

**MORPHOLOGISCHE UNTERSUCHUNG
ZUM ZELLVERMITTELTEN ABBAU UND
ZUR KNÖCHERNEN INTEGRATION VON
RESORBIERBAREM CALCIUM-PHOSPHAT
(BIOBON[®]) IM TIBIABOHRLOCHDEFEKT
BEIM SCHAF**

NIKOLAJ WIEGHORST

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

édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

Das Werk ist in allen seinen Teilen urheberrechtlich geschützt.

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

1. Auflage 2006

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

1st Edition 2006

© 2006 by VVB LAUFERSWEILER VERLAG, WETTENBERG
Printed in Germany



VVB LAUFERSWEILER VERLAG
édition scientifique

GLEIBERGER WEG 4, D-35435 WETTENBERG
Tel: 06406-4413 Fax: 06406-72757
Email: VVB-IPS@T-ONLINE.DE

www.doktorverlag.de

**Morphologische Untersuchung zum zellvermittelten Abbau und
zur knöchernen Integration von resorbierbarem Calcium-
Phosphat (Biobon[®]) im Tibiaboehrlochdefekt beim Schaf**

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

des Fachbereichs Humanmedizin

der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von

Nikolaj Wieghorst

aus Berlin

Gießen 2006

Aus der Klinik und Poliklinik für Unfallchirurgie
Direktor: Univ.-Prof. Dr. Dr. med. Reinhard Schnettler
des Universitätsklinikums Gießen und Marburg GmbH
Standort Gießen

Gutachter: Prof. Dr. Dr. med. R. Schnettler

Gutachter: Prof. Dr. med. R. Middendorff

Tag der Disputation: 15.02.2006

INHALTSVERZEICHNIS

1	Einleitung und Problemstellung	1
2	Aufbau und Regulation von Knochengewebe.....	3
2.1	Osteoblasten.....	6
2.2	Osteozyten	6
2.3	Osteoklasten.....	7
3	Knochenersatzmaterialien.....	11
3.1	biologische Knochenersatzmaterialien	17
3.1.1	Hydroxylapatit	17
3.1.2	Pflanzliches Calciumphosphat	19
3.2	synthetische Knochenersatzmaterialien	19
3.2.1	Calciumphosphat.....	19
3.2.2	Calciumsulfat	22
3.2.3	Composites.....	23
4	Material und Methode	25
4.1	Versuchstiere und Haltung.....	25
4.2	Diamond bone cutting System (DBCS).....	25
4.3	Prüfsubstanz: Calciumphosphat-Implantat (Biobon®).....	27
4.4	Narkose.....	27
4.5	Operation und Nachbehandlung	28
4.6	Fluorochrommarkierung	31
4.7	Perfusion und Tötung.....	31
4.8	Computertomographie	33
4.9	Histologische Untersuchungen	33
4.9.1	Aufsägen der Tibiae	33
4.9.2	Trenn-Dünnschliff-Technik	34
4.9.3	Toluidinblaufärbung.....	34
4.9.4	Fluoreszenzhistologie.....	34
4.9.5	Färbung mit tartratresistenter saurer Phosphatase (TRAP)	34
4.9.6	Semidünnschnitte und Transmissionselektronenmikroskopie (TEM)	35
5	Ergebnisse	38
5.1	Makroskopische Befunde	38
5.2	Radiologische Befunde	38
5.2.1	Nativradiologische Befunde.....	38
5.2.2	Computertomographische Befunde.....	39

Inhaltsverzeichnis

5.3	Histologische Befunde.....	41
5.3.1	Toluidinblaufärbungen.....	41
5.3.2	Semidünnschnitte (6-Wochen-Tiere).....	54
5.3.3	Fluoreszenzmikroskopische Befunde.....	57
5.3.4	Enzymhistochemische Befunde, Nachweis der sauren Phosphatase.....	59
5.3.5	Transmissionselektronenmikroskopische (TEM) Befunde	60
6	Diskussion	69
7	Zusammenfassung.....	81
8	Summary	83
9	Literaturverzeichnis.....	84
10	Danksagung.....	104
11	Lebenslauf.....	105
12	Erklärung.....	106

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 1: Schemazeichnung zum RANK/RANKL/Osteoprotegerin-System 9

Abbildung 2: Schemazeichnung zur Knochenresorption des Osteoklasten 10

Abbildung 3: Foto: DBC System 26

Abbildung 4: Foto: Schaffung des Bohrlochdefektes mit dem DBC System..... 29

Abbildung 5: Foto: Bohrlochdefekt nach Entnahme des Bohrzylinders 29

Abbildung 6: Foto: Bohrlochzylinder 30

Abbildung 7: Foto: Präparationssitus für die Perfusion 32

Abbildung 8: Foto: Ultracut 36

Abbildung 9: Schemazeichnung zum Aktinnachweis..... 37

Abbildung 10: Nativröntgenbild seitlich 39

Abbildung 11: Nativröntgenbild anterior-posterior..... 39

Abbildung 12: Computertomographie Übersicht 40

Abbildung 13: Computertomographie Schnittebene 1 40

Abbildung 14: Computertomographie Schnittebene 2 40

Abbildung 15: Foto: Übersicht des Tibiakopfes 6 Wochen postoperativ..... 41

Abbildung 16: Histologie: Ausschnittsvergrößerung aus Abbildung 15..... 42

Abbildung 17: Histologie: Ausschnittsvergrößerung aus Abbildung 16 (blaues Rechteck) 43

Abbildung 18: Histologie: Ausschnittsvergrößerung aus Abbildung 17..... 44

Abbildung 19: Histologie: Ausschnittsvergrößerung aus Abbildung 16 (gelbes Rechteck) 45

Abbildung 20: Histologie: Ausschnittsvergrößerung aus Abbildung 19..... 45

Abbildung 21: Histologie: Ausschnittsvergrößerung aus Abbildung 20..... 46

Abbildung 22: Histologie: Ausschnittsvergrößerung (rechtes Rechteck) aus Abbildung 21 47

Abbildung 23: Histologie: Ausschnittsvergrößerung (linkes Rechteck) aus Abbildung 21 47

Abbildung 24: Histologie: Osteoblasten im Semidünnschliff 6 Wochen nach Implantation 48

Abbildung 25: Schemazeichnung der Abbildung 24..... 49

Abbildung 26: Foto: Bindegewebsabssaum um das Calciumphosphat-Implantat 50

Abbildung 27: Histologie: Ausschnittsvergrößerung aus Abbildung 26..... 50

Abbildung 28: Histologie: Ausschnittsvergrößerung aus Abbildung 27..... 51

Abbildung 29: Foto: Übersicht des Tibiakopfes 24 Wochen postoperativ..... 52

Abbildung 30: Foto: Übersicht des Tibiakopfes 48 Wochen postoperativ..... 53

Abbildung 31: Foto: Übersicht des Tibiakopfes 48 Wochen postoperativ, Leerdefekt 54

Abbildung 32: Histologie: Mehrkernige Zellen 6 Wochen postoperativ 55

Abbildung 33: Histologie: Mehrkernige Zellen im Phasenkontrast..... 55

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 34: Histologie: Implantatabbau und Rekonstitution des Knochenmarks.....	56
Abbildung 35: Histologie: Ausschnittsvergrößerung aus Abbildung 34.....	56
Abbildung 36: Fluoreszenzhistologie I.....	57
Abbildung 37: Fluoreszenzhistologie II.....	58
Abbildung 38: Fluoreszenzhistologie III.....	58
Abbildung 39: Histologie: Multinukleäre Zellen nach TRAP-Färbung 6 Wochen postoperativ	59
Abbildung 40: Histologie: Ausschnittsvergrößerung aus Abbildung 39.....	60
Abbildung 41: TEM: Osteoklast, Degradation des Calciumphosphat-Implantates.....	62
Abbildung 42: TEM: Ausschnittsvergrößerung der „ <i>sealing zone</i> “ eines Osteoklasten	63
Abbildung 43: TEM: Immunogoldlabelling der Aktinfilamente in der „ <i>sealing zone</i> “ eines Osteoklasten	63
Abbildung 44: TEM: Transzytose.....	64
Abbildung 45: TEM: Inklusionsextrusion.....	65
Abbildung 46: TEM: Phagozytose der Osteoklastenprodukte durch einen Makrophagen.....	65
Abbildung 47: TEM: Osteoklast am Knochen-Implantatübergang.....	66
Abbildung 48: TEM: Osteoblasten I.....	66
Abbildung 49: TEM: Osteoblasten II.....	67
Abbildung 50: TEM: Makrophage, Osteoblast und Osteoklast	68
Abbildung 51: TEM: Osteozyt.....	68
Abbildung 52: Fluoreszenzhistologie: Transzytose von Tetrazyklin durch einen Osteoklasten.	73
Abbildung 53: Fluoreszenzhistologie: SALO a	73
Abbildung 54: Fluoreszenzhistologie: SALO b	73

1 EINLEITUNG UND PROBLEMSTELLUNG

Die Auffüllung knöcherner Defekte am menschlichen Skelett stellt ein häufiges Problem in der Unfallchirurgie und operativen Orthopädie dar. Die Entstehung der Defekte kann angeboren, traumatisch oder resektionschirurgisch bedingt sein. Pro Jahr werden in den USA 1,5 Millionen Knochendefekte operativ mittels autogener (körpereigener) und allogener (körperfremder) Spongiosa oder mit Knochenersatzmaterialien behandelt (EINHORN, 2003). Der Knochenersatzmaterialeinsatz steigt jährlich, während die Zahl der Operationen mit autogenen Spongiosatransplantationen rückläufig ist (KOMIYA et al., 2003). Die Zahl der allogenen Knochentransplantationen in Deutschland lag 1997 bei 20.000 pro Jahr (KNAEPLER, 1997).

Sowohl die autogene als auch die allogene Transplantation weisen erhebliche Risiken auf. Die Materialentnahme erfolgt bei Verwendung von autogenem Material meist durch einen Zweiteingriff, welches die Dauer der Operation und damit auch der Narkose verlängert. Darüber hinaus steht nur eine begrenzte Menge an autogener Knochensubstanz in Form von Spongiosa oder als kortikospongiöser Span zur Verfügung. Bei allogenem Material ist die Führung einer arbeits- und kostenintensiven Knochenbank notwendig. Es besteht das Risiko der Übertragung von viralen Erkrankungen wie beispielsweise Hepatitis B und C oder HIV. Auch eine Tumorübertragung kann nicht sicher ausgeschlossen werden. Es stellt sich daher die Frage, wie die Knochentransplantation umgangen, gleichzeitig aber entsprechende therapeutische Erfolge erzielt werden können.

In der vorliegenden Arbeit wurde das Einwachsverhalten eines Calciumphosphat-Implantates auf synthetischer Basis untersucht. Das getestete Knochenersatzmaterial gilt als resorbierbar und erfüllt somit eine Platzhalterfunktion bis zum Ersatz durch körpereigenen Knochen.

Das Tierexperiment ermöglicht die Ermittlung von in vivo Daten über das Einwachsverhalten des Knochens und die Resorption sowie den Umbau der Knochenersatzplastik zu klar definierten Zeitpunkten. Kleintiere wie Mäuse, Ratten oder Kaninchen zeigen einen erheblich gesteigerten Knochenstoffwechsel gegenüber größeren Säugetieren und entsprechen damit nicht den Verhältnissen beim Menschen (FLAUTRE et al., 1999). Das Schaf bietet aufgrund seiner Größe und Anatomie gute Voraussetzungen, um die Situation nach Implantation von Knochenersatzmaterialien zu erforschen (WISSING et al., 1990). Die Qualität der ovinen Knochenstruktur und die quantitativen Knochenumbauvorgänge im Sinne des ossären *remodeling* sind aus zahlreichen Studien hinreichend bekannt (BENUM et al., 1976; GUIGUI

1 Einleitung und Problemstellung

et al., 1994; GAO et al., 1996; FLAUTRE et al., 1999; FRAYSSINET et al., 2000; GRIFFON et al., 2001; WENISCH et al., 2003; BLOEMERS et al., 2003).

Ziel der Arbeit ist, die durch Implantation eines Calciumphosphat-Implantates im Knochen hervorgerufenen Umbauvorgänge in ihrem zeitlichen Ablauf radiologisch, histologisch und elektronenmikroskopisch darzustellen, sowie besonders die am Um- und Abbau des resorbierbaren Calciumphosphat-Implantates beteiligten zellulären Reaktionen nachzuweisen.

2 AUFBAU UND REGULATION VON KNOCHENGEWEBE

Knochen setzt sich aus anorganischen Bestandteilen (65%), einem organischen Anteil (25%) und Wasser (10%) zusammen. Die Mineralien sind im wesentlichen Calcium und Phosphat, aber auch Magnesium, Fluor und Natrium. Knochen ist der Hauptspeicherort für Calcium: 99% des körpereigenen Calciums sind im Knochen gespeichert, nur 1% ist in den Körperflüssigkeiten gelöst. Die organische Matrix ist zu über 90% aus Typ-I-Kollagen sowie zu etwa 10% aus nicht kollagenen Proteinen wie Fibronectin, Thrombospondin, Osteopontin, Vitronectin und „bone sialoprotein“ aufgebaut (BASLE et al., 1998).

Osteoblasten bilden die organische und anorganische Knochenmatrix. Der Abbau des Knochens wird vornehmlich durch Osteoklasten bewerkstelligt. Dieser stetige Auf-, Ab- und Umbau des Knochens wird *remodeling* genannt. Bei einem gesunden erwachsenen Menschen werden 10 Prozent der gesamten Knochenmasse pro Jahr durch *remodeling* erneuert und die Gestalt des Knochens damit den Anforderungen an das Skelett angepasst (RUSSELL et al., 2001)

FROST (1966) bezeichnet den Knochen als ein stark differenziertes und hoch aktives Stoffwechselorgan mit permanent laufenden Umbauprozessen, die es ermöglichen, auf unterschiedliche funktionelle Beanspruchung mit Knochenabbau und -Ersatz zu reagieren.

Am Knochen wird eine feste Außenzone (Kortikalis) und eine weniger dichte, innere Zone, bestehend aus einem schwammartigem Gerüstwerk feiner Knochenbälkchen (Spongiosa), unterschieden. Der Kortikalis aufgelagert ist die Knochenhaut (Periost), welche den Knochen umgibt und maßgeblich für die Durchblutung, Innervation und Regeneration mit verantwortlich ist. Das Knochenmark als Bildungsstelle der Knochenmarkzellen findet sich in den Spongiosazwischenräumen sowie im Innern der langen Röhrenknochen in der Markhöhle.

Entwicklungsgeschichtlich lässt sich der desmale oder Bindegewebsknochen vom knorpelig vorgebildeten chondralen Knochen unterscheiden. Histologisch werden Geflechtknochen und Lamellenknochen unterschieden. Geflechtknochen ist charakteristisch für embryonalen und fetalen Knochen. Geflechtknochen enthält Fibrillen, die wie bei einem Bindegewebe angeordnet sind. Er findet sich im gesunden erwachsenen Skelett lediglich an den Insertionsstellen von Bändern und Sehnen sowie übergangsweise als Kallusgewebe im Verlauf der Knochenheilung beim Knochenauf- und Knochenumbau. In Knochtumoren und Knochenmetastasen kommt Geflechtknochen pathologischerweise vor.

Lamellenknochen ist eine reifere Form der Knochenbildung. Die funktionelle Untereinheit des Lamellenknochens ist das Osteon. Es ist aus bis zu 20 konzentrischen Speziallamellen zusammengesetzt, welche einen Zylinder mit dem Durchmesser von 200 bis 300 μm ergeben. Die Lücken zwischen Osteonen werden mit Schaltlamellen, die Resten älterer Osteone entsprechen, ausgefüllt. Bis zu 7 konzentrische Ringe von Osteozyten sind in die Wand des Osteons eingebaut. Mehrere Osteone sind zu Lamellen aufgebaut. Innerhalb der Lamellen sind Kollagenfaserbündel gegenläufig spiralig angeordnet, der Verlaufssinn und Steigungswinkel wechselt von Lamelle zu Lamelle. Durch den unterschiedlichen Verlauf entstehen bei Druck und Zug Flächenpressungen, die eine hohe Festigkeit erzeugen. Die Zugfestigkeit des Knochens ist vor allem durch die Kollagenfaserbündel und Lamellen, die Druckfestigkeit auch durch die eingelagerten anorganischen Substanzen bedingt. Alle Schichten sind als funktionelle Einheit den auf sie wirkenden Kräften ausgesetzt und reagieren auf diese durch Umbauvorgänge (*remodeling*). Während die Kortikalis bei Belastung an Dicke zunimmt, baut sich die Spongiosa im Verlauf der Krafrichtung (Spannungstrajektorien) um.

Die Durchblutung des Knochens erfolgt vorwiegend vom Periost, aber auch vom gut vaskularisierten Markraum aus. In der Längsachse von Röhrenknochen verlaufen die Gefäße im Zentrum von Osteonen, den sogenannten HAVERSschen Kanälen. Querverbindungen zu anderen Osteonen werden über die VOLKMANNschen Kanäle hergestellt.

Im erwachsenen Skelett herrscht normalerweise ein Gleichgewicht zwischen Knochenauf- und -abbau. Den physiologischen Prozess, durch den die Knochenmasse zwischen dem Ende der Pubertät und dem Ausfall der Gonadenfunktion annähernd konstant gehalten wird, nennt man *Knochenremodeling*. Eine Akkumulation der Knochenmasse (Osteopetrose oder Osteosklerose) ist ebenso wie ein Knochenverlust (Osteoporose) als Störung des *remodeling*prozesses anzusehen (LAZNER et al., 1999).

Die Regulation der Knochenmasse wird über Parathormon (gebildet in den Epithelkörperchen der Nebenschilddrüse), Kalzitinin (aus der Schilddrüse) und Vitamin D (mit seinen Vorstufen aus Haut, Leber und Niere) gesteuert. Die genannten Hormone sind für die Menge an Knochenmasse und die Regelung der Calcium- und Phosphatkonzentration im Blut zuständig. Zwischen Knochen und Blut herrscht ein Fließgleichgewicht der Calcium- und Phosphatkonzentration.

Eine zentralnervöse Steuerung der Knochenmasse wird durch Leptin postuliert (AMLING et al., 2001). Leptin ist ein Polypeptidhormon welches von Adipozyten sezerniert wird. Leptin

ist das Produkt des ob-Gens, einem Hormon, dessen Aktivität in ob/ob-Mäusen (einem Mausmodell für Adipositas) fehlt. Leptin ist der stärkste endokrine Inhibitor der Knochenformation. Die Regulation erfolgt über den im Hypothalamus gelegenen Rezeptor des Leptins. Der Rückkopplungsmechanismus ist bisher nicht ausreichend verstanden.

Viele Erkrankungen des Skelettsystems sind auf eine Dysfunktion des Regelkreises oder eine gestörte Osteoblasten- oder Osteoklastenfunktion zurückzuführen (Osteomalazie, Rachitis, Osteoporose, Osteopetrose, Hyperparathyreoidismus, Morbus Paget etc.). Ein Knochen, der in seinem biologischen System keiner Belastung mehr ausgesetzt ist, atrophiert. Ein belasteter Knochen hypertrophiert. Wenn die auf ihn einwirkende Kraft seine Belastbarkeit übersteigt, bricht er.

Während 90 bis 95 Prozent der vorkommenden Knochenbrüche laut EINHORN und TRIPPEL (1997) zufriedenstellend ausheilen, kommt es in 5 bis 10 Prozent zu einer verzögerten oder ausbleibenden Knochenheilung. Unabdingbare Voraussetzung für die ungestörte Knochenbruchheilung ist eine erhaltene oder wiederhergestellte Vaskularisation der Frakturenenden (SCHENK und HUNZIKER, 1995).

Es werden die primäre und sekundäre Knochenbruchheilung unterschieden. Für die primäre Knochenbruchheilung ist die absolute Ruhigstellung der Fragmente durch eine Osteosynthese mit exakter Reposition der Fragmente notwendig. Die primäre Knochenbruchheilung verläuft ohne Kallusbildung. Nach der Aktivierung der Zellen am Frakturspalt kommt es zunächst zur Resorption des direkt beteiligten Knochenmaterials für den Zeitraum von etwa einem Monat und danach zur Formation von neugebildetem Knochen (ARF-Regel von FROST, 1966 und 1989). Frost hat sich intensiv mit dem Phänomen des *remodeling* beschäftigt. Er nennt den zugrundeliegenden Zellkomplex BMU („Basic Multicellular Unit of Bone Remodeling“). Die Zeitdauer für den ARF-Prozeß in einem typischen BMU beträgt 3 Monate (FROST, 1966). In diesem Zeitraum wird durch Osteoblasten etwa die gleiche Menge an Knochen ersetzt, die durch Osteoklasten resorbiert wurde.

Die sekundäre Knochenbruchheilung ist durch die Frakturkallusbildung gekennzeichnet. Kallus entsteht im Bereich des Frakturhämatoms, welches zunächst durch Einwachsen von Fibroblasten organisiert wird. Es kommt dadurch zu einer zunehmenden Versteifung im Frakturbereich, durch Geflechtknochen bildet sich eine ossäre Brücke. Am Ende der sekundären Frakturheilung wird der Geflechtknochen im Sinne des *remodeling* zu Lamellenknochen umgebaut, der Frakturkallus weitgehend wieder abgebaut.

Die sekundäre Knochenbruchheilung ist nicht auf die rigide Osteosynthese angewiesen und wird auch als biologische Form der Frakturheilung bezeichnet. Der sekundären Form liegt damit ein anderer Mechanismus der Frakturheilung zugrunde, sie stellt keineswegs eine minderwertig Form dar. Während die mit klassischen Plattenosteosynthesen versorgten Frakturen durch primäre Knochenbruchheilung ausheilen, findet man bei allen Formen der intramedullären Nagelung und der Behandlung im Gips die hier erwünschte sekundäre Knochenbruchheilung.

2.1 Osteoblasten

Der Knochenaufbau wird durch Osteoblasten bewerkstelligt. Osteoblasten entstehen über Osteoprogenitorzellen und Präosteoblasten aus pluripotenten mesenchymalen Stammzellen. Es handelt sich um plasmareiche, basophile Zellen, die perlschnurartig dem neugebildeten Osteoid anliegen (siehe Abbildung 24). Ihr größter Durchmesser beträgt 20-30 µm. Der Zellkern weist einen oder mehrere gut ausgebildete Nukleoli auf. Ultrastrukturell (siehe auch Abbildung 48 und Abbildung 49) werden neben einem gut entwickelten GOLGI-Apparat mit Centriolen ein raues endoplasmatisches Retikulum und viele Ribosomen beschrieben (THYBERG et al., 1975). Zahlreiche Mitochondrien und Lysosomen sind im Zytoplasma verteilt. Zytoplasmafortsätze lassen sich noch bis in die nicht mineralisierte Grundsubstanz hinein nachweisen.

Die Osteoblasten bilden die unverkalkte Interzellulärsubstanz (Osteoid) des Knochens, in die sie allmählich eingeschlossen und damit zu nicht mehr teilungsfähigen Osteozyten werden (AUBIN, 1998). Sie bilden Kollagen Typ I, welches im Osteoid zu Kollagenfibrillen aggregiert. Osteoblasten erzeugen mit Hilfe des Enzyms Alkalische Phosphatase (AP) hohe Phosphatkonzentrationen. Diese führt durch lokale Überschreitung der Löslichkeit zu einem Niederschlag von Calciumphosphat. Ein Osteoblast kann entweder als Knochendeckzelle an der Knochenoberfläche bestehen bleiben oder über die Vorstufe des Präosteozyten zum Osteozyten werden. Dabei wird er in die von ihm gebildeten Matrix eingemauert. Die Lebensdauer der Osteoblasten beträgt beim Menschen zwischen drei Tagen und 8 Wochen (SOMMERFELDT und RUBIN, 2001).

2.2 Osteozyten

Osteozyten machen 90% der Zellen des Knochens aus. Nach der Einlagerung in das von Osteoblasten produzierte Osteoid werden diese als Osteozyten bezeichnet. Die kuboide Form der Osteoblasten wandelt sich hin zur flachgedrückten, längsovalen Form der Osteozyten. Die

ohne Zellfortsätze 6-15 µm großen Zellen liegen in knöchernen Höhlen, den Lakunen. Die Zytoplasmafortsätze der Osteoblasten bleiben bei den Osteozyten erhalten, sie sind 20-30 µm lang. Die dendritischen Fortsätze verlaufen in kleinen Kanälen (Canaliculi), die zu einem Netzwerk verbunden sind und mit dem die Osteozyten in engem Kontakt zu ihren Nachbarzellen und Blutgefäßen stehen. Über die Fortsätze sind die Osteozyten nicht nur miteinander verbunden, auch der Austausch von Ionen und Molekülen im Sinne eines Informationsnetzwerkes ist möglich. Sind beim Osteoblasten anfänglich noch 7 bis 9 Zellfortsätze feststellbar, vergrößert sich die Anzahl im Laufe der Differenzierung zum Osteozyten auf 16 bis 20 (KAISER und DELLING, 2002). Osteozytenfortsätze, die zur Knochenoberfläche gerichtet sind, kommen häufiger vor und sind länger als solche, die ins Knocheninnere laufen. Der Osteozyt ist damit eine zur Oberfläche orientierte Zelle (MAROTTI, 2000). Beim Ablauf von Stoffwechselprozessen und bei der Versorgung der Osteozyten nimmt das Kanalsystem eine zentrale Stellung ein. Auch auf die nicht-Osteoklasten-vermittelte Calciumfreisetzung aus dem Knochen haben Osteozyten einen großen Einfluss.

Ultrastrukturell sichtbar verlieren die der Matrixproduktion dienenden Zellorganellen der Osteoblasten an Bedeutung, zurück bleibt der im Verhältnis zum Zytoplasma deutlich größere Zellkern der Osteozyten (siehe Abbildung 51). Die Anzahl der Zellfortsätze des Osteoblasten steigt auf seinem Weg vom Präosteozyten zum Osteozyten hin deutlich an. Die Synthese von Kollagen Typ I, Alkalischer Phosphatase, Cbfa und Periostin wird stark vermindert, dafür steigt jedoch die Expression von Osteocalcin, Connexin 43, Bone Sialoprotein und Osteonectin stark an (AARDEN et al., 1996 und HORIUCHI et al., 1999).

2.3 Osteoklasten

Die vielkernigen Osteoklasten sind für den Knochenabbau zuständig. Sie entstehen aus Vorläuferzellen der Monozyten-/ Makrophagenfraktion des Knochenmarks (FUJIKAWA et al., 1996) und liegen in den von ihnen gebildeten Knochenresorptionsräumen, den HOWSHIP-Lakunen (siehe Abbildung 32). Ihr Durchmesser kann bis zu 100µm betragen. Auf der dem Knochen oder Implantat zugewandten Seite findet sich ein Bürstensaum, der „*ruffled border*“ des Osteoklasten. Der „*ruffled border*“ stellt das Resorptionsorganell des Osteoklasten dar. Ultrastrukturell sind außerdem die „*sealing zone*“ als Anheftungsorganell, Aktinfilamente, zahlreiche unregelmäßig gestaltete Zellkerne, Vakuolen, viele Mitochondrien und perinukleär der GOLGI-Apparat sichtbar (siehe Abbildung 41 und Abbildung 43).

Osteoblasten und Osteoklasten wirken als funktionelle Umbaueinheit. Eindrucksvoll im Hinblick auf die Aktivität ist das zahlenmäßige Verhältnis von Osteoklasten zu Osteoblasten: ein Osteoklast vermag pro Zeiteinheit gleich viel Knochengewebe abzubauen, wie 100 bis 150 Osteoblasten aufgebaut haben. Osteoblasten und Osteoklasten kommunizieren über zahlreiche parakrine Faktoren. APase (Alkalische **Phosphatase**)-positive Knochenmarkszellen, zu denen auch Osteoblasten gezählt werden, haben die Fähigkeit, die Differenzierung und Aktivierung von Osteoklasten zu regulieren (KONDO et al., 2001).

1997 wurde ein Inhibitor der Osteoklastenformation in Form von **Osteoprotegerin (OPG)** und seines **Liganden (OPG-L)** gefunden (ROODMAN, 1999; AUBIN und BONNELYE, 2000). Beide Moleküle binden den transmembranösen Rezeptor **RANK (receptor activator of nuclear factor κ B)**, der auf Osteoklastenvorläuferzellen ausgebildet ist. RANK ist der Rezeptor für **RANK-L (RANK-Ligand: Synonym verwendet wird der Begriff ODF [osteoclast differentiation factor])**. Dieser Messenger ist laut HOFBAUER und HEUFELDER (2000) das Ziel von zahlreichen Botenstoffen im Knochenstoffwechsel wie Vitamin D, Parathormon, Östrogen, Prostaglandin E₂, Interleukinen und dem Tumor-Nekrose-Faktor (siehe Abbildung 1). Die Fusion der Osteoklastenvorläuferzellen zu mehrkernigen Osteoklasten erfolgt durch **M-CSF (Makrophagen Colonie-Stimulierenden Faktor)** und die **RANK-L-RANK Interaktion (BUCKLEY und FRASER, 2002)**. Eine Hemmung dieser Aktivierung ist durch die Bindung von OPG an RANK-L möglich. RANK-L ist ein wichtiger Faktor für die Osteoklastenaktivität. So erfolgt die Knochenresorption beispielsweise beim Mammakarzinom über die verstärkte Bildung von RANK-L und der damit verbundenen erhöhten Osteoklastenaktivität (ROODMAN, 2003). Auch für die Aufrechterhaltung des Calciumspiegels spielt die RANK-L-RANK Bindung eine wesentliche Rolle: ausgeschüttetes Parathormon kann aufgrund des fehlenden Rezeptors nicht direkt auf die Osteoklasten wirken. Osteoblasten produzieren nach Parathormonstimulation RANK-L, nach Aktivierung des Osteoklasten kommt es zur vermehrten Knochenresorption und damit Anhebung des Calciumspiegels (TEITELBAUM, 2000; KORNAK et al., 2003)

Die Regulation der Knochenmasse und Knochenheilung nach Fraktur erfolgt unter anderem auch über **Insulin-like Growth Factor**, der nach TRIPPEL (1998) einen Weg der Kaskade des **Growth Hormons (GH)** fortsetzt, welcher mit dem **Growth Hormon releasing Hormon (GHRH)** aus der Hypophyse beginnt.

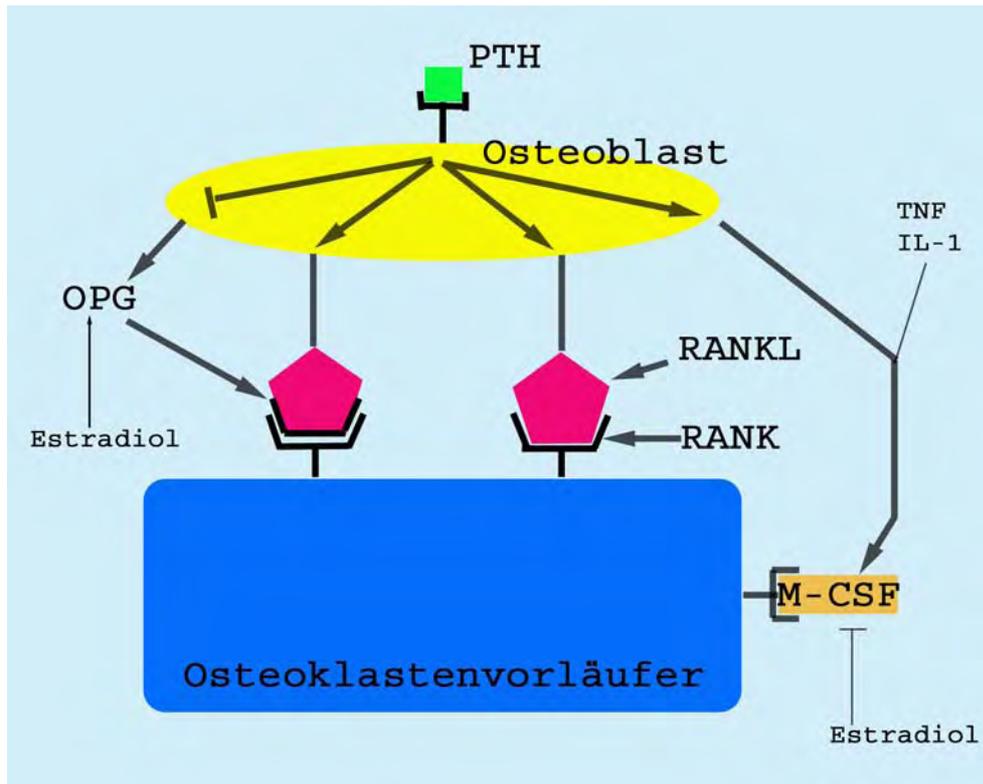


Abbildung 1: Schemazeichnung zum RANK/RANKL/Osteoprotegerin-System

Parathormon (PTH) der Nebenschilddrüse wirkt stimulierend auf Osteoblasten. Diese bilden daraufhin RANKL (receptor activator of nuclear factor Kappa B-ligand), der an seinen Rezeptor RANK auf der Zelloberfläche von Osteoklasten und Osteoklastenvorläuferzellen bindet. Durch die Bindung kommt es zu verstärkter Bildung und Aktivität der Osteoklasten. Das durch kompetitive Hemmung antagonistisch wirkende von Osteoblasten sezernierte Protein Osteoprotegerin (OPG) bindet ebenfalls an RANK. Parathormon hemmt die Osteoprotegerinbildung, Estradiol fördert sie. Tumornekrosefaktor (TNF) und Interleukin 1 (IL-1) fördern die Entstehung des von Osteoblasten sezernierten „macrophage colony-stimulating factor“ (M-CSF), dies führt zur vermehrten Entstehung der Osteoklastenvorläuferzellen. Estradiol hemmt die M-CSF Entstehung. (Schemazeichnung modifiziert nach KORNAK et al., 2003)

Grundlage für eine Knochenresorption durch Osteoklasten ist die Anlagerung an die zu resorbierende Substanz. Hierbei haben Integrine eine bedeutende Funktion (DUONG und RODAN, 1998 und 1999). Integrine sind Transmembranproteine, die aus einer α - und einer β -Kette bestehen. Das klassische Integrin des Osteoklasten ist $\alpha v \beta 3$ (ZAIDI et al., 2003). Über $\alpha v \beta 3$ verbindet sich der Osteoklast mit Proteinen der Extracellulärmatrix wie dem *bone sialoprotein*, *Fibronectin*, *Vitronectin* und *Osteopontin* (McKEE und NANCI, 1996). Die Erkennung von Extrazellulärmatrixproteinen ist somit ein wichtiger Schritt für die Anheftung des Osteoklasten.

Nachdem der Osteoklast eine direkte Verbindung mit dem zu resorbierenden Knochen über seine Anheftungsstelle, die „sealing-zone“, hergestellt hat, beginnt der Degradationsprozess. Über umfangreiche Membranaufwerfungen zur Oberflächenvergrößerung, den „*ruffled border*“, sezerniert der Osteoklast Säure in die Resorptionslakune, welche über eine

Protonenpumpe generiert wird (siehe Abbildung 2). Durch den so hergestellten niedrigen pH-Wert von 3 bis 4 (VÄÄNÄNEN und HORTON, 1995; VÄÄNÄNEN et al., 2000) löst er den mineralischen Knochenanteil auf. Übrig bleibt der organische Knochenanteil, welcher mit Hilfe der vom Osteoklasten gebildeten Proteinasen Cathepsin K und Matrix-Metalloproteinase 9 (MMP-9) weiter abgebaut wird. Während Cathepsin K die Schlüsselrolle in der Degradation zukommt, sind Matrix-Metalloproteinasen wie MMP-9 auch an der Regulation der Anlagerung des Osteoklasten an den Knochen beteiligt (DELAISSE et al., 2000).

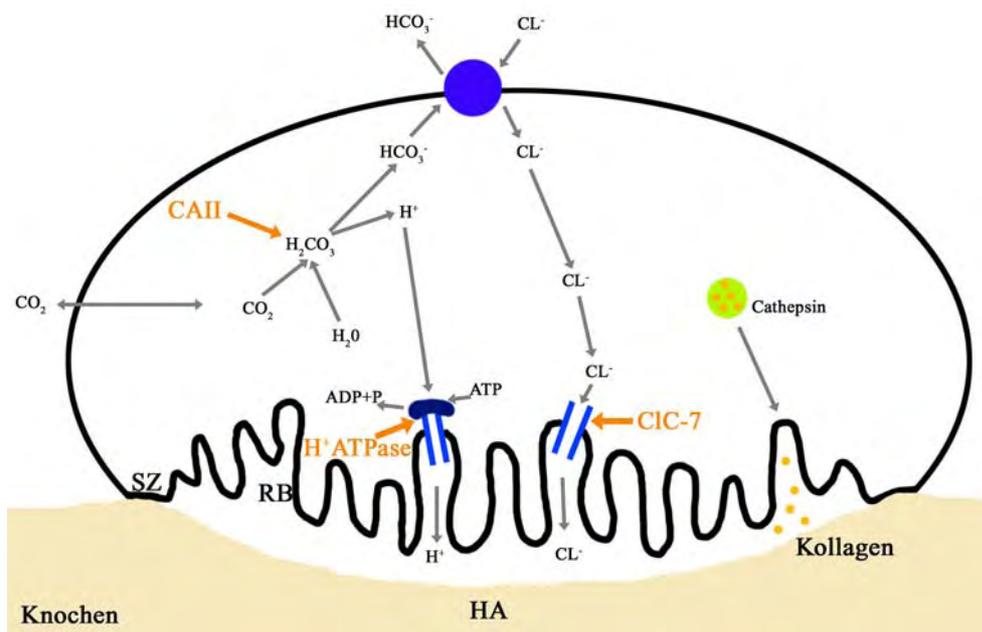


Abbildung 2: Schemazeichnung zur Knochenresorption des Osteoklasten

Wirkungsmechanismus der Knochenresorption des Osteoklasten. Ein Osteoklast hat sich mit seiner „sealing zone“ (SZ) an den unten im Bild liegenden Knochen angelagert. Durch die Carboanhydrase Typ II (CAII) werden im Cytoplasma des Osteoklasten Protonen und Bicarbonat aus Kohlendioxid und Wasser generiert. Über eine ATP-abhängige Protonenpumpe (H^+ ATPase) werden H^+ -Ionen, durch einen spannungsgesteuerten Chloridionenkanal (CLC-7) Cl^- Ionen in die unter dem Bürstensaum („ruffled border“ RB) erkennbare Resorptionslakune geschleust. Die Freisetzung der Calciumionen aus dem Hydroxylapatit (HA) des Knochens erfordert die Sekretion großer Mengen Säure. Die Matrixproteine des Knochens (vor allem Kollagen) werden durch die von Vesikeln ausgeschütteten sauren Proteinasen (vor allem Cathepsin K) abgebaut. (Schemazeichnung modifiziert nach BARON et al., 1985; TEITELBAUM, 2000; VÄÄNÄNEN et al., 2000 und KORNAK et al., 2003)

Die Identifikation von Osteoklasten basiert auf morphologischen Kriterien, die idealerweise elektronenmikroskopisch zu ermitteln sind. Des weiteren erfolgt sie durch den enzymhistochemischen Nachweis von tartratresistenter saurer Phosphatase (TRAP), die immunhistochemische Detektion des Calcitoninrezeptors (ITONAGA et al., 2003) und von Aktinfilamenten der „sealing zone“.

