

Klinik für Orthopädie und Sportorthopädie  
der Technischen Universität München  
Klinikum rechts der Isar  
(Direktor: Univ. Prof. Dr. R. Gradinger)

## **Untersuchung zur Dynamik der Knochendefektheilung bei der Ratte am standardisierten Bohrlochdefekt in den Femurkondylen**

Markus Volker Keydel

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Medizin der Technischen  
Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines

Doktors der Medizin

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender:	Univ. - Prof. Dr. D. Neumeier
Prüfer der Dissertation:	1. Univ. - Prof. Dr. R. Gradinger
	2. Univ. - Prof. Dr. A. Imhoff

Die Dissertation wurde am 18.10.2001 bei der Technischen Universität München  
eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 13.02.2002 angenommen.

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>EINLEITUNG</b>	<b>6</b>
<b>2</b>	<b>ZIELSETZUNG</b>	<b>6</b>
<b>3</b>	<b>FRAGESTELLUNG</b>	<b>7</b>
<b>4</b>	<b>GRUNDLAGEN</b>	<b>8</b>
<b>4.1</b>	<b>Morphologie des Knochens</b>	<b>8</b>
4.1.1.1	Knochenzellen	8
4.1.1.2	Osteoblasten	9
4.1.1.3	Osteozyten	9
4.1.1.4	Osteoklasten	10
4.1.1.5	Osteoprogenitorzellen	11
4.1.2	Matrix	11
4.1.2.1	Anorganische Bestandteile	12
4.1.2.2	Organische Bestandteile	12
4.1.2.3	Wasser	12
4.1.3	Grenzschichten	13
4.1.3.1	Periost	13
4.1.3.2	Endost	14
<b>4.2</b>	<b>Theorie der Knochentransplantation</b>	<b>14</b>
4.2.1	Osteogenese	14
4.2.2	Osteoinduktion	15
4.2.3	Osteokonduktion	16
4.2.4	Terminologie	16
<b>4.3</b>	<b>Das autogene Spongiosatransplantat</b>	<b>17</b>
<b>4.4</b>	<b>Bohrlochdefekte in der Spongiosa</b>	<b>17</b>
<b>5</b>	<b>EIGENE UNTERSUCHUNGEN</b>	<b>18</b>
<b>5.1</b>	<b>Material und Methoden</b>	<b>18</b>
5.1.1	Tierspezies	18

5.1.2	Versuchsplanung	18
5.1.3	Anästhesie	19
5.1.4	Operatives Vorgehen	19
5.1.5	Postoperative Kontrollen	20
5.1.6	Postmortale Aufarbeitung der Proben	20
5.1.6.1	Allgemeines Vorgehen	20
5.1.6.2	Paraffinhistologie	20
5.1.6.3	Hartschnitthistologie	21
5.1.7	Polychrome Sequenzmarkierung	23
5.1.8	Statistik	24
<b>5.2</b>	<b>Auswertungen</b>	<b>25</b>
5.2.1	Paraffinhistologie	25
5.2.2	Hartschnitthistologie und polychrome Sequenzmarkierung	28
<b>6</b>	<b>ERGEBNISSE</b>	<b>28</b>
<b>6.1</b>	<b>Spongiosatransplantat am Femurkondylus</b>	<b>28</b>
6.1.1	Paraffinhistologie	28
6.1.2	Hartschnitthistologie und polychrome Sequenzmarkierung	31
<b>6.2</b>	<b>Leerdeфекt am Femurkondylus</b>	<b>32</b>
6.2.1	Paraffinhistologie	32
6.2.2	Hartschnitthistologie und polychrome Sequenzmarkierung	35
<b>7</b>	<b>VERGLEICH ZWISCHEN DEN TIERARTEN</b>	<b>35</b>
<b>8</b>	<b>DISKUSSION</b>	<b>38</b>
8.1	Diskussion der Methoden	38
8.2	Diskussion der histologischen Auswertungen	42
<b>9</b>	<b>SCHLUßFOLGERUNG</b>	<b>44</b>
<b>10</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG</b>	<b>45</b>
<b>11</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS</b>	<b>46</b>

<b>12</b>	<b>ABBILDUNGSVERZEICHNIS</b>	<b>55</b>
<b>13</b>	<b>TABELLENVERZEICHNIS</b>	<b>56</b>
<b>14</b>	<b>DANKSAGUNGEN</b>	<b>57</b>
<b>15</b>	<b>LEBENS LAUF</b>	<b>58</b>

## Abkürzungsverzeichnis

bzw.	beziehungsweise
°C	Grad Celsius
ca.	circa
g	Gramm
kg	Kilogramm
KG	Körpergewicht
µm	Mikrometer
mg	Milligramm
ml	Milliliter
mm	Millimeter
nm	Nanometer
o.g.	oben genannt
S.	Seite
sog.	sogenannt
z.B.	zum Beispiel

## **1 Einleitung**

Viele Disziplinen der operativen Medizin stehen vor dem Problem eines ossären Defektes. Diese Defekte können angeboren, erworben oder durch den Operateur hervorgerufen sein. Viele Materialien wurden und werden zur Auffüllung dieser Defekte verwendet. Die herausragendsten Eigenschaften zur Überbrückung dieser Defekte hat das körpereigene Knochentransplantat (autogenes Transplantat). Alle anderen verwendeten Materialien müssen sich, nicht zuletzt seit den Untersuchungen von MATTI 1932, an diesem „Golden Standard“ messen lassen. Ein nicht unwesentliches Problem dabei stellt die begrenzte Menge des zur Verfügung stehenden autogenen Knochens dar. Daher muß bei großen Defekten oft auf allogenen Knochen oder auf Knochenersatzmaterialien zurückgegriffen werden. Viele Untersuchungen wurden in der Vergangenheit zur Einheilung der verschiedensten Materialien durchgeführt. Wegen der unterschiedlichen Versuchsanordnungen, betreffend Tierart, Material, Menge des Materials, Lokalisation der Implantation und Größe des Defektes ist, ein Vergleich der einzelnen Untersuchungen nur schwer möglich.

## **2 Zielsetzung**

Die vorliegende Arbeit ist Teil eines Gesamtversuches. Dieser hat zum Ziel, anhand eines Interspeziesvergleiches festzustellen, welche Tierart sich für die Untersuchung der Dynamik der Defektheilung am besten eignet. Ausgewählt wurden die vier am häufigsten, für Versuche der Knochentransplantateinheilung, verwendeten Tierspezies Schaf, Schwein, Kaninchen und Ratte. Anhand des Vergleiches der einzelnen Tiergruppen soll es möglich werden, abhängig von den unterschiedlichen Regenerationspotenzen, sowohl das ideale Tier, als auch den idealen Zeitpunkt für eine möglichst differenzierte Aussage über die jeweilige Versuchsfragestellung zu erhalten. Dies ist notwendig, da in der Vergangenheit zwar viele Versuche zur Einheilung von Kortikalis und/oder Spongiosa in Knochendefekten durchgeführt

wurden, bei vielen Versuchen aber unterschiedliche Parameter verwendet wurden. Das führt dazu, daß die unterschiedlichen Versuche nicht miteinander vergleichbar sind, und somit keine gültige Aussage über die Dynamik der Defektheilung getroffen werden kann. Vor allem die Regenerationsleistung der verschiedenen Spezies in Bezug auf die Knochenneubildung wird in der Literatur völlig unterschiedlich beurteilt (KATTHAGEN 1986 S. 58) und es kommt immer wieder die Diskussion auf, ob bei der verwendeten Spezies nicht jeder Defekt spontan verheilt (KATTHAGEN 1986 S. 57).

