

**Hyaluronsäure als Trägersubstanz für bioaktive Proteine zur  
Optimierung der Knochendefektheilung**

Von der Medizinischen Fakultät  
der Rheinisch-Westfälischen Technischen Hochschule Aachen  
zur Erlangung des akademischen Grades  
eines Doktors der Medizin  
genehmigte Dissertation

vorgelegt von

**Marcus Rehbein**

aus

Hagen

Berichter: Herr Universitätsprofessor  
Dr. med. Fritz Uwe Niethard

Frau Professorin  
Dr. med. Benita Hermanns-Sachweh

Tag der mündlichen Prüfung: 14. Januar 2008

Diese Dissertation ist auf den Internetseiten der Hochschulbibliothek online  
verfügbar.

## Inhaltsverzeichnis

|           |                                                                        |          |
|-----------|------------------------------------------------------------------------|----------|
| <b>1.</b> | <b>Einleitung</b>                                                      | <b>5</b> |
| <b>2.</b> | <b>Grundlagen</b>                                                      | <b>7</b> |
| 2.1.      | Struktur und Stoffwechsel des Knochens                                 | 7        |
| 2.1.1.    | Aufbau der Knochenmatrix                                               | 7        |
| 2.1.1.1   | Knochenzellen                                                          | 11       |
| 2.1.1.2   | Regulation des Knochenstoffwechsels                                    | 13       |
| 2.1.1.3   | Humorale Kontrolle der Knochenbildung                                  | 14       |
| 2.1.1.4   | Wachstumsfaktoren des Knochens                                         | 15       |
| 2.1.1.5   | Mineralisation                                                         | 22       |
| 2.1.2.    | Ossifikationsformen                                                    | 23       |
| 2.1.2.1   | Desmale Ossifikation                                                   | 23       |
| 2.1.2.2   | Chondrale Ossifikation                                                 | 24       |
| 2.1.3.    | Pathophysiologie der Fraktur und Frakturheilung                        | 25       |
| 2.2.      | Knochenersatzstoffe                                                    | 26       |
| 2.2.1.    | Indikationen für Knochenersatzstoffe                                   | 26       |
| 2.2.2.    | Klinische Anforderungen an Knochenersatzstoffe                         | 29       |
| 2.2.3.    | Synthetische Knochenersatzstoffe                                       | 30       |
| 2.2.4.    | Pathophysiologie der Transplantateinheilung                            | 34       |
| 2.2.5.    | Fremdspongiosa                                                         | 35       |
| 2.3.      | Hyaluronsäure                                                          | 35       |
| 2.3.1.    | Chemische Zusammensetzung der Hyaluronsäure (Ha)                       | 37       |
| 2.3.1.1   | Biosynthese                                                            | 39       |
| 2.3.1.2   | Biologische Bedeutung                                                  | 40       |
| 2.3.1.3   | Umsatzrate und Stoffwechsel                                            | 41       |
| 2.3.2.    | Hyaluronsäure als bioaktives Implantatmaterial                         | 42       |
| 2.3.3.    | Klinische Anwendung von Hyaluronsäure                                  | 45       |
| 2.3.4.    | Osteostimulation bei Knochendefekten durch Hyaluronsäure               | 48       |
| 2.4.      | Idee des Composites                                                    | 49       |
| 2.4.1.    | Zusammensetzung des Composites                                         | 49       |
| 2.4.2.    | Hyaluronsäure als Trägersubstanz für bioaktive Substanzen              | 50       |
| 2.4.3.    | Die osteoinduktiven und osteostimulierenden Proteine „BMP2“ und „bFGF“ | 52       |

|           |                                                              |           |
|-----------|--------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>3.</b> | <b>Material und Methodik</b>                                 | <b>54</b> |
| 3.1.      | Material                                                     | 54        |
| 3.1.1.    | Hyaluronsäure, BMP2 und bFGF                                 | 54        |
| 3.1.2.    | Versuchstiere und deren Auswahlkriterien                     | 55        |
| 3.1.3.    | Geräte                                                       | 56        |
| 3.1.4.    | Farbstoffe, Chemikalien und Medikamente                      | 58        |
| 3.2.      | Methoden                                                     | 60        |
| 3.2.1.    | Operation                                                    | 60        |
| 3.2.2.    | Postoperative Versorgung                                     | 64        |
| 3.2.3.    | Polychrome Fluoreszenzmarkierung                             | 65        |
| 3.2.4.    | Tötung und Exartikulierung der Hinterläufe                   | 66        |
| 3.2.5.    | Computertomographie der Knochenblöcke                        | 66        |
| 3.2.6.    | Fixation und Aufbereitung der Knochenproben                  | 66        |
| 3.2.7.    | Histologie und Histomorphometrie                             | 68        |
| 3.2.8.    | Fluoreszenz-Fotografien                                      | 69        |
| 3.2.9.    | Mikroradiografien                                            | 70        |
| <b>4.</b> | <b>Ergebnisse</b>                                            | <b>72</b> |
| 4.1.      | Operationsverlauf und in vivo Befunde                        | 72        |
| 4.2.      | Untersuchung des Knochendefektes                             | 73        |
| 4.2.1.    | Histomorphometrische Auswertung                              | 73        |
| 4.2.2.    | Auswertung der Fluoreszenz-Fotografien                       | 75        |
| 4.2.3.    | Auswertung der Mikroradiografien und Toluidin-Blau Färbungen | 76        |
| 4.2.4.    | Röntgenuntersuchungen                                        | 77        |
| <b>5.</b> | <b>Diskussion</b>                                            | <b>78</b> |
| <b>6.</b> | <b>Zusammenfassung</b>                                       | <b>86</b> |
| <b>7.</b> | <b>Literaturverzeichnis</b>                                  | <b>87</b> |
| <b>8.</b> | <b>Anhang</b>                                                | <b>I</b>  |

## Verzeichnis der Abbildungen

|                                                                                                                                                       |      |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------|
| Abbildung 1: Schematische Zeichnung eines Ausschnitts der Substantia compacta der Diaphyse eines Röhrenknochens (Junqueira und Carneiro (1991)) _____ | 10   |
| Abbildung 2: Regelkreis des Knochenumbaus (Debrunner (1993)) _____                                                                                    | 13   |
| Abbildung 3: Anforderungen an Knochenersatzstoffe (Niedhart, Niethard (1999)) _____                                                                   | 29   |
| Abbildung 4: Polymere Hyaluronsäure-Komplexe und ihr Baustein das Disaccharid _____                                                                   | 37   |
| Abbildung 5: Defektbohrung mit Diamant-Hohlfräse _____                                                                                                | 62   |
| Abbildung 6: Defektentnahme mittels Extraktor _____                                                                                                   | 63   |
| Abbildung 7: Leerdefekt (Toluidin-Blau, 6,3fache Vergrößerung, 12 Wochen) _____                                                                       | I    |
| Abbildung 8: Spongiosaplastiken (Toluidin-Blau, 6,3fache Vergrößerung, 12 Wochen) _____                                                               | II   |
| Abbildung 9: Fluoreszenzphotografie Gruppe 3 (Hyaluronsäure, 16fache Vergrößerung) _____                                                              | III  |
| Abbildung 10: Fluoreszenzphotografie Gruppe 4 (Hyaluronsäure+BMP2, 16fache Vergrößerung) _____                                                        | III  |
| Abbildung 11: Fluoreszenzphotografie Gruppe 5 (Hyaluronsäure+bFGF, 16fache Vergrößerung) _____                                                        | IV   |
| Abbildung 12: Mikroradiografie Gruppe 3 (Hyaluronsäure, 6,3fache Vergrößerung) _____                                                                  | V    |
| Abbildung 13: Toluidin-Blau Färbung Gruppe 3 (Hyaluronsäure, 6,3fache Vergrößerung) _____                                                             | V    |
| Abbildung 14: Mikroradiografie Gruppe 4 (Hyaluronsäure+BMP2, 6,3fache Vergrößerung) _____                                                             | VI   |
| Abbildung 15: Toluidin-Blau Färbung Gruppe 4 (Hyaluronsäure+BMP2, 6,3fache Vergrößerung) _____                                                        | VI   |
| Abbildung 16: Mikroradiografie Gruppe 5 (Hyaluronsäure+bFGF, 6,3fache Vergrößerung) _____                                                             | VII  |
| Abbildung 17: Toluidin-Blau Färbung Gruppe 5 (Hyaluronsäure+bFGF, 6,3fache Vergrößerung) _____                                                        | VII  |
| Abbildung 18: Defektzylinder distale Femurepiphyse postoperativ (li. Gruppe 3, re. Gruppe 5) _____                                                    | VIII |
| Abbildung 19: Defektzylinder distale Femurepiphyse 12 Wochen postoperativ (li. Gruppe 3, re. Gruppe 5) _____                                          | VIII |
| Abbildung 20: Lagekontrolle Defektzylinder (Gruppe 4) _____                                                                                           | IX   |

## Verzeichnis der Tabellen

|                                                                              |    |
|------------------------------------------------------------------------------|----|
| Tabelle 1: Wachstumsfaktoren und Knochenbruchheilung (Solheim (1998)) _____  | 17 |
| Tabelle 2: Wirkmechanismen von HA- und TCP-Keramiken als Knochenersatz _____ | 32 |
| Tabelle 3: Zusammensetzung und Molekulargewicht der Glykosaminglykane _____  | 39 |
| Tabelle 4: Versuchsgeräte und Zubehör _____                                  | 57 |
| Tabelle 5: Farbstoffe zur Fluoreszenzmarkierung der Versuchstiere _____      | 58 |
| Tabelle 6: Chemikalien zur Einbettung der Knochenblöcke _____                | 59 |
| Tabelle 7: Verwendete Medikamente _____                                      | 60 |
| Tabelle 8: Einteilung der Versuchsgruppen _____                              | 64 |
| Tabelle 9: Auswertung der Spongiosaplastiken _____                           | 74 |
| Tabelle 10: Auswertung der Leerdefekte _____                                 | 75 |

## 1. Einleitung

Die chirurgische Versorgung von Knochendefekten erfordert eine biomechanisch belastbare Verbindung der Defektteile, eine Auffüllung bzw. Augmentation aus prophylaktischer oder ästhetischer Indikation oder einen endoprothetischen Ersatz des Defektbereiches. Als Implantate bzw. zur Knochenstabilisierung stehen bisher diverse osteosynthetische Nagel- und Plattensysteme und Endoprothesen mit verschiedenen Oberflächen zur Verfügung. Insbesondere zur Knochendefektfüllung kommen biokompatible Hydroxylapatitmaterialien und autologe Spongiosaplastiken zum Einsatz. Bisher liegt nur bei der Verwendung autologer Spongiosaplastik („Goldstandard“ der Knochendefektheilung) ein bioaktiver Knochenersatz vor, der durch eingebrachte Osteoblasten und in der Knochenmatrix gespeicherte Wachstumsfaktoren die Knochenheilung aktiv stimuliert.

Im Rahmen unseres Projektes wird eine Optimierung der Knochendefektheilung durch Kombination einer neuartigen Trägersubstanz (in diesem Fall Hyaluronsäure) mit lokal wirksamen osteoanabolen Proteinen angestrebt.

Knochenanaloge, perkutan injizierbare Hyaluronsäure wird mit lokal wirksamen Knochenwachstumsfaktoren (BMP2 bzw. bFGF) kombiniert, um initial die ossäre Integration in das Implantatlager und längerfristig die Substitution des Hyaluronsäure-Composites durch Knochengewebe zu ermöglichen.

Entscheidend bei der Behandlung von Frakturen ist es, die ursprünglichen Verhältnisse nach Möglichkeit wiederherzustellen. Ein wichtiges Kriterium hierfür ist die Zeit, in welcher der Defekt mit neuem Knochenmaterial aufgefüllt wird. Eine langandauernde Immobilisation der betroffenen Fraktur erfordert in der Regel eine im Anschluss daran längere Remobilisation bzw. Rehabilitation. Durch perkutane Injektionen osteostimulativer Substanzen scheint eine schonende und minimal invasive Behandlung von Knochendefekten möglich.

Ziel dieser tierexperimentellen Studie ist es, Grundlagen zu schaffen, die auf eine Verbesserung der Behandlung von Knochendefekten abzielen. Auch bei gestörter Stoffwechsellage (z.B. osteoporotische Frakturen, fibröse Dysplasie) sollte sich dieses Verfahren gegenüber den herkömmlichen Techniken zur Defektbehandlung behaupten.

Im Einzelnen wird in unserer Studie tierexperimentell untersucht, ob die Kombination einer Trägersubstanz (Hyaluronsäure) mit rekombinanten, osteoinduktiven (BMP2), bzw. osteostimulativen Peptiden (bFGF)

1. ein Fortbestehen der Bioaktivität der eingesetzten Wachstumsfaktoren gewährleistet,
2. einen signifikanten Beitrag zu einer Beschleunigung der lokalen Knochenneubildung und dadurch der Defektheilung leistet.

## **2. Grundlagen**

### **2.1. Struktur und Stoffwechsel des Knochens**

#### **2.1.1. Aufbau der Knochenmatrix**

Das Stütz- oder Skelettsystem bildet durch seine feste Knochensubstanz ein Rahmenwerk, an dem die Weichteile des Organismus ihre funktionsgerechte Anordnung finden. Das Stützsystem bietet die Grundlage für vielfältige mechanische Funktionen und gibt weiten Körperpartien Schutz gegen mechanische Einwirkungen von außen. Es beherbergt das hämatopoetische System und steht dem Organismus als Mineraldepot, insbesondere für Kalzium und Phosphat, zur Verfügung. Von allen Geweben und Organen des Organismus unterscheidet sich der Knochen durch den Gehalt an anorganischen Salzen, die der Knochenstruktur die nötige Festigkeit geben. Die Knochensubstanz in ihrer jeweiligen morphologischen Struktur steht in einem dynamischen Stoffwechselgleichgewicht von Synthese und Resorption. Diese für die Aufrechterhaltung der Funktionsfähigkeit der Knochen notwendigen aktiven Stoffwechselvorgänge spielen sich in den Knochenzellen ab, bzw. werden durch die Knochenzellen im Kompartiment der extrazellulären Matrix vermittelt. Der Stoffwechsel und die morphologische Struktur unterliegen neben lokalen, auf den Stoffwechsel einwirkenden Faktoren, einer komplex aufgebauten, vorwiegend humoralen Steuerung, durch die gleichzeitig die Verknüpfung mit dem Gesamtstoffwechsel des Organismus gegeben ist (Gressner und Greiling (1995)).

Die Interzellulärsubstanz des Knochens wird auch als Knochengrundsubstanz bezeichnet. Sie besteht:

- etwa zu 50% aus Mineralien,
- etwa zu 25% aus organischen Verbindungen
- und etwa zu 25% aus Hydratationswasser.

#### **Mineralien**

Als anorganische Bestandteile herrschen anorganisches Phosphat (ca. 50%) und Kalzium (ca. 35 %) vor. Die übrigen Bestandteile setzen sich aus Citrat, Carbonat, Nitrat, Magnesium, Fluor und Spurenelementen zusammen. Insgesamt bestehen 1-2 % des Körpergewichtes aus Kalzium, wovon ungefähr 99 % des Kalziums im Knochen deponiert sind.

Die Mineralien im Knochen liegen in Form von sogenannten Apatitkristallen vor. Als Apatit bezeichnet man hexagonale Kalziumphosphatverbindungen deren hauptsächlichster Bestandteil das Hydroxylapatit ( $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6\text{OH}_2$ ) darstellt.

### **Organische Verbindungen**

Hauptbestandteil des organischen Materials ist das Kollagen mit 90 - 95 %. Der Rest setzt sich aus verschiedenen Proteinen zusammen, Osteonektin (ein 32 kDa-Phosphoprotein), Osteocalcin (ein sehr saures Protein, Molekulargewicht 5200-5900), sowie aus kleineren Proteoglykanen bzw. Glykosaminoglykanen. Einige dieser Substanzen verbinden die Mineralien des Knochens mit Kollagen (Osteonektin) bzw. mit den Zellen (Osteopontin).

### **Wasser**

Durch die Hydratisierung der oberflächlichen Ionen des Hydroxylapatits entsteht ein Hydratmantel. Dieser schafft die Voraussetzung für einen Ionenaustausch zwischen den Kristallen und der Umgebung, welcher bei der Einlagerung und Mobilisierung von Kalzium im Knochen eine wichtige Rolle spielt.

### **Histologischer Bau**

Zwei Arten von Knochengewebe lassen sich histologisch unterscheiden:

- Geflechtknochen
- Lamellenknochen

### **Geflechtknochen**

Das Stadium des Geflechtknochens muss bei jeder Neubildung von Knochen durchlaufen werden. Die Kollagenfasern des Geflechtknochens haben im Gegensatz zum Lamellenknochen keine besondere Verlaufsrichtung.

Der Anteil an Mineralien ist im Geflechtknochen geringer als im Lamellenknochen, wohingegen der Bestand an Osteozyten erhöht ist. Geflechtknochen weist eine hohe Zug- und Biegezugfestigkeit auf.

Normalerweise wird im Laufe der Entwicklung Geflechtknochen durch Lamellenknochen ersetzt.

## **Lamellenknochen**

Der für den Erwachsenen typische Lamellenknochen ist gekennzeichnet durch Lamellen und Knochenkanälchen.

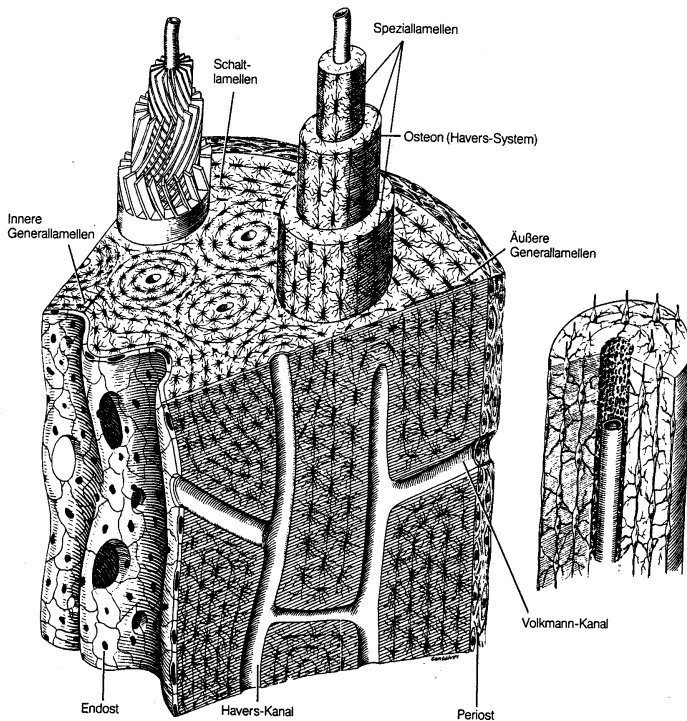
Die Dicke der Lamellen (Knochenschichten) beträgt durchschnittlich 3-7  $\mu\text{m}$ . Die Lamellen setzen sich aus Kollagenfasern und Osteozyten zusammen.

Die Kollagenfasern haben in jeder Lamelle einen typischen, in der Regel schraubenförmigen Verlauf. Entscheidend und funktionell bedeutend ist, dass Verlaufsrichtung und Steigungswinkel der Kollagenfasern von Lamelle zu Lamelle wechseln.

Die Osteozyten befinden sich in den Lamellen oder an deren Grenzen. Sie liegen in sogenannten Knochenhöhlen (Lacuna Ossea), von denen radiär Knochenkanälchen für die Osteophytenfortsätze ausstrahlen. Benachbarte Knochenkanälchen stehen untereinander in Verbindung und münden in die sogenannten Zentralkanäle. Die Knochenhöhlen werden nie komplett von den Osteozyten ausgefüllt. Der Freiraum dient dem Substanztransport zur Ernährung der Knochenzellen.

Die Anordnung der Lamellen gliedert sich in äußere und innere Generallamellen, Speziallamellen und Schaltlamellen (siehe Abbildung 1).

Abbildung 1: Schematische Zeichnung eines Ausschnitts der Substantia compacta der Diaphyse eines Röhrenknochens (Junqueira und Carneiro (1991))



Die Speziallamellen (v.a. in den Diaphysen der Röhrenknochen vorkommend), gehören zu einem Lamellensystem, welches als Osteon oder Havers-System bezeichnet wird.

Bei den Knochenkanälchen unterscheidet man die Canales centrales (Havers-Kanäle) und die Canales perforantes (Volkmann-Kanäle). Die Zentralkanäle dienen in erster Linie den ernährenden Blutgefäßen sowie den Nerven als Leitstruktur. Die Canales perforantes treten senkrecht von der inneren und äußeren Oberfläche in den Knochen ein, queren die General- und Speziallamellen und stehen dann mit den Zentralkanälen in direkter Verbindung. In die Canales perforantes treten Gefäße aus dem Periost bzw. Endost ein (Junqueira und Carneiro (1991)).

### **2.1.1.1 Knochenzellen**

Knochenzellen liegen in vier verschiedenen Formen vor, nämlich als:

- Vorläuferzellen (bone lining cells)
- Osteoblasten
- Osteozyten und
- Osteoklasten.

Vorläuferzellen, Osteoblasten und Osteozyten gehen auseinander hervor. Osteoklasten sind vielkernige Riesenzellen, die dem Knochenabbau dienen. Osteoklasten entstehen durch die Verschmelzung von mononukleären Monozyten. Sie lassen sich dementsprechend dem mononukleären Phagozytosesystem zuordnen (Junqueira und Carneiro (1991)).

#### **Vorläuferzellen (bone lining cells)**

Diese Zellgruppe ist mesenchymaler Herkunft und während des ganzen Lebens vorhanden. Die Vorläuferzellen sind in der äußeren und inneren Knochenoberfläche sowie in den Havers Kanälen lokalisiert. Histologisch sind Vorläuferzellen relativ undifferenziert. Sie sind spindelförmig, haben nur wenig ribosomales endoplasmatisches Retikulum (RER) und einen spärlich entwickelten Golgi-Apparat. Sie besitzen aber die Fähigkeit, sich in Osteoblasten mit einem deutlich ausgeprägten Syntheseapparat umzuwandeln. Bone lining cells weisen während des Knochenwachstums und bei der Frakturheilung eine hohe Aktivität auf.

#### **Osteoblasten**

Hauptaufgabe der Osteoblasten ist die Synthese von Knochengrundsubstanz in Form von Kollagen, Proteoglykanen und Glykoproteinen sowie die Produktion der Knochenhartsubstanz. Die Aktivität der Osteoblasten wird durch verschiedene Hormone reguliert. Osteoblasten stehen durch feine zytoplasmatische Fortsätze miteinander in Verbindung. Im Lichtmikroskop sind sie als basophile Zellen zu erkennen. Sie produzieren Typ-1-Kollagen und sezernieren alkalische Phosphatase, deren Menge Rückschlüsse auf die Zellaktivität erlaubt. Die Abgabe der Syntheseprodukte erfolgt an den Stellen, an denen die Zellen mit der Knochengrundsubstanz in Verbindung stehen. Diese neue noch nicht verkalkte Grundsubstanz wird als Osteoid oder Vorknochen bezeichnet.

## **Osteozyten**

Osteozyten sind aus Osteoblasten hervorgegangen. Sie dienen der Erhaltung des Knochens. Bei ihrem Untergang wird die benachbarte Knochenmatrix abgebaut.

Als Osteozyt wird eine Knochenzelle dann bezeichnet, wenn sie ringsum von Knochen-substanz umgeben ist. Reife Osteozyten liegen in verkalkter Grundsubstanz und sind in Schichten angeordnet. Charakteristisch sind feine filopodienartige Fortsätze, die sich in Knochenkanälchen befinden, welche radiär von den Knochenhöhlen ausgehen, in denen die Knochenzellen liegen. Die Fortsätze, die dem Stofftransport dienen, stehen untereinander durch Gap junctions in Verbindung. Durch diese Bauweise wird die Oberfläche der Osteozyten stark vergrößert.

Osteozyten haben im Vergleich zu Osteoblasten eine verminderte Syntheseaktivität.

Osteoblastische Osteozyten dienen in erster Linie der Erhaltung der vorhandenen Grundsubstanz. Osteozyten (und Osteoblasten) enthalten in ihrem Zytoplasma protein- und glykoproteingebundenes Kalziumphosphat. Knochenzellen haben offenbar die Fähigkeit, Kalziumphosphat in ihrem Zytoplasma zu konzentrieren. Die Substanzen Kalzium und Phosphat sind zum Aufbau der interzellulären Hartschubstanz unerlässlich (Junqueira und Carneiro (1991)).

## **Osteoklasten**

Osteoklasten sind große, stark verzweigte und bewegliche Zellen. Diese Riesenzellen haben eine große azidophile Zellhülle, die über 50 Zellkerne enthalten kann. Osteoklasten sind in der Lage Knochengrundsubstanz abzubauen. An Stellen, wo Knochenabbau stattfindet, liegen die Osteoklasten in Einbuchtungen der Grundsubstanz, den sogenannten „Howship-Lakunen“. Bestimmte Enzyme (v.a. saure Hydrolasen) werden in den Osteoblasten hergestellt, im perinukleären Golgi-Apparat in primäre Lysosomen verpackt und dann mittels Exozytose in den extrazellulären Raum abgegeben. Ein Osteoklast kann pro Zeiteinheit die gleiche Knochenmenge abbauen, die von 100-150 Osteoblasten aufgebaut wurde. Die Aktivität der Osteoklasten wird hormonell gesteuert. Eine Hemmung erfolgt durch Kalzitinin und Östrogene, eine Förderung durch Parathormon.

### 2.1.1.2 Regulation des Knochenstoffwechsels

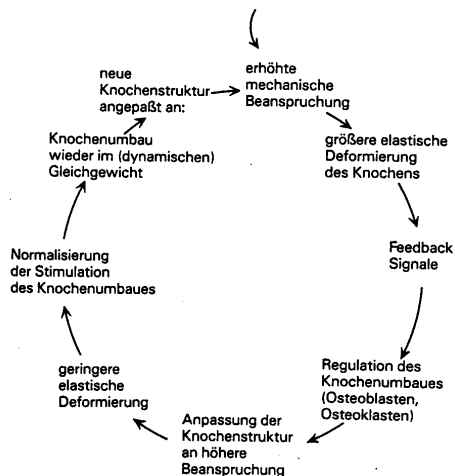
Halten sich Knochenabbau und –anbau an einer Stelle die Waage, so wird alter Knochen ohne Formveränderung durch neuen ersetzt. Das Resultat des Umbaus hängt von der Steuerung der Osteoblasten- und Osteoklastentätigkeit ab.

Ziel dieser Umbauvorgänge ist es, die Knochenstruktur der mechanischen Beanspruchung anzupassen. Anbau von Stützsubstanz erfolgt dort, wo es mechanisch notwendig ist und Abbau dort, wo die Beanspruchung gering ist. Ein solcher Mechanismus ist bestens geeignet, das Prinzip der größten mechanischen Festigkeit mit dem kleinstmöglichen Materialaufwand zu verwirklichen.

Auf mikroskopischer Ebene muß ein sensorisches System vorhanden sein, welches die mechanische Beanspruchung wahrnimmt und mittels Rückkopplungsmechanismus die Zelltätigkeit beeinflussen kann, so daß der Knochenumbau, das „bone remodeling“, direkt durch die mechanische Beanspruchung gesteuert wird.

Dieses System vermag wahrscheinlich die Spannungen, d.h. die elastischen Deformationen des Knochens zu registrieren. Hierbei spielen elektrische Phänomene eine Rolle, die im Einzelnen nicht genau bekannt sind (Abbildung 2).

Abbildung 2: Regelkreis des Knochenumbaus (Debrunner et al. (1993))



### **2.1.1.3 Humorale Kontrolle der Knochenbildung**

Biosynthese und Resorption der Knochenmatrix werden durch systemische, lokale und biomechanische Reize reguliert. Die Neubildung und Differenzierung von Osteoblasten sowie die Synthese und Sekretion der Matrixsubstanzen erfolgen unter dem Einfluss von zahlreichen Hormonen.

In erster Linie beteiligen sich drei Hormone (Parathormon, Kalzitinin und Vitamin D) am Knochenstoffwechsel.

#### **Parathormonwirkungen**

Der physiologische Reiz für die Ausschüttung von Parathormon ist eine erniedrigte Kalziumkonzentration im Blut. Parathormon wirkt am Knochen und aktiviert hier Osteoklasten zu vermehrtem Knochenabbau. Es kommt zu einer Freisetzung von Kalzium- und Phosphationen ins Blut. Die Bindung des Kalziums an Phosphationen wird dadurch verhindert, daß das Parathormon gleichzeitig die Ausscheidung von Phosphat über die Niere fördert. Ein weiterer direkt in der Niere ausgeübter Effekt des Parathormons besteht in der Verminderung der Ausscheidung von Kalziumionen. Wenn die Kalziumionenkonzentration im Blut hoch ist wird die Parathormonsekretion inhibiert.

#### **Kalzitininwirkungen**

Kalzitinin wird von den C-Zellen der Schilddrüse vermehrt ausgeschüttet, wenn der Kalziumspiegel im Blut erhöht ist. Es bewirkt einen verminderten Knochenabbau, sowie einen vermehrten Einbau von Kalzium in den Knochen und hat damit eine gegenüber dem Parathormon antagonistische Wirkung.

#### **Wirkung des Vitamin D**

Vitamin D ist die Vorstufe (Provitamin) für eine Reihe von Hormonen, die den Kalziumhaushalt wesentlich mitbestimmen. Der menschliche Organismus kann dieses Provitamin selbst aus Cholesterin herstellen. Voraussetzung dafür ist aber eine ausreichende Bestrahlung der Haut mit UV-Licht. Ist diese nicht gegeben, muss Vitamin D über die Nahrung bzw. ergänzende Präparate aufgenommen werden.

Im Blut wird Vitamin D an ein Eiweiß gebunden und transportiert. In der Leber wird es in 25-Hydroxy-Vitamin D umgewandelt. Sinkt der Kalziumspiegel im Blut, sorgt das Pa-

rathormon dafür, dass 25-Hydroxy-Vitamin D in der Niere zu dem wesentlich aktiveren Vitamin D3 umgewandelt wird. Vitamin D3 bewirkt, dass Kalzium aus den Knochen freigesetzt und im Darm vermehrt aufgenommen wird. Dadurch wird die Kalziumkonzentration im Blut weitgehend konstant gehalten. Weiterhin vermindert Vitamin D3 die Ausschüttung von Parathormon (Schmidt und Thews (1995)).

#### **2.1.1.4 Wachstumsfaktoren des Knochens**

Neben den bereits beschriebenen zentral wirkenden Substanzen (PTH, Kalzitinin, Vitamin D) gibt es zusätzlich eine Gruppe lokal wirkender Knochenwachstumsfaktoren.

Der Einfluss der Wachstumsfaktoren ist in Osteoblasten-Kulturen und einer Vielzahl klinischer und experimenteller Studien untersucht worden. Lokale Applikationen der verschiedensten Wachstumsfaktoren in Osteoblastenkulturen sowie bei Tierversuchsprojekten im Rahmen der Frakturheilung oder bei Knochendefekten konnten die Proliferation, die Differenzierung und die Proteinbiosynthese positiv beeinflussen. Eine Gruppe von Wachstumsfaktoren, die BMPs, bewirken eine Ausdifferenzierung von Mesenchymzellen an atypischen Stellen, d.h. an Orten, wo kein Knochen vorhanden ist, zu Osteoblasten.

Wachstumsfaktoren sind Polypeptide, die von bestimmten Gewebetypen synthetisiert werden und dort als lokale Wachstumsregulatoren die Zellfunktion beeinflussen (siehe Tabelle 1). Die meisten Faktoren sind hochmolekulare Vorstufen, die erst durch Proteolyse in ihre aktiven Bausteine zerlegt werden.

Die lokalen Wachstumsfaktoren lassen sich in zwei Gruppen unterteilen. Zum einen sind dies osteoinduktive und zum anderen osteostimulative Wachstumsfaktoren. Die einzigen bis heute bekannten osteoinduktiven Wachstumsfaktoren sind die „Bone Morphogenetic Proteins“ (BMPs) (Wang et al. (1990)). Bei den BMPs handelt es sich um eine Gruppe von mehreren verschiedenen Wachstumsfaktoren, welche zusammen mit dem TGF $\beta$ 1 und dem TGF $\beta$ 2 zu der Gruppe der „Transforming Growth Factors“ gehören. Die TGFs nehmen eine Schlüsselrolle in der Regulation des Knochenwachstums ein (Kuebler und Urist (1993), Sandberg et al. (1993)).