3 KNOCHENERSATZMATERIALIEN

Vor der Beschreibung von biologischen und synthetischen Knochenersatzmaterialien wird kurz auf die operativen Verfahren zur Rekonstruktion von Knochendefekten mittels autogener-, allogener- und xenogener Knochen transplantation sowie auf die Kallusdistraction als Alternativverfahren eingegangen.

Die **autogene Knochen transplantation**: Der Ersatz von Knochen durch körpereigenen Knochen einer anderen Lokalisation wird als autogene Knochen transplantation bezeichnet. Die Vorteile der autogenen Knochen transplantation sind in der hohen biologischen Wertigkeit des Transplantates zu sehen. Die Gefahr der Abstoßung aufgrund von Unverträglichkeiten oder Infektionen mit Hepatitis-, HI-Viren, Bakterien, Prionen oder anderen Krankheitserregern besteht nicht. Die Gefahr der Tumorzellverschleppung aus einem anderen Organismus entfällt. Die Entnahme des spongiösen oder kortikospongiösen körpereigenen Knochens erfolgt je nach Größe und Lokalisation des aufzufüllenden Defektes meist am Beckenkamm, Tibiakopf, distalen Radius oder am Olekranon. Nach einer traumatischen Amputation kann das Amputat bei fehlender Replantationsmöglichkeit als autogenes Spendermaterial noch wichtige Aufgaben im Sinne einer autogenen Transplantation übernehmen. Das Verfahren der autogenen Knochen transplantation ist besonders als gefäßgestielte Ersatzplastik, gegebenenfalls auch mit Weichteilgewebe, erfolgversprechend (KÄRCHER, 2000).

Laut SAILER und WEBER (2000) erfolgt die Vaskularisierung der porösen Spongiosa 10 mal schneller als von vergleichbarer Kortikalis. Zur Auffüllung von längeren Schaftdefekten ist auch die autogene Transplantation von langen Knochenstücken wie zum Beispiel der Fibula oder einer Rippe denkbar. Die lokale Transposition von paarigen Knochen kann am Unterschenkel erfolgen (Fibula pro Tibia), am Unterarm wird sie nur selten angewendet (RUEGER, 1997). Aufgrund der sehr guten Einheilung des Transplantates und dem meist komplettem Einbau wird die autogene Knochen transplantation auch heute noch als der „Goldstandard“ angesehen (GUNZBURG et al., 2001). SCHNETTLER und DINGELDEIN konnten 1997 nachweisen, dass der Durchbau einer autogenen Spongiosaplastik in einem standardisierten Zylinderdefekt vom Lagerknochen ausgeht. Zu keinem Zeitpunkt war im Inneren des Transplantates eine beginnende Knochenneubildung erkennbar. Die autogene Knochen transplantation dient somit als ideale Leitschiene für den vom Rand des Transplantates einwachsenden Knochen (Osteokonduktion). Der Nachteil der autogenen Knochen transplantation besteht in der begrenzten Verfügbarkeit sowie in den

möglichen Komplikationen des Zweiteingriffes. Eine zusätzliche Operationsnarbe bleibt darüber hinaus sichtbar. Als häufigste Komplikationen treten Hämatome, Wundheilungsstörungen, Nervenläsionen und lokale Wundinfekte auf (WIPPERMANN et al., 1997). Denkbar ist eine Schwächung der Knochenstruktur an der Entnahmestelle. Bei Kindern erscheint für die Entnahme autogener Transplantate aufgrund des noch nicht abgeschlossenen Wachstums Zurückhaltung geboten. Sensibilitätsstörungen im Entnahmegebiet sind häufig. Intraoperativ ist das Umlagern des Patienten mit erneutem sterilen Abwaschen und Abdecken verknüpft, so dass es zu einer Verlängerung der Operations- und Narkosezeit und den damit verbundenen Risiken und Kosten kommt. Vorbestehende, bislang unerkannte Tumore im Entnahmegebiet des Knochens können zu ernsthaften Komplikationen führen (STULL und KNEISL, 2002).

Die **allogene Knochentransplantation**: Als allogene Transplantation wird die Gewebe-/ Organübertragung eines genetisch nicht identischen (fremden) Spenders der gleichen Art auf den Empfänger bezeichnet. Der Vorteil für den Empfänger liegt in dem erspartem Zweiteingriff. Dagegen überschattet eine Reihe von Nachteilen diese Möglichkeit der Transplantation. Die entnommenen Knochen müssen sterilisiert oder kryokonserviert und weiter aufgearbeitet werden. Die mechanischen Eigenschaften können sich verändern. Trotz dieser Maßnahmen kann eine Übertragung von Viren, Bakterien, Prionen oder Karzinomzellen letztlich nicht sicher ausgeschlossen werden (RÜBSAMEN-WAIGMANN, 1997).

Es besteht darüber hinaus das Risiko einer Antikörperbildung bei blutgruppeninkompatibler Transplantation mit Gefahr der Ausbildung eines Morbus haemolyticus neonatorum im Falle einer späteren Schwangerschaft.

Das potenzielle Risiko einer Übertragung für HIV-Viren durch tiefgefrorenen, nicht bestrahlten und unbehandelten Knochen wird von DELLOYE et al. (2003) mit Eins zu einer Million, für die Übertragung von Hepatitis C-Viren mit Eins zu 200.000 angegeben. Insbesondere vor Einführung der HIV-Antikörpernachweismethode im September 1985 durchgeführte allogene Knochentransplantationen haben zu mehreren bekanntgewordenen HIV Infektionen geführt. SCHRATT et al. (1996) führen insgesamt 5 Fälle von HIV Infektionen nach Entnahme von Knochentransplantaten bei zwei Spendern im November 1984 an. Über 3 weitere Fälle berichten SIMONDS et al. (1992). Die Entnahme erfolgte bei einem serologisch HIV-negativem Spender, bei welchem retrospektiv mittels PCR-Analyse das HI-Virus

nachgewiesen wurde. Auf Hepatitis C –Virus Infektionen nach Knochentransplantationen weisen CONRAD et al. (1995) hin.

Oft stammen die Transplantate aus Operationen von älteren Menschen (beispielsweise entnommener Hüftkopf im Rahmen der Implantation einer Hüftgelenktotalendoprothese). Die Spongiosa im Hüftkopf eines alten Menschen ist meist durch Fettmark ersetzt und stellt damit ein Transplantat von fraglicher osteogenetischer Potenz dar, auch steigt das Risiko einer Karzinomzellbelastung des Knochens mit zunehmendem Alter. Nachteilig ist das aufwändige und kostenintensive Führen einer Knochenbank.

Eine Sonderform der allogenen Knochentransplantation stellt die Implantation von demineralisiertem kortikalen Knochen dar (**d**emineralisierte **K**nochen**m**atrix: DKM, **d**emineralisierte **b**one **m**atrix: DBM). URIST beschreibt in zahlreichen Versuchen die osteoinduktive Wirkung von DBM. (URIST 1968; URIST et al., 1970; URIST 1973; URIST et al., 1977). Die osteogenetischen Faktoren (Osteoinduktion) sollen bei der DBM im Gegensatz zu den anorganischen Materialien (Osteokonduktion) erhalten bleiben.

Osteoinduktion ist ein biologisches Prinzip, unter dem man die Fähigkeit des knöchernen Stützgewebes versteht, nach Transplantation durch induktive Eigenschaften des Transplantates aus eigener Kraft neuen Knochen zu bilden (SCHWEIBERER et al., 1986). Nach URIST et al. (1970) handelt es sich bei der Osteoinduktion um eine postfetale Osteogenese, welche über die Differenzierung pluripotenter Mesenchymzellen zur Knochenneubildung am heterotopen Ort führt. Die Applikation von Knochenwachstumsfaktoren wie dem **b**one **m**orphogenetic **p**rotein (bmp) ist nach der Entdeckung (URIST et al., 1979; URIST und MIKULSKI, 1979) und seiner rekombinanten Herstellung möglich geworden.

SCHNETTLER (1993) konnte in seinen tierexperimentellen Untersuchungen am Minischwein keinen osteostimulativen Effekt der DBM im Femurbohrlochdefekt auf die Osteogenese nachweisen. Die oben beschriebene von URIST gesehene osteoinduktive Wirkung der DBM stammt aus Untersuchungen an Mäusen, Ratten, Meerschweinchen und Kaninchen. Die günstigen Ergebnisse an Nagetieren können nicht uneingeschränkt auf höhere Tiere übertragen werden. So sahen auch THIELEMANN et al (1991) keine osteoinduktive Wirkung der DBM auf den experimentellen Defekt der Hundetibia.

Die **xenogene Knochentransplantation**: Unter xenogener Transplantation wird die Übertragung von Gewebe und Organen zwischen zwei verschiedenen Spezies verstanden (zum Beispiel vom Tier auf den Menschen). Für die xenogene Knochentransplantation wird

vor allem boviner Knochen verwendet, der bei Temperaturen von über 1000° Celsius gesintert und daher als frei von potentieller infektiöser Kontamination beschrieben wird.

Die Möglichkeit des Prionentransfers wird kontrovers diskutiert. Während WENZ et al. (2001) aufgrund von theoretischen und experimentellen Untersuchungen davon ausgehen, dass die von Ihnen untersuchten Knochentransplantate bovinen Ursprungs kein Risiko bezüglich der Übertragung von Prionen darstellen, kommen HONIG et al. (1999) in ihren Untersuchungen zu einem anderen Schluss. Sie untersuchten ebenfalls ein Knochenersatzmaterial bovinen Ursprungs. Vom Hersteller wurde die Substanz als frei von organischem Material beschrieben. Polarisationsmikroskopisch und färbetechnisch fand sich der Hinweis auf Proteine. Ein Prionentransfer sei somit theoretisch möglich. Ein effektives und aktives Risiko-Management-Programm bezüglich der Auswahl und Verarbeitung von boviner Substanz kann den Prionentransfer minimieren (Risikoanalyse von SOGAL und TOFE, 1999).

Verwendung finden ebenso Keramiken aus Korallen. Der Vorteil der xenogenen Transplantate gegenüber den autogenen Transplantaten liegt in der ausreichenden Verfügbarkeit. Ein interkonnektierendes Porensystem ist bei den xenogenen Transplantaten meist, bei synthetisch hergestellten Knochenersatzstoffen dagegen selten zu finden. Es ermöglicht die Erschließung des Transplantates durch den Wirtsknochen. Nach Implantation erfolgt in der Regel die Integration des Transplantates durch Osteokonduktion, eine Neubildung von Knochen mittels Osteoinduktion tritt jedoch nicht auf (SCHWEIBERER et al., 1986). Im Kaninchenversuch wurde ein geringer Abbau von Hydroxylapatitkeramiken gezeigt (MÜLLER-MAI et al., 2001). Mit einem kompletten Umbau des Transplantates ist jedoch nicht zu rechnen.

Für die knöcherne Rekonstruktion von langstreckigen Vollschafdefekten der großen Röhrenknochen hat sich die **Kallusdistraction** (Segmentverschiebung nach ILISAROV, welcher die Technik von CODIVILLA (1905), PUTTI (1921) und BIER (1923) weiterentwickelte), bewährt. Das Verfahren beruht auf der Tatsache, dass sich frischer Kallus erheblich modulieren lässt, wenn man ihn rhythmischer oder kontinuierlicher Dehnung aussetzt. Der Knochen wird im metaphysären Bereich mit einem Klingenmeißel zur Prävention von Hitzenekrosen durchtrennt (Kortikotomie). Dabei ist auf sorgfältige Schonung des Periostschlauches zu achten. Die Stabilität wird durch einen Fixateur externe, einen Ringfixateur (von ILISAROV 1951 erstmals vorgestellt, WIEDEMANN, 1996) oder einen intramedullären Verriegelungsnagel mit anliegendem Transportfixateur gewährleistet. Nach

Organisation des Hämatoms um die Kortikotomie herum beginnt 5 bis 7 Tage später die Distraction. Nach dieser Latenzphase hat die Regeneration des Periostes und Revaskularisation des Knochenmarkes begonnen (HANKEMEIER et al., 2004). Während der Distractionsphase bildet sich ein Knochenregenerat um den durchtrennten Knochen herum, welches sich langsam (in 4 Schritten von jeweils 0,25 Millimeter pro Tag) über einen Transportfixateur ziehen lässt. Nachdem die gewünschte Knochenlänge erreicht ist, reift der Knochenschlauch je nach Alter des Patienten 3 bis 5 Tage pro gezogenem Millimeter Wegstrecke bei noch liegendem Transportfixateur, da dieser sonst eine Schrumpfungstendenz zeigt (ILIZAROV, 1990; MONTICELLI und SPINELLI, 1981; MONTICELLI et al., 1981). In dieser Konsolidationsphase werden wie bei der Frakturheilung Heilungsvorgänge durch Mikrobewegungen stimuliert. Hat der Knochen die Dockingstelle erreicht und ist gereift, erfolgt meist eine Spongiosaplastik, um die knöcherne Konsolidation der Dockingstelle zu gewährleisten. Die Entfernung des Fixateurs sollte erst bei sicherer radiologischer Durchbauung erfolgen. Mit der Kallusdistraction können auch langstreckige Defekte einschließlich Weichteilmantel überbrückt werden. Die Nachteile des Verfahrens liegen in

- der langen Dauer der Behandlung (sowie der damit verbundenen Gefahr der Entzündung von Fixateurpineintrittsstellen)
- der Einsteifung von Gelenken (bei gelenküberbrückenden Fixateurmontagen)
- Schmerzempfindungen während des Distractionsvorganges

Knochenersatzmaterialien werden bestimmte Eigenschaften zugeschrieben. Sie werden von ALBREKTSSON und JOHANSSON (2001) nach folgenden Kriterien beurteilt:

- Osteokonduktivität; die Fähigkeit des Knochens auf einem Material zu wachsen
- Osteointegration; die stabile Verankerung des Implantats im Wirtsknochen
- Osteoinduktivität; die Eignung des Implantates zur Anregung von Knochenneubildung im heterotopen (ersatzschwachen) Lager.

Als ersatzschwache Lager werden im Sinne von LEXER (1911) „spontane Reparationsvorgänge, die über eine unwesentliche, auf den Defektrand beschränkte Knochenapposition nicht hinausgehen“ bezeichnet, „während ein ersatzstarkes Knochenlager von sich aus in der Lage ist, einen gegebenen Knochendefekt weitgehend oder völlig zu erneuern“ (zitiert nach SCHNETTLER, 1993).

Die Gruppe der Knochenersatzmaterialien ist vielgestaltig. Faktoren, nach denen einzelne Gruppen untereinander und miteinander verglichen werden können, sind nach OSBORN (1979) die folgenden:

- Biotoleranz (Gewebeverträglichkeit)
- Bioinertheit (der Einfluss, den ein Stoff auf sein Wirtsgewebe hat)
- Bioaktivität (die Reaktion, die er in seinem Wirtsgewebe auslöst)

Umgesetzt auf die Knochenersatzstoffe bedeutet das:

- Löst das Knochenersatzmaterial eine Umgebungsreaktion aus (Entzündung, Unverträglichkeitsreaktion)?
- Wird es vom Wirtsknochen umschlossen und erschlossen (Osteokonduktivität)?
- Regt es die Knochenneubildung des Wirtsgewebes an (Osteoinduktivität)?

Wichtig ist weiterhin, ob ein Stoff abbaubar ist oder dauerhaft als Fremdkörper im Knochen vorliegt. Von Autoren werden unterschiedliche Einteilungen für Knochenersatzmaterialien vorgenommen. RÜGER (1998) schlägt folgende 4 Klassen vor:

I.: biologisch, organische Substanzen

II.: synthetische, anorganische Materialien

III.: synthetische, organische Verbindungen

IV.: Kompositen.

Knochenersatzmaterialien werden nach HENCH und CLARK (1982) entsprechend ihrer Oberflächen-Reagibilität eingeteilt. Als „oberflächen-aktive Biomaterialien“ werden Substanzen bezeichnet, welche eine Bindung mit der Umgebung eingehen können. Hierzu zählen **H**ydroxylapatitkeramiken (HA) und **T**ricalciumphosphatkeramiken (TCP).

Ein Knochenersatzmaterial sollte folgende Eigenschaften aufweisen (SCHNETTLER und DINGELDEIN, 2002):

- eine gute lokale und systemische Verträglichkeit zeigen
- kein allergisches Potential beinhalten, keine Abstoßungsreaktion hervorrufen
- Osteokonduktion vermitteln
- Stimulation der Knochenheilung oder Osteoinduktion auslösen (Komposite)
- komplette Füllung eines knöchernen Defektes ermöglichen

- Fähigkeit zum Ersatz des Knochenersatzmaterials durch vorzugsweise lasttragenden, lamellären Knochen schaffen

3.1 biologische Knochenersatzmaterialien

3.1.1 Hydroxylapatit

Natürliche HA-Keramiken werden meist als xenogene Transplantate von Rindern oder Korallen hergestellt. Apatite sind komplexe Salze mit Ca^{2+} als Zentralatom. Als Liganden sind drei $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ -Moleküle gebunden, die je zwei Koordinationsstellen einnehmen. Hydroxylapatit hat die chemische Formel $[\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2]$. Hydroxylapatit (HA) stellt in Bezug auf die räumliche Anordnung des Kristallgitters eine Sonderform der Calciumphosphate dar. HA ist der Hauptbestandteil des anorganischen Knochenanteils. HA ist in wässriger Lösung die stabilste Form der Calciumphosphate (BOHNER, 2000; SCHNÜRER et al., 2003).

Verwirrend ist die Namensgebung im Bereich der Knochenersatzmaterialien. Es werden durch Sinterung von oberhalb 800° Celsius erhaltene Hydroxylapatite als Hydroxylapatit (HA) bezeichnet. Zur besseren Unterscheidung werden die durch thermische Behandlung erhaltenen Hydroxylapatite in dieser Arbeit als HA-Keramiken bezeichnet. Diese Unterscheidung wird in der Literatur jedoch nicht durchgängig verwendet.

Bovine HA-Keramiken werden folgendermaßen hergestellt: zunächst werden die Rinderknochen durch Sägen in Streifen grob zerkleinert, dann durch mehrmaliges Kochen in Wasser vorentfettet. Daran anschließend erfolgt die Pyrolyse der organischen Bestandteile oberhalb von 700° Celsius. Bei hohen Temperaturen (oberhalb von 1200° Celsius für 5 Stunden Dauer) findet die Sinterung des Transplantates statt. Materialeigenschaften wie mechanische Festigkeit und Sprödigkeit werden hauptsächlich durch die Brennbedingungen bestimmt (SCHNETTLER, 1993; BOULER et al., 1996).

Die gute Biokompatibilität von HA-Keramiken ist durch zahlreiche tierexperimentelle und klinische Studien belegt (EGGLI et al., 1988; SCHALLER et al., 1993; SCHNETTLER, 1993; DINGELDEIN et al., 1994; SCHNETTLER et al., 1994; HING et al., 1997; REVELL et al., 1997; SCHNETTLER und DINGELDEIN 2002; TRÖSTER und LIEBENDÖRFER, 1997; SAILER et al., 1999; BRIEM et al., 2002; SCHNETTLER et al., 2003). Es kommt nach der Implantation zunächst zur Ausbildung von Knochenkontakten mit dem Ersatzmaterial. Eine Induktion der Knochenneubildung (Osteoinduktion) nach Implantation von HA-Keramiken ist nicht nachweisbar (SCHNETTLER und DINGELDEIN, 1997).

Das Einwachsen des Knochens in das Ersatzmaterial ist von der Lokalisation und Durchblutung des Implantationsortes sowie besonders von der Porengröße des Implantates abhängig. Für das Einwachsen von Bindegewebe ist ein minimaler Porendurchmesser von 5 bis 15 μm notwendig (KLAWITTER und HULBERT, 1971). Allerdings wird zur Ausbildung von osteonartigen Strukturen ein deutlich größerer Porendurchmesser benötigt, da es sonst zu Einschnürungserscheinungen im Verlauf des Wachstums kommen kann. Auf die große Bedeutung der Erschließung einer Keramik mit Blutgefäßen vor dem knöchernen Durchbau wird hingewiesen (SCHNETLER et al., 2003). Ein interkonnektierendes Porensystem von wenigen hundert μm Größe (TADIC et al., 2004) ist für die vollständige Erschließung der Hydroxylapatitkeramik notwendig (Osteokonduktion). Anders als die xenogenen HA-Keramiken haben synthetisch hergestellte HA-Keramiken den Nachteil, meist nicht über ein interkonnektierendes Porensystem zu verfügen. Nicht interkonnektierende Poren einer HA-Keramik werden lediglich aufgefüllt, eine Erschließung des Implantates wie bei den Calciumphosphat-Implantaten (zum Beispiel Tricalciumphosphat TCP, siehe unten) oder biologischen HA-Keramiken erfolgt nicht.

HA-Keramiken unterliegen im Langzeitverlauf keiner relevanten Biodegradation. Lediglich ein geringer Abbau durch chemisch-physikalische Auflösung und Fragmentation wird beschrieben (SPECTOR, 1991). Es ist damit von einem nahezu lebenslangen Verbleib der Keramik am Implantationsort auszugehen.

Wenn neugeformter Knochen das Porensystem eines osteokonduktiven Knochenersatzmaterials erschlossen hat, ändern sich die Knochen-Implantat-Konfiguration und ihre ursprünglichen biomechanischen Eigenschaften (SCHNETTLER et al., 2004). Es besteht eine hohe Korrelation zwischen der Menge des in ein interkonnektierendes Porensystem eingewachsenen Knochens und der Biegesteifigkeit der HA-Keramik (MARTIN et al., 1989; HING et al., 1997).

Wie oben beschrieben zeigen HA-Keramiken eine gute Osteokonduktivität. Ein Nachteil kann jedoch die operativ anspruchsvolle Verankerung in einem unregelmäßig gestalteten Defekt aufgrund der fehlenden plastischen Eigenschaften der HA-Keramiken sein.

Hydroxylapatit lässt sich ebenso aus dem Exoskelett von Korallen gewinnen. Auch sie besitzen ein interkonnektierendes Porensystem (HOLMES et al., 1984; POOL, 1995). In einer tierexperimentellen Arbeit an Hunden konnten SARTORIS et al. (1987) die gute Osteokonduktion und Verträglichkeit der Korallenimplantate in der Radiusdiaphyse zeigen. Zu einer Degradation der Keramik kam es nicht. GUIGUI et al. (1994) zeigten den Durchbau

einer posterolateralen spinalen Arthrodesse beim Schaf mit Korallenimplantaten bei allen 11 Schafen nach einem Jahr.

3.1.2 Pflanzliches Calciumphosphat

Knochenanaloges Calciumphosphat kann auch aus Pflanzen (Algen) gewonnen werden. Im Handel ist es als Granulat in drei verschiedenen Korngrößen unter dem Namen Algipore® (Friadent GmbH, Mannheim, Deutschland) zugelassen. SCHLEGEL et al. (2003) untersuchten die knöcherne Regeneration im 1x1 Zentimeter durchmessenden Defekt im Os frontale von weiblichen Schweinen. Sie konnten bei zunehmender Mineralisation des Defektes im Knochen den Abbau des pflanzlichen Calciumphosphates zeigen (53% Durchbau nach 26 Wochen).

3.2 synthetische Knochenersatzmaterialien

3.2.1 Calciumphosphat

Calciumphosphat wurde zunächst in Form von Blöcken als gesintertes Calciumphosphat hergestellt, bis es BROWN und CHOW 1985 erstmals gelang einen Zement herzustellen, welcher mit Wasser vermischt, unter Raumtemperatur aushärtete (US Patent 1985, 1986). Knochenersatzstoffe aus Calciumphosphat sind heute in unterschiedlicher Form erhältlich. Es gibt Formkörper als Quader, Zylinder, Scheiben und Granulat oder auch Calciumphosphatzement in Form eines Pulvers, das mit Flüssigkeit zu einer Paste angemischt wird. Synthetisch hergestellte Knochenersatzmaterialien aus Calciumphosphat weisen ein stöchiometrisches Calcium/ Phosphatverhältnis zwischen 1,0 und 2,0 auf. Es entspricht damit der Zusammensetzung der im menschlichen Knochen am häufigsten vorkommenden Verbindungen Hydroxylapatit (HA) (siehe auch Abschnitt 3.1) und Tricalciumphosphat (TCP).

BOHNER (2001) beschäftigte sich mit dem Abbauverhalten von Knochenersatzstoffen aus Calciumphosphaten. Er unterteilt die Calciumphosphatzemente in „*low temperature*“ und „*high temperature*“ Calciumphosphate. Die „*low temperature*“ Calciumphosphate (CaP) werden aus einem CaP Pulver und einer wässrigen Lösung gemischt. Durch Präzipitation entsteht eine Paste, die innerhalb von Minuten aushärtet. Die „*high temperature*“ CaP erhält man durch eine thermische Reaktion, typischerweise oberhalb von 1000° Celsius. Abgesehen von den Herstellungsverfahren liegt der große Unterschied in der Oberfläche: „*low temperature*“ CaP haben eine spezifische Oberfläche von mehr als 100m²/Gramm, die „*high*

temperature“ CaP hingegen von rund 1m²/Gramm. BOHNER (2000) leitet die sehr viel größere Aktivität beziehungsweise Reaktivität der „*low temperature*“ CaP von diesem Oberflächenunterschied ab. Die Löslichkeiten verhalten sich entsprechend: in Wasser sind die „*low temperature*“ CaP sehr viel besser löslich als die „*high temperature*“ CaP. Nach DRIESSENS und VERBEECK (1988) ist die Löslichkeit in Wasser die wichtigste Eigenschaft der Calciumphosphate, da anhand dieser Eigenschaft ihr in vivo Verhalten in großem Umfang vorausgesagt werden kann. Die Beobachtung stimmt mit den experimentell gefundenen Abbauraten überein („*low temperature*“ CaP sind degradierbar, „*high temperature*“ CaP sind dies kaum) GOAD et al., 1997; SCHNETTLER und DINGELDEIN 1997; WIPPERMANN et al., 1999.

Calciumphosphatzemente gehören in die Gruppe der präzipitierten Hydroxylapatite („*low temperature*“ CaP). Sie haben ein Calcium/Phosphat Verhältnis von 1,50 bis 1,67 und ähneln der mineralischen Knochenkomponente. Auch das hier untersuchte Calciumphosphat-Implantat Biobon[®] gehört in diese Gruppe (BOHNER, 2000).

Synonym mit präzipitiertem Hydroxylapatit wird der Name **calcium-defizientes-Hydroxylapatit (CDHA)**, aber auch tricalcium-Phosphat (TCP) benutzt. Aufgrund der ungleichen Kristallstruktur wird α -TCP und β -TCP unterschieden. Bei den „*low temperature*“ Calciumphosphatzementen handelt es sich, falls TCP verwendet wurde, immer um α -TCP. Bei gleicher chemischer Zusammensetzung resultieren unterschiedliche Eigenschaften von α -TCP und β -TCP. Das wichtigste Unterscheidungsmerkmal von α -TCP ist seine gegenüber β -TCP bessere Löslichkeit in Wasser und die daraus ableitbare schnellere Degradierbarkeit. Sprachlich besser wäre sicher die konsequente Kennzeichnung des TCP als α -TCP. Zur Herstellung von α -TCP wird β -TCP über 1125° Celsius erhitzt (WELCH und GUTT, 1961). Der Begriff der „*low temperature*“ Calciumphosphate bezieht sich damit nicht auf den Herstellungsprozeß, bei dem wie oben ausgeführt β -TCP auf über 1125° Celsius erhitzt werden muss, sondern auf die Anmischung des Zementes bei Raumtemperatur.

Die Calciumphosphatzemente werden alle aus einer wässrigen Lösung und einem oder mehreren Calciumphosphaten hergestellt. Während des Mixens der Komponenten löst sich die Calciumphosphatkomponente und präzipitiert in ein weniger lösliches Calciumphosphat. Während der Präzipitationsreaktion wächst das Calciumphosphatkristall an und verknüpft sich, dadurch wird eine gewisse Stabilität erreicht. Anders als bei den PMMA Zementen (**P**olymethyl**m**etacrylat), die zur Verankerung von Prothesen in der Unfallchirurgie und operativen Orthopädie verwendet werden, härten die Calciumphosphatzemente nicht durch

Polymerisation, so dass nur wenig Wärme frei wird. Das Volumen der Calciumphosphatzemente bleibt während des Anmischungsprozesses weitgehend konstant. Die Zugfestigkeit der Calciumphosphatzemente ist 5 bis 20 Mal kleiner als ihre Kompressionsfestigkeit. Daher müssen sie in belasteten Arealen immer mit einer Osteosynthese kombiniert werden. Um in vivo injizierbar zu sein, müssen Calciumphosphatzemente zwei Eigenschaften aufweisen:

1. Die Zementpaste muss durch eine schmale, lange Nadel passen und darf dabei keine Änderung der Konsistenz erfahren. Eine Entmischung erfolgt, wenn die Flüssigkeit ungenügend an die Zementbestandteile gebunden ist. Dann tritt ein Filter-Effekt auf: Die Flüssigkeit wird ohne die Calciumphosphatbestandteile ausgepresst.
2. Kohäsion: Der innere Zusammenhalt der Moleküle muss gewährleisten, dass die Paste ohne Desintegration aus der Spritze ausgetrieben werden kann.

Obwohl das hier getestete Calciumphosphat-Implantat injizierbar ist, wurde die Applikation (siehe Abschnitt 4.5) mit einem Spatel vorgenommen, um theoretisch vorhandene Probleme bei der Injektion auszuschließen.

Die Porosität ist ebenfalls ein sehr wichtiger Faktor für die Abbaubarkeit von Knochenersatzmaterialien. Die Porosität der Calciumphosphatzemente ist stark vom Verhältnis des Pulvers zur Flüssigkeit abhängig. Ein hohes Pulver/Flüssigkeits-Verhältnis geht mit einer niedrigen Porosität einher. Die mechanischen Eigenschaften sinken mit der Zunahme der Porosität (BOULER et al., 1996). DRIESENS (1999) hat die mechanischen Eigenschaften des in dieser Untersuchung getesteten Calciumphosphat-Implantates Biobon[®] mit 4 ± 1 Megapascal (Mpa) angegeben. Es weist eine Porosität von 80% auf, die Aushärtungszeit beträgt 19 ± 1 min. Im Vergleich zu anderen Calciumphosphatzementen ist es damit hochporös, aber wenig stabil. Die Notwendigkeit der hohen Primärstabilität eines Calciumphosphat-Implantates ist nicht absolut zu sehen. Die Stabilität soll in der rekonstruktiven Unfallchirurgie und Orthopädie die Osteosynthese übernehmen. Formschlüssigkeit und durch die hohe Porosität bedingt eine gute Durchdringung des Implantates mit neugebildetem Knochen ermöglichen nach Durchbau des Implantates wie bereits oben beschrieben eine neue Knochen-Implantat-Konfiguration und damit auch andere biomechanischen Eigenschaften (SCHNETTLER et al., 2004).

Das hier untersuchte Calciumphosphat-Implantat ist aus **Dicalciumphosphatdihydrat** (DCPD) und amorphem Calciumphosphat hergestellt. Als Endprodukt ergibt sich präzipitiertes Hydroxylapatit. DCPD ist bisher auch im menschlichen Körper im Frakturkallus (LENART et

al., 1972), im Knochen (MÜNZENBERG und GEBHARDT, 1973) sowie in Nierensteinen (WERNESSE et al., 1981) nachgewiesen worden. Es ist das Calciumphosphat mit der größten Löslichkeit, es ist biokompatibel und osteokonduktiv.

In tierexperimentellen Studien konnte die Abbaubarkeit der tricalciumphosphathaltigen Knochenersatzmaterialien gezeigt werden. Im ersatzschwachen Lager ist zunächst eine bindegewebige Einscheidung und später die Resorption über zahlreiche Makrophagen und Fremdkörperriesenzellen sichtbar. Sowohl der vollständige Abbau als auch das langzeitige Bestehen (RUEGER et al., 1998) im ersatzschwachen Lager ist in Studien beobachtet worden. Eine Knochenneubildung (Osteoinduktion) in der Muskulatur nach Implantation von TCP-Knochenersatzmaterial tritt nicht auf.

Calciumphosphatzemente sind in klinischer Anwendung bereits in fast allen Lokalisationen untersucht worden. Als Beispiele seien hier genannt:

- Kieferknochen (EPPEY, 1999; FRIEDMAN et al., 1998)
- Kalkaneusfrakturen: (THORDARSON et al., 1999; SCHNETTLER und DINGELDEIN, 2002)
- Hüfte (STANKEWICH et al., 1996; GOODMAN et al., 1998)
- Vertebroplastie (BAI et al., 1999)
- Tibiafrakturen (FRANKENBURG et al., 1998)

Gemeinsam ist den Calciumphosphatzementen in den oben angeführten Studien eine ausgezeichnete Verträglichkeit. Sie sind sicher und formschlüssig durch ihre pastöse Eigenschaft im Knochendefekt platzierbar und zeigen alle eine deutliche Degradierbarkeit.

3.2.2 Calciumsulfat

Calciumsulfat kommt in der Natur weitverbreitet in Form von Gips vor. Durch Erhitzen auf 120 bis 180° Celsius verliert Gips $\frac{3}{4}$ seines Wassergehaltes und geht in das Hemihydrat über, den sogenannten gebrannten Gips. Gepulvertes Hemihydrat, das mit Wasser verrührt wird, härtet exotherm bei Temperaturen zwischen 33 und 50 °Celsius zu einer festen Masse aus (HÖGSET und BREDBERG, 1986).

Ende des 19. Jahrhunderts wurden Patienten mit tuberkulösen Knochenveränderungen, Osteomyelitiden und Enchondromen behandelt, indem die Knochenhöhlen mit flüssigem Calciumsulfat aufgefüllt wurden. Seitdem wird Calciumsulfat als Knochenersatzmaterial, auch unter dem Namen "Plaster of Paris", verwendet. Es handelt sich um

Calciumsulfatdihydrat ($\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$), und hat fast die gleiche Zusammensetzung und Kristallstruktur wie Dicalciumphosphatdihydrat (neben amorphem Calciumphosphat der Hauptbestandteil des hier untersuchten Calciumphosphat-Implantates, siehe auch Abschnitt 4.3). Beide Verbindungen haben ein ähnliches Molekulargewicht. Allerdings ist Calciumsulfatdihydrat bei normalem pH-Wert 10 mal besser wasserlöslich als Dicalciumphosphatdihydrat (BOHNER, 2000) Über die Resorbierbarkeit und Neubildung von Knochen liegen sehr unterschiedliche Ergebnisse vor (DELLOYE et al., 2003). In der Regel wird eine sterile Entzündung in Abhängigkeit vom jeweiligen pH-Wert beobachtet. Daher wird Calciumsulfat in der klinischen Anwendung immer mehr von den Calciumphosphat-Implantaten verdrängt. Eine Erklärung für die Ausbildung der sterilen Entzündung kann die große Menge von Säure sein, die sich bei der Hydratation bildet. Die Säurebildung von Calciumsulfat ist nach COETZEE (1980) vom Lösungsmittel abhängig. Dienen physiologische Kochsalzlösung oder steriles Wasser als Lösungsmittel, so besitzt das Calciumsulfat einen pH-Wert von 6,8. Wird dagegen 20%ige Natriumchlorid-Lösung verwendet, so sinkt der pH-Wert auf unter 6 ab. Extrazelluläre Flüssigkeit weist physiologischer Weise einen pH-Wert von 7,4 auf.

Die Degradierbarkeit der verschiedenen Knochenersatzmaterialien wird von BOHNER (2000) wie folgt angegeben: Calciumsulfatdihydrat > α -TCP > β -TCP > HA

3.2.3 Composites

Composites bestehen aus verschiedenen Knochenersatzmaterialien, die miteinander kombiniert werden. In diese Gruppe gehören alle Verbindungen von biologischen und synthetischen, organischen und anorganischen Substanzen, die Verwendung als Implantat im Knochen finden. Die Vielzahl der vorhandenen Composites zeugt von den Versuchen, die unterschiedlichen Materialeigenschaften verschiedener Knochenersatzmaterialien in einem Knochenersatzstoff zu vereinigen. Auch Knochenersatzmaterialien, die mit Wachstumsfaktoren kombiniert werden, können als Composites angesehen werden (RÜGER, 1998).

Exemplarisch seien folgende Composites genannt:

- Hydroxylapatit oder Tricalciumphosphat mit Blutmarkaspiration, erstmals beschrieben von BURWELL (1961)

- Polymer-Calciumphosphat-composites: Hierbei handelt es sich um Kombinationen von organischen Polymeren mit Calciumphosphatkomponenten (MICKIEWICZ et al., 2002).
- Biphasische Keramiken: Sie bestehen aus Hydroxylapatit (HA) und Tricalciumphosphat (TCP). Gemäß den Eigenschaften von HA und TCP sind die biphasischen Keramiken partiell abbaubar. Die biphasischen Keramiken liegen in Gestalt von nicht formbaren Blöcken, Zylindern, Granulaten oder Pulver vor (DACULSI et al., 1990; GUIGUI et al., 1994).
- Polylaktid- und bioaktive Glaskomponenten (JAAKKOLA et al., 2004).
- Mit autogenen Osteoblasten beschickte Calciumphosphat-Implantate als Knochenersatzmaterial in der Wirbelsäule von Kaninchen (KAI et al., 2003).
- Silikat-Calciumphosphat-Composite als Matrix der Knochenneubildung (PORTER et al., 2003; EL-GHANNAM, 2004).
- Mit BMP (Bone Morphogenetic Protein) und Kollagen bestückte Tricalciumphosphatzylinder im Segmentdefekt des Schafes (GAO et al., 1996).
- Mit basischem Fibroblastenwachstumsfaktor beschichtete HA-Zylinder (SCHNETTLER et al., 2003)

4 MATERIAL UND METHODE

4.1 Versuchstiere und Haltung

Das Versuchsvorhaben wurde am 29.03.2000 nach §8a Absatz 1 und 2 des Tierschutzgesetzes in der Fassung vom 17. Februar 1993, BGBl I, 254 beim zuständigen Regierungspräsidenten angezeigt und von diesem in der vorliegenden Fassung genehmigt.

Es erfolgte die unilaterale Implantation des Knochenersatzmaterials Biobon[®] im Tibiakopf von 9 zwei Jahre alten weiblichen nichtträchtigen Merino Wollschafen. Als Kontrollgruppe wurden zusätzlich drei Tiere operiert, welche kein Knochenersatzmaterial erhielten (Leerdefekte).

Die Tiere wurden in 4 Gruppen von 3 Schafen in 4 jeweils 12 Quadratmeter großen Boxen in den Versuchstierstallungen der chirurgischen Veterinärklinik der Justus-Liebig-Universität in Gießen (Prof. Dr. med. vet. K. Bonath) untergebracht. Es erfolgte täglich eine tierärztliche Visite. Als Futter erhielten die Tiere Heu und Kraftfutter zu bestimmten Tageszeiten sowie Wasser ad libitum.

Zu Beginn der Aufstallung wurden eine eingehende Untersuchung zusammen mit einem laborklinischen Screening auf Rickettsien- und Chlamydienbefall und eine parasitologische Untersuchung anhand von Stuhlproben vorgenommen, um unter Umständen bereits vorhandene Infektionen oder weitere Erkrankungen auszuschließen.

Bei keinem der Tiere konnten dabei Hinweise auf das Vorliegen einer akuten oder chronischen Erkrankung gewonnen werden. Die parasitologische Untersuchung fiel bei allen Tieren negativ aus.

Die Identifikation der Tiere konnte durch eine Ohrmarke und eine große aufgemalte Ziffer am Rücken zweifelsfrei gewährleistet werden. Das Gewicht der Tiere betrug im Mittel 58,8 kg (51-66).

