. 178:1-163.

**Kent J. N., Zide M. F., Kay J. F., Jarcho M. (1987).** Hydroxylapatite blocks and particles as bone graft substitutes in orthognatic and reconstructive surgery. *J. Oral Maxillofac. Surg.* 44:579-605.

**Kevy S. V., Jacobson M. S. (2004).** Comparison of methods for point of care preparation of autologous platelet gel. *Extra Corpor. Technol.* 36(1):28-35.

**Khalil N., Berezney O., Sporn M., Greenberg A. H. (1989).** Macrophage production of transforming growth factor  $\beta$  and fibroblast collagen synthesis in chronic pulmonary inflammation. *J. Exp. Med.* 170:727-737.

**Khalil N., Whitman C., Zuo L., Danielpour D., Greenberg A. (1993).** Regulation of alveolar macrophage transforming growth factor- $\beta$  secretion by corticosteroids in bleomycin induced pulmonary inflammation in the rat. *J. Clin. Invest.* 92:1812-1818.

**Khan S. N., Cammina F. P., Jr. Sandhu H. S., Diwan A. D., Girardi F. P., Lane J. M. (2005).** The biology of bone grafting. *J. Am. Acad. Orthop. Surg.* 13:77-86.

**Kilian O., Wenisch S., Heiss C., Horas U., Dingeldein E., Schnettler R. (2002).** Ostim®-Einfluss kombiniert mit autologen thrombozytären Wachstumsfaktoren auf die Knochendefektheilung in vivo. *Biomaterialien*. 3:126-133.

**Kilian O., Alt V., Heiss C., Jonuleit T., Dingeldein E., Flesch I., Wenisch S., Schnettler R. (2005).** New blood vessel formation and expression of VEGF receptors after implantation of platelet growth factor-enriched biodegradable nanocrystalline hydroxyapatite. *Growth factors* 23 (2):125-133.

**Kilian O. (2005).** Untersuchungen zum Einfluss exogen applizierter thrombozytärer Wachstumsfaktoren auf mesenchymale Stammzellen, Osteoprogenitorzellen und Endothelzellen in-vitro und auf die Frühphase der Knochendefektheilung nach Implantation von nanopartikulären, biodegradierbaren Hydroxylapatit im Tiermodell. Habilitationsschrift zur Erlangung der Venia legendi des Fachbereichs Medizin der JLU-Gießen.

**Kilian O., Dahse R., Alt V., Zardi L., Hentschel J., Schnettler R., Kosmehl H. (2008).** mRNA expression and protein distribution of fibronectin splice variants and high-molecular weight tenascin-C in different phases of human fracture healing. *Calcif. Tissue Int.* 83(2):101-11.

**Knaak D., Aiolova M., Tofighi A. (1999).** A fully resorbable calcium phosphate bone substitute. Symposium XI – Materials in Clinical Applications. Vincenzini P, ed. Techna Srl. 55-75.

**Konrads C. (2008).** Histomorphologische Untersuchungen zur Frakturheilung unter temporärem Distraktionsreiz. Medizinische Fakultät der Universität Ulm. Diss. 2008.

**Köster K., Karbe E., Heide H., König R. (1976).** Experimenteller Knochenersatz durch resorbierbare Calciumphosphatkeramik. *Langenbecks Arch. Chir.* 341:77-86.

**Kunner E., Hendrich U. (1984).** Allogene Knochentransplantation. Indikation – Konservierung – Ergebnisse. *Chirurg.* 55:704-709.

**Landesberg R., Roy M., Glickmann R. S. (2000).** Quantification of growth factor levels using a simplified method of platelet-rich plasma gel preparation. *J. Oral Maxillofac. Surg.* 58(3):297-300.

**Laschke M. W., Witt K., Pohlemann T., Menger M. D. (2007).** Injectable nanocrystalline hydroxyapatite paste for bone substitution: in vivo analysis of biocompatibility and vascularization. 82(2):494-505.

**Lauer M. (2006).** Untersuchungen zum Einfluss thrombozytärer Wachstumsfaktoren auf den zellvermittelten Abbau eines nanopartikulären Knochenersatzstoffes auf Hydroxylapatitbasis – Eine experimentelle Studie am Miniaturschwein. Justus-Liebig-Universität Gießen, Fachbereich Veterinärmedizin, Diss. 2006.