Bei der Durchführung dieser Versuchsserie wurden an den verschiedenen Spezies genau definierte und standardisierte Defekte transkondylär an beiden Femura gesetzt, wie dies MAATZ in seiner Arbeit 1954 beschrieben hat. Die Größe der Defekte wurde auf die Größe des jeweiligen Versuchstieres abgestimmt (KATTHAGEN 1986 S. 146). Auf der einen Seite wurde Spongiosa in den Defekt gefüllt, die andere Seite diente als Leerdefekt der Kontrolle. Die Auswertung erfolgte anhand von histologischen Paraffin- und Hartschnitten. Die Großtiere wurden zusätzlich mit verschiedenen Verfahren der Bildgebung (Röntgen, Kontaktröntgen, Kernspintomographie, Szintigraphie) nachuntersucht.

### **3 Fragestellung**

Die Fragestellung bei dem hier vorliegenden Teilbereich des oben erwähnten Interspeziesvergleiches ist die Beurteilung der Knochendefektheilung der Versuchsspezies Ratte anhand von standardisierten Defekten in den Femurkondylen. Es soll eine Aussage darüber getroffen werden, ob und in welcher Form die Ratte geeignet ist, als Spezies für Versuche zur Spongiosaeinheilung zu dienen. Die Auswertung erfolgte anhand der im Protokoll des Gesamtversuches festgelegten Parameter.

## 4 Grundlagen

### 4.1 Morphologie des Knochens

Lange Zeit galt der Knochen wegen seiner enormen, angeblichen Rigidität und Härte als avitales Gewebe. Erst spät erkannte man, daß der Knochen wegen seiner ständig ablaufenden An- und Umbauprozesse eines der produktivsten Gewebe des menschlichen Körpers darstellt (Schoch 1995 S. 12). Die vielseitigen Funktionen des Knochens beinhalten Stütz- und Schutzfunktionen, Aufgaben in den metabolischen Regelkreisen des Körpers und sie bieten Ansatzpunkte und Hebel für die Muskulatur, um die Fortbewegung zu ermöglichen.

Es können

- lange Knochen (z. B. Femur, Humerus)
- kurze Knochen (z. B. Wirbel, Handwurzel)
- platte Knochen (z. B. Schädelkalotte, Schulterblatt)

unterschieden werden. Jeder Knochen besteht aus einer Substantia compacta, die als äußere Schicht den Knochen umgibt (= Kortikalis), und einer Substantia spongiosa, die im Inneren ein mit zum Teil zell- und zum Teil flüssigkeitsgefülltes, schwammartiges Balkenwerk bildet. Die jeweiligen Grenzschichten bilden das Periost, das den Knochen außen umgibt, und das Endost, das den Knochen innen zum Markraum hin bedeckt. Die langen Röhrenknochen sind aufgebaut in einen diaphysären Teil und an den beiden Enden jeweils einen metaphysären und einen epiphysären Teil. Zusätzlich können apophysäre Anbauten vorhanden sein.

#### 4.1.1.1 Knochenzellen

Vier verschiedenen Zellformen sind bekannt:

- Osteoprogenitorzellen (Vorläuferzellen)
- Osteoblasten

- Osteozyten
- Osteoklasten

#### **4.1.1.2 Osteoblasten**

Osteoblasten sind für die Synthese der organischen Bestandteile der Knochengrundsubstanz (Osteoid) verantwortlich, nämlich Typ-I-Kollagen, Proteoglykane und Glykoproteine. Außerdem weisen sie einen hohen Anteil an Osteocalcin und an alkalischer Phosphatase auf (KECK 1989 S. 6), mit dessen Hilfe sie auf die Kalzifizierungsprozesse einwirken (JEE 1983 S. 214). Die Steuerung der Osteoblasten erfolgt durch das Parathormon, den Epidermal Growth Faktor und das 1,25 - Dihydroxicholecalciferol (KECK 1986 S. 7). Bei Bedarf werden sie aus den Osteoprogenitorzellen gebildet. Anzutreffen sind die Osteoblasten als monozelluläre Schicht an der Oberfläche von Knochenbälkchen. In der Synthesephase haben sie eine kubische bis hochprismatische Form, die sich bei Abnahme der Syntheseaktivität abflacht. Sie haben feine zytoplasmatische Fortsätze, mit denen sie untereinander in Verbindung stehen. Sie verfügen über ein gut entwickeltes rauhes endoplasmatisches Retikulum und einen deutlich ausgeprägten Golgi-Apparat (JUNQUEIRA 1991 S. 192). Osteoblasten sind polarisierte Zellen. Der große, runde Zellkern liegt auf der der Matrix abgewandten Seite. Die Abgabe der Syntheseprodukte erfolgt dort, wo die Zelle mit der Knochengrundsubstanz in Berührung steht, durch Abschnürung von Matrixvesikeln. Die Zellorganellen liegen zwischen Zellkern und Abgabeseite.

#### **4.1.1.3 Osteozyten**

Die Aufgabe der Osteozyten liegt in der Erhaltung der Knochenmatrix (JUNQUEIRA 1991 S. 192) und in der Feinregulierung des Kalzium- und Phosphatregelkreises (VITALLI 1970 S. 24 u. S 35). Osteozyten gehen aus Osteoblasten hervor, wenn diese vollständig von Knochengrundsubstanz umgeben sind und ihre Synthesephase beendet haben. Untereinander stehen die Osteozyten durch feine, filopodienartige Fortsätze in Verbindung, die sich in radiär von der

Knochenhöhle ausgehenden Kanälen befinden und dem interzellulären Transport von Ionen und kleinen Molekülen dienen. Ihr Zelleib ist flach und mandelförmig. Sie haben vergleichsweise wenig rauhes endoplasmatisches Retikulum, einen kleinen Golgi-Apparat und einen dichteren chromatinhaltigen Zellkern. Dies weist auf eine verminderte Syntheseleistung hin. BELANGER (1969 S. 3) schreibt den Osteozyten auch eine osteolytische Funktion zu.

#### **4.1.1.4 Osteoklasten**

Die Aufgabe der Osteoklasten ist die Resorption von Knochen. Dabei kann ein Osteoklast pro Zeiteinheit die gleiche Menge an Knochengewebe abbauen, die von 100-150 Osteoblasten aufgebaut wurde (JUNQUEIRA 1991 S. 194). Sie liegen in Einbuchtungen der Grundsubstanz (sogenannte Howship'schen Lakunen), die ihre eigenen Resorptionshöhlen darstellen (GÖTHLIN 1976 S. 1). Die Osteoklasten sind bewegliche Rießenzellen mit einem stark verzweigtem azidophilen Zelleib, einer Größe von bis zu 100µm und 50 oder mehr Zellkernen. Elektronenmikroskopisch stellt sich die der Knochengrundsubstanz zugewandte Seite als „ruffled border“ mit unregelmäßigen, vielfach verzweigten Auffaltungen dar (JUNQUEIRA 1991 S. 193). Diese Struktur bewirkt eine Vergrößerung der Oberfläche an der aktiven Resorptionsseite. Die Regulation der Knochenresorption erfolgt hormonell. Eine Steigerung der Resorption erfolgt durch das Parathormon und das 1,25-Dihydroxicholecalciferol (RAISZ 1972 S. 750). Die Hemmung erfolgt durch Calcitonin (KECK 1988 S. 27). Weiter modulierende Faktoren sind Makrophagen und Monozyten, die bei der Produktion des Osteoklasten aktivierenden Faktors eine entscheidende Rolle spielen (RUTHERFORD 1983 S. 178; YONEDA 1979 S. 338). Eine enge Verbindung besteht während der Resorptionsphase zwischen Mediatoren des Immunsystems und den Knochenzellen (KECK 1989 S. 3; HOROWITZ 1991 S. 1165). Ebenso scheinen, nach Untersuchungen von GOWEN, Interleukin-1, Prostaglandine und der Tumor Necrosis Factor an der Regulation der Osteoklasten beteiligt zu sein (GOWEN 1983 S. 642). Die histogenetische Herkunft der Osteoklasten wird unterschiedlich beurteilt. Die frühere Meinung von YOUNG (1962 S. 357), Osteoblasten und Osteoklasten würden sich aus gemeinsamen

Osteoprogenitorzellen entwickeln, wurde wieder verlassen. Andere Hypothesen gehen davon aus, daß der Osteoklast aus einem Präosteoklasten unbekannter Herkunft hervorgeht (HORTON 1984 S. 281). KECK hat Hinweise gefunden, daß Osteoklasten aus Stammzellen der Monozyten-Makrophagenreihe stammen und somit zum mononukleären Phagozytosesystem gehören (KECK 1989 S. 3; JUNQUEIRA 1991 S. 195).