4.2 Diamond bone cutting System (DBCS)

Das **Diamond bone cutting system** (DBCS) (Biomet Merck, Darmstadt, Deutschland) geht auf die Entwicklung von DRAENERT (1987) zurück. Das Spezialinstrumentarium besteht aus innengeschülten Diamanthohlschleifen, und dazu in der Größe passenden Extraktoren. Mit der Innenspülung unter Druck gelingt es zum einen, das Abriebmaterial zu entfernen, und zum anderen, Wasserkühlung an den Knochen heranzubringen (SCHNETTLER, 1993). Ein

4 Material und Methode

spezieller Adapter wird zur Fixierung der Fräsen benötigt (siehe Abbildung 3). Die Schleifen liegen in verschiedenen Durchmessern vor. Es wurde eine Schleife mit 11 mm Durchmesser verwendet (siehe Abbildung 4). Auf der Außenseite der Hohl Schleife ist eine Markierung in Millimeter-Schritten angebracht, so dass standardisierte, artefaktfreie knöcherne Substanzdefekte von 11 mm Durchmesser und 25 mm Tiefe möglich waren (siehe Abbildung 5). Nach dem Schleifen der knöchernen Defekte erfolgte die Entnahme des Knochenzylinders mit dem Extraktor des zugehörigen Instrumentariums. Der Extraktor besitzt 3 Innenprofile. Diese verhindern eine Rotation und gewährleisten damit ein sicheres Abdrehen des Knochenzylinders an der Basis. Der Knochenzylinder wurde mit Hilfe eines Stößels aus der Hohl Schleife entfernt (siehe Abbildung 6). Das DBCS Instrumentarium wird in der Unfallchirurgie und Orthopädie für Knorpel-Knochen-Transplantationen sowie zur Knochen Transplantatgewinnung und -einbringung verwendet.

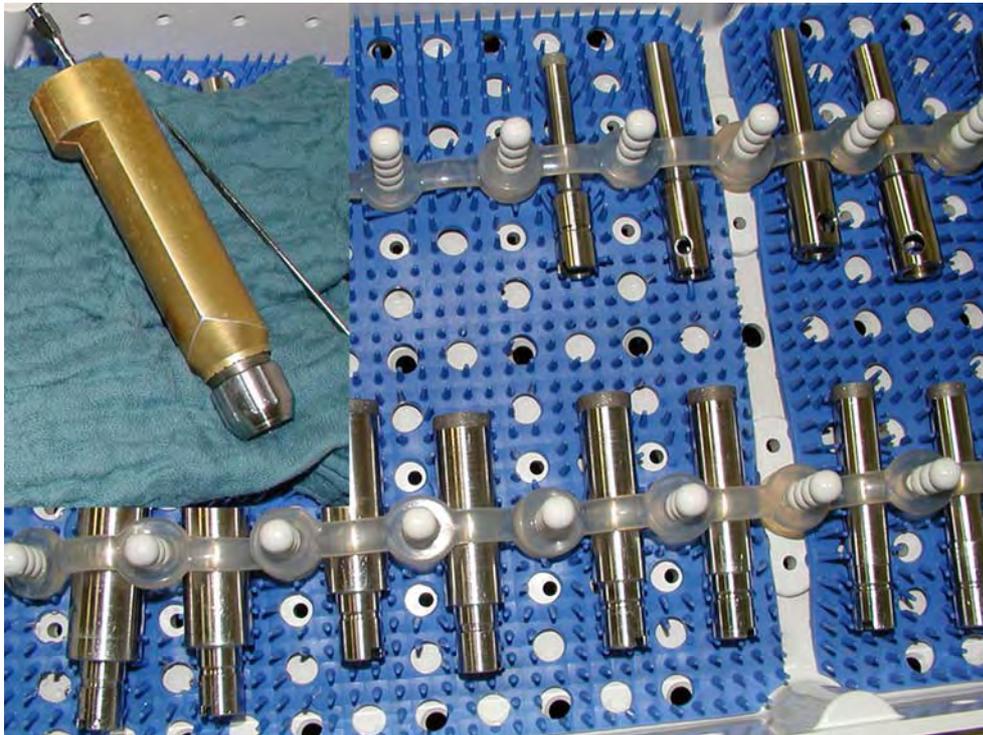


Abbildung 3: Foto: DBC System

Diamond Bone Cutting System mit innengekühlten Hohl Schleifen verschiedener Durchmesser, links oben im Bild der Adapter (in kleinerem Bildmaßstab), in welchen die Schleifen eingesetzt werden.

4.3 Prüfsubstanz: Calciumphosphat-Implantat (Biobon®)

Das Calciumphosphat-Implantat Biobon® (Merck Biomaterial GmbH, Darmstadt, Deutschland) ist ein in Deutschland zur Anwendung am Menschen zugelassenes Knochenersatzmaterial aus amorphem Calciumphosphat. Es ist zur Auffüllung oder Rekonstruktion von Knochendefekten bestimmt. Der Präparatenahme vor der Zulassung lautete α -BSM. Es handelt sich um ein vollständig synthetisch hergestelltes Material, das aus einem mikrokristallinen, hydroxylapatitartigen Calciumphosphat besteht. Die Komponenten Dicalciumphosphatdihydrat und amorphes Calciumphosphat ergeben als Endprodukt präzipitiertes Hydroxylapatit. Dieses entspricht in seiner chemischen Zusammensetzung und kristallinen Struktur im wesentlichen der natürlichen Calciumphosphatkomponente des Knochens. Es gehört in die Gruppe der Calciumphosphatzemente, also der *low-temperature*-Calciumphosphate (siehe auch Abschnitt 3.2.1) und wird als hygroskopisches Pulver in einem elastischen Ballon mit einer separat verpackten sterilen Kochsalzflüssigkeit und einer Spritze geliefert. Direkt vor der Applikation wird in dem Ballon durch Zugabe von 2 ml Kochsalzlösung zu den 2,5 Gramm Pulver die Paste durch Kneten des Ballons für mindestens 1 bis höchstens 3 Minuten angemischt. Für die percutane Applikation ist die entstehende Paste auch mit der mitgelieferten Spritze und einer 16G Kanüle injizierbar, in der vorliegenden Untersuchung wurde ein Spatel verwendet.

Das Knochenersatzmaterial härtet in situ endotherm aus. Nach DRIESENS (1999) beträgt die Kompressionsfestigkeit von Biobon® 4 ± 1 MPa. Es weist eine Porosität von 80% auf, die Aushärtungszeit beträgt 19 ± 1 min.

4.4 Narkose

Nüchternheit der Tiere wurde durch Fasten 24 Stunden präoperativ gewährleistet. Die Prämedikation zur Narkose erfolgte körperrgewichtabhängig mit Xylazin 2% (Bayer, Leverkusen, Deutschland) sowie Ketamin 10% (Parke-Davis, Berlin, Deutschland) intramuskulär. Die Narkose wurde mit Inhalation eines Isofluran-Sauerstoffgemisches eingeleitet und für die Dauer der Operation aufrechterhalten. Von der Narkoseeinleitung bis zum Narkoseende erfolgte die Überwachung der Tiere mittels EKG-Ableitung und Sauerstoffsättigung.

4.5 Operation und Nachbehandlung

Die operationstechnische Ausrüstung bestand aus OP-Tisch, Beleuchtung, Druckluftanschluss für die Hohlschleife sowie einer anästhesietechnischen Ausstattung mit Beatmungsgerät, Isofluran-Verdampfer, Elektrokardiogramm und Sauerstoffsättigungsmessung. Perioperativ erfolgte eine körperrgewichtabhängige Antibiose mit Procillin[®] 30 (Bela-Pharm, Vechta, Deutschland).

Die Tiere wurden in Linksseitenlage unter Fixierung der Extremitäten am Operationstisch gelagert und die linke Hintergliedmaße auf der Innenseite sorgfältig rasiert. Nach Desinfektion und sterilem Abdecken des Operationsgebietes erfolgte ein circa 4 cm langer Hautschnitt als ventromedialer Zugang zum Tibiakopf in Längsrichtung der Extremität. Der Tibiakopf wurde durch Präparation dargestellt, das Kniegelenk dabei nicht eröffnet. Mit Hilfe der innengekühlten Diamanthohlschleife entstand ein 25 mm tiefer und 11 mm durchmessender Defekt circa 5 bis 10 mm unterhalb der Gelenkfläche (siehe Abbildung 5, Abbildung 10 und Abbildung 11). Der Knochenzylinder konnte mit dem Extraktor entnommen werden (siehe Abbildung 6). Mit einer Kompresse erfolgte die Säuberung des zylindrischen Defekts von Blut vor Einbringung des angemischten Knochenersatzmaterials mit einem Spatel. Der zylindrische Defekt wurde vollständig mit der Calcium-Phosphat-Paste aufgefüllt.

Bei 9 Tieren kam Calciumphosphat-Implantat als Knochenersatzmaterial zum Einsatz. Weitere 3 Tiere mit unaufgefülltem Defekt dienten als Kontrollgruppe. Von dem entnommenen Knochenzylinder wurde eine Scheibe (Spongiosa) mit einem Meißel so abgetrennt, dass durch den resultierenden längsovalen Deckel der Defekt pressfit nach außen verschlossen werden konnte. Der Rest des entnommenen Knochenzylinders wurde verworfen. Der Faszienschluß über dem Defekt erfolgte mittels Vicryl[®]-Naht (Ethicon GmbH, Norderstedt, Deutschland), die Hautnaht mit einem monofilem Faden (Biosyn 2-0[®] USS DG, Norwalk, USA). Die Operationswunde wurde mit Nobecutan[®] Spray (Astra, Wedel, Deutschland) steril abgedeckt.

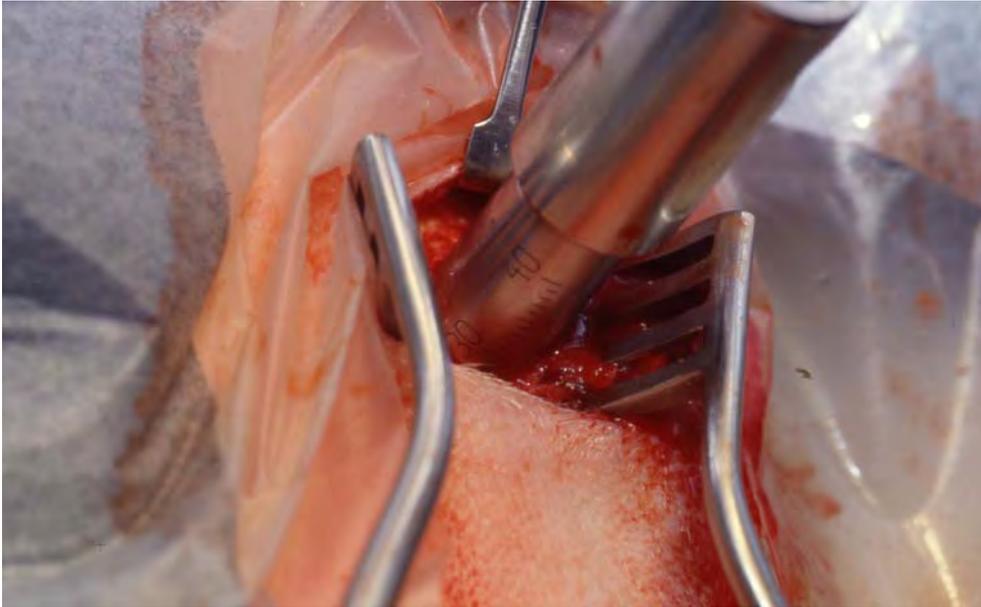


Abbildung 4: Foto: Schaffung des Bohrlochdefektes mit dem DBC System

Schaffung des Bohrlochdefektes mit dem Diamond Bone Cutting System nach Präparation des Tibiakopfes der linken Hintergliedmaße des Schafes medial. Tiefe des Bohrloches: 25 mm.

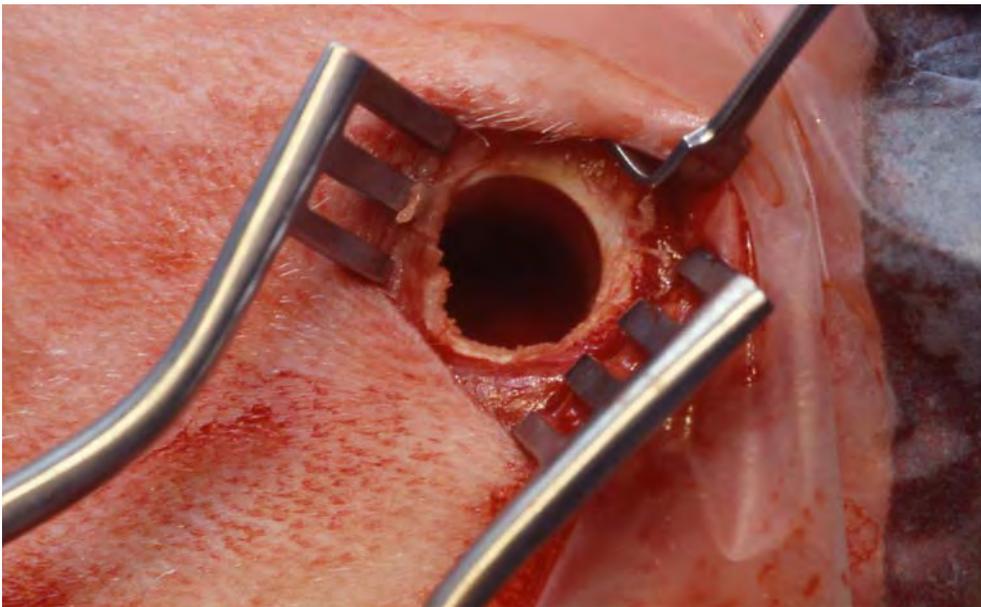


Abbildung 5: Foto: Bohrlochdefekt nach Entnahme des Bohrzylinders

Bohrlochdefekt im Tibiakopf mit 11 mm Durchmesser nach Entnahme des Bohrzylinders mit dem Extraktor.



Abbildung 6: Foto: Bohrlochzylinder

25 mm langer Bohrlochzylinder nach Entnahme aus dem Tibiakopf des Schafes. Durchmesser 11mm.

Zur Lagebestimmung des Implantates wurde bei allen Versuchstieren direkt postoperativ die Nativröntgenaufnahme der linken Tibia in zwei Ebenen durchgeführt. Die Aufnahmen erfolgten am Röntgengerät Selector MD 125/80 (Hofmann, Erlangen, Deutschland). Es wurde das Format 18x24 cm, Film-Folien-Kombination mit einem Film der Empfindlichkeitsklasse 100 und ein Fokus-Filmabstand von 100 cm gewählt. Die seitlichen Aufnahmen wurden mit einer Röhrenspannung von 57 kV und 14 Milliamperekunden, die anterior-posterioren Aufnahmen mit 70 kV 18 Milliamperekunden belichtet.

Die kontrollierte Aufwachphase wurde auf dicker Stroheinstreuung gewährleistet. Bis zum Abschluß der Wundheilung wurde die Haltung der Schafe in der Laufbox fortgesetzt und die Tiere mehrmals täglich klinisch kontrolliert. Protokolliert wurden das Verhalten der Tiere, ihre Bewegungsaktivität und Futteraufnahme sowie die Beschaffenheit der Wunde.

Zwei Tiere lahnten postoperativ (ein Tier aus der Calciumphosphat-Implantat-Gruppe und eines aus der Gruppe der Leerdefekte). Sie erhielten prophylaktisch postoperativ eine Antibiose mit Ceftiofur (Excenel[®], Pharmacia & Upjohn, Erlangen, Deutschland) für längstens 14 Tage. Zur Schmerztherapie erhielten alle Tiere für 3 Tage eine subcutane Injektion mit Metamizol (Novalgin[®], Hoechst, Bad Soden, Deutschland). Das Hautnahtmaterial wurde am 12. postoperativen Tag bei allen Tieren entfernt.

Am 16. und 20. postoperativen Tag begann die Fluorochrommarkierung mit Tetracyclin (Ursocyclin[®] 10% , Serumwerk Bernburg AG, Deutschland) (siehe auch Kapitel 4.6).

Anschließend erfolgte der Transport der Schafe aus ihren Laufboxen zurück zur Herde. Um eine Trächtigkeit auszuschließen, wurden die Versuchstiere getrennt vom Rest der Herde in einer großen Stallbox gehalten.

4.6 Fluorochrommarkierung

Um eine zeitliche Zuordnung der neugebildeten Knochenstruktur (turn-over) zu ermöglichen, wurde eine zeitlich versetzte Sequenzmarkierung durch Vitalfärbung mit Fluorochromen durchgeführt. Fluorochromfarbstoffe sind Chelat-Bildner, die zusammen mit Calcium in der Appositionszone des neugebildeten Knochens angereichert werden. Sie zeichnen sich durch eine Lumineszenz unter Bestrahlung mit ultraviolettem Licht aus. Die Farbstoffe wurden körperrgewichtabhängig subcutan appliziert. Zur Anwendung kamen:

- Tetracyclin (Ursocyclin[®] 10% , Serumwerk Bernburg AG, Deutschland), 30 mg/kgKG, am 16. und 20. Tag postoperativ bei allen Tieren
- Alizarin complexon (Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland), 30mg/kgKG, am 34. und 38. Tag postoperativ bei allen Tieren
- Calcein grün (Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland), 10 mg/kgKG, 9 und 5 Tage prämortem bei allen Tieren mit Ausnahme der 6-Wochen-Tiere

4.7 Perfusion und Tötung

Die Perfusion und Tötung der Tiere erfolgte jeweils 6, 24 und 48 Wochen postoperativ. An jedem Termin wurden 3 Tiere geopfert. Die Schafe mit den Leerdefekten wurden zusammen mit den letzten 3 Tieren der Calciumphosphat-Implantat-Gruppe nach 48 Wochen getötet. Nach gewichtsadaptierter Prämedikation mit Ketamin 10% und Xylazin[®] intramuskulär erfolgte die Vertiefung der Narkose durch intravenöse Gabe von Ketamin 10% und Xylazin[®] unter erhaltener Spontanatmung.

Das Operationsgebiet wurde rasiert und ein Hautschnitt in der linken Leiste gesetzt, um die Arteria und Vena femoralis präparatorisch darzustellen (siehe Abbildung 7). Das Anschlingen der Femoralgefäße erfolgte bei erhaltenem Kreislauf. Eine Knopfkanüle wurde in die Arteria femoralis links eingebunden, die Vena femoralis als Ablauf eröffnet. Die Tötung der Tiere wurde mit T 61[®] (Intervet, Unterschleißheim, Deutschland) exzitationsfrei durch intravenöse Gabe in die Vena cephalica durchgeführt.

Die Perfusion des linken Beines erfolgte mit warmer heparinisierter Ringerlösung (25.000 I.E. pro Liter Lösung), bis nur noch Spülflüssigkeit ohne makroskopisch erkennbare Blutanteile

aus der Vene austrat. Erst nach festgestellter Nulllinie im EKG erfolgte die Fixierung der linken hinteren Extremität durch Perfusion über den bereits angelegten Spülkatheter entweder mit Karnowsky-Lösung oder mit 4% Paraformaldehyd. Ziel der Perfusion war, das Knochengewebe optimal für die unterschiedlichen Nachbehandlungen zu fixieren. Die Tiere, die Eingang in die spätere morphologische Untersuchung finden sollten, wurden mit Karnowsky-Lösung (siehe Kapitel 4.9.3), jene, die auch Eingang in die enzymhistochemische Untersuchung finden sollten, wurden mit Paraformaldehyd perfundiert (siehe Kapitel 4.9.5).

Es handelt sich bei Karnowsky-Lösung um eine Zusammensetzung aus 4% Paraformaldehyd (Merck, Darmstadt, Deutschland) mit 2% Glutardialdehyd (Merck) in 0,1 molarem Natriumphosphatpuffer (Merck) pH 7,3. Die Perfusion wurde nach Einsetzen einer merkbar festen Konsistenz des Gewebes fortgesetzt, um auch schlechter vaskularisierte Areale sicher zu fixieren. Der Fixationserfolg wurde auch durch Strecken der Extremität sichtbar.

Nach Freipräparation der Tibiae uni- und kontralateral und Exartikulation im Kniegelenk erfolgte die Durchtrennung des Tibiaschaftes mit der Knochensäge und Aushöhlung des Knochenmarkes, um die Diffusion der Fixierlösung nicht zu behindern. Die Knochen wurden gekennzeichnet und in beschriftete Behältnisse mit Karnowsky-Lösung oder Paraformaldehydlösung (je nach geplanter Nachuntersuchung wie oben beschrieben) eingelegt.

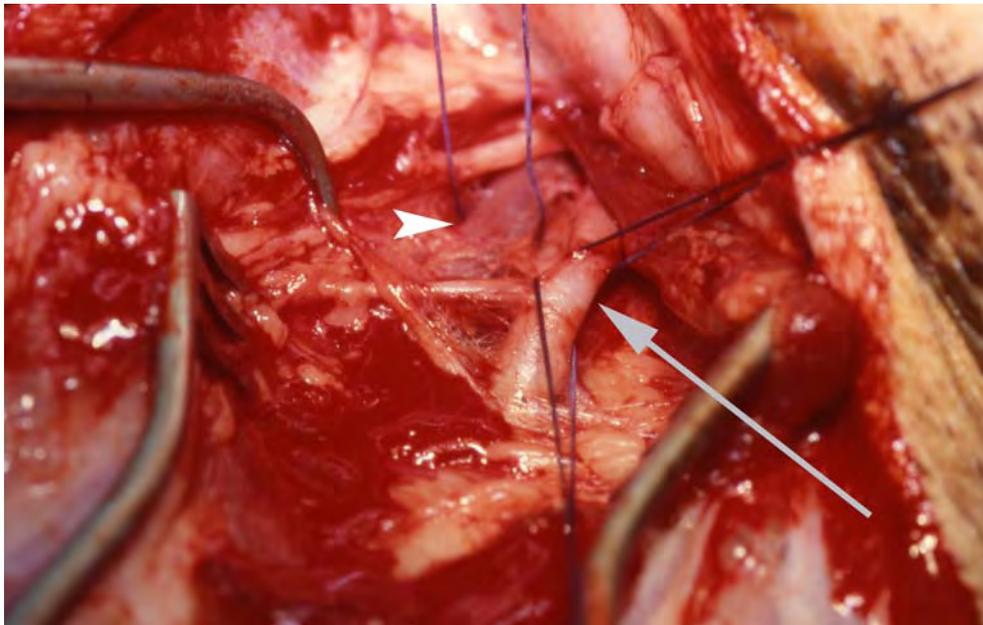


Abbildung 7: Foto: Präparationssitus für die Perfusion

Präparationssitus vor der Perfusion im Bereich der linken Leiste des Schafes. Direkt über der Arteria femoralis (grauer Pfeil) ist die Vena femoralis (weiße Pfeilspitze) angeschlungen. Die Präparation erfolgte am narkotisierten, noch lebenden Tier.

4.8 Computertomographie

Nach Tötung und Perfusion wurden die abgetrennten und präparierten linken Tibiaköpfe im Computertomographen in einer Schichtdicke von 0,5 mm untersucht (Somatom plus vier, Firma Siemens, Hamburg, Deutschland).

4.9 Histologische Untersuchungen

4.9.1 Aufsägen der Tibiae

Unmittelbar nach der computertomographischen Untersuchung erfolgte die Auftrennung der Tibiae, wie auch alle weiteren Schritte, im Labor für experimentelle Unfallchirurgie der Klinik und Poliklinik für Unfallchirurgie der Justus-Liebig-Universität Giessen. Zur Anwendung kam eine Knochenbandsäge (Exakt-Apparatebau, Norderstedt, Deutschland). Der Tibiakopf wurde sagittal, senkrecht zur Implantationsachse planparallel aufgetrennt. Nach Entfernung des Deckels wurden entsprechend den verschiedenen Einbettungsmedien folgende Knochenscheiben angefertigt:

- I Deckel
- II 4 mm dicke Scheibe für die Einbettung in Technovit 7200 VLC (Kulzer, Wehrheim/Ts., Deutschland) [Schlifftechnik und Fluoreszenz]
- III 2 mm dicke Scheibe für die Einbettung in Epon (Serva, Heidelberg, Deutschland) [Transmissionselektronenmikroskopie und Semidünnschnitte]
- IV 3 mm dicke Scheibe für die Einbettung in Technovit 9100 (Kulzer, Wehrheim/Ts., Deutschland) [Enzymhistochemische Untersuchung]
- V Reserve

Die Scheiben wurden für die Licht- und Elektronenmikroskopie in Karnovsky-Lösung und Yellow-Fix für die Enzymhistochemie in 4% Paraformaldehyd für weitere 12 Stunden bei 4° Celsius immersionsfixiert. Bei Yellow Fix handelt es sich um 2% Paraformaldehyd (Merck, Darmstadt, Deutschland) und 2% Glutaraldehyd (Merck) mit 0,02% Picrinsäure (Merck). Nach gründlichem Spülen in PBS (phosphate buffered saline, pH 7,2) begann die Entwässerung in einer aufsteigenden Alkoholreihe, bevor die Proben in die oben aufgeführten Einbettungsmedien überführt wurden. Die Auftrennung der rechten Tibiae, welche als Kontrollgruppe kein Implantat trugen, erfolgte in der gleichen Weise.

4.9.2 Trenn-Dünnschliff-Technik

Zur Herstellung dünner Schliffe unter 20 µm von nicht schneidbaren Geweben ist die Trenn-Dünnschliff-Technik von DONATH (1989) eine etablierte Methode. Die Herstellung der Schliffe erfolgte mit dem Exakt-Trennschleifsystem (Exakt-Apparatebau, Norderstedt, Deutschland). Danach wurden folgende Schritte bis zum fertigen Trenn-Dünnschliff-Präparat durchgeführt:

- 1.: planparallele Aufblockung mit der Exakt-Vakuum-Klebevorrichtung
- 2.: Kleben mit der Exakt-Präzisions-Klebepresse
- 3.: Dehydratation und Kunststoffinfiltration
- 4.: Einbettung und Polymerisation (DONATH, 1989)

4.9.3 Toluidinblaufärbung

Für die morphologische Untersuchung wurde das mit der Trenn-Dünnschliff-Technik erstellte Präparat mit Toluidinblau (Merck, Darmstadt, Deutschland) gefärbt. Hierbei wurden die Schliffe zunächst mit einer 10%igen H₂O₂-Lösung für 10 Minuten angeätzt, danach gründlich mit Wasser abgespült, getrocknet und anschließend 15 Minuten mit Toluidinblau gefärbt. Weitere Arbeitsschritte waren erneutes Abspülen und Abtrocknen, dann Eindecken mit Technovit 7200 (Kulzer, Wehrheim/Ts., Deutschland) und Polymerisation unter Blaulicht.

4.9.4 Fluoreszenzhistologie

Der ungefärbte histologische Schliff wurde am Axiophot 2 Lichtmikroskop (Zeiss, Göttingen, Deutschland), Lichtquelle: HBO 103 Fluoreszenzlampe (Zeiss), unter Verwendung des „set 25“ Dreifach-Filter (Zeiss) betrachtet. Die Bilddokumentation erfolgte durch eine aufgesetzte Digitalkamera (Sony, Japan).

4.9.5 Färbung mit tartratresistenter saurer Phosphatase (TRAP)

Semidünnschnitte von in Technovit 9100 eingebetteten Proben fanden Eingang in die enzymhistochemische Untersuchung. Nach Entplasten und Entwässerung der Schnitte kam folgendes Protokoll zum Nachweis der tartratresistenten sauren Phosphatase (TRAP) zur Anwendung: Inkubation für zwei Stunden bei 37°Celsius in TRAP-Lösung. Später erfolgte die Kernfärbung mit Haematoxylin für 5 Minuten gemäß der Färbeanleitung zu Technovit 9100 (Heraeus Kulzer, Wehrheim/Ts., Deutschland).

4.9.6 Semidünnschnitte und Transmissionselektronenmikroskopie (TEM)

Nach Fixierung wurden die Proben für 24 Stunden in 0,1 molarem Natrium-Phosphatpuffer (pH 7,3) gespült und für 150 Minuten in 1% Osmiumsäure (OsO_4) (Plano, Wetzlar, Deutschland) nachfixiert und kontrastiert. Es folgte Spülen mit Phosphatpuffer und die Entwässerung in einer aufsteigenden Alkoholreihe. Um ein besseres Eindringen des Einbettungsmediums Epon (Gemisch aus Glycidether, DDSA, MNA und DMP 30; Serva, Heidelberg, Deutschland) zu gewährleisten, wurden die Proben in Xylol verbracht. Deren Infiltration erfolgte in der aufsteigenden Xylol/Epon Reihe. Mit dem Exsiccator wurden noch vorhandene Luftblasen entzogen. Die Polymerisation des Epons erfolgte bei 60°Celsius für 20 Stunden. Die gehärteten Präparate wurden anschließend in kleine Blöcke (2x1x1 mm) gesägt und dann am Ultratrim (Leica, Bensheim, Deutschland) getrimmt.

Am Ultracut (Leica, Bensheim, Deutschland) wurden mit einem Glas- beziehungsweise Histodiamantmesser (Diatome, Biel, Schweiz) 0,5 bis 1 μm dicke Semidünnschnitte angefertigt (siehe Abbildung 8), die auf einem Wassertropfen schwimmend mit einem Holzstäbchen auf einen mit APES beschichteten Objektträger (Fluka, Buchs) aufgebracht und auf einer 70° Celsius warmen Wärmeplatte getrocknet wurden. Anschließend erfolgte die Färbung der Schnitte mit einer Lösung aus 1% Toluidinblau und 1% Borax. Nach dem Trocknen wurden sie mit Epon Einbettmedium eingedeckt.

Anhand der Übersichten in den Semidünnschnitten konnten Detailansichten für die Elektronenmikroskopie ausgewählt werden. Für die Elektronenmikroskopie wurden ultradünne Schnitte mit einer Dicke von 600-800 nm am Ultracut mit dem Diamantmesser 45° hergestellt und auf 3 mm Kupfernetze der Größe 100 mesh aufgezogen, welche mit einer dünnen Kollodiumfolie belegt waren. Die Nachkontrastierung dieser Schnitte mit Uranylacetat und Bleicitrat fand im Reichert Ultrastainer (Leica, Bensheim, Deutschland) statt. Anschließend wurden die Schnitte am Transmissionselektronenmikroskop EM 109 (Zeiss, Göttingen, Deutschland) mit einem Strahlstrom von 80 KV untersucht.

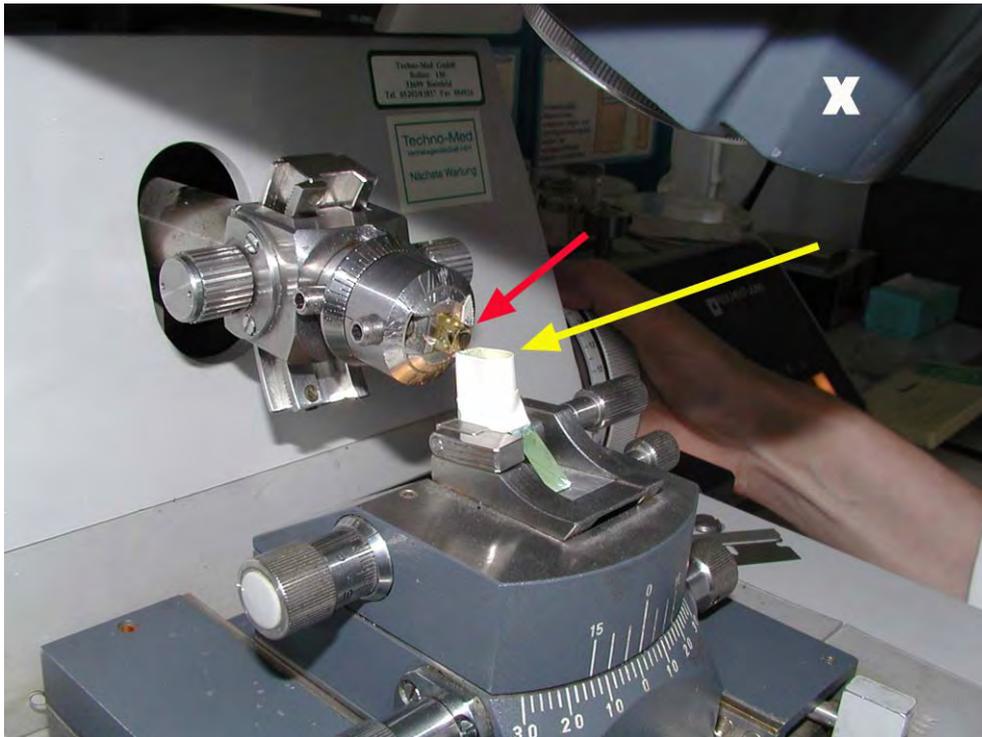


Abbildung 8: Foto: Ultracut

Ultracut der Firma Leica. Der probentragende polymerisierte Eponblock ist eingespannt (roter Pfeil), ein Glasmesser 45° (gelber Pfeil) schneidet 0,5 bis 1µm dicke Semidünnschnitte unter optischer Kontrolle durch die Mikroskopeinheit des Gerätes (weißes X oben rechts im Bild).

Für die Immunogold-Markierung der Aktinfilamente der Osteoklasten (siehe Abbildung 43) wurden kleine Probenstücke, je nach Dicke der Probenscheibe, für 4 bis 12 Stunden in 3% Paraformaldehyd und 0,2% Glutaraldehyd in 0,1 molarem Natriumphosphatpuffer (pH 7,4) immersionsfixiert. Nach mehrmaligem Spülen in 0,1 molarem Natriumphosphatpuffer, dem zuvor 3,5% Saccharose und 0,5 mmol CaCl₂ zugefügt worden waren, blieben die Proben über Nacht in diesem Puffer. Es folgte die Entwässerung der Proben in der aufsteigenden Alkoholreihe. Im Anschluß wurden sie bei Raumtemperatur in ein Alkohol-LR-Gold-Gemisch (The London Resin Co. Ltd., Berkshire, Großbritannien) überführt (für eine Stunde: 7 Teile Alkohol und 3 Teile LR-Gold; für eine weitere Stunde: 3 Teile Alkohol und 7 Teile LR-Gold).

Es folgte die Behandlung in reinem LR-Gold über Nacht, über Tag und schließlich über eine weitere Nacht in LR-Gold mit 0,1% Benzil. Am folgenden Tag wechselten die Proben für drei weitere Stunden in ein frisches LR-Gold/Benzil Gemisch, um im Anschluß – im gleichen Medium – innerhalb luftdicht abgeschlossener Plastikformen eingebettet zu werden. Die anschließende Polymerisation erfolgte mit Hilfe einer 40Watt Halogenlampe (Osram Halolux T) für 48 Stunden bei -13°Celsius. Die Nachpolymerisation der Blöcke bei

Raumtemperatur nahm einen weiteren Tag in Anspruch. Danach konnten die Ultradünnschnitte hergestellt und auf mit Kollodiumfolien beschichtete Nickelnetze aufgezogen werden.

Zweimaligem Spülen der Ultradünnschnitte in 0,1 molarem PBS für jeweils zwei Minuten schlossen sich folgende Arbeitsschritte an: (1) Inkubation mit 5% Ziegen-Normalserum (Vector Laboratories Inc. Burlinghame, CA, USA) in 0,1 molarem PBS. (2) Inkubation mit dem primären Antikörper gegen zytoskelettales Aktin in einer Verdünnung von 1:30 (monoklonale Antikörper gegen zytoskelettales Aktin [Amersham, Little Chalfon, Großbritannien]) für eine Stunde. (3) Spülen der Schnitte in PBS 4 mal 5 Minuten. (4) Nochmalige Inkubation mit 5% Ziegen-Normalserum für 5 Minuten. (5) Inkubation mit goldkonjugiertem (10nm) Anti-Maus-Immunglobulin der Klasse G (British Biocell International, Cardiff, Großbritannien) in einer Verdünnung 1:5. (6) Spülen in PBS 5 mal 5 Minuten. (7) Spülen in Aqua bidestillata, 5 mal 5 Minuten. (8) Nachkontrastierung mit Uranylacetat und Bleizitrat mit dem Ultrastainer (Leica, Bensheim, Deutschland).

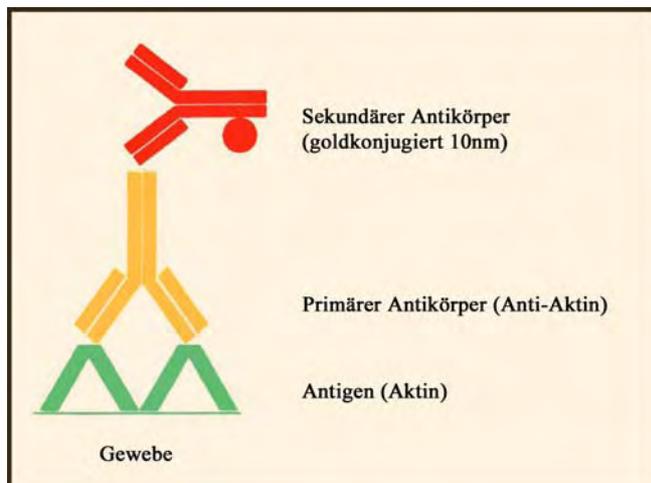


Abbildung 9: Schemazeichnung zum Aktinnachweis

Schemazeichnung zum Nachweis der Aktinfilamente der Osteoklasten in der „sealing zone“ durch 10nm große, goldkonjugierte monoklonale Antikörper gegen zytoskelettales Aktin

Die Auswertung und Fotografie der Befunde erfolgten mit dem Transmissionselektronenmikroskop EM 109 (Zeiss, Göttingen, Deutschland). Die Beschreibung der Immunogold-Markierung erfolgte modifiziert nach WENISCH (2001).

5 ERGEBNISSE

5.1 Makroskopische Befunde

Eine Rötung, Schwellung oder Überwärmung als Zeichen für einen Wundinfekt trat postoperativ bei keinem Tier auf. Jeweils ein Schaf der Calciumphosphat-Implantat-Gruppe und der Kontrollgruppe belasteten postoperativ die operierte Extremität nicht voll. Diese beiden Schafe erhielten Metamizol als Schmerzmedikation (wie die übrigen Tiere auch) sowie prophylaktisch eine Antibiose (siehe Kapitel 4.5). Eine Nahtinsuffizienz trat bei keinem Schaf auf, so dass eine zeitgerechte Entfernung des Hautnahtmaterials nach 12 Tagen bei allen Schafen möglich war.

Während der Fixierung mit Karnowsky-Lösung direkt nach der Tötung der Tiere zeigte sich der Perfusionserfolg sehr eindrücklich als Streckung der Extremität durch Fixierung der Muskulatur. Die Implantationsstelle des Calciumphosphat-Implantates war nach Entfernung des umgebenden Gewebes postmortal bei den 6-Wochen-Tieren noch gut auffindbar, der Knochendeckel erschien fest im umgebenden Knochen verankert. Bei den Tieren aus den 24- und 48- Wochen-Gruppen war sie in Einzelfällen nur noch als Verdickung der Kortikalis erkennbar. Ein makroskopischer Hinweis auf eine abgelaufene Infektion fand sich bei keinem der 12 Tiere.

5.2 Radiologische Befunde

5.2.1 Nativradiologische Befunde

Die direkt nach der Implantation erhobenen nativradiologischen Befunde in je zwei Ebenen zeigen die Lage des Implantates circa 5 mm distal des Tibiaplateaus und proximal des Markraumes. Dieser zeigt große individuelle Schwankungen in seiner Ausdehnung nach proximal. Nativradiologisch grenzt bei allen Tieren das eingebrachte Implantat an den Markraum, bei einigen Tieren wurde der Markraum eröffnet, und der Implantatzylinder reicht randständig bis in den Markraum.