**Lee M. B. (1997).** Bone morphogenetic proteins: Background and implications for oral reconstruction. A review. *J. Clin. Periodontol.* 24:355-365.

**Lee S. J. (2000).** Cytokine delivery and tissue engineering. *Yonsei Med. J.* 41:704-719.

- Levander G. (1934).** On the formation of new bone in bone transplantation. *Acta. Chir. Scand.* 74:425-426.
- Lexer E. (1911).** Über freie Transplantationen. *Langenbecks Arch. klin. Chir.* 95:827.
- Liebermann J. R., Daluiski A., Einhorn T. A. (2002).** The role of growth factors in the repair of bone. Biology and clinical applications. *J. Bone Joint Surg. Am.* 84-A:1032-1044.
- Lind M., Schumacker B., Soballe K., Keller J., Melsen F., Bunger C. (1993).** Transforming growth factor-beta enhances fracture healing in rabbit tibiae. *Acta. Orthop. Scand.* 64(5):553-556.
- Lindner J. E., Henry S. L. (1992).** Autogenous corticocancellous bone grafting: The standard technique. In: Dorr LD (Hrsg.) *Techniques in Orthopaedics – Bone Grafting Techniques.* 72:7-16.
- Liptak J. M., Erhardt N., Santoni B. G., Wheeler D. L. (2006).** Cortical bone graft and endoprosthesis in the distal radius of dogs: A biochemical comparison of two different limb-sparing techniques. *Vet. Surg.* 35: 150-160.
- Löffler G., Petrides G. E. (1998).** Biochemie und Pathobiochemie. In: Springer Verlag Berlin (Hrsg.). 5:708–712.
- Luttikhuisen D. T., Harmsen M. C., Van Luyn M. J. (2006).** Cellular and molecular dynamics in the foreign body reaction. *Tissue Eng.* 12 (7):1955–1970.
- Macewen W. (1881).** Observations concerning transplantation on bone. *Proc. R. Soc. Lond.* 32:232.
- Marden L., Fan R., Pierce G., Reddi A., Hollinger J. (1993).** Platelet-derived growth factor inhibits bone regeneration induced by osteogenin, a bone morphogenetic protein, in rat craniotomy defects. *J. Clin. Invest.* 92:2897-2905.
- Marks S. C., Odgren P. R. (2002).** Structure and development of the skeleton. In J. P. Bilezikian, L. G. Raisz & G. A. Rodan (Eds). *Principles of bone Biology.* 1:463-481.
- Martinez-Gonzalez J. M., Cano-Sanchez J., Gonzalo-Lafuente J. C., Campo-Trapero J., Esparza-Gomez G., Seoane J. (2002).** Do ambulatory-use Platelet-Rich-Plasma (PRP) concentrates present risks? *Med. Oral.* 7:375-390.
- Marx R. E., Carlson E. R., Eichstaedt R. M., Schimmele S. R., Strauss J. E., Georgeff K. R. (1998).** Platelet-rich plasma: growth factor enhancement for bone grafts. *Oral Surg. Oral med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod.* 85:638-646.