Als Wachstumsfaktoren mit osteostimulativer Potenz sind der basic Fibroblast Growth Factor(bFGF), der acid Fibroblast Growth Factor (aFGF), der Insuline Growth Factor

(IGF), der Platelet-derived Growth Factor (PDGF) und der Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) zu nennen. Die mitogene Potenz dieser Wachstumsfaktoren ist in verschiedenen Studien nachgewiesen worden (Aspenberg et al. (1989), Canalis et al. (1988), Harada et al. (1994)).

Tabelle 1: Wachstumsfaktoren und Knochenbruchheilung (Solheim et al. (1998))

| Heilungsstadium                     | Wachstumsfaktor | Ursprung, Lokalisation und Verhalten                                                                                                                                                                              |
|-------------------------------------|-----------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| direkte Reaktion auf die Verletzung | BMP2/4          | Gefunden in Mesenchymzellen in Fraktur angrenzenden Hämatom- und Periostbezirken. BMP-4 mRNA findet man in „osteoprogenitor Zellen“ des proliferierenden Periosts, dem Knochenmark und frakturhaften Muskelzellen |
|                                     | TGF- $\beta$    | Ausgeschüttet von Blutplättchen und Entzündungszellen ins Frakturhämatom. Fördert Proliferation der Mesenchymzellen im angrenzenden Periost                                                                       |
|                                     | PDGF            | Ausgeschüttet von Blutplättchen und Entzündungszellen ins Frakturhämatom. Gefunden in periostnahen Makrophagen 2 Tage nach der Fraktur. Fördern die Proliferation der periostnahen Mesenchymzellen.               |
|                                     | aFGF,bFGF       | Gefunden in angrenzenden Periostzellen verbunden mit rapidem Anstieg der Mesenchymzellen.                                                                                                                         |
| intramembranöse „bone formation“    | BMP2/4          | Gefunden in Osteoblasten des neuen Geflechtknochens 6 Tage nach der Fraktur.                                                                                                                                      |
|                                     | TGF- $\beta$    | Gefunden in proliferierenden Mesenchymzellen, in „bone lining cells“, und in der Knochenmatrix.                                                                                                                   |
|                                     | PDGF            | Ausgeschüttet von Blutplättchen. Förderung der intramembranösen Knochenneubildung.                                                                                                                                |
| Chondrogenese                       | BMP2/4          | Knorpel-Vorläuferzellen färben sich stark an kurz bevor sie in unreife Knorpelzellen übergehen.                                                                                                                   |
|                                     | TGF- $\beta$    | Gefunden in Mesenchymzellen, in unausgewachsenen Knorpelzellen und in reifen Knorpelzellen.                                                                                                                       |
|                                     | IGF1            | Gefunden in unausgewachsenen Chondroblasten am Rande von Knorpelanhäufungen bei der Kollagenbildung.                                                                                                              |
|                                     | aFGF            | Gebildet von Knorpelzellen, ihren Vorläuferzellen und von Makrophagen. Fördert Chondrozyten Proliferation und hat wahrscheinlich Einflüsse auf die Chondrozytenreifung.                                           |
| Enchondrale Ossifikation            | BMP2/4          | Intensive Anfärbung der Osteoblasten, welche die kalzifizierte knorpelige Matrix auskleiden.                                                                                                                      |
|                                     | TGF- $\beta$    | Gefunden in der die hypertrophen Chondrozyten umgebenden Matrix                                                                                                                                                   |
|                                     | TGF- $\beta$    | Gefunden in Chondrozyten am Rand der Verknöcherungszone.                                                                                                                                                          |
|                                     | bFGF            | Gebildet von Chondrozyten und wichtig bei der enchondralen Ossifikation.                                                                                                                                          |

## **BMP**

1979 konnten Urist und Mitarbeiter zum ersten Mal einen Extrakt osteoinduktiver Glykoproteine aus Knochengewebe isolieren. Sie nannten diese Substanzen „bone morphogenetic proteins“. BMPs sind in der Lage, die Bildung von ektoem Knorpel- und Knochengewebe zu induzieren, wenn man sie subkutan oder intramuskulär appliziert. Da man BMPs in vielen unterschiedlichen Gewebetypen nachgewiesen hat, so z.B. im Gehirn (BMP6), in der Placenta (BMP7), in den Nieren (BMP3,4 und 7), in der Lunge (BMP3,4,5 und 6), im Dünndarm (BMP3 und 7) im Herz (BMP2,4,6 und 7), in den Extremitätenknospen (BMP2,4,5 und 7) sowie in den Zähnen (BMP3,4 und 7), liegt die Vermutung nahe, daß BMPs noch andere Aufgaben bei Wachstum und Differenzierung besitzen, als nur die der Knocheninduktion.

Insgesamt konnten 16 unterschiedliche BMPs isoliert werden (Wozney et al. (2002)). Bis auf BMP1 sind alle BMPs Teile der TGF- $\beta$  Superfamilie. BMP2 und BMP4 sind untereinander zu 86% identisch und zu 33-35% identisch mit TGF- $\beta$ . BMP5, BMP6, BMP7 und BMP8 bilden eine andere Untergruppe, sie sind untereinander zu 73-83% identisch und mit TGF- $\beta$  zu 33-37%. BMP3 und BMP3b bilden eine eigene Untergruppe, ebenso BMP9 und BMP10, BMP12,13 und 14 und schließlich BMP11.

BMPs sind 30-38 kDa Homodimere und, obwohl dies die Standardform zu sein scheint, gibt es natürlicherweise auch Heterodimere mit identischer, wenn nicht sogar gesteigerter Bioaktivität. BMPs haben eine Länge zwischen 100 und 140 Aminosäuren. Sie sind sowohl innerhalb einer Spezies, als auch bei verschiedenen Spezies untereinander sehr ähnlich, so sind z.B. humanes, murines und ratines BMP2 zu 100% identisch.

BMPs haben vielfältige Aufgabe während der Embryogenese und im adulten Organismus. Die BMPs spielen eine bedeutende Rolle bei der extraskelatalen und skelatalen Organogenese, sowie bei der Entstehung und Regeneration von Knochengewebe. Vor allem BMP2 und 4 werden bei der enchondralen Ossifikation während der postnatalen Knochenformation und der Frakturheilung gefunden (Riley et al. (1996)). BMP-Rezeptoren konnten identifiziert werden (Paralkar et al. (1991)), und es konnte die Expression dieses Rezeptors bei der Entstehung von Knochenmaterial in der Embryonalentwicklung und bei dem Vorgang der Frakturheilung demonstriert werden (Ishidou et al. (1995)).

Bindungsstellen für die Gruppe der BMPs konnten nicht nur auf Osteoblasten, sondern auf einer Vielzahl anderer Zellen, unter anderem auch auf Tumorzellen ausfindig gemacht werden (Iwasaki et al. (1995)). In Tabelle 1 ist der Einfluss von BMPs (Bostrom et al. (1995), Nakase et al. (1994)) sowie anderer Wachstumsfaktoren auf die Frakturheilung beschrieben. Als Hauptverursacher dieser Knochenneubildung wurden bisher neun verschiedene BMPs identifiziert. BMPs können für den klinischen Gebrauch entweder rekombinant hergestellt werden oder durch Extraktion aus Knochen gewonnen werden. Hierbei wird meist ein Gemisch verschiedener Proteine gewonnen, die Zusammensetzung ist nicht eindeutig definiert. Demineralisierte Knochenmatrix ist ein Beispiel für eine solche Mischung verschiedener osteoinduktiver Proteine. Aus Knochen gewonnenes BMP muss nachfolgend sterilisiert werden, was die Wirksamkeit des BMP herabsetzt (Ijiri et al. (1994)). Die osteoinduktive Potenz verschiedener BMPs, vor allem BMP2 und BMP7 wurde in zahlreichen Tierversuchen nachgewiesen, hierbei waren deutlich höhere Mengen BMP notwendig als physiologisch im Knochen vorkommend. Auch im humanen System wurde die Wirksamkeit der BMPs mittlerweile nachgewiesen (Johnson et al. (1990)). Von einigen Wachstumsfaktoren, z.B. basischer Fibroblasten-Faktor (bFGF), Insulin-like Growth Factor (IGF) oder Platelet-derived Growth Factor (PDGF) ist bekannt, dass sie die osteoinduktive Wirkung von BMP verstärken bzw. allein osteostimulierend wirken (Kawaguchi et al. (1994)). Voraussetzung für eine Wirksamkeit osteoinduktiver/-stimulierender Substanzen ist die Anwesenheit von Zielzellen (Vorläuferzellen für BMP, Osteoblasten und -zyten für stimulierende Faktoren). Durch Zugabe von Blut, Knochenmark oder zerkleinerter Spongiosa zum Transplantat wird die Ausbreitung vitalen Knochengewebes beschleunigt.

### **TGF- $\beta$**

Zurzeit sind fünf verschiedene TGFs- $\beta$  bekannt, die TGFs- $\beta$  1-5 genannt werden, wobei TGF- $\beta$ 4 und TGF- $\beta$ 5 bisher nur bei Nichtsäugetieren nachgewiesen wurden. Die TGFs- $\beta$ 1-3 besitzen jeweils 112 Aminosäuren.

Die verschiedenen TGFs- $\beta$  sind, sowohl innerhalb einer Spezies als auch beim Vergleich verschiedener Spezies, untereinander sehr ähnlich. Humaner TGF- $\beta$ 2 ist zu 71% identisch mit humanem TGF- $\beta$ 1, humaner TGF- $\beta$ 1 ist zu 99% identisch mit murinem, während hu-

maner TGF- $\beta$ 2 zu 97% mit murinem TGF- $\beta$ 2 identisch ist. TGF- $\beta$ 3 ist zu 76% identisch mit TGF- $\beta$ 1 und zu 80% mit TGF- $\beta$ 2.

Die TGF- $\beta$ -Rezeptoren 1-3 findet man auf vielen unterschiedlichen Zelltypen, so auch auf Zellen des Skelettsystems. Der Typ 1 TGF- $\beta$  Rezeptor scheint nur TGF- $\beta$  binden zu können, wenn er neben einem Typ 2 TGF- $\beta$  Rezeptor liegt, TGF- $\beta$  bindet dann zunächst an den Typ 2 TGF- $\beta$  Rezeptor und veranlasst damit den Typ 1 TGF- $\beta$  Rezeptor mit ihm in Verbindung zu treten. Der Typ 3 TGF- $\beta$  Rezeptor bindet TGF- $\beta$ 1 und TGF- $\beta$ 2 mit der gleichen Affinität, möglicherweise bindet TGF- $\beta$  erst an den Typ 3 TGF- $\beta$  Rezeptor, der dann den TGF- $\beta$  dem Typ 2 TGF- $\beta$  Rezeptor präsentiert. Eine lösliche Form des Typ 3 TGF- $\beta$  Rezeptors wurde im Serum gefunden und fungiert damit vielleicht als TGF- $\beta$  Bindungsprotein. TGF- $\beta$ 1 und TGF- $\beta$ 2 sind in der Lage das Heterodimer TGF- $\beta$ 1.2 zu bilden (Rosen et al. (1995)).

TGF- $\beta$  wird von Osteoblasten produziert und in der Knochenmatrix gespeichert. Der Knochen ist somit der größte Speicherplatz von TGF- $\beta$  im menschlichen Körper (Bonewald et al. (1990)). Osteoblasten besitzen außerdem die größte Anzahl an TGF- $\beta$  Rezeptoren.

TGF- $\beta$  spielt eine Rolle bei der Embryonalentwicklung, bei der normalen Zellphysiologie, bei Entzündungsprozessen und bei der Wundheilung. TGF- $\beta$  wurde im Periost in einem sehr frühen Stadium der Frakturheilung bei tierexperimentellen Knochenbruchstudien (Boland et al. (1992)), sowie bei Knochenfrakturen des Menschen gefunden (Andrew et al. (1993)). TGF- $\beta$  fördert die Proliferation von mesenchymalen Zellen und von Osteoblasten bei Knochenfrakturen genauso, wie bei experimentellen Knochendefekten (Beck et al. (1993)). Die Expression von TGF- $\beta$ 1 und 2 während der Frakturheilung ist in den letzten Jahren eingehend untersucht worden (Steinbrech et al. (2000)).

Subperiostale Injektionen von TGF- $\beta$  am Femur von neugeborenen Ratten lösten eine enchondrale Ossifikation an der Injektionsstelle aus. Joyce et al. schlossen daraus, daß mesenchymale Stammzellen von TGF- $\beta$  zu Proliferation und Differenzierung veranlasst werden (Joyce et al. (1990)). Mit TGF- $\beta$  beschichtete Implantate beschleunigen sowohl im belasteten als auch im unbelasteten Frakturmodell die Knochenformation beim Hund (Lind et al. (1998)).

## FGF

Es handelt sich bei den Substanzen um eine Gruppe von mittlerweile neun verschiedenen Fibroblasten-Wachstumsfaktoren, welche in ihren Aminosäuresequenzen zu über 50% übereinstimmen (Baird und Klagsbrunn (1991), Gospodarowicz et al. (1987)). Die FGFs können in zwei Gruppen unterteilt werden. Zum einen acid FGF (aFGF) und basic FGF (bFGF), also saurer und basischer Fibroblasten-Wachstumsfaktor, als nicht-transformierende Wachstumsfaktoren und zum anderen FGF3-FGF9, welche in normalem Gewebe nicht vorkommen und proto-onkogene Eigenschaften besitzen (Baird und Böhlen (1991), Folkmann und Shing (1992)). Baird und Böhlen (1991) zeigten, dass die Fibroblasten-Wachstumsfaktoren in vielen Körpergeweben, wie z.B. Gehirn, Nebennieren, Ovarien, Hoden, Schilddrüse u.a., nachgewiesen werden können.

Die FGFs stimulieren das Zellwachstum und haben mitogene Effekte auf Zellen (Burgess und Maciag (1989)). Zusätzlich sind die FGFs in der Lage, die Zellmigration, die Angiogenese bzw. das Gefäßwachstum (Folkmann und Klagsbrunn (1987)), die Wundheilung (Davidson et al. (1985)), die Differenzierung (Eckenstein et al. (1994)) und die Morphogenese von Zellen (Dono und Zeller (1994)) zu stimulieren.

Die beiden einzigen im Knochen bzw. in der Knochenmatrix nachgewiesenen FGFs sind saurer FGF (aFGF) und basischer FGF (bFGF) (Hauschka et al. (1986)), wobei jedoch die Konzentration des bFGF im Knochen 10-fach höher als die des aFGF ist (Seyedin et al. (1985)). Globus et al. fanden 1988 und 1989 heraus, dass bFGF von Osteoblasten produziert und in der extrazellulären Matrix des Knochens gespeichert wird.

Das bFGF setzt sich aus 146 Aminosäuren (Molekulargewicht 16,5 kDa) zusammen. Es wird nach der Ruptur der Zellmembran, dem Zelltod oder nach übermäßiger Erhitzung freigesetzt bzw. vermehrt produziert. Es wirkt proliferativ auf Osteoblasten, Fibroblasten und differenzierte Chondrozyten und stimuliert die Kollagen-Synthese (Cuevas et al. (1988)).

Eine weitere Wirkung des bFGF ist die Stimulation von Osteoklasten bzw. von Osteoklastenvorläuferzellen (Hurley et al. (1998)). Hurley et al. (1992) fanden heraus, dass die Anzahl von osteoklastenartigen Zellen durch die 96-stündige Behandlung mit bFGF von 21 Tage alten Ratten zunimmt. Der direkte Vorläufer der Osteoklasten, welche

im Prinzip ihren Ursprung in Vorläuferzellen der Hämatopoese haben, ist die CFU-GM (colony forming unit-for granulocytes and macrophages). Diese CFU-GM wird in Zellkulturen von humanem Knochenmark durch bFGF stimuliert (Gabilove et al. (1994)). Eine weitere Möglichkeit, wie bFGF die Osteoklasten stimuliert, geht auf den Ursprung der Knochenzellen zurück. Vorläuferzellen von Osteoblasten, Chondroblasten, Fibroblasten und anderen Zellen sind die multipotenten mesenchymalen Zellen, sog. Stromazellen. Für die Differenzierung von Osteoklasten müssen deren Vorläuferzellen Kontakt zu Osteoblasten oder Stromazellen haben. Auf diese Zelle wirkt bFGF wiederum mitogen. Fasst man alle Eigenschaften des bFGF zusammen, so ist festzuhalten, dass das bFGF unter physiologischen Bedingungen eine wichtige Rolle im Prozeß des sog. „bone remodelings“, also dem physiologischen Auf- und Abbau von Knochen einzunehmen scheint (Globus et al. (1988)). Die in vivo Untersuchungen (Tierversuche) bestätigten die in vitro bereits herausgefundenen Wirkungen des bFGF.

Weiss et al. (1995) zeigten, dass das bFGF die Osteogenese und Angiogenese in vaskularisierten Knochentransplantaten steigert. Es erhöht außerdem den Kalziumgehalt von Implantaten aus demineralisierter Knochenmatrix, also die Mineralisierung von nicht mineralisierter Knochenmatrix (Aspenberg et al. (1989)). Eine bedeutende Rolle spielt das FGF auch bei der Frakturheilung, wie in Versuchen an Ratten gezeigt werden konnte, in denen das aFGF die Heilung der Frakturen wesentlich beschleunigen konnte (Jingushi et al. (1990)). Durch Versuche an normalen und diabetischen Ratten konnte gezeigt werden, dass das bFGF sowohl die Kallusbildung, als auch die Freisetzung weiterer Wachstumsfaktoren z.B. TGF- $\beta$  fördert (Kawaguchi et al. (1994)).

#### **2.1.1.5 Mineralisation**

Die für die Knochenfunktion notwendige Festigkeit wird dem Stützgewebe durch die Einlagerung von Kalziumphosphat in Form des Hydroxylapatit ( $\text{Ca}_5[\text{PO}_4]_3\text{OH}$ ) verliehen. Mehr als 99 % des Kalziums des menschlichen Organismus findet man in den Knochen. Zusätzlich sind folgende Substanzen in die Knochenmatrix eingelagert: Natrium, Magnesium, Kalium, Carbonat, Citrat und Lactat.

Glykoproteine, wie Osteonectin und „bone sialoprotein“, die sich in der Osteoidmatrix befinden, binden über die Hydroxylapatit-Bindungsregion den anorganischen Teil der Kno-

chenmatrix an das Osteoid (Termine et al. (1981)). Diese stark  $\gamma$ -glutaminsäurereichen Regionen ermöglichen lokal hohe Kalziumkonzentrationen und werden somit als Kristallisationszentren bezeichnet.

Der Vorgang des Knochenabbaus wird durch die Osteoklasten gesteuert. Nach Kontakt mit der mineralisierten Knochenmatrix lösen sie lokal oder nach Phagozytose Hydroxylapatitkristalle mit Hilfe der in ihnen in hoher Dosis vorhandenen sauren Phosphatase heraus und degradieren die Osteoidmatrix durch lysosomale Enzyme. Eine entscheidende Bedeutung in der Knochenresorption hat das Osteopontin. Dieses Protein, das von Osteoklasten synthetisiert wird, vermittelt die Bindung der Osteoklasten an die mineralisierte Knochenmatrix. Hauptsächlich wird der Ablauf des Mineralstoffwechsels durch spezifische Glykoproteine gesteuert. Anabole Prozesse erfordern erhöhte Konzentrationen von Osteonectin, „bone sialoprotein“ und alkalischer Phosphatase, katabole Zustände eine gesteigerte Produktion von Osteopontin und Osteocalcin, das mit Hilfe seiner Kalziumionen bindenden drei benachbarten  $\gamma$ -Glutaminsäuregruppen die Kristallisation von Hydroxylapatit hemmen kann (Urist et al. (1983)). Die Regelung des interossären Mineralstoffwechsels erfolgt durch Stimulation und Inhibition ihrer Synthese.

### **2.1.2. Ossifikationsformen**

Die Knochenentwicklung gliedert sich in:

- desmale Ossifikation (direkte Knochenbildung) und
- chondrale Ossifikation (indirekte Knochenbildung)

#### **2.1.2.1 Desmale Ossifikation**

Bei der desmalen Ossifikation, auch als direkte Knochenbildung bezeichnet, geht der Knochen direkt aus dem Mesenchym hervor. Es entsteht ein Bindegewebsknochen. Die desmale Ossifikation ist z.B. bei der perichondralen Knochenmanschettenbildung aller Röhrenknochen zu finden.

Eine Vermehrung von Mesenchymzellen in umschriebenen Gebieten des embryonalen Bindegewebes leitet die desmale Ossifikation ein. Als nächstes beginnen diese Zellen, die jetzt als Osteoblasten bezeichnet werden, mit der Kollagenbildung und Osteoidsynthese. Durch Abscheiden dieser Substanzen in ihrer Umgebung mauern sich diese Zellen ein.

Die Kollagenfasern sind in ihrer Anordnung eher zufällig und ungeordnet. Zeitgleich zu diesem Vorgang kommt es zur Mineralisation der Matrix, indem Kalziumphosphatniederschläge entstehen. Die Zellen in der sich bildenden Knochensubstanz stehen alle miteinander in Verbindung. Diese Art von Knochen bezeichnet man als Geflechtknochen. Ausgang der desmalen Ossifikation sind „primäre Ossifikationszentren“, welche nach und nach miteinander verschmelzen (Junqueira und Carneiro (1991)).

### **2.1.2.2 Chondrale Ossifikation**

Es gibt zwei verschiedene Mechanismen, die knorpelig vorgebildete Knochenanlage zu ersetzen. Die perichondrale Ossifikation findet man in der Schaftmitte von langen Röhrenknochen. Die enchondrale Ossifikation trifft man bei den kurzen knorpeligen Knochenanlagen im Bereich der Epiphysen und an den Enden der langen Röhrenknochen an.

Bei der perichondralen Ossifikation verläuft der Knochenaufbau um den knorpeligen Schaft nach demselben Prinzip wie bei der desmalen Knochenbildung. Auf den Knorpel wird eine dünne Schicht von Faserknochen aufgelagert. Das Wachstum in die Breite erfolgt durch die Anlagerung von weiteren Knochenfaserbälkchen, bis sich ein locker strukturierter Schaft gebildet hat. Später werden die unter der Knochmanschette gelegenen Knorpelzellen durch Knochenmark ersetzt.

Bei der enchondralen Ossifikation kommt es zur Mineralisation der Grundsubstanz im Inneren, gefolgt von einem Einsprossen der Gefäße in diese Zonen. Die Knorpelzellen teilen sich und ordnen sich in Richtung der Längsachse der Epiphyse zu Zellsäulen, dem sogenannten Säulenknorpel an. Im weiteren Verlauf werden die Zellen großblasig (Blasenknorpel), danach eröffnet und aufgelöst. Nun kommt es zur Einsprossung von Kapillaren in die vorhandenen Knorpelsepten. Als nächstes modellieren Chondroklasten aus den verkalkten Knorpelsepten das Gerüst für die Bildung der Primären Spongiosa.

Während der Wachstumsphase wird immer mehr Knorpel durch Knochen ersetzt. Zwischen den verknöcherten Epiphysen und dem verknöcherten Schaft bleibt bis zum Ende des Wachstums die Epiphysenfuge zurück. Bei der Auflagerung von lamellärem Knochen auf mineralisierte Knorpelsepten entsteht Spongiosa. Am Rande der Epiphysenfuge gelegene Anteile sind später im zukünftigen Kortikalisbereich anzutreffen. Im Bereich der spä-

teren Markscheide verschwinden die verkalkten Knorpelsepten komplett (Benninghoff et al. (1994)).

### **2.1.3. Pathophysiologie der Fraktur und Frakturheilung**

Der wichtigste, aber auch komplexeste Reparationsvorgang am Bewegungsapparat ist die knöcherne Wiedervereinigung zweier voneinander getrennter Knochenteile.

Die natürliche Knochenbruchheilung erfolgt durch primären Aufbau eines Frakturkallus. Seine Bildung basiert auf ähnlichen Mechanismen wie die embryonale Knochenbildung und die chondrale Ossifikation beim epiphysären Längenwachstum.

Die histologische Entwicklung des Frakturkallus beinhaltet folgende Teilschritte (Debrunner (1993)):

1. Organisation des Frakturhämatoms durch einwachsendes Granulationsgewebe. Osteogenetische Gewebe aus der Umgebung der Fraktur sind an der Kallusbildung beteiligt (Periost, Endost, Zellen aus dem Knochen, Gefäße).
2. Im Frakturspalt entsteht vorerst ein Knorpelkallus (Faserknorpel und Bindegewebe).
3. Zur gleichen Zeit entsteht periostal und endostal in Anlehnung an die Fragmentenden, jedoch in einiger Distanz vom Frakturspalt, ein Knochenkallus (Faserknochen).
4. Die knöcherne Überbrückung der Fraktur ist unter mechanisch instabilen Bedingungen nur über den Umweg des Knorpelkallus möglich. Dieser wird schrittweise mineralisiert und durch einsprossende Gefäße und begleitende Chondroblasten aufgebrochen. Nachfolgende Osteoblasten lagern an die Kalkknorpelreste das erste Faserknochengerüst an. Der Vorgang entspricht also ziemlich genau der chondralen Ossifikation an den Epiphysenfugen. Als Voraussetzung für die Ossifikation muß eine Eigenstabilität des Knorpelkallus bestehen, welche erst das Eindringen der Gefäße und die Mineralisation ermöglicht.
5. Parallel zu diesen Umbauvorgängen kommt es in den Fragmentenden zum „Haversschen Knochenumbau.“ Die devitalisierten Zonen werden ersetzt. Die Osteone wachsen jetzt auch in den neugebildeten, weitmaschigen Faserknochenkallus ein und ersetzen diesen durch kompakten Lamellenknochen.

6. Der Umbau ist erst dann beendet, wenn die ursprüngliche äußere Form und innere Struktur des Knochens wiederhergestellt sind. Dieser Prozeß ist meist erst nach Monaten bzw. Jahren beendet. Die natürliche Frakturheilung entspricht etwa einer Rekapitulation der embryonalen Knochenentwicklung.

## **2.2. Knochenersatzstoffe**

### **2.2.1. Indikationen für Knochenersatzstoffe**

Größere Knochendefekte, wie sie zum Beispiel bei komplexen Frakturen, Zysten oder Tumoren auftreten, können ab einer bestimmten „kritischen Größe“ nicht mehr vom Körper aufgefüllt werden. Diese Defekte werden heutzutage in der Regel durch die autologe Spongiosaplastik, mit allogenem Spenderknochen oder mit Knochenersatzmaterialien aufgefüllt.

Mit der Auffüllung eines Knochendefektes sollen zwei Ziele erreicht werden:

Primär soll die Kontinuität des Knochens wiederhergestellt werden. Der Knochen sollte mechanisch belastbar sein, wenn nötig unter Verwendung von Knochenersatzmaterialien.

Sekundär ist zu fordern, dass der Ersatzstoff abgebaut und durch belastungsadäquat gebildeten körpereigenen Knochen ersetzt wird. Dieser Knochen soll erneut dem physiologischen Remodeling unterliegen. Ist ein Knochenersatzstoff nicht resorbierbar, so ist zu fordern, dass das Einwachsen des umliegenden Knochengewebes zu dauerhafter Stabilität führt.

Die wichtigsten Indikationen für Knochenersatzstoffe sind (Niedhart und Niethard(1999)):

- Frakturen
- Zysten
- Arthrodesen
- Fusionen der Wirbelsäule
- Endoprothesen-Wechsel

Zur Behandlung knöcherner Defekte des menschlichen Skeletts stehen zurzeit folgende Methoden zur Verfügung:

- Auffüllung mit autogenem Knochen
- Auffüllung mit allogenen Knochen
- Segmenttransport, Knochentransfer mit mikrovaskulärem Anschluß des autogenen Transplantates bzw. allogenen Implantates, Knochentransposition (nur paarige Knochen; in der Regel: Unterschenkel, vereinzelt Unterarm) und primäre Verkürzung
- Knochenersatzmaterialien

Diese Methoden werden mit sehr unterschiedlicher Häufigkeit, in Abhängigkeit von unterschiedlichen Indikationen, eingesetzt und können grundsätzlich auch kombiniert angewendet werden.

Im Folgenden wird kurz auf die Vor- bzw. Nachteile einiger Punkte eingegangen.

### **Auffüllung mit autogenem Knochen**

Autogener, das heißt demselben Individuum zugehöriger Knochen, stellt zum heutigen Zeitpunkt immer noch den sogenannten „Goldstandard“ der Defektauffüllung dar. Er hat den Vorteil, daß er in den umgebenden Knochen integriert und somit die ursprüngliche Stabilität des Knochens wieder erreicht wird (Niedhart und Niethard (1999)). Diese Methode der Knochendefektfüllung ist aber keinesfalls als optimal zu bezeichnen. Die Gewinnung, Transplantation und das Einwachsen des Knochens ist mit zahlreichen möglichen Komplikationen behaftet (Niedhart et al. (2003)). Folgende Komplikationen können sich für den Patienten ergeben:

- Infektion und Schmerzen
- Ausbildung eines postoperativen Hämatoms
- Lokale Nervenschäden an der Knochenentnahmestelle
- Mechanische Schwächung am Explantationsort, welche zu einer Fraktur an der Knochenentnahmestelle führen kann
- Erschöpfung der Spongiosa an der Entnahmestelle

Die Komplikationsrate ist mit bis zu 10% relativ hoch (Younger und Chapman (1989)). Grundsätzlich führt die autogene Knochengewinnung zu einer deutlichen Verlängerung der OP-Zeit (Explantation und Transplantation der Knochenspongiosa). Durch den zusätzlichen Eingriff werden neue Kosten verursacht. Letztlich muß bei diesem Verfahren natürlich mit Therapieversagern gerechnet werden, d.h. daß das Transplantat partiell oder als Ganzes nicht anwächst (Rueger et al. (1996)).

### **Auffüllung mit allogenem Knochen**

Durch die Verwendung von Fremdspongiosa (allogener Spongiosa) werden zuvor aufgeführte Nachteile wie Infekt, Hämatombildung, Nervenschädigung sowie die Erschöpfung des Spongiosamaterials umgangen. Die Nachteile von allogenem Knochen sind jedoch, daß Fremdspongiosa sterilisiert werden muß, um die Übertragung von Krankheitserregern sowie serologische Unverträglichkeitsreaktionen zu vermeiden. Dieses Verfahren führt zu einer Abschwächung der osteokonduktiven Eigenschaften, bei deutlich schlechteren biomechanischen Eigenschaften. Das Sterilisationsverfahren ist aufwändig und die laufenden Kosten einer Knochenbank sind enorm. Trotzdem wird allogenes Knochenmaterial aus Mangel an autologem Material verwendet.

### **Knochenersatzstoffe**

Angesichts dieser Komplexitäten bemühen sich Forscher intensiv um die Entwicklung von Knochenersatzstoffen, die anstelle von autogenem bzw. allogenem Knochen in der operativen Medizin eingesetzt werden könnten. Es soll sich um Ersatzstoffe handeln, die für solche Indikationen verwendet werden können, für die heutzutage autogener oder allogener Knochen trans- und implantiert wird (Rueger et al. (1996)).

Es ist zu fordern, dass Knochenersatzstoffe, nach ihrer Implantation in einen knöchernen Defekt, die knöcherne Heilung hinsichtlich folgender Kriterien positiv beeinflussen:

- Vollständige Defektheilung
- Qualität des neugebildeten Knochens
- Zeitraum, in der diese Neuformation stattfindet

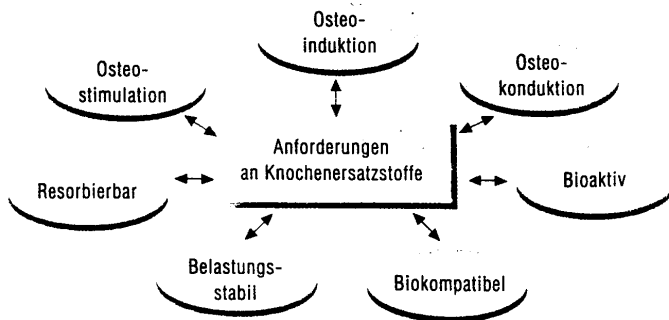
Das Ziel dieser Bemühungen soll sein, am Implantationsort einen reifen Knochen anzutreffen, der osteonal und trajektorieell aufgebaut, mechanisch belastbar ist und dem physio-

logischen „remodeling“ unterworfen ist (Ripamonti et al. (1991)). Es sollte also eine „Restitutio ad Integrum“ stattgefunden haben, das heißt, der neugebildete Knochen sollte dem ursprünglich vorhandenem Knochen entsprechen.