Das Calciumphosphat-Implantat ist in den Aufnahmen röntgendicht, und besonders in den Bereichen, in denen viel Kortikalisanteile des Tibiakopfes vorliegen, schwierig vom Knochengewebe zu unterscheiden (siehe Abbildung 10 und Abbildung 11).



Abbildung 10: Nativröntgenbild seitlich



Abbildung 11: Nativröntgenbild anterior-posterior

Röntgenbilder direkt postoperativ mit dem eingebrachten Calciumphosphat-Implantat (Lage durch Pfeile markiert) im Tibiakopf des Schafes. Links im seitlichen, rechts im anterior-posterioren Strahlengang.

5.2.2 Computertomographische Befunde

Sowohl die Lage des Defektes als auch die noch vorhandenen Anteile des Calciumphosphat-Implantats im Knochen waren vor der Auftrennung der Knochen in den 0,5 mm dicken Schnitten der Computertomographie gut sichtbar. Eine Übersicht der Schnittebenen stellt die Abbildung 12 dar, die Schnittebenen quer zur Achse des zylindrischen Implantates zeigen Abbildung 13 und Abbildung 14.

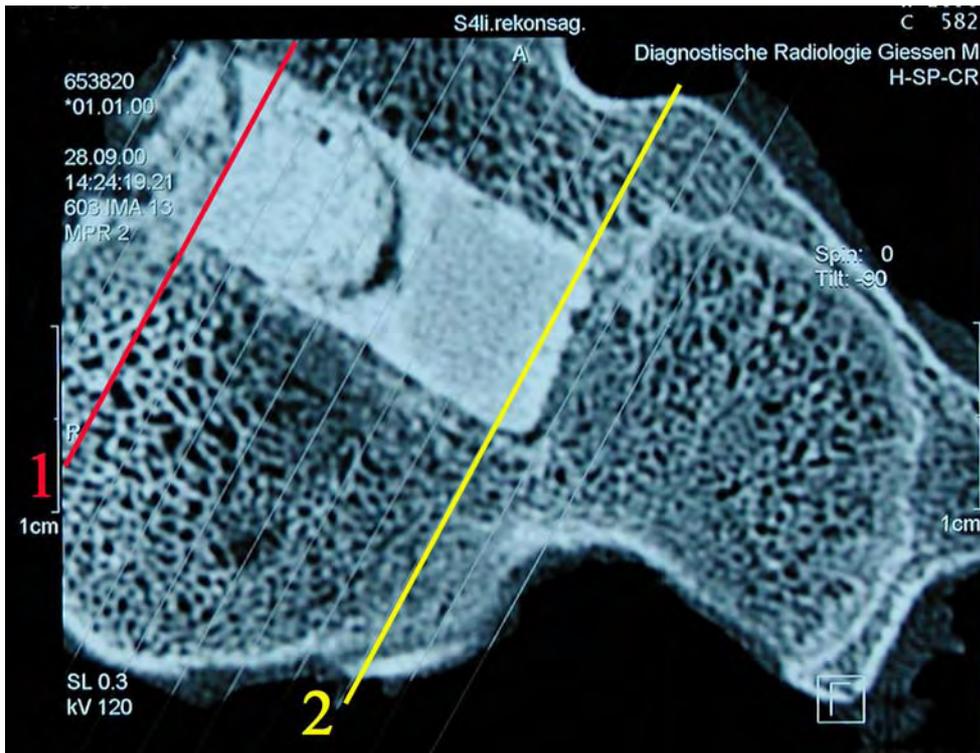


Abbildung 12: Computertomographie Übersicht

Computertomographische Übersicht der Schnittebenen von Abbildung 13 und Abbildung 14. Aufnahme 6 Wochen nach Implantation des Calciumphosphat-Implantates.

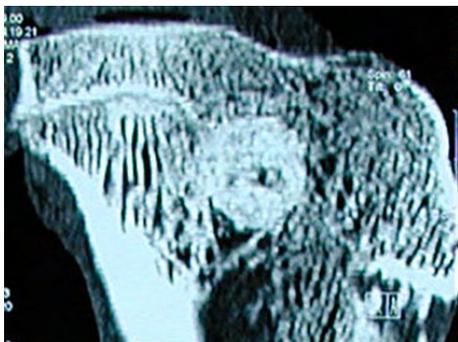


Abbildung 13: Computertomographie Schnittebene 1



Abbildung 14: Computertomographie Schnittebene 2

Computertomographische Ansichten der Schnittebenen in Abbildung 12 eines implantattragenden Schafstibiakopfes in 0,5 mm dicken Schnitten 6 Wochen nach Implantation des Calciumphosphat-Implantates. (Abbildung 13 entspricht der roten Schnittebene 1, Abbildung 14 der gelben Schnittebene 2 der computertomographischen Übersicht aus Abbildung 12).

5.3 Histologische Befunde

5.3.1 Toluidinblaufärbungen

5.3.1.1 6-Wochen-Tiere

In der Übersichtsaufnahme (siehe Abbildung 15) sind bei den 2 Jahre alten Tieren noch Reste der Wachstumsfuge zu erkennen. Das Calciumphosphat-Implantat ist in den toluidinblau gefärbten Schnitten nicht angefärbt und daher im Bereich des kreisrunden Bohrlochs durch seine graue Farbe gut von dem blau gefärbten, mineralisierten Knochen zu unterscheiden (siehe Abbildung 15). Es liegt in unterschiedlich großen Schollen vor und ist an den Implantaträndern bereits von neugebildetem mineralisiertem Lamellenknochen umgeben (siehe Abbildung 16). Diese Fragmentierung ist erwartungsgemäß weder in den Nativröntgenaufnahmen noch in den CT-Schnitten, aufgrund der zu geringen Auflösung, zu sehen.

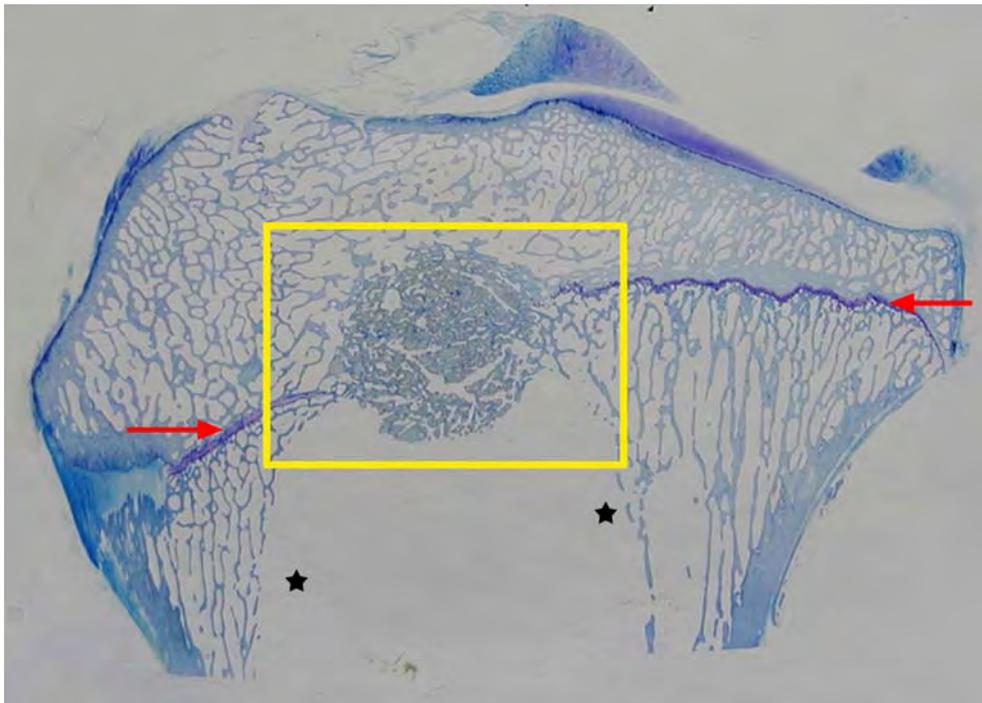


Abbildung 15: Foto: Übersicht des Tibiakopfes 6 Wochen postoperativ

Übersicht des Tibiakopfes 6 Wochen postoperativ nach Einbringung des Calciumphosphat-Implantates. Im oberen Bildanteil sind Knorpelanschnitte des Tibiaplateau erkennbar, im mittleren Bildanteil Reste der Wachstumsfuge (rote Pfeile). Das Ersatzmaterial reicht an den Markraum (schwarze Sterne) heran. Das Knochenmark ist herausgelöst. Dünnschliff, Toluidinblau, Vergrößerung: 2,1 fach.

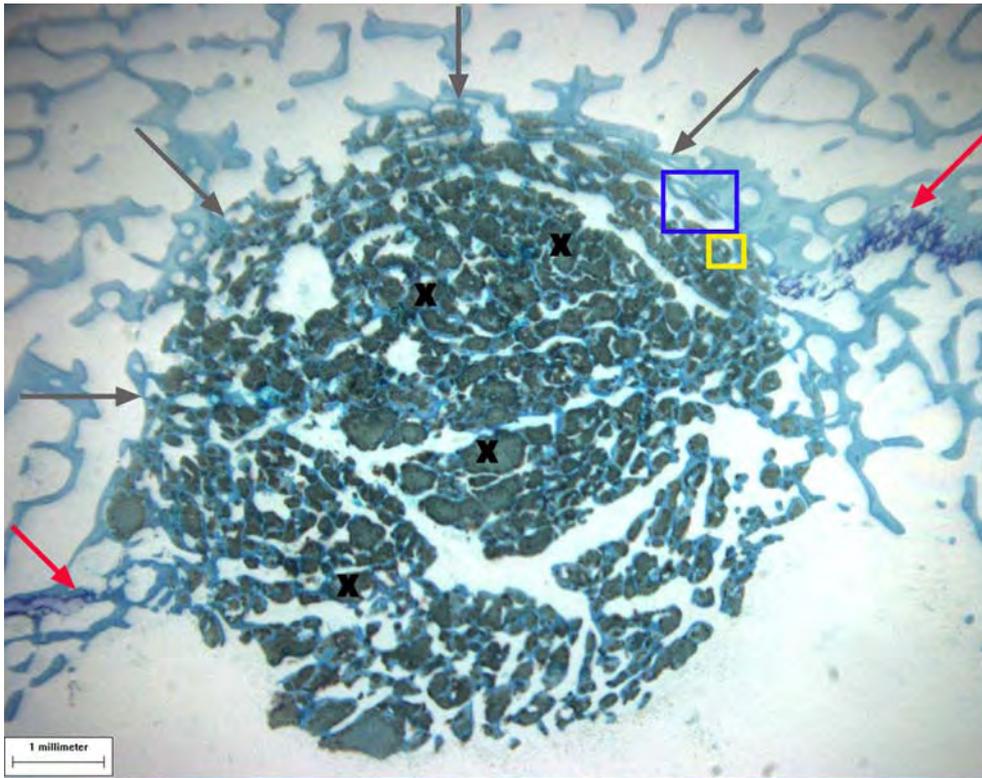


Abbildung 16: Histologie: Ausschnittsvergrößerung aus Abbildung 15

Der Ausschnitt zeigt den im gelben Rechteck der Abbildung 15 gelegenen Abschnitt bei stärkerer Vergrößerung. Die Spongiosa des Lagerknochens und des neugebildeten Knochens ist hellblau, die knorpeligen Reste der Wachstumsfuge sind lila gefärbt (rote Pfeile). Das Calciumphosphat-Implantat liegt als grobschollige, grau erscheinende Partikel (schwarze X) vor. Der Defektbereich grenzt an die Spongiosa des Lagerknochens und im unteren Bildanteil an den Markraum. Die *interface-region* ist mit grauen Pfeilen gekennzeichnet. Die Ausschnittsvergrößerung der *interface-region* in Abbildung 17 ist mit dem blauem Rechteck markiert. Die Knochenneubildung ist bereits bis ins Zentrum des Defektes fortgeschritten. Das gelbe Rechteck entspricht der stärker vergrößerten Darstellung in Abbildung 19. Dünnschliff, Toluidinblau.

Die Knochenneubildung schreitet vom Lagerknochen ausgehend (siehe Abbildung 17) nach zentripetal fort und hat das Zentrum des Defektes bei den meisten Präparaten bereits erreicht (siehe Abbildung 16). Als *interface-region* wird die Grenzschicht des Empfängerknorpels und des Knochenersatzimplantates bezeichnet. Zur Übersicht der *interface-region* siehe Abbildung 16, zur stärkeren Vergrößerung Abbildung 17 und Abbildung 18. Der neugebildete Knochen liegt in den Zwischenräumen des fragmentierten Knochenersatzmaterials direkt an dieses angelagert und ist teilweise bereits lamellär gegliedert.

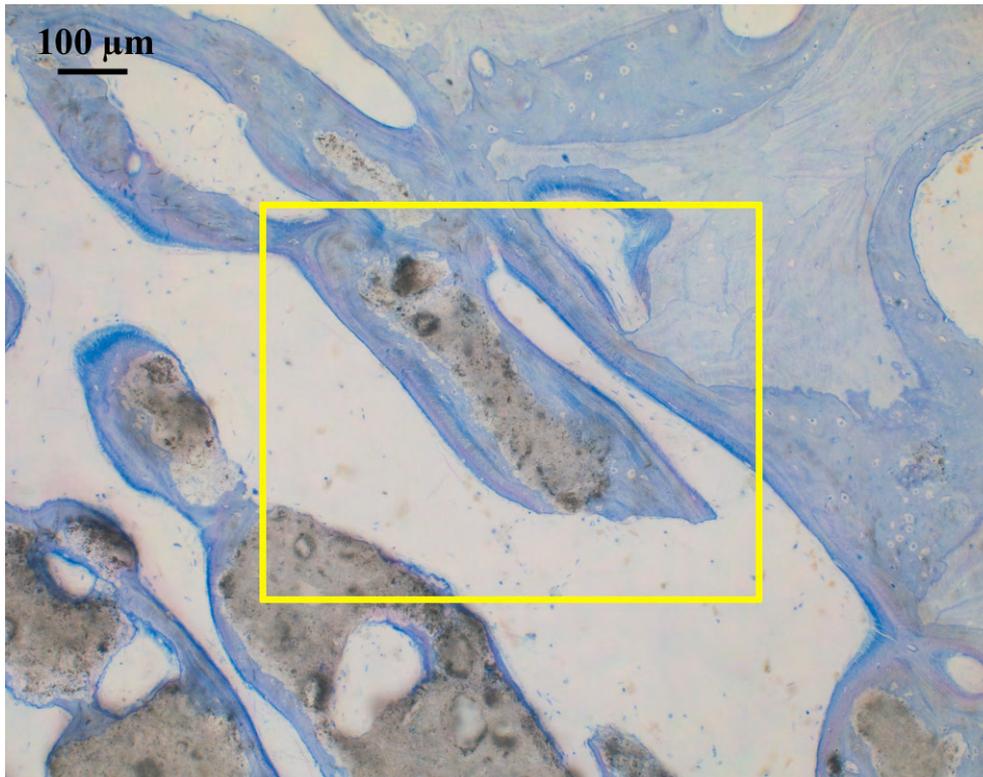


Abbildung 17: Histologie: Ausschnittsvergrößerung aus Abbildung 16 (blaues Rechteck)

Interface-region: Im oberen Bildanteil rechts ist der Lagerknochen des Tibiakopfes als charakteristischer spongöser Knochen sichtbar. Große Anteile des vor 6 Wochen implantierten Calciumphosphat-Implantates sind bereits von neugebildetem Knochen überzogen. Dünnschliff, Toluidinblau.

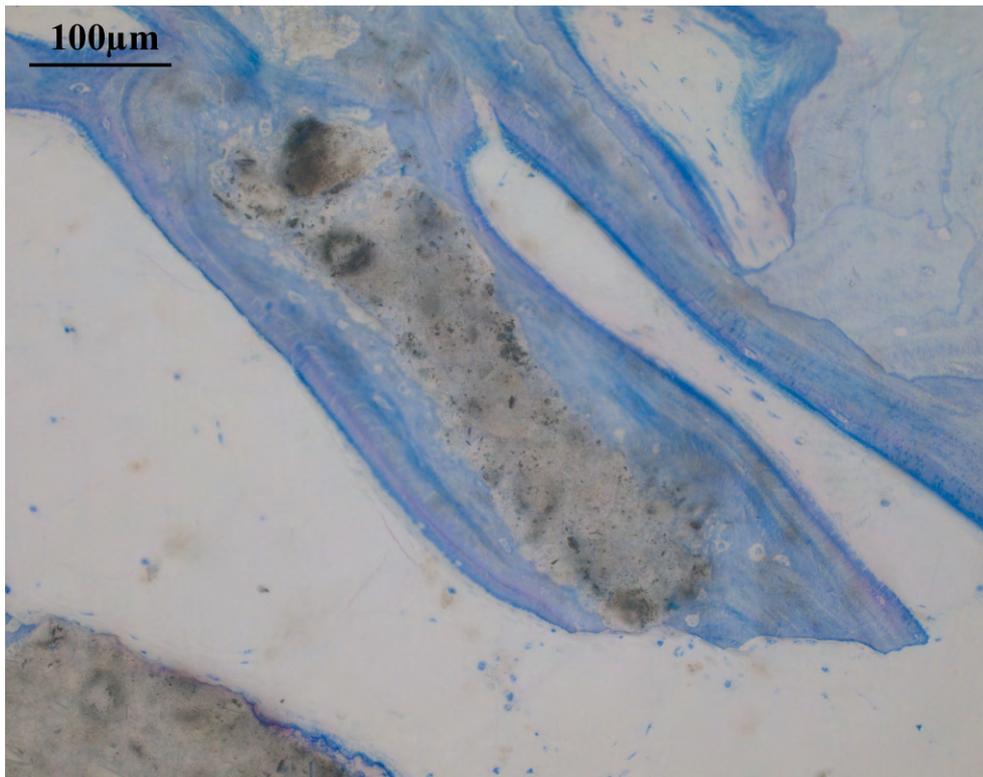


Abbildung 18: Histologie: Ausschnittsvergrößerung aus Abbildung 17

Die stärkere Vergrößerung zeigt den bereits teilweise lamellären Aufbau des neugebildeten Knochens um das Calciumphosphat-Implantat herum. Der junge, noch wenig mineralisierte Knochen färbt sich kräftig an (zum Vergleich siehe blasser gefärbte Anschnitte des Lagerknochens oben rechts im Bild). Dünnschliff, Toluidinblau.

Große, mehrkernige Zellen mit Vakuolen besiedeln vor allem die freien Implantatoberflächen (siehe Abbildung 19 und in stärkeren Vergrößerungen Abbildung 20 und Abbildung 21). Teilweise sind sie in Resorptionslakunen eingebettet.

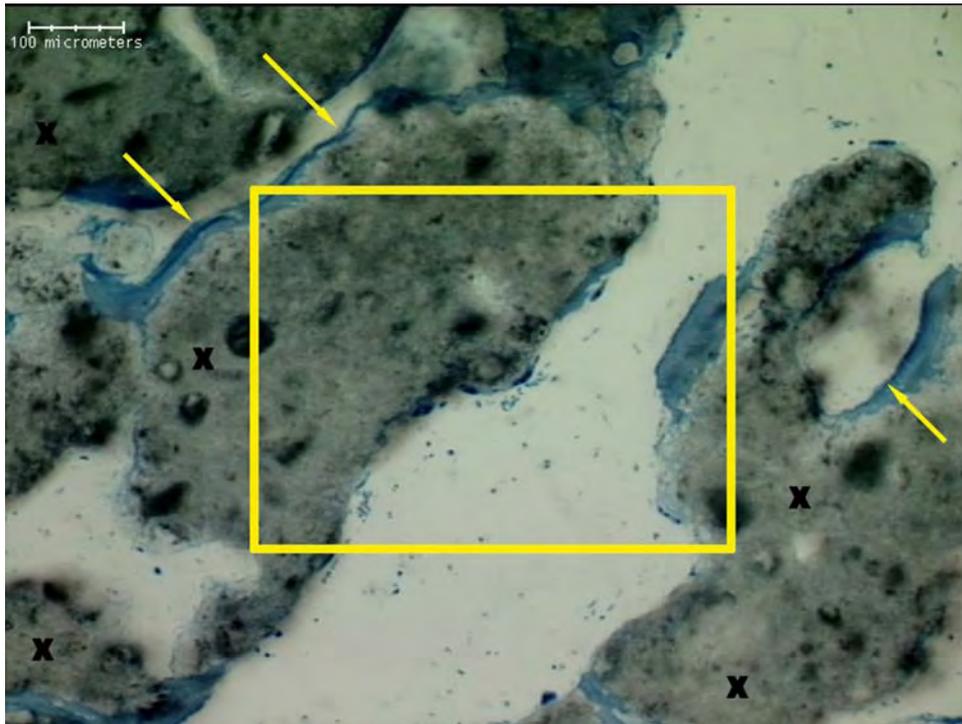


Abbildung 19: Histologie: Ausschnittsvergrößerung aus Abbildung 16 (gelbes Rechteck)

Der Ausschnitt zeigt den im gelben Rechteck der Abbildung 16 gelegenen Abschnitt bei stärkerer Vergrößerung. Das Calciumphosphat-Implantat (schwarze X) ist 6 Wochen nach der Implantation noch nicht vollständig von neugebildetem Knochen umgeben. Die neugebildeten, blauen Osteoidsäume sind durch gelbe Pfeile markiert. Dünnschliff, Toluidinblau.



Abbildung 20: Histologie: Ausschnittsvergrößerung aus Abbildung 19

Es ist die Besiedelung der freien Implantatoberflächen mit mehrkernigen Zellen zu beobachten. Der interfragmentäre Raum ist mit Knochenmark aufgefüllt. Dünnschliff, Toluidinblau.

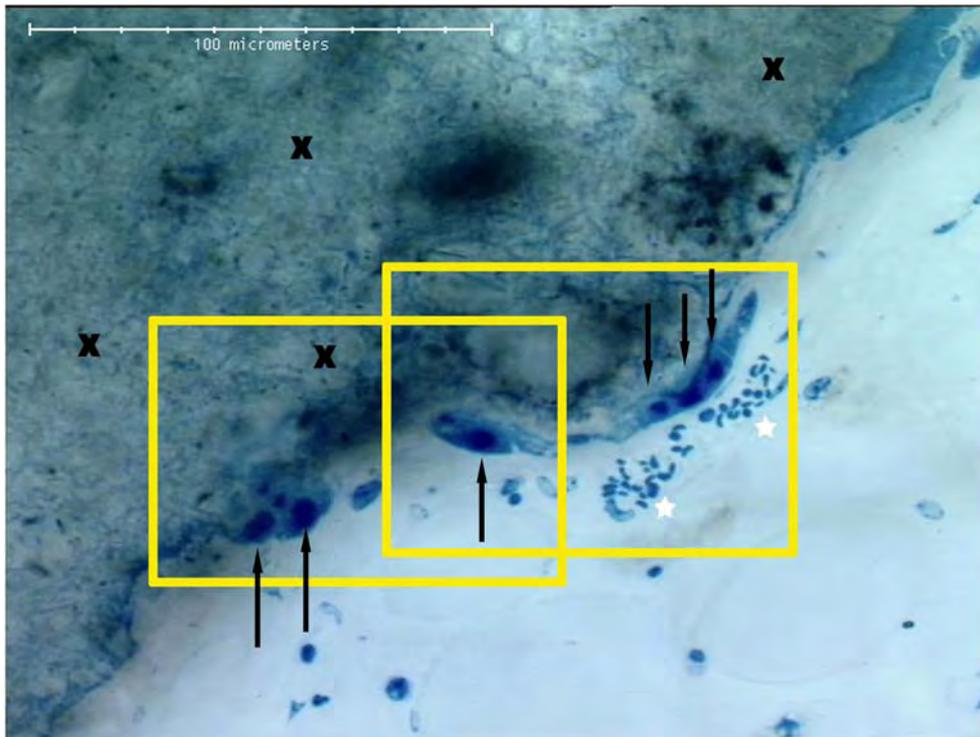


Abbildung 21: Histologie: Ausschnittsvergrößerung aus Abbildung 20

Im oberen Bildanteil liegt das Calciumphosphat-Implantat (schwarze X). In den mehrkernigen Zellen (welche dem Calciumphosphat-Implantat direkt anliegen) sind die Nuklei deutlich zu erkennen (schwarze Pfeile). Gefäßanschnitte mit Erythrozyten sind durch weiße Sterne gekennzeichnet. Dünnschliff, Toluidinblau.

Die intrazytoplasmatischen Vakuolen, die im toluidinblau gefärbten Präparat optisch leer erscheinen, finden sich vor allem in den Abschnitten der Zellen, die dem Implantat zugewandt liegen (siehe Abbildung 22 und Abbildung 23. In den Semidünnschnitten entsprechen diese Abschnitte der Abbildung 32 und Abbildung 35). Insgesamt wirkt der Knochen-Implantatverbund aufgelockert. In den Implantatzwischenräumen (fragmentiertes Knochenersatzmaterial) herrscht neben neugebildetem Knochen kapillar- und gefäßreiches Gewebe vor. Besonders im *interface*-nahen Bereich ist Lamellenknochen zu beobachten. Wo das Knochenersatzmaterial direkt im gefäß- und fettreichen Markraum liegt, sind weniger Zellen des Knochenaufbaus (Osteoblasten) oder -abbaus (multinukleäre Zellen) dem Implantat angelagert. Auch sind die Anteile des in der Markhöhle liegenden Implantatmaterials weniger von neugebildetem Knochen umgeben und durchsetzt als die im spongiösen Tibiaplateau gelegenen Bereiche.

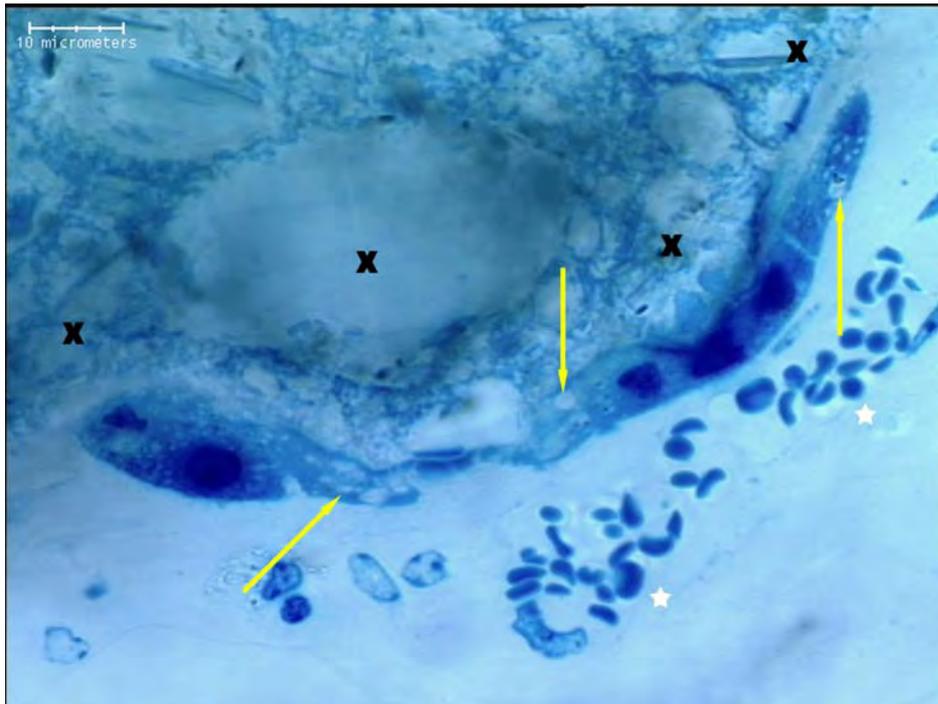


Abbildung 22: Histologie: Ausschnittsvergrößerung (rechtes Rechteck) aus Abbildung 21

Im oberen Bildanteil liegt das Calciumphosphat-Implantat (schwarze X). Randständig liegen zwei mehrkernige Zellen deren intrazytoplasmatische Vakuolen (gelbe Pfeile) optisch leer in Erscheinung treten. Gefäßanschnitte mit Erythrozyten sind durch weiße Sterne gekennzeichnet. Dünnschliff, Toluidinblau.

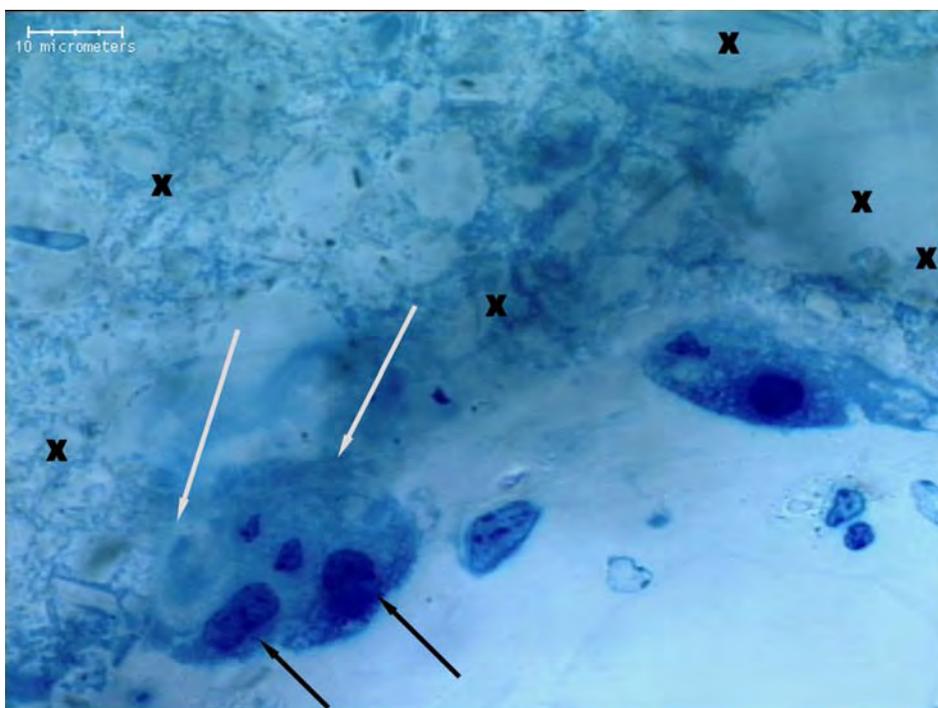


Abbildung 23: Histologie: Ausschnittsvergrößerung (linkes Rechteck) aus Abbildung 21

Im oberen Bildanteil liegt das Calciumphosphat-Implantat (schwarze X). Im linken Bildabschnitt liegt eine mehrkernige Zelle (schwarze Pfeile weisen auf die Kerne) in einer Resorptionslakune (hellgraue Pfeile). Dünnschliff, Toluidinblau.

Osteoblasten (siehe Abbildung 24 und Abbildung 25) sind als kleine, kuboidale Zellen, die in langen Reihen direkt am Calciumphosphat-Implantat angeordnet sind, als Produzenten des neugebildeten Knochens erkennbar. Sie flankieren unterschiedlich breite Osteoidsäume (siehe auch Abbildung 19).

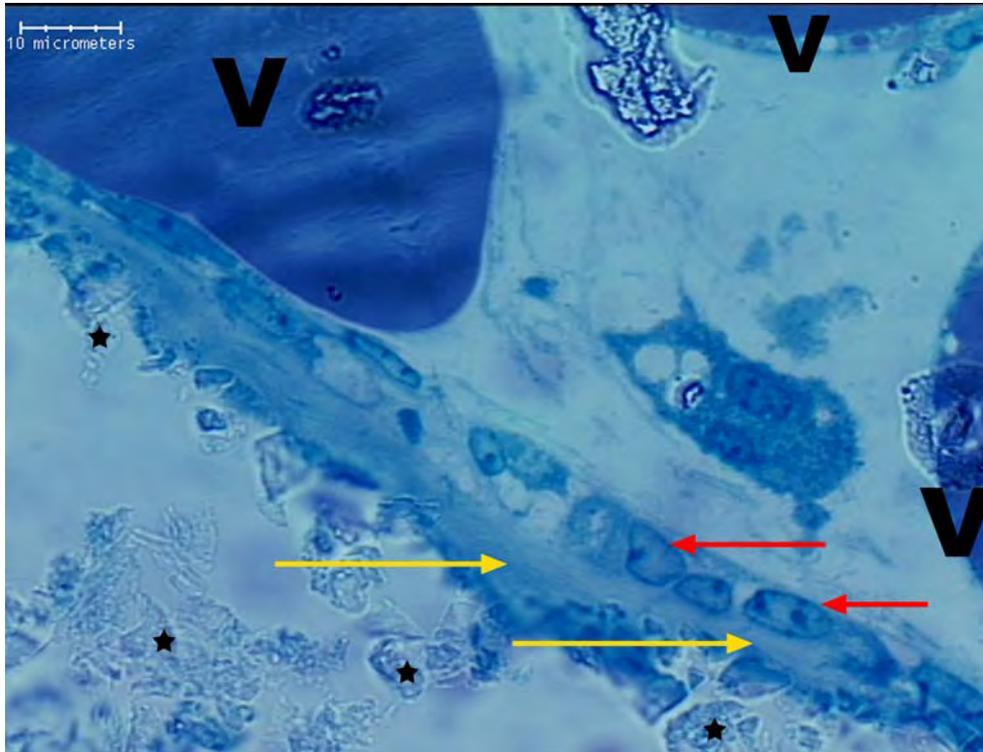


Abbildung 24: Histologie: Osteoblasten im Semidünnschliff 6 Wochen nach Implantation

Osteoblasten (rote Pfeile) im Semidünnschliff 6 Wochen nach Implantation des Calciumphosphat-Implantates (schwarze Sterne; das Calciumphosphat-Implantat ist aufgrund von Schnittartefakten großflächig herausgelöst). Zwischen den Osteoblasten und dem Calciumphosphat-Implantat liegt noch nicht mineralisierte Grundsubstanz des Knochens (Osteoid, gelbe Pfeile). Angeschnittene Fettvakuolen des Knochenmarkes (V) erscheinen dunkelblau. In der Riesenzelle sind zwei Zellkerne angeschnitten, links von den Zellkernen liegen Vakuolen welche optisch leer erscheinen. Semidünnschliff, Toluidinblau.



Abbildung 25: Schemazeichnung der Abbildung 24

Abbildung 26 zeigt deutliche Abweichungen bezüglich der knöchernen Integration des Knochenersatzmaterials: Bei diesem Tier (Schaf Nr. 9) liegt das Implantat von Bindegewebe eingeschleitet nahezu unverändert im spongiösen Anteil des Tibiakopfes. Es handelt sich um faserreiches Bindegewebe mit wenigen Kapillaren (siehe Abbildung 27 und Abbildung 28). Entzündungszellen wie neutrophile Granulozyten und Plasmazellen sind ebenso wenig zu finden wie ein- und mehrkernige Makrophagen. Der im zellarmen Bindegewebe vorherrschende Zelltyp ist der durch seine spindelförmige Gestalt charakterisierte Fibrozyt. Aufgrund der Färbung mit dem basischem Farbstoff Toluidinblau färben sich nur die Zellkerne und nicht das Zytoplasma der Zellen an.

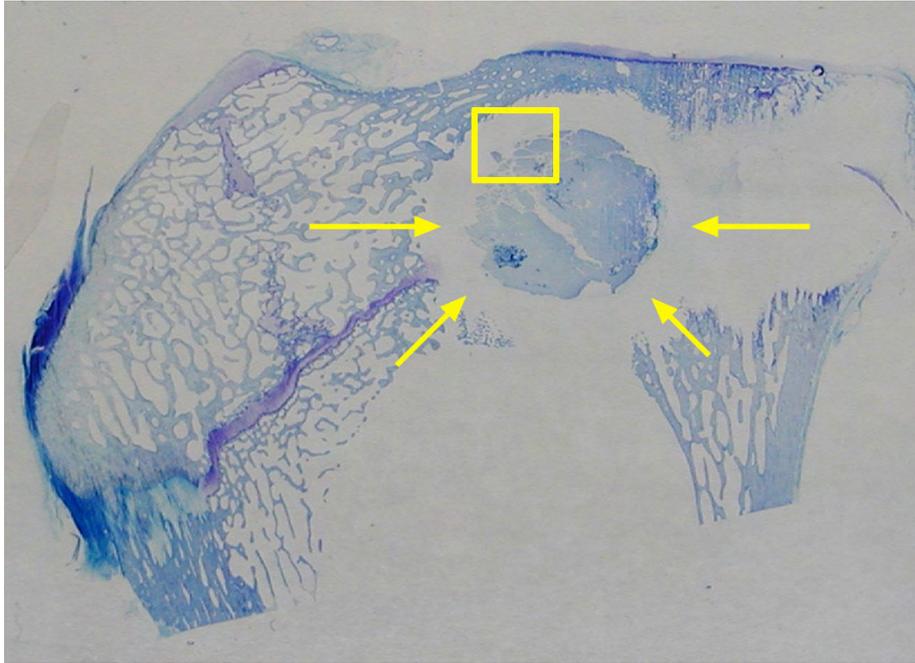


Abbildung 26: Foto: Bindegewebsabssaum um das Calciumphosphat-Implantat

Übersicht des Tibiakopfes 6 Wochen postoperativ nach Einbringung des Calciumphosphat-Implantates. Der mit gelben Pfeilen markierten Bereich zeigt auf das Ersatzmaterial, welches durch Bindegewebe vom Lagerknochen abgegrenzt ist (zum Vergleich siehe auch Abbildung 15). Dünnschliff, Toluidinblau, Vergrößerung: 2,1 fach.

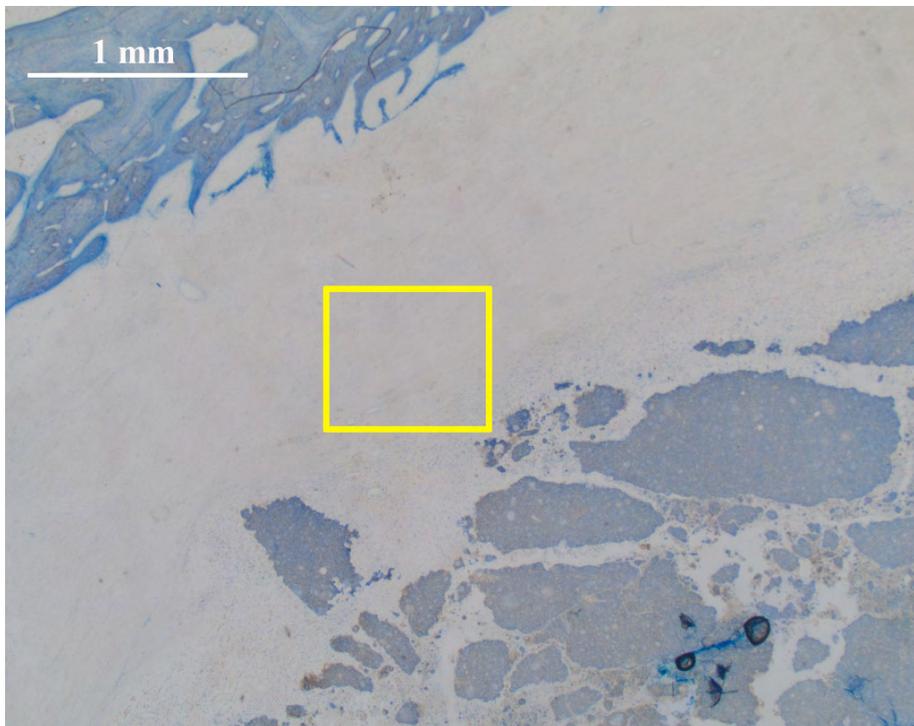


Abbildung 27: Histologie: Ausschnittsvergrößerung aus Abbildung 26

Die Ausschnittsvergrößerung entspricht dem gelben Rechteck aus der Abbildung 26. Das Calciumphosphat-Implantat findet sich im unteren Bildanteil, eine Erschließung mit Knochengewebe ist durch den faserreichen Bindegewebssaum, welcher das Implantat vom links oben sichtbaren Lagerknochen trennt, verhindert worden. Dünnschliff, Toluidinblau.