#### **4.1.1.5 Osteoprogenitorzellen**

Die Aufgabe der Osteoprogenitorzellen ist es, sich bei Bedarf in Osteoblasten zu differenzieren. Sie sind während des ganzen Lebens im Knochen vorhanden und liegen in der Nähe der äußeren und inneren Knochenoberfläche, sowie in den Havers'schen Kanälen. Sie sind mesenchymalen Ursprungs und sehr proliferationsfreudig. Histologisch sind sie relativ undifferenziert. Sie haben eine spindelförmige Gestalt, wenig rauhes endoplasmatisches Retikulum und einen kleinen Golgi-Apparat. Das Ursprungsgewebe ist wahrscheinlich das hämatopoetische Knochenmarksstroma (WLODARSKI 1990 S. 283), das in der Kambiumschicht des Periosts, dem Endost und in den Osteonen vorkommt (OWEN 1980 S. 1077). URIST siedelt die Osteoprogenitorzellen im mesenchymalen perivaskulären Gewebe an. Durch den Einfluß verschiedenen Stimuli wird die Zelldifferenzierung angeregt. Auslöser hierfür können chemische (Bone Morphogenetic Protein, Osteogenin, Alkohol), physikalische und elektrische Reize sein (URIST 1983 S. 680, JUSTUS 1970 S. 222, BASSETT 1967 S. 268).

#### **4.1.2 Matrix**

Die Matrix wird auch als Interzellulärsubstanz oder Knochengrundsubstanz bezeichnet. Sie besteht etwa zu 50% aus Mineralien (anorganische Bestandteile) und etwa zu 25 % aus organischen Verbindungen. Die restlichen ca. 25% sind Wasser (JUNQUEIRA 1991 S.195).

#### **4.1.2.1 Anorganische Bestandteile**

Die anorganischen Bestandteile des Knochens machen ca. 75% des Knochengewichts aber nur 50% des Knochenvolumens aus. Die häufigsten anzutreffenden Bestandteile sind anorganisches Phosphat (ca. 50%) und Kalzium (ca. 35%). Der Rest beinhaltet Zitrat, Karbonat, Nitrat, Natrium, Magnesium und Fluor. Die Mineralien liegen im Körper in Form von Apatitkristallen, überwiegend Hydroxylapatit ( $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ ), vor (JUNQUEIRA 1991 S. 195). Ein Apatit ist ein hexagonal gebauter Kristall aus Kalziumphosphatverbindungen. Diese Hydroxylapatite sind in einem Abstand von 60-70nm längs der Kollagenfibrillen angeordnet und werden durch die umgebende Grundsubstanz (nichtkollagene Proteine) stabilisiert. Dadurch wird die enorme Härte des Knochens erreicht (JEE 1983 S. 213).

#### **4.1.2.2 Organische Bestandteile**

JEE definiert die organische Matrix des Knochens als eine extrazelluläre organische Phase aus Protein, Glykoprotein und Polysacchariden, die von osteogenen Zellen sezerniert wird und diese einschließt (JEE 1983 S. 212). Die überwiegende Substanz stellt mit 90-95% das Kollagen dar, das in Form von kollagenen Fasern vorliegt (JUNQUEIRA 1991 S. 195). Von diesem Kollagen entfallen ca. 90% auf Kollagen-Typ I, weitere 5% verteilen sich auf die Typen III, IV und V (FRANKE 1987 S. 30). Die verbleibenden 5% beinhalten verschiedene nichtkollagene Proteine, wie z. B. Osteocalcin, Osteonectin (ROMANOWSKI 1990 S. 353) und Bone Morphogenetic Protein (URIST 1989 S. 2).

#### **4.1.2.3 Wasser**

Durch die Hydratisierung der oberflächlichen Ionen des Hydroxylapatits entsteht ein Hydratmantel um die Apatitkristalle, der die Voraussetzung für einen Ionenaustausch zwischen den Kristallen und der Umgebung schafft (JUNQUEIRA 1991 S. 195).

### 4.1.3 Grenzschichten

Zwei Bindegewebsschichten scheiden den Knochen ein:

- das *Periost*, das den Knochen von außen umgibt und nur dort fehlt, wo Knorpel dem Knochen anliegt. Es ist reich an Nerven und führt die der Ernährung des Knochen dienenden Gefäße.
- das *Endost*, das dem Knochen von innen anliegt und engen Kontakt zum Knochenmark hat.

An den Stellen des Knochens, an denen die oberflächliche Bindegewebsschicht fehlt unterliegt der Knochen der Resorption. Es treten Osteoklasten auf, die den Knochen abbauen. Diese Tatsache spielt zum Beispiel bei Frakturen oder chirurgischen Eingriffen am Knochen eine große Rolle.

#### 4.1.3.1 Periost

Das Periost ist aus zwei Schichten (JUNQUEIRA 1991 S. 202) aufgebaut:

- Das *Stratum fibrosum* ist die äußere, dem Knochen abgewandte Schicht. Es ist sehr faserreich und enthält zusätzlich Fibroblasten.
- Das *Stratum osteogenicum*, auch Kambiumschicht genannt, ist eine sehr zell-, nerven- und gefäßreiche Schicht, die außer Fibroblasten noch Knochenvorläuferzellen besitzt, durch die es osteogenetisch wirkt.

Das Periost wird durch sogenannte Sharpey-Fasern - Bündel periostaler Kollagenfasern, die aus dem Stratum fibrosum kommend in die Knochenmatrix eintreten - am Knochen fixiert. Auf Grund seines Nervenreichtums ist das Periost sehr schmerzempfindlich. Durch die Canales perforantes und Foramina nutricia treten kleinere und größere Periostgefäße in den Knochen ein und tragen so wesentlich zur Ernährung des Knochens bei. Das äußere Drittel des Knochens wird vom Periost versorgt, die inneren zwei Drittel jedoch vom medullären Gefäßsystem. Bei einer

Verletzung des Periosts kann die Kambiumschicht aktiviert werden und führt dann zur Knorpel- oder Knochenneubildung (WLODARSKI 1989 S. 271). Bei der autogenen Transplantation wird dem Periost von CRAIG GRAY sowohl beim Spongiosa- (CRAIG GRAY 1982 S.268) als auch beim Kortikalistransplantat (CRAIG GRAY 1979 S. 230) ca. ein Drittel der osteogenetischen Fähigkeit zugeschrieben.

#### **4.1.3.2 Endost**

Das Endost besteht aus einer Schicht von abgeflachten Bindegewebszellen, die den Knochen an der inneren Oberfläche einschließlich der Spongiosabälkchen bedecken und auch die Knochenkanälchen (Canales perforantes, Canales centrales) auskleiden (JUNQUEIRA 1991 S. 202). Nach YEE bilden osteoblastenähnliche Zellen den Hauptbestandteil des Endosts (YEE 1983 S. 576). Kollagenfasern findet man im Endost in der Regel nicht. 60% der osteogenetischen Potenz bei der Knochentransplantation wird durch CRAIG GRAY (1979 S. 225, 1982 S. 270) den endostalen Zellen und dem Knochenmark zugeschrieben.