- Marx R. E. (2004).** Platelet-rich plasma: evidence to support its use. *J. Oral Maxillofac. Surg.* 62:489-496.
- Masaki N., Vogel R. (1986).** Fibroblast Growth Factor Enhances Type  $\beta$ 1 Transforming Growth Factor Gene Expression in Osteoblast-like Cells. *J. Cell Biol.* 109:2529-2535.
- Massague J. (1990).** The transforming growth factor-beta family. *Annu. Rev. Cell. Biol.* 6:597-641.
- Matti H. (1919).** Über die Behandlung von Pseudarthrosen mit Spongiosatransplantation. *Schweiz Med. Wochenschr.* 49:1254-1258.
- McCarthy T. L., Centrella M., Canalis E. (1989).** Effects of fibroblast growth factors on desoxyribonucleic acid and collagen synthesis in rat parietal bone cells. *Endocrinology* 125(4):2118-2126.
- McKibbin B. (1978).** The biology of fracture healing in long bones. *J. Bone Surg.* 60: 150-162.
- Nagai H., Tsukuda R., Mayahara H. (1995 ).** Effects of basic fibroblast growth factor on bone formation in growing rats. *Bone* 16:367-373.
- Nakagawa M., Kaneda T., Arakawa T., Morita S., Sato K., Yomada T., Hanada K., Kumegawa M., Haked Y. (2000).** Vascular endothelial growth factor (VEGF) directly enhances osteoblastic bone resorption and survival of mature osteoblasts. *FEBS Lett.* 473:161-164.
- Nash T. J., Howlett C. R., Martin C., Steele J., Johnson K. A., Hicklin D. J. (1994).** Effect of platelet-derived growth factor on tibial osteotomies in rabbits *Bone* 15 (2):203-208.
- Niedhart C., Niethard F.U. (1998).** Klinische Anforderungen an Knochenersatzstoffe. In W. Puhl (ed): *Bioceramics in orthopaedics – New Applications* Enke Verlag. 46-50.
- Nordström P., Pihlajamaki H., Toivonen T., Törmälä P., Rokkanen P. (1998).** Tissue response to polyglycolide and polylactide pins in cancellous bone. *Arch. Orthop. Trauma. Surg.* 117:197-204.
- Oberdalloff H. (1947).** Zur Frage der Knochenneubildung. *Chirurg* 17:18-123.
- Okumura M., Okuda T., Nakamura T., Yajima M. (1996 ).** Effect of basic fibroblast growth factor on wound healing in healing-impaired animal model. *Arzneim. Forsch.* 46:547-551.

**Ollier L. (1867).** Traité experimental et clinique de la régénération des os. Victor Mason et Fils, Paris.

**Osborn J. F. (1985).** Implantatwerkstoff Hydroxylapatitkeramik, Grundlagen und klinische Anwendung. Berlin, Chicago, London, Rio de Janeiro, Tokio: Quintessenz Verlags GmbH.

**Paulsson Y., Hammacher A., Heldin C. H., Westermarck B. (1987).** Possible positive autocrine feedback in the prereplicative phase of human fibroblasts. Nature 328(6132):715-717.

**Pelto-Vasenius K., Hirvensalo E., Vasenius J., Rokkanen P. (1997).** Osteolytic changes after polyglycolide pin fixation in chevron osteotomy. Foot Ankle Int. 18:21-25.

**Perren S. M. (1981).** Primary bone healing. In: Bojrab M. (ed) Pathophysiology in small animal surgery. Lea & Febiger, Philadelphia. 519-527.

**Pfeil J. (2005).** Orthopädie. Georg Thieme Verlag.

**Poulaki V., Mitsiades C. S., Mc Mullan C., Sykoutri D., Fanourakis G., Kotoula V., Tseleni-Balafouta S., Demetrios A., Mitsiades N., Mitsiades K. (2003).** Regulation of Vascular Endothelial Growth Factor Expression by Insulin-Like Growth Factor I in Thyroid Carcinomas. 11:5392-5398.

**Powell D. W., Mifflin R. C., Valentich J. D., Crowe S. E., Sada J. I., West A. B. (1999).** Myofibroblasts. I. Paracrine cells important in health and disease. Am. J. Physiol. 277:1-9.

**Ranly D. M., Lohmann C. H., Andreacchio D., Boyan B. D., Schwartz Z. (2007).** Platelet-rich plasma inhibits demineralized bone matrix-induced bone formation in nude mice. J. Bone Surg. Am. 89:139-147.

**Regel G., Südkamp N. P., Illgner A., Buchenau A., Tscherne H. (1992).** 15 Jahre allogene Knochentransplantation. Unfallchirurg. 95:1-8.

**Remedios A. (2002).** Bone and bone healing. Vet. Clin. North. Am. Small Anim. Pract. 29:1029-1044.

**Revell P. A., Hing K. A., Tanner K. E. (1997).** Osseointegration of porous hydroxyapatite. In: Schnettler R, Markgraf E, Hrsg. Knochenersatzmaterialien und Wachstumsfaktoren. Stuttgart - New York: Thieme :28-30.