### 2.2.2. Klinische Anforderungen an Knochenersatzstoffe

Die limitierenden Faktoren des „Goldstandards“ haben zu einer verstärkten Suche nach dem „idealen Knochenersatzstoff“ geführt. Dieser Stoff sollte einer Reihe von Anforderungen genügen (siehe Abbildung 3).

Abbildung 3: Anforderungen an Knochenersatzstoffe (Niedhart und Niethard(1999))



Er sollte bioaktiv und biokompatibel sein. Der in den Körper implantierte Stoff darf weder toxisch, immunogen oder kanzerogen sein. Es ist zu fordern, dass dieses Material mit dem Körper in Interaktion tritt. Als Endergebnis sollte eine Verbundosteogenese mit direktem Knocheneinwuchs ohne Bindegewebsschicht stehen. Die gesuchte Substanz sollte nach Möglichkeit sowohl osteokonduktiv als auch osteoinduktiv oder –stimulierend sein.

**Osteokonduktion:** Unter Osteokonduktion versteht man die Fähigkeit, das Einwachsen von Kapillaren, perivaskulärem Gewebe und Knochenzellen zu erleichtern (Leitschieneffekt). Osteokonduktion ist zum Beispiel durch ein interkonnektierendes Porensystem zu erreichen (z.B. bei Kalziumphosphatkeramiken). Bei Abbau und Ersatz durch körpereigenen Knochen spricht man von Substitution.

**Osteoinduktion:** Die Umwandlung noch nicht differenzierter mesenchymaler Vorläuferzellen in Osteoprogenitorzellen, der eine enchondrale Ossifikation folgt, bezeichnet man als Osteoinduktion. Osteoinduktion kann orthotop, d.h. im Knochenlager und heterotop, z.B. im Fett- oder Muskelgewebe erfolgen.

**Osteostimulation:** Der Begriff Osteostimulation kennzeichnet eine Anregung des Knochenstoffwechsels über eine Aktivierung von schon differenzierten Knochenzellen.

Der Knochendefekt sollte nach seiner Auffüllung stabil und möglichst schnell voll belastbar sein. Ermüdungsfrakturen sollten nach Möglichkeit nicht in Erscheinung treten. Die Biomechanik sollte dem normalen Knochen relativ nahe kommen.

Das verwendete Material sollte resorbierbar sein und im Laufe der Zeit durch körpereigenen Knochen ersetzt werden, der dem physiologischen Remodeling unterliegt. Ist der Fremdstoff nicht resorbierbar, so muß eine ausreichende Stabilität des Knochens gewährleistet sein. Das Knochenersatzmaterial muß sterilisierbar sein, damit die Risiken möglicher Infektionen minimiert werden können. Die gewünschte Substanz sollte leicht zu synthetisieren und verarbeiten sein und in ausreichender Menge zur Verfügung stehen.

Bisher konnte noch kein Werkstoff entwickelt werden, der allen diesen Kriterien genügt. Der Großteil der bekannten Werkstoffe ist durch eine gute Osteokonduktivität bei oft unterschiedlicher Stabilität gekennzeichnet. Die meisten Erfahrungen liegen bisher mit keramischen Werkstoffen vor. Bei den bisher bekannten und im klinischen Einsatz verwendeten Materialien stehen sich Stabilität auf der einen und Osteokonduktivität/ Resorbierbarkeit auf der anderen Seite gegenüber.

### **2.2.3. Synthetische Knochenersatzstoffe**

Folgende Gruppen von Knochenersatzstoffen finden Verwendung:

- Biogläser
- Kalziumphosphatkeramiken
- hydrothermal umgewandelte Korallen und
- bovine Sinterprodukte

## **Biogläser**

Biogläser bestehen aus Silikon-Phosphat-Ketten, die über ionische Bindungen an  $\text{CaO}$ ,  $\text{CaF}_2$ ,  $\text{P}_2\text{O}_5$ ,  $\text{Na}_2\text{O}$ ,  $\text{K}_2\text{O}$ ,  $\text{ZnO}$ ,  $\text{Al}_2\text{O}_3$ ,  $\text{TiO}_2$ ,  $\text{CuO}$  und  $\text{NiO}$  Verbindungen gebunden sind. Zusätzlich besitzen diese Materialien die Fähigkeit, Ionenbindungen mit dem sie umgebenden physiologische Milieu einzugehen (Zaffe et al. (1991)). Biogläser sind somit in der Lage, über chemische Verbindungen in den Knochen integriert zu werden. Es sind in den letzten Jahren eine Reihe synthetischer Biogläser zur Überbrückung von Knochendefekten getestet worden. Sie sind bioaktiv und teilweise resorbierbar (Jeffrey et al. (1996)). Die Substanzklasse findet z.B. Anwendung als Oberflächenbeschichtung von metallischen Implantaten, um deren Verbindung mit vitalem Knochen ohne Zwischenschicht grenzenlos zu ermöglichen.

## **Kalziumphosphatkeramiken**

Kalziumphosphatkeramiken bestehen hauptsächlich aus Kalzium-Phosphat-Verbindungen unterschiedlicher Stöchiometrie. Außer den aus Knochen oder Korallen gesinterten Kalziumphosphatkeramiken kommen klinisch in erster Linie synthetisches Hydroxylapatit (HA) und Trikalziumphosphat (TCP) zur Anwendung (Tabelle 2). Hydroxylapatit stellt die mineralische Hauptkomponente des Knochens dar. Die Herstellung dieser Materialien erfolgt durch Pyrolyse und Sinterprozesse aus boviner Spongiosa oder Korallen. Die Werkstoffe sind bioaktiv und biokompatibel. Sie sind nicht osteoinduktiv, besitzen aber osteokonduktive Fähigkeiten, wenn sie über ein interkonnektierendes Porensystem (100-1000 pm) verfügen (Koester et al. (1976)). Hydroxylapatitkeramiken werden im Laufe der Jahre vollständig von vitalem Knochen umbaut, sind aber histologisch und röntgenmorphometrisch nahezu unverändert im Gewebe nachzuweisen, weil sie vom körpereigenen Knochengewebe schlecht resorbiert werden können. Im Laufe der Zeit entstehen Mikrofrakturen der Keramik mit möglichen Auswirkungen auf die Festigkeit des überbrückten Defektes. HA-Keramiken besitzen in Abhängigkeit von ihrer Porengröße eine gute Druckfestigkeit. Die Belastungsstabilität ist aufgrund ihrer geringen Biege- und Torsionsbelastbarkeit niedrig.

Trikalziumphosphat (TCP) wird gegenüber der Hydroxylapatitkeramik besser resorbiert, ist jedoch nur bedingt belastungsstabil. Gesinterte TCP-Keramiken werden in vivo über einen Zeitraum von sechs Monaten bis einigen Jahren (abhängig von Größe, Qualität und Implantationsort) resorbiert (Bashkar et al. (1971)). In klinischer Erprobung sind in den

letzten Jahren sogenannte Kalziumphosphat-Zemente. Sie liegen als Zweiphasen-Komponenten vor, die miteinander vermischt eine zahnpasteartige Viskosität entwickeln (Constanz et al. (1995)). Sie können in einen Knochendefekt injiziert werden und aushärten. Sie werden im Gegensatz zum HA resorbiert und durch körpereigenen Knochen ersetzt.

Kalziumphosphatkeramiken werden bisher für die Auffüllung von Defekten am Beckenkamm nach der Spongiosaentnahme, für die Behandlung von Defekten bei Patienten mit Enchondromen oder juvenilen Knochenzysten oder auch als Formkörper bei Spondylodesen und Umstellungsosteotomien verwendet.

Als Composite, zusammen mit autogenem Knochen, finden sie Gebrauch bei Spondylodesen und in der Gelenkersatzchirurgie, wie z.B. beim Prothesenwechsel oder der Auffüllung periprotetisch bestehender Knochendefekte.

Um ein Einheilen zu beschleunigen, können HA und TCP mit Knochenmark oder mit Blut vermischt werden. In primär stabilen Defekten ist das Einheilungsverhalten durchaus mit dem von autologen Spongiosaplastiken zu vergleichen (Buchholz et al. (1987)).

In Tabelle 2 ist die Wirkung der HA- und TCP-Keramiken als Knochenersatz beschrieben.

**Tabelle 2: Wirkmechanismen von HA- und TCP-Keramiken als Knochenersatz (Niedhart und Niethard (1999))**

|            | <b>Röntgen</b>                                      | <b>Resorption</b>                                                                                    | <b>Histologie</b>                                             | <b>Substitution</b>                                                                                                                |
|------------|-----------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>HA</b>  | verschwindet niemals (Ausnahme nanokristallines-HA) | Nur oberflächliche Resorption von wenigen $\mu\text{m}$ ca. 8%                                       | Aktiver und vitaler Knochen umgibt HA-Blöcke oder HA-Granulat | Keine Substitution, aber direkter Kontakt an der HA-Oberfläche und Knochen-Einwachsen durch Osteokonduktion in die poröse Struktur |
| <b>TCP</b> | Auflösung nach 1-2 Jahren                           | Nach erster Oberflächen-Resorption zerfällt TCP in kleine Partikel und wird von Makrophagen zersetzt | Aktiver und vitaler Knochen umgibt TCP-Partikel               | Teilweise Abtransport durch Makrophagen. Danach sind neue Knochenformationen zwischen den TCP-Partikeln nachweisbar                |

### **Hydrothermal umgewandelte Korallen**

Durch hydrothermale Umwandlungsprozesse ist man in der Lage, aus dem Kalziumkarbonatexoskelett unterschiedlicher Korallenarten Knochenersatzmittel herzustellen. Diese Stoffe bestehen nach ihrer chemischen Umwandlung aus reinem Hydroxylapatit (HA) bzw. aus einer Mischung von Hydroxylapatit und Whitlockit. Sie enthalten keinerlei organische Bestandteile mehr.

Grundsätzlich bestehen keine Unterschiede zwischen aus Korallen hergestelltem Hydroxylapatit und synthetischen Hydroxylapatitkeramiken. In Abhängigkeit von der Porengröße sind auch hydrothermal umgewandelte Korallen nur begrenzt mechanisch stabil. Der Vorteil koralliner Implantate ist, dass zwischen ihnen und dem eingewachsenen Knochen ein grenzschichtloser Kontakt entsteht. Aus Korallen hergestelltes Hydroxylapatit ist weder toxisch noch sind allergene Wirkungen bekannt.

### **Boviner Knochen**

Dieses Knochenersatzmaterial entsteht nach Pyrolyse von Rinderknochen, bei dem alle organischen Bestandteile nahezu vollständig zerstört werden. Nach einer zweiten Hochtemperaturbehandlung entsteht eine Hydroxylapatitkeramik bzw. ein Hydroxylapatitkeramikanalog. Aufgrund des Erhitzungsprozesses sind die Produkte keimfrei und nicht immunogen. Bei der Sinterung des Knochens kommt es zu einem Schwund der spongiösen Räume des bovinen Knochens (bis zu 30%) und zu einer Verdichtung dieses Ersatzmittels bei zunehmender Zahl der Verbindungspunkte zwischen einzelnen keramischen Partikeln des Ausgangsmaterials. Von großem Nachteil, bedingt durch den Herstellungsprozeß, ist, dass die Primärkristallgröße dieser Hydroxylapatitkeramiken die physiologischen Werte reifen Knochenminerals mindestens um den Faktor 100 überschreitet. Die Folge ist, dass die Resorption dieses Knochenersatzstoffes erheblich eingeschränkt ist.

Grundsätzlich haben bovine Implantate unter mechanisch stabilen Verhältnissen gute osteokonduktive Eigenschaften. Das Einwachsverhalten in das neue Knochengewebe und hier insbesondere das Resorptionsverhalten sind je nach Präparations- und Aufbereitungsverfahren des bovinen Knochens unterschiedlich (Rueger et al. (1996)).

## **2.2.4. Pathophysiologie der Transplantateinheilung**

Wichtige Aufgaben der Knochentransplantation bestehen in der Defektauffüllung, der Anregung der Osteogenese und der biomechanisch wirksamen Abstützung. Die vom Transplantat ausgehende Knochenneubildung und die Anregung der Knochenneubildung im Defektbereich sind als pathophysiologische Wirkungen des Transplantates zu beobachten.

### **Osteogenese**

Während einer initial osteoblastären Phase erfolgt die provisorische Verkittung des Transplantates mit dem Transplantatlager durch die Osteoidbildung der oberflächennahen, mit dem Transplantat übertragenen Osteoblasten. Voraussetzung für die Einheilung bei Spongiosatransplantaten ist es, biomechanisch stabile Konstellationen herzustellen. Die initiale Osteoregeneration findet vorwiegend an den durch Diffusion oder Frührevaskularisierung ernährten Transplantatoberflächen statt (Saur et al. (1978)). Zentral gelegene Transplantatareale bleiben zunächst reaktionslos. Die Bildung von neuem Knochenmaterial steht in enger Beziehung zu zellulär resorbierten Transplantatregionen und eingesprossenen Gefäßkapillaren. Es kommt zu einer Umwandlung der mesenchymalen Zellen des einsprossenden Gewebes zu Osteoblasten.

### **Transplantatrevaskularisierung**

Die biomechanische Integration der Transplantatstruktur in das Knochenlager hängt davon ab, inwieweit und wie schnell ernährende und induzierbares Zellmaterial führende Gefäße aus dem Lager in den Pflanzling eindringen können. Die Revaskularisierungsgeschwindigkeit ist bei kompakten Kortikalistransplantaten etwa 10fach niedriger als in Spongiosatransplantaten. Die größere osteogenetische Potenz der Spongiosa erklärt sich aus ihrer maschenartigen, für die Gefäße leichter erschließbaren Raumstruktur. Außer der Architektur und der Dimension des Transplantates hat auch die Vitalität einen wichtigen Einfluss auf die Quantität der Gefäßeinsprossung (Schweiberer et al. (1982)).

Devitale Transplantate werden langsamer vaskularisiert als vitale, gestielte Transplantate schneller als freie (Ray et al. (1972), Baadsgaard et al. (1970)). Wabig-lockere Spongiosagerüste sind leichter revaskularisierbar als reine Compacta, eine Mittelstellung nehmen corticospongiose Transplantate ein. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die autologe Spongiosaplastik noch immer als der sogenannte „Goldstandard“ bezeichnet werden

kann. Spongiosa besitzt im Vergleich zu Periost oder kortikalem Knochen die größte osteogenetische Potenz. Der schnelle Einbau von Spongiosa beruht auf ihrer Fähigkeit, direkte Verbindungen mit Kapillaren des Empfängerorgans zu bilden und die Knochenneubildung zu stimulieren (Clement und Szypryt (1987)). Die Verwendung autologer Spongiosa verhindert die Übertragung zahlreicher Krankheiten. Autologe Spongiosa kommt den Bedingungen eines idealen Knochentransplantates am nächsten, wobei sie jedoch nur limitiert verfügbar ist (siehe Kap. 2.2.1 und 2.2.2).

### **2.2.5. Fremdspongiosa**

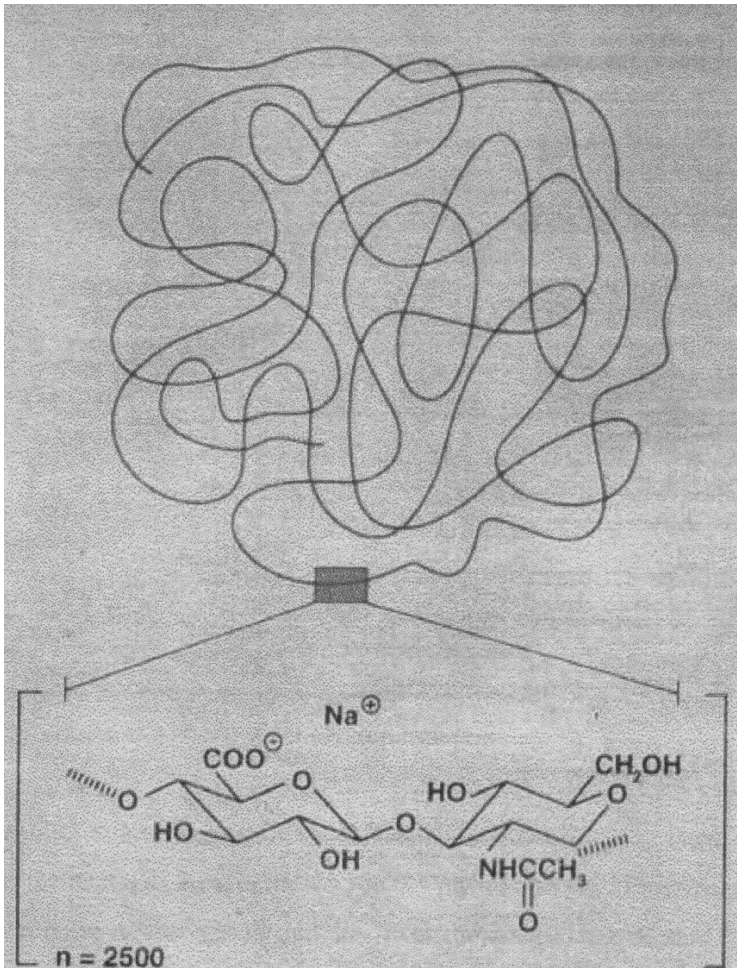
Die Fremdspongiosa stammt normalerweise von kältekonserverten (-30 bis -40°C) Hüftköpfen, die beim alloplastischen Ersatz des Hüftgelenks anfallen. Im Vergleich zur autologen Spongiosaplastik entsteht der Knochen nicht über vital transplantierte Osteoblasten. Die Bildung von neuem Knochenmaterial ist bei dieser Methode erheblich verlangsamt (Schumpelick et al. (1994)). Die immunologischen Reaktionen sind begrenzt, jedoch wird Fremdknochen in schlecht durchbluteten Transplantationslagern schlecht integriert. Es kommt nur zu einer geringen Knochenneubildung, der Knochen wird teilweise resorbiert, und es besteht sogar die Gefahr der Nekrosenbildung. Trotzdem ist Fremdspongiosa für eine Vielzahl von Anwendungsbereichen zu gebrauchen: Bei verhältnismäßig kleinen Defekten und günstigen Bedingungen (sauberes, gut vaskularisiertes knöchernes Spanbett) ist eine Spanentnahme aus dem Beckenkamm kaum gerechtfertigt. In diesem Fall ist die Verwendung homologer Spongiosa völlig ausreichend. Auch bei größeren Defekten können stabile druckfeste Späne gewonnen und implantiert werden, falls ihnen lediglich mechanische Funktion zukommt. Bei diesen Spänen kommt es zwar nur an ihrer Oberfläche zu Umbauvorgängen und dem Ersatz durch körpereigenen Knochen, aber sie werden toleriert und eingebaut. Fremdspongiosa-Transplantate werden in sogenannten Knochenbanken gelagert. Die Aufbewahrung erfolgt tiefgekühlt und die Anforderungen an die Sicherheit sind hoch (Hepatitisviren, HIV, BSE, usw.).

### **2.3. Hyaluronsäure**

Im Jahr 1934 isolierten Meyer und Palmer ein Polysaccharid aus einer glasartigen Rinderflüssigkeit und nannten es Hyaluronsäure (Meyer und Palmer (1934)). Hyaluronsäure

konnte im Laufe der Zeit auch aus anderen Quellen isoliert werden, wie z.B. aus Bindege-  
webe, Synovialflüssigkeit, Haut und der Nabelschnur. Hyaluronsäure kann auf natürlichem  
Wege durch lysosomale Hyaluronidase zerlegt werden. 1942 demonstrierte Duran-  
Reynals die Aktivität der Hyaluronidase zum ersten Mal in Hodenextrakten und bezeichne-  
te es als einen „spreading factor“ (Duran-Reynals et al. (1942)). Die chemische Struktur der  
Hyaluronsäure setzt sich aus alternierenden D-Glucuronsäure- und N-Acetyl-D-  
Glucosamin-Resten zusammen (siehe Abbildung 4). Sie spielt eine lebenswichtige Rolle  
bei verschiedenen biologischen Prozessen wie z.B. Wasseranlagerung im Gewebe, Orga-  
nisation von Proteoglykanen, Zelldifferenzierung und der Angiogenese.

Abbildung 4 Polymere Hyaluronsäure-Komplexe und ihr Baustein das Disaccharid



### 2.3.1. Chemische Zusammensetzung der Hyaluronsäure (Ha)

Hyaluronsäure ist eine Substanz aus der Gruppe der Polysaccharide, welche typischerweise im Bindegewebe von Vertebraten gefunden wird. Formell ist sie der Gruppe der sauren Mucopolysaccharide zuzuordnen, sie werden aber als Glykosaminglykane bezeichnet (siehe Tabelle 3) (Balazs et al. (1986)). Glykosaminglykane sind unverzweigte, einsträngige Polymere, die sich aus Disaccharideinheiten zusammensetzen. Die erste

Einheit enthält N-Acetylhexosamin und Hexose. Der zweite Zucker besteht in der Regel aus Hexuronsäure, die jedoch statt Keratansulphat den Zucker Galaktose enthält. Glykosaminglykane weisen eine Vielzahl von Eigenschaften auf. Sie besitzen Sulphatgruppen und ihre Polysaccharidketten sind relativ kurz ( $< 50$  kDa, normalerweise 15-20 kDa). Ihre Synthese findet im endoplasmatischen Retikulum und im Golgi-Apparat statt. Sie sind zusammen mit anderen Sacchariden in Peptid-Hüllen eingebettet. Unterschiedliche Arten von sulphatierten Glykosaminglykanen können einer fertiggestellten Peptidhülle angegliedert werden. Diese hinzugefügten Variationen in den Proteinen und anderen Sacchariden ermöglichen eine große Vielfalt der Proteoglykan Strukturen und ein erweitertes Reaktionspotenzial mit anderen Bausteinen der extrazellulären Matrix oder anderen Zellen. Die meisten Proteoglykane sind durch eine oder mehrere Bindungen mit fixen Matrixstrukturen oder Zellen gekoppelt und sind somit relativ immobil.

Hyaluronsäure (Ha) unterscheidet sich stark von anderen Glykosaminglykanen. Die Primärstruktur besteht aus einer Polysaccharidkette und enthält keine Peptide. Das Molekulargewicht (M) beträgt normalerweise mehrere Millionen (zum Vergleich: das Durchschnittsgewicht in normaler Synovialflüssigkeit beträgt gewöhnlich  $7 \times 1.000.000$ ). Die Uniformität des Aufbaus grenzt die biologischen Fähigkeiten des Moleküls stark ein. Um diesem zu entgehen haben sich auf anderen Zelloberflächen und Gewebemolekülen sogenannte „binding-sites“ entwickelt, die mit der Hyaluronsäure in Beziehung treten können. Außer diesen Fähigkeiten verfügt das Ha-Molekül über weitere unverwechselbare Eigenschaften, die auf ihre außerordentliche Molekülmasse zurückzuführen sind und eine nicht unerhebliche Rolle im Extrazellulärraum spielen (Fraser et al. (1997)).

Tabelle 3: Zusammensetzung und Molekulargewicht der Glykosaminyglykane (Fraser et al. (1997))

| Name                         | Constituent sugars                          | Sulphate | Approx. M             | Proteoglykans |
|------------------------------|---------------------------------------------|----------|-----------------------|---------------|
| Hyaluronan                   | Glucuronic acid<br>Glucosamine              | -        | $10^6 - 10^7$         | -             |
| Chondroitin 4-(6-) sulphates | Glucuronic acid<br>Galactosamine            | +        | $10 - 50 \times 10^3$ | +             |
| Dermatan sulphate            | Iduronic acid<br>Galactosamine              | +        | $10 - 50 \times 10^3$ | +             |
| Keratan sulphate             | Galactose<br>Glucosamine                    | +        | $5 - 15 \times 10^3$  | +             |
| Heparan sulphate             | Glucuronic and iduronic acid<br>Glucosamine | +        | $10 - 50 \times 10^3$ | +             |
| Heparin                      | Glucuronic and iduronic acid<br>Glucosamine | +        | $5 - 20 \times 10^3$  | +             |

Gereinigte hochmolekulare Hyaluronsäure ist extrem viskös und weist interessante rheologische Eigenschaften auf. Aufgrund dieser Eigenschaften wird Hyaluronsäure z.B. in Gebieten der Viscosupplementation und der Viscosurgery vielfältig eingesetzt. Ein weitgefächerter Einsatz ist durch die Tatsache begrenzt, dass unmodifizierte Ha nur in der Form eines wässrigen Gels mit kurzer Haltbarkeitsdauer zur Verfügung steht (Fraser et al. (1997)).

### 2.3.1.1 Biosynthese

Die Biosynthese und der Export von Hyaluronsäure unterscheiden sich von der Produktion anderer Polysaccharide deutlich. Im Gegensatz zu anderen Polysacchariden, welche im Inneren der Membranen des glatten endoplasmatischen Retikulums synthetisiert werden, wird die Hyaluronsäure an der Zellmembran hergestellt. Glykosaminyglykane werden durch spezielle Vesikel sezerniert, wohingegen Hyaluronsäure auf dem direkten Weg in die extrazelluläre Matrix ausgestoßen wird (Prehm et al. (1984)). Die Kettenverlängerung geschieht am reduzierten Ende des Moleküls durch alternierenden Transfer an der wachsenden Kette zu UDP-Glucuronsäure und UDP-N-Acetylglucosamin (Prehm et al. (1983)). Das an die Membran gebundene Enzym, Hyaluron-Synthetase, wurde zum ersten Mal in seiner aktiven Form aus einem Streptokokkenstamm isoliert. In letzter Zeit konnte eine Vielzahl von Genen, die Proteine codieren, die für die Synthese von Hyaluronsäure verantwortlich sind, entschlüsselt und geklont werden.

### **2.3.1.2 Biologische Bedeutung**

Hyaluronsäure ist ein wichtiger Bestandteil der extrazellulären Matrix. Während des proliferierenden Stadiums der Entwicklung der Gliedmaßen produzieren mesodermale Zellen eine große Menge an Hyaluronsäure in Form einer perizellulären Hülle. In den folgenden Stadien produzieren die Zellen weit weniger Hyaluronsäure, und es kommt nicht zur Ausbildung einer perizellulären Hülle. Zur selben Zeit bilden mesodermale Zellen membranbindende Strukturen für Hyaluronsäure an ihrer Oberfläche aus (Knudson und Toole (1985)). Auch bei der Entwicklung des Gehirns konnte eine erhöhte Produktion von Hyaluronsäure festgestellt werden. Sie konnte überwiegend im Extrazellulärraum der weißen Substanz lokalisiert werden. In vitro Experimente haben bewiesen, dass Hyaluronsäure die Zelldifferenzierung beeinflusst. Kuiawa und seine Mitarbeiter (1986) konnten zeigen, dass Hyaluronsäure in der Lage ist, sich an Zellkulturbestandteile zu heften, die Differenzierung von Myoblasten verhindern kann und die Zellproliferation ermöglicht. Weitere Experimente haben gezeigt, daß in der Gegenwart von niedrigmolekularer Hyaluronsäure eine Differenzierung von Chondroblasten stattfindet (Kuiawa et al. (1986)). Eine erhöhte Konzentration von Hyaluronsäure konnte ebenfalls in den Einwanderungsbezirken von mesenchymalen Kornealzellen, neuronalen Zellnestern, endokardialen Zellbanden und in Bereichen der Sklera ausfindig gemacht werden. Ein Anstieg der Hyaluronsäurekonzentration steht also mit der Zelldifferenzierung in unmittelbarem Zusammenhang. Man konnte herausfinden, daß Hyaluronsäure verschiedene Arten des Zellverhaltens beeinflusst (z.B. Phagozytose, Beweglichkeit, Bindungsfähigkeit und Trennung). Eine Anregung zur Phagozytose konnte bei Monozyten und Granulozyten beobachtet werden (Hakansson und Venge (1987)). Zellbewegungen konnten durch die Anwesenheit von Hyaluronsäure, durch den Aufbau eines hohen osmotischen Druckgefälles, beobachtet werden (Meyer et al. (1983)). Der ansteigende Druck ist in der Lage, Räume in der extrazellulären Matrix und den Zellschichten zu schaffen, die eine Beweglichkeit der Zelle erlauben. Ein weiterer Mechanismus, eine Migration der Zellen zu ermöglichen, besteht in der Fähigkeit der Hyaluronsäure, die Bindungskräfte zwischen den Zellen zu reduzieren. Die oben erwähnten Möglichkeiten des Zellverhaltens sind unter anderem auch von dem unterschiedlichen Molekulargewicht und der Konzentration der Hyaluronsäure abhängig (Abatangelo et al. (1982)).

Die Interaktion zwischen der Zelloberfläche und der Hyaluronsäure ist auf membran-gebundene Rezeptoren zurückzuführen (Underhill et al. (1992)). Diese Rezeptoren gehören zu einer Gruppe von Proteinen, CD44 genannt (früher bekannt als PGp-1, Ly-24, ECM3, gp90, H-CAM und ganz allgemein als Hyaluronsäure-Rezeptoren). Diese CD44 Gruppe leitet sich von einem einzelnen Gen ab und kann in unterschiedlichen Isoformen zur Ausprägung kommen. Zwei dieser Isoformen stehen in Verbindung zu mesenchymalen Zellen (Leukozyten und hämatopoetischen Zellen) und zu sich in Teilung befindlichen Epithelzellen. Eine andere Isoform kann ebenfalls an Hyaluronsäure binden und ermöglicht zielgerichtete Lymphozytenbewegungen (Haynes et al. (1991)). Der Rezeptor ist aus drei Hauptdomänen zusammengesetzt: Die cytoplasmatische Domäne interagiert mit dem Cytoskelett, die Hauptdomäne ist für die Lymphozytenmigration verantwortlich und eine Domäne mit einer terminalen Aminogruppe ist für das Erkennen und Binden der Hyaluronsäure zuständig. Die Anwesenheit eines solchen Rezeptors könnte zum einen die biologische Aktivität der Hyaluronsäure auf zellulärer Ebene erklären, zum anderen die Bindungskräfte der Zellen, die bei unterschiedlichen Zelltypen beobachtet werden konnten. Die hier angesprochenen Zellaktivitäten können entweder in Abhängigkeit von der Molekülgröße der Hyaluronsäure und dem entsprechenden Zelltyp unterdrückt oder aktiviert werden.

Ein weiteres Wirkungsgebiet der Hyaluronsäure ist die Angiogenese. West und seine Mitarbeiter konnten zum ersten Mal in Anwesenheit von Hyaluronsäure eine Gefäßneubildung in vivo nachweisen. Auch hierbei ist die Größe der Hyaluronsäuremoleküle von entscheidender Bedeutung. Nur niedrigmolekulare Hyaluronsäurefragmente können bei geringen Konzentrationen (1-100 mg Ha/ml, max. Wirkung bei 2 mg/ml) eine Gefäßneubildung induzieren. Diese Effekte scheinen ebenfalls wieder rezeptorgesteuert zu sein. Hyaluronsäure beeinflusst die Ansatzstelle von Endothelzellen und von muralen Gefäßzellen auf eine spezielle Art in Abhängigkeit von der Zelldichte (West et al. (1989)).