## **4.2 Theorie der Knochentransplantation**

Bei der Knochentransplantation kommen drei verschiedene Prinzipien der Knochenneubildung vor, die einzeln oder gemeinsam auftreten können:

- Osteogenese
- Osteoinduktion
- Osteokonduktion

### **4.2.1 Osteogenese**

Die Osteogenese bezeichnet eine von überlebenden Zellen des Transplantates ausgehende Knochenneubildung.

Sie geht von Zellen der Knochenoberfläche aus, nämlich Osteoblasten und Osteoprogenitorzellen (Kattagen 1986 S. 17), die aus dem Knochenmark stammen (NADE 1977 S 577) . Es konnte nachgewiesen werden, daß Knochenmark alleine nach sieben bis acht Tagen zur Knochenneubildung führen kann (NADE 1977 S 577). Die im Inneren der Knochenlamellen des Transplantates gelegenen Osteozyten sterben dagegen nach BURWELL (1964 S.112) bereits nach wenigen Wochen wegen unzureichender Nährstoffversorgung ab und hinterlassen leere Lakunen (URIST 1980 S. 332). Ein entscheidender Faktor bei der Transplantation von Knochengewebe spielt die abgelaufene Zeit und die Aufbewahrungsart. BOHR (1968 S. 873) wies nach, daß Luft eine negative Auswirkung auf den zu transplantierenden Knochen hat, dieser in physiologischer Kochsalzlösung aber über eine Stunde gelagert werden kann. DRENAUS (1988 S. 165) konnte diese Feststellung noch präzisieren, indem er nachwies, daß sich die Zelldichte autogener Spongiosa bereits nach einer Luftexposition von 15 Minuten um 50 % verringert.

#### **4.2.2 Osteoinduktion**

Die Osteoinduktion bezeichnet eine Knochenneubildung ausgehend von einem Reiz des Transplantates, der im heterotopen Lager die Differenzierung von mesenchymalen Zellen zu knorpel- und knochenbildenden Zellen anregt.

URIST konnte 1965 (S. 897) eine matrixinduzierte Knochenneubildung nachweisen. 1971 (S. 1392) fand er erste Anhaltspunkte für das Vorhandensein eines Bone Morphogenetic Protein, das er 1979 (S. 1828) schließlich isolieren konnte. Diesem Protein sprach er die Fähigkeit zu, mesenchymale Zellen in Chondro- und Osteoprogenitorzellen und letztendlich in Chondro- und Osteoblasten zu differenzieren (URIST 1980 S. 335). Die wichtigsten Schritte bei der Osteoinduktion sind die Chemotaxis, die Mitose und die Zelldifferenzierung (REDDI 1987 S. 207). THIELEMANN (1982 S. 222) sieht den Vorteil der Osteoinduktion in einer vollständigen Defektauffüllung mit neugebildetem Knochen und der vollständigen Resorption des implantierten Gewebes.

### 4.2.3 Osteokonduktion

Die Osteokonduktion bezeichnet eine Knochenneubildung bei der das Gerüst des Transplantates als dreidimensionale Leitschiene für die Einwanderung von Gefäßen und Osteoprogenitorzellen aus dem Lagerknochen dient.

Eine entscheidende Rolle spielt die Osteokonduktion nach GLOWACKI (1981 S. 71) bei der allogenen Knochentransplantation. BURCHARDT (1987 S. 188) schreibt die Fähigkeit zur Osteokonduktion auch den Knochenersatzmaterialien zu, mit der Einschränkung, daß Abstriche bei der Integrationsdauer gemacht werden müssen (BURCHARDT 1983 S. 29).

### 4.2.4 Terminologie

Die international anerkannten Begriffe für die Art und Herkunft eines Transplantates wurden von GORLER, sowie RUSSEL und MONACO geprägt und von KATTHAGEN 1986 in die Terminologie eingeführt. Trotz dieser Empfehlungen finden sich in der Literatur Begriffe, die veraltet sind und aufgrund dessen für Verwirrung sorgen können. Die in dieser Arbeit verwendeten und international empfohlenen Begriffe sind in Tabelle 1 zusammengestellt.

<b>Begriff</b>	<b>Definition</b>
autogen	Spender = Empfänger
isogen	Transplantation zwischen histokompatiblen Individuen gleicher Spezies (Zwillinge)
allogen	Transplantation zwischen histoinkompatiblen Individuen gleicher Spezies
xenogen	Transplantation zwischen Individuen unterschiedlicher Spezies
alloplastisch	synthetische Fremdmaterialien

Tabelle 1: Internationale Terminologie der Transplantatart.

### **4.3 Das autogene Spongiosatransplantat**

MATTI konnte 1932 nachweisen, daß die autogene Spongiosa eine Transplantation überleben kann. Auf diesen Ergebnissen basierten alle weiteren Versuche zur Transplantatregeneration. 1954 entwickelte MAATZ den sogenannten „Spongiosatest“. Er brachte dabei einen Stanzzylinder in die Femurkondylen von Hunden ein und erkannte, daß dem autogenen Transplantat eine überragende Rolle im Vergleich zu allen anderen gebräuchlichen Materialien zukommt (MAATZ 1954). Ebenfalls 1954 führte ALGIRE die Milliporediffusionskammer ein, die 1963 von ROSIN zur Untersuchung der Knochenneubildung weiterentwickelt wurde (ALGIRE 1954, ROSIN 1963). SEGMÜLLER konnte mit dieser Methode zeigen, daß spongiöses Material sich in alle drei Stützgewebe differenzieren kann, und das Endstadium dieser Entwicklung der Faserknochen darstellt (SEGMÜLLER 1967). KATTHAGEN stellt zusammenfassend fest, daß die osteogenetische Stammzelle im autogenen Spongiosatransplantat überleben und daß von dem autogenen Spongiosatransplantat selbst eine osteogenetische Knochenregeneration ausgeht. Somit kommt der autogenen Spongiosa die überragende Bedeutung bei der Knochen transplantation zu. Dies wird durch die klinischen Anwendungen bei der verzögerten Bruchheilung, bei Pseudarthrosen, bei Knochendefekten und sogar im Infekt bestätigt (KATTHAGEN 1986).

### **4.4 Bohrlochdefekte in der Spongiosa**

Schon in der Vergangenheit wurden Defekte in einem spongiösen Lagerknochen erzeugt, um das Einheilverhalten von ossären Transplantaten zu beobachten. 1954 hat MAATZ einen Defekt mit 5mm Durchmesser erzeugt, um die Wertigkeit knöcherner Transplantate zu prüfen (MAATZ 1954 S. 723). Die Kritik an Versuchen dieser Art war, daß sich Defekte mit zu geringem Durchmesser spontan verschließen (HOPF 1957, SCHWEIBERER 1970 S. 67). Dies führt zu unbrauchbaren Aussagen über die zu testende Substanz, da es ein zu gutes Einheilverhalten vorspiegelt. Aus diesem Grund wählte Schweiberer bei seinen Versuchen am Tibiakopf des Hundes einen Defektdurchmesser von 10mm. KATTAGEN (1986 S. 54) hat in seinen Studien

mit Knochenersatzmaterialien am Kaninchen bei einem Defekt von 6mm keine spontane Durchbauung feststellen können während SCHOCH (1994 S. 131) schon bei einem Defekt von 4mm nach vier Wochen nur eine Verstärkung am Rand des Defektes feststellen konnte. In unseren Versuchen haben wir, angelehnt an die Angaben von SCHOCH (1994 S. 34), die Defektgröße mit einem Drittel des mittleren Kondylendurchmessers gewählt.