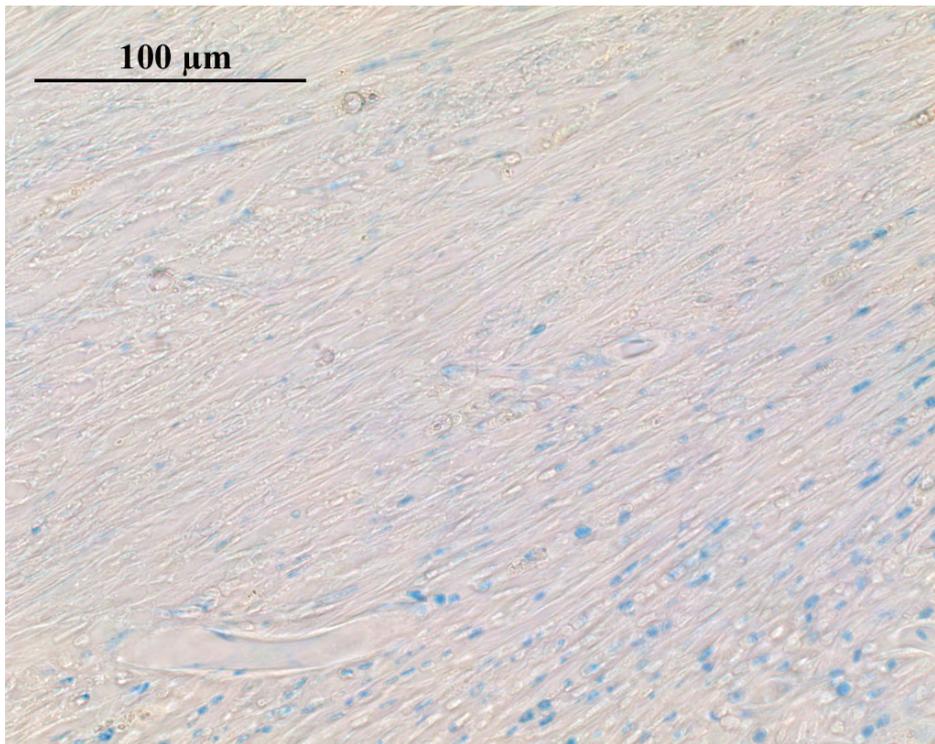


Abbildung 28: Histologie: Ausschnittsvergrößerung aus Abbildung 27

Die Ausschnittsvergrößerung entspricht dem gelben Rechteck aus der Abbildung 27. Sichtbar sind die angefärbten Zellkerne des vorherrschenden Zelltyps, der spindelförmigen Fibrozyten. Dünnschliff, Toluidinblau.

5.3.1.2 24-Wochen-Tiere

Waren in der Übersichtsaufnahme der 6-Wochen-Tiere noch Reste der Wachstumsfuge zu erkennen, fällt ihre Detektion zunehmend schwerer (siehe Abbildung 29). Im Unterschied zum vorangegangenen Untersuchungszeitpunkt sind annähernd alle Implantatpartikel von neugebildetem Knochen umgeben. Die interfragmentären Spalten sind knöchern verschlossen, so dass die Übersichtshistologie ein sehr kompaktes Bild des Implantatgebietes widerspiegelt. Die Implantatränder sind fast ganz von neugebildetem Knochen umgeben, es liegen kaum mehr freie Implantatränder vor. Der Anteil des konzentrisch lamellären Knochens hat weiter zugenommen, er findet sich nun auch zentral im Defekt. Im spongiösen Bereich ist die Rekonstruktion der Trabekel annähernd abgeschlossen. Die sogenannte *interface-region* als ursprüngliche Grenzzone zwischen vorhandenem Knochen und Implantatmaterial ist kaum noch erkennbar. In Bereichen, in denen das Implantat an den Markraum grenzt, haben nur geringe Umbauvorgänge stattgefunden. Die Präparate dieser Gruppe zeigen ein verschiedenartiges Bild bezüglich des *remodeling*. Das Präparat aus der Abbildung 29 zeigt den am weitesten fortgeschrittenen Umbau.

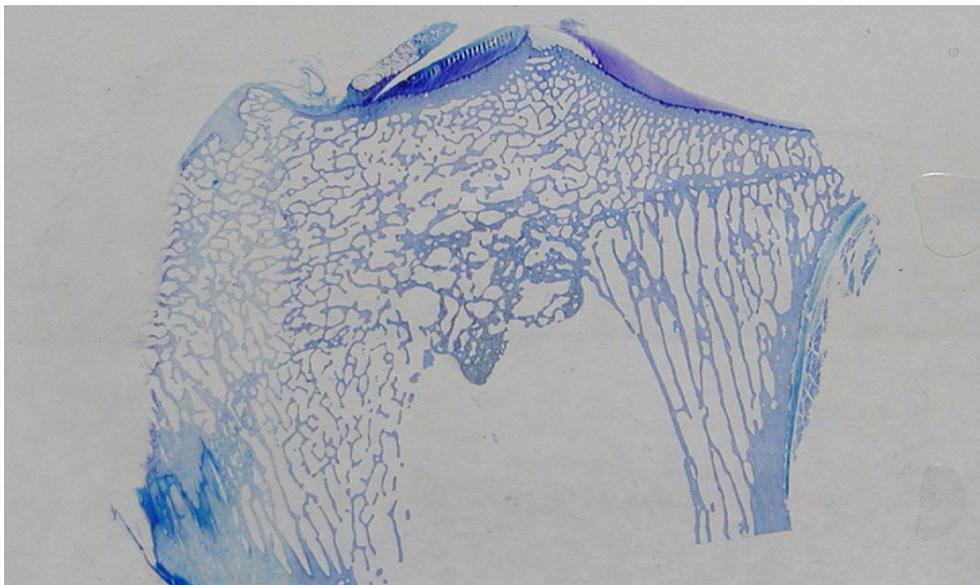


Abbildung 29: Foto: Übersicht des Tibiakopfes 24 Wochen postoperativ

Übersicht des Tibiakopfes 24 Wochen postoperativ nach Einbringung des Calciumphosphat-Implantates. Dünnschliff, Toluidinblau, Vergrößerung: 2,1 fach.

5.3.1.3 48-Wochen-Tiere

Im Unterschied zu den 24-Wochen-Tieren zeigen sich nur geringfügige Veränderungen (siehe Abbildung 30): Insgesamt ist die Knochenneubildung im Implantatverbund ebenso wie die

Umwandlung in konzentrisch lamellären Knochen weiter fortgeschritten. Die Wachstumsfuge ist kaum mehr sichtbar, das Wachstum der Tiere ist sicher abgeschlossen. In der *interface-region* sind nur noch in wenigen Trabekeln Reste des Implantatmaterials zu finden, während im Grenzbereich zur Markhöhle noch deutlich sichtbare Reste zu erkennen sind.

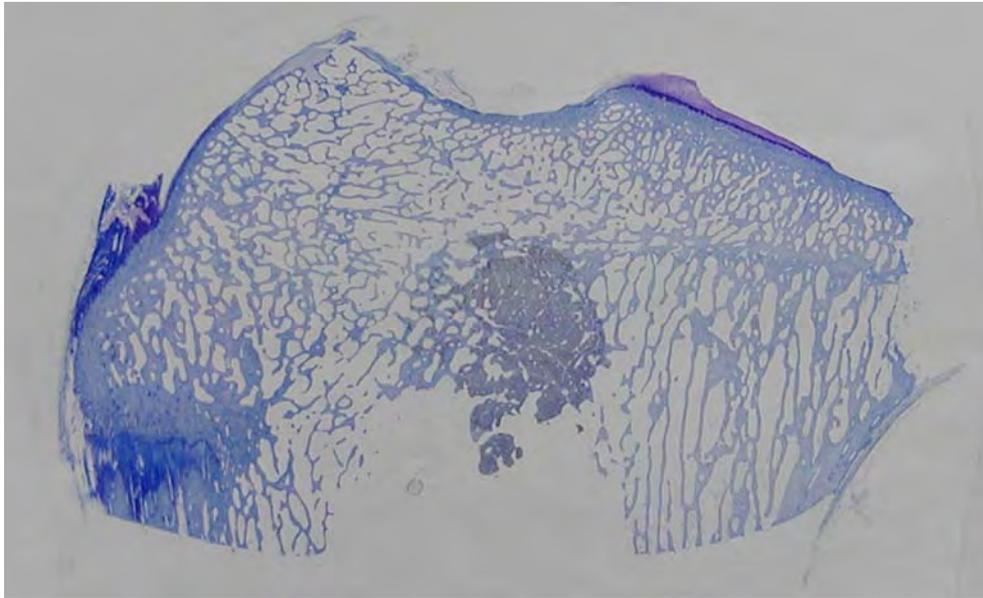


Abbildung 30: Foto: Übersicht des Tibiakopfes 48 Wochen postoperativ

Übersicht des Tibiakopfes 48 Wochen postoperativ nach Implantation des Calciumphosphat-Implantates. Dünnschliff, Toluidinblau, Vergrößerung: 2,1 fach.

Die Leerdefekte sind nach 48 Wochen komplett mit Lamellenknochen durchbaut. Dennoch finden sich ebenso wie in der Implantatgruppe noch Texturstörungen der Trabekelarchitektur. Sie sind aufgrund der zahlreichen kurzen, kompakten, dicht benachbarten Trabekel zu erkennen (siehe Abbildung 31).

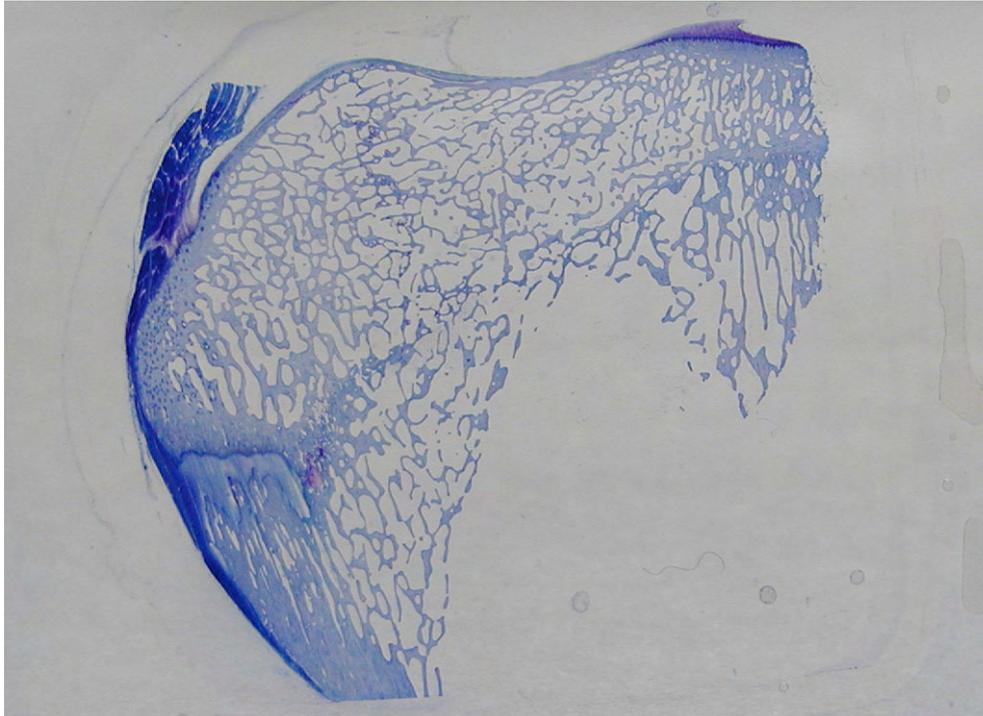


Abbildung 31: Foto: Übersicht des Tibiakopfes 48 Wochen postoperativ, Leerdefekt

Übersicht des Tibiakopfes 48 Wochen postoperativ, Leerdefekt. Dünnschliff, Toluidinblau, Vergrößerung: 2,1 fach.

5.3.2 Semidünnschnitte (6-Wochen-Tiere)

In Übereinstimmung mit den vorangegangenen Befunden der Trenn-Dünnschlifftechnik zeigt sich, dass der neugebildete Knochen 6 Wochen postoperativ dem Implantatmaterial (bis auf die in Abbildung 26 erwähnte Ausnahme) ohne eine bindegewebige Zwischenschicht direkt anliegt. Es ist zum sogenannten „*bone-bonding*“ gekommen. Auch stellen sich in den Semidünnschnitten die Resorptionslakunen der mehrkernigen Zellen sehr gut dar. Die mehrkernigen Zellen besitzen an der dem Implantat zugewandten Seite intrazytoplasmatische, optisch leer erscheinende Vakuolen (siehe Abbildung 32 und Abbildung 35). Das Calciumphosphat-Implantat zeigt sich in diesen Schnitten als kristalline Struktur, die im verstärkten Phasenkontrast ein typisches Brechungsverhalten des Lichtes zeigt (siehe Abbildung 32 und Abbildung 33). Kleine Teilchen mit entsprechender Struktur liegen innerhalb der mehrkernigen Riesenzellen. Dies weist auf eine Aufnahme von Implantatpartikeln in das Zytoplasma der mehrkernigen Zellen hin, die direkt am Implantat liegen. Abbildung 34 zeigt die weit fortgeschrittene Rekonstitution des Knochenmarks.

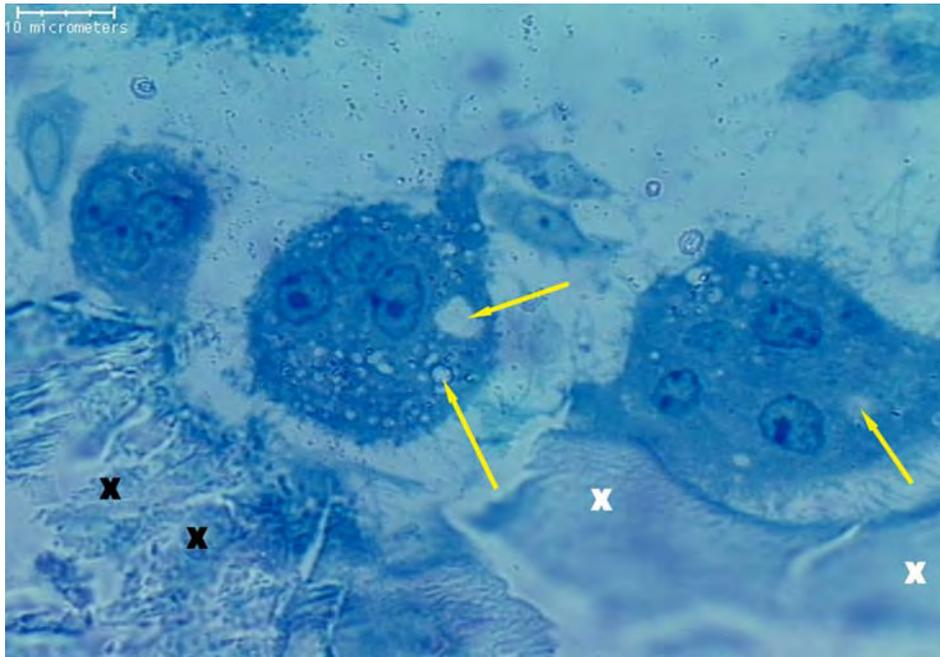


Abbildung 32: Histologie: Mehrkernige Zellen 6 Wochen postoperativ

Mehrkernige Zellen in unmittelbarer Nachbarschaft des Implantates (schwarze X) sowie des Lagerkochens (weiße X) 6 Wochen nach Implantation. Mehrkernige Zellen mit optisch leeren intrazytoplasmatischen Vakuolen (gelbe Pfeile) liegen in Resorptionslakunen (HOWSHIP Lakunen). Das Calciumphosphat-Implantat ist durch Schnittartefakte teilweise herausgelöst. Semidünnschnitt, Toluidinblau.

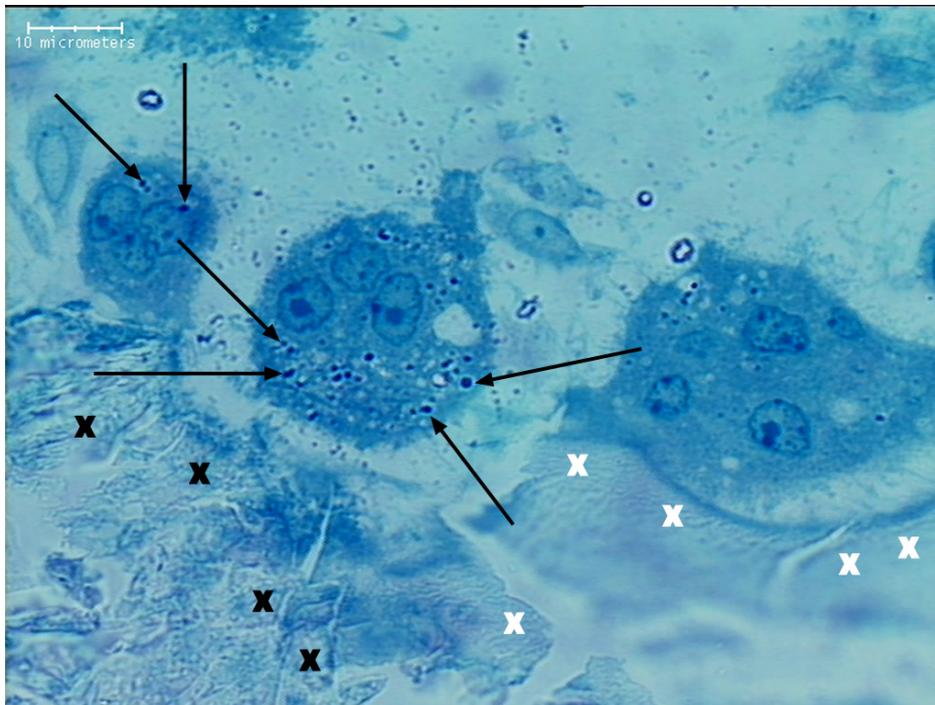


Abbildung 33: Histologie: Mehrkernige Zellen im Phasenkontrast

Mehrkernige Zellen in unmittelbarer Nachbarschaft des Implantates (schwarze X) sowie des Lagerkochens (weiße X) 6 Wochen nach Implantation. Gleiches Präparat wie Abbildung 32, andere Einstellung der Mikrometerschraube. Das Calciumphosphat-Implantat zeigt sich dadurch auch in den mehrkernigen Zellen liegend (schwarze Pfeile). Semidünnschnitt, Toluidinblau.

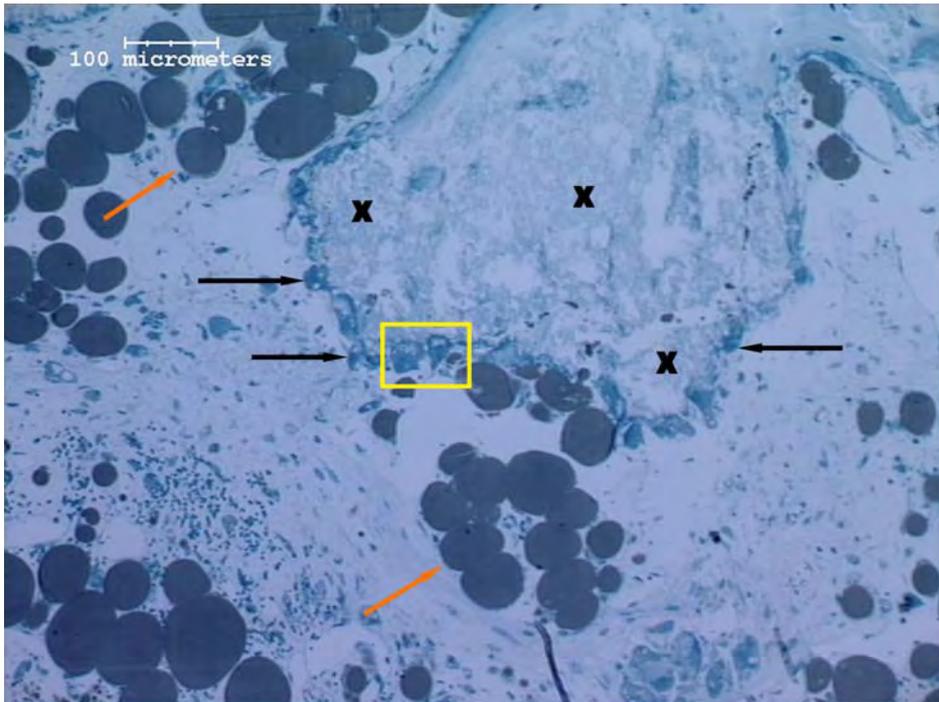


Abbildung 34: Histologie: Implantatabbau und Rekonstitution des Knochenmarks

Übersichtsabbildung von mehrkernigen Zellen (schwarze Pfeile), die direkt am Übergang zum Calciumphosphat-Implantat (schwarze X) lokalisiert sind. Fettvakuolen des Knochenmarkes sind durch orangefarbene Pfeile gekennzeichnet. Semidünnschnitt, Toluidinblau.

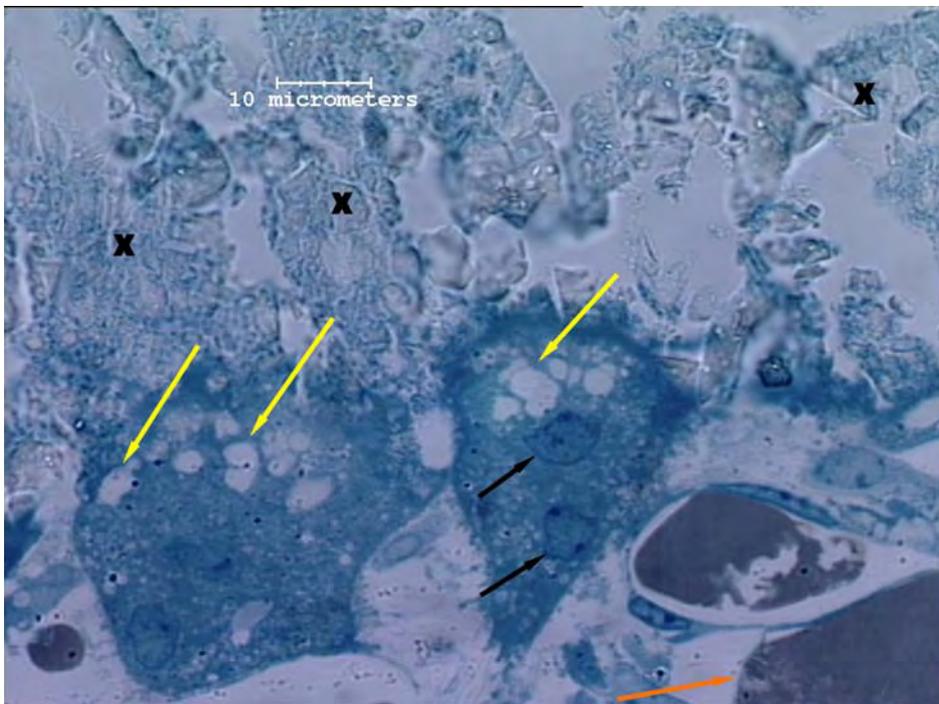


Abbildung 35: Histologie: Ausschnittsvergrößerung aus Abbildung 34

Die großen implantatassoziierten Zellen weisen mehrere Kerne (schwarze Pfeile) auf. Sie liegen in Resorptionslakunen direkt dem Calciumphosphat-Implantat (schwarze X) an. Die intrazytoplasmatischen Vakuolen (gelbe Pfeile) finden sich vermehrt an der dem Implantat zugewandten Seite. Oranger Pfeil: Fettvakuole des Knochenmarkes. Semidünnschnitt, Toluidinblau.

5.3.3 Fluoreszenzmikroskopische Befunde

Im ungefärbten fluoreszenzmikroskopischen Bild sind gelbe, rote und grüne Banden scharf voneinander abgegrenzt. Diese Banden markieren den zu unterschiedlichen Zeitpunkten der Fluorochrommarkierung (siehe Kapitel 4.6) neugebildeten Knochen. Die gelben Banden entsprechen dem Knochenwachstum ab dem 16. postoperativen Tag, hervorgerufen durch Tetracyclingabe. Die roten Banden spiegeln die Bildung nach Gabe von Alizarin complexon ab dem 34. Tag wider. Die durch Calcein-grün markierten Banden sind nur bei den 24- und 48-Wochen Schafen vorhanden. Der Farbstoff wurde allen Schafen dieser Gruppen ab dem 9. Tag prämortem verabreicht.

Während in allen Präparaten kräftige rote und grüne Banden anzutreffen sind, liegen die gelben Banden im Bereich der Calciumphosphat-Implantationsstelle nicht in allen Präparaten vor (Vergleiche Abbildung 36, Abbildung 37 und Abbildung 38). Auffällig ist jedoch, dass die Tetracyclinmarkierungen im Lagerknochen regelmäßig vorhanden sind. Während im Präparat 6 Wochen nach der Implantation die zeitliche Abfolge der Knochenbildung durch die gelben und darauffolgenden roten Banden gut nachvollziehbar ist (siehe Abbildung 36), sind zu den späteren Zeitpunkten sowohl ein konzentrischer, als auch der scheinbar ungeordnete Aufbau von Verbindungs- und Bruchlamellen erkennbar (Abbildung 37 und Abbildung 38).

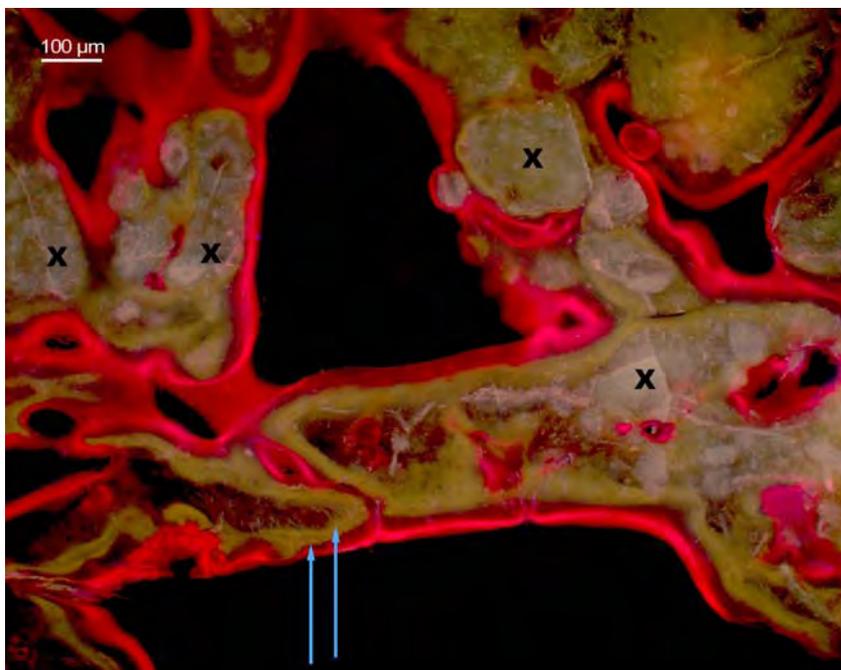


Abbildung 36: Fluoreszenzhistologie I

Fluoreszenzhistologie sechs Wochen nach Implantation. Das Calciumphosphat-Implantat ist durch schwarze X gekennzeichnet. Die gelben Banden entsprechen dem Knochenstoffwechsel der Tetracyclingabe ab dem 16. Tag, die roten Banden der Alizarin Complexongabe ab dem 34. Tag postoperativ. Die hellblauen Pfeile links unten im Bild markieren die einzelnen Banden, welche den Applikationstagen des Tetracyklins entsprechen (die Markierung erfolgte mit 4 Tagen Abstand).

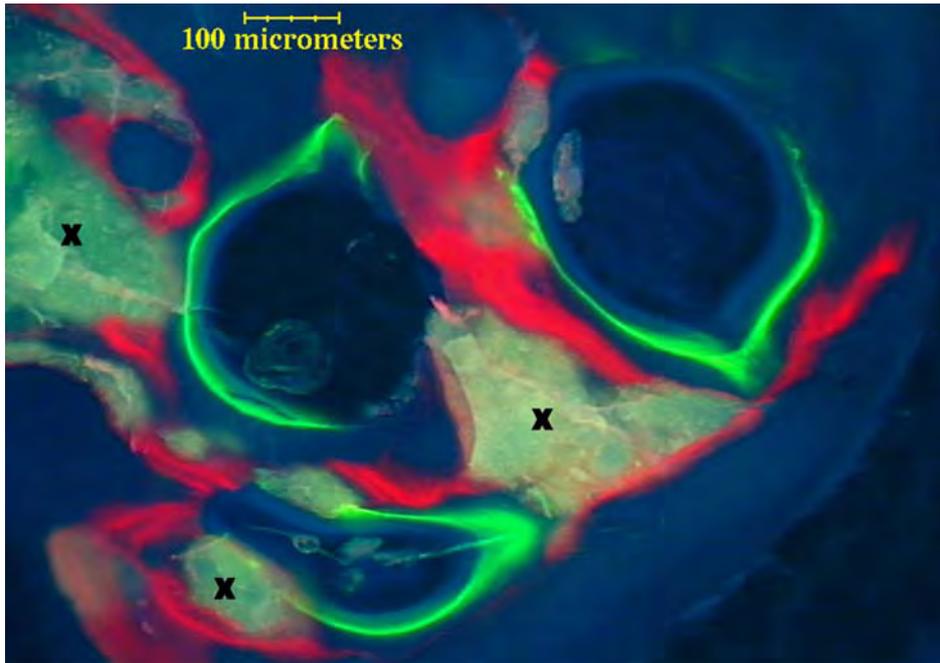


Abbildung 37: Fluoreszenzhistologie II

Fluoreszenzhistologie 24 Wochen nach Implantation. Das Calciumphosphat-Implantat ist durch schwarze X gekennzeichnet. Die roten Banden entsprechen dem Knochenstoffwechsel ab dem 34. Tag postoperativ, die grünen Banden der Gabe ab dem 9. Tag prämortem (siehe auch Kapitel 4.6). Autofluoreszenz ungefärbt.

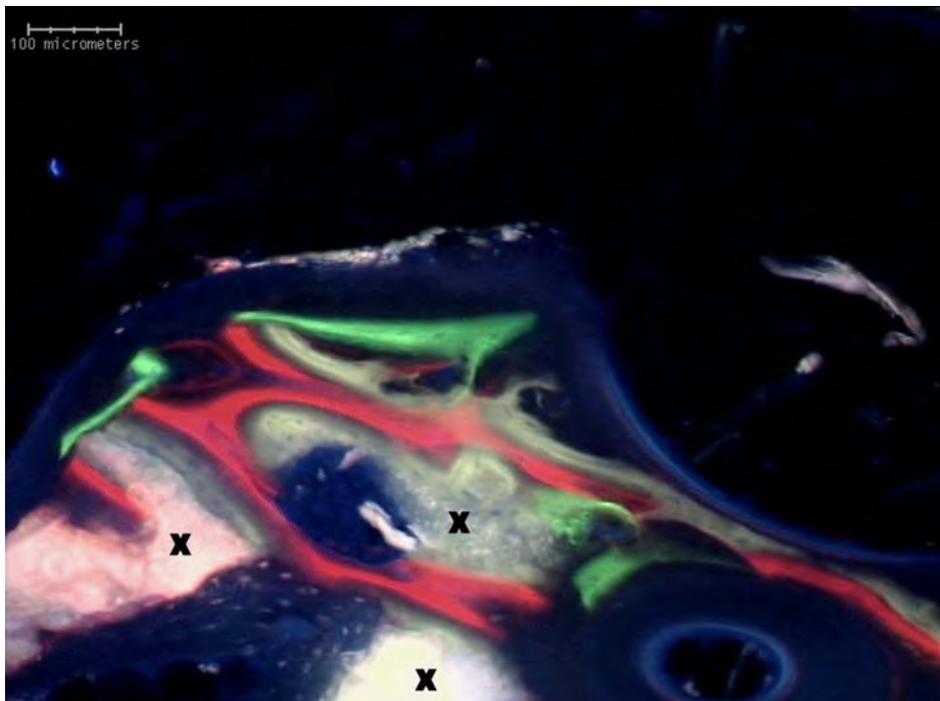


Abbildung 38: Fluoreszenzhistologie III

Fluoreszenzhistologie 48 Wochen nach Implantation. Das Calciumphosphat-Implantat ist durch schwarze X gekennzeichnet. In der Abbildung sind die gelben Banden im Unterschied zu der Abbildung 37 gut erkennbar, sie entsprechen der Tetracyclingabe ab dem 16. Tag postoperativ. Autofluoreszenz ungefärbt.

5.3.4 Enzymhistochemische Befunde, Nachweis der sauren Phosphatase

6 Wochen postoperativ zeigen die implantatassoziierten mehrkernigen Zellen eine deutliche Aktivität der tartratresistenten sauren Phosphatase (TRAP), die sich nach enzymhistochemischer Färbung in einer deutlichen Rotfärbung des Zytoplasmas zeigt (Abbildung 39). Die Kerne sind von der enzymhistochemischen Färbung ausgespart, sie sind mit Hämatoxylin gegengefärbt und erscheinen daher blau (Abbildung 40).

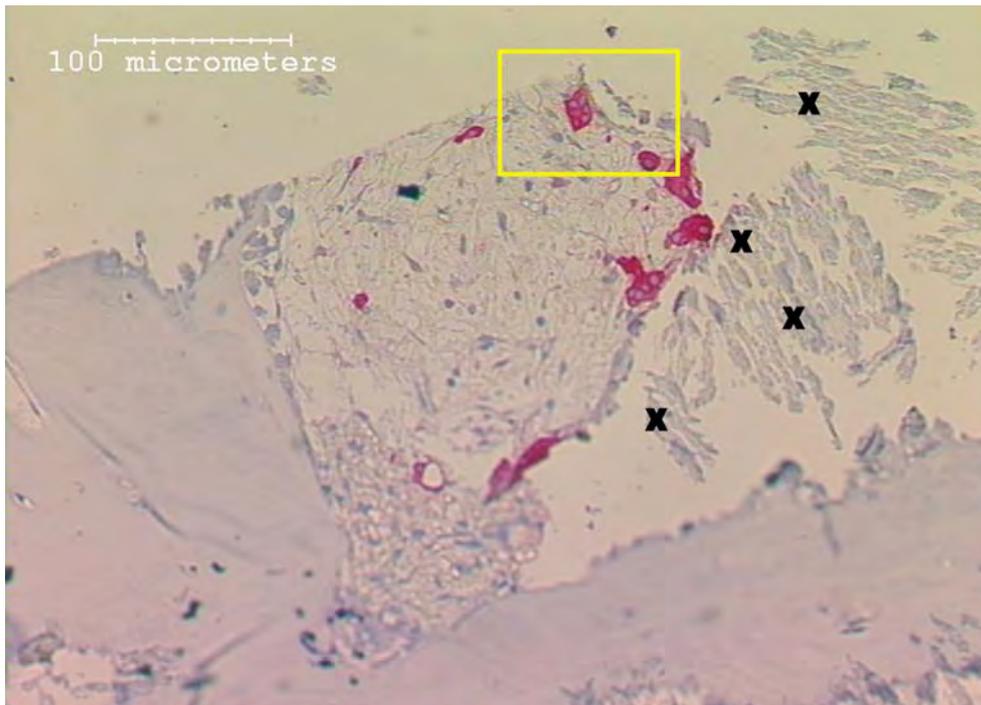


Abbildung 39: Histologie: Multinukleäre Zellen nach TRAP-Färbung 6 Wochen postoperativ

Nach enzymhistochemischem Nachweis der sauren Phosphatase sind die implantatassoziierten mehrkernigen Zellen durch ihre Rotfärbung deutlich zu erkennen. Das Implantat (schwarze X) ist durch Schnittartefakte teilweise herausgelöst. Semidünnschnitt, enzymhistochemische Färbung mit TRAP.

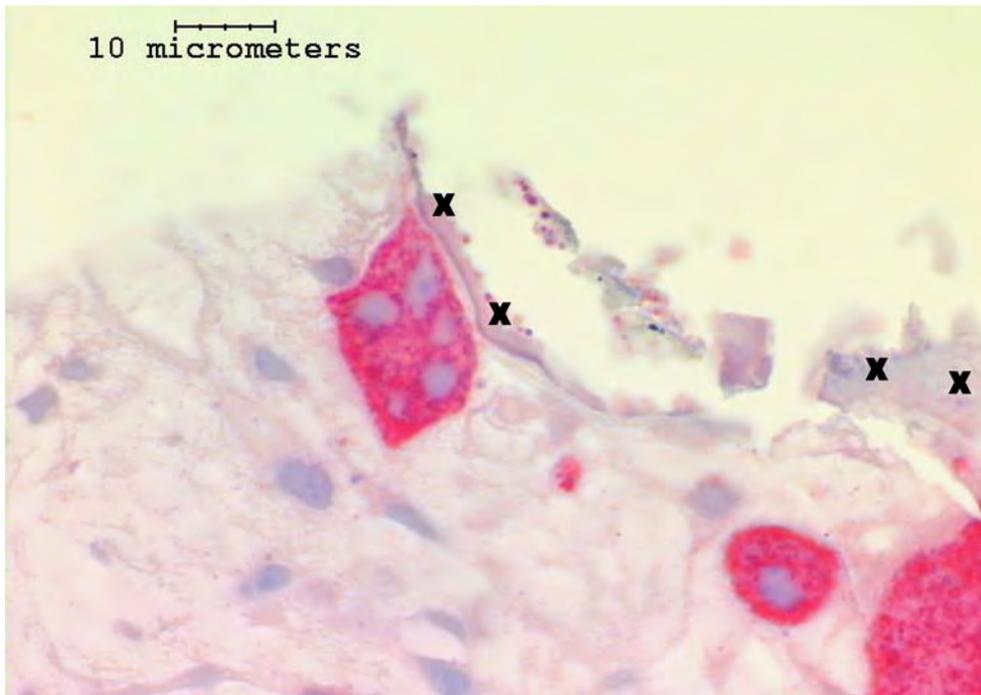


Abbildung 40: Histologie: Ausschnittsvergrößerung aus Abbildung 39

Der Ausschnitt zeigt den im gelben Rechteck der Abbildung 39 gelegenen Abschnitt bei stärkerer Vergrößerung. Im Unterschied zum Zytoplasma sind die Zellkerne von der enzymhistochemischen Färbung ausgespart und durch die Gegenfärbung mit Hämatoxylin blau gefärbt. Das Implantat (schwarze X) ist durch Schnittartefakte teilweise herausgelöst. Semidünnschnitt, enzymhistochemische Färbung mit TRAP.