### **2.3.1.3 Umsatzrate und Stoffwechsel**

Die Menge an Hyaluronsäure im Blut kann mittels Radioimmunoassay bestimmt werden. Die zirkulierende Hyaluronsäure stammt meist aus der Lymphflüssigkeit, in die sich die umgebenden Gewebe entleeren. Eine hohe Umsatzrate ist in Gelenken, Haut (Halbwertszeit 12 Std.) und Auge (Halbwertszeit 1-1,5 Std.) festgestellt worden. Dort liegt die Hyalu-

ronsäure in hohen Konzentrationen vor. Die Lymphgefäße transportieren einen beträchtlichen Teil der Hyaluronsäure in die Blutbahn. In Geweben mit höherer Dichte wie z.B. Knochen und Knorpel, wird ein beträchtlicher Anteil der Hyaluronsäure zusammen mit Kollagenen und Proteoglykanen bei nicht vorhandenem Lymphabfluß direkt verstoffwechselt und umgesetzt (Fraser et al. (1997)). Dennoch gelangt der größte Teil der Hyaluronsäure aus dem Bindegewebe in die Lymphbahnen und wird dann in der Leber verstoffwechselt. Die Hauptorte des katabolen Hyaluronsäurestoffwechsels sind die Kupfer'schen Sternzellen der Leber, Endothelzellen und Lymphknoten. Niere und Milz spielen hierbei eine untergeordnete Rolle. Der katabole Stoffwechsel von Hyaluronsäure findet intrazellulär statt und wird durch spezielle Rezeptoren gesteuert. Am Abbau sind folgende Enzyme wesentlich beteiligt: Hyaluronidase,  $\beta$ -D-Glucuronidase und  $\beta$ -N-Acetyl-D-Hexoaminidase. Die vollständige Zerlegung findet in den Lysosomen statt. Die Endprodukte sind Glucuronsäure und N-Acetylglucosamin. Diese Monosaccharide diffundieren in das Cytosol und werden auf zwei Wegen verstoffwechselt. Glucuronsäure wird in Pentose umgewandelt. N-Acetylglucosamin kann zu Fruktose umgebaut werden, oder es kann für die Biosynthese von Glyko-Verbindungen wiederverwendet werden (Abatangelo et al. (1994)).

### **2.3.2. Hyaluronsäure als bioaktives Implantatmaterial**

Wie bereits im letzten Kapitel erwähnt, muss die in ihrer ursprünglichen Form bestehende Hyaluronsäure in ihrer chemischen Form abgewandelt und verändert werden, um eine optimale Effizienz in ihrem Einsatzgebiet erzielen zu können (Bendetti et al.(1994)). Die chemischen Umwandlungsprozesse der Hyaluronsäuremoleküle beruhen grundsätzlich auf zwei Prinzipien. Es handelt sich hierbei um sogenannte „cross-linking“ und „coupling“ Reaktionen. Eine kommerziell erhältliche Form der Hyaluronsäure, welche als HYAFF (Bendetti et al. (1994)) bezeichnet wird, ist als bioaktives Implantatmaterial ausgiebig untersucht worden. Diese ist vergleichbar mit dem von uns verwendeten „Hyalart“. Es handelt sich hierbei um eine Gruppe von Hyaluronsäurederivaten, die man durch Veresterung an der Carboxylgruppe einer Untereinheit eines Hyaluronsäure-Polymers mit linearen oder aromatischen Alkoholen gewinnt. Im nun folgenden Abschnitt sollen grundlegende Punkte erläutert werden, die die Verwendung von Hyaluronsäure als bioaktives Implantatmaterial als sehr interessant erscheinen lassen.

Betrachtet werden dabei folgende Punkte:

- Biologischer Abbau
- Zytotoxizität
- Beeinflussung anderer Zellen in vitro
- Beeinflussung anderer Zellen in vivo (intramuskuläre Implantation und intraossäre Implantation)

### **Biologischer Abbau**

Die Wasserlöslichkeit von Ha verändert sich, wenn die freien Carboxylsäure-Gruppen verestert werden. Mit steigender Anzahl an Esterbindungen sinkt die Wasserlöslichkeit des Moleküls. Dies ist in erster Linie auf den Verlust von hydrophilen Carboxylsäure-Gruppen und den hydrophoben Charakter durch die angehängten Alkohole zurückzuführen. Die körpereigenen Strukturen, die mit der Ha reagieren, sind aus vielen Komponenten zusammengesetzt (z.B. Anionen, Kationen, Proteine, spezifische Enzyme etc.). Es ist nun wichtig zu wissen, wie diese einzelnen Bestandteile in Interaktion mit der Hyaluronsäure treten und diese in ihrem biologischen Abbau beeinflussen. Diese Interaktionen sind natürlich für jedes anders strukturierte Ha-Polymer unterschiedlich. Zhong et al. (1994) hat z.B. das Enzym Hyaluronidase betrachtet und herausgefunden, dass wasserlösliche, nur zum Teil veresterte Polymere schnell durch Hyaluronidase abgebaut werden können, wohingegen die vollständig veresterten Polymere nicht durch dieses Enzym angegriffen werden können. Diese Erkenntnisse und eine Vielzahl weiterer Untersuchungen zeigen, dass es möglich sein muss, den Mechanismus zum Abbau von Ha-Derivaten zu manipulieren.

### **Zytotoxizität**

Ein ganz wichtiger Punkt bei der Implantation von Biomaterialien ist es, auszuschließen, dass das Implantat den Wirt schädigt. Dies kann am besten mit einem in vitro etablierten Toxizitätstest herausgefunden werden. Dieser Test bestimmt die Inzidenz von Zelluntergängen, wenn es zum Kontakt mit dem neuen Material kommt. Ein hierfür entwickeltes Analyseverfahren misst Abweichungen von der Zellatmungsrate, wenn Fibroblasten in Gegenwart des Biomaterials (Ha) inkubiert werden (David et al. (1994)). Das Ergebnis dieses Tests zeigt, dass die Zellatmung durch das neue Biomaterial in nicht signifikanter Weise gesenkt wird. Hyaluronsäure kann also, was das Kriterium der Zytotoxizität betrifft, als harmlos eingestuft werden.

### **Beeinflussung anderer Zellen in vitro**

Um einen Bezug herstellen zu können, wie es sich mit der Biokompatibilität des Biomaterials gegenüber dem Zellverband und anderen Gewebebestandteilen verhält, hat man die Adhäsion an Oberflächenmolekülen und ihre Migration beobachtet. Humane neutrophile Granulozyten wurden von freiwilligen Spendern entnommen und auf den Oberflächen von Hyaluronsäure-Derivaten (HYAFF) plaziert. Hunt und seine Mitarbeiter (1992) haben die Bewegung und Gestaltänderung der Neutrophilen beobachtet. Eine Vielzahl von Parametern wurde analysiert, wobei der Schwerpunkt auf der Geschwindigkeit und der Richtung der Zellbewegungen lag. Die Ergebnisse für die hier betrachteten Hyaluronsäurederivate waren sehr unterschiedlich (Campoccia et al. (1993)). Man vermutet, dass die verschiedenen Resultate im Zusammenhang mit dem unterschiedlichen Wasserbindungsvermögen der Derivate lagen.

### **Beeinflussung anderer Zellen in vivo (intramuskuläre/ intraossäre Implantation)**

Die Antwort des Wirtes auf eine neue Substanz spielt für die Biokompatibilität eine sehr entscheidende Rolle. Vince und seine Mitarbeiter (Vince et al. 1991)) entwickelten den Gebrauch quantitativer Techniken, die das Antwortverhalten von Bindegewebe gegenüber Hyaluronsäure erfassen und eine quantitative Erfassung von Zellverteilungen um die neu implantierten Materialien ermöglichen. Es zeigte sich ein unterschiedliches Antwortverhalten des Bindegewebes auf die einzelnen veresterten Hyaluronsäuren. Nach intramuskulärer Implantation fand nach einer bestimmten Zeit (von den einzelnen Implantaten abhängig) eine Einwanderung von Makrophagen um die neuen Biomaterialien statt. Nach einem noch längeren Zeitpunkt waren die neuen Materialien nahezu vollständig zerlegt und von einer Vielzahl an Phagozyten durchsetzt (David et al. (1994)). Diese Zellbewegungen, die im Wirt durch den Fremdstoff (Implantat) ausgelöst worden sind, lassen jedoch nicht unmittelbar den Schluß zu, dass sich hier sogenannte Abstoßungsreaktionen abgespielt haben. Die Einwanderung von Entzündungszellen in das Bindegewebe stellt in diesem Fall keinen Indikator für Biokompatibilität dar. Die Präsenz der Entzündungszellen ist unvermeidlich und es entspricht der Natur und Aktivität dieser Zellen, jegliche Art von neu eingebrachten Substanzen und Biomaterialien zu besetzen.

In einer weiteren Reihe von Experimenten ist die Reaktion von Knochengewebe auf das Einbringen von Hyaluronsäurederivaten untersucht worden (David et al. (1994)). Da es

sich bei der Hyaluronsäure um kein Implantat von fester struktureller Konsistenz handelt, wie es zum Beispiel beim Ersatz von Gelenken, maxillofacialen Prothesen etc. benötigt wird, sind bei diesem Ersatzstoff die biologischen Eigenschaften des Materials von größerem Interesse als die mechanischen. Im Moment besteht eine große Diskussion über die Entwicklung neuartiger Biomaterialien als Knochenersatzstoffe. Bisher scheint jedoch nicht das perfekte Material gefunden zu sein, das ein Einwachsen von neuem Knochen ermöglicht. Bisher wird vielfach noch die Meinung vertreten, daß Kalziumphosphatbaustoffe, wegen ihrer dem Kalziumhydroxylapatit ähnelnden Zusammensetzung, die einzigen geeigneten synthetischen Materialien darstellen. Wie bereits im Kapitel Knochenersatzstoffe beschrieben, gibt es jedoch eine Vielzahl weiterer Substanzklassen, die aufgrund ihrer teils osteokonduktiven teils osteoinduktiven Eigenschaften als Ersatzstoffe in Betracht kommen. Außer diesen bereits erwähnten Materialien soll jetzt die Betrachtung auf zerlegbare Polymere und insbesondere auf Hyaluronsäure gelegt werden. Polyester, wie „polyglycolic acid“ und „polylactic acid“ (Radder et al. (1994)) weisen keine optimalen Eigenschaften auf, um im klinischen Alltag eingesetzt zu werden.

Soranzo und Benedetti haben 1994 die Wirkung von zwei Hyaluronsäurederivaten (HY-AFF7 und ACP-Schwämme) auf die Knochenheilung untersucht. Ihre Studie zeigte, dass schon nach kurzer Zeit Resorption am Ende des perforierten Knochens nachgewiesen werden konnte. Innerhalb des Knochenmarks und zwischen den polymeren Implantatfasern hatte sich neuer Geflechtknochen gebildet. Es waren sogenannte Knochen-Spiculae erkennbar, die von Osteoblasten ummauert waren. Weitere Untersuchungen mit oben genannten Hyaluronsäurederivaten haben zu dem Ergebnis geführt, dass sowohl neues Knochenwachstum sowie Knochenregeneration als auch Knochenremodelling nachgewiesen werden konnte (Soranzo et al. (1994)). Die Antwort des Knochens war jedoch abhängig von dem verwendeten Derivat und seiner chemisch-physikalischen Beschaffenheit. Wichtige Einflussgrößen sind hierbei die Abbaugeschwindigkeit des Implantats und die Aktivität von Osteoblasten und Osteoklasten. Die Resultate zeigen, dass Hyaluronsäure-Derivate sehr interessante Eigenschaften besitzen.

### **2.3.3. Klinische Anwendung von Hyaluronsäure**

Der Gebrauch von Ha hat bis heute einen vielfältigen Einsatz in der klinischen Praxis gefunden. Folgende Einsatzgebiete seien in diesem Abschnitt kurz kommentiert: Augenheil-

kunde, Wiederherstellungs-Chirurgie, Gelenkerkrankungen, Hyaluronsäure und Hyaluronsäurederivate in der Pharmakologie und in der Wundheilung.

### **Augenheilkunde**

Aufgrund der hohen Viskosität von Hyaluronsäure-Lösungen wird die Ha in der Augenheilkunde häufig verwendet (Grav et al. (1979), Balazs und Denlinger (1989)). Der Vorreiter dieser klinischen Anwendungsform war Balazs. Er prägte den Begriff „Viscosurgery“ für diese medizinische Applikationsform, die Gebrauch von den physikalisch-chemischen Eigenschaften der Hyaluronsäure macht. In der Augen-Chirurgie wird z.B. eine Hyaluronsäure-Lösung in die Augenkammer zum Schutz des Bindegewebes und des Hornhautendothels injiziert (Grav et al. (1979)).

### **Wiederherstellungs-Chirurgie**

Hyaluronsäure wird nach Gewebeschädigungen eingesetzt, um eine schnellere Wundheilung und Geweberegeneration zu ermöglichen. Nach Verletzungen der Haut oder des Bindegewebes kommt es zu einer Organisation des Gewebes, die auf denselben Prinzipien beruht, wie die Entwicklung und das Wachstum des embryonalen Gewebes. Glykosaminoglykane spielen eine entscheidende Rolle, um neuen Zellverbänden ein Einwandern in das zerstörte Gewebe zu ermöglichen. Besonders der Migration von Fibroblasten kommt hier eine große Bedeutung zu. Wie in einer Studie von Longaker gezeigt werden konnte, spielt Hyaluronsäure bei der fetalen Wundheilung eine entscheidende Rolle (Longaker et al. (1991)). Es gibt Informationen darüber, dass zu Beginn einer Schädigung des Bindegewebes ein Anstieg der Hyaluronsäurekonzentration im Gewebe zu verzeichnen ist. Versuche am Tier und auch am Menschen belegen die stimulierenden Effekte von Ha in der Wundheilung (Weigel et al. (1986)). Ha weist eine Reihe von pharmakologischen Eigenschaften auf, die den Wundheilungsprozess positiv beeinflussen. Durch die Applikation von Hyaluronsäure konnte z.B. eine Vernetzung der Zellen bei der Regeneration von Sehngewebe aufgrund von Veränderungen der Oberflächeneigenschaften des regenerierten Gewebes (sog. „gliding effect“) verbessert werden (Gaughan et al. (1991)).

Das wohl wichtigste Einsatzgebiet von Hyaluronsäure ist die plastische Chirurgie. Es gibt eine Reihe von Untersuchungen und Experimenten, die den Einfluß von Hyaluronsäure auf Heilungsprozesse beschädigter und verletzter Haut dokumentieren. In vivo Versuche an zuckerkranken Ratten haben gezeigt, dass bei der Anwendung von Hyaluronsäure das

Einwandern von Epithelzellen in verletztes Gewebe und ein Nachschub von dermalen Fibroblasten verbessert werden konnte (Abatangelo et al. (1983)). In vitro Untersuchungen haben die Hypothese gestützt, dass die Präsenz von Hyaluronsäure Wachstum und Beweglichkeit von Fibroblasten ermöglicht (Doherty et al. (1989)). Grund hierfür ist die Fähigkeit der Hyaluronsäure, Bindungskräfte der Zellen untereinander und zwischen Zelle und umgebender Matrix zu reduzieren.

### **Gelenkerkrankungen**

Hyaluronsäure ermöglicht eine strukturelle Integrität der Proteoglykan-Bausteine des knorpeligen Extrazellulärraumes und stellt den Hauptbestandteil der Synovialflüssigkeit dar. Seit mehr als 20 Jahren wird Hyaluronsäure in Gelenke von Menschen und von Tieren injiziert. Beim Menschen kommt diese Behandlung bei der Arthrose zum Einsatz. Sie stellt eine Alternative zur traditionellen Steroid Therapie dar (Jones et al. (1993)). Die Zugabe von Hyaluronsäure zu Chondrozytenkulturen hat gezeigt, dass sie die Synthese von Glykosaminoglykanen in unterschiedlicher Art und Weise beeinflussen kann. Es wurden sowohl suppressive als auch stimulatorische Effekte beobachtet (Solursh et al. (1974), Cortivo et al. (1990)). Auch in der Rheumatologie findet Hyaluronsäure einen vielfältigen Einsatz. Man macht sich folgende Effekte bei der Behandlung von Gelenkerkrankungen mit Hyaluronsäure zu Nutzen: Senkung der Chemotaxis von Entzündungszellen, Verhinderung der Prostaglandin-Synthese und Stimulation der Synovialzellproduktion. Studien haben gezeigt, dass Hyaluronsäure gut gewebeverträglich ist und eine Alternative zur herkömmlichen Steroidtherapie oder zur Therapie mit nicht steroidal entzündungshemmenden Substanzen darstellt (Partsch et al. (1989), Smith und Gosh (1987)).

### **Hyaluronsäure und Hyaluronsäurederivate in der Pharmakologie und der Wundheilung**

Ha hat sich als geeignetes Carrier-Molekül für Pharmaka herausgestellt. Ihr Grundgerüst besitzt chemische Gruppen an die man Pharmaka binden kann. Im klinischen Einsatz wird Ha z.B. als Carrier für Methylprednisolon benutzt (Kyyrönen et al. (1992)). Diese Verbindung besitzt bei der Zugabe zu Chondrozyten-Kulturen anti-inflammatorische und chondroprotective Eigenschaften. Weiterhin ist es möglich, wasserunlösliche Hyaluronsäure-Derivate mit verschiedenen therapeutisch aktiven oder inaktiven Alkoholgruppen zu versehen. Diese in vorausgehenden Kapiteln bereits beschriebenen Hyaluronsäure-Ester

kommen in der Klinik zum Einsatz. Diese Ester werden z.B. bei Projekten zum Bau von Membranen, Verbandsmaterialien, Schwämmen und „Microsphären“ verwendet. Membranen und Häutchen, die aus Ethylestern der Hyaluronsäure produziert werden, sind in Wundheilungsstudien am Schwein und Kaninchen getestet worden (Davidson et al. (1991)). Diese Membranen haben sich als geeignete Substrate für Keratozytenkulturen und als in vivo nutzbare Transplantationsmaterialien erwiesen (Andreassi et al. (1991)).

#### **2.3.4. Osteostimulation bei Knochendefekten durch Hyaluronsäure**

Eine Studie von T. Sasaki und C. Watanabe aus dem Jahre 1995 ist die erste Untersuchung mit dem Ziel, die morphologischen Effekte auf die Knochenheilungsprozesse beim Gebrauch von elastovisköser, gereinigter, hochmolekularer Hyaluronsäure zu dokumentieren. Die Experimente sind eine Reaktion auf Untersuchungen von Piloni und Bernard (Piloni und Bernard (1992)). Sie haben herausgefunden, dass Hyaluronsäure zu einem Anstieg der mesenchymalen Zelldifferenzierung und Zellmigration und somit zu einem Anstieg der „osteoblastic bone formation“ in vitro geführt hat.

In der Studie von Sasaki und Watanabe handelt es sich um ein in vivo Experiment an Ratten. In die mittlere Diaphyse des kortikalen Oberschenkelknochens von Ratten wurde ein kreisrunder Defekt (1 mm Durchmesser) mit einem Bohrer gesetzt. Sofort danach wurde der ausgehobene Knochendefekt mit hochmolekularer Hyaluronsäure aufgefüllt und versiegelt. Nach 1,2,4,7 und 14 Tagen wurden die Oberschenkelknochen exartikuliert und fixiert. Danach wurde der Defekt histomorphometrisch untersucht. In der Kontrollgruppe, in welcher der Defekt ausschließlich mit „blood clots“ wiederaufgefüllt wurde, konnte nach ein und zwei Tagen nur das Vorhandensein von "blood clots" " und "fibrin clots" " festgestellt werden. Nach etwa vier Tagen konnte im Defekt Granulationsgewebe bestehend aus Makrophagen, Neutrophilen und Fibroblasten auffindig gemacht werden. Neue Knochenformationen durch differenzierte Osteoblasten konnten frühestens nach einer Woche entdeckt werden. Nach zwei Wochen waren der perforierte kortikale Knochen und das Knochenmark von neugebildetem Geflechtknochen durchsetzt. Im Vergleich zur Kontrollgruppe ergaben die mit Hyaluronsäure aufgefüllten Defekte folgende Ergebnisse: Eine Bildung von neuem Knochengewebe in den peri- und endostalen Schichten des kortikalen Knochens konnte bereits nach vier Tagen beobachtet werden. Schon nach einer Woche war der Defekt vollständig von Geflechtknochen durchsetzt und ein normales „bone remode-

ling“ von Osteoblasten und Osteoklasten war erkennbar. Das Granulationsgewebe wurde sehr schnell durch normales Knochenmark ersetzt. Obwohl bei den Untersuchungen von Sasaki und Watanabe nicht deutlich wird, ob die Ha auf direktem Weg oder auf eine indirekte Art seine Einflüsse auf das Wachstum von neuem Knochen deutlich macht, so ist doch eindeutig festzustellen, dass es bei den mit Ha aufgefüllten Defekten zu einer schnelleren Knochenneubildung gekommen ist (Sasaki und Watanabe (1995)).

## **2.4. Idee des Composites**

### **2.4.1. Zusammensetzung des Composites**

Im Kapitel Knochenersatzstoffe ist bereits beschrieben worden, welche Knochenersatzstoffe es gibt und welche klinischen Anforderungen an diese Stoffe gestellt werden müssen. Hier noch einmal die Kriterien für eine optimale Versorgung knöcherner Defekte:

Der Knochendefekt muss nach der Auffüllung stabil, d.h. schnell voll belastbar sein, Ermüdungsfrakturen sind auszuschließen, und die Biomechanik nach Defektauffüllung sollte der von normalem Knochen entsprechen. Eine weitere wichtige Komponente ist, dass der neu implantierte Fremdstoff resorbierbar sein muss und nach und nach durch körpereigenen Knochen ersetzt werden kann. Dieser neu gebildete Knochen sollte dem normalen physiologischen Remodeling unterworfen sein. Wenn der eingebrachte Fremdstoff nicht durch normales Knochengewebe ersetzt werden kann, so sollte der Ersatzstoff eine lebenslange Stabilität gewährleisten. Der gesuchte Werkstoff müsste in ausreichender Menge zur Verfügung stehen oder produziert werden können und gut zu verarbeiten sein. Bis heute konnte kein Material mit all diesen Fähigkeiten gefunden werden. Um dem Ideal eines solchen Werkstoffes möglichst nahe zu kommen, hat man die Idee eines sogenannten Composites entworfen. Ein Composite ist ein Knochenersatzstoff, der aus einer osteoinduktiven oder osteostimulativen und osteokonduktiven Komponente zusammengesetzt ist. Diese Entwicklung kommt der Idee eines perfekten Knochenersatzmaterials schon relativ nahe. Die meisten Materialien zeichnen sich nur durch eine gute osteokonduktive Komponente aus, bei meist nur durchschnittlicher Stabilität des Implantats. Beim Composite werden durch Zugabe einer induktiv oder stimulierend wirkenden Komponente zu einer stabilen Grundsubstanz primär belastungsstabile Verhältnisse erzielt. Als nächstes wird das Transplantat (Composite) von körpereigenem Knochen durchbaut oder sogar durch diesen vollständig ersetzt. Ein Beispiel für ein Composite stellt z. B. der humane Knochen selber

selber dar. Neben der in die organische Matrix (zu 95 % Kollagen) eingelagerten mineralischen Komponente (50 % des Trockengewichts, hauptsächlich Hydroxylapatit), die für die nötige Stabilität sorgt (Gerüststoff), enthält Knochen eine Vielzahl den Knochenstoffwechsel beeinflussende Wachstumsfaktoren und Zytokine (osteoinduktive bzw. -stimulierende Komponenten). Die dritte Komponente dieses Composites sind die Zielzellen: Osteoblasten, Osteozyten, Osteoklasten und Vorläuferzellen (Andre et al. (1995), Niedhart und Niethard (1999)).

#### **2.4.2. Hyaluronsäure als Trägersubstanz für bioaktive Substanzen**

Wie im vorigen Kapitel erwähnt, sind Composites grundsätzlich aus zwei Komponenten zusammengesetzt. Neben den eigentlichen biologischen (osteostimulierenden) Faktoren ist eine Trägersubstanz von entscheidender Wichtigkeit. Ohne diesen Teil des Composites käme es zu einem schnellen Auswaschen der Substanz und zu einem Einwuchern von Fibroblasten in den noch nicht wieder mit neuem Knochenmaterial ausgefüllten Defekt. Generell stehen folgende Substanzen als osteokonduktive Gerüststoffe zur Verfügung:

Metallgerüste, Keramiken, biologische resorbierbare Materialien und Polymere. Hydroxylapatit (HA) und Trikalziumphosphat (TCP) sind die Keramiken, die im klinischen Einsatz am häufigsten verwendet werden. Biopolymere wie z.B. Poly-Aminosäuren (Jeffrey et al. (1996)) oder Hyaluronsäure sind ebenfalls als osteokonduktive Gerüststoffe in der Klinik im Gebrauch. Im Folgenden sollen nun die Vorteile von Hyaluronsäure als Trägersubstanz herausgestellt werden:

D. Bakos und Mitarbeiter haben 1999 eine Arbeit veröffentlicht, in der ein Composite bestehend aus einer Hydroxylapatit- und einer Kollagen-Hyaluronsäure-Komponente untersucht worden ist (Bakos et al. (1999)). Die Kalziumphosphatkeramik wählte er als den ersten Composite-Bestandteil aus, weil Hydroxylapatit biokompatibel ist und zusätzlich seit Jahren weltweit in praktischen Anwendungen als Knochenersatzmittel eingesetzt wird. Der Nachteil einer alleinigen Anwendung von Hydroxylapatit ist, dass sie nach Implantation spröde wird und mit zunehmender Porengröße an Druckfestigkeit abnimmt. Zusätzlich kommt es im Laufe der Zeit zu Mikrofrakturen des Implantates mit möglicherweise negativen Auswirkungen auf die Festigkeit des aufgefüllten Defektes (siehe Kap. 2.2.3) (Marouf et al. (1990)). Nach Bakos war das größte Problem, dass sich die Hydroxylapatitkeramik

nicht übergangslos mit dem neu eingewachsenen Knochenmaterial verband. Um eine bessere Integration mit dem einwachsenden Knochenmaterial zu ermöglichen, überzog er die Hydroxylapatit (Anteil 92 %) -Keramik mit einer Schicht bestehend aus Kollagen und Hyaluronsäure (Anteil 8 %). Sein Ziel war es, ein Composite zu entwerfen, das sowohl ein gutes Bindungsvermögen gegenüber harten Gewebebestandteilen (z.B. Knochen), als auch gegenüber anderen Substanzen (z.B. Bindegewebe, Gewebsflüssigkeiten, Blut etc.) hat. Durch die seiner Meinung nach besseren Kohäsionskräfte, sollten die bisher beschriebenen Nachteile des Hydroxylapatits, was die Integration in den neuen Knochen betrifft, minimiert werden. Vor allem Hyaluronsäure (siehe Kap. 2.3.2), die eine Schlüsselrolle bei der Gewebedifferenzierung und einer Vielzahl von Reparaturmechanismen spielt, kommt eine besondere Rolle bei der Anbindung an flüssige Materialien zu (Kim und Valentini (1996)). Durch die Ausbildung von speziellen Bindungen ermöglicht sie, gebunden an die Kollagen-Komponente, eine sehr gute Integration der Keramik in den neu einwachsenden Knochen (Rehakova et al. (1996)). Der Kollagenfilm hatte die Aufgabe, ein besseres Anbinden des porösen Hydroxylapatits an das neue Knochenmaterial zu ermöglichen (Ten Huisen et al. (1995)). Was dieses Composite außerdem so interessant erscheinen lässt, ist, dass Hyaluronsäure wie in Kapitel 2.3.4 beschrieben, über außergewöhnlich gute osteostimulierende Fähigkeiten verfügt.

Unsere Überlegung war es, die Hyaluronsäure selbst als Trägersubstanz eines neuen Composites einzusetzen. Die hervorragenden Eigenschaften als bioaktives Implantatmaterial sind als Voraussetzung in Kapitel 2.3.2 ausführlich beschrieben worden. Das Vorliegen der Hyaluronsäure als hochvisköse Flüssigkeit und nicht als starrer Hydroxylapatitkeramikblock veranlasste uns, diese Substanz als Trägerstoff eines neuen Composites zu verwenden. Die Möglichkeit, Hyaluronsäure passgenau anzumodellieren bzw. zu verformen, erschien uns als ideal zum Auffüllen von Knochendefekten. Die Hyaluronsäure in Form einer hochviskösen Masse kann z.B. perkutan in den Knochen injiziert werden. Dies ist ein großer Vorteil gegenüber der Vielzahl anderer Knochenersatzstoffe. Die Trägersubstanz lässt sich zum Beispiel mit Substanzen kombinieren, die über gute osteostimulierende Eigenschaften verfügen. Hierfür sind z.B. die Proteine BMP und bFGF als Bausteine geeignet.

### **2.4.3. Die osteoinduktiven und osteostimulierenden Proteine „BMP2“ und „bFGF“**

Die Knochenneubildung durch Osteoinduktion ist ein komplexer Prozess, der durch eine Vielzahl von zentralen (Vitamin D, Parathormon, Calcitonin) und lokalen Wachstumsfaktoren (vor allem TGF- $\beta$ , Bone Morphogenetic Proteins, IGF, TNF, Interleukine und Interferone) gesteuert wird (siehe Kap. 2.1.1.4) (Urist et al. (1983), Reddi et al. (1987)). Prinzipiell haben alle hier erwähnten Substanzen die Potenz, neues Knochenwachstum zu stimulieren.

Die einzige bekannte osteoinduktive Substanz ist das Bone Morphogenetic Protein (BMP). Ergebnisse immunhistochemischer Färbungen haben gezeigt, dass menschliches BMP entlang von Kollagenfibrillen des normalen Knochens in periostalen Zellen und in mesenchymalen Zellen des Knochenmarks verteilt ist. BMP wird zum Großteil in Knochenzellen der Kortikalis und in kleineren Mengen auch in der Spongiosa gefunden. Außerdem konnte das Protein im Prädentin menschlicher Pulpazellen und in Zellen des inneren und äußeren Schmelzepithels nachgewiesen werden (Takeda et al. (1994)). BMP ist ebenfalls im Zytoplasma menschlicher Tumorzellen bei Osteosarkomen, Chondrosarkomen und im Wundgewebe nach Zahnextraktionen gefunden worden (Lianjia und Yan (1990)). Seit dem Nachweis einer die Knochenneubildung stimulierenden Potenz demineralisierten Knochens hat es viele Versuche gegeben, die Knochenneubildung bei Frakturen und Defekten durch Ausnutzung dieser osteogenetischen Potenz zu fördern.

Der exakte Wirkungsmechanismus und die Interaktionen von lokalen und systemischen Wachstumsfaktoren, die bei der Knochenneubildung und dem Knochenwachstum eine Rolle spielen, sind noch nicht genau bekannt. BMP ist in der Lage, die Differenzierung noch nicht spezialisierter Mesenchymzellen zu stimulieren. Alle beteiligten Faktoren und die genauen Wirkungsmechanismen sind ebenfalls noch unzureichend bekannt (Aaboe et al. (1995)). Bisher konnten als Hauptverursacher von Knochenneubildungen aus der Gruppe der neun verschiedenen BMPs BMP2, BMP4 und BMP7 identifiziert werden (Wozney et al. (1988)). Grundsätzlich hängt die Tendenz, neuen Knochen zu bilden, vom BMP (insbesondere BMP2, 4, 7), dem Transportsystem oder einem geeigneten Carrier ab (Ferguson et al. (1987)). BMPs können für den klinischen Einsatz entweder rekombinant hergestellt werden oder durch Extraktion aus Knochen gewonnen werden. Zum Abschluss

muss aus dem Knochen gewonnenes BMP sterilisiert werden, was die osteostimulierenden Eigenschaften mindert (Ijiri et al. (1994)).

Die osteoinduktiven Eigenschaften verschiedener BMPs konnten in zahlreichen Tierversuchen und auch im humanen System unter Beweis gestellt werden (Johnson et al. (1990)). Es waren jedoch deutlich höhere Dosen an BMP nötig, als sie im menschlichen Organismus physiologischerweise nachzuweisen sind.

bFGF ist ebenfalls ein lokaler Wachstumsfaktor (siehe Kap. 2.1.1.4). Es beeinflusst eine Vielzahl von Zelltypen, in erster Linie jedoch die Proliferation mesenchymaler Zellen (McCarthy et al. (1989)). FGF (Fibroblast Growth Factor) stimuliert die Mitogenese, die Chemotaxis, die Zelldifferenzierung und die Angiogenese. Es spielt eine bedeutende Rolle bei der Entwicklung vaskulärer, nervaler und knöcherner Systeme. FGF hat Einfluss auf die Wundheilung und die Regeneration unterschiedlichster Gewebetypen (Burgess und Maciag (1989), Klagsbrunn et al. (1989)). Die Wirkung des FGF ist in zahlreichen Studien untersucht worden. Bei frakturierten Oberschenkelknochen von Ratten hat die lokale Injektion von FGF zu einem Anstieg der Knorpelmenge bei der Kallusbildung geführt (Jingushi et al. (1990)). Eine andere Studie hat die Kallusbildung bei Tibiafrakturen am Hund unter dem lokalen Einfluss des Wachstumsfaktors FGF untersucht (Nakamura et al. (1998)). Kawaguchi und Mitarbeiter behaupten, dass die Wirkung von FGF auf die Frakturheilung in erster Linie auf die Stimulation der Proliferation von Mesenchymzellen zurückzuführen sei. Die mesenchymalen Zellen setzen dann die Kaskade der Frakturheilung in Gang (Kawaguchi et al. (1994)).