## **5 Eigene Untersuchungen**

### **5.1 Material und Methoden**

#### **5.1.1 Tierspezies**

Verwendet werden 18 männliche Ratten vom Stamm Wistar mit einem Gewicht von 500-600g. Die Tiere wurden von der Firma Versuchstierkunde und -zucht Dr. Karl Thomae GmbH Biberach an der Riß bezogen. Verwendung fanden nur Tiere, die bei einer orientierenden Inspektion durch einen Veterinärarzt keine pathologischen Befunde zeigten und keine Auffälligkeiten im Verhalten boten. Die Haltung der Tiere erfolgt in Makrolonkäfigen bei Fütterung ad libidum.

#### **5.1.2 Versuchsplanung**

Die 18 Tiere wurden randomisiert auf drei Gruppen verteilt (siehe Tabelle 2). Die Überlebenszeiten waren für Gruppe 1 zwei Wochen, für Gruppe 2 vier Wochen und für Gruppe 3 16 Wochen. Alle Tiere wurden von dem gleichen Chirurgen operiert. Drei Tiere je Gruppe wurden der Paraffinhistologie zugeführt, die anderen Tiere wurden nach festgelegtem Schema mit fluoreszierenden Farbstoffen markiert und histologisch mit der Hartschnittechnik untersucht. Die genaue Beschreibung der einzelnen Techniken folgt bei dem jeweiligen Unterpunkt. Am Ende der Versuchszeit wurden die Tiere mit einer Überdosis Pentobarbital (Narcoren®) geopfert.

	<b>Tiernummern</b>	<b>Überlebenszeiten</b>
Gruppe 1	5(911), 11(917), 12(918), 13(919), 14(920), 18(924)	2 Wochen
Gruppe 2	8(914), 9(915), 10(916), 15(921), 16(922), 17(923)	4 Wochen
Gruppe 3	1(907), 2(908), 3(909), 4(910), 6(912), 7(913)	16 Wochen

Tabelle 2: Gruppeneinteilung und Überlebenszeiten.

### **5.1.3 Anästhesie**

Sämtliche Eingriffe erfolgten ausnahmslos in Allgemeinanästhesie unter aseptischen Bedingungen. Hierbei erhielten die Tiere unter manueller Ruhighaltung („physical restraint“) eine Kombination aus Ketamin (Ketanest® 100mg/kg KG) und Xylazin (Rompun® 5mg/kg KG) intramuskulär in den Oberschenkel injiziert (ERHARDT 1986 S. 336). Bei Bedarf wurde eine geringere Dosis der gleichen Mischung nachgespritzt.

### **5.1.4 Operatives Vorgehen**

Nach Eintreten der Anästhesie wurden die Tiere an beiden Femura rasiert und in Bauchlage auf dem OP-Tisch fixiert. Nach Abwaschen mit einem handelsüblichen Hautdesinfektionsmittel und Abdecken mit sterilen Tüchern erfolgte zunächst die Operation des linken Femurs. Der Zugang zum lateralen Femurkondylus wurde durch eine ca. 5-10mm lange Hautinzision erreicht. Es wurde eine Bohrung durch beide (laterale und mediale) Femurkondylen mit einem Durchmesser von 2mm unter Schonung der Kollateralbandursprünge durchgeführt. Die gewonnene Spongiosa wurde in einer mit physiologischer Kochsalzlösung getränkten Kompresse asserviert. Auf der Gegenseite wurde identisch vorgegangen. Die gewonnene Spongiosa beider Seiten wurde gemischt und in den Bohrlochdefekt des rechten Femurs eingebracht. Auf der linken Seite blieb der Leerdefekt bestehen. Die Operationsdauer pro Ratte betrug ca. 20min.

Für die Bohrungen waren laut Versuchsprotokoll ein Drittel der Femurkondylenbreite vorgesehen. Die Festlegung dieses Maßes erfolgte durch Messungen an mehreren Rattenkadavern (WOLTER 1995 S. 17).

### **5.1.5 Postoperative Kontrollen**

Postoperativ wurden die Tiere auf Zellstoff gelagert und dieser erst nach vollständigem Abklingen der Anästhesie durch das übliche Sägemehl ersetzt. Es erfolgte täglich eine klinische Kontrolle der Tiere, wobei besonders auf Wundinfektionen und Nahtinsuffizienzen geachtet wurde.

### **5.1.6 Postmortale Aufarbeitung der Proben**

#### **5.1.6.1 Allgemeines Vorgehen**

Am Ende der Versuchszeit werden die Tiere in Allgemeinanästhesie versetzt und mit einer Überdosis Pentobarbital (Narcofen®) geopfert. Anschließend werden die hinteren Extremitäten in der Hüfte und im Kniegelenk abgesetzt, vorsichtig von den Weichteilen befreit und je nach vorgesehener Verwendung laut Versuchsplan entweder der Paraffin- oder der Hartschnitthistologie zugeführt.

#### **5.1.6.2 Paraffinhistologie**

Zunächst müssen die gewonnenen Proben fixiert werden. Dazu wird eine 6%ige, neutralisierte Formalinlösung benutzt. Das Verhältnis Formalin zu Gewebe soll etwa 10:1 sein, um eine vollständige Durchdringung des Gewebes mit dem Formalin zu gewährleisten. Nach vier Tagen wird die alte Formalinlösung durch eine frische ersetzt. Nach vollständiger Fixation kann mit dem Entkalken der Proben begonnen werden. Zunächst muß das Formalin abgegossen werden und anschließend die Proben unter fließendem Wasser ca. eine Stunde gewässert werden. Danach werden die Proben, im Verhältnis 1:10, in Entkalkungslösung nach PLANK (PLANK 1952 S. 252-254) gegeben:

Inhaltsstoff	Menge
Aluminiumchlorid	700g
Salzsäure 32%	980ml
Ameisensäure 98%	484ml
Wasser	ad 10l

Tabelle 3: Zusammensetzung der Entkalkungslösung nach Plank.

Diese Lösung muß täglich gewechselt werden. Nach einer Woche werden die Proben erneut kurz gewässert, bevor sie für ca. 12 Stunden in einer Neutralisationlösung aufbewahrt werden. Nach dieser Zeit werden die Proben, zur Verbesserung der Anfärbbarkeit, erneut über mehrere Stunden gewässert. Danach wird das Gewebe bis zur Einbettung mit Paraffin in 6%igem Formalin gelagert. Zur histologischen Aufarbeitung werden die Femura in kleinere Gewebestücke geteilt, diese einzeln in Paraffin eingebettet und anschließend mit einem Rotationsmikrotom in ca. 8µm dicke Scheiben geschnitten. Diese Scheiben werden auf einen Objektträger aufgebracht und angefärbt. Die Färbungen erfolgten mit Hämatoxylin-Eosin, Elastica van Gieson und Elastica-Ladewig. Die Schnitte wurden im Bereich der Femurkondylen senkrecht zum Bohrkanal angefertigt.

### 5.1.6.3 Hartschnitthistologie

Um die Fluoreszenzfarbstoffe der polychromen Sequenzmarkierung mikroskopisch untersuchen zu können, muß eine sog. Hartschnitthistologie der Gewebeproben angefertigt werden. Dazu werden die Proben in einen Kunststoff, wie z. B. Methylmetacrylat eingebettet, um anschließend in dünne Scheiben geschliffen zu werden, die dann unter fluoreszierendem Licht im Mikroskop betrachtet werden können. Der Vorteil dieser Methode ist zum einen die Beurteilung der zu bestimmten Zeitpunkten injizierten Fluoreszenzfarbstoffe, zum anderen ist es dadurch möglich, die mineralischen Bestandteile des Knochens zu erhalten und zu beurteilen.