**Rolden J. C., Jepsen S., Miller J., Freitag S., Rueger D. C., Acil Y., Terheyden H. (2004).** Bone formation in the presence of platelet-rich plasma vs. bone morphogenetic protein-7. *Bone*. 34:80-90.

**Ronnov-Jessen L., Petersen O. W. (1993).** Induction of  $\alpha$ -smooth muscle actin by transforming growth factor- $\beta$ 1 in quiescent human breast gland fibroblasts. Implications for myofibroblast generation in breast neoplasia. *Lab. Invest.* 68:696-707.

**Roodman G. D. (1999).** Cell biology of the osteoclast *Exp. Hematol.* 27:1229-1241.

**Rubbia-Brandt L., Sappino A. P., Gabbiani G. (1991).** Locally applied GM-CSF induces the accumulation of  $\alpha$ -smooth muscle actin containing myofibroblasts. *Virchows Arch. B. Cell. Pathol.* 60:73-82.

**Rueger J. M. (1995).** Allogener Knochen und Knochenersatzmittel In: Rüter A, Trentz O, Wagner M (Hrsg) *Unfallchirurgie*. Urban & Schwarzenberg, München Wien Baltimore.

**Runkel M., Rommens P. M. (2000).** Pseudarthrosen. *Unfallchirurg* 103:51-63.

**Saadeh P., Mehrara B., Steinbrech D., Dudziak M., Gosain A., Gittes G., Longaker M. (1999).** Transforming growth factor- $\beta$ 1 modulates the expression of vascular endothelial growth factor by osteoblasts. *Am. J. Physiol. Cell. Physiol.* 277:628-637.

**Saadeh P. B., Mehrara B. J., Steinbrech D. S., Spector J. A., Greenwald J. A., Chin G. S., Ueno H., Gittes G. K., Longaker M. T. (2000).** Mechanisms of Fibroblast Growth Factor-2 Modulation of Vascular Endothelial Growth Factor Expression by Osteoblastic Cells. *Endocrinology* 141:2075-2083.

**Sanchez A. R., Sheridan P. J., Kupp L. I. (2003).** Is platelet-rich plasma the perfect enhancement factor? A current review. *Int. J. Oral. Maxillofac. Implants.* 18:93-103.

**Sanders K. M. (1996).** A case for interstitial cells of Cajal as pacemakers and mediators of neurotransmission in the gastrointestinal tract. *Gastroenterology*. 111:492-515.

**Sappino A. P., Schurch W., Gabbiani G. (1990).** Differentiation repertoire of fibroblastic cells: expression of cytoskeletal proteins as marker of phenotypic modulations. *Lab. Invest.* 63:144-161.

**Sawano A., Iwai S., Sakurai Y., Ito M., Shitara K., Nakahata T., Shibuya M. (2001).** Flt-1, vascular endothelial growth factor receptor 1 is a novel cell surface marker for the lineage of monocyte-macrophages in humans. *Blood* 97:785-791.