5.3.5 Transmissionselektronenmikroskopische (TEM) Befunde

Mehrkernige Zellen sind an den Oberflächen des Knochens und des Implantates (siehe Abbildung 41) nachweisbar und aufgrund ihrer Ultrastruktur eindeutig als Osteoklasten zu identifizieren. Die tiefen Plasmalemminvaginationen des apikalen Zytoplasmas „*ruffled border*“ entsprechen dem Resorptionsorganell der Osteoklasten. Die „*sealing zone*“, die Anheftungsdomäne des Osteoklasten, besteht aus aktinfilamentreichen, organellenfreien Zytoplasmaabschnitten. Die Osteoklasten heften sich mit ihrer „*sealing zone*“ dem Knochenersatzmaterial oder dem Knochen breitflächig an (siehe Abbildung 42). Der Nachweis der Aktinfilamente der Osteoklasten in der „*sealing zone*“ erfolgte durch monoklonale Antikörper gegen zytoskelettales Aktin (siehe Abbildung 9 und Abbildung 43).

Nicht in allen Anschnitten sind die ovoiden, mit unregelmäßigen Einbuchtungen der Karyotheka versehenen Zellkerne der Osteoklasten anzutreffen. Bei optimaler Schnittebene ist der GOLGI-Apparat stets perinukleär lokalisiert (siehe Abbildung 41), dagegen verteilen sich die zahlreich vorkommenden Mitochondrien diffus im Zytoplasma. Die basolaterale Plasmamembran bildet zahlreiche Mikrovilli aus, die in unterschiedlichen Schnittebenen im

Interzellularräum zu finden sind. Bei den besonders zahlreich im apikalen Bereich des Osteoklasten gelegenen Vakuolen lassen sich zwei Formen unterscheiden. Die größeren Vakuolen sind oft mit mäßig elektronendichten Kristallnadeln angefüllt (siehe Abbildung 44). Kleinere Vakuolen beinhalten elektronendichteres Material, welches aber auch nicht membrangebunden im Plasma vorliegt. Die Extrusion dieses Materials ist besonders an der mikrovillitragenden Seite des Osteoklasten in den Interzellularräum nachweisbar (siehe Abbildung 45). Den Osteoklasten benachbarte einkernige Makrophagen weisen intrazytoplasmatisch entsprechend strukturiertes elektronendichtes Material auf (siehe Abbildung 46).

Die dem *ruffled border* zugewandte Seite des Knochenersatzmaterials weist regelmäßig eine weniger elektronendichte Zone mit aufgelockerter Kristallnadelstruktur auf (siehe Abbildung 44).

Osteoklasten sind auch entlang der freien Oberfläche des Lagerknochens zu identifizieren. Stellenweise ist die Anlagerung eines Osteoklasten sowohl an die Ersatzplastik als auch an den Lagerknochen sichtbar (siehe Abbildung 47).

Neben Osteoklasten sind die Implantatoberflächen auch von Osteoblasten besiedelt (siehe Abbildung 48 und Abbildung 49). Die Synthese der noch nicht mineralisierten Grundsubstanz ist stellenweise so weit vorangeschritten, dass breite Kollagensäume zwischen den Osteoblasten und dem Knochenersatzmaterial zu erkennen sind. Die ovoid gestalteten Osteoblasten ordnen sich häufig perlschnurartig entlang der Implantatoberfläche an. Im Zytoplasma dominiert neben einigen Mitochondrien vor allem das raue Endoplasmatische Retikulum (rER) das ultrastrukturelle Erscheinungsbild. Als Mineralisationszentren sind Sphäriten im vom Osteoblasten sezernierten Kollagen erkennbar (siehe Abbildung 49). Osteoblasten, Osteoklasten und Makrophagen können räumlich direkt nebeneinander vorkommen (siehe Abbildung 50).

In der neugebildeten mineralisierten Grundsubstanz können Osteozyten identifiziert werden. Sie weisen im Unterschied zu den Osteoblasten eine vergleichsweise „arme“ Organellenausstattung auf. Zudem hat sich das Kern-Plasma-Verhältnis zugunsten des Kernes verschoben (siehe Abbildung 51).

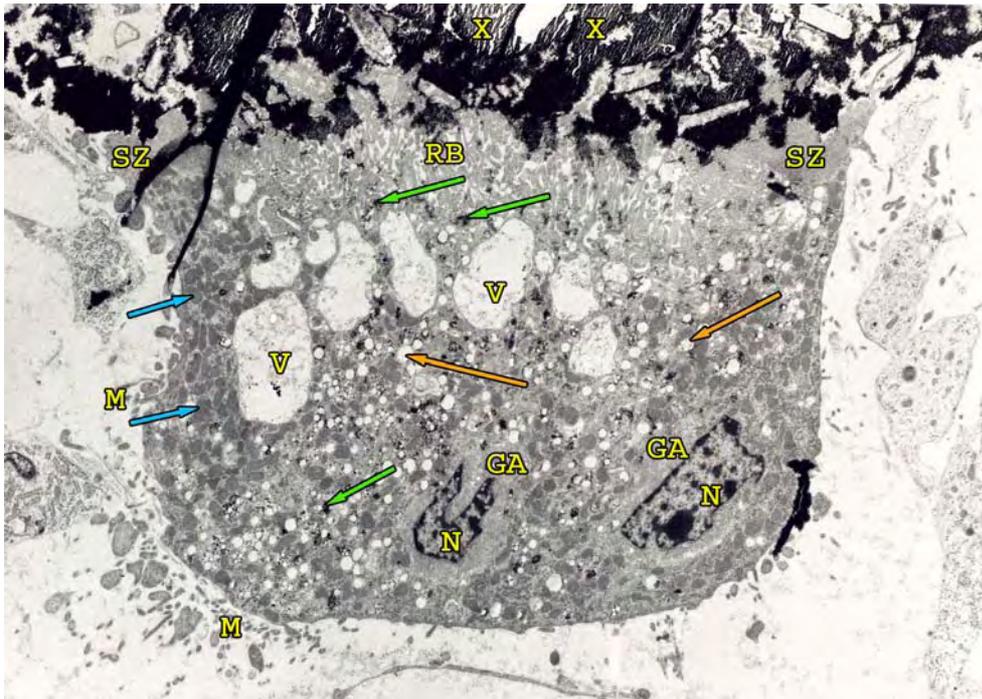


Abbildung 41: TEM: Osteoklast, Degradation des Calciumphosphat-Implantates

Transmissionselektronenmikroskopische (TEM) Übersicht eines implantatassoziierten Osteoklasten (gelbe X apikal im elektronendichten Material). Der Osteoklast haftet mit seiner „sealing zone“ (SZ) am Calciumphosphat-Implantat und dichtet das Resorptionsorganell des Osteoklasten, den „ruffled border“ (RB) gegen den Interzellularraum der Zellumgebung ab. Lateral und basal sind Anschnitte von Mikrovilli (M) sichtbar, die in den Interzellularraum reichen. Unregelmäßig gestaltete Zellkerne (N) finden sich im basalen Anteil des Osteoklasten; im apikalen Bereich haben große längsovale Vakuolen (V) mit mäßig elektronendichtem Inhalt topographische Beziehung zum „ruffled border“. Perinukleär schafft der GOLGI-Apparat (GA) einen vakuolenfreien Raum. Blaue Pfeile markieren die zahlreich vorkommenden Mitochondrien im Zytoplasma; orange Pfeile die diffus verteilten optisch leer erscheinenden kleinen Vakuolen. Im gesamten Osteoklasten sind Konglomerate unterschiedlicher Größe mit elektronendichtem Material (grüne Pfeile) anzutreffen. TEM, 6 Wochen nach Implantation, Vergrößerung: 7509 fach.

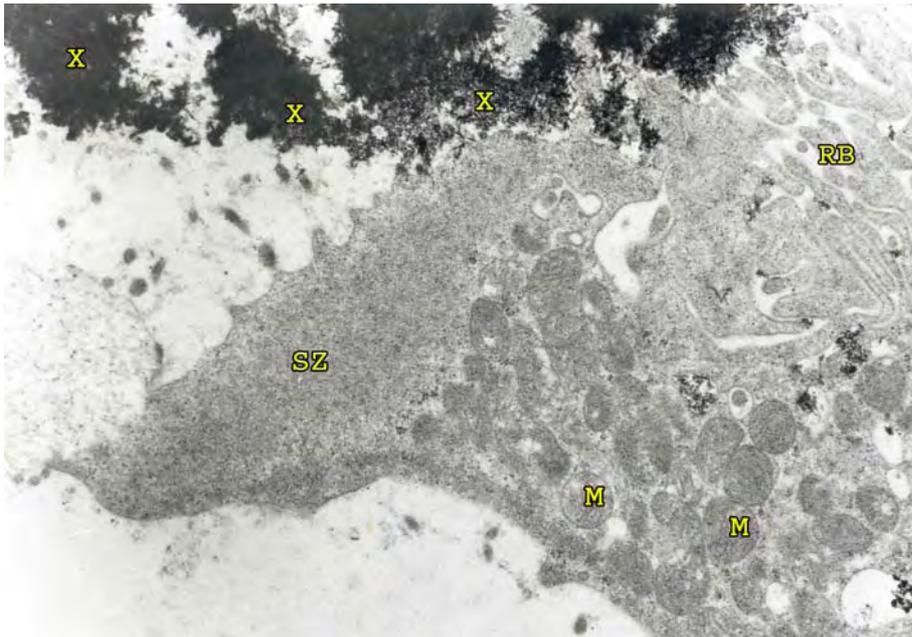


Abbildung 42: TEM: Ausschnittsvergrößerung der „sealing zone“ eines Osteoklasten

Die Darstellung zeigt eine der Abbildung 41 vergleichbare Anheftungsregion des Osteoklasten in stärkerer Vergrößerung. Die „sealing zone“ (SZ) erscheint durch die Gesamtheit der Aktinfilamente als organellenfreie Zone. Die Membrananschnitte des „ruffled border“ (RB) sind apikal gelegen, die Mitochondrien (M) lateral. Das Calciumphosphat-Implantat ist durch gelbe X markiert. TEM, 6 Wochen nach Implantation, Vergrößerung: 15843 fach.

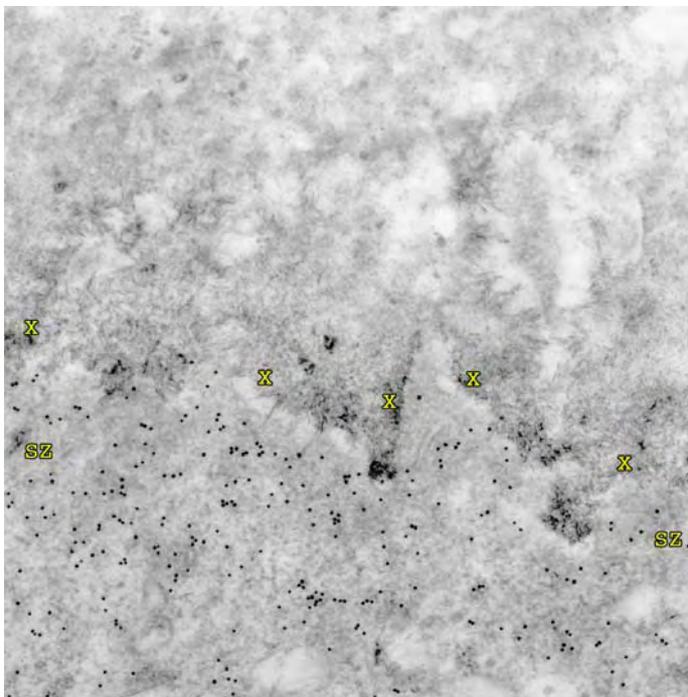


Abbildung 43: TEM: Immunogoldlabelling der Aktinfilamente in der „sealing zone“ eines Osteoklasten

Ausschnitt aus der „sealing zone“ (SZ) eines Osteoklasten (unten im Bild) am Calciumphosphat-Implantat (gelbe X oben im Bild). Die goldkonjugierten monoklonalen Antikörper zum Nachweis von zytoskelettalem Aktin der „sealing zone“ des Osteoklasten sind als schwarze Punkte im unteren Bildanteil sichtbar, ihre Größe beträgt 10 nm. TEM, 6 Wochen nach Implantation, Vergrößerung: 54546 fach.

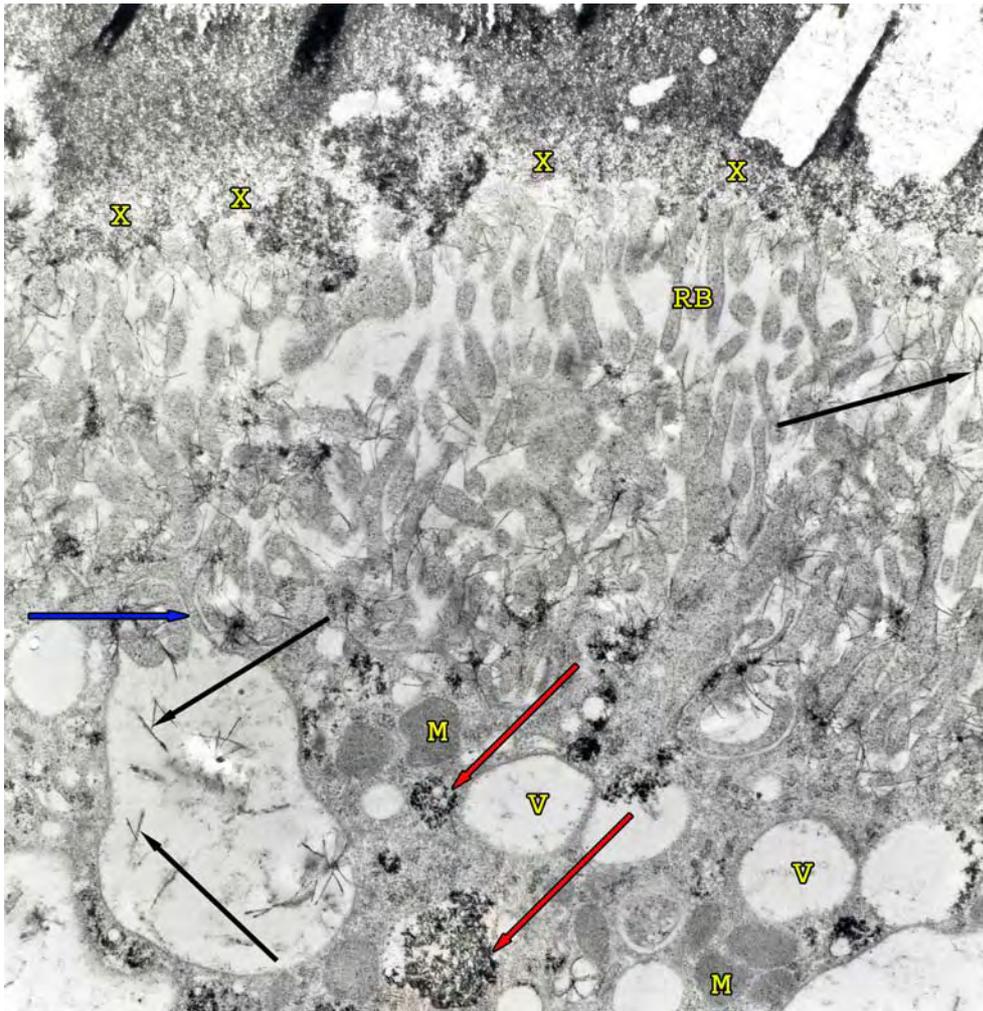


Abbildung 44: TEM: Transzytose

Das Calciumphosphat-Implantat erscheint im oberen Bildanteil elektronendichter als in dem Anteil, welcher direkt an den „*ruffled border*“ (RB) des Osteoklasten reicht (gelbe X in der demineralisierten Zone des Implantates). Kristallnadeln (schwarze Pfeile) des Knochenersatzmaterials werden aus dem Verband herausgelöst und gelangen zwischen die Membraninvaginationen des „*ruffled border*“, die sich teilweise bis in die großen Vakuolen (V) verfolgen lassen (blauer Pfeil). Neben den Kristallnadeln liegt das Ersatzmaterial auch in Form von elektronendichtem Material in Vakuolen im Osteoklasten vor (rote Pfeile). M: Mitochondrien. TEM, 6 Wochen nach Implantation, Vergrößerung: 16690 fach.

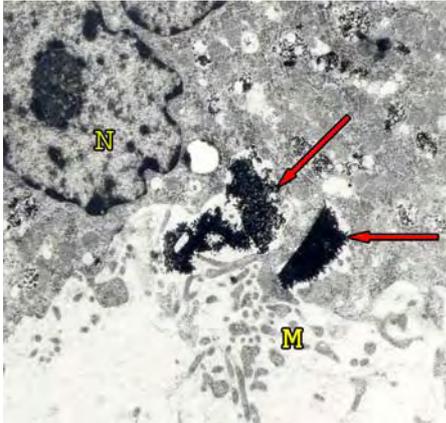


Abbildung 45: TEM: Inklusionsextrusion

Gezeigt ist ein Ausschnitt aus dem basalen Anteil des Osteoklasten mit Kernanschnitt (N) und im Interzellularraum gelegenen Mikrovilli (M). Das durch rote Pfeile gekennzeichnete elektronendichte Material, welches frei im Zytoplasma liegt, wird in den Interzellularraum nach außen geschleust. TEM, 6 Wochen nach Implantation, Vergrößerung: 6126 fach.

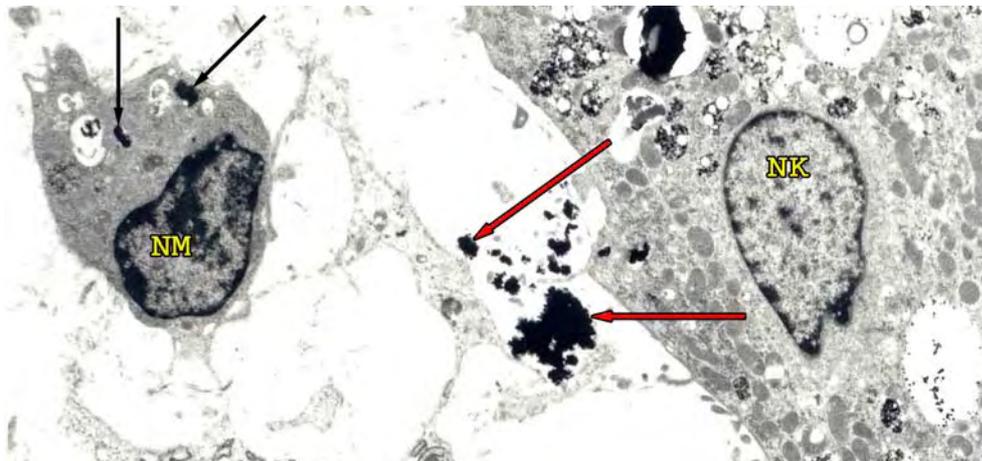


Abbildung 46: TEM: Phagozytose der Osteoklastenprodukte durch einen Makrophagen

Am rechten Bildrand ist ein Osteoklast mit Kern (NK) angeschnitten, im Interzellularraum findet sich das gleiche elektronendichte Material (rote Pfeile) wie in Abbildung 45. Im linken Bildteil liegt ein einkerniger Makrophage mit angeschnittenem Kern (NM) der durch Phagozytose das Material (schwarze Pfeile) inkorporiert hat. TEM, 6 Wochen nach Implantation, Vergrößerung: 5335 fach.

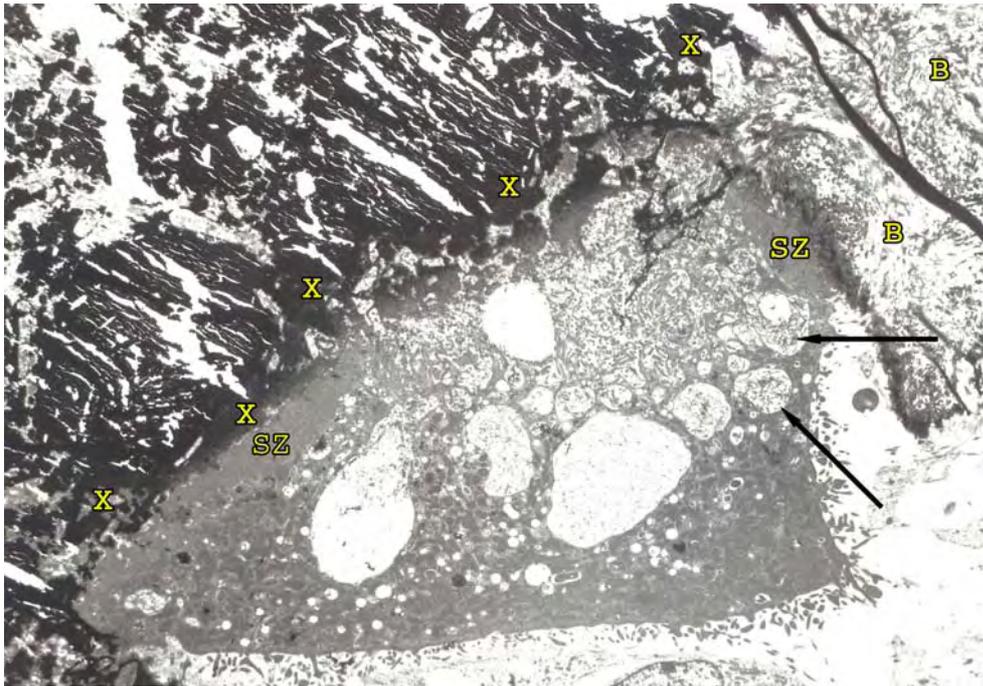


Abbildung 47: TEM: Osteoklast am Knochen-Implantatübergang

Ein Osteoklast ohne angeschnittene Kerne haftet mit seiner „sealing zone“ (SZ) an der linken Bildseite am Calciumphosphat-Implantat (gelbe X), auf der rechten Bildseite am Knochen (B). In den mit schwarzen Pfeilen markierten Vakuolen finden sich wie in Abbildung 44 feine Kristallnadeln. TEM, 6 Wochen nach Implantation, Vergrößerung: 3118 fach.

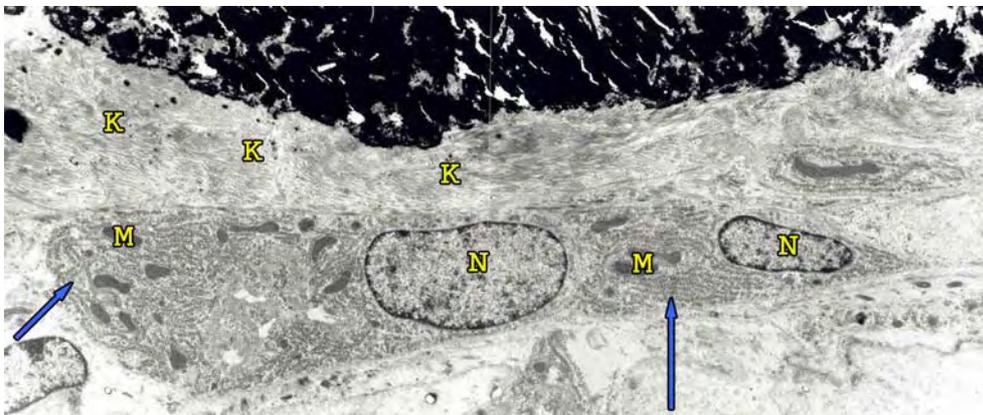


Abbildung 48: TEM: Osteoblasten I

Zwei ovale Osteoblasten mit jeweils auf der rechten Bildseite gelegenen Kern (N) liegen unter dem von ihnen synthetisierten und in Richtung des Calciumphosphat-Implantates (elektronendicht im oberen Bildrand gelegen) exprimierten kollagenen Materials (K). Die Mitochondrien (M) der Osteoblasten sind langgestreckt; die blauen Pfeile markieren die mäandrierend verlaufenden Schläuche des rauen endoplasmatischen Retikulums. TEM, 6 Wochen nach Implantation, Vergrößerung: 4544 fach.

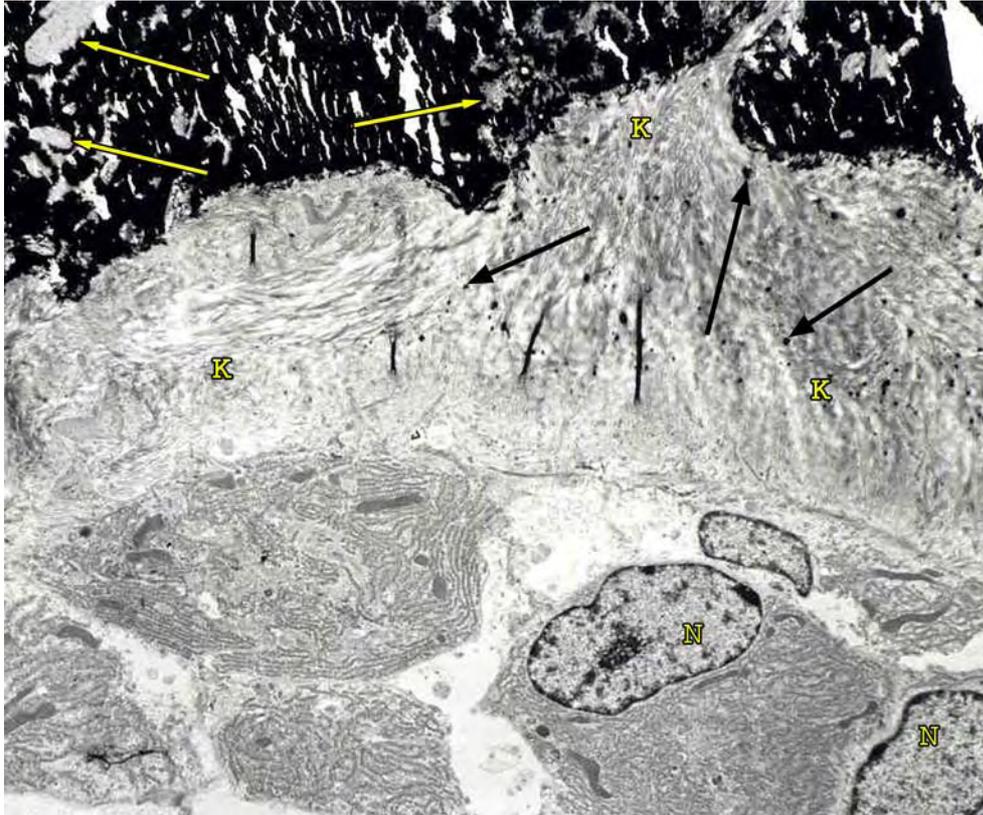


Abbildung 49: TEM: Osteoblasten II

Osteoblasten, teilweise mit Kernanschnitt (N), teilweise ohne, liegen durch das von ihnen in Richtung des Implantates sezernierten Kollagens (K) vom Calciumphosphat-Implantat getrennt im unteren Bilddrittel vor. Die schwarzen Pfeile weisen auf Mineralisationszentren (Sphäriten mit einem Durchmesser von 30- 100 nm) hin. Am oberen Bildrand sind Lücken im Calciumphosphat-Implantat schon wieder durch neugebildeten Knochen geschlossen (gelbe Pfeile). TEM, 6 Wochen nach Implantation, Vergrößerung: 3118 fach.

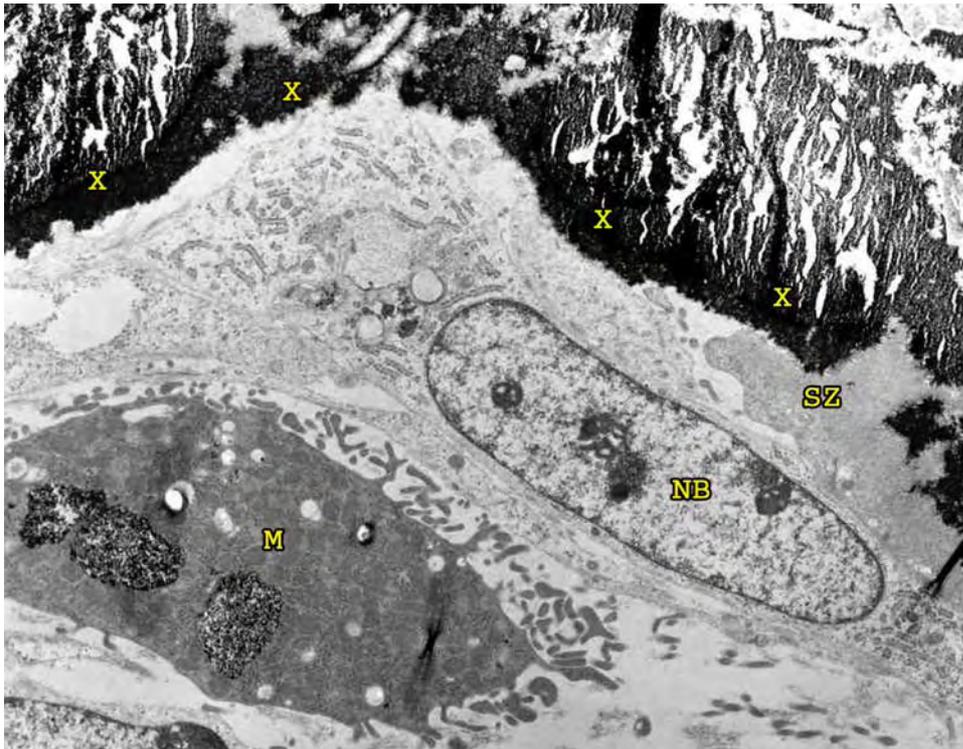


Abbildung 50: TEM: Makrophage, Osteoblast und Osteoklast

Die am Auf- und Abbau beteiligten Zellen kommen in engem räumlichen Zusammenhang vor. Im unteren Bildteil liegt ein Makrophage (M), welcher elektronendichtes Material in 3 Vakuolen phagozytiert hat. Direkt darüber liegt ein Osteoblast mit angeschnittenem Kern (NB). Am rechten Bildrand ist die organellenfreie Struktur der „sealing zone“ (SZ) eines Osteoklasten auszumachen. Das elektronendichte Calciumphosphat-Implantat ist durch gelbe X gekennzeichnet. TEM, 6 Wochen nach Implantation, Vergrößerung: 6348 fach.



Abbildung 51: TEM: Osteozyt

Ein junger Osteozyt mit seinem im Verhältnis zum Zytoplasma großen ovalen Kern (N) ist von neugebildetem Knochen (B) eingeschleitet. TEM, 6 Wochen nach Implantation, Vergrößerung: 6348 fach.

6 DISKUSSION

Das Schaf ist aufgrund seiner Größe und der Knochenstruktur für Untersuchungen zur Überprüfung der Biokompatibilität, des Knocheneinwachsverhaltens und der Degradation von Knochenersatzmaterialien besonders geeignet (MANDELKOW et al., 1990). EITEL et al. (1981) gingen davon aus, dass im Tierexperiment gewonnene Ergebnisse in ihrer wissenschaftlichen Aussagekraft für den Menschen als gültig anerkannt werden können, sofern Alter und Beanspruchung des Skelettes vergleichbar sind. Ihre Untersuchungen beziehen sich auf den osteogenen Reparatursprozess an Hunden. Die ovine Knochenstruktur entspricht den menschlichen Verhältnissen sehr genau (REHMAN et al., 1995). Die oft für Untersuchungen zur Regenerationsfähigkeit von Knochendefekten herangezogenen Nager weisen einen akzelerierten Knochenstoffwechsel auf (HOPF, 1957; FROST, 1966; SIMMONS und KUNIN, 1970; THIELEMANN und ETTER, 1989). Die Übertragung von an Kaninchen gewonnenen Forschungsergebnissen bezüglich des Ein- und Umbauverhaltens von Knochenersatzmaterialien auf die humanen Verhältnisse ist daher nicht statthaft (OSBORN, 1985).

Die Tibia des Schafes liegt, ebenso wie die menschliche, in der Tragachse des Beines und ist damit einer vergleichbaren Belastung ausgesetzt (WISSING et al., 1990). Knochenumbauprozesse erfolgen im Schaf dreimal langsamer als im Kaninchen (FLAUTRE et al., 1999). Wie oben ausgeführt, sind am Tierexperiment gewonnene Ergebnisse nicht ohne Einschränkungen auf die menschliche Situation übertragbar. Gefordert wird daher ein standardisiertes Defektmodell um die knöcherne Reaktion auf verschiedene Implantate vergleichend studieren zu können (DRAENERT und DRAENERT, 1987).

In der vorliegenden Versuchsanordnung wurde mit dem DBCS Instrumentarium ein 11 mm durchmessender und 25 mm tiefer Defekt im Tibiakopf des Schafes über einen ventromedialen Zugang erzeugt. Gewählt wurde diese Defektart, um einen ausreichend großen, standardisierten und reproduzierbaren Defekt unter gleichzeitig stabilen Verhältnissen im ersatzstarken Knochenlager zu schaffen (SCHNETTLER et al., 1998; HORAS et al., 2000 und 2003; PETERSEN et al., 2003). Eine zusätzliche Osteosynthese war nicht erforderlich. Dies erweist sich als vorteilhaft, da eine Osteosynthese oft zu einer Verschlechterung der Durchblutung im Implantatgebiet führt, wodurch standardisierte Bedingungen der Versuchsanordnung sowie die Vergleichbarkeit der Ergebnisse kaum mehr gegeben sind. Die Primärstabilität wurde im klinischen Teil der Studie nicht überprüft. Das

Calciumphosphat-Implantat Biobon® besitzt nach BAI et al. (1999) im Kompressionsversuch eine vergleichbare Druckfestigkeit wie Polymethylmethacrylat im osteoporotischen Knochen.

Beim Defekt im Tibiakopf des Schafes handelt es sich um ein ersatzstarkes Lager. Es weist intakte Trabekel entlang des *interfaces* auf. Die Knochenregeneration kann direkt der Revaskularisation vom Knochenlager ausgehend folgen, es muss kein Frakturspalt mehr überwunden werden.

Die Größe und Lokalisation des geschaffenen Defektes spielt eine wichtige Rolle für seine spätere Überbrückung. Erfährt ein knöcherner Spalt während der Lebenszeit eines Tieres keine Konsolidierung, spricht man von einem kritischen Defekt (GOSAIN et al., 2000).

In der hier vorgelegten experimentellen Untersuchung waren die Leerdefekte nach einer Standzeit der Tiere von 48 Wochen vollständig durchbaut. Ob eine knöcherne Durchbauung bereits bei den früheren Untersuchungszeitpunkten (6 und 24 Wochen) bestand, kann in dieser Untersuchung nicht beurteilt werden, da ausgehend von der ursprünglichen Annahme einer kritischen Defektgröße keine entsprechenden Kontrollgruppen einbezogen wurden.

In der Literatur finden sich wenig Hinweise auf die notwendige Größe eines kritischen Defektes beim Schaf. In der Versuchsanordnung von SCHNEIDER (1998) wurden 7 mm durchmessende Defekte im Schaffemur distal geschaffen, das Geschlecht der Tiere wurde nicht erwähnt. Nach 12 Wochen zeigte sich der mittels autogener Knochenzelltransplantation auf Gelatinevliesen aufgefüllte Defekt durchbaut. Eine Kontrollgruppe ohne Ersatzmaterial existierte nicht. Keine Durchbauung der mit dem DBC-System geschaffenen Leerdefekte zeigte sich bei den jeweils zwei Jahre alten weiblichen Schafen von SCHNETTLER (2000) im Tibiakopfbereich nach 60 Tagen (Defektgröße 12 mm) sowie bei HEISS (2002) im Olecranonbereich nach 84 Tagen (Defektgröße 10 mm). Bei WEFER et al. (2000) wurden 2 cm lange Tibiasegmentdefekte an zwei Jahre alten Mutterschafen geschaffen, die osteosynthetisch mit einer Platte versorgt wurden. Die Leerdefekte der Kontrollgruppe zeigten sich nach 52 Wochen nicht überbaut. Bei der Untersuchung von WIPPERMANN et al. (1999) und BLOEMERS et al. (2003) wurde ein 3 cm messender Defekt im Bereich des Tibiaschaftes von zwei Jahre alten Schafen mit einem unaufgebohrtem Verriegelungsnagel versorgt. Das Geschlecht der Tiere fand keine Erwähnung. Die Leerdefekte der Kontrollgruppe zeigten sich nach 12 Wochen nicht durchbaut. Bei den oben angeführten Untersuchungen im Tibiaschaftbereich handelt es sich um die knöcherne Regeneration eines kortikalen Defektes. Eine Übertragbarkeit auf die spongiösen Verhältnisse des Tibiakopfes wie in der vorliegenden Untersuchung ist nicht gegeben.

Nach den Regeln der Knochenbruchheilung und der Regulation des Knochenauf- und abbaus wird bei einem spongiösen und auch kortikalem knöchernen Defekt die sukzessive Wiederherstellung des ursprünglichen Zustandes erwartet. In der vorliegenden Versuchsanordnung handelt es sich nicht um einen Defekt im Sinne einer Fraktur. Die Spannungstrajektorien, nach denen die Spongiosabälkchen angeordnet sind, wurden jedoch zerstört. Voraussetzungen für die Wiederherstellung des Ursprungszustandes sind insbesondere die Resorbierbarkeit des Knochenersatzmaterials, die Durchblutung des Lagerknochens, die ossäre Regenerationsfähigkeit des Wirtsknochens und die Infektfreiheit des Operationsgebietes.

Das implantierte Calciumphosphat-Implantat Biobon[®] entspricht in seiner Zusammensetzung, ebenso wie HA-Keramiken der anorganischen Knochenkomponente. Das Calciumphosphat-Implantat wurde beim Kaninchen innerhalb von 4 Wochen zu Knochen trabekeln umgebaut, nach 12 Wochen zeigten sich lamellärer und kortikaler Knochen (KNAACK et al., 1998). Die osteokonduktive Wirkung dieses Calciumphosphat-Implantates beschreiben LEE et al. (1999) und PATKA et al. (1998). In kontrollierten Studien wurde Biobon[®] bereits beim Menschen eingesetzt (LE HUEC et al., 1997; SARKAR et al., 2001 und 2002; PATKA et al., 2003; BLOEMERS et al., 2004). Nach Entfernung des Osteosynthesematerials konnten vereinzelt histologische Ergebnisse auch beim Menschen gewonnen werden. Sie decken sich mit den vorliegenden Ergebnissen am Schaf, die auf die gute Osteokonduktion des Implantatmaterials hinweisen. Die Resorption des Calciumphosphat-Implantates war noch nicht vollständig abgeschlossen, teilweise war es radiologisch noch nach 12 Monaten deutlich erkennbar.

Die im Tierexperiment direkt postoperativ angefertigten nativradiologischen Bilder zeigen die Lage des Knochenersatzmaterials im Tibiakopf des Schafes. Das Calciumphosphat-Implantat absorbiert durch seine höhere Dichte etwas mehr Röntgenstrahlung als die Spongiosa des Knochens und ist damit in den Bildern als Aufhellung sichtbar (siehe Abbildung 10 und Abbildung 11). Die Überlagerung der Materialschichten und deren Abbildung in einer Ebene in der Nativröntgenaufnahme verhindern es, die knöcherne Integration des Knochenersatzmaterials beurteilen zu können. Die CT-Aufnahmen erlauben dagegen die Aussage, ob ein Defekt randständig mit Knochenersatzmaterial aufgefüllt wurde und ob Lufteinschlüsse oder Brüche vorhanden sind. Zur Feststellung der knöchernen Integration ist jedoch dieses hoch auflösende Verfahren wie auch die Magnetresonanztomographie nicht geeignet. Histologische und ultrastrukturelle Befunde sind zur Klärung weitergehender

Fragestellungen über die Biokompatibilität, das Knocheneinwachsverhalten und den Abbau des Implantates unerlässlich.