Die für die Hartschnitthistologie vorgesehenen Femura werden nach der Opferung zunächst in gepuffertem 6%igem Formalin für sieben Tage fixiert. Nach dieser Zeit

werden die Proben für 60min unter fließendem Wasser gewässert, um kristalline Niederschläge des Fixationsmediums in den fertigen Blöcken zu vermeiden. Danach durchlaufen die Proben eine Alkoholreihe, die dem Entwässern und Entfetten der Proben dient (siehe Tabelle 4).

Äthanol	Dauer
70%	2-4 Tage
80%	2-4 Tage
90%	2-4 Tage
100%	1-2 Tage
100%	1-2 Tage

Tabelle 4: Alkoholreihe zur Entwässerung und Entfettung der Proben.

Nach dem Durchlaufen dieser Alkoholreihe werden die Proben in eine Methylmetacrylat - Lösung eingebettet. Diese Lösung besteht in einem Mischungsverhältnis aus 870ml Methylmetacrylat, 130ml Plastoid N und 23g Benzoyl Peroxid. Methylmetacrylat stellt das eigentliche Einbettmedium dar. Plastoid N ist ein Weichmacher, der das Methylmetacrylat auf die gleiche Härte wie den einzubettenden Knochen bringt. Dies ist wichtig, um beim Schleifvorgang keine Brüche oder Ablösungen an der Kontaktzone zwischen Kunststoff und Knochen zu erhalten. Benzoyl Peroxid dient als Katalysator für die Polymerisationsreaktion. In dieser Lösung werden die Proben zur Infiltration für fünf Tage bei 6°C im Kühlschrank gelagert. Während dieser Zeit wird das Infiltrationsmedium zweimal gewechselt. Zur Einbettung werden die Knochen in ein Glasgefäß gegeben und mit der o.g. Lösung vollständig bedeckt. Zur Polimerisation werden die Gefäße im Brutschrank bei 32°C für sechs Tage gelagert. Danach werden die Proben zur vollständigen Aushärtung bei 70°C für zwölf Stunden „getempert“. Von den so entstandenen Blöcken wird mit einer Bandsäge das überschüssige Methylmetacrylat abgetrennt. Mit einer wassergekühlten Diamantsäge werden die Kondylen senkrecht zum Bohrlochdefekt in zwei bis vier Scheiben geschnitten. Diese werden auf einen Plexiglasobjektträger aufgeklebt, durch ein Naßschleifverfahren manuell auf ca. 80µm Dicke geschliffen,

die Oberfläche poliert und unter einem Auflicht-Fluoreszenz-Mikroskop ausgewertet (BURCK 1982, ROMEIS 1989; SMITH 1979)

### **5.1.7 Polychrome Sequenzmarkierung**

Die polychrome Sequenzmarkierung ist ein Verfahren mit dem sich die dynamischen Umbauvorgänge im Knochen darstellen lassen. Anders als bei radiologischen Verfahren, die immer nur eine isolierte Momentaufnahme wiedergeben können, gestattet es die polychrome Sequenzmarkierung Ort, Zeitpunkt und Umfang von knöchernen Umbauprozessen histologisch sichtbar zu machen. Dies wird möglich durch die Injektion von Fluoreszenzfarbstoffen, die sich farblich unterscheiden und zu bestimmten Zeitpunkten als Bolus appliziert werden. Die Farbstoffe bilden Chelatkomplexe (MILCH 1958 S. 909; MODIS 1969 S. 163), die sich am stärksten entlang der Mineralisationsfronten aktiver Osteone, am mineralisierenden Frakturkallus sowie an Wachstumszonen in den Knochen einlagern, also dort, wo gerade neuer Knochen gebildet wird (SUZUKI u. MATHEWS 1966 S. 60; RAHN u. PERREN 1971 UND 1972; MODIS 1969 S. 163). 1958 hat MILCH (S: 897-910) als erster beschrieben, daß sich Tetrazyklin im lebenden Knochen ablagert und bei mikroskopischer Betrachtung eines Hartschliffes unter ultraviolettem Licht eine gelbe Farbbande an Stellen der Knochenneubildung sichtbar wird. Weitere Farbstoffe kamen durch RAHN und PERREN hinzu, die sowohl das sich orange darstellende Xylenorange als auch den roten Alizarinkomplex einführen. Das von SUZUKI und MATHEWS entdeckte Calcein zeigt eine leuchtend grüne Bande.

Durch die unterschiedlich gefärbten Banden ist eine Differenzierung der einzelnen neugebildeten Knochenabschnitte möglich und man kann somit Rückschlüsse auf die Dynamik der Knochenneubildung ziehen.

Die Markierung der Tiere erfolgten nach folgendem Schema:

<b>Zeitpunkt</b>	<b>Farbstoff</b>	<b>Farbe</b>	<b>Dosis</b>
prae OP	Tetrazyklin	gelb	25 mg / kg KG
1 Wo post OP	Alizarin	rot	30 mg / kg KG
2 Wo post OP	Xylenolorange	orange	90 mg / kg KG
4 Wo post OP	Calcein	grün	5 mg /kg KG
8 Wo post OP	Alizarin	rot	30 mg / kg KG
16 Wo post OP	Tetrazyklin	gelb	25 mg / kg KG

Tabelle 5: Markierungsschema der Fluorchrome.

Es wurden jeweils drei Tiere aus jeder Überlebenszeit ausgewählt:

- zwei Wochen: Tier 911, 917, 918
- vier Wochen: Tier 914, 915, 916
- 16 Wochen: Tier 910, 912, 913

Die Farbstoffe wurden am Tag der Injektion frisch angemischt und mit Hilfe eines vorgeschalteten Filters intramuskulär in die Oberschenkelmuskulatur injiziert.

### **5.1.8 Statistik**

Eine statistische Auswertung der histologischen Ergebnisse ist aufgrund der geringen Tierzahlen pro Gruppe nicht möglich. Die Ergebnisse der histologischen Untersuchungen werden deskriptiv ausgewertet und mittels eines Punktescores tabellarisch und graphisch zur Darstellung gebracht.

## **5.2 Auswertungen**

Die Auswertungskriterien und -schemata für die einzelnen Untersuchungsmethoden wurden im Rahmen des Gesamtprojektes „Spezies-Vergleich der Knochenheilung“ aufeinander abgestimmt und auf die einzelnen Spezies (Ratte, Schaf, Kaninchen, Schwein) übertragen.

### **5.2.1 Paraffinhistologie**

Für die Beurteilung der Proben mit transplantierte Spongiosa wird ein Punktescore verwendet, der von HEIPLE (HEIPLE 1984) und LANE (LANE 1987) entworfen und von SCHOCH (SCHOCH 1994 S. 50) weiterentwickelt wurde. Berücksichtigt werden dabei die Umbauvorgänge der transplantierten Spongiosa, die Veränderungen des Knochenmarks und die schrittweise Abnahme der Größe des Restdefekts (siehe Tabelle 6).

Die Auswertung des Leerdefekts erfolgt durch ein von SCHOCH (SCHOCH 1994 S. 52) entwickeltes Punkteschema, das die Defektauffüllung mit neugebildetem Knochen, die Reorganisation des Hämatoms und die schrittweise Abnahme der Größe des Restdefektes beurteilt (siehe Tabelle 7).

Durch die exakte Einhaltung dieser semiquantitativen Punktescores ist es möglich, alle vier Tierspezies des Gesamtprojektes untereinander vergleichen zu können.

Zusätzlich erfolgt eine deskriptive Beurteilung der vorhandenen histologischen Präparate.