- Schieker M., Mutschler W. (2006).** Bridging posttraumatic bony defects. Unfallchirurg 109:715-732.
- Schieker M., Heiss C., Mutschler W. (2008).** Bone Substitutes. Unfallchirurg. 111(8):613-20.
- Schindeler A., McDonald M. M., Bock P., Little D. G. (2008).** Bone remodeling during fracture repair: The cellular picture. Semin. Cell & Develop. Biol. 19:459-466.
- Schlegel K. A., Kloss F. R., Scgultze-Mosgau S., Neukam F. W., Wiltfang J. (2003).** Tierexperimentelle Untersuchung zum Einfluss verschiedener Thrombozytenkonzentrate auf die Defektregeneration mit autogenem Knochen und Knochenersatzmaterialien (Biogran und Algipore). Mund Kiefer Gesichts Chir. 7:112-118.
- Schmitt J. M., Buck D. C., Joh S. P. (1998).** Comparison of porous bone mineral and biologically active glass in critical size defects. J. Peridontal. 69:1312-4.
- Schmitt-Graff A., Desmouliere A., Gabbiani G. (1994).** Heterogeneity of myofibroblast phenotypic features : an example of fibroblastic cell plasticity. Virchows Arch. 425:3-24.
- Schmitz J. P., Hollinger J. O. (1986).** The critical size defect as an experimental model for craniomandibulofacial nonunions. Clin. Orthop. 205:299-309.
- Schnürer S. M., Gopp U., Kuhn K. D., Breusch S. J. (2003).** Bone substitutes. Orthopädie 32:2-10.
- Schnettler R., Dingeldein E., Herr G. (1998).** Defect reconstruction using demineralized bone matrix. Experimental studies on piglets. Orthopäde. 27:80-88.
- Schnettler R., Alt V., Dingeldein E., Pfefferle H. J., Kilian O., Meyer C., Heiss C., Wenisch S. (2003).** Bone ingrowth in bFGF-coated hydroxyapatite ceramic implants. Biomaterials 24:4603-4608.
- Schnettler R., Stahl J. P., Alt V., Pavlidis T., Dingeldein E., Wenisch S. (2004).** Calcium phosphate-based bone substitutes – review article. Europ. J. Trauma. 4:219-229.
- Schnettler R., Alt V., Stahl J.-P., Wenisch S. (2005).** Cellular aspects of bone defect healing after implantation of calciumphosphate based bone substitutes. In: Practice of intramedullary locked nails, Ed.: Leung K. S., Taglang G., Schnettler R.; Springer Verlag.
- Schweiberer L., Eitel F., Betz A. (1982).** Spongiosatransplantation. Chirurg. 53:195-200

**Segmüller G. (1967).** Spongiosaregeneration in der Milliporekammer. *Helv. Chir. Acta.* 34:5.

**Serini G., Gabbiani G. (1996).** Modulation of  $\alpha$ -smooth muscle actin expression in fibroblasts by transforming growth factor- $\beta$  isoforms: an in vivo and in vitro study. *Wound Rep. Reg.* 4:277-287.

**Serini G., Gabbiani G. (1999).** Mechanisms of Myofibroblast Activity and Phenotypic Modulation. *Experimental Cell Research.* 250:273-283.

**Shimokado K., Raines E. W., Madtes D. K., Barrett T. B., Benditt E. P., Ross R. (1985).** A significant part of macrophage-derived growth factor consists of at least twoforms of PDGF. *Cell* 43(1):277-286.

**Siebert C., Miltner O., Weber M., Sopka S., Koch S., Niedhart C. (2003).** Healing of osteochondral grafts in an ovine model under the influence of bFGF. *Arthroscopy* 19:182-187.

**Soldner E., Herr G. (2001).** Knochen, Knochentransplantate und Knochenersatzmaterialien- Grundlagen, aktueller Stand und neue Entwicklungen. *Trauma und Berufskrankheit.* 3:256-269.

**Soost F. (1996).** Historischer Überblick der Knochenersatz- und Implantatmaterialien in der craniofacialen Chirurgie. *Osteologie.* 5:135-143.

**Spies C., Schnürer S., Gotterbarm T., Breusch S. (2008).** Animal study of the bone substitute material Ostim within osseus defects in Göttinger minipigs. *Z Orthop Unfall.* 146(1):64-9.

**Sporn M. B., Roberts A. B., Wakefield L. M., de Crombrughe B. (1987).** Some recent advances in the chemistry and biology of transforming growth factor-beta. *J. Cell. Biol.* 3:1039-1045.

**Sprutacz O. (2005).** Einfluss der lokalen Applikation von basic Fibroblast Growth Factor auf die lokale Infektionsresistenz nach standardisiertem, geschlossenem Weichteiltrauma. Eine experimentelle Studie an Ratten. Medizinische Fakultät der Ruhr – Universität Bochum. Diss. 2005.

**Steven M. J., Skokos E., Laiwalla F., Krady M.-M., Kyriakides R. T. (2007).** Foreign body giant cell formation is preceded by lamellipodia formation and can be attenuated by inhibition of rac1 activation. *Am. J. Pathol.* 171:000-000.

**Strauß A. (1999).** Lokaler Antibiotikumträger aus Kalziumphosphat. Verträglichkeit im Gewebe und Pharmakokinetik der angewendeten Antibiotika nach Implantation im Kaninchen. Diss. Med. vet., Gießen. Biomaterialien in der Medizin. Gießen: Fachverlag Köhler.