Grundsätzlich ist für die osteostimulierenden Substanzen die Anwesenheit von sogenannten Zielzellen (Vorläuferzellen für BMP, Osteoblasten und Osteozyten für stimulierende Faktoren) obligat. Bei Zugabe von Blut, Knochenmark oder zerkleinerter Spongiosa zum Transplantat kann die Bildung von neuem, vitalem Knochen beschleunigt werden. Für das Einbringen der osteostimulierenden bzw. -induktiven Faktoren ist eine Trägersubstanz erforderlich. Dieser Komplex wird als Composite bezeichnet und ist bereits im Kapitel 2.4.1 beschrieben.

### 3. Material und Methodik

#### 3.1. Material

##### 3.1.1. Hyaluronsäure, BMP2 und bFGF

Zur Defektauffüllung sind die im Folgenden aufgelisteten Substanzen verwendet worden:

##### **Hyaluronsäure (Hyalart®):**

Hyalart® wird in hochgereinigter Form extraktiv aus Hahnenkämmen hergestellt. Die im Präparat enthaltene Fraktion des Hyaluronsäure-Natriumsalzes hat ein Molekulargewicht von 500-730 kDalton und liegt in einer hochviskösen wässrigen Lösung vor.

Die Hyaluronsäure ist in Fertigspritzen zu 20mg/2ml Injektionslösung abgefüllt, die wirksame und nicht wirksame Bestandteile enthält.

Wirksamer Bestandteil:

- Hyaluronsäure-Natriumsalz 20,0 mg

Nichtwirksamer Bestandteil:

- Natriumchlorid 17,0 mg
- Dinatriummonohydrogenphosphat 12 [H<sub>2</sub>O] 1,2 mg
- Mononatriumhydrogenphosphat 2 [H<sub>2</sub>O] 0,1 mg
- Wasser für Injektionszwecke q.s. ad 2,0 ml

Der in den Femur der Schafe gebohrte Defekt wurde mit 1 cm<sup>3</sup> Hyaluronsäure aufgefüllt. Um ein Auslaufen der Säure aus dem Defekt zu verhindern, wurde die Viskosität der Hyaluronsäure durch eine Aufbewahrung bei ca. 4°C im Kühlschrank erhöht.

##### **BMP2**

Tiefgefrorenes Rekombinantes BMP2 (100 µg)

Der Defekt wurde mit einer Kombination von 100 µg BMP2 und 1 cm<sup>3</sup> Hyalart aufgefüllt. Das BMP2 wurde im Institut für physiologische Chemie der Universität Würzburg hergestellt (nach Ruppert et al (1996)). Das BMP2 wurde lyophilisiert geliefert mit sterilem destil-

liertem Wasser gelöst und bei  $-70^{\circ}\text{C}$  gelagert. Direkt praeoperativ wurde die entsprechende Verdünnung hergestellt und dem Hyalart durch Beimengung zugefügt.

### **bFGF**

Tiefgefrorenes Rekombinantes bFGF (100  $\mu\text{g}$ )

Der Defekt wurde mit einer Kombination von 100  $\mu\text{g}$  bFGF und 1  $\text{cm}^3$  Hyalart aufgefüllt. Das bFGF (Hersteller: Stratmann Biotec GmbH Hannover) wurde ebenfalls lyophilisiert geliefert, allerdings wurde es in PBS (phosphate buffered saline) gelöst. Auch hier erfolgte die Lagerung bei  $-70^{\circ}\text{C}$ . Entsprechend dem BMP2 wurde das bFGF verdünnt und dem Hyalart direkt praeoperativ beigemischt.

### **3.1.2. Versuchstiere und deren Auswahlkriterien**

In unserem tierexperimentellen Projekt wurden insgesamt 25 Schafe verwendet. Insgesamt wurden eine Kontrollgruppe (10 Tiere) und drei Versuchsgruppen (15 Tiere) untersucht (siehe Kap 3.2.1). Die Untersuchungen erfolgten nach den Richtlinien des Bundesgesundheitsministeriums und unter Beachtung der Bestimmungen zum Umgang und zur Betreuung von Versuchstieren. Die Tiere wurden mindestens eine Woche vor Versuchsbeginn in die Zentralabteilung für Versuchstierkunde (ZV) angeliefert. In der ZV wurden die Tiere zunächst in Gruppenhaltung auf Stroheinstreu untergebracht. Die Tiere konnten über Heu, Wasser und energiereiches, pelletiertes Ergänzungsfutter frei verfügen. Als Nahrungsergänzung wurden den Tieren zusätzlich mineralstoffhaltige Salzlecksteine angeboten. Die Haltungsbedingungen wurden durch die Versuchstierabteilung vorgegeben. Die Umgebungstemperatur betrug  $20\pm 2^{\circ}\text{C}$ , die relative Luftfeuchte  $50\pm 10\%$  und der Hell/Dunkel Rhythmus 12:12h. Die Tiere wurden 24h vor der Operation in Boxen zu jeweils zwei Tieren überführt. Mit Überführung der Tiere in die Boxen begann die Nahrungskarenz. Postoperativ wurden die Tiere zunächst in Käfigen mit max. vier Tieren auf Stroheinstreu gehalten. Anschließend wurden sie wieder für eine Woche in der Gruppenhaltung untergebracht, bevor sie dann über die externen Stallungen der Versuchstierabteilung, in welchen sie wiederum eine Woche verbrachten, für die restliche Studiendauer an einen externen Schäfereibetrieb abgegeben wurden. Dort wurden die Schafe entsprechend der üblichen Haltungsbedingungen des Schäfereibetriebes untergebracht. Die Umweltbedin-

gungen in den externen Stallungen, wie Temperatur, Luftfeuchte und Hell/Dunkel Rhythmus, unterlagen den natürlichen jahreszeitlichen Schwankungen.

Verwendet worden sind in dieser Studie ausgewachsene weibliche Schafe. Diese Tiere waren ca. ein Jahr alt und ungefähr 50 - 55 kg schwer. Es handelte sich hierbei nicht um eigens für Tierversuche gezüchtete Tiere. Anwendung in dieser Untersuchung fand das sog. Hausschaf (*Ovis aries*), welches von den eurasischen Unterarten des Mufflons abstammt.

### **3.1.3. Geräte**

Alle im Laufe der Versuchsreihe verwendeten Geräte sind auf der folgenden Seite in Tabelle 4 aufgelistet.

Tabelle 4: Versuchsgeräte und Zubehör

| Bezeichnung                             | Bestellnummer                   | Firma                               |
|-----------------------------------------|---------------------------------|-------------------------------------|
| Pipetten                                |                                 | Eppendorf, Hamburg                  |
| Rollrandgefäße, 80x30mm                 | 47413                           | Scherf Präzision GmbH, USA          |
| Rollrandgefäße, 50x30mm                 | 47411                           | Scherf Präzision GmbH, USA          |
| Mikroradiografieplatten                 | High Resolution UF Plate 206K1A | Microcrome Technology, San Jose USA |
| Röntgen-Entwickler-Konzentrat           | 00011                           | Adefo-Chemie, Nürnberg              |
| Röntgen-Fixier-Konzentrat               | 00064                           | Adefo-Chemie, Nürnberg              |
| Röntgengerät                            | Super S 100                     | Philips                             |
| Röntgenfilme                            |                                 | Kodak/Agfa                          |
| Objektträger 50x100x1,5                 | 4151                            | Exakt Apparatebau, Norderstedt      |
| Fixationskleber Technovit 7230 VLC      | 5130                            | Kulzer-Exakt, Norderstedt           |
| Präzisionskleber Technovit 7210 VLC     | 5110                            | Kulzer-Exakt, Norderstedt           |
| Band-Trennschleifsystem Macro Exakt 310 | 3602                            | Exakt Apparatebau, Norderstedt      |
| Trennband 0,1mm/D64/Makro               | 3441                            | Exakt Apparatebau, Norderstedt      |
| Trennband 0,2mm/D64/Makro               | 3445                            | Exakt Apparatebau, Norderstedt      |
| Trennband 0,3mm/D126/Makro              | 3461                            | Exakt Apparatebau, Norderstedt      |
| Mikrometermessschraube                  | 4220                            | PSI, Laudenbach                     |
| Vacuum-Klebpresse                       | 4210                            | Exakt Apparatebau, Norderstedt      |
| Präzisionsschleifgerät                  |                                 | Exakt Apparatebau, Norderstedt      |
| Schleifpapier K800                      |                                 | PSI, Laudenbach                     |
| Schleifpapier K1200                     |                                 | PSI, Laudenbach                     |
| Schleifpapier K2400                     |                                 | PSI, Laudenbach                     |
| Schleifpapier K4000                     |                                 | PSI, Laudenbach                     |
| Kühlschrank                             |                                 | Bosch, Köln                         |
| Eisschrank -20°C                        |                                 | Bosch, Köln                         |
| Eisschrank -80°C                        |                                 | Forma, Majetta, USA                 |
| Wärmeschrank                            |                                 | Heraeus                             |
| Waage                                   |                                 | Sartorius, Köln                     |
| Magnetrührer                            | MR 3001                         | Heidolph                            |
| Foto-Makroskop                          | M 400                           | Wild-Mikroskope                     |
| Fotoautomat                             | MPS 55                          | Wild/Leitz                          |
| Makroskoplampe                          | MTR 27                          | Wild/Leitz                          |
| Film Ektachrome                         | 400                             | Kodak, New York, USA                |
| Bildanalyseystem                        | Quantimed 600                   | Leica, Benzheim                     |
| Trimmer                                 |                                 |                                     |
| Einbettungsgefäße                       |                                 |                                     |
| PH-Meter                                | 766 Calimatic                   | Knicks, Berlin                      |
| Vakuumpumpe                             |                                 | Laboport, Köln                      |
| Exsikator                               |                                 |                                     |
| Folienschweißgerät                      | Type 381 B                      | Krups, Solingen                     |
| Sterilfilter                            |                                 |                                     |
| Röntgen-Entwicklungsmaschine            |                                 | Agfa                                |
| Narkosegerät                            | 11263                           | Dräger                              |
| Faxitron-Tischröntgengerät              |                                 | Hewlett-Packard, USA                |
| OP-Abdeckung                            |                                 | Johnson/Johnson Medical             |
| Nahtmaterial Vicryl Stärke 2            |                                 | Ethicon Norderstedt/Germany         |
| Nahtmaterial Vicryl Stärke 0            |                                 | Ethicon Norderstedt/Germany         |
| Nahtmaterial Ethylen Stärke 2/0         |                                 | Ethicon Norderstedt/Germany         |
| Knochenwachs                            |                                 | Ethicon Norderstedt/Germany         |
| Diamantfräse                            |                                 | Biomed, Merck KG Darmstadt          |

### 3.1.4. Farbstoffe, Chemikalien und Medikamente

#### Farbstoffe

Tabelle 5: Farbstoffe zur Fluoreszenzmarkierung der Versuchstiere

| Bezeichnung/Herstellung                                                                                                                                                                                                                                 | Bestellnummer                                       | Firma                                                                                    |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------|
| Fluorochrome ansetzen:<br><br>Fluorochrome in entsprechender Menge mit Ausnahme des Tetracyclins in Aqua dest. lösen, unter Rühren pH mit NaOH auf 7,2 einstellen und lichtgeschützt lagern. Vor der Injektion die Flourochromlösung steril filtrieren. |                                                     |                                                                                          |
| <b>Flourochrome:</b><br>Calceingrün<br>Alizarin-Komplexon<br>Tetracyclin (Vibravenös SF)<br><br>Calceinblau<br>NaOH                                                                                                                                     | C-0875<br>A-3882<br>PZN-3547195<br>21040<br>1.06495 | Sigma, Steinheim<br>Sigma, Steinheim<br>Pfizer<br><br>Fluka, Neu-Ulm<br>Merck, Darmstadt |

## Chemikalien, Lösungen und Rezepte

Tabelle 6: Chemikalien zur Einbettung der Knochenblöcke

| Bezeichnung/Herstellung                                                                                                                                                                                                                                                                                 | Bestellnummer                            | Firma                                                                   |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------|
| <b>Formalin nach Lillie:</b><br>100 ml Formaldehyd 37% Lösung (filtriert) +<br>4g Natriumdihydrogenphosphat-Monohydrat (NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ·xH <sub>2</sub> O) +<br>6,5g Dinatriumhydrogen-phosphat (Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> )<br>ad 1000 ml Aqua dest.<br>PH auf 7,0 einstellen | 1.0399<br>720A168646<br>1.06586          | Merck, Darmstadt<br>Merck, Darmstadt<br>Merck, Darmstadt<br>RWTH Aachen |
| <b>MMA (rein):</b><br>Methylmetacrylat                                                                                                                                                                                                                                                                  | 1.12244                                  | Merck, Darmstadt                                                        |
| <b>MMA (Gemisch):</b><br>500 ml Methylmetacrylat +<br>3g α-Azisobutyronitril +<br>5 ml Dibutylphthalat +<br>Mischen und gekühlt aufbewahren                                                                                                                                                             | 1.12244<br>8.011595.0250<br>8.00910.1000 | Merck, Darmstadt<br>Merck, Darmstadt<br>Merck, Darmstadt                |
| <b>Toluidin-Blau Färbung:</b><br>1. Schliff mit 1:1 Gemisch 100% Alkohol/Azeton abwischen<br>2. 5 min in H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (30%) schwenken<br>3. mit Leitungswasser abspülen<br>4. 15 min mit Toluidin-Blau Lösung färben<br>5. mit Leitungswasser abspülen                                 | 1.08597.1000                             | Merck, Darmstadt                                                        |
| <b>Herstellen der Lösung:</b><br>Lösung A und B mischen und 2x filtrieren                                                                                                                                                                                                                               |                                          |                                                                         |
| <b>Lösung A:</b><br>800 ml Aqua dest. +<br>8g Na-Tetraborat +<br>8g Toluidin-Blau O<br>15 min mit Magnetrührer mischen                                                                                                                                                                                  | 1.06306<br>T3260                         | RWTH Aachen<br>Merck, Darmstadt<br>Sigma, Steinheim                     |
| <b>Lösung B:</b><br>200 ml Aqua dest. +<br>2g Pyronin G +<br>15 min mit Magnetrührer mischen                                                                                                                                                                                                            | 83200                                    | RWTH Aachen<br>Fluka, Neu-Ulm                                           |
| Alkohole                                                                                                                                                                                                                                                                                                |                                          | Hausapotheke RWTH Aachen                                                |
| Azeton                                                                                                                                                                                                                                                                                                  |                                          | Hausapotheke RWTH Aachen                                                |

## Medikamente

Tabelle 7: Verwendete Medikamente

| Medikament                          | Bestellnummer | Firma                   |
|-------------------------------------|---------------|-------------------------|
| Äther pro inhalationem              |               | Merck                   |
| Narcoren (Phenobarbital, 16g/100ml) | 9307          | Rhone Merieux, Laupheim |
| Ketamin (Ketaminhydrochlorid)       | 28185.00.00   | Sanofi-Ceva, Düsseldorf |
| Rompun 2% (Xylazinhydrochlorid)     | 826524        | Bayer, Leverkusen       |
| Ampi-Sleecol (Ampicillin)           | GB91327       | Albrecht, Aulendorf     |
| Halothan                            | P2116665      | Hoechst, Frankfurt      |
| KCL (Kaliumchloridlösung)           |               | Braun, Melsungen        |
| Atropinum sulfuricum solum 1%       | 88205         | WDT, Garbsen            |
| Dopram (Doxapramhydrochlorid)       | L009A/3/93    | Albrecht, Aulendorf     |
| Novaminsulfon                       | TU947077      | Albrecht, Aulendorf     |
| Ringer-Lactat-Lösung                |               | Braun, Melsungen        |
| Betaisodona (Polyvidon-Iod-Komplex) |               |                         |

## 3.2. Methoden

### 3.2.1. Operation

#### Präoperative Vorbereitung

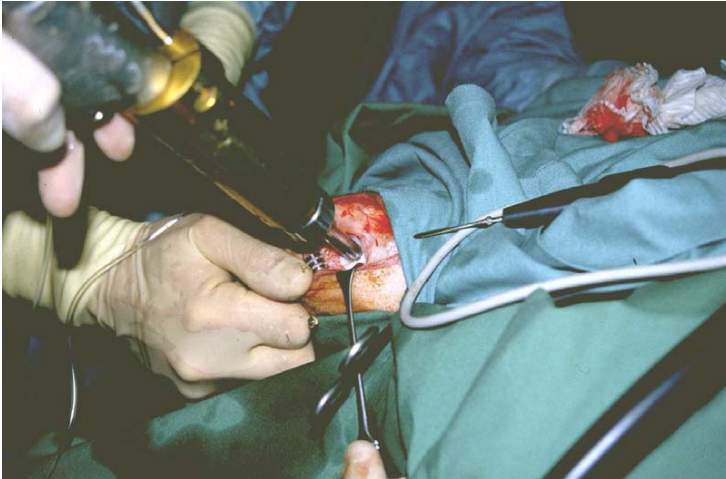
Am präoperativen Tag wurden die Schafe in Einzelhaltung ohne Einstreu in der tierexperimentellen Einrichtung des Universitäts-Klinikums der RWTH Aachen aufbewahrt. Die Defektsetzung erfolgt am rechten sowie linken Femur. Vor Beginn der Operation erhielten die Tiere eine perioperative Antibiotikaprophylaxe von 10 ml Ampicillin intramuskulär. Zusätzlich wurden präoperative Röntgenaufnahmen von beiden Oberschenkelknochen in zwei Ebenen angefertigt. Vor dem Einbringen einer Venenverweilkanüle in eine Ohrvene wurden die Tiere durch die intramuskuläre Injektion von 1 ml Atropin und 5 ml Rompun sediert. Nach dem Einsetzen der Sedation wurde dann die Venenverweilkanüle eingesetzt und es folgte die Injektion von 10 ml eines 1:1 Gemisches von Phenobarbital (Narcoren, 16g Phenobarbital/100 ml Lösung, Rhone Merieux, Laupheim) und Aqua pro injektionem. Danach erfolgte dann zügig die endotracheale Intubation mit 8,5 mm dicken, blockbaren Tuben, sowie das Legen der Magensonden als Aspirationsprophylaxe. Es erfolgte eine ständige Kontrolle der Atmung und falls notwendig, wurde eine assistierte Beatmung mit dem Beatmungsbeutel durchgeführt. Nach dem Transport in den OP-Saal wurden die Tiere an Narkose- und Beatmungsgerät angeschlossen. Die Narkose wurde mit einem Lachgas/Sauerstoff Gemisch und dem Zusatz von 4% Halothan an der Atemluft durchgeführt.

Nach kurzer Zeit wurde der Anteil des Halothans auf 0,8 % reduziert. Die Atemfrequenz betrug 18 Atemzüge pro Minute, das Atemzugvolumen 500 ml. Zusätzlich wurden die Tiere zur ständigen Kontrolle des Pulses, sowie der Sauerstoffsättigung an ein Pulsoxymeter angeschlossen. Desweiteren erfolgte eine ständige Kontrolle der Vitalfunktionen und der Narkosetiefe. Zur Volumensubstitution wurde den Tieren 500 ml NaCl infundiert.

## **OP**

Die Hinterläufe wurden rasiert und mit Betaisodona-Lösung gründlich gewaschen. Eine Lagerung und Fixierung der Schafe erfolgte entsprechend der Defektsetzung in Rückenlage auf dem OP-Tisch. Anschließend wurden die Knie beider Hinterläufe mit Braunoderm desinfiziert und steril abgedeckt. Das weitere Vorgehen fand unter streng sterilen Bedingungen statt. Hautschnitt an der medialen Seite zwischen Patella und Femurkondylus. Als nächstes darstellen des lateralen Patellarandes und scharfes Durchtrennen des subkutanen Bindegewebes, der Sehnenansätze und der Gelenkkapsel. Als nächstes Medialisierung der Patella und Darstellung des Patellagleitlagers. Mit der Diamant-Hohlfräse wurde nun ein 1 cm tiefer Defekt in die distale Femurepiphyse gefräst, wobei der Defekt ca. 2 cm vom Kreuzbandansatz in ventro-cranialer Richtung entfernt war, sich also in einem nicht belasteten Teil der Gelenkfläche befand. Der Knochenzylinder wurde nun mit einem Extraktor aus dem Defekt entfernt (siehe Abbildung 5 und Abbildung 6).

**Abbildung 5: Defektbohrung mit Diamant-Hohlfräse**

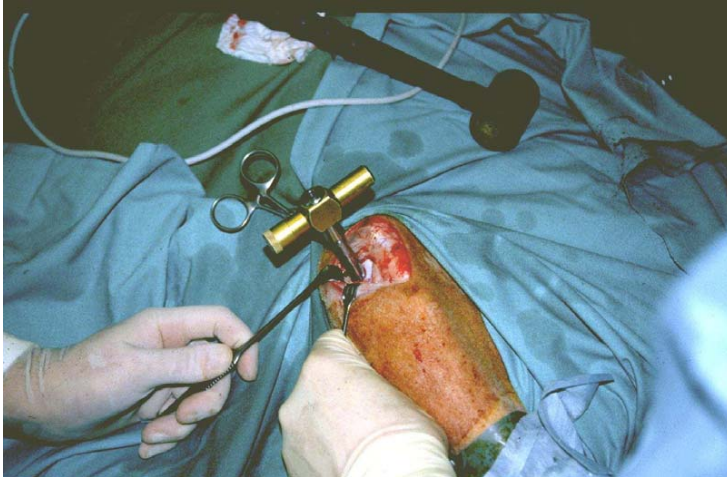


Dieser Defekt wurde nun mit Hyaluronsäure, Hyaluronsäure + BMP2, oder Hyaluronsäure + bFGF aufgefüllt (siehe Kap. 3.1.1). Zusätzlich wurden in einer Kontrollgruppe die Defekte als Leerdefekte belassen oder mit Spongiosaspänen aufgefüllt. Der entnommene Knochenzylinder diente hierbei als Ausgang für die Gewinnung der autologen Spongiosa. Der Knochenzylinder wurde zunächst in einer sterilen Schale mit Kochsalzlösung aufbewahrt. Die Spongiosaspäne wurden dann mittels einer Zange von dem Zylinder abgetrennt, in den Defekt gefüllt und anschließend unter manueller Kompression verdichtet. Bei der Leerdefektgruppe wurden lediglich die Leerdefekte trepaniert und der Defekt mit steriler NaCl-Lösung gespült.

Nach der Defektauffüllung wurde der Defekt in allen Gruppen mit Knochenwachs verschlossen. Anschließend ausgiebige Spülung des Gelenkinnenraumes und Reposition der Patella. Danach wurde die Gelenkkapsel, das subkutane Bindegewebe und die Haut schichtweise mit Einzelknopfnähten verschlossen. Zum Abschluss wurde ein Sprühverband aufgebracht und die Naht mit einer sterilen Kompresse abgedeckt. Die Kompressen wurden im Hautniveau mit Nähten fixiert. Anschließend erfolgte die Operation der anderen Seite in analoger Weise.

Insgesamt wurden in unserem Projekt 25 Schafe operiert, die in fünf Gruppen (siehe Tabelle 8) unterteilt wurden.

**Abbildung 6: Defektentnahme mittels Extraktor**



Bei den ersten 10 Tieren wurde der Defekt am linken Femur mit einer Spongiosaplastik (Gruppe 1) aufgefüllt und an der rechten Seite als vergleichbare Kontrollgruppe ein Leerdefekt (Gruppe 2) hinterlassen.

Die anderen 15 Schafe wurden in die Gruppen 3-5 unterteilt:

- Gruppe 3: Hyaluronsäure
- Gruppe 4: Hyaluronsäure + BMP2
- Gruppe 5: Hyaluronsäure + bFGF

**Tabelle 8: Einteilung der Versuchsgruppen**

| <b>Defektfüllung</b>           | <b>Einheilungszeit</b> | <b>Anzahl</b> |
|--------------------------------|------------------------|---------------|
| Gruppe 1: Spongiosaplastik     | 3 Monate               | 10            |
| Gruppe 2: Leerdefekt           | 3 Monate               | 10            |
| Gruppe 3: Hyaluronsäure        | 3 Monate               | 10            |
| Gruppe 4: Hyaluronsäure + BMP2 | 3 Monate               | 10            |
| Gruppe 5: Hyaluronsäure + bFGF | 3 Monate               | 10            |
| <b>Gesamtanzahl</b>            |                        | <b>50</b>     |

In Gruppe 3 wurden 10 gesetzte Defekte mit 1 cm<sup>3</sup> Hyaluronsäure ausgefüllt. Um ein Herauslaufen der Hyaluronsäure aus dem Defekt zu verhindern, wurde die Hyaluronsäure zwei Tage vor OP-Beginn bei etwa 4°C im Kühlschrank gelagert, womit eine Viskositäts-erhöhung der Säure erreicht wurde. Abgeschlossen wurde der Defekt wie bei allen anderen Gruppen mit Knochenwachs. Bei der 4. Gruppe wurden 10 gesetzte Defekte am Femur mit einer Kombination aus in Hyaluronsäure gelöstem BMP2 in einer Konzentration von 100 µg BMP2/cm<sup>3</sup> aufgefüllt und in der 5. Gruppe wurden 10 Defekte mit der Kombination aus in Hyaluronsäure gelöstem bFGF in einer Konzentration von 100 µg bFGF/cm<sup>3</sup> aufgefüllt. Direkt postoperativ erfolgten radiologische Aufnahmen zur Lagekontrolle des Bohrloches.

### **3.2.2. Postoperative Versorgung**

Am OP-Tag wurden die Tiere isoliert, unter Nahrungskarenz, in den Ställen der tiermedizinischen Abteilung des Universitätsklinikums der RWTH Aachen gehalten. Nach dem ersten postoperativen Tag wurden die Tiere für eine Woche im Großtierstall gehalten und veterinärmedizinisch betreut. Die Tiere erhielten die ersten fünf postoperativen Tage eine tägliche Antibiotikaprophylaxe mit 5ml Ampicillin i.m.. Am 7. postoperativen Tag wurden die Tupfer entfernt und die Wunden bzw. die Nähte im Hinblick auf Entzündungen oder Heilungsverlauf begutachtet. Da die Tiere in der ersten postoperativen Woche mäßigen Schmerzen ausgesetzt waren, konnte eine Linderung durch eine entsprechende Schmerz-

therapie erzielt werden. Die postoperative Schmerztherapie erfolgte nach Rücksprache mit dem Tierarzt mit Novalgin (3x tgl. 6 ml Novaminsulfon) über insgesamt fünf Tage. Im Rahmen dieser Injektionen wurden die Tiere regelmäßig körperlich untersucht. Nach ca. 10 beschwerdefreien Tagen wurden die Tiere dem Schäfer übergeben und dort unter weiterer veterinärmedizinischer Kontrolle mit der Herde auf der Weide gehalten. Um die Knochenneubildung zeitlich einordnen zu können, wurde eine polychrome Fluoreszenzmarkierung durchgeführt (siehe Kap. 3.2.3). Die Markierungen erfolgten als subkutane Injektionen in die Achseln der Vorderläufe der Tiere. Postoperativ, nach sieben Wochen und nach 3 Monaten wurden die Hinterläufe erneut geröntgt, um zu sehen, inwieweit der Bohrlochdefekt bereits mit neuem Knochenmaterial verschlossen war (siehe Abbildung 18 und Abbildung 19 im Anhang, Kap.8). Die radiologischen Kontrollen wurden unter einer Sedierung der Tiere mit 1 ml Atropin und 5 ml Rompun durchgeführt. Die Röntgenuntersuchungen am Versuchsende wurden post mortem durchgeführt. Die Tötung und Exartikulation der Hinterläufe erfolgte nach 12 Wochen.

### **3.2.3. Polychrome Fluoreszenzmarkierung**

Nach Beendigung der Operation erfolgten zusätzlich zu den radiologischen Kontrollen der Femurenden polychrome Fluoreszenzmarkierungen der Tiere. Die verabreichten Farbstoffe markierten den nach dem Zeitpunkt der Injektion neugebildeten Knochen. In der Auswertung unter dem Fluoreszenzmikroskop (siehe Kap. 3.1.3), konnte später, nach der Aufbereitung der Knochendefekte, genau analysiert werden, zu welchem Zeitpunkt nach der OP neuer Knochen gebildet wurde.

Die polychrome Fluoreszenzmarkierung wurde nach folgendem Schema durchgeführt:

- Gabe von Calceingrün (10 mg/kg KG) nach einer Woche
- Gabe von Tetracyclin (30 mg/kg KG) nach 4 Wochen
- Gabe von Alizarinkomplex (Alizarin-Rot) (12 mg/kg KG) nach 7 Wochen
- Gabe von Calceinblau (30 mg/kg KG) nach 10 Wochen

Die Gabe der Fluorochrome erfolgte subkutan, falls notwendig unter Sedation der Tiere mit Rompun (0,3 ml/Tier, i.m, auf 2 ml NaCl). Die oben angegebenen Zeitpunkte beziehen sich auf den Tag der Operation.

### **3.2.4. Tötung und Exartikulierung der Hinterläufe**

Drei Monate nach erfolgter Operation wurden die Tiere vom Schäfer zur Einschläferung ins tiermedizinische Institut des Klinikums zurücktransportiert. Zuerst erfolgte zur Beruhigung der Tiere eine Prämedikation mit 6 ml Rompun/Tier. Nach Legen eines intravenösen Zuganges in die Ohrvene wurden den Tieren 20 ml eines 1:1 Gemisches von Phenobarbital (Narcoren) mit einer Konzentration von 16g Phenobarbital/100 ml Fertiglösung und Aqua pro injektionem injiziert. Zusätzlich wurde den Tieren mindestens 100 mval KCl gespritzt. Das Auftreten von Herzrhythmusstörungen und der darauf folgende Herzstillstand wurden auskultatorisch festgestellt.

Nach der Freipräparation der Defektstelle konnte der Defekt als Knochenblock (ca. 1,5-2 cm großer Würfel) aus den Oberschenkelknochen der Tiere mit einer oszillierenden Säge herausgesägt werden. Die Tierkadaver wurden im Anschluss von Tierärzten auf mögliche Infektionen oder Krankheiten nachuntersucht.

### **3.2.5. Computertomographie der Knochenblöcke**

Der Knochenblock sollte natürlich den kompletten Defektausschnitt enthalten und als Sicherheitsabstand mit ausreichend altem Knochenmaterial umgeben sein. Um diese Bedingungen zu kontrollieren, wurden CT-Bilder (siehe Kap. 8, Abbildung 20) von den einzelnen Knochenblöcken angefertigt. Die Aufnahmen wurden mit einem Philips Tomoscan AV, einem Einzeldetektor Spiral-CT, angefertigt, mit dem eine hochauflösende Einzelschichtuntersuchung in Schichtkollimation angefertigt werden konnte. Die Präparate wurden im Knochenfenster betrachtet. Das CT wurde auf eine Röhrenspannung von 120KV und 200mA bei einer Belichtungszeit von 2,0s eingestellt. Nach Abschluß der Untersuchung wurde versucht, sekundäre multiplanare Rekonstruktionen darzustellen. Die Ergebnisse des CT wurden deskriptiv ausgewertet.