	Punkte
<b>Spongiosa im Lagerknochen</b>	
keine Reaktion	0
beginnende Bildung von Fasergewebe	1
Fasergewebe mit Knochenneubildung	2
Transplantat überwiegend von neuem Knochen umgeben	3
Transplantat resorbiert und durch neuen Knochen ersetzt	4
<b>Knochenmark</b>	
nekrotisch, inaktiv	0
ersetzt durch fibrinöses Material	1
reichlich neues Fasergewebe	2
Fasergewebe mit Fettmark	3
altersentsprechendes Mark	4
<b>Restdefekt</b>	
80 - 100%	0
60 - 80%	1
40 - 60%	2
20 - 40%	3
0 - 20%	4
<b>maximal mögliche Gesamtpunktzahl</b>	<b>12</b>

Tabelle 6: Bewertungsschema des Spongiosatransplantates.

	Punkte
<b>Reaktion des Leerlagers</b>	
keine Reaktion	0
beginnende Bildung von Fasergewebe	1
Fasergewebe mit Knochenneubildung	2
Lager zu über 50% mit neugebildetem Knochen ausgefüllt	3
Lager vollständig mit neugebildetem Knochen ausgefüllt	4
<b>Hämatom</b>	
keine Organisation des Hämatoms	0
beginnende Organisation des Hämatoms	1
zufriedenstellende Organisation des Hämatoms	2
nur noch kleine Restbestandteile des Hämatoms	3
vollständige Reorganisation des Hämatoms	4
<b>Restdefekt</b>	
80 - 100%	0
60 - 80%	1
40 - 60%	2
20 - 40%	3
0 - 20%	4
<b>maximal mögliche Gesamtpunktzahl</b>	<b>12</b>

Tabelle 7: Bewertungsschema des Leerdefekts.

## **5.2.2 Hartschnitthistologie und polychrome Sequenzmarkierung**

Die Auswertung der Hartschnitthistologie erfolgt rein qualitativ-deskriptiv durch Beschreibung der Bandenmuster der Fluoreszenzfarbstoffe unter der UV-Lampe. Das Spongiosatransplantat und der Leerdefekt werden getrennt über den Versuchszeitraum beurteilt.

# **6 Ergebnisse**

## **6.1 Spongiosatransplantat am Femurkondylus**

### **6.1.1 Paraffinhistologie**

Zwei Wochen postoperativ zeigt sich in den Präparaten mit Spongiosatransplantat der Defektbereich angefüllt mit reichlich Bindegewebe. Dieses ist locker und ungerichtet, mit großen abgerundeten Fibroblasten. Eingebettet in das Bindegewebe liegen viele Spongiosafragmente ohne erkennbare vitale Zellen. Vereinzelt sieht man große mehrkernige Osteoklasten in Resorptionslakunen an den Rändern der transplantierten Spongiosa. Zwischen den Fragmenten zeigen sich viele Gefäßanschnitte, die zum Teil radiär ins Zentrum hin ausgerichtet sind. Am Rand des Defekts bemerkt man, daß das Bindegewebe radiär in Richtung Zentrum angeordnet wird und in einem breiten Saum bereits in neugebildete Spongiosa umgewandelt wurde. Die Spongiosabälkchen sind von einer Schicht aus Osteoblasten umgeben. Am Rand des Defektes zeigt sich zum Teil eine zirkulär angeordnete Schicht Knochen, die die Grenze zwischen der alten und der neugebildeten Spongiosa darstellt. Eingebettet in den Knochen liegen Osteozyten in ihren Höhlen. Zwischen der Spongiosa liegen viele Gefäßanschnitte. Knochenmark ist weder im Randbereich des Defekts noch im Zentrum zu sehen. Bei der Betrachtung unter dem polarisierten Licht zeigt sich ein deutlicher Unterschied in der Stärke der doppelbrechenden Kollagenfasern zwischen der alten Spongiosa außerhalb, und der neugebildeten Spongiosa innerhalb des Defektes. Eine Ausrichtung der Kollagenfasern ist nicht zu bemerken. Die Wachstumsfugen sind in allen Präparaten gut abzugrenzen und

zeigen die typische pallisadenförmige Anordnung des hyalinen Knorpels als Zeichen hoher Aktivität. Die Größe des Restdefektes liegt durchweg bei circa 60%.

Zwei Wochen später zeigt sich bei den Tieren mit vier Wochen Überlebenszeit ein vollständig anderes Bild. Hier ist der Defekt in allen Präparaten nur noch zu erahnen. Man sieht das Bild von normaler Spongiosa, wie im gesamten Rest des Präparates. Eine zirkuläre Randlamelle ist nicht mehr zu erkennen. Die Spongiosabälkchen sind nur noch vereinzelt radiär angeordnet. Dazwischen befindet sich ausgereiftes Knochenmark, das sich nicht von dem Knochenmark im übrigen Präparat unterscheidet. Auch in der Betrachtung unter dem polarisierten Licht erkennt man keinen Unterschied mehr zwischen dem ehemaligen Defekt und der ursprünglichen Spongiosa. Die Epiphysenfugen sind allerdings noch genauso ausgebildet wie bei den Tieren der zwei Wochen Gruppe.

Nach sechzehn Wochen liegt das gleiche Bild wie nach vier Wochen vor. Ein Unterschied besteht nur darin, daß die Struktur der Spongiosa insgesamt etwas ausgedünnt erscheint. Auch die Fugen sind zum Teil bereits knöchern verschlossen.

Die Auswertung der Präparate nach Punktescore ist in der Tabelle 8 ausgeführt, die graphische Darstellung zeigt Abbildung 1.

	<b>Tiernummer</b>	<b>Punkte</b>
<b>Gruppe 1</b> (2 Wochen )	919	6
	920	4,7
	924	5
Mittelwert		<b>5,2</b>
<b>Gruppe 2</b> (4 Wochen)	921	12
	922	12
	923	12
Mittelwert		<b>12</b>
<b>Gruppe 3</b> (16 Wochen)	907	12
	908	12
	909	12
Mittelwert		<b>12</b>

Tabelle 8: Histologische Ergebnisse des Spongiosatransplantates nach dem Punktescore aus Tabelle 6.

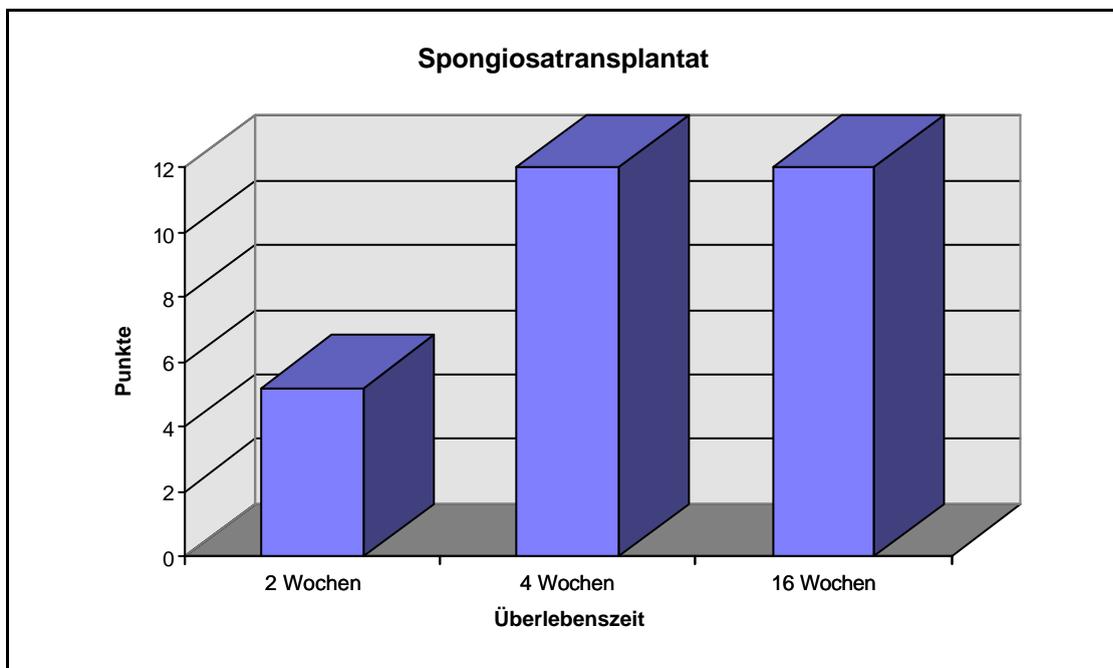


Abbildung 1: Graphische Darstellung der Punktwerte aus der histologischen Untersuchung des Spongiosatransplantates.