**Street J., Bao M., DeGuzman L., Bunting S., Peale F. V. Jr., Ferrara N., Steinmetz H., Hoeffel J., Cleland J. L., Daughtery A., van Bruggen N., Redmond H. P., Carano R. A., Filvaroff E. H. (2002).** Vascular endothelial growth factor stimulates bone repair by promoting angiogenesis and bone turnover. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 99:9656-9661.

**Südkamp N., Haas N., Tempka A., Veuskens A., Kirchhoff A., Tscherne H. (1993).** Indikationen und Häufigkeiten von Spongiosatransplantaten bei offenen Frakturen: Analyse von 470 offenen Frakturen. Akt. Traumatol. 23:169-177.

**Sumner D. R., Turner T. M., Purchio A. F., Gombotz W. R., Urban R. M., Galante J. O. (1995).** Enhancement of bone ingrowth by transforming growth factor-beta. J. Bone Joint. Surg. Am. 77(8):1135-1147.

**Switzer R. B., Summer G. K. (1971).** Collagen Synthesis in Human Skin Fibroblasts: Effects of Ascorbate,  $\alpha$ -Ketoglutarate and Ferrous Ion on Proline Hydroxylation. J. Nutrition 102:721-728.

**Szalay K., Kasten P., Vogel J., Geiger F., Niemeyer P., Richter W., Eerbeek V. (2006).** Plättchenreiches Plasma verbessert die Knochenheilung im Radiusdefekt des Kaninchens auf einer neuen Keramik mit einer großen Oberfläche. J. German Congress of Orthop. and Trauma Surg.. Meeting Abstract.

**Szivek J. A., Nelson E. R., Hajdu S. D., Yablonski K., DeYoung D. W. (2004).** Transforming growth factor-beta 1 accelerates bone bonding to a blended calcium phosphate ceramic coating: A dose-response study. J. Biomed. Mater. Res. 68A:537-543.

**Tang L., Eaton J. W. (1995).** Inflammatory responses to biomaterials. Am. J. Clin. Pathol. 103:466-471.

**Terheyden H., Roldan-Ossa J. C., Miller J., Jepsen S., Acil Y. (2002).** Platelet-rich plasma in der Knochenregeneration - Erste Ergebnisse zweier experimenteller Studien. Implantologie. 10:195-205

**Thorn J. J., Sorensen H., Weis-Fogh U., Anderson M. (2004).** Autologous fibrin glue with growth factors in reconstructive maxillofacial surgery. *Int. J. Oral Maxillofac. Surg.* 33:95-100.

**Tscherne H., Regel G. (1996).** Knochenersatz Aktueller Stand und Perspektiven. Teil II Allg. Behandlungsgebiete.

**Urist M. R., Silvermann B. F., Büring K., Dubuc F. L., Rosenberg J. M. (1967).** The bone induction principle. *Clin. Orthop. Rel. Res.* 53:243.

**Valentich J. D., Popov V., Saada J. I., Powell D. W. (1997).** Phenotypic characterization of an intestinal subepithelial myofibroblast cell line. *Am. J. Physiol.* 41:1513-1524.

**Vyalov S. L., Gabbiani G., Kapanci Y. (1993).** Rat alveolar myofibroblast acquire  $\alpha$ -smooth muscle actin expression during bleomycin-induced pulmonary fibrosis. *Am. J. Pathol.* 143:1754-1765.

**Walter Ph. V. (1821).** Wiedereinheilung der bei der Trepanation ausgebohrten Knochenscheibe. *J. Chir. Augenheil.* 2:571.

**Wang D., Yamazaki K., Nohtomi K., Shizume K., Ohsumi K., Shibuya M., Demura H., Sato K. (1996).** Increase of vascular endothelial growth factor mRNA expression by 1,25-dihydroxyvitamin D3 in human osteoblast-like cells. *J. Bone Miner. Res.* 11:472-479.

**Warmuth S. (2005).** Entzündungsparameter an oberflächenmodifiziertem TiAl6V4. München, Technische Universität. Diss 2005.

**Watanabe K., Konno S., Sekiguchi S., Kikuchi S. (2007).** Spinal stenosis: assessment of motor function, VEGF expression and angiogenesis in an experimental model in rat. *Europ. Spine J.* 16(11):1913-8.