### **3.2.6. Fixation und Aufbereitung der Knochenproben**

Nach der Gewinnung der Knochenblöcke wurden die Blöcke in einzelnen durchnummerierten Kunststoffbehältern aufbewahrt. Die Becher mit den Präparaten wurden mit Formalin aufgefüllt und mit Deckeln luftdicht verschlossen. Als nächstes wurden die Proben für eine Woche im Kühlschrank (4°C) gelagert. In dieser Zeit wurde das Formalin täglich ausgewechselt. Zur Fixation wurde neutral gepuffertes Formol nach Lillie (Rezept siehe

Kap. 3.1.4) verwendet. In diesem weitverbreiteten Rezept wird ein Phosphatpuffer mit Formol zu einer 1:10 verdünnten etwa 3,5 %igen Formollösung gemischt. Im nächsten Arbeitsgang wurde durch eine zweitägige ununterbrochene Wässerung der Proben die Fixierflüssigkeit (Formol) ausgewaschen. Im Anschluss daran mussten die Knochenblöcke entwässert werden, weil sie später in ein nicht mit Wasser mischbares Einbettmedium übertragen werden sollten. Um dabei ein Zerreißen und Schrumpfen der Proben zu vermeiden, sollte die Entwässerung stufenweise erfolgen. In unserem Fall wurden die Blöcke in folgender Alkoholreihe schrittweise entwässert: 70-80-90-96-100% iger Alkohol.

Die Proben wurden in jeder dieser Alkoholstufen fünf Tage lang in den bereits verwendeten Kunststoffbehältern bei 4°C im Kühlschrank gelagert. Täglich fand ein Austausch von altem Alkohol gegen neuen statt. Zum Abschluss der Alkoholreihe wurden die Knochenstücke für 48 Std. in einem Gemisch aus 100 % igem Alkohol und Azeton (50:50) im Kühlschrank gelagert. Den Abschluss der Entwässerung bildete eine erneute fünftägige Lagerung in 100 % igem Alkohol, der wiederum täglich erneuert wurde.

Nach der Entwässerung der Präparate wurden nun folgende Schritte zur Einbettung der Proben beschrieben. Im ersten Einbettungsschritt wurden die Knochen für eine Woche in ihren Gefäßen mit Polymethylmetacrylat (MMA) (siehe Kap. 3.1.4) übergossen und für weitere fünf Tage im Kühlschrank gelagert. Im zweiten Schritt wurde das reine MMA gegen ein MMA-Gemisch (siehe Kap. 3.1.4) ausgetauscht und die Aufbewahrung bei 4°C fortgeführt (5 Tage). Nach diesen fünf Tagen erfolgte die eigentliche Einbettung der Knochenblöcke. Um eine ebene Auflagefläche für die Präparate zu erhalten, haben wir bereits während der Entwässerung der Präparate durch die Alkoholreihe eine etwa 1 cm hohe Schicht aus Polymethylmetacrylat in neuen luftdicht abschließbaren Glasgefäßen vorpolymerisiert. In diese bereits vorbereiteten Gefäße konnten nun die Proben mit der geplanten Schnittfläche nach unten gelegt und mit genügend MMA Einbettungsmedium überschichtet werden. Eine ausreichende Überschichtung von mindestens 1cm war erforderlich, um nach der unvermeidbaren Schrumpfung während der Polymerisation (13-15 %) einen ausreichenden Überstand für die Halterung im Schneidegerät zu haben und ein Entblößen der Knochen zu vermeiden. Der Polymerisationsvorgang der vorpräparierten Glasbehälter erfolgte nach demselben Prinzip wie die eigentliche Einbettung der Proben. Zum Abschluss erfolgte ein luftdichter Verschluss der Gefäße, der ein Verdampfen des

Mediums verhindern und eine ungestörte Polymerisation gewährleisten sollte. Im letzten Schritt wurden die Glasgefäße im auf 37°C erwärmten Wasserbad für mehrere Tage bei konstant 37°C im Brutschrank aufbewahrt. In der Regel war die vollständige Aushärtung nach max. 7-8 Tagen erfolgt. Fertig ausgehärtete Präparate konnten nach Zerschlagung der Glasgefäße gewonnen werden. Der nächste Arbeitsschritt bestand darin, die polymerisierten Knochenblöcke auf eine Größe zu trimmen, die ein Aufkleben auf spezielle Objektträger ermöglichte. Die Kunststoffblöcke wurden mit einem Trimmer in eine quaderähnliche Form mit planen Seiten überführt. Die Quader waren so groß, dass der Knochen von allen Seiten mit einer etwa 1mm dicken Kunststoffschicht (Einbettungsmedium) überzogen war. Als nächstes erfolgte das Aufkleben der Blöcke mit Fixationskleber auf vorher gereinigte Objektträger. Zur Bestimmung der „Nullebene“ wurde ein erster Schnitt getätigt, der genau die Ebene des Defektbeginns kennzeichnete. Von dieser sog. „Nullebene“ wurden Schnitte mit einer Dicke von 100-120 µm angefertigt. Zum Schneiden der eingebetteten Knochenpräparate wurde eine spezielle Säge mit dafür geeigneten Sägeblättern (siehe Kap. 3.1.3) verwendet. Insgesamt wurden so viele Schnitte angefertigt, bis das Ende des Defektes erreicht war. In der Regel konnten aus einem Knochenblock sieben Schnitte gewonnen werden. Jeder einzelne Schnitt wurde am Schleifgerät mit Schleifpapier (Stärke 2400) angeschliffen und dann auf den vorbereiteten Objektträger mit Präzisionskleber aufgeklebt (siehe Kap. 3.1.3). Um das Aushärten sowohl des Fixationsklebers, als auch des Präzisionsklebers zu ermöglichen, wurden die Blöcke bzw. Schnitte für acht Minuten unter eine UV-Lampe gelegt. Im nun folgenden Arbeitsschritt wurden alle Schnitte an der Schleifmaschine auf eine Dicke zwischen 70-100µm mit Papier der Stärke 800 (s. Tab. Geräte) heruntergeschliffen. Zum Abschluss wurden die Schnitte poliert (2 Min. mit Papier der Stärke 2400 und danach Feinpolitur 3 Min. mit Papier der Stärke 4000) und noch einmal vermessen. Als nächstes konnten die Fluoreszenzphotografien von jedem einzelnen Schnitt angefertigt werden (siehe hierzu Kapitel 3.2.7). Zur Vorbereitung für die Färbungen und die mikroradiografischen Aufnahmen mussten die Schnitte noch einmal auf eine Dicke von ungefähr 30 µm heruntergeschliffen und poliert werden.

### **3.2.7. Histologie und Histomorphometrie**

Zur Vorbereitung auf die histomorphometrische Auswertung wurde aus der Kontrollgruppe (Spongiosaplastik/ Leerdefekt) jeweils ein Schnitt pro Präparat ausgewählt (s. Kap. 4.2.1).

Dieser Schnitt wurde wie bereits beschrieben auf eine Dicke von 30 µm heruntergeschliffen und poliert. Von jedem Präparat wurde die qualitativ beste Schnittebene ausgewählt und vermessen. Als nächstes wurden die Schnitte mit Toluidin-Blau (siehe Kap. 3.1.4) angefärbt und mit einem histomorphometrischen Analysesystem ausgewertet. Die Defektgröße und der neu eingewachsene Knochenanteil sind in der Auswertung als dimensionslos zu betrachten. Der Grund liegt im Analysegerät (Quantimed 600S), das mit seinem angeschlossenen Mikroskop aufgrund seiner Vergrößerung die tatsächlichen Defektdurchmesser (Ausgangswert 9,4 mm) verfälscht. In der Auswertung ist deshalb das Verhältnis von neu eingewachsenem Knochen bezogen auf die Defektgröße nur in Relation zu betrachten. Der Anteil von neu eingewachsenem Knochen wurde somit prozentual ermittelt. Das verwendete Gerät (Quantimed 600) bietet die Möglichkeit ein histologisches Präparat mit einem Mikroskop zu betrachten und den gewählten Bildausschnitt auf einem Bildschirm darzustellen. Aufgrund der Größe des Schafsdefektes konnten die Präparate nicht direkt mit dem an das Bildanalysesystem angeschlossenen Mikroskop betrachtet werden. Die Abmessung des Schafsdefektes machte es notwendig, die Präparate mit einem Mikroskop mit geringerer Vergrößerung abzufotografieren und in einen Computer einzuscannen. Die Bilddatei, unter der das Bild dann abgespeichert wurde, konnte dann mit einem Computer, mit welchem auch die histomorphometrische Untersuchung durchgeführt wurde, wieder aufgerufen werden und als Datei in dem Bildanalysesystem geöffnet werden. Durch diese Vorarbeit war es möglich, den Defekt, statt nur zu einem Viertel, komplett abzubilden und zu analysieren.

### **3.2.8. Fluoreszenz-Fotografien**

Nachdem pro Präparat in der Regel sieben Schnitte mit einer Dicke von ungefähr 100µm angefertigt wurden, konnten diese Schnitte unter dem Fluoreszenzmikroskop (siehe Kap. 3.1.3) abfotografiert werden. In diesem Arbeitsschritt wurden die subkutan verabreichten Farbstoffe als sogenannte Sekundärfluoreszenzen im Mikroskop wahrgenommen. Die Fluorochrome markierten neu entstandenes Knochenmaterial, so dass eine gezielte Markierung und Auswertung von neuem Knochen möglich war. Aufgrund ihrer hohen Empfindlichkeit wird die Fluoreszenzmikroskopie heute v.a. im Rahmen vielfältiger histochemischer Untersuchungen eingesetzt. Als Lichtquelle werden im Fluoreszenzmikroskop Quecksilberdampflampen verwendet, die für eine Anregungsstrahlung in ausreichender

Intensität und Wellenlänge sorgen. Ein Erregerfilter filtert aus dem Lampenlicht den Wellenlängenbereich heraus, mit dem das Objekt optimal zur Fluoreszenz angeregt wird, wohingegen die anderen Wellenlängenbereiche zurückgehalten werden. Schließlich wird vor dem Okular noch ein Sperrfilter benötigt. Dieser unterdrückt überschüssiges Erregerlicht und lässt nur das längerwelligere Fluoreszenzlicht hindurch.

Zuerst wurden von jedem einzelnen Schnitt sogenannte Übersichtsaufnahmen angefertigt. Diese Aufnahmen wurden bei 16 facher Vergrößerung gemacht. Da der Defekt bei dieser Vergrößerung nicht als Ganzes erfaßt werden konnte, wurde die Übersichtsaufnahme als Fotografie der oberen bzw. der unteren Hälfte des Defektes erstellt. Bei auffälligen Bezirken dieser Aufnahmen, d.h., wenn aufgrund der Fluoreszenzbanden neues Knochenwachstum vermutet werden konnte, wurden Aufnahmen dieser Bereiche bei stärkeren Vergrößerungen (50fach, 100fach oder 200fach) angefertigt.

### **3.2.9. Mikroradiografien**

Nach Abschluß der Fluoreszenzfotografien haben wir in unserem Projekt aus jeder der Gruppen 3-5 (Ha/Ha+BMP2/Ha+bFGF) eine Übersichtsaufnahme herausgegriffen. Diese Aufnahme setzt sich, wie bereits beschrieben, aus zwei Fotografien zusammen, die die beiden Hälften des Defektes eines Schnittpräparates erfassen (siehe Kap. 3.2.8). Bei den hier ausgewählten Präparaten sollte es sich um Schnitte handeln, bei denen die Fluoreszenzbanden deutlich und scharf erkennbar, die Defektgrenzen gut abgrenzbar waren, und wo es möglicherweise zur Bildung neuer Knochenstrukturen gekommen war. Ziel dieser Aufnahmen war es, das Einwachsen von neuem Knochenmaterial im Defekt eindeutig ausfindig zu machen. Aus jeder der Gruppen 3-5 wurde eine Kontaktmikroradiografie erstellt (siehe Tabelle 8).

Für die Aufnahmen wurden spezielle mit einer Fotoemulsion beschichtete Glasplatten verwendet. Auf diese Platten wurden die Präparate mit der zu untersuchenden Präparate-seite aufgelegt. Der Objektträger zeigte nun nach oben, also in Richtung der Strahlenquelle, und die zu untersuchende Fläche zeigte in die entgegengesetzte Richtung, in Richtung der Fotoplatte. Das Präparat und die Fotobeschichtung der Glasplatte hatten bei dieser Untersuchung direkten Kontakt, so daß es zu keinen Beeinflussungen, im Sinne von z.B. Verzerrungen durch divergierende Strahlen kam. Im Rahmen der durchgeführten Untersu-

chungen wurde eine Röhrenspannung von 65kV angelegt. Die Belichtungszeit betrug 15 Minuten. Bei diesen Einstellungen zeigte sich eine gute Detailschärfe der Präparate. Nach Abschluß der Aufnahmen wurden die Fotoplatten durch Verwendung einer speziellen Entwickler- und Fixierlösung nach den Herstellerangaben weiterverarbeitet. Die gewonnenen Aufnahmen wurden dann unter dem Mikroskop betrachtet und fotodokumentiert. Die Bewertung der Aufnahmen erfolgte ausschließlich deskriptiv.

## **4. Ergebnisse**

### **4.1. Operationsverlauf und in vivo Befunde**

Die Operationen konnten wie beschrieben durchgeführt werden. Die Defektzylinder konnten mit dem verwendeten OP-Instrumentarium gut entnommen werden. Die Auffüllung der Knochendefekte mit den Composites (Hyaluronsäure+BMP2, Hyaluronsäure+bFGF) sowie der Hyaluronsäure und der Spongiosa war unproblematisch. Der intraoperative Verlauf war komplikationslos. Schon einige Stunden nach der Operation konnten die Tiere wieder selbständig aufstehen. Die volle Beweglichkeit der Hinterläufe war jedoch erst nach einigen Tagen wieder vorhanden. Ein Tier aus der Leerdefekt-Gruppe erlitt durch ein Verutschen des Tubus in der Aufwachphase eine fragliche Aspiration von Mageninhalt. Im weiteren Verlauf ergaben sich jedoch keine Probleme. Einem Schaf musste wegen postoperativer Atemdepression ein Atemstimulans (Dopram) verabreicht werden. Bei insgesamt sieben Tieren aus den ersten beiden Gruppen (Leerdefekte, Spongiosaplastiken) kam es zu oberflächlichen Wundinfektionen, die jedoch von alleine ausheilten. Bei zwei Tieren aus den ersten beiden Gruppen und bei einem Tier aus der dritten Gruppe (Hyaluronsäure) kam es in der 3. bis 4. postoperativen Woche zu einer Kniegelenksschwellung. Diese Ergüsse wurden unter sterilen Bedingungen punktiert. Die Mikrobiologie ergab ein steriles Punktat. Im weiteren Verlauf waren die Schwellungen rückläufig und die Tiere objektiv beschwerdefrei. Ein Tier aus den ersten beiden Gruppen zog sich beim Transport zwei Tage vor der Tötung eine Sprunggelenksverletzung zu. Bis zu seiner Tötung wurde dem Schaf 2x8 ml Novaminsulfon injiziert. Ein Schaf aus der Hyaluronsäure-Gruppe erlitt nach der Injektion von Rompun und Calceingrün einen Kreislaufkollaps. Nach wenigen Minuten war es jedoch wieder kreislaufstabil. Es erhielt jedoch prophylaktisch Ampicillin und Acetylcystein wegen der Gefahr einer Aspirationspneumonie. Im weiteren Verlauf konnte sich dies nicht bestätigen. Der postoperative Verlauf der übrigen Schafe war unauffällig. Alle Tiere konnten in die Auswertung miteinbezogen werden.

## **4.2. Untersuchung des Knochendefektes**

### **4.2.1. Histomorphometrische Auswertung**

Wie bereits im Kapitel 3.2.6 beschrieben, wurde aus der Kontrollgruppe (Spongiosaplastik/Leerdekt), jeweils ein Schnitt pro Präparat ausgewählt. Um die Ergebnisse der histologischen Untersuchung quantifizieren zu können, wurde eine histomorphometrische Untersuchung mit dem Quantimed 600, einem halbautomatischen Bildanalysesystem, durchgeführt. Die Gruppen 3-5 (siehe Kap.3.2.1) sollten entsprechend der Kontrollgruppen aufgearbeitet werden. Da jedoch bereits auf den Fluoreszenzphotografien makroskopisch kein Einwachsen von neuem Knochen im Defekt zu sehen war, wurde nur exemplarisch aus jeder der drei Gruppen ein Schnitt ausgewählt (siehe Kap. 4.2.2). Von diesen wurde eine mikroradiografische Aufnahme erstellt und eine Toluidin-Blau Färbung angefertigt. Auch hier waren bereits makroskopisch eindeutige Schlüsse zu ziehen. Der Defekt hatte noch seine kreisrunde Ausgangsform und war komplett unausgefüllt. Die histomorphometrische Auswertung erübrigte sich bei diesen Gruppen.

Da die Auswertung der Gruppen 3-5 (Hyaluronsäure, Hyaluronsäure+BMP2, Hyaluronsäure+bFGF) kein Einwachsen von neuem Knochenmaterial ergab, machte es nur Sinn, die Kontrollgruppe, d.h. die Spongiosaplastiken (Gruppe 1) und die Leerdefekte (Gruppe 2), histomorphometrisch auszumessen (siehe Tabelle 9 und Tabelle 10).

Auswertung der Kontrollgruppen:

### Spongiosaplastiken (Gruppe 1)

Die folgende Tabelle 9 zeigt den Zuwachs von neuem Knochen und bereits implantiertem Knochen bezogen auf die ursprüngliche Defektgrösse.

Tabelle 9: Auswertung der Spongiosaplastiken

| Präparat <sup>1)</sup> | Defektgröße | Neuer Knochen | Anteil an neuem Knochen in % |
|------------------------|-------------|---------------|------------------------------|
| 1 I                    | 2,29        | 0,27          | 11,79                        |
| 2 I                    | 2,19        | 0,35          | 15,98                        |
| 3 I                    | 2,43        | 0,5           | 20,58                        |
| 4 I                    | 2,12        | 0,43          | 20,28                        |
| 5 I                    | 2,31        | 0,43          | 18,61                        |
| 6 I                    | 2,34        | 0,57          | 24,36                        |
| 7 I                    | 2,18        | 0,53          | 24,31                        |
| 8 I                    | 2,59        | 0,57          | 22,01                        |
| 9 I                    | 2,57        | 0,56          | 21,79                        |
| Gesamt                 |             |               | 19,97                        |

<sup>1)</sup> Präparatenummer, I = linker Femur

Bei den Spongiosaplastiken ist im Mittel ein Knochenzuwachs von  $19,97 \% \pm 3,81 \%$  zu verzeichnen, wobei der Messwert die Anteile von implantiertem Knochen und neu gebildetem Knochen zusammenfasst. Makroskopisch scheint der Defekt mit neuem Knochenmaterial durchbaut, wobei noch die ursprünglichen Defektgrenzen zu erahnen sind. Im Bildanhang (siehe Kap.8, Abb. 8) wird eine Spongiosaplastik als Toluidin-Blau Färbung aus der Kontrollgruppe demonstriert. Eine nahezu vollständige knöcherne Integration ist deutlich zu erkennen.

## Leerdefekte (Gruppe 2)

Die folgende Tabelle 10 stellt das Verhältnis von neuem Knochen bezogen auf die ursprüngliche Defektgröße dar.

Tabelle 10: Auswertung der Leerdefekte

| Präparat <sup>1)</sup> | Defektgröße | Neuer Knochen | Anteil an neuem Knochen in % |
|------------------------|-------------|---------------|------------------------------|
| 1 r                    | 1,93        | 0,07          | 3,63                         |
| 2 r                    | 2,06        | 0,08          | 3,88                         |
| 3 r                    | 2,18        | 0,11          | 5,04                         |
| 5 r                    | 2,25        | 0,08          | 3,56                         |
| 6 r                    | 1,97        | 0,09          | 4,57                         |
| 7 r                    | 2,24        | 0,18          | 8,04                         |
| 9 r                    | 2,26        | 0,16          | 7,08                         |
| Gesamt                 |             |               | 5,11                         |

<sup>1)</sup> Präparatenummer, r = rechter Femur

Bei den Leerdefekten ist im Mittel ein Knochenzuwachs von  $5,11 \% \pm 1,64\%$  zu verzeichnen. Im Bildanhang (siehe Kap. 8, Abb. 7) wird ein Leerdefekt als Toluidin-Blau Färbung aus der Kontrollgruppe demonstriert.

### 4.2.2. Auswertung der Fluoreszenz-Fotografien

Wie bereits in Kap. 3.2.3 beschrieben, wurden den Tieren postoperativ in bestimmten Abständen Farbstoffe subkutan injiziert. Ziel dieser Markierung sollte es sein, anhand neu gebildeter Fluoreszenzbanden im Defekt sowohl qualitativ, als auch quantitativ auf die Bildung von neuem Knochenmaterial zu schließen. Zusätzlich sollte es möglich sein, anhand der Abstände der verabreichten Farbstoffe, Zeitpunkte festzulegen, in denen der neue Knochen in den Defekt eingewachsen war.

Aus jeder Gruppe wird im Kapitel 8 ein kompletter Defektausschnitt als Fluoreszenz fotografie präsentiert. Zur Demonstration ist die 6. Schnittebene (ca. 7-8 mm Entfernung von der sog. Nullebene, siehe Kap. 3.2.5.) am besten geeignet. In dieser Ebene war bei allen Präparaten der Defekt mittig angeschnitten und klar abgrenzbar. In dieser Ebene war kein Knochenwachs mehr im Defekt auszumachen. In den tiefergelegenen Schnitten (7. Schnittebene und tiefer) war zumeist das Ende des gesetzten Defektes erreicht und somit keine klare Zuordnung zwischen altem Knochenmaterial und eigentlichem Defekt auszu-

machen. Im Bildanhang (siehe Kap. 8, Abbildung 9,10,11) sind die Fluoreszenzphotografien in der Übersichtsaufnahme aufgeführt. Die Übersichtsaufnahmen setzen sich aus oberer bzw. unterer Hälfte des Defektes zusammen und zeigen den kompletten Defekt bei 16-facher Vergrößerung. Die drei vorgestellten Fluoreszenzphotografien stehen stellvertretend für die Fotografien aller Versuchsgruppen.

In den Übersichtsaufnahmen ist makroskopisch der zentral gelegene Knochendefekt zu erkennen und die Defektgrenzen sind deutlich vom umgebenden alten Knochenmaterial abzugrenzen. Der Defekt hat noch seine ursprüngliche kreisrunde Form. Im Defekt selber sind keine Fluoreszenzbanden erkennbar. Der Durchmesser des Loches entspricht dem Durchmesser des gesetzten Bohrlochdefektes (Durchmesser 9,4mm). Aufgrund der makroskopisch eindeutigen Defektbeurteilung schien eine exakte histomorphometrische Auswertung nicht sinnvoll und nicht aussagekräftig zu sein. Es liegt nach wie vor ein komplett unausgefüllter Knochendefekt vor. Dies lässt den Schluss zu, dass es in dem Zeitraum zwischen Operation und Tötung der Tiere zu keinem Einwachsen von neuem Knochenmaterial gekommen ist.

#### **4.2.3. Auswertung der Mikroradiografien und Toluidin-Blau Färbungen**

Von den in Kapitel 4.2.2 verwendeten Präparaten sind Mikroradiografien und Toluidin-Blau Färbungen angefertigt worden. Sie zeigen den kompletten Defektausschnitt in der Übersicht (6,3-fache Vergrößerung). Es sind auch hier Schnittebenen aus tiefergelegenen Defektbereichen ausgewählt worden. Jede Aufnahme steht wiederum stellvertretend für eine der Versuchsreihen. Im Anhang (siehe Kap. 8, Abb. 12 bis 17) sind die Mikroradiografien bzw. Toluidin-Blau Färbungen in der Übersicht präsentiert. Auch hier zeigt sich kein neues Knochenmaterial. Wie schon bei den Fluoreszenzphotografien ist der ursprünglich gesetzte Defektbereich eindeutig zu identifizieren. Makroskopisch lässt sich mit ausreichender Sicherheit ein kreisrunder und leerer Bereich identifizieren. Eine histomorphometrische Vermessung würde hier keine anderen Ergebnisse liefern.

Zusammenfassend ist also auch hier keine Knochenneubildung zu verzeichnen.

#### **4.2.4. Röntgenuntersuchungen**

Im Verlauf der Studie wurden die Tiere insgesamt drei Röntgenuntersuchungen unterzogen. Die Aufnahmen wurden im Anschluß an die Operation, nach sieben Wochen und nach der Tötung der Tiere nach drei Monaten gemacht. Sie dienten der Beurteilung des Einwachsens von neuem Knochen und möglicher Anzeichen von Umgebungsreaktionen.

Bei der Analyse der postoperativen Röntgenbilder zeigte sich in allen Gruppen die korrekte Lage des Defektes im Bereich der distalen Femurepiphyse. In der Gruppe der Spongiosaplastiken zeigten sich die Defekte in einer Röntgendichte, welche vergleichbar mit der Dichte des umgebenden Knochens war. Die Betrachtung der späteren Röntgenbilder zeigte in der Gruppe der Leerdefekte keine deutlichen Unterschiede im Vergleich zu der postoperativen Röntgenuntersuchung, die mit der Spongiosaplastik gefüllten Defekte waren kaum noch vom umgebenden Knochen zu unterscheiden. Beim Vergleich der postoperativen Röntgenbilder der Gruppen 3-5 (Hyaluronsäure, Hyaluronsäure+BMP2 und Hyaluronsäure+bFGF) mit den späteren Aufnahmen waren ebenfalls keine größeren Unterschiede erkennbar (siehe Kap. 8, Abbildung 18,19). In allen Gruppen konnten sowohl postoperativ als auch später keine Hinweise auf größere Umgebungsreaktionen gefunden werden.

## 5. Diskussion

Es ist bisher nicht gelungen, eine Substanz bzw. ein Materialgemisch zu entwickeln, dass nach der Implantation in den menschlichen Körper eine dem autogenen Knochentransplantat auch nur ähnliche Aktivität entfalten kann. Bis heute stellt die autologe Spongiosaplastik den Goldstandard für Knochenersatzstoffe dar, so daß sich jeder neu entwickelte und untersuchte Knochenersatzstoff an diesem Standard messen lassen muß. Bis zu diesem Zeitpunkt ist es noch nicht gelungen, einen sogenannten „idealen Knochenersatzstoff“ zu entwickeln, der regelmäßige Verwendung bei orthopädischen oder unfallchirurgischen Operationen findet und die bisher als Goldstandard geltende Spongiosaplastik ersetzen oder ergänzen kann. Die Ursachen dafür, dass dieser Knochenersatzstoff, geschweige denn das angestrebte Ziel der Beschleunigung der Knochenheilung nicht erreicht werden konnten, sind vielfältig. Ein idealer Knochenersatzstoff sollte folgende Anforderungen erfüllen können:

- biokompatibel
- osteokonduktiv
- osteoinduktiv, bzw. zumindest osteostimulativ
- resorbierbar/biodegradabel
- sterilisierbar
- in ausreichender Menge verfügbar
- biomechanisch belastbar

Zurzeit gibt es noch kein allseits akzeptiertes Tierversuchsmodell. Trotzdem setzt sich langsam die Erkenntnis durch, dass Substanzen für den Knochenersatz in standardisierten Versuchsanordnungen überprüft werden sollten. Dazu muss definiert werden, welche Spezies, Alter und Geschlecht der Versuchstiere am besten geeignet wären (Rueger et al. (1996)). Das in unserem Projekt verwendete Tiermodell ist bereits 1993 von Schnettler erfolgreich eingesetzt worden. In unserem Projekt wurden ausgewachsene (ein Jahr alte), weibliche Schafe als Versuchstiere ausgewählt. Auch wenn der Knochenstoffwechsel des

Schafes im Vergleich zum Menschen beschleunigt ist, lässt das Schafsmodell aufgrund der ähnlichen Knochenstruktur und einem somit vergleichbaren Knochenstoffwechsel eine Übertragung auf den Menschen zu.

Grundvoraussetzung bei der Untersuchung von Knochendefekten am Tiermodell ist ein Defekt sogenannter kritischer Größe. Darunter versteht man, daß es sich hierbei um einen Defekt handelt, welcher innerhalb von sechs Monaten nach der Anlage des Defektes nicht ausheilt, bzw. nicht signifikant mit Knochen ausgefüllt wird. Übertragen auf unser Schafsmodell müßte ein solcher Defekt bei einer Einheilungszeit von 3 Monaten einen Durchmesser von 18-20mm aufweisen (Lindholm et al. (1988)). In unserer Versuchsreihe liegt der Defektdurchmesser mit 9,4 mm deutlich unter dieser geforderten Größe. Im beobachteten Zeitraum von 12 Wochen konnte jedoch bei der Auswertung der Leerdefekte gezeigt werden, dass es trotz des geringeren Defektdurchmessers zu keiner knöchernen Füllung des Defektes gekommen war. Aus diesem Grund scheint der Knochendefekt also eine kritische Größe zu haben. Ob es bei einer deutlichen Verlängerung der Studie zu einer Ausfüllung des Defektes mit neuem Knochenmaterial gekommen wäre, lässt sich anhand unserer Ergebnisse nicht beurteilen. Als nächstes stand zur Diskussion, welches eine geeignete Stelle zur Implantation des Knochenersatzmittels sein könnte. Wir entschieden uns für die distale Femurepiphyse beim Schaf, weil an dieser Stelle der Defekt belastungsstabil ist. Belastungsstabil heißt, hier ist ein ruhiges und stabiles Implantatlager, also ein Implantatlager in dem keine Mikrobewegungen stattfinden, anzutreffen, welches eine Voraussetzung für die knöcherne Einheilung von Knochenersatzstoffen ist. Bei der Auffüllung von Defekten in instabilen Bereichen, kommt es oft zu der Ausbildung von Pseudarthrosen. Fragen nach der Art des in einem „idealen“ Versuchsaufbau zu untersuchenden Knochenersatzmittels – biologisch, synthetisch, Composite – blieben dabei bisher unberücksichtigt.

Wie bereits in Kapitel 2.2 erläutert wurde, können die komplexen Formen der Knochenbildung und -regeneration, Osteoinduktion und Osteostimulation zurzeit mit keiner auf dem Markt angebotenen Ersatzsubstanz mit ausreichender Sicherheit im menschlichen Knochen hervorgerufen werden. Versucht man einzelne Effekte – Angiogenese, Zellmigration, Zellinduktion, u.a.-, die diesen komplexen Reaktionen zugrunde liegen, zu beschreiben, so kann dies bisher nur partiell nachgeahmt werden. Da die exakten Steuerungsmechanis-

men für die an der Knochenregeneration beteiligten Zellen noch nicht vollständig aufgeklärt sind, ist ihre gezielte Beeinflussung zurzeit nicht möglich.

Die Spongiosaplastik stellt bis heute immer noch den sogenannten „Goldstandard“ dar. Sie ist jedoch nicht als ideal zu bezeichnen und weist ebenfalls eine Vielzahl von Problemen auf (Notwendigkeit eines Zweiteingriffs, Infektionen, limitierte Vorräte, Schwierigkeit der Behandlung großer knöcherner Defekte, postoperative Schmerzen etc.) (Niedhart et al. (2003)). Ziel unter den Entwicklern von Knochenersatzstoffen muss es also sein, einen Ersatzstoff zu entwickeln, der dem der Spongiosaplastik überlegen oder zumindest ebenbürtig ist. Nach dem heutigen Stand der Forschung kann ein solcher nur, wie im Kapitel 2.4 beschrieben, in Form eines Composites zusammengesetzt sein.

Die osteoinduktive Wirkung von BMP2 ist seit längerem bekannt und wurde in Tierversuchen nachgewiesen (Marshall et al. (1983)). Hierbei wurde die heterotope Osteoinduktion durch Einbringen von BMP2 in das subkutane Fettgewebe und die orthotope Induktion durch dessen Einbringen in Knochendefekte belegt (Alan und Yasko (1992), Chen et al. (1991)). Auch die osteostimulierende Wirkung von bFGF ist seit längerem aus Zellkultur-experimenten bekannt. In Tierversuchen wurde die heterotope Stimulation mit demineralisierter Knochenmatrix als Trägersubstanz sowie orthotop mit nicht auflösbaren Hydroxylapatitkeramiken nachgewiesen (Kawaguchi et al. (1994), Nakamura et al. (1995)).