Fluorochromfarbstoffe sind Chelat-Bildner. Sie werden zusammen mit Calcium in der Appositionszone des neugebildeten Knochens im Hydroxylapatit abgelagert (JANSEN, 2003). Die Fluoreszenzmarkierung geht auf OLERUD und LORENZI (1970) zurück. RAHN (1979) hat die Intravitalfarbstoffe in definierten Zeitabständen verabreicht, die Methode wurde dann von DRAENERT weiterentwickelt (NOLTE et al., 1999; DRAENERT et al., 2001). Wie die fluoreszenzmikroskopischen Befunde gezeigt haben, hat sich neugebildeter Knochen nur in den seltensten Fällen in Gestalt aufeinanderfolgender konzentrischer Lamellen um das Knochenersatzmaterial herum angeordnet. Die durch die Fluoreszenz unterschiedlichen Zeitpunkten zugeordnete Knochenneubildung offenbart, dass früh entstandener Knochen zu einem späteren Zeitpunkt im Sinne des *remodeling* wieder abgebaut wird (siehe Abbildung 36, Abbildung 37 und Abbildung 38). Auf- und Abbau des Knochens finden somit nebeneinander statt. Die Defektregeneration findet erst am Ende einer katabolen Phase nach circa 4 bis 6 Tagen statt. Nicht in allen Präparaten im Implantatgebiet waren die gelben Banden der Tetracyclingabe nachweisbar (siehe Kapitel 5.3.3). SCHNETTLER (1993) beschrieb im Rahmen einer Versuchsserie mit Minischweinen ebenfalls, dass die zuerst verabreichten Farblabel nach *remodeling*vorgängen im Transplantat nach 12 Wochen teilweise wieder resorbiert waren.

Die Fluoreszenz korreliert zeitlich und räumlich mit einer Knochenneubildung, während das ausbleibende Signal, wie in der vorliegenden Untersuchung beim Tetracyclin beobachtet, auf einen Knochenabbau im Rahmen des *remodeling*prozesses hinweist. Insgesamt spiegelt die Fluoreszenzmikroskopie ein sehr unregelmäßiges Bild der Knochenneubildungsprozesse zu den späteren Zeitpunkten wider (siehe Abbildung 37 und Abbildung 38). Die Anordnung der Banden lässt den Schluss zu, dass auch nach 48 Wochen noch Auf- und Umbauvorgänge im Knochen-Implantatverband stattfinden. Der Knochenstoffwechsel im Implantatgebiet weist höhere Umbauraten als der Lagerknochen auf.

Der Einfluss der Fluorochrommarkierung auf den Knochenstoffwechsel wird unterschiedlich diskutiert. BEVELANDER und COHLAN (1962) sowie CHOWDHURY et al. (1993) gehen davon aus, dass eine Tetracyclingabe den Knochenstoffwechsel negativ beeinflusst. So zeigte Doxycyclin *in vitro* eine dosisabhängige Hemmung der Osteoklastenfunktion. SALO et al., (1997) weisen mit ihren Untersuchungen zur Transcytose mit tetracyclinmarkiertem organischen und anorganischen Knochenmaterial den Weg der Vesikel durch Osteoklasten

nach (siehe Abbildung 52). Sie stellen keine Funktionsbeeinträchtigung dieses Zelltyps in vitro fest. Der zeitliche Ablauf der Transzytose ist fluoreszenzmikroskopisch in Abbildung 53 und Abbildung 54 dargestellt (SALO et al., 1997).

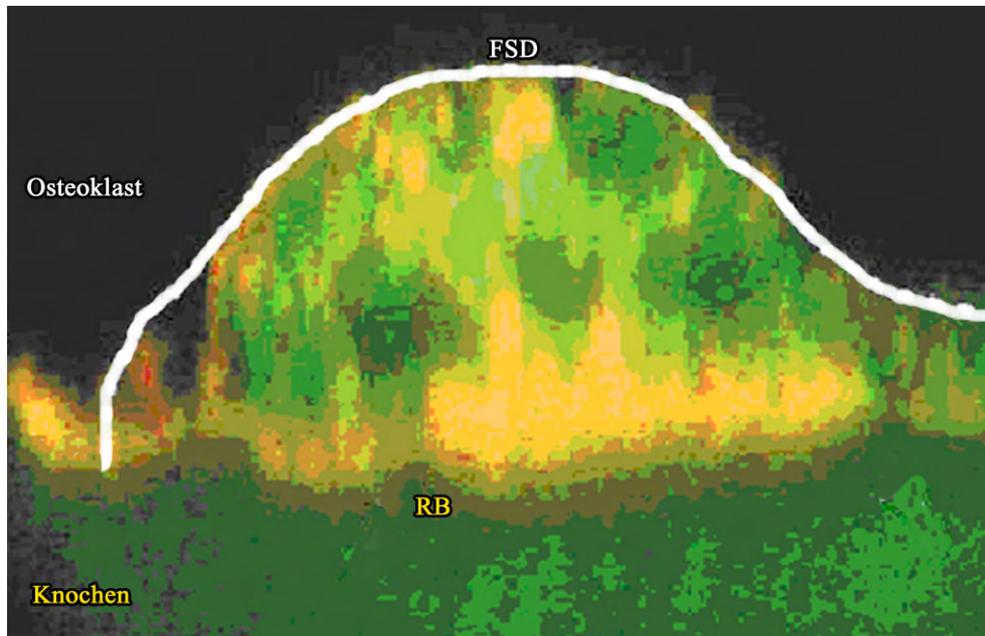


Abbildung 52: Fluoreszenzhistologie: Transzytose von Tetrazyklin durch einen Osteoklasten.

Zur Visualisierung der Transzytose durch den Osteoklasten (Umriss des Osteoklasten durch weiße Linie gekennzeichnet) wurde boviner Knochen in vivo mit Oxytetracyclin (gelb) markiert. Die Fluoreszenzaufnahme zeigt den Weg des Tetrazyklins von der Basis des Osteoklasten mit ihrem „ruffled border“ (RB) bis zur „functional secretory domain“ (FSD) apikal, derjenigen Zone, an welcher die Extrusion des Materials erfolgt. Abbildung modifiziert nach SALO et al., 1997.

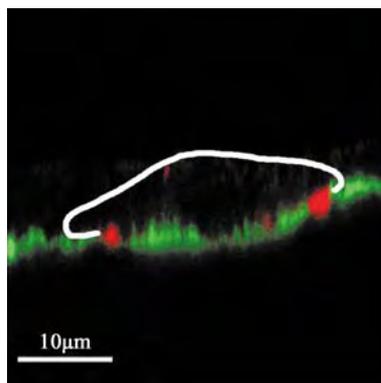


Abbildung 53: Fluoreszenzhistologie: SALO a

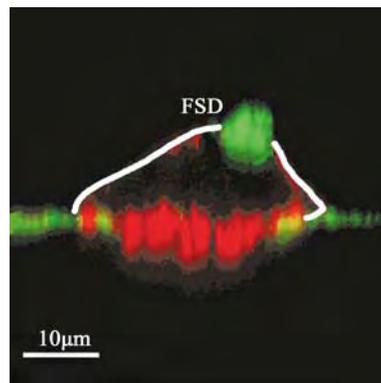


Abbildung 54: Fluoreszenzhistologie: SALO b

Resorptionskreis von Osteoklasten modifiziert nach SALO et al., 1997. Mit Biotin (grün) beschichtete bovine Knochenscheiben dienen den Rattenosteoklasten (weiße Umrisslinie) als Resorptionsmaterial. Während zu Beginn der Resorption (a) noch kein Biotin in der Zelle vorhanden ist, wird zum späteren Zeitpunkt (b) das Biotin an der „functional secretory domain“ des Osteoklasten apikal ausgeschleust. Aktin ist durch Phalloidin rot gekennzeichnet.

Die nach Doxycyclingabe über 28 Tage veränderten mechanischen Eigenschaften von ovariectomierten Ratten untersuchten PYTLIK et al. (2004). Sie konnten keine statistisch signifikanten Änderungen der Knochenfestigkeit feststellen.

Calciumphosphat-Implantate und Hydroxylapatitkeramiken (HA-Keramiken) sind in ihrer biologischen Wirkung vergleichbar. Die Erschließung von HA-Keramiken (Endobon[®], Pyrost[®]) läuft jedoch sehr viel langsamer ab als die des Calciumphosphat-Implantates (Biobon[®]). Es wird dabei eine reine Osteokonduktion beobachtet (LIEBENDÖRFER und TRÖSTER, 1997; MITTELMEIER, 1998; HELBER und ULRICH, 2000;). BAREILLE et al. (2000) zeigten, dass sich in einer mit humanen Knochenmarkszellen beladenen Hydroxylapatitkeramik, die im Subcutangewebe der Maus implantiert worden war, Knochenbälkchen ausgebildet hatten. Die Implantation ohne Knochenmarkszellen hatte keine Knochenbildung hervorgerufen. Die oben beschriebene Methode der Blutmarkaspiration geht auf BURWELL (1961) zurück. Den humanen Knochenmarkszellen ist die osteoinduktive Wirkung zuzuschreiben. Hydroxylapatit und Calciumphosphat-Implantat zeigten allein keine Osteoinduktivität im ersatzschwachen Lager, wenn sie in Subcutan- und Muskelgewebe von Schafen implantiert wurden (GOSAIN et al., 2002).

In der vorliegenden Untersuchung konnte bereits nach 6 Wochen histologisch eine vollständige Erschließung des Calciumphosphat-Implantates beobachtet werden, wobei das Calciumphosphat-Implantat in unregelmäßig gestaltete Partikel fragmentiert war. Gefäßreiches Gewebe befand sich zwischen den verbliebenen Implantatresten. Die hohe Porosität von 80% des verwendeten Calciumphosphat-Implantates (DRIESENS, 1999) ist für dieses Einwachsverhalten eine wesentliche Voraussetzung. Die mit einer hohen Porosität einhergehende Minderung der Primärstabilität erfordert im klinischen Einsatz des Calciumphosphat-Implantates Biobon[®] die gleichzeitige Anwendung einer stabilen Osteosynthese. Die Ergebnisse sprechen für eine Osteokonduktion, eine osteoinduktive Wirkung des implantierten Calciumphosphat-Implantates wurde nicht gesehen. Dies entspricht den Aussagen unter anderem von SCHNETTLER et al. (2003) und DELLOYE et al. (2003), dass kein erhältliches Knochenersatzmaterial ohne den Zusatz eines osteoinduktiven, biologischen Faktors (als Composit) osteoinduktiv ist.

Nach BOHNER (2000 und 2001) wird die Unterscheidung der Calciumphosphate (CaP) in „*high temperature*“ und „*low temperature*“ CaP vorgenommen. Das untersuchte Calciumphosphat-Implantat gehört in die Gruppe der „*low temperature*“ CaP, die mit ihrer großen Oberfläche von mehr als 100m²/Gramm und der hohen Wasserlöslichkeit eine gute

Degradierbarkeit aufweisen. Das chemisch vorhergesagte Abbauverhalten stimmt mit der in unserer Untersuchung dargestellten Abbaurate des Calciumphosphat-Implantates gut überein.

Die toluidinblau gefärbten Schliffe zeigen die vom Lagerknochen ausgehende Besiedelung des Calciumphosphat-Implantates mit körpereigenem neugebildeten Knochen (*interface-region*, graue Pfeile in Abbildung 16). Im Verlauf der Zeit kommt es zu einer fortschreitenden konzentrischen Einscheidung des Ersatzmaterials sowie zum Umbau der Trabekelstruktur im Tibiakopf. Bereits nach 6 Wochen ist der Umbau des transient gebildeten Geflechtknorpels zum reifen Lamellenknochen sichtbar.

Wo die Ersatzplastik operationstechnisch bedingt im Markraum liegt, war der Umbau später oder überhaupt nicht zu verzeichnen. Es entstand also nur an den Stellen neuer Knochen, an denen er auch physiologischerweise zu finden ist.

Nur in einer Ausnahme war nach 6 Wochen die bindegewebige Einscheidung des Knochenersatzmaterials zu sehen (siehe Abbildung 26). Die Vergrößerungen (siehe Abbildung 27 und Abbildung 28) zeigen die im Bindegewebe vorherrschenden spindelförmigen Fibrozyten. Toluidinblau als basischer Farbstoff zeigt eine große Affinität zu den sauren Gruppen der RNA. Fibrozyten als in ihrer Aktivität reduzierte Zellen weisen im Zytoplasma nur wenig endoplasmatisches Retikulum auf, das Zytoplasma der Zellen bleibt daher ungefärbt, sichtbar sind in Abbildung 28 daher nur die Zellkerne. Lagerknochen und Implantat sind durch die Bindegewebsschicht getrennt. Die bindegewebige Einscheidung ist möglicherweise auf ein operationstechnisches Problem zurückzuführen. Vermutlich war die Implantation des Knochenersatzmaterials in einen mit Blut gefüllten Hohlraum erfolgt. Hierdurch wurde die Anlagerung des Materials an den Lagerknochen verhindert. Nach Resorption des Hämatoms wurde der verbleibende Raum bindegewebig aufgefüllt. Dieser Einzelfall bestätigt die allgemeine Auffassung, dass ein Knochenersatzmaterial direkten Kontakt zum Lagerknochen für die knöcherne Erschließung benötigt. Die formschlüssige Implantation in ein blutrockenes Implantatbett ist die wesentliche Voraussetzung für den erfolgreichen Einsatz von osteokonduktiven Knochenersatzmaterialien.

Bei der Herstellung von Calciumphosphat-Implantaten können verschiedene Zusätze entweder der pulverförmigen oder flüssigen Komponente beigemischt werden, um den Zerfall des Calciumphosphat-Implantates beim ersten Kontakt mit Körpersekreten bis zur Abbindereaktion zu verhindern (KHAIROUN et al., 1997 und 1999). Das hier untersuchte Calciumphosphat-Implantat hingegen besitzt keine solche Zusätze. Es ist davon auszugehen, dass es bei Kontakt mit Blut oder anderen Körperflüssigkeiten zu einer Vermengung dieser

Komponenten mit dem Knochenersatzmaterial kommt, bis die Abbindeaktion abgeschlossen ist. Für die Erschließung und den Durchbau des Knochenersatzmaterials mit neugebildetem Knochen ist die so stattfindende Desintegration zu Lasten der Primärstabilität von Vorteil. Die Zellen, welche die Ersatzplastik besiedeln, werden durch Wachstumsfaktoren an den Ort des Regenerationsprozesses geleitet. Aus verletzten Blutgefäßen entstammende Thrombozyten entlassen zahlreiche Wachstumsfaktoren und Zytokine, die die Proliferation und Differenzierung von Zellen steuern. Hier sind vor allem PDGF (Platelet derived growth factor), VEGF (Vascular endothelial growth factor), FGF (Fibroblast growth factor) und TGF β (Transforming growth factor β) zu nennen (EINHORN, 1997; CARANO und FILVAROFF, 2003; SCHNETTLER et al., 2003 und 2004). 6 Wochen nach der Implantation war die Knochenanlagerung an die Implantatoberflächen bis ins Zentrum der Knochenersatzplastik fortgeschritten. Dass die Knochenneubildung auf den Implantatoberflächen vom Rand ausgeht, also ihren Ursprung im Lagerknochen hat, konnten unter anderem SCHNETTLER et al. (2003) zeigen.

Zur Beantwortung der Frage, ob das untersuchte Calciumphosphat-Implantat direkt für den Aufbau von neuem Knochen verwendet wird, muss auf die Untersuchungen von LE HUEC et al. (1998) verwiesen werden. Circa 25% des radioaktiv markierten, in die Femurkondyle des Kaninchens implantierten Calciumphosphates, waren im neugebildeten Knochen der Region wiederzufinden. Die niedrige Radioaktivität der Markierung ließ jedoch keinen Schluss darüber zu, ob sich der Rest des resorbierten Calciums noch im Körper der Versuchstiere befand.

Neben der knöchernen Erschließung des geschaffenen Defektes stand besonders der zellvermittelte Umbau des Calciumphosphat-Implantates im Vordergrund der wissenschaftlichen Fragestellung.

Der Knochenaufbau wird durch Osteoblasten bewerkstelligt. Morphologisch sind Osteoblasten durch ihre kubische Zellform gekennzeichnet. Sie liegen direkt dem von ihnen exprimierten Osteoid an (siehe Abbildung 24, Abbildung 48 und Abbildung 49). Das in den TEM-Bildern der Osteoblasten zahlreich vorhandene raue endoplasmatische Retikulum (rER) zeugt von der hohen Syntheseleistung dieser Zellen. In der Umgebung von Osteoblasten kann der pH-Wert bis auf 8,5 ansteigen (KHAIROUN et al., 2002). Übereinstimmend wird in der Literatur darauf verwiesen, dass sie von humanen mesenchymalen Stammzellen (hMSC) abstammen (JÄGER et al., 2002). Als Differenzierungsort wird das humane Knochenmark angesehen, in welchem Präosteoblasten nachgewiesen werden können. Aus mesenchymalen

Stammzellen differenzieren sich neben knochenbildenden Zellen auch Knorpel-, Sehnen-, Bänder-, Dermis-, Muskel- und Bindegewebszellen sowie Knochenmarksstromazellen und Adipozyten. Die Differenzierungsschritte des Osteozyten –ausgehend von der Osteoprogenitorzelle (entspringt der humanen mesenchymalen Stammzellreihe)– durchschreiten folgende Stadien: Prä-osteoblast, Osteoblast, Präosteozyt, Osteozyt (KAISER und DELLING, 2002). Bei der osteogenen Induktion spielen vor allem Dexamethason, Ascorbinsäure, β -Glycerolphosphat sowie verschiedene Wachstumsfaktoren der BMP Gruppe eine herausragende Rolle (JÄGER et al., 2002).

Mit fortschreitender Knochenneubildung werden Osteoblasten zu Osteozyten. Das Verhältnis des Zytoplasmas zum Kern verschiebt sich dabei zugunsten des Kernes. Beim *remodeling* des Knochens werden die Osteozyten durch Osteoklasten aus ihrem Knochenverband herausgelöst. Stellenweise erfolgt jedoch die Wiedereinbettung in den neuen Knochen und so überstehen die Osteozyten, oft unter Erhalt ihrer Zellkontakte, den Umbau des Knochens (SUZUKI et al., 2000).

Osteoklasten bewerkstelligen Knochen- wie auch den Calciumphosphat-Implantatabbau. Zellen, die lichtmikroskopisch als implantatassoziierte, mehrkernige Zellen anzusprechen sind, reagieren im Rahmen der enzymhistochemischen Färbung mit saurer Phosphatase positiv. Osteoklasten exprimieren das Enzym tartratresistente saure Phosphatase (TRAP) (GAUTHIER et al., 1999). Aber auch mehrkernige Riesenzellen können TRAP-positiv sein. Der sicherste Nachweis für Osteoklasten liegt daher im ultrastrukturellen Nachweis der Osteoklastenmorphologie, allen voran dem „*ruffled border*“ und der „*sealing zone*“ (WENISCH et al., 2003) sowie im Nachweis der Calcitoninrezeptoren (ATHANASOU, 1996). Zum Nachweis von Calcitoninrezeptoren der ovinen Osteoklasten sind speziesspezifische Antikörper notwendig, die derzeit für Schafe nicht verfügbar sind.

KONDO et al. (2001) stellten fest, dass für die Regulation von Osteoklasten alkalische Phosphatase (ALPase)-positive Zellen notwendig sind. Die Funktion der Osteoblasten ist unter anderem mit ihrem Gehalt an alkalischer Phosphatase assoziiert. Der qualitative Nachweis von alkalischer Phosphatase ist jedoch nicht spezifisch für Osteoblasten, da auch Fibroblasten und mesenchymale Stammzellen in der Lage sind, dieses Enzym zu exprimieren. Bereits TAKAHASHI et al. (1988) haben gezeigt, dass Osteoklastenvorläuferzellen den Kontakt mit ALPase-positiven Zellen (Osteoblasten) benötigen, um sich zu Osteoklasten zu differenzieren. Auch SAKIYAMA et al. (2001) weisen in ihren Untersuchungen zur Kultivierung von Osteoklasten darauf hin, dass Osteoblasten oder Knorpelzellen, die ebenfalls

das Enzym alkalische Phosphatase besitzen, für die Differenzierung von Osteoklasten notwendig sind.

Wiederholt wurde die Frage gestellt, ob Makrophagen durch Phagozytose oder Osteoklasten durch Resorption am Abbau von Calciumphosphat-Implantaten beteiligt sind. Osteoklasten sind zwar die einzigen auf resorptiven Knochenabbau spezialisierten Zellen, aber auch Makrophagen oder Tumorzellen sind mittels Phagozytose zum Knochenabbau befähigt (ATHANASOU, 1996). Wie die eigenen Ergebnisse zeigen, ist auf lichtmikroskopischer Ebene keine Differenzierung zwischen mehrkernigen Riesenzellen und Osteoklasten möglich (siehe Abbildung 22 und Abbildung 23). Mehrkernige Zellen entsprechen entweder Makrophagen-Polykaryen, die ein verkalktes Gewebe nur durch Phagozytose abbauen (ATHANASOU et al., 1991) oder Osteoklasten, die durch ihre spezifischen Organellen und Membrandomänen („*ruffled border*“, „*sealing zone*“, Protonenpumpen, mit Proteinase gefüllte Vesikel) Knochen sehr effektiv abbauen können. Monozyten und Makrophagen können zwar den anorganischen und organischen Teil des Knochens abbauen, sie bilden dabei aber, anders als Osteoklasten, keine Resorptionslakunen aus. Aufgrund ihrer in vitro Untersuchungen weisen HEYMANN et al. (2001) darauf hin, dass Osteoklasten nicht nur zur Resorption, sondern auch gleichzeitig zur Phagozytose befähigt sind. Morphologisch unterscheiden sich die auf Calciumphosphat kultivierten Osteoklasten nicht von denen, die auf Knochen kultiviert worden waren.

In der vorliegenden Untersuchung verweisen sowohl die positive Färbung mit saurer Phosphatase, die Ultrastruktur und der Nachweis von monoklonalen Antikörpern gegen zytoskelettales Aktin eindeutig darauf, dass Osteoklasten am Abbau des Calciumphosphat-Implantates beteiligt sind. Die Osteoklasten heften mit der „*sealing zone*“ direkt dem Knochenersatzmaterial an. Bei der „*sealing zone*“ handelt es sich um eine spezifische Membrandomäne, die nach Migration am Ort der Resorption vom Osteoklasten ausgebildet wird (VÄÄNÄNEN und HORTON, 1995). Die Plasmamembran heftet fest der Knochenmatrix an und dichtet so den Resorptionsort von der Umgebung ab. Das mittels goldkonjugierten monoklonalen Antikörpern gegen zytoskelettales Aktin nachgewiesene Aktin vermittelt die adhäsiven Eigenschaften der „*sealing zone*“, indem es über mikrofilamentbindende Proteine wie Vinculin, Talin und α -Aktin die Verbindung zu den intrazellulären Domänen der Integrine, besonders dem $\alpha\beta 3$ -Rezeptor herstellt (WENISCH et al., 2003). Abgedichtet von der „*sealing zone*“ befindet sich das strukturelle Resorptionsorganell des Osteoklasten, das „*ruffled border*“. Die Resorptionsleistung entsteht durch die Fusion von säurehaltigen intracellulären Vesikeln mit der Plasmamembran, die dem

Knochen direkt zugewandt ist (BLAIR et al., 1989). Der zur Degradation der mineralischen Knochenphase notwendige niedrige pH-Wert von 4,5 (TEITELBAUM, 2000) wird durch ATP-abhängige Protonenpumpen (siehe Abbildung 2) aufrecht erhalten (BARON et al., 1985). Die Matrixproteine wie Kollagen werden durch saure Proteasen (vor allem Cathepsin K) abgebaut (KORNAK et al., 2003).

DOI et al. (1999) beobachteten im Unterschied zu den vorliegenden Ergebnissen keine Resorption von Scheiben aus komprimiertem Dicalcium-phosphat-dihydrat durch Osteoklasten in vitro. Dicalcium-phosphat-dihydrat entspricht den Grundsubstanzen aus denen auch das untersuchte Calciumphosphat-Implantat hergestellt ist. Sie führen diesen Befund auf die hohe Calciumionenkonzentration im Medium zurück: hohe Calciumionenkonzentrationen hemmen die Aktivität von Osteoklasten.

Die Löslichkeit eines Knochenersatzmaterials stellt einen wichtigen Faktor hinsichtlich seiner Degradierbarkeit dar: herrscht durch hohe Löslichkeit einer Calciumphosphatplastik eine hohe Calciumionenkonzentration im Interzellularraum, werden Osteoklasten durch entsprechend intrazellulär ansteigende Spiegel weitgehend gehemmt. Der Abbau erfolgt nur noch durch die weniger effektiven Makrophagen.

YUASA et al. (2001) zeigten, dass in vitro eine Resorption von Apatitzementen durch Kaninchenosteoklasten erfolgt. Sie fanden jedoch deutliche Unterschiede in der zahlenmäßigen Besiedelung der Apatitzemente und der als Kontrolle dienenden Scheibe bovinen kortikalen Knochens. Auf dem kortikalen Knochen waren die Defekte, die durch Resorption der Knochenmasse von Osteoklasten hervorgerufen wurden 12 mal zahlreicher und zugleich um 120% größer als diejenigen auf den Apatitzementen. Übertragen würde diese Beobachtung bedeuten, dass bei Knochenersatzstoffen aus Calciumphosphat weniger als ein Prozent der Degradation von kortikalem Knochen erreicht würde.

Unsere eigenen Ergebnisse zeigen jedoch einen Um- und Abbau des Calciumphosphat-Implantates durch Osteoklasten in einem deutlich kürzeren Zeitraum, als es die in vitro-Studie (YUSA et al., 2001) nahe legt. Ein Rückschluß von der in vitro-Studie auf in vivo-Verhältnisse scheint daher nicht ohne weiteres möglich und zulässig.

NESBITT und HORTON (1997) beschreiben die Aufnahme und den Weg von resorbiertem Knochen und seiner Matrixproteine (wie Collagen Typ I) in und durch den Osteoklasten in Form von Endocytose und Transcytose. Diese Mechanismen gehen vom „*ruffled border*“ aus. Die Abbauprodukte gelangen zur basolateralen Membran, wo sie an den Extrazellularraum

abgegeben werden. Den gleichen Mechanismus konnten wir erstmals im Tierexperiment nachweisen (siehe Abbildung 44 und Abbildung 45).

Der anorganische Teil des Calciumphosphat-Implantates wird durch die vom „*ruffled border*“ sezernierte Säure aufgelöst und erscheint dadurch weniger elektronendicht (heller). Zum einen liegt das Abbaumaterial frei im Zytoplasma, zum anderen ist es in Vakuolen eingeschleust. Einige optisch leer erscheinende Vakuolen sind möglicherweise schnitt- und fixationsbedingt ungefüllt. Der Osteoklast speichert das von ihm abgebaute Material nicht, sondern transportiert es von der apikalen Seite zur basolateralen Membran (*funktional secretory domain*), wo es dann an den Interzellularraum abgegeben wird (siehe Abbildung 45). Ein- oder mehrkernige Makrophagen nehmen das Material durch Phagozytose auf (siehe Abbildung 46).

Die dichtgepackten Mitochondrien im Zytoplasma der Osteoklasten sind ein Hinweis auf die enorme Energieleistung, die diese Zellen beim Abbau von Knochen oder Knochenersatzmaterial erbringen. Seine Effizienz verdankt der Osteoklast sicherlich auch dem Umstand, dass durch die Transzytose die Anheftung an das zu degradierende Material nicht immer wieder erneuert werden muss.

Unzureichend sind bisher die Transportwege von phagozytiertem Calciumphosphat-Implantat im Organismus bekannt. In kommenden experimentellen in-vivo Untersuchungen sollte der weitere Weg des Transportmechanismus der Makrophagen erforscht werden.

7 ZUSAMMENFASSUNG

Die Auffüllung knöcherner Defekte am menschlichen Skelett stellt eine häufige Notwendigkeit in der Unfallchirurgie und Orthopädie dar. Unter den zur Verfügung stehenden Knochenersatzmaterialien gewinnen die synthetischen Calciumphosphat-Implantate immer größere Bedeutung. Die Mechanismen der Integration und Resorption von Knochenersatzplastiken können nur im Tierexperiment untersucht werden. Ziel der Arbeit war, die durch Implantation eines Calciumphosphat-Implantates im Knochen hervorgerufenen Umbauvorgänge in ihrem zeitlichen Ablauf radiologisch, histologisch und elektronenmikroskopisch darzustellen.

Als Tierspezies wurde das Schaf gewählt, da die Knochen in Struktur, Größe und Stoffwechsel den menschlichen Verhältnissen sehr nahe kommen. Nagetiere sind für diese Untersuchung weniger geeignet, da sie eine extrem hohe Regenerationsfähigkeit der Knochendefekte aufweisen.

Die Implantation des Calciumphosphat-Implantates erfolgte in einen standardisierten Tibiabohrlochdefekt im Bereich des Tibiakopfes von 11 mm Durchmesser und 25 mm Tiefe bei 9 weiblichen zwei Jahre alten Merino Schwarzkopfschafen. Zusätzlich dienten 3 Tiere mit je einem Leerdefekt als Kontrolle. Postoperativ wurden Nativröntgenaufnahmen in zwei Ebenen durchgeführt.

Alle Tiere wurden in drei Zeiträumen durch subcutane Injektionen von drei verschiedenen Fluorochromen markiert. Am Ende der Nachbeobachtungszeit von 6, 24 und 48 Wochen wurden die Tiere getötet und die betreffende Extremität zur Fixation des Gewebes perfundiert. CT-Schnitte, Schliffpräparate, Semidünnschnitte, Fluoreszenzmikroskopie und Transmissionselektronenmikroskopie (TEM) fanden Eingang in die Untersuchung.

Im histologischen Schliff schreitet die Knochenneubildung vom Lagerknochen ausgehend nach zentripetal hin fort und erreicht das Zentrum bereits nach 6 Wochen. Das Calciumphosphat-Implantat erscheint fragmentiert. Es wird von neugebildetem lamellären Knochen umwachsen. Im histologischen Schliff sind mehrkernige, in Resorptionslakunen gelegene Zellen nachweisbar. Sie wurden elektronenmikroskopisch anhand der ultrastrukturellen Merkmale des „*ruffled border*“ und der „*sealing zone*“ eindeutig als Osteoklasten identifiziert.

Der Abbaumechanismus konnte wie folgt geklärt werden:

Das anorganische Knochenersatzmaterial wird durch den im subosteoklastären Raum aufgebauten niedrigen pH-Wert abgelöst. Gleichzeitig finden im Osteoklasten Phagozytose und Resorption statt. Das Material wird in Vakuolen, die aus Plasmalemminvaginationen des „*ruffled border*“ gebildet werden, durch die Zelle geschleust (Transzytose) und an der mikrovillitragenden Seite des Osteoklasten in den Interzellularraum abgegeben. Dort wird es von einkernigen Makrophagen phagozytiert.

Dem Verstoffwechselprozess über die einkernigen Makrophagen sollte in einer weiteren experimentellen Arbeit nachgegangen werden.

8 SUMMARY

The filling or replacement of bony defects in the human skeleton is a frequent necessity in Trauma- and Orthopaedic Surgery. With the currently available synthetic replacements of bone, calcium-phosphate cement is gaining more and more importance. The mechanism of integration and absorption of synthetic bone substitutes is commonly determined in animal models.

The objective of this project was to demonstrate the sequence of structural changes after implantation of calcium-phosphate cement into bone by means of x-ray studies, histological examination, and electron microscopy. As an animal model a sheep (Merino-Blackhead) was chosen because structure, size, and metabolism of their bone are comparable to human bones. Rodents are less suitable for these investigations due to their extraordinary ability to regenerate bony defects. The Implantation of calcium-phosphate cement was carried out in a standardised fashion in a tibia drill hole of 11mm diameter and 25mm depth in nine female sheep two years of age. Postoperative conventional x-rays in two views were obtained. All animals were marked by subcutaneous injections of 3 different fluorochromes during 3 different periods of time. After 6, 24 and 48 weeks of observation animals were sacrificed and the extremity under investigation perfused for fixation. Computed Tomography (CT), cutting-grinding-technique for hard tissue, semi-thin cuts, fluorescence- and transmission electron microscopy (TEM) were utilized for examination.

New development of bone could be demonstrated from the margin of the bony defect towards the centre of the implant on histological specimens and reached the centre within 6 weeks. The calcium-phosphate cement implant appeared fragmented and was seeded with lamellar bone. Absorption of the implanted bone substitute is accomplished by large multinucleated cells, which were found in lacunas within the composite as well as the osseous tissue on histological specimens. Due to their ruffled borders and clear zone they were identified as osteoclasts by means of electron microscopy. The mechanism of absorption could be identified as follows: lysis of bone substitute material occurs in the subosteoclastic space due to low pH and packed in vacuoles that are derived from plasmalemmal invaginations. These vacuoles are transported through the cell (transcytosis) and emptied into the intercellular space by osteoclastic microvilli, where they are phagocytosed by single nucleated macrophages. The identification of the metabolic processing of these vacuoles within the single-nucleated macrophages should be the subject of future investigations.

9 LITERATURVERZEICHNIS

- (1) Aarden EM, Wassenaar AM, Alblas MJ, Nijweide PJ. Immunocytochemical demonstration of extrazellular matrix proteins in isolated osteozytes. *Histochem Cell Biol* 1996; 106(5):495-501.
- (2) Albrektsson T, Johansson C. Osteoinduction, osteoconduction and osseointegration. *Eur Spine J* 2001; 10 Suppl 2:96-101.
- (3) Amling M, Schilling AF, Haberland M, Rueger JM. Leptin: Faktor in der zentralnervösen Regulation der Knochenmasse. Entwicklung eines neuen Verständnisses von Knochenremodeling, Skelettumbau, Skeletterhaltung und Skelettrepauratur. *Orthopäde* 2001; 30(7):418-424.
- (4) Athanasou NA, Quinn J, Ferguson DJ, McGee JO. Bone resorption by macrophage polykaryons of giant cell tumor of tendon sheath. *Br J Cancer* 1991; 63:527-533.
- (5) Athanasou NA. Cellular biology of bone-resorbing cells. *J Bone Joint Surg Am* 1996; 78(7):1096-1112.
- (6) Aubin JE. Bone stem cells. *J Cell Biochem Suppl* 1998; 30-31:73-82.
- (7) Aubin JE, Bonnelye E. Osteoprotegerin and its ligand: A new paradigm for regulation of osteoclastogenesis and bone resorption. *Medscape Womens Health* 2000; 5(2):5.
- (8) Bai B, Jazrawi LM, Kummer FJ, Spivak JM. The use of an injectable, biodegradable calcium phosphate bone substitute for the prophylactic augmentation of osteoporotic vertebrae and the management of vertebral compression fractures. *Spine* 1999; 24(15):1521-1526.
- (9) Bareille R, Lafage-Proust MH, Faucheux C, Laroche N, Wenz R, Dard M, Amedee J. Various evaluation techniques of newly formed bone in porous hydroxyapatite loaded with human bone marrow cells implanted in an extra-osseous site. *Biomaterials* 2000; 21(13):1345-1352.

- (10) Baron R, Neff L, Louvard D, Courtoy PJ. Cell-mediated extracellular acidification and bone resorption: evidence for a low pH in resorbing lacunae and localization of a 100-kD lysosomal membrane protein at the osteoclast ruffled border. *J Cell Biol* 1985; 101(6):2210-2222.
- (11) Basle MF, Lesourd M, Grizon F, Pascaretti C, Chappard D. Typ-I-Kollagen im xenogenen Knochenmaterial reguliert Anbindung und Verbreitung von Osteoblasten über die beta1-Integrin-Untereinheit. *Orthopäde* 1998; 27(2):136-142.
- (12) Benum P, Lyng S, Bo O, Rafn I, Haffner JF. Porous ceramics as a bone substitute in the medial condyle of the tibia. An experimental study in sheep. *Acta Orthop Scand* 1976; 47(2):158-166.
- (13) Bevelander G, Cohlan SQ. The effect on the rat fetus of transplacentally acquired tetracycline. *Biol Neonat* 1962;(4):365-370.
- (14) Bier A. Über Knochenregeneration, über Pseudarthrosen und über Knochentransplantate. *Arch Klin Chir* 1923; 127:1-136.
- (15) Blair HC, Teitelbaum SL, Ghiselli R, Gluck S. Osteoclastic bone resorption by a polarized vacuolar proton pump. *Science* 1989; 245(4920):855-857.
- (16) Bloemers FW, Blokhuis T, Patka P, Bakker FC, Wippermann BW, Haarman HJ. Autologous bone versus calcium-phosphate ceramics in treatment of experimental bone defects. *J Biomed Mater Res* 2003; 66B(2):526-531.
- (17) Bloemers FW, Stahl J-P, Sarkar MR, Linhart W, Rueckert U, Wippermann BW. Bone substitution and augmentation in trauma surgery with a resorbable calcium phosphate bone cement. *Eur J Trauma* 2004; 30:17-22.
- (18) Böhner M. Calcium orthophosphates in medicine: from ceramics to calcium phosphate cements. *Injury* 2000; 31 Suppl 4:37-47.
- (19) Böhner M. Physical and chemical aspects of calcium phosphates used in spinal surgery. *Eur Spine J* 2001; 10 Suppl 2:114-121.

- (20) Bouler JM, Trecant M, Delectrin J, Royer J, Passuti N, Daculsi G. Macroporous biphasic calcium phosphate ceramics: influence of five synthesis parameters on compressive strength. *J Biomed Mater Res* 1996; 32(4):603-609.
- (21) Briem D, Linhart W, Lehmann W, Meenen NM, Rueger JM. Langzeitergebnisse nach Anwendung einer porösen Hydroxylapatitkeramik (Endobon) zur operativen Versorgung von Tibiakopffrakturen. *Unfallchirurg* 2002; 105(2):128-133.
- (22) Brown WE, Chow LC. Dental restorative cement pastes. patent
US Patent no. 4518430. 1985.
- (23) Brown WE, Chow LC. Combinations of sparingly soluble calcium phosphates in slurries and paste as mineralizers and cements. patent
US Patent no 4.612.053. 1986.
- (24) Buckley KA, Fraser WD. Receptor activator for nuclear factor kappaB ligand and osteoprotegerin: regulators of bone physiology and immune responses/ potential therapeutic agents and biochemical markers. *Ann Clin Biochem* 2002; 39(6):551-556.
- (25) Burwell RG. A study of homologous cancellous bone combined with autologous red marrow after transplantation to a muscular site. *J Anat* 1961; 95:613.
- (26) Carano RA, Filvaroff EH. Angiogenesis and bone repair.
Drug Discov Today 2003; 1(8):980-989.
- (27) Chowdhury MH, Moak SA, Rifkin BR, Greenwald RA. Effect of tetracyclines which have metalloproteinase inhibitory capacity on basal and heparin-stimulated bone resorption by chick osteoclasts. *Agents Actions* 1993; 40(1-2):124-128.
- (28) Codivilla A. On the means of lengthening, in the lower limbs, the muscles and tissues which are shortened through deformity. *Am J Orthop Surg* 1905; 2:353.
- (29) Coetzee AS. Regeneration of bone in the presence of calcium sulfate.
Arch Otolaryngol 1980; 106(7):405-409.
- (30) Conrad EU, Gretch DR, Obermeyer KR, Moogk MS, Sayers M, Wilson JJ, Strong DM. Transmission of the hepatitis-C virus by tissue transplantation.
J Bone Joint Surg Am 1995; 77(2):214-224.