**Webster T. J., Ergun C., Doremus R. H., Siegel R. W., Bizios R. (2001).** Enhanced osteoclast-like cell functions on nanophase ceramics. *Biomaterials* 22:1327-1333.

**Weibrich G., Gnoth S. H., Otto M., Reichert T. E., Wagner W. (2002).** Wachstumsstimulation von humanen osteoblastenähnlichen Zellen durch Thrombocytenkonzentrate in vitro. *Mund Kiefer Gesichtschir.* 6:168-174.

**Weibrich G., Hansen T., Kleis T., Buch R., Hitzler W. E. (2004).** Effect of platelet concentration in platelet-rich plasma on peri-implant bone regeneration. *Bone* 34:665-671.

- Weiner S., Wagner H. D. (1998).** The material Bone: structure – mechanical function relations. *Annu Rev. of Mater. Sci.* .28:271-98
- Wenisch S., Stahl J. P., Horas U., Kilian O., Trinkhaus K., Hild A., Schnettler R. (2003a).** In vivo mechanisms of hydroxyapatite ceramic degradation by osteoclasts: fine structural microscopy. *J. Biomed. Mater. Res. A* 67 (3):713-718.
- Wenisch S., Stahl J. P., Horas U., Kilian O., Heiss C., Schnettler R. (2003b).** Ultrastructural examination of cell-mediated degradation of calcium phosphate ceramic. *Unfallchirurg* 106 (5):387-391.
- Wenz R. (2002).** An innovative treatment concept in trauma and orthopaedics. The international review of modern surgery. *Orthop. Surg.* 37.
- Whitman D. H., Berry R. L., Green D. M. (1997).** Platelet gel: an autologous alternative to fibrin glue with applications in oral and maxillofacial surgery. *J. Oral Maxillofac. Surg.* 55:1294-1299.
- Wiltfang J., Schlegel K. A., Schultze-Mosgau S., Nkenke E., Zimmermann R., Kessler P. (2003).** Sinus floor augmentation with beta-tricalciumphosphate (beta-TCP): does platelet-rich plasma promote its osseous integration and degradation? *Clin. Oral Implants Res.* 14:213-218.
- Wilting J., Birkenhager R., Eichmann A., Kurz H., Martiny-Baron G., Marme D., McCarthy J. E., Christ B., Weich H. A. (1996).** VEGF 121 induces proliferation of vascular endothelial cells and expression of FLK-1 without affecting lymphatic vessels of chorioallantoic membrane. *Dev. Biol.* 176:76-85.
- Wippermann B. (1997).** Vergleich von  $\alpha$ -BSM und Hydroxylapatitkeramik Granulat (HA) in einem Tibia-Segmentdefekt des Schafes. *Proceedings of the German Traumatology Union.*
- Wissenschaftlicher Beirat der Bundesärztekammer (1996).** Richtlinien zum Führen einer Knochenbank. *Dtsch. Ärztebl.* 35:1715-1719.
- Wolter D. (1987).** Historischer Überblick der Knochentransplantation unter besonderer Berücksichtigung des autologen Spongiosatransplantats. *Hefte z. Unfallheilkunde* 185:1-5.
- Xia Z. (2006).** A review on macrophage responses to biomaterials. *Biomed. Mater.* 1:R1–R9.



**Xing Z., Tremblay G. M., Sime P. J., Gauldie J. (1997).** Overexpression of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor induces pulmonary granulation tissue formation and fibrosis by induction of transforming growth factor- $\beta$ 1 and myofibroblast accumulation. *Am. J. Pathol.* 150:59-66.

**Yamamoto M., Tabata Y., Hing L., Miyamoto S., Hashimoto N., Ikada Y. (2000).** Bone regeneration by transforming growth factor-beta 1 released from a biodegradable hydrogel. *J. Controlled Release* 64:133-142.

**Yazawa M., Ogata H., Nakajima T., Mori T., Watanabe N., Handa M. (2003).** Basic studies on the clinical applications of platelet-rich plasma. *Cell Transplant* 12:509-518.