In diesem Projekt sollten somit diese beiden Proteine die osteostimulierenden bzw. osteoinduktiven Komponenten des neuen Composites darstellen. Als Trägersubstanz wurde Hyaluronsäure und nicht das vielfach getestete Hydroxylapatit verwendet. Hyaluronsäure hat eine Reihe entscheidender Vorteile gegenüber anderen Trägersubstanzen. Ein ganz entscheidender Vorteil der Hyaluronsäure ist z. B. der Applikationsweg. Hyaluronsäure ist als visköses Gel beliebig verformbar und ideal von perkutan ins Einsatzgebiet (Frakturbereich, Knochenzyste, osteoporotische Knochenbereiche, etc.) zu applizieren (Radomsky et al. (1999)). Diese Form der Anwendung bietet zahlreiche Vorteile gegenüber den bisher üblichen Methoden der Knochenimplantation. Die perkutane Anwendung stellt ein minimal invasives Verfahren dar. Folge dieser Anwendung gegenüber der herkömmlichen Methode (z.B. Spongiosaplastik) ist, dass eine signifikante Reduzierung der Infektionen wahrscheinlich erscheint. Der relativ kleine Eingriff ermöglicht es dem Patienten, sich schnell zu erholen und so früh wie möglich eine entsprechende Rehabilitation zu

beginnen. Das Ziel jeder Knochendefektbehandlung sollte es sein, so schnell wie möglich die Ausgangsfunktionen wiederherzustellen oder zumindest annähernd herzustellen und eine übermäßig lange Immobilisation zu vermeiden.

Was die chemischen Aspekte der Hyaluronsäure betrifft, so bietet die Hyaluronsäure ideale Voraussetzungen als Trägersubstanz für perkutane Injektionen. Das Vorliegen der Hyaluronsäure als Lösung eines hochviskösen Gels stellt eine Diffusionsbarriere für die sie enthaltenden Wachstumsfaktoren (BMP/bFGF) dar. Die Wachstumsfaktoren werden also erst an der Stelle freigesetzt, an der sie ihre Wirkung entfalten sollen, d.h. direkt am Zielgebiet, dem Knochendefekt (Radomsky et al. (1999)). Vorausgehende Studien haben gezeigt, dass sich eine Kombination aus Hyaluronsäure + Wachstumsfaktor als brauchbar erwiesen hat. Arbeiten an Ratten zeigen, dass es bei subperiostaler Injektion von einem Hyaluronsäure-Gel, dem kein Wachstumsfaktor beigemischt wurde, zu keiner Knochenneubildung gekommen ist (Radomsky et al. (1997)). Zudem konnte in experimentellen Arbeiten an Kaninchen nachgewiesen werden, dass Trägersysteme aus Hyaluronsäure + bFGF zu deutlich besseren Ergebnissen bei der Frakturheilung führen, als ein Composite bestehend aus bFGF + einer Fibrin-Gel Lösung (Radomsky und Thompson (1998)). Auch die alleinige Injektion von FGF bei einer Frakturstudie an Ratten zeigte keine überzeugenden Ergebnisse bei der Frakturheilung. Der Frakturkallus war bei den mit FGF behandelten Tieren größer, die Durchbauung mit Geflechtknochen dagegen dauerte länger als bei der unbehandelten Vergleichsgruppe (Jingushi et al. (1990)). In diesem Modell wurde allerdings der Wachstumsfaktor aFGF anstatt von bFGF verwendet. Auch in zwei weiteren Studien von Nakamura und Kawaguchi, die ebenfalls Frakturen durch Injektion mit bFGF behandelt haben, konnte eine signifikant beschleunigte Frakturheilung nachgewiesen werden (Nakamura et al. (1998) und Kawaguchi et al. (1994)).

In zahlreichen Projekten ist nur die Wirkung der Einzelkomponenten des hier verwendeten Composites untersucht worden. Eine Arbeit von Huang hat z.B. die positive Wirkung von Hyaluronsäure, abhängig von ihrem Molekulargewicht und ihrer Dosierung, auf den Knochenstoffwechsel beschrieben (Huang et al. (2003)). In unserer Studie sind die Einzelkomponenten eingebunden als Bestandteile eines Composites beobachtet worden. Die Idee war, dass sich die auf die Knochenbildung günstigen Effekte der Einzelsubstanzen gegenseitig ergänzen und synergistisch wirken. Dies stellt einen bedeutenden Unterschied

hinsichtlich anderer Studien dar. Parallelen dieser Studie sind zu einer Arbeit von Radomsky und Mitarbeitern (1997) zu ziehen. Er verwendete in seiner Studie ein Composite bestehend aus Hyaluronsäure und bFGF in unterschiedlichen Konzentrationen. Im Gegensatz zu dieser Studie setzte er jedoch keinen Knochendefekt kritischer Größe, d.h. sein Defekt wäre im Laufe der Zeit wieder von alleine mit Knochenmaterial verschlossen worden. Dies ist ein entscheidender Unterschied, denn es ist von großer klinischer Relevanz, auch Defekte kritischer Größe schnellstmöglich und patientenschonend mit eigenem Knochen zu durchbauen. Zusätzlich konnte bei dieser Arbeit nicht auf die Effekte der Einzelkomponenten (d.h. vor allem auf die Komponente Hyaluronsäure) geschlossen werden, da nur das Composite als Ganzes untersucht wurde. Auch eine tierexperimentelle Studie von Arosarena hat gezeigt, dass ein Composite aus Hyaluronsäure und BMP2 zu einem verstärkten Knochenwachstum geführt hat. Er füllte in seiner Untersuchung Knochendefekte an der Mandibula von 16 Ratten mit Composites bestehend aus BMP2 und Hyaluronsäure bzw. BMP2 und einer Verbindung aus Kollagen, Hydroxylapatit und Trikalziumphosphat auf (Arosarena et al. (2005)). Auch hierbei handelte es sich nicht um Defekte kritischer Größe.

Ein Kriterium, Hyaluronsäure auszuwählen, war, dass Hyaluronsäure nicht nur als reine Trägersubstanz sogenannten osteokonduktiven Fähigkeiten genügt, sondern wie durch die grundlegenden Arbeiten von T. Sasaki und C. Watanabe gezeigt, bemerkenswerte osteostimulierende Eigenschaften aufweist. Diese Studie sowie die vielfältigen Einsatzgebiete in der Klinik (siehe Kap. 2.3.3) gaben den Ausschlag, Hyaluronsäure sowohl als Trägersubstanz mit ihren guten osteokonduktiven Eigenschaften, als auch als osteostimulierende Komponente einzusetzen (Sasaki und Watanabe (1995)). Ein Kriterium für den Einsatz von Hyaluronsäure als Trägersubstanz anstatt eines Hydroxylapatitzementes beruht auf folgenden Überlegungen: Hydroxylapatitzement ist nach dem Aushärten nicht verformbar. Bei instabilen Verhältnissen kann es zu einem „Zerbröseln“ des Zementes mit nachfolgendem Defekt kommen. Hyaluronsäure dagegen hat aufgrund seiner viskösen und elastischen Eigenschaften den Vorteil, bei Belastung leicht nachzugeben, bei Entlastung jedoch die ursprüngliche Form wiedereinzunehmen und so den Defekt stets auszufüllen. Hervorzuheben ist in dieser Diskussion die ausgesprochen gute Biokompatibilität der Hyaluronsäure. Diese und die hervorragende Eignung als bioaktives Implantatmaterial wurde bereits in Kap. 2.3.2 ausführlich beschrieben.

Aufgrund dieser hier diskutierten Eigenschaften wird davon ausgegangen, dass mit dieser Arbeit ein in dieser Konstellation bisher noch nicht bekanntes Composite entworfen worden ist. Die gute Biokompatibilität, die Fähigkeit, Zelldifferenzierung und Zellmigration positiv zu beeinflussen (siehe Kap. 2.3.2) bzw. die osteostimulierenden Eigenschaften und die Tatsache, dass in den Defekt injizierte Hyaluronsäure komplett und schnell vom umgebenden Gewebe resorbiert wird, lassen diese Substanz als äußerst interessant erscheinen.

Die Ergebnisse der Kontrollgruppen zeigen in beeindruckender Weise, dass bei den Spongiosaplastiken, im Vergleich zu den Leerdefekten, trabekulärer Knochen in dem Defekt vorhanden war und der Defekt in dem umliegenden Knochen fast nicht auszumachen war. Eine Unterscheidung zwischen implantiertem und neu gebildetem Knochen war zwar nicht möglich, es zeigte sich jedoch, dass der implantierte Knochen mit dem umgebenden Knochenmaterial zusammengewachsen war und zwischen den beiden Knochenanteilen keine Spaltbildung und keine Osteolysen nachgewiesen werden konnten.

Die Ergebnisse der Gruppen 3-5 (Hyaluronsäure, Hyaluronsäure+BMP2 und Hyaluronsäure+bFGF) sind leider nicht zufriedenstellend. Es hat keine Bildung von neuem Knochenmaterial stattgefunden, obwohl in den erwähnten Studien ausreichende Hinweise auf einen erfolversprechenden neuen Knochenersatzstoff aufgeführt sind. Die Studie bestätigt stattdessen, dass die Spongiosaplastik immer noch den aktuellen „Goldstandard“ darstellt. Allen nachfolgenden Studien kann diese Arbeit als wegweisender Begleiter zur Erforschung eines effektiveren Composites dienen. Ein wichtiges Ergebnis dieser Arbeit ist (entgegen einer Reihe von Literaturhinweisen (siehe Kap. 2.3.4)), dass alleine in den Knochendefekt injiziert Hyaluronsäure nicht zu einer Neubildung von Knochen führt.

Die Ergebnisse dieser Studie können durch verschiedene mögliche Erklärungen begründet werden.

Beginnend mit dem Wachstumsfaktor bFGF wäre ein Erklärungsansatz, dass das bFGF keine ausreichend osteostimulative Wirkung hatte, d.h. dass die Osteoblasten nicht ausreichend zum Wachstum stimuliert wurden. Anhand der Literatur konnte jedoch gezeigt werden, dass das verwendete bFGF (Niedhart et al. (2004)) osteostimulative Eigenschaften besitzt und somit für die Durchführung der Studie geeignet war. Eine weitere Erklärung

könnte sein, dass die Dosis der Wachstumsfaktoren möglicherweise nicht die Richtige war. In der Studie von Aspenberg konnte gezeigt werden, dass eine sehr hohe Konzentration des bFGF zu einem verminderten Knochenwachstum führt, wohingegen niedrigere Dosen des bFGF mit dem gleichen Trägermaterial, demineralisierter Knochenmatrix, zu einer verstärkten Knochenbildung führen. Für sehr niedrige Dosen konnte kein Effekt nachgewiesen werden. Ab einer bestimmten Konzentration nimmt die osteostimulative Potenz des bFGF ab, bis es in hohen Dosisbereichen sogar zu einer verminderten Knochenneubildung führt (Aspenberg et al. (1991)). Vielleicht war die Dosierung von 100µg zu gering. Studien von Wippermann und Nakamura (Nakamura et al. (1998), Wippermann et al. (1994)) zeigen, daß es bei Konzentrationen von 200µg bFGF zu einer deutlich gesteigerten Knochenneubildung, bzw. deutlich schnelleren Frakturheilung gekommen ist. Die Dosis von 100 µg wurde jedoch gezielt ausgewählt, weil in der Vorarbeit zu diesem Projekt (Maus U. (2002)) in einer Dosis-Wirkungs Beziehung am Rattenmodell sich eine Dosis von 100 µg als effektive Dosierung auf die Knochenneubildung herausstellte.

Auch der Wachstumsfaktor BMP2 ist bereits in vergleichbaren Studien an der Ratte als Composite (TCP-Zement/ BMP2) erfolgreich zur Knochendefektheilung eingesetzt worden (Niedhart et al. (1999, 2003)). Auch hier gibt es eine Arbeit von Sumner, der die Abhängigkeit der BMP2 Wirkung von der verabreichten Dosis untersucht hat. Sumner et al. testeten in ihrer Arbeit drei verschiedene Dosierungen (100 µg, 400 µg und 800 µg) von BMP2 bei Hunden (Sumner et al. (2004)). Am Versuchsende nach vier Wochen war der prozentual ins Implantat eingewachsene Knochen in der 100 µg Gruppe am größten.

Trotz einer Reihe von Untersuchungen scheint aber bis heute immer noch keine ausreichende Datenlage über die Dosis-Wirkungs Beziehung von BMP2 und bFGF auf die Bildung von neuem Knochenmaterial vorzuliegen.

Anhand dieser Studien ist anzunehmen, dass der Carrier Hyaluronsäure eine negative Wirkung auf die verwendeten Wachstumsfaktoren und somit die Knochendefektheilung ausgeübt haben könnte. Diese Annahme ist auch nicht durch die Literatur zu widerlegen. Erwähnt sei hierzu noch einmal die Studie von Radomsky, der in seiner Studie positive Effekte auf die Frakturheilung bei der Verwendung eines Hyaluronsäure/bFGF Composites beschreibt, hier ist aber kein Defekt kritischer Größe verwendet worden (Radomsky et al. (1999)). Auch hat Radomsky in seiner Arbeit eine doppelt so hohe Konzentration (20

mg/ml) an Hyaluronsäure verwendet als wir in unserer Studie (20mg/2ml). Im Gegensatz zu dieser Behauptung stehen ebenfalls die Ergebnisse der Gruppe 3, in der ausschließlich Hyaluronsäure zur Defektfüllung verwendet worden ist. Hierbei ist es ebenfalls zu keinem signifikanten Einbau von neuem Knochenmaterial gekommen.

Letztendlich sind die Vorgänge, welchen zu dem Ergebnis der vorliegenden Studie geführt haben, unklar. Durch eine Wiederholung der Versuchsanordnung mit möglicherweise veränderten Konzentrationsverhältnissen der Composites wäre eventuell eine weitere Klärung der Ergebnisse möglich. Eine sinnvolle Ergänzung der Untersuchung wäre es z. B., die Analyse der Freisetzungskinetik der Wachstumsfaktoren aus dem Carrier Hyaluronsäure genauer zu untersuchen. Desweiteren wäre es interessant zu untersuchen, welche Einflüsse Hyaluronsäure und die Wachstumsfaktoren (BMP2/bFGF) aufeinander ausüben.

Definitiv scheint man trotz vielversprechender Literaturdaten sagen zu können, dass der Einsatz von Hyaluronsäure als isolierter Knochenersatzstoff zum jetzigen Zeitpunkt wenig sinnvoll ist. Dies lässt sich auch auf die Composite-Gruppen grundsätzlich übertragen, allerdings ist hierbei die Datenlage bis heute noch insgesamt unzureichend.

## 6. Zusammenfassung

Die Fortschritte beim Verständnis der Physiologie des Knochenstoffwechsels und die Möglichkeiten der Gewinnung spezieller Makromoleküle haben in den letzten Jahren dazu geführt, neue Wege bei der Behandlung von Knochendefekten einzuschlagen. Basic Fibroblast Growth Factor (100 µg), ein hochpotentes Mitogen oder das Bone Morphogenetic Protein (100 µg), dessen osteoinduktive Wirkung bekannt ist und 1 cm<sup>3</sup> Hyaluronsäure (Hyalart 10mg/ml), ein Bestandteil der extrazellulären Matrix, wurden zu einer viskösen Gelformation miteinander kombiniert. Dieses Composite wurde entwickelt, um mittels perkutaner Injektion in Knochendefekte unterschiedlichster Art eingebracht werden zu können. In einem experimentellen Frakturmodell wurde ein Defekt kritischer Größe (Durchmesser 9,4 mm, Tiefe 10 mm) in das femoro-patellare Gleitlager von 25 Schafen gesetzt. Bei 15 Tieren wurde der Defekt entweder mit Hyaluronsäure (Ha), Ha + BMP2 oder Ha + bFGF aufgefüllt, die anderen 10 Tiere wurden als Kontrollgruppe mit einer Spongiosaplastik versehen oder als Leerdefekt belassen.

Radiografische Aufnahmen und Fluoreszenzphotografien (12 Wochen postoperativ) zeigten bereits makroskopisch eindeutig, dass es zu keinem Einwachsen von neuem Knochenmaterial gekommen war. In der Kontrollgruppe hingegen wurden die Ergebnisse histomorphometrisch ausgewertet, weil es gerade bei den Spongiosaplastiken zu einem Einwachsen von reichlich Knochenmaterial gekommen war. Im Mittel ist bei den Spongiosaplastiken eine Zunahme von 19,97 % neuem Knochen zu verzeichnen, wobei der Messwert die Anteile von implantiertem Knochen und neu gebildetem Knochen zusammenfasst. Bei den Leerdefekten war es ein Zuwachs von 5,11 %. Die Studie zeigt, dass Composites aus Ha + BMP2 bzw. Ha + bFGF keine geeigneten Knochenersatzstoffe darstellen. Die guten Ergebnisse der Spongiosaplastiken bestätigen den aktuellen Stand der Behandlung von Knochendefekten. Die autologe Spongiosaplastik kann, obwohl sie eine Vielzahl von Problemen mit sich bringt (limitierte Vorräte, Infektionen, Schmerzen, Blutungen etc.), immer noch als der GOLDSTANDARD bei der Behandlung von Knochendefekten angesehen werden.

## 7. Literaturverzeichnis

- Aaboe M., Pinholt EM, Hjorting-Hansen E.:** Healing of experimentally created defects: a review. *British Journal of oral & maxillofacial surgery*, 33 (1995) 312-318
- Abatangelo G., Brun P., Cortivo R.:** Hyaluronan (hyaluronic acid) : An overview. In: *Novel Biomaterials based on hyaluronic acid and its derivatives (Proceedings of a workshop held at the Annual meeting of the European Society for Biomaterials)*, Pisa (1994) 8-20
- Abatangelo G., Cortivo R., Martelli M., et al.:** Cell detachment mediated by hyaluronic acid. *Exp Cell Res* 137 (1982) 73-8
- Abatangelo G., et al.:** Healing of hyaluronic acid-enriched wounds; histological observations. *J. Surg. Res.* 35 (1983) 410-5
- Alan W., Yasko, et al.:** The Healing of segmental Bone Defects, Induced by Recombinant Human Bone Morphogenetic Protein (rhBMP2). *The Journal of Bone and Joint Surgery, Incorporated* Vol 74-A, No. 5 (1992) 659-670
- Andre R., Gazdag MD, Joseph M., et al.:** Alternatives to autogenous Bone Graft: Efficacy and Indications ; *Journal of the American Academy of Orthopedic Surgeons, A Comprehensive Review*, Vol 3, No 1, Jan/Feb (1995) 1-8
- Andreassi L., Casini L., Trabucchi E., et al.:** Human keratinocyte cultured on membranes composed of benzyl esters of hyaluronic or grafting. *Wounds* 3 (1991) 116-26
- Andrew JG, et al.:** Demonstration of TGF-beta 1 mRNA by in situ hybridization in normal human fracture healing. *Calcif Tissue Int* 53 (1993) 97-102
- Arosarena OA, Collins WL:** Bone regeneration in the rat mandible with bone morphogenetic protein-2: a comparison of two carriers. *Head and neck surgery*; Vol 132 (4); p. 592-7 (2005)
- Aspenberg P., et al.:** Fibroblast growth factor stimulates bone formation: bone induction studied in rats. *Acta Orthop. Scand.* 60 (1989) 473-476
- Aspenberg P., Thorngreen KG, Lohmander LS:** Dose dependent stimulation of bone induction by basic fibroblast growth factor. *Acta Orthop Scand* 62 (1991) 473-476
- Baadsgaard A., et al.:** Transplantation of pedicle bone grafts to fresh skeletal defects and defect pseudoarthroses. *Acta. Orthop. Scand.* 41 (1970):261
- Baird A., Böhlen P.:** Fibroblast growth factors.: Sporn MB, Roberts AB, eds. *Peptide growth factors and their receptors I*. New York: Springer-Verlag (1991) 369-418
- Baird A., Klagsbrun M.:** The fibroblast growth factor family. *Cancer Cells* 3 (1991) 239-243
- Bakos D., Soldan M., Hernandez-Fuentes I.:** Hydroxyapatite-collagen-hyaluronic acid composite; *Biomaterials* 20 (1999) 191-195
- Balazs EA, Denlinger JL:** Clinical use of hyaluronan. In: *Ciba Found. Symp.* 143 (1989), The biology of hyaluronan Chichester: Wiley 265-80
- Balazs EA, Laurent TC, Jeanloz RW:** Nomenclature of hyaluronic acid. *Biochem. J.* 235 (1986) 903
- Bashkar SN, et al.:** Reaction of bone to tricalcium phosphate pellets. *Oral Surg.* 32 (1971) 336-340

- Beck LS, et al.:** TGF-beta 1 induces bone closure of skull defects: temporal dynamics of bone formation in defects exposed to rhTGF-beta 1. *J. Bone Miner Res.* 8 (1993) 753-761
- Benedetti L., et al.:** Chemical Modification of Hyaluronan. In: *Novel biomaterials based on hyaluronic acid and its derivatives* (Proceedings of a workshop held at the annual meeting of the European Society for Biomaterials), Pisa (1994) 20-30
- Benedetti L., et al.:** New biomaterials from hyaluronic acid. *Medical Device Technology.* 11 (1994) 32-37
- Benninghoff, et al.:** *Anatomie* 1 Aufl. 15 (1994) Kap. 5 S.153
- Bolander ME, et al.:** Regulation of fracture repair by growth factors. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 200 (1992) 165-170
- Bonewald LF, et al.:** Role of transforming growth factor-beta in bone remodeling. *Clin. Orthop.* 250 (1990) 261-276
- Bostrom M., et al.:** Immunolocalization of expression of bone morphogenetic proteins 2 and 4 in fracture healing. *J. Orthop Res* 13 (1995) 357-367
- Buchholz RW, et al.:** Hydroxylapatite and tricalcium phosphate bone graft substitutes. *Orthop. Clin. North Am.* 18 (1987) 323-334
- Burgess WH, Maciag T.:** The heparin-binding (fibroblast) growth factor family of proteins. *Annu. Rev. Biochem.* 58 (1989) 1572-1577
- Burgess WH, Maciag T.:** The heparin-binding (fibroblast) growth factor family of proteins. *Annu. Rev. Biochem.* 58 (1989) 575-606
- Campoccia D., et al.:** Human neutrophil chemokinesis and polarization induced by hyaluronic acid derivatives. *Biomaterials* 14 (15) (1993) 1135-1139
- Canalis E., Centrella M., McCarthy T.:** Effects of basic fibroblast growth factor on bone formation in vitro. *J. Clin. Invest* 81 (1988) 1572-1577
- Chen TL, Bates RL, Dudley A., et al.:** Bone morphogenetic protein 2b stimulation of growth and osteogenic phenotypes in rat osteoblast-like cell: comparison with TGFβ1. *J. Bone Min. Res.* 6 (1991) 1387-1393
- Clement DA, Szypryt EP:** An experimental study in the rabbit of the role of cortico cancellous bone graft used to augment plate fixation of a contaminated osteotomy, *J Bone Joint Surg.* 69B (1987) 496
- Clement DA:** Posttraumatische Knochentransplantation, *Trends in der Frakturbehandlung von T.D. Bunker et al.* Kap.5 (Deutscher Ärzte Verlag Köln 1992)
- Constanz BR, et al.:** Skeletal repair by in situ formation of the mineral phase of bone. *Science* 267 (1995) 1796-1799
- Cortivo R., et al.:** Hyaluronic acid promotes chick embryo fibroblast and chondroblast expression. *Cell Biol. Int. Rep.* 14 (1990) 111-2
- Cuevas P., Burgos J., Baird A.:** Basic FGF promotes cartilage repair in vivo. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 156(2) (1988) 611-618

- Davidson JM, et al.:** Hyaluronic derivates and their application to wound healing: preliminary observations. *Clin. Materials* 8 (1991) 171-7
- Davidson JM, Klagsbrunn M., et al.:** Accelerated wound repair, cell proliferation and collagen accumulation are produced by a cartilage-derived growth factor. *J. Cell Biol.* 100 (1985) 1219-1227
- Debrunner A., et al.:** Orthopädische Chirurgie 3. Aufl. (1993), S. 43 ff.
- Debrunner A., et al.:** Orthopädische Chirurgie 3. Aufl. (1993), S. 64 ff.
- Doherty R., et al.:** Glycosaminyglykans facilitate the movement of fibroblasts through three-dimensional collagen substrates. *J. Cell Sci.* 92 (1989) 263-70
- Dono R., Zeller R.:** Cell type-specific nuclear translocation of fibroblast growth factor-2 isoforms during chicken kidney and limb morphogenesis. *Dev. Biol.* 163 (1994) 316-330
- Duran-Reynals F., et al.:** Tissue permeability and spreading factors in infection. *Bacteriol. Rev.* 6 (1942) 197-252
- Eckenstein FP, Kuzis K., Nishi R.:** Cellular distribution, subcellular localization and possible functions of basic and acidic fibroblast growth factor.: *Biochem. Pharmacol.* 47 (1994) 103-110
- Ferguson D., et al.:** Bovine bone Morphogenetic protein (BBMP) fraction-induced repair of craniotomy defects in the rhesus monkey (*Macaca speciosa*), *Clin. Orthop* 219(1987) 251-258
- Folkmann J., Klagsbrunn M.:** Angiogenetic factors. *Science* 235 (1987) 442-447
- Folkmann J., Shing Y.:** Angiogenesis. *J. Biol. Chem.* 267 (1992) 10931-10934
- Fraser J. R. E. et al.:** Nature and Function, *Journal of internal Medicine* 242 (1997) 23-77
- Fraser J. R. E., Laurent T. C.& Laurent U. B. G.:** Hyaluronan its nature, distribution, functions and turnover. *J. of Internal Medicine* 242 (1997) 27-33
- Gabrilove JL, White K., Rahman Z., Brown EL:** Stem cell factor and basic fibroblast growth factors are synergistic in augmenting committed myeloid progenitor cell growth. *Blood* 83 (1994) 907-910
- Gaughan EM, et al.:** Effects of sodium hyaluronate on tendon healing and adhesion formation in horses. *Am. J. Vet. Res.* 52 (1991) 764-773
- Globus RK, Patterson-Buckendahl D., Gospodarowicz D.:** Regulation of bovine bone cell proliferation by fibroblast growth factor and transforming growth factor. *Endocrinology* 123 (1988) 98-105
- Gospodarowicz D., Ferrara N., Schweigerer L., et al.:** Structural characterization and biological functions of fibroblast growth factor. *Endocr. Rev.* 8 (1987) 95-114
- Grav EL, Polack FM, Balazs EA:** The protective effect of Na-hyaluronate to corneal endothelium. *Exp. Eye Res.* 31 (1979) 119-27
- Gressner, Greiling:** Lehrbuch der klinischen Chemie und Pathobiochemie . 3. Aufl. (1995), Kap. 4.11
- Hakansson L., Venge P.:** The molecular basis of the hyaluronic acid-mediated stimulation of granulocyte function. *J. Immunol.* 138 (1987) 4347-52
- Harada S., Nagy J., Sullivan K., et al.:** Induction of vascular endothelial growth factor expression by prostaglandin E2 and E1 in osteoblasts. *J. Clin. Invest.* 93 (1994) 2490-2496
- Hauschka PV, Mavrakos AE, Lafrati MD.:** Growth factors in bone matrix. *J. Biol. Chem.* 261 (1986)

12665-12674

**Haynes BF, Liao HX, Patton KL:** The transmembran Rezeptor(cd44)), Multiple functions, multiple forms. *Cancer Cell* 3 (1991) 347-50.

**Huang L., Cheng YY., Koo PL., et al.:** The effect of hyaluronan on osteoblast proliferation and differentiation in rat calvarial-derived cell cultures. *Journal of biomedical materials research. Part A; Vol: 66* (4); p. 880-4 (2003)

**Hunt JA, Remes and Williams DF:** Stimulation of neutrophil movement by metal ions. *Journal of Biomedical Materials Research* 26 (1992a) 819-828.