- (31) Daculsi G, Passuti N, Martin S, Deudon C, Legeros RZ, Raher S. Macroporous calcium phosphate ceramic for long bone surgery in humans and dogs. Clinical and histological study. *J Biomed Mater Res* 1990; 24(3):379-396.
- (32) Delaisse JM, Engsig MT, Everts V, del Carmen OM, Ferreras M, Lund L, Vu TH, Werb Z, Winding B, Lochter A, Karsdal MA, Troen T, Kirkegaard T, Lenhard T, Heegaard AM, Neff L, Baron R, Foged NT. Proteinases in bone resorption: obvious and less obvious roles. *Clin Chim Acta* 2000; 291(2):223-234.
- (33) Delloye C, Cnockaert N, Cornu O. Bone substitutes in 2003: an overview. *Acta Orthop Belg* 2003; 69(1):1-8.
- (34) Dingeldein E, Donath K, Wahlig H, Bauer HJ. Einheilung einer porösen Hydroxylapatitkeramik biologischer Herkunft im spongiösen Knochenlager von Kaninchen. *Osteo Trauma Care* 1994; 2:112-116.
- (35) Doi Y, Iwanaga H, Shibutani T, Moriwaki Y, Iwayama Y. Osteoclastic responses to various calcium phosphates in cell cultures. *J Biomed Mater Res* 1999; 47(3):424-433.
- (36) Donath B. Die Trenn-Dünnschliff-Technik zur Herstellung histologischer Präparate von nicht schneidbaren Geweben und Materialien. *Exakt-Kulzer-Druckschrift*, Norderstedt 1989;1-16.
- (37) Draenert K, Draenert Y. Ein neues Verfahren für die Knochenbiopsie und die Knorpel-Knochen-Transplantation. *Sandorama* 2 1987;31-38.
- (38) Draenert K, Wiese FG, Garde U, Draenert Y, Helber MU, Börner M. Synthetische Knochenersatzwerkstoffe auf HA- und TCP-Basis. *Trauma Berufskrankh* 2001; 3(4):293-300.
- (39) Driessens FC, Verbeeck R. Relation between physico-chemical solubility and biodegradability of calcium phosphates. In: de Putter C, de Lange GL, de Groot K, Lee AJC, editors. *Implant materials in biofunction. Advances in Biomaterials*. Amsterdam: Elsevier, 1988: 105-111.
- (40) Driessens FC. Chemistry and applied aspects of calcium phosphate bone cements. Concepts and clinical applications of ionic cements. *Ref Type: Data File*. Arcachon, France 1999.

- (41) Duong LT, Rodan GA. Integrin-mediated signaling in the regulation of osteoclast adhesion and activation. *Frontiers in Bioscience* 3 1998;757-768.
- (42) Duong LT, Rodan GA. The role of integrins in osteoclast function. *J Bone Miner Metab* 1999; 17(1):1-6.
- (43) Egli PS, Müller W, Schenk RK. 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 of bony ingrowth and implant substitution. *Clin Orthop* 1988; 232:127-138.
- (44) Einhorn TA, Trippel SB. Growth factor treatment of fractures. *Instr Course Lect* 1997; 46:483-486.
- (45) Einhorn TA. Clinical applications of recombinant human BMPs: early experience and future development. *J Bone Joint Surg Am* 2003; 85-A Suppl 3:82-88.
- (46) Eitel F, Seiler H, Schweiberer L. Vergleichende morphologische Untersuchungen zur Übertragbarkeit tierexperimenteller Ergebnisse auf den Regenerationsprozeß des menschlichen Röhrenknochens. *Unfallheilkd* 1981; 84:250-255.
- (47) El-Ghannam A. Advanced bioceramic composite for bone tissue engineering: design principles and structure-bioactivity relationship. *J Biomed Mater Res* 2004; 69A(3):490-501.
- (48) Eppley B. Development and clinical results of synthetic calcium phosphate materials in craniomaxillofacial surgery. Concepts and clinical applications of ionic cements. Ref Type: Report. Sept. 8. 1999. Arcachon, France.
- (49) Flautre B, Delecourt C, Blary MC, Van Landuyt P, Lemaitre J, Hardouin P. Volume effect on biological properties of a calcium phosphate hydraulic cement: experimental study in sheep. *Bone* 1999; 25(2 Suppl):35-39.
- (50) Frankenburg E, Goldstein S, Bauer T, Harris S, Poser R. Biomechanical and histological evaluation of a calcium phosphate cement. *J Bone Joint Surg Am* 1998; 80(8):1112-1124.

- (51) Frayssinet P, Mathon D, Lerch A, Autefage A, Collard P, Rouquet N. Osseointegration of composite calcium phosphate bioceramics. *J Biomed Mater Res* 2000; 50(2):125-130.
- (52) Friedman C, Costantino P, Takagi S, Chow L. Bone source hydroxyapatite cement a novel biomaterial for craniofacial skeletal tissue engineering and reconstruction. *J Biomed Mater Res* 1998; 43(428):432.
- (53) Frost HM. Bone dynamics in metabolic bone disease. *J Bone Joint Surg Am* 1966; 48(6):1192-1203.
- (54) Frost HM. The biology of fracture healing. An overview for clinicians. Part I. *Clin Orthop* 1989;(248):283-293.
- (55) Frost HM. The biology of fracture healing. An overview for clinicians. Part II. *Clin Orthop* 1989;(248):294-309.
- (56) Fujikawa Y, Quinn JM, Sabokbar A, McGee JO, Athanasou NA. The human osteoclast precursor circulates in the monocyte fraction. *Endocrinology* 1996; 137(9):4058-4060.
- (57) Gao TJ, Lindholm TS, Kommonen B, Ragni P, Paronzini A, Lindholm TC, Jamsa T, Jalovaara P. Enhanced healing of segmental tibial defects in sheep by a composite bone substitute composed of tricalcium phosphate cylinder, bone morphogenetic protein, and type IV collagen. *J Biomed Mater Res* 1996; 32(4):505-512.
- (58) Gauthier O, Bouler JM, Weiss P, Bosco J, Daculsi G, Aguado E. Kinetic study of bone ingrowth and ceramic resorption associated with the implantation of different injectable calcium-phosphate bone substitutes. *J Biomed Mater Res* 1999; 47(1):28-35.
- (59) Goad ME, Aiolova M, Tofighi A, Jacobs M, Lee D. Resorbable apatitic bone substitute material, Alpha-BSM, is associated with rapid bone growth in defects of rabbit tibias. *J Bone Miner Res* 1997; 12 Suppl.(1):518.
- (60) Goodman SB, Bauer T, Carter D, Casteleyn PP, Goldstein S, Kyle R, Larsson S, Stankewich CJ, Swiontkowski M, Tencer A, Yetkinkler D, Poser R. Norian SRS cement augmentation in hip fracture treatment. *Clin Orthop Rel Res* 1998; 348:42-50.

- (61) Gosain AK, Song L, Yu P, Mehrara BJ, Maeda CY, Gold LI, Longaker T. Osteogenesis in cranial defects: reassessment of the concept of critical size and the expression of TGF- β Isoforms. *Plast Reconstr Surg* 2000; 106:360-371.
- (62) Gosain AK, Song L, Riordan P, Amarante MT, Nagy PG, Wilson CR, Toth JM, Ricci JL. A 1-year study of osteoinduction in hydroxyapatite-derived biomaterials in an adult sheep model: part I. *Plast Reconstr Surg* 2002; 109(2):619-630.
- (63) Griffon DJ, Dunlop DG, Howie CR, Pratt JN, Gilchrist TJ, Smith N. An ovine model to evaluate the biologic properties of impacted morselized bone graft substitutes. *J Biomed Mater Res* 2001; 56(3):444-451.
- (64) Guigui P, Plais PY, Flautre B, Viguiet E, Blary MC, Sales De Gauzy J, Chopin D, Lavaste F, Hardouin P. Experimental model of posterolateral spinal arthrodesis in sheep. Part 1. Experimental procedures and results with autologous bone graft. *Spine* 1994; 19(24):2791-2797.
- (65) Guigui P, Plais PY, Flautre B, Viguiet E, Blary MC, Chopin D, Lavaste F, Hardouin P. Experimental model of posterolateral spinal arthrodesis in sheep. Part 2. Application of the model: evaluation of vertebral fusion obtained with coral (Porites) or with a biphasic ceramic (Triostite). *Spine* 1994; 19(24):2798-2803.
- (66) Gunzburg R, Szpalski M, Passuti N, Aebi M. Biomaterials: the new frontiers in spine surgery. *Eur Spine J* 2001; 10 Suppl 2:85.
- (67) Hankemeier S, Bastian L, Gosling T, Krettek C. Prinzipien der Kallusdistraction. *Unfallchirurg* 2004; 107(10):945-958.
- (68) Heiss C. Persönliche Mitteilung 2002.
- (69) Helber MU, Ulrich C. Metaphysärer Defektersatz mit Hydroxylapatitkeramik. 3- bis 4-Jahresnachuntersuchungs-Ergebnisse. *Unfallchirurg* 2000; 103(9):749-753.
- (70) Hench LL, Clark AE. Adhesion to bone. In: Williams DF, editor. *Biocompatibility of orthopedic materials*- 2CRC Press, Boca Raton. 1982: 129-170.

- (71) Heymann D, Guicheux J, Rousselle AV. Ultrastructural evidence in vitro of osteoclast-induced degradation of calcium phosphate ceramic by simultaneous resorption and phagocytosis mechanisms. *Histol Histopathol* 2001; 16(1):37-44.
- (72) Hing KA, Best SM, Tanner KE, Bonfield W. Biomechanical assessment of bone ingrowth on porous hydroxyapatite. *J Mat Sci Mat Med* 1997; 8:731-736.
- (73) Hofbauer LC, Heufelder AE. Clinical review 114: hot topic. The role of receptor activator of nuclear factor-kappaB ligand and osteoprotegerin in the pathogenesis and treatment of metabolic bone diseases. *J Clin Endocrinol Metab* 2000; 85(7):2355-2363.
- (74) Holmes RE, Mooney V, Bucholz RW, Tencer A. A corraline hydroxyapatite bone graft substitute. Preliminary report. *Clin Orthop* 1984; 188:252-262.
- (75) Honig JF, Merten HA, Heinemann DE. Risk of transmission of agents associated with Creutzfeldt-Jakob disease and bovine spongiform encephalopathy. *Plast Reconstr Surg* 1999; 103(4):1324-1325.
- (76) Hopf A. Knochenregenerationsfähigkeit beim Kaninchen. *Verh Dtsch Ges Orthop* 1957; 90:440-441.
- (77) Horas U, Schnettler R, Pelinkovic D, Herr G, Aigner T. Knorpelknochen transplantation versus autogene Chondrozytentransplantation. *Chirurg* 2000; 71:1090-1097.
- (78) Horas U, Pelinkovic D, Herr G, Aigner T, Schnettler R. Autologous chondrocyte implantation and osteochondral cylinder transplantation in cartilage repair of the knee joint. A prospective, comparative trial. *J Bone Joint Surg Am* 2003; 85-A(2):185-192.
- (79) Horiuchi K, Amizuka N, Takeshita S, Takamatsu H, Katasuura M, Ozawa H, Toyama Y, Bonewald LF, Kudo A. Identification and characterization of a novel protein, periostin, with restricted expression to periosteum and peridontal ligament and increased expression by transforming growth factor beta. *J Bone Miner Res* 1999; 14(7):1239-1249.

- (80) Högset O, Bredberg G. Plaster of Paris: thermal properties and biocompatibility. A study on an alternative implant material for ear surgery. *Acta Otolaryngol* 1986; 101(5-6):445-452.
- (81) Ilizarov GA. Clinical application of the tension-stress effect for limb lengthening. *Clin Orthop* 1990;(250):8-26.
- (82) Itonaga I, Hussein I, Kudo O, Sabokbar A, Watt-Smith S, Ferguson D, Athanasou NA. Cellular mechanisms of osteoclast formation and lacunar resorption in giant cell granuloma of the jaw. *J Oral Pathol Med* 2003; 32:224-231.
- (83) Jaakkola T, Rich J, Tirri T, Narhi T, Jokinen M, Seppala J, Yli-Urpo A. In vitro Ca-P precipitation on biodegradable thermoplastic composite of poly (epsilon-caprolactone-co-DL-lactide) and bioactive glass (S53P4). *Biomaterials* 2004; 25(4):575-581.
- (84) Jansen JA. Histological analysis of bone-implant interface. In: An YH, Martin KL, editors. *Handbook of Histology Methods for Bone and Cartilage*. Totowa, New Jersey: Humana Press, 2003: 353-360.
- (85) Jäger M, Wild A, Krauspe R. Pluripotente mesenchymale Stammzellen und Osteogenese (I): Grundlagen. *Osteologie* 2002; 11(2):55-66.
- (86) Kai T, Shao-qing G, Geng-ting D. In vivo evaluation of bone marrow stromal-derived osteoblasts-porous calcium phosphate ceramic composites as bone graft substitute for lumbar intervertebral spinal fusion. *Spine* 2003; 28(15):1653-1658.
- (87) Kaiser E, Delling G. Osteozyten- ein Organ im Aufwind morphologischer und zellbiologischer Forschung! *Osteologie* 2002; 11(4):219-236.
- (88) Kärcher H. Mikrochirurgischer Knochenersatz. *Mund Kiefer Gesichtschirurgie* 2000; 4:322-330.
- (89) Khairoun I, Boltong MG, Driessens FC, Planell JA. Effect of calcium carbonate on clinical compliance of apatitic calcium phosphate bone cement. *J Biomed Mater Res* 1997; 38(4):356-360.
- (90) Khairoun I, Driessens FC, Boltong MG, Planell JA, Wenz R. Addition of cohesion promoters to calcium phosphate cements. *Biomaterials* 1999; 20(4):393-398.

- (91) Khairoun I, Magne D, Gauthier O, Bouler JM, Aguado E, Daculsi G, Weiss P. In vitro characterization and in vivo properties of a carbonated apatite bone cement. *J Biomed Mater Res* 2002; 60:633-642.
- (92) Klawitter JJ, Hulbert SF. Application of porous ceramics for the attachment of load bearing international orthopedic application. *J Biomet Res* 1971; 2:161.
- (93) Knaack D, Goad ME, Aiolova M, Rey C, Tofighi A, Chakravarthy P, Lee DD. Resorbable calcium phosphate bone substitute. *J Biomed Mater Res* 1998; 43(4):399-409.
- (94) Knaepler H. Thermische Behandlung allogener Knochentransplantate -experimentelle Ergebnisse. In: Schnettler R, Markgraf E, editors. *Knochenersatzmaterialien und Wachstumsfaktoren*. Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 1997: 118-122.
- (95) Komiya K, Nasuno S, Uchiyama K, Takahira N, Kobayashi N, Minehara H, Watanabe S, Itoman M. Status of bone allografting in Japan - Nation-wide survey of bone grafting performed from 1995 through 1999. *Cell Tissue Bank* 2003; 4(2-4):217-220.
- (96) Kondo Y, Irie K, Ikegame M, Ejiri S, Hanada K, Ozawa H. Role of stromal cells in osteoclast differentiation in bone marrow. *J Bone Miner Metab* 2001; 19(6):352-358.
- (97) Kornak U, Delling D, Mundlos S. Molekulare Mechanismen der Regulation der Knochendichte durch Osteoklasten. *Deutsches Ärzteblatt* 2003;1058-1063.
- (98) Lazner F, Gowen M, Pavasovic D, Kola I. Osteopetrosis and osteoporosis: two sides of the same coin. *Hum Mol Genet* 1999; 8(10):1839-1846.
- (99) Le Huec JC, Lesprit E, Delavigne C, Clement D, Chauveaux D, Le Rebeller A. Tricalcium phosphate ceramics and allografts as bone substitutes for spinal fusion in idiopathic scoliosis as bone substitutes for spinal fusion in idiopathic scoliosis: comparative clinical results at four years. *Acta Orthop Belg* 1997; 63(3):202-211.
- (100) Le Huec JC, Clement D, Brouillaud B, Barthe N, Dupuy B, Foliguet B, Basse-Cathalinat B. Evolution of the local calcium content around irradiated beta-tricalcium phosphate ceramic implants: in vivo study in the rabbit. *Biomaterials* 1998; 19(7-9):733-738.

- (101) Lee DD, Tofighi A, Aiolova M, Chakravarthy P, Catalano A, Majahad A, Knaack D. alpha-BSM: a biomimetic bone substitute and drug delivery vehicle. Clin Orthop 1999; 367 Suppl:396-405.
- (102) Lenart G, Bidlo G, Pinter J. Some basic problems in the examination of the calcium hydrogen phosphates in bone. Clin Orthop Rel Res 1972; 83:263-272.
- (103) Lexer E. Über freie Transplantationen. Langenbeck`s Arch klin Chir 95 1911;827-851.
- (104) Liebendörfer A, Tröster S. Hydroxylapatitkeramik im klinischen Einsatz. Histologische Befunde von 23 Patienten. Unfallchirurg 1997; 23(2):60-68.
- (105) Mandelkow HK, Hallfeldt KK, Kessler SB, Gayk M, Siebeck M, Schweiberer L. Knochenneubildung nach Implantation verschiedener Hydroxylapatitkeramiken. Tierexperimentelle Studie am Bohrlochmodell der Schafstibia. Unfallchirurg 1990; 93(8):376-379.
- (106) Marotti G. The osteocyte as a wiring transmission system. J Musculoskel Neuron Interact 2000; 1(2):133-136.
- (107) Martin RB, Chapman MW, Holmes RE, Sartoris DJ, Shors EC, Gordon JE, Heitter DO, Sharkey NA, Zissimos AG. Effects of bone ingrowth on the strength and non-invasive assessment of a coralline hydroxylapatite material. Biomaterials 1989; 10(7):481-488.
- (108) McKee MD, Nanci A. Osteopontin: an interfacial extracellular matrix protein in mineralized tissues. Connect Tissue Res 1996; 35(1-4):197-205.
- (109) Mickiewicz RA, Mayes AM, Knaack D. Polymer-calcium phosphate cement composites for bone substitutes. J Biomed Mater Res 2002; 61(4):581-592.
- (110) Mittelmeier H, Mittelmeier W, Gleitz M. Mineralisches, spongiöses Knochenersatzmaterial Pyrost. Experimentelle Grundlagen und 13 Jahre klinische Erfahrung bei über 1000 Fällen. Orthopäde 1998; 27(2):126-135.
- (111) Monticelli G, Spinelli R, Bonucci E. Distraction epiphysiolysis as a method of limb lengthening. II. Morphologic investigations. Clin Orthop 1981;(154):262-273.

- (112) Monticelli G, Spinelli R. Distraction epiphysiolysis as a method of limb lengthening. III. Clinical applications. Clin Orthop 1981;(154):274-285.
- (113) Monticelli G, Spinelli R. Distraction epiphysiolysis as a method of limb lengthening. I. Experimental study. Clin Orthop 1981;(154):254-261.
- (114) Müller-Mai C, Voigt C, Hering A, Rahmzadeh R, Gross U. Madreporische Hydroxylapatitgranulate zur Füllung ossärer Defekte. Unfallchirurg 2001; 104:221-229.
- (115) Münzenberg KJ, Gebhardt M. Brushite, octocalcium phosphate and carbonate-containing apatite in bone. Clin Orthop Rel Res 1973; 90:271-273.
- (116) Nesbitt SA, Horton MA. Trafficking of matrix collagens through bone-resorbing osteoclasts. Science 1997; 276(5310):266-269.
- (117) Nolte D, Raab S, Thein E, Draenert K, Ehrenfeld M, Meßmer K. Neues experimentelles Modell zur repetitiven Messung der ossären Durchblutung. Mund Kiefer Gesichtschir 1999; 3(Suppl1):147-150.
- (118) Olerud D, Lorenzi G. Triple Fluorochrome labeling in bone formation and bone resorption. J Bone Joint Surg Am 1970; 52(2):274-278.
- (119) Osborn JF. Biowerkstoffe und ihre Anwendung bei Implantaten. Schw Mschr Zahnheilkd 89 1979;1138-1139.
- (120) Osborn JF. Implantatwerkstoff Hydroxylapatitkeramik, Grundlagen und klinische Anwendung. Berlin, Chicago, London, Rio de Janeiro, Tokio: Quintessenz Verlags-GmbH, 1985.
- (121) Patka P, Haarman HJ, Bakker FC. Bone transplantation and bone replacement materials. Ned Tijdschr Geneesk 1998; 142(16):893-896.
- (122) Patka P, Stahl J-P, Sarkar MR, Bakker FC, Schnettler R, Haarman HJ. Bone substitution and augmentation in trauma surgery using a degradable calcium phosphate bone cement. Osteo Trauma Care 2003; 11:13-16.

- (123) Petersen JP, Ruecker A, Stechnow Dv, Adamietz P, Poertner R, Rueger JM, Meenen NM. Present and future therapies of articular cartilage defects. Eur J Trauma 2003; 29:1-10.
- (124) Pool R. Coral chemistry leads to human bone repair. Science 1995; 267(5205):1772.
- (125) Porter AE, Patel N, Skepper JN, Best SM, Bonfield W. Comparison of in vivo dissolution processes in hydroxyapatite and silicon-substituted hydroxyapatite bioceramics. Biomaterials 2003; 24(25):4609-4620.
- (126) Putti V. The operative lengthening of the femur. JAMA 1921; 77:934-935.
- (127) Pytlik M, Folwarczna J, Janiec W. Effects of Doxycycline on mechanical properties of bones in rats with ovariectomy-induced osteopenia. Calcif Tissue Int 2004; 75:225-230.
- (128) Rahn BA. Die polychrome Sequenzmarkierung des Knochens. Nova Acta Leopoldina 1979; 44(249):255.
- (129) Rehman I, Smith R, Hench LL, Bonfield W. Structural evaluation of human and sheep bone and comparison with synthetic hydroxyapatite by FT-Raman spectroscopy. J Biomed Mater Res 1995; 29(10):1287-1294.
- (130) Revell PA, Hing KA, Tanner KE, Best SM, Bonfield W. Osseointegration of porous hydroxyapatite. In: Schnettler R, Markgraf E, editors. Knochenersatzmaterialien und Wachstumsfaktoren. Stuttgart, New York: Thieme Verlag, 1997: 28-30.
- (131) Roodman GD. Cell biology of the osteoclast. Exp Hematol 1999; 27(8):1229-1241.
- (132) Roodman GD. Biology of osteoclast activation in cancer. J Clin Oncol 2003; 19:3562-3571.
- (133) Rueger JM. Knochenersatzmittel Knochengelatine- elektronenmikroskopische und histologische Ergebnisse. In: Schnettler R, Markgraf E, editors. Knochenersatzmaterialien und Wachstumsfaktoren. Georg Thieme Verlag Stuttgart, 1997: 69-73.
- (134) Rueger JM. Knochenersatzmittel. Heutiger Stand und Ausblick. Orthopäde 1998; 27(2):72-79.

- (135) Rueger JM, Linhart W, Sommerfeldt D. Biologische Reaktionen auf Kalziumphosphatkeramik-Implantationen. Tierexperimentelle Ergebnisse. Orthopäde 1998; 27(2):89-95.
- (136) Russell G, Mueller G, Shipman C, Croucher P. Clinical disorders of bone resorption. Novartis Found Symp 2001; 232:251-267.
- (137) Rübsamen-Waigmann H. Virussicherheit von Blutspenden und Knochentransplantaten. In: Schnettler R, Markgraf E, editors. Knochenersatzmaterialien und Wachstumsfaktoren. Georg Thieme Verlag Stuttgart, 1997: 1-7.
- (138) Sailer HF, Weber FE. Knochenersatzmaterialien. Mund Kiefer Gesichtschir 2000; 4 Suppl 1:S384-S391.
- (139) Sailer R, Gabl M, Lutz M, Seykora P, Pechlaner S. Integration einer porösen Hydroxylapatitkeramik am distalen Radius älterer Patienten. Radiologische Untersuchung. Unfallchirurg 1999; 102(7):531-534.
- (140) Sakiyama H, Masuda R, Inoue N, Yamamoto K, Kuriwa K, Nakagawa K, Yoshida K. Establishment and characterization of macrophage-like cell lines expressing osteoclast-specific markers. J Bone Miner Metab 2001; 19(4):220-227.
- (141) Salo J, Lehenkari P, Mulari M, Metsikko K, Väänänen HK. Removal of osteoclast bone resorption products by transcytosis. Science 1997; 276(5310):270-273.
- (142) Sarkar MR, Wachter N, Patka P, Kinzl L. First histological observations on the incorporation of a novel calcium phosphate bone substitute material in human cancellous bone. J Biomed Mater Res 2001; 58(3):329-334.
- (143) Sarkar MR, Stahl JP, Wachter N, Schwamborn M, Schnettler R, Kinzl L. Defect reconstruction in articular calcaneus fractures with a novel calcium phosphate cement. Eur J Trauma 2002; 28:340-348.
- (144) Sartoris DJ, Holmes RE, Bucholz RW, Mooney V, Resnick D. Coralline hydroxyapatite bone-graft substitutes in a canine diaphyseal defect model. Radiographic-histometric correlation. Invest Radiol 1987; 22(7):590-596.

- (145) Schaller P, Geldmacher J, Freiberger N, Flügel M. Die Auffütterung kleiner Knochenhöhlen mit Knochenkeramik (Hydroxylapatit). Handchir Mikrochir Plast Chir 1993; 25:184-190.
- (146) Schenk RK, Hunziker EB. Histologic and ultrastructural features of fracture healing. Bone Formation and Repair. American Academy of Orthopaedic Surgeons Symposium, 1995: 117-146.
- (147) Schlegel KA, Kloss FR, Schultze-Mosgau S, Neukam FW, Wiltfang J. Tierexperimentelle Untersuchung zum Einfluss verschiedener Thrombozytenkonzentrate auf die Defektregeneration mit autogenem Knochen und Kombination von autogenem Knochen und Knochenersatzmaterialien (Biogran und Aligpore). Mund Kiefer Gesichtschir 2003; 7(2):112-118.
- (148) Schneider U. Die autogene Knochenzelltransplantation. Orthopäde 1998; 27(2):143-146.
- (149) Schnettler R. Experimentelle Untersuchungen zum Einwachsverhalten von autogenen und allogenen Spongiosatransplantaten im Vergleich zu Keramik, DBM und basischem Fibroblastenwachstumsfaktor (bFGF). Habilitationsschrift, Jena. 1993.
- (150) Schnettler R, Dingeldein E, Tausch W. Untersuchungen zur knöchernen Integration einer Hydroxylapatit-Keramik und bFGF im Vergleich zu autogenen Spongiosazylindern. Osteo Trauma Care 1994; 2:118-126.
- (151) Schnettler R, Dingeldein E. Untersuchungen zur knöchernen Integration einer Hydroxylapatitkeramik (HAK) (Endobon) und bFGF im Vergleich zu autogenen Spongiosazylindern. In: Schnettler R, Markgraf E, editors. Knochenersatzmaterialien und Wachstumsfaktoren. Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 1997: 31-42.
- (152) Schnettler R, Dingeldein E, Herr G. Defektaufbau mit demineralisierter Knochenmatrix. Experimentelle Untersuchungen beim Minischwein. Orthopäde 1998; 27(2):80-88.
- (153) Schnettler R. Persönliche Mitteilung 2000.

- (154) Schnettler R, Dingeldein E. Inorganic bone substitutes. In: Lewandrowski K-U, editor. Tissue Engineering and Biodegradable Equivalents. Scientific and Clinical Applications. New York, Basel: Dekker M. Inc., 2002: 401-432.
- (155) Schnettler R, Alt V, Dingeldein E, Pfefferle HJ, Kilian O, Meyer C, Heiss C, Wenisch S. Bone ingrowth in bFGF-coated hydroxyapatite ceramic implants. Biomaterials 2003; 24(25):4603-4608.
- (156) Schnettler R, Kilian O, Alt V, Wenisch S. Potentiation of osteogenesis and angiogenesis in vivo after implantation of hydroxyapatite combined with autogenous growth factors. Osteo Trauma Care 2004;(12):170-173.
- (157) Schnettler R, Stahl J-P, Alt V, Pavlidis T, Dingeldein E, Wenisch S. Calcium phosphate based bone substitutes. Eur J Trauma 2004; 30(4):219-229.
- (158) Schnürer SM, Gopp U, Kühn K-D, Breusch SJ. Knochenersatzwerkstoffe. Orthopäde 2003; 32(1):2-10.
- (159) Schratt HE, Regel G, Kiesewetter B, Tscherne H. HIV-Infektion durch kältekonservierte Knochentransplantate. Unfallchirurg 1996; 99(9):679-684.
- (160) Schratt HE, Regel G, Lobenhoffer P, Tscherne H. Die Organisation einer Knochen- und Gewebekbank. Konsequenzen für die Organisation von Knochen- und Gewebekbanken nach HIV- und Hepatitis-C-Infektionen. Unfallchirurg 1996; 99(11):880-888.
- (161) Schweiberer L, Hallfeldt K, Mandelkow H. Osteoinduktion. Orthopäde 1986; 15(1):3-9.
- (162) Simmons DJ, Kunin AS. Development and healing of rickets in rats. Clin Orthop 1970; 68:261-272.
- (163) Simonds RJ, Holmberg SD, Hurwitz RL, Coleman TR, Bottenfield S, Conley LJ, Kohlenberg SH, Castro KG, Dahan BA, Schable CA. Transmission of human immunodeficiency virus type 1 from a seronegative organ tissue donor. N Engl J Med 1992; 326(11):726-732.

- (164) Sogal A, Tofe AJ. Risk assessment of bovine spongiform encephalopathy transmission through bone graft material derived from bovine bone used for dental applications. *J Periodontol* 1999; 70(9):1053-1063.
- (165) Sommerfeldt DW, Rubin CT. Biology of bone and how it orchestrates the form and function of the skeleton. *Eur Spine J* 2001; 10 Suppl 2:86-95.
- (166) Spector MS. Charakterisierung biokeramischer Kalziumphosphatimplantate. *Hefte zur Unfallheilkunde* 1991; 261:12-22.
- (167) Stankewich C, Swiontkowski M, Tencer A, Yetkinler D, Poser R. Augmentation of femoral neck fracture fixation with an injectable calcium-phosphate bone mineral cement. *J Orthopaedic Res* 1996; 14:786-793.
- (168) Stull DE, Kneisl JS. Incidental neoplasm in iliac crest autograft procured for anterior cervical fusion. *Spine* 2002; 27(8):221-223.
- (169) Suzuki R, Domon T, Wakita M. Some osteocytes released from their lacunae are embedded again in the bone and not engulfed by osteoclasts during bone remodeling. *Anat Embryol* 2000; 202:119-128.
- (170) Tadic D, Beckmann F, Donath T, Epple M. Comparison of different methods for the preparation of porous bone substitution materials and structural investigations by synchrotron μ -computer tomography. *Mat -wiss u Werkstofftech* 2004; 35(4):240-244.
- (171) Takahashi N, Akatsu T, Udagawa N, Sasaki T, Yamaguchi A, Moseley JM, Martin TJ, Suda T. Osteoblastic cells are involved in osteoclast formation. *Endocrinology* 1988; 123(5):2600-2602.
- (172) Teitelbaum SL. Osteoclasts, integrins, and osteoporosis. *J Bone Miner Metab* 2000; 18(6):344-349.
- (173) Teitelbaum SL. Bone resorption by osteoclasts. *Science* 2000; 289(5484):1504-1508.
- (174) Thielemann FW, Etter C. Evaluation of experimental osteoinduction in different animal models. In: Aebi M, Regazzoni P, editors. *Bone transplantation*. Springer, Berlin Heidelberg New York, 1989.

- (175) Thielemann FW, Schmid U, Holz U, Herr G. Vergleich des Einbauverhaltens von allogener Knochenmatrix mit autogener Spongiosa am Defektmodell der Hundetibia. *Chirurgisches Forum* 1991;209-213.
- (176) Thordarson D, Hedman T, Yetinkler D, Eskander E, Lawrence T, Poser R. Superior compressive strength of a calcaneal fracture construct augmented with remodelable cancellous bone cement. *J Bone Joint Surg Am* 1999; 81(2):239-246.
- (177) Thyberg J, Nilsson S, Friberg U. Electron microscopic and enzyme cytochemical studies on the guinea pig metaphysis with special reference to the lysosomal system of different cell types. *Calc Tiss Res* 1975; 156:273-299.
- (178) Trippel SB. Potential role of insulinlike growth factors in fracture healing. *Clin Orthop* 1998;(355 Suppl):301-313.
- (179) Tröster S, Liebendörfer A. Die Biokeramik Endobon im klinischen Einsatz: Erfahrungen, Ergebnisse, Perspektiven. In: Schnettler R, Markgraf E, editors. *Knochenersatzmaterialien und Wachstumsfaktoren*. Stuttgart, New York: Thieme, 1997: 149-157.
- (180) Urist MR. Surface-decalcified allogeneic bone (SDAB) implants. A preliminary report of 10 cases and 25 comparable operations with undecalcified lyophilized bone implants. *Clin Orthop* 1968; 56:37-50.
- (181) Urist MR, Urist JM, Dubuc FL, Strates BS. Quantitation of new bone formation in intramuscular implants of bone matrix in rabbits. *Clin Orthop* 1970; 68:279-293.
- (182) Urist MR. A bone morphogenetic system in residues of bone matrix in the mouse. *Clin Orthop* 1973; 91:210-220.
- (183) Urist MR, Granstein R, Nogami H, Svenson L, Murphy R. Transmembrane bone morphogenesis across multiple-walled diffusion chambers. New evidence for a diffusible bone morphogenetic property. *Arch Surg* 1977; 112(5):612-619.
- (184) Urist MR, Mikulski AJ. A soluble bone morphogenetic protein extracted from bone matrix with a mixed aqueous and nonaqueous solvent. *Proc Soc Exp Biol Med* 1979; 162(1):48-53.

- (185) Urist MR, Mikulski AJ, Lietze A. Solubilized and insolubilized bone morphogenetic protein. *Proc Natl Acad Sci USA* 1979; 76(4):1828-1832.
- (186) Väänänen HK, Horton M. The osteoclast clear zone is a specialized cell-extracellular matrix adhesion structure. *J Cell Sci* 1995; 108 (8):2729-2732.
- (187) Väänänen HK, Zhao H, Mulari M, Halleen JM. The cell biology of osteoclast function. *J Cell Sci* 2000; 113 (3):377-381.
- (188) Wefer J, Wefer A, Schratt HE, Thermann H, Wippermann BW. Einheilung von autologen Spongiosatransplantaten und Hydroxylapatitkeramiken im Tibiasegmentdefekt. Wert der sonographischen Verlaufskontrolle. *Unfallchirurg* 2000; 103(6):452-461.
- (189) Welch J, Gutt W. High-temperature studies of the system calcium oxide-phosphorus pentoxide. *J Chem Soc* 1961;4442-4444.
- (190) Wenisch S. Zur Entwicklung und Zelldifferenzierung der Riechschleimhaut des Rindes. Habilitationsschrift, Gießen. 2001.
- (191) Wenisch S, Stahl J-P, Horas U, Kilian O, Heiss C, Schnettler R. Ultrastrukturelle Untersuchungen zum zellvermittelten Abbau einer Calciumphosphatkeramik. *Unfallchirurg* 2003; 106:387-391.
- (192) Wenisch S, Stahl J-P, Horas U, Heiss C, Kilian O, Trinkaus K, Hild A, Schnettler R. In vivo mechanisms of hydroxyapatite ceramic degradation by osteoclasts: Fine structural microscopy. *J Biomed Mater Res* 2003; 67A:713-718.
- (193) Wenz B, Oesch B, Horst M. Analysis of the risk of transmitting bovine spongiform encephalopathy through bone grafts derived from bovine bone. *Biomaterials* 2001; 22(12):1599-1606.
- (194) Werness PG, Bergert JH, Smith LH. Crystalluria. *J Crystal Growth* 1981; 53:166-181.
- (195) Wiedemann M. Callus distraction: a new method? A historical review of limb lengthening. *Clin Orthop* 1996; 327:291-304.

- (196) Wippermann BW, Schratt HE, Steeg S, Tscherne H. Komplikationen der Spongiosaentnahme am Beckenkamm. Eine retrospektive Analyse von 1191 Fällen. *Chirurg* 1997; 68(12):1286-1291.
- (197) Wippermann BW, Donow C, Schratt HE, den Boer FC, Blokhuis T, Patka P. The influence of hydroxyapatite granules on the healing of a segmental defect filled with autologous bone marrow. *Ann Chir Gynaecol* 1999; 88(3):194-197.
- (198) Wissing H, Stürmer KM, Breidenstein G. Die Wertigkeit verschiedener Versuchstierspecies für experimentelle Untersuchungen am Knochen. *Hefte zur Unfallheilkunde*, Heft 212 1990;479-488.
- (199) Yuasa T, Miyamoto Y, Ishikawa K, Takechi M, Nagayama M, Suzuki K. In vitro resorption of three apatite cements with osteoclasts. *J Biomed Mater Res* 2001; 54(3):344-350.
- (200) Zaidi M, Blair HC, Moonga BS, Abe E, Huang CL. Osteoclastogenesis, bone resorption, and osteoclast-based therapeutics. *J Bone Miner Res* 2003; 18(4):599-609.

10 DANKSAGUNG

Ich möchte Herrn Univ.-Prof. Dr. Dr. Reinhard Schnettler für die Überlassung des Dissertationsthemas, die Bereitschaft zur kritischen Diskussion und die Nutzung des Labors für experimentelle Unfallchirurgie herzlich danken.

Herrn Oberarzt Dr. Jens-Peter Stahl, danke ich für die Hilfe bei den Tieroperationen, fachlichen Rat und freundschaftliche Zusammenarbeit.

Frau Privatdozentin Dr. Sabine Wenisch danke ich herzlich für ihre große Unterstützung bei histologischen Fragestellungen.

Frau Maren Cassens und Frau Anne Hild danke ich besonders für die Hilfe bei der Erstellung der histologischen und elektronenmikroskopischen Präparate.

11 LEBENS LAUF

Name: Nikolaj Wieghorst
Geburtsdatum: 17.01.1971
Geburtsort: Berlin-Schmargendorf

Ausbildung

Schulbildung:

1977 - 1981 Grundschule Fischbeck (Niedersachsen)
1981 - 1983 Orientierungsstufe Hessisch Oldendorf
1983 - 1990 Schiller-Gymnasium Hameln
Abschluss: Allgemeine Hochschulreife

Zivildienst:

1991 - 1992 Paritätische Gesellschaft Behindertenhilfe Hameln

Hochschulstudium:

1992 – 1999 Humanmedizin an der Justus-Liebig-Universität Gießen
Abschluss im Mai 1999

Tätigkeiten

Arzt im Praktikum:

05.1999 – 11.2000 Klinik und Poliklinik für Unfallchirurgie, Universitätsklinikum Gießen
Approbation am 20.11.2000

Assistenzarzt:

11.2000 – 11.2003 Klinik und Poliklinik für Unfallchirurgie, Universitätsklinikum Gießen
11.2003 – 10.2005 Chirurgische Abteilung, Asklepios Klinik Lich
seit 10.2005 Klinik und Poliklinik für Unfallchirurgie, Universitätsklinikum Gießen und Marburg GmbH, Standort Gießen

Zusatzqualifikation

16.01.2001 Fachkundenachweis Rettungsdienst

12 ERKLÄRUNG

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

édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

VVB LAUFERSWEILER VERLAG
GLEIBERGER WEG 4
D-35435 WETTENBERG

Tel: +49-(0)6406-4413 Fax: -72757
redaktion@doktorverlag.de
www.doktorverlag.de

ISBN 3-8359-5023-1



9 783835 950238 ©