**Ylinen P., Suuronen R., Taurio R., Tormala P., Rokkanen P. (2002).** Use of hydroxylapatite / polymer-composite in facial bone augmentation. An experimental study. *Int. J. Oral Maxillofac. Surg.* 31:405-409.

**Yoo J. U., Johnstone B. (1998).** The role of osteochondral progenitor cells in fracture repair. *Clin. Orthop. Relat. Res.* 73-81.

**Zechner W., Tangl S., Tepper G., Furst G., Bernhart T., Haas R., Mailath G., Watzek G. (2003).** Influence of platelet-rich plasma on osseous healing of dental implants: a histologic and histomorphometric study in minipigs. *Int. J. Oral Maxillofac. Implants.* 18:15-22.

**Zhao Q., Topham N., Anderson J. M., Hiltner A., Lodoen G., Payet C. R. (1991):** Foreign-body giant cells and polyurethane biostability: in vivo correlation of cell adhesion and surface cracking. *J. Biomed. Mater. Res.* 25:177-183.

**Zimmermann R., Jakubietz R., Jakubietz M., Strasser E., Schlegel A., Wiltfang J., Eckstein R. (2001).** Different preparation methods to obtain platelet components as source of growth factors for local application. *Transfusion.* 41(10):1186-1189.

### 9. Danksagung

Hiermit möchte ich mich herzlich bei Frau Prof. Dr. S. Wenisch für die Bereitstellung des Dissertationsthemas, die fachlich und menschlich kompetente Betreuung, die guten Ratschläge und die offene und ehrliche Art bedanken.

Herrn Prof. Dr. Dr. R. Schnettler möchte ich für die Möglichkeit danken, die im Rahmen meiner Dissertation angefertigten Untersuchungen in der Abteilung für Unfallchirurgie der Justus-Liebig-Universität Gießen durchführen zu können.

Für die Planung und Durchführung des operativen Anteils des Tierversuches möchte ich Herrn Dr. O. Kilian danken.

Bei den Mitarbeitern des Laboratoriums für Experimentelle Unfallchirurgie möchte ich mich herzlich für die technische Hilfe und die tatkräftige Unterstützung bei der Laborarbeit bedanken. Für die stetige Unterstützung und die guten Ratschläge möchte ich besonders Anne Hild, Rainer Braun, Ida Oberst und Iris Schütz danken.

Des Weiteren möchte ich Herrn Dr. rer. nat. K. Failing für die fachliche Unterstützung bei der statistischen Auswertung danken.

Auf diesem Weg möchte ich auch allen danken, die mich moralisch unterstützt haben, mir mit Rat und Tat zur Seite gestanden und mich auf vielfältige andere Weise unterstützt haben insbesondere meinen Eltern, die mir immer fest zur Seite stehen, immer an mich glauben und mich bei der Erfüllung meiner Träume unterstützen.

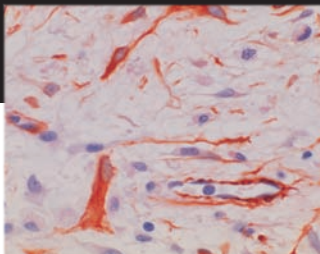
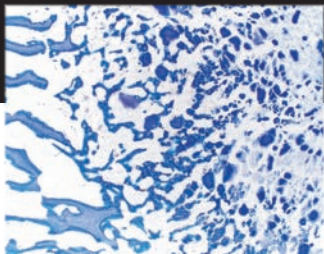
Mein letzter Dank gilt meiner Freundin Saskia, die mir stets zur Seite steht und mich aus voller Kraft mit ihrem Fachwissen und vor allem ihrer Liebe unterstützt hat.

### **10. Erklärung**

Ich versichere ausdrücklich, daß ich die vorgelegte Dissertation selbständig und ohne fremde Hilfe verfaßt, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe, Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht und die im Rahmen der Dissertation angefertigten Untersuchungen unter Wahrung der Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, durchgeführt habe.

Filip Janu

Heidenrod, den 14.11. 2010



*édition scientifique*  
**VVB LAUFERSWEILER VERLAG**

VVB LAUFERSWEILER VERLAG  
STAUFENBERGRING 15  
D-35396 GIESSEN

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

ISBN: 978-3-8359-5728-2



9 783835 195728 2