**Hurley MM, Lee SK, Raisz LG, et al.:** Basic fibroblast growth factor induces osteoclast formation in murine bone marrow cultures. *Bone* 22 (1998) 309-316

**Ijiri S., Yamamuro T., Nakamura T., et al.:** Effect of sterilization on bone morphogenetic protein. *J. Orthopedic. Res.* 12 (1994) 628 635

**Ishidou Y., et al.:** Enhanced expression of type 1 receptors for bone morphogenetic proteins during bone formation. *J Bone Miner Res* 10 (1995):1651-1659

**Iwasaki S., et al.:** Distribution and characterization of specific cellular binding proteins for bone morphogenetic protein-2. *J. Biol. Chem.* 270 (1995) 5476-5482

**Jeffrey O. Hollinger, PDS, PhD, et al.:** Role of bone Substitutes, *Clinical Orthopedics and related Research Number* 324 (1996) 55-65

**Jingushi S., et al.:** Acidic fibroblast growth factor (aFGF) injection stimulates cartilage enlargement and inhibits cartilage gene expression in rat fracture healing. *J. Orthop. Res.* 8 (1990) 364-371

**Jingushi S., Heydemann A., Kana SK, et al.:** Acidic fibroblast growth factor injection stimulates cartilage enlargement and inhibits cartilage gene expression in rat fracture healing. *J. Orthop. Res.* 8 (1990) 364-371

**Johnson E.E., Urist M.R., Finermann G.A.M.:** Distal metaphyseal tibial nonunion. *Clin. Orth.* 250 (1990) 234-240

**Johnson EE, et al.:** Distal metaphyseal tibial nonunion. *Clin. Orthop.* 250 (1990) 234-240.

**Jones AC, et al.:** A double blind trial of intra-articular hyaluronic acid (HA) vs. i.a. triamcinolone hex-acetonide (TH) in knee osteoarthritis (OA). *Osteoart. Cartil.* 1 (1993) 71

**Joyce ME, Roberts AB, Sporn MB, et al.:** Transforming growth factor-beta and the initiation of chondrogenesis and osteogenesis in the rat femur. *J Cell Biol. Jun.* 110(6) (1990) 2195-207

**Junqueira, Carneiro:** *Histologie* 3. Auflage (1991) S. 202 ff.

**Junqueira, Carneiro:** *Histologie* 3. Auflage (1991) S.190-194

**Junqueira, Carneiro:** *Histologie.* 3. Aufl. (1991), S. 197ff

**Kawaguchi H., Kurokawa T., Hanada K., et al.:** Stimulation of fracture repair by recombinant human basic fibroblast growth factor in normal and streptozotocin-diabetic rats. *Endocrinology* 135 (2) (1994) 774-781

**Kim HD, Valentini RF:** Hyaluronan-based biodegradable scaffolds for sceletal tissue reconstruction.

Proc. 5<sup>th</sup> World Biomater. Congress, Vol. 2. Toronto, Canada, (1996) 236

**Klagsbrunn M., et al.:** The fibroblast growth factor family: structural and biological properties. Prog. Growth Factor Res. 1 (1989) 207-235

**Knudson CB, Toole BP:** Changes in the pericellular matrix during differentiation of limb bud mesoderm. Dev. Biol. 112 (1985) 308-14

**Köster K., Karbe E., et al.:** Experimenteller Knochenersatz durch resorbierbare Calciumphosphatkeramik. Langenbecks Arch Chir 341 (1976) 77-86

**Kuebler N., Urist M.:** Cell differentiation in response to partially purified osteosarcoma-derived bone morphogenetic protein in vivo and in vitro. Clin. Orthop. 292 (1993) 321-328

**Kuiawa MJ, Caplan AI:** Hyaluronic acid bonded to cell culture surfaces stimulates chondrogenesis in stage 24 limb mesenchyme cultures. Dev. Biol. 114 (1986) 504-18

**Kuiawa MJ, Carrino DA, Caplan AI:** Substrate-bonded hyaluronic acid exhibits a size-dependent stimulation of chondrogenetic differentiation of stage 24 limb mesenchymal cells in culture. Dev. Biol. 114 (1986b) 519-2

**Kuiawa MJ, Pechak DJ, Fizman MY, et al.:** Hyaluronic acid bonded to cell culture surfaces inhibits the program of myogenesis. Dev. Biol. 113 (1986a) 10-16

**Kyyrönen K., Hume L., Benedetti L., et al.:** Methylprednisolone esters of hyaluronic acid in ophthalmic drug delivery: in vitro and in vivo release studies. Int J Pharm 80 (1992) 161-9

**Lianjia Y., Yan J.:** Immunohistochemical observations on bone morphogenetic protein in normal and abnormal conditions. Clin. Orthop. 257 (1990) 249-256

**Lind M., et al.:** Growth factor stimulation of bone healing. Effects on osteoblasts, osteomies and implants fixation. Acta Orthop Scand Suppl. Oct 283 (1998) 2-37

**Lind M., et al.:** Growth factors, possible new clinical tools: a review. Acta Orthop. Scand 67 (1996) 407-417

**Lindholm TS, Urist MR:** A quantitative analysis of new bone formation by induction in composite grafts of bone marrow and bone matrix. Clin Orthop 150 (1988) 288-300

**Longaker MT, et al.:** Studies in fetal wound healing: A prolonged presence of hyaluronic acid characterizes wound fluid. Ann. surg. 213 (1991) 292-6

**Marouf H., Quayle AA, Sloan P.:** In vitro studies with collagen/hydroxyapatite implants. Int. J. Oral Maxillofac. Implants 5 (1990) 148-54

**Marshall R., Urist MR, Robert J., et al.:** Bone Cell Differentiation and Growth Factors. Science, Vol 220 (1983) 680-686

**Maus U.:** In vivo Testung eines neuartigen bFGF/TCP-Composite. Dissertation medizinische Fakultät der RWTH-Aachen (2002)

**McCarthy TL, Centrella M., Canalis E.:** Effects of fibroblasts growth factors on deoxyribonucleic acid and collagen synthesis in rat parietal bone cells. Endocrinology 125 (1989) 2118-2126

- Meyer FA, et al.:** Macromolecular basis of globular protein exclusion and of swelling in loose connective tissue (umbilical cord). *Bioch Biophys Acta* 755 (1983) 388-99
- Meyer K., Palmer JW:** The polysaccharides of the vitreous humor. *J. Biol. Chem.* 107 (1934):629-34
- Mowlem R.:** Bone and cartilage transplants, their use and behaviour. *Br. J. Surg.* 29 (1941) 182-93
- Mowlem R.:** Cancellous chip bone grafts. Report on 75 cases, *Lancet* (1944) ii:746-8
- Nakamura T., Hananda K., Tamura M., et al.:** Stimulation of endostal bone formation by systemic injections of recombinant basic fibroblast growth factor in rats. *Endocrinology* 136 (1995) 1276-1284
- Nakamura T., Hara Y., Tagawa M., et al.:** Recombinant human fibroblast growth factor accelerates fracture healing by enhancing callus remodeling in experimental dog tibial fracture. *J. Bone Miner Res.* 13 (1998) 942-949
- Nakase T., et al.:** Transient and localized expression of bone morphogenetic protein 4 messenger RNA during fracture healing. *J. Bone Miner Res.* 9 (1994) 651-659
- Niedhart C., et al.:** A composite of injectable tricalcium phosphate and rhBMP2 is superior to autologous bone graft in rats. *Bone* 24 (1999) 428
- Niedhart C., Maus U., Redmann E., et al.:** Stimulation of bone formation with an in situ setting tricalcium phosphate/rhBMP-2 composite in rats. *Journal of biomedical materials research. Part A; Vol. 65(1) ; p. 17-23* (2003)
- Niedhart C., Niethard FU, Orthopädische Universitätsklinik der RWTH, Aachen:** Knochenersatzstoffe: Alternativen zur autologen Spongiosaplastik. *Implant 1* (1997) 3-6
- Niedhart C., Niethard FU:** Klinische Anforderungen an Knochenersatzstoffe. In W. Puhl (ed) : *Bio ceramics in orthopaedics – New Applications* Enke Verlag (1998) 46-50
- Niedhart C., Pingsmann A., Niethard FU, et al.:** Komplikationen nach Entnahme autologen Knochens aus dem ventralen und dorsalen Beckenkamm-eine prospektive kontrollierte Studie. *Zeitschrift für Orthopädie und ihre Grenzgebiete. Vol 141 (4); p.481-6* (2003)
- Niedhart C., Maus U., Niethard FU., et al.:** The effect of basic fibroblast growth factor on bone regeneration when released from a novel in situ setting tricalcium phosphate cement. *Journal of biomedical materials research. Part A; Vol 69 (4); p. 680-5* (2004)
- Paralkar VM. Hammonds RG, Reddi AH:** Identification and Characterization of cellular binding proteins (receptors) for recombinant human bone morphogenetic protein 2B, an initiator of bone differentiation cascade. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88 (1991) 3397-3401
- Partsch G., et al.:** Modulation of the migration and chemotaxis of PMN cells by Ha. *Z. Rheumatol.* 48 (1989) 123-8
- Pilloni A., Bernard GW:** Low molecular weight hyaluronic acid increases osteogenesis in vitro. *J. Dent Res.* 71 (1992) 574
- Prehm P., et al.:** Hyaluronate is synthesized at the plasma membrane. *Biochem. J.* 220 (1984) 597-600

- Prehm P., et al.:** Synthesis of Hyaluronate in different teratocarcinoma cells. 1. Characterization of the synthase. *Biochem J* 211 (1983) 181-9 / 2. Mechanism of chain growth. *Biochem. J.* 211 (1983) 191-8
- Radder AM, Leeders H. van Blitterswijk:** Interface reactions to PEO/PBT co-polymer (polyactive) after implantation in cortical bone. *J. Of Biomedical Materials research* 23 (1994) 141-151
- Radomsky ML, Merck A., Gonsalves M., et al.:** Basic fibroblast growth factor in a hyaluronic acid gel stimulates intramembranous bone formation. *Trans. Orthop. Res. Soc.* 22 (1997) 510
- Radomsky ML, Thomas B., et al.:** Novel formulation of fibroblast growth factor-2 in a hyaluronan gel accelerates fracture healing in nonhuman primates. *J. of Orthop. Res.* 17 (1999) 607-614
- Radomsky ML, Thompson AY:** Potential role of fibroblast growth factor in enhancement of fracture healing. *Clin. Orthop. Suppl.* 355 (1998) 283-293
- Ray RD, et al.:** Vascularization of bone grafts and implants. *Clin. Orthop.* 87 (1972) 43
- Reddi AH, et al.:** Biologic principles of bone induction. *Orthop. Clin. North Am.* 18 (1987) 207-212
- Rehakova M., Bakos D., Vizarova K., et al.:** Properties of collagen and hyaluronic acid composite materials and their modification by chemical crosslinking. *J. Biomater. Med. Res.* 30 (1996) 369-72
- Riley E., Lane J., Urist MR, et al.:** Bone morphogenetic protein-2: biology and applications. *Clin. Orthop.* 324 (1996) 39-46
- Ripamonti U., et al.:** Bone induction in nonhuman primates. *Clin. Orthop. Rel. Res.* 269 (1991) 284-294
- Rosen RV, Thies RS, Song JJ, et al.:** Bone morphogenetic protein-9 binds to liver cells and stimulates proliferation. *Endocrinology.* Oct,136 (10) (1995) 4293-7
- Rueger JM, et al.:** Knochenersatzmittel, State of the art und: Wohin gehen wir? *Unfallchirurg* 99 (1996) 228-236
- Rupper R., Hoffmann E., Sebald W.:** *Eur. J. Biochem* 237 (1996) 295-302
- Sandberg MM, Aro HAT, Vuorio EI:** Gene expression during bone repair. *Clin. Orthop.* 289 (1993) 292-312
- Sasaki T. and Watanabe C.:** Stimulation of Osteoinduction in Bone Wound Healing by High-Molecular Hyaluronic Acid; *Bone.* Vol. 16. No. 1 January (1995) 9-15
- Saur K., Dambe LT, Schweiberer L.:** Experimentelle Untersuchungen zum Einbau autologer Spongiosa in die Kompakta des Röhrenknochens. *Arch. Orthop. Traumatol. Surg.* 92 (1978) 211
- Schmidt, Thews:** *Physiologie des Menschen* 26. Aufl. (1995): Homöostase des Kalzium und Phosphathaushaltes S. 404 ff.
- Schumpelick V., Bleese NM, Mommsen U.:** *Chirurgie* 3. Aufl. (1994) S. 833 ff.
- Schweiberer L., Eitel F., Betz A.:** Leitthema: Autotransplantation von Geweben in der Unfallchirurgie-Spongiosatransplantation. *Chirurg* 53 (1982) 195-200
- Seyedin SM, Thomas TC, Thompson AY, et al.:** Purification and characterization of two cartilage inducing factors from bovine demineralized bone. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82 (1985) 2267-2271

- Smith M., Gosh P.:** The synthesis of hyaluronan by human-synovial fibroblasts is influenced by the nature of the hyaluronate in its extracellular environment. *Rheumatol. Int.* 7 (1987) 133-22
- Solheim E., et al.:** Growth factors in bone. *Int. Orthop.* 22 (6) (1998) 410-416
- Solursh M., et al.:** Depression by hyaluronic acid of glycosaminoglykans synthesis by cultured chick embryo chondrocytes. *Devel. Biol.* 41 (1974) 23-44
- Soranzo C., Benedetti L., et al.:** Evaluation of two hyaluronic derivates (HYAFF7 and ACP sponges) for bone healing. The 20<sup>th</sup> Annual Meeting of the Society for Biomaterials (Boston USA, 5-9 April 1994)
- Steinbrech D., Spector JA, Warren SM, et al.:** Gene expression of transforming growth factor-beta 3 and tissue inhibitor of metalloproteinase type 1 during membranous bone healing in rats. *J Craniofac Surg.* Nov 11 (6) (2000) 521-6
- Sumner D.R., Turner T.M., Urban R. M. et al.:** Locally delivered rhBMP-2 enhances bone ingrowth and gap healing in a canine model. *J Orth Res* 22 (2004) 58-65
- Takeda K., et al.:** Expression of Bone Morphogenetic Protein genes in the human dental pulp cells. *Bone* 15 (1994) 467-470
- Tanaka T., et al.:** Morphological study of recombinant human transforming growth factor beta-1 induced intramembranous ossification in neonatal rat parietal bone. *Bone* 14 (1993) 1177-123
- Ten Huysen KS, Martin RI, Klimikiewicz M., et al.:** Formation and properties of a synthetic bone composite: hydroxyapatite-collagen. *J. Biomed. Mater. Res.* 29 (1995) 803-10
- Termine JD, Kleinmann HK, Whison SW, et al.:** Osteonectin a bone-specific protein linking mineral to collagen. *Cell* 26 (1981) 99-105
- Underhill C.:** CD44:The hyaluronan receptor. *J. Cell Sci.* 103 (1992) 293-8
- Urist MR, et al.:** Bone cell differentiation and growth Factors. *Science* 220 (1983) 680-686.
- Urist MR, Sato A., Brownell AG, et al.:** Human bone morphogenetic protein. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* (1983) 173-99
- Vince DG, Hunt JA and Williams DF:** Quantitative assesments of the tissue response to implanted biomaterials. *Biomedical Engineering* 15 (1991) 39-45
- Wang E., Rosen V., Dalessandro J., et al.:** Recombinant human bone morphogenetic protein induces bone formation. *Proc Natl Acad Sci USA* Vol 87 (1990) 2220-2224
- Weigel PH, et al.:** A model for the role of HA and fibrin in the early events during the inflammatory response and wound healing. *J. Theor. Biol.* 119 (1986) 219-34
- Weiss AP, Olmedo ML, Lin JC, et al.:** Growth factor modulation of the bone formation of a molded vascularized bone graft in vivo. *J. Hand Surg. (am)* 20 (1995) 94-100
- West DC, Wennar S.:** Hyaluronan and Angiogenesis. In: Ciba Foundation Symposium143, The biology of hyaluronan. Chichester, England J Wiley and Sons (1989) 187-201
- Williams DF, Campoccia D.:** In vitro and in vivo biocompatibility of hyaluronic acid derivates. In: Novel biomaterials based on hyaluronic acid and its derivates (Proceedings of a workshop held at the annual meeting of the european society for biomaterials), Pisa (1994) 30-38

**Wippermann BW, Zwipp H., Junge P., et al.:** Healing of a segmental defect in the sheep tibia filled with a hydroxyapatite ceramic augmented by basic fibroblast growth factor and autologous bone marrow. *Trans Orthop Res Soc.* 40 (1994) 545

**Wozney JM, et al.:** Novel regulators on bone formation. *Science* 242 (1988) 1528-1534

**Wozney JM, et al.:** Overview of bone morphogenetic proteins. *Spine* 27 (2002) 2-8

**Younger, EM, Chapman MW:** Morbidity at bone graft donor sites. *J. Orthop. Trauma* 3 (1989) 192-195

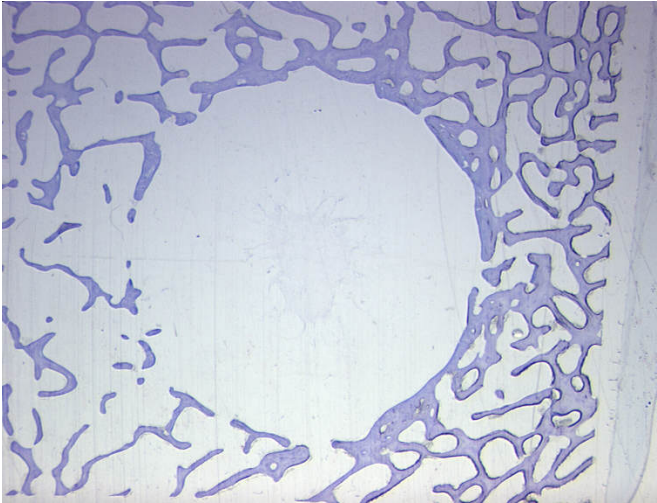
**Zaffe D., Moroni A., Pezzuto V., et al:** Histological and Physico-Chemical Analyses on Transformations of some bioactive glasses implanted in long bones of rabbit and sheep. In Vincenzini P (ed.) *Ceramics in Substitute and Reconstuctive Surgery.* Amsterdam, Elsevier Science Publishers (1991) 395-407

**Zhong, et al.:** Biodegradation of hyaluronic acid derivatives by hyaluronidase. *Biomaterials* 15(5) (1994a) 359-365

## 8. Anhang

### Leerdefekte

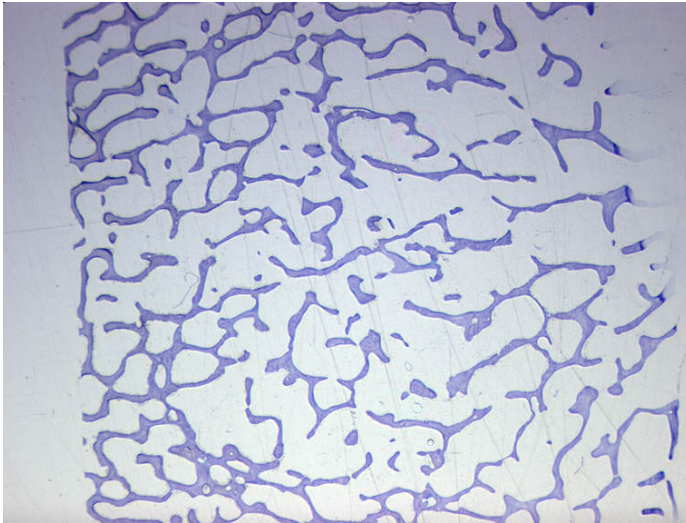
Abbildung 7: Leerdefekt (Toluidin-Blau, 6,3fache Vergrößerung, 12 Wochen)



Lediglich am Defektrand ist ein schmaler Saum neugebildeten Knochens nachweisbar (Defekt kritischer Größe).

## **Spongiosaplastiken**

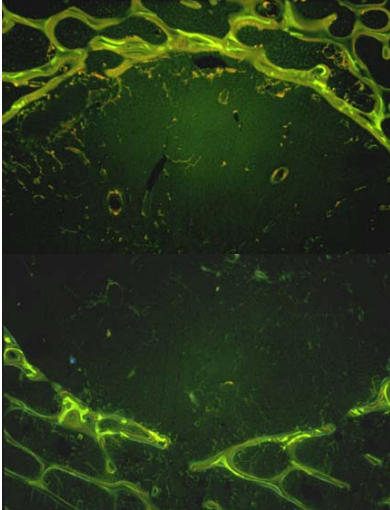
Abbildung 8: Spongiosaplastiken (Toluidin-Blau, 6,3fache Vergrößerung, 12 Wochen)



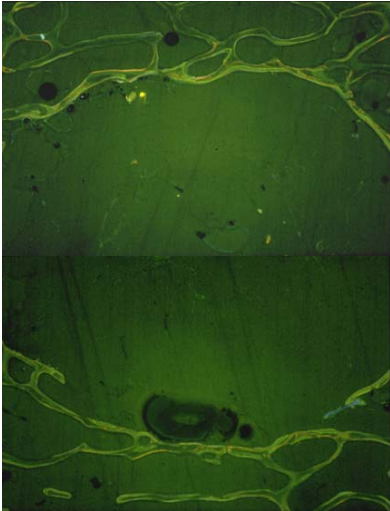
Der Defekt ist nur schwer von dem Lamellenknochen zu unterscheiden; im Defekt vollständig integrierter trabekulärer Knochen.

### **Fluoreszenzenfotografien der Gruppen 3-5**

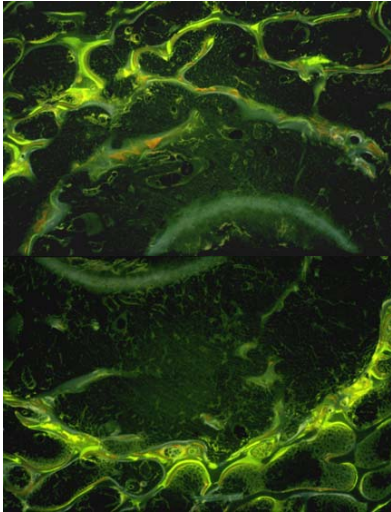
**Abbildung 9: Fluoreszenzfotografie Gruppe 3 (Hyaluronsäure, 16fache Vergrößerung)**



**Abbildung 10: Fluoreszenzfotografie Gruppe 4 (Hyaluronsäure+BMP2, 16fache Vergrößerung)**



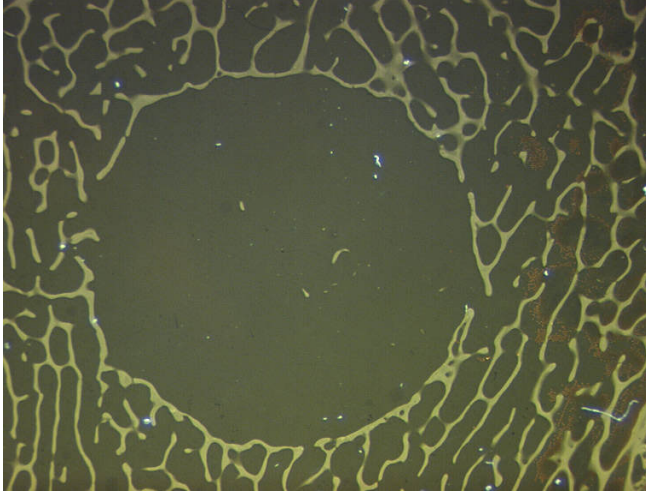
**Abbildung 11: Fluoreszenzphotografie Gruppe 5 (Hyaluronsäure+bFGF, 16fache Vergrößerung)**



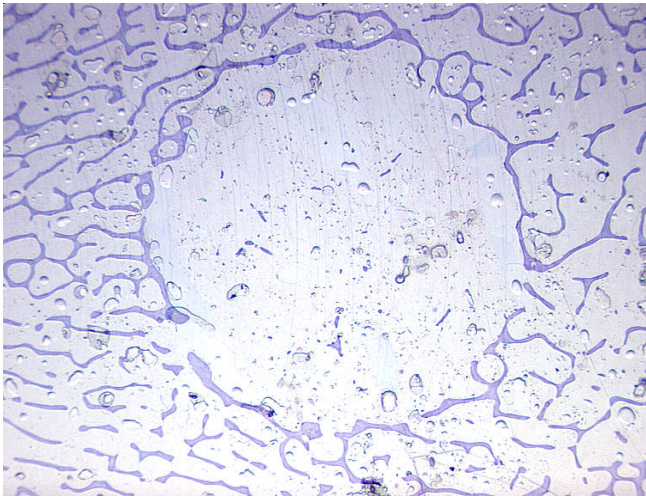
Zusammenfassend hat der Defekt in den Gruppen 3-5 (Hyaluronsäure, Hyaluronsäure+BMP2, Hyaluronsäure+bFGF) noch seine ursprüngliche kreisrunde Form. Im Defekt sind keine Fluoreszenzbanden erkennbar.

## **Mikroradiografien + Toluidin-Blau Färbungen der Gruppen 3-5**

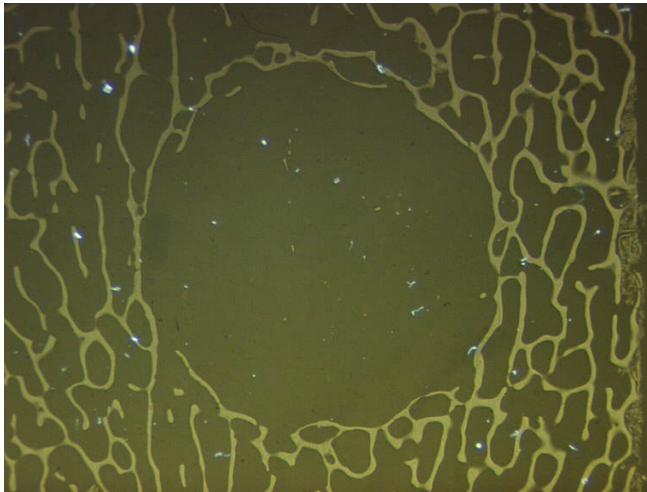
**Abbildung 12: Mikroradiografie Gruppe 3 (Hyaluronsäure, 6,3fache Vergrößerung)**



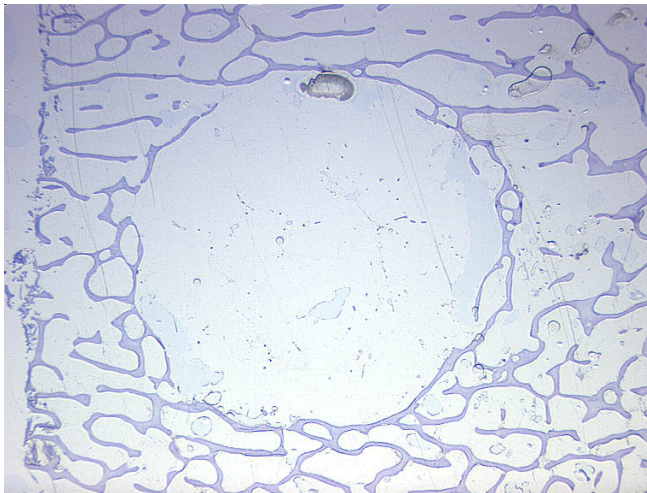
**Abbildung 13: Toluidin-Blau Färbung Gruppe 3 (Hyaluronsäure, 6,3fache Vergrößerung)**



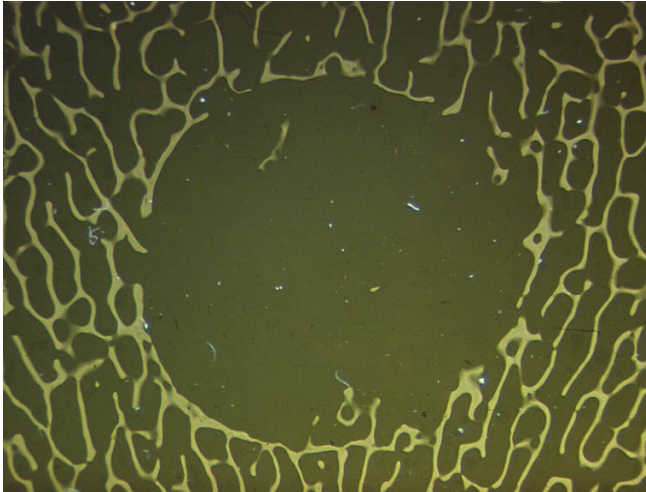
**Abbildung 14: Mikroradiografie Gruppe 4 (Hyaluronsäure+BMP2, 6,3fache Vergrößerung)**



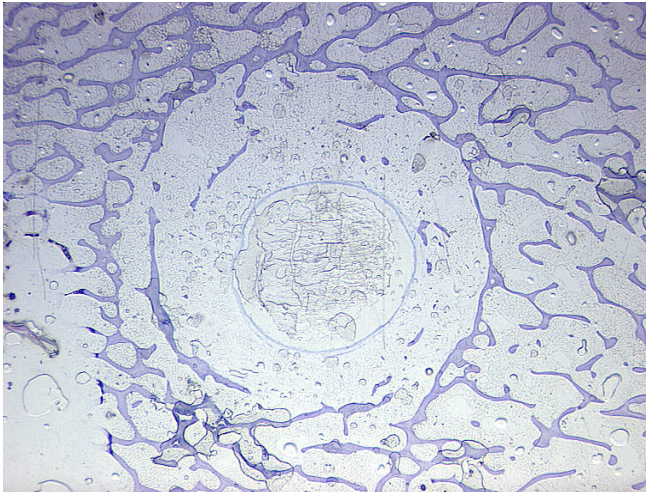
**Abbildung 15: Toluidin-Blau Färbung Gruppe 4 (Hyaluronsäure+BMP2, 6,3fache Vergrößerung)**



**Abbildung 16: Mikroradiografie Gruppe 5 (Hyaluronsäure+bFGF, 6,3fache Vergrößerung)**



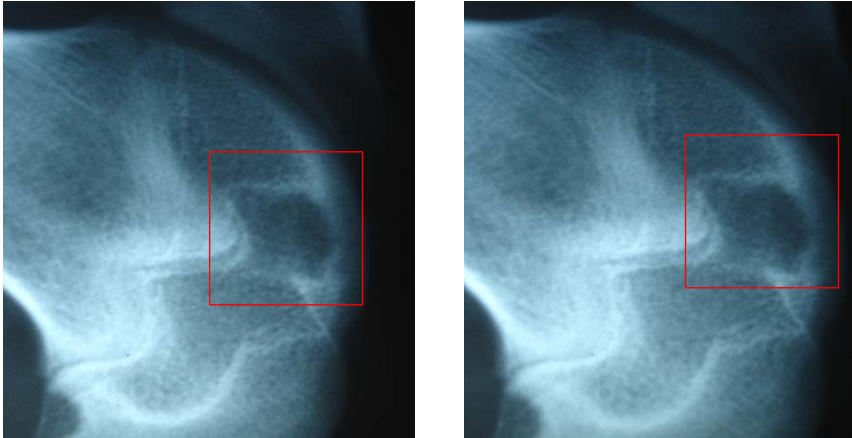
**Abbildung 17: Toluidin-Blau Färbung Gruppe 5 (Hyaluronsäure+bFGF, 6,3fache Vergrößerung)**



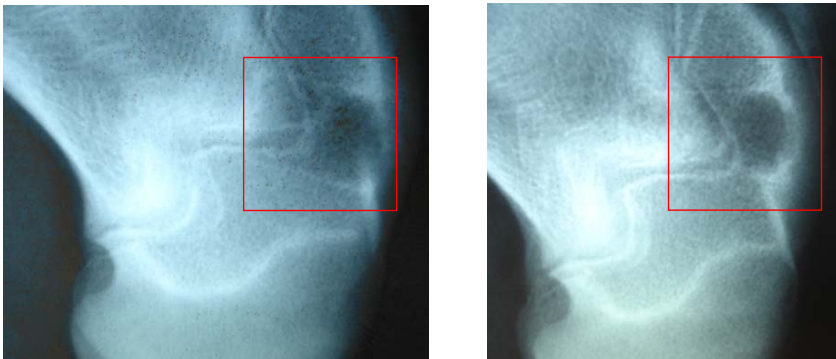
Wie schon bei den Fluoreszenzphotografien ist der ursprünglich gesetzte Defektbereich eindeutig zu identifizieren. Zusammenfassend ist also auch hier keine Knochenneubildung zu verzeichnen.

## **Röntgenbilder**

**Abbildung 18: Defektzylinder distale Femurepiphyse postoperativ (links: Gruppe 3, rechts: Gruppe 5)**



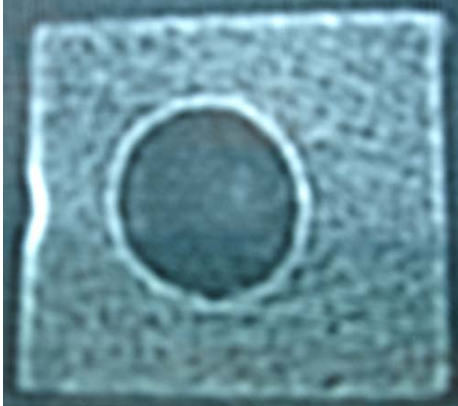
**Abbildung 19: Defektzylinder distale Femurepiphyse 12 Wochen postoperativ (links: Gruppe 3, rechts: Gruppe 5)**



Vergleicht man die postoperativen Röntgenbilder der Gruppe 3 und Gruppe 5 (Hyaluronsäure und Hyaluronsäure+bFGF) mit den Aufnahmen 12 Wochen nach OP sind die Defektzylinder nahezu identisch.

## **CT-Bilder**

**Abbildung 20: Lagekontrolle Defektzylinder Gruppe 4 (Hyaluronsäure+BMP2)**



Der Knochenblock beinhaltet den kompletten Defektausschnitt und ist mit ausreichend altem Knochenmaterial umgeben.

## **Danksagung**

Danken möchte ich Herrn Professor Dr. med. F.U. Niethard, Direktor der Orthopädischen Universitätsklinik der RWTH Aachen, für die Bereitstellung des Themas.

Bedanken möchte ich mich bei Dr. med. C. Niedhart und Dr. med. U. Maus für die sehr engagierte Betreuung der Arbeit, für Ratschläge, Kritik und Unterstützung bei der Durchführung der Versuche und bei der Verfassung dieser Arbeit.

Frau M. Wirtz und Herrn M. Hohenberger, beide MTA im Osteologie-Labor, gebührt mein Dank für die Unterstützung bei praktischen Fragen und der tatkräftigen Unterstützung bei der Durchführung der Versuche.

Frau A. Freund und Frau U. Ernst, Abteilung für Kieferorthopädie und Abteilung für Zahn-, Mund-, und Kieferheilkunde, danke ich für die Anleitung und die Hilfe bei der Verarbeitung der Präparate, der Anfertigung der histologischen Schnitte und der Bereitstellung der Geräte.

Danken möchte ich für die finanzielle Unterstützung und die Bereitstellung der Geräte der IZKF Biomat.

Bei der Zentralabteilung für Versuchstierkunde, vor allem Herrn Stupinski, möchte ich mich für die Beschaffung und Betreuung der Tiere und die Hilfe bei der Durchführung der Operationen bedanken.

Der Klinik für radiologische Diagnostik der RWTH Aachen, insbesondere Herrn Dr. Piroth, möchte ich für die Anfertigung der computertomographischen Untersuchungen danken.

Zuletzt bedanke ich mich noch bei allen anderen Doktoranden aus dem Osteologie Labor für die kollegiale Zusammenarbeit.



# Lebenslauf

Zur Person: Marcus Rehbein  
geboren 20.06.1974 in Hagen (Westfalen), ledig

## Schulischer Werdegang

---

|           |                               |
|-----------|-------------------------------|
| 1980-1984 | Grundschule, Tönisvorst       |
| 1984-1993 | Gymnasium Horkesgath, Krefeld |
| Mai 1993  | Abitur                        |

## Zivildienst

---

|           |                                               |
|-----------|-----------------------------------------------|
| 1993-1994 | ASB Krefeld, Ausbildung zum Rettungssanitäter |
|-----------|-----------------------------------------------|

## Studium

---

|           |                                             |
|-----------|---------------------------------------------|
| 1994-2001 | Studium der Humanmedizin an der RWTH Aachen |
| 2001      | 3. Staatsexamen, Approbation                |

## Berufstätigkeit

---

|                |                                                                                                         |
|----------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 2002-2003      | AiP Unfallchirurgie Klinikum Krefeld (Prof. Dr. med. Meißner)                                           |
| seit Juli 2003 | Assistenzarzt Allgemein-, Thorax-, Visceralchirurgie<br>St. Josef Krh. Moers (Dr. med. Meier zu Eissen) |

## Doktorarbeit

---

|      |                                |
|------|--------------------------------|
| 2008 | Mündliche Prüfung, RWTH Aachen |
|------|--------------------------------|