### **6.1.2 Hartschnitthistologie und polychrome Sequenzmarkierung**

Fluoreszenzmikroskopisch zeigten sich bei den Tieren mit zwei Wochen Überlebenszeit die Banden der drei applizierten Farbstoffe. Es erscheinen das gelbe Tetrazyklin und das rote Alizarin sehr kräftig, das orange Xylenolorange, das erst einen Tag vor der Opfierung gespritzt wurde, eher schwach. Am deutlichsten lassen sich die Farbbanden in Bereich der Randzone des Defektes und in den Bereichen des Endostes und der Epiphysenfuge nachweisen. Am Rand der eingebrachten Spongiosa sieht man nur vereinzelt Xylenolorange an den Knochenbälkchen des Transplantates. Im Zentrum des Defektes ist keine Farbmarkierung der dort vorhandenen Spongiosastücke nachzuweisen.

Nach vier Wochen ist die gerade applizierte grüne Calceinbande deutlich von den anderen Farbstoffen abzugrenzen. Diese findet sich hauptsächlich im Bereich des ehemaligen Defektzentrums, das fast vollständig von neuer Spongiosa ausgefüllt ist. Ebenso kann man Xylenolorange in diesem Bereich nachweisen, das zwei Wochen postoperativ injiziert wurde. Am Rand des Defektes und im Bereich der Epiphysenfuge zeigen sich alle vier Farbstoffe nebeneinander.

Nach 16 Wochen ist der Defekt nur noch schwach mit den zuletzt injizierten Farben Alizarin und Tetrazyklin angefärbt. Insgesamt zeigt sich das gleiche Bild wie in der umgebenden Spongiosa des Lagerknochens. Die Bereiche der Epiphysenfuge, die noch nicht verschlossen sind, lassen die meiste Anreicherung mit den applizierten Farbstoffen erkennen.

Zusammenfassend kann man feststellen, daß anscheinend zwischen der zweiten und der vierten Woche der Hauptteil der Knochenneubildung erfolgt. In der vierten und sechzehnten Woche erkennt man in der Anlagerung der Farbstoffe kaum Unterschiede zwischen der Spongiosa des Lagers und der des Transplantates. Diese Beobachtungen decken sich mit den Ergebnissen der Paraffinhistologie, die ebenso bereits nach vier Wochen einen vollständigen Durchbau des Defektes zeigt, und bei der nach 16 Wochen ein Defekt nicht mehr identifizierbar ist.

## **6.2 Leerdefekt am Femurkondylus**

### **6.2.1 Paraffinhistologie**

Die histologischen Auswertungen der Leerdefekte bei der Gruppe mit zwei Wochen Überlebenszeit zeigen ein gemischtes Bild. Bei allen Präparaten ist die Wachstumsfuge noch offen. Der Defekt liegt zumeist dorsal in der Metaphyse und durchbricht bei mehreren Schnitten die Epiphysenfuge und/oder die dorsale oder ventrale Corticalis. Zum Teil werden die Defekte von einer zirkulären Pseudolamelle umgeben. Im Zentrum zeigt sich zumeist ungerichtetes Bindegewebe mit großen Fibrozyten. Eingebettet in das Bindegewebe liegen vereinzelte Knochenfragmente, die immer nekrotisch imponieren, umgeben von einigen Gefäßanschnitten. An den Rändern der nekrotischen Spongiosafragmente finden sich einige Osteoklasten in Resorptionslakunen. Am Randbereich des Defektes erkennt man neugebildeten Spongiosaknochen umgeben von Osteoblasten. Dieser neue Knochen ist zum Teil zirkulär angeordnet, zum Teil radiär zum Zentrum hin gerichtet. Eine scharfe Grenze zwischen alter und neugebildeter Spongiosa ist nur in seltenen Fällen zu sehen. Unter polarisiertem Licht zeigen sich doppelbrechende Bindegewebsfasern, die zumeist radiär vom Rand in das Zentrum gerichtet sind.

Generell ist festzustellen, daß das Hämatom in allen Präparaten bereits vollständig umgebaut wurde, und der Leerdefekt nach zwei Wochen bereits zu circa 40 bis 60 % durch neugebildeten spongiösen Knochen aufgefüllt ist (siehe dazu auch die Auswertung des Punktescores).

Vier Wochen postoperativ ist das Bindegewebe vollständig im Bohrlochdefekt verschwunden und hat altersentsprechendem Knochenmark mit großen Fettzellen und allen Zellen der Hämatopoese Platz gemacht. Vereinzelt sieht man Gefäßanschnitte, die ohne erkennbare Richtung angeordnet sind. Die Wachstumsfuge ist in allen Präparaten noch gut abgrenzbar. Im Zentrum des Defektes liegen vereinzelte Anschnitte von Spongiosabälkchen. Diese zeigen keine nekrotischen Anteile, sondern haben lebende Osteozyten in den Knochenhöhlen. Sie

zeigen das gleiche Bild wie Spongiosaanschnitte außerhalb des Defektes. Am Rand des Defektes erkennt man eine ringförmige Struktur aus Spongiosa. Diese ist nur wenige Knochenlagen dick und grenzt außen an die normale Spongiosa an. Unter polarisiertem Licht sieht man die Kollagenfasern ohne radiäre Ausrichtung. Die Anordnung des Faserverlaufes entspricht der normalen Spongiosa außerhalb des Defektes.

Die Auswertung des Punktescores ergibt ein in allen Präparaten vollständig organisiertes Hämatom mit dem Bild des altersentsprechenden Knochenmarks, sowie eine vom Rand des Defektes ausgehende Knochenneubildung mit einem Restdefekt von ca. 50 %.

Nach sechzehn Wochen tritt nur bei einem Tier ein ähnliches Bild wie bei den Tieren mit vier Wochen Überlebenszeit auf. Die Wachstumsfuge ist zwar noch aktiv, aber in einzelnen Bereichen schon knöchern überbaut. Auch zeigen sich vermehrte Spongiosabälkchen im Zentrum des Defektes.

In allen anderen Tieren der sechzehn Wochen Gruppe ist der Defekt nicht mehr identifizierbar. Man beobachtet eine homogene Verteilung des Spongiosamusters über den gesamten Bereich der angeschnittenen Metaphyse. Auch das Knochenmark ist homogen über das gesamte Präparat verteilt. Daher muß man davon ausgehen, daß der gesetzte Defekt vollständig mit Spongiosa ausgefüllt wurde, und kein Restdefekt mehr vorhanden ist. Dies entspricht der vollen Punktzahl in der Scoreauswertung.

Die Auswertung der Präparate nach Punktescore ist in der Tabelle 9 ausgeführt, die graphische Darstellung zeigt Abbildung 2.

	<b>Tiernummer</b>	<b>Punkte</b>
<b>Gruppe 1</b> (2 Wochen )	919	6,5
	920	5,5
	924	9
Mittelwert		<b>7</b>
<b>Gruppe 2</b> (4 Wochen)	921	9
	922	9
	923	9,7
Mittelwert		<b>9,2</b>
<b>Gruppe 3</b> (16 Wochen)	907	8,8
	908	12
	909	12
Mittelwert		<b>10,9</b>

Tabelle 9: Histologische Ergebnisse des Leerdefektes nach dem Punktescore aus Tabelle 7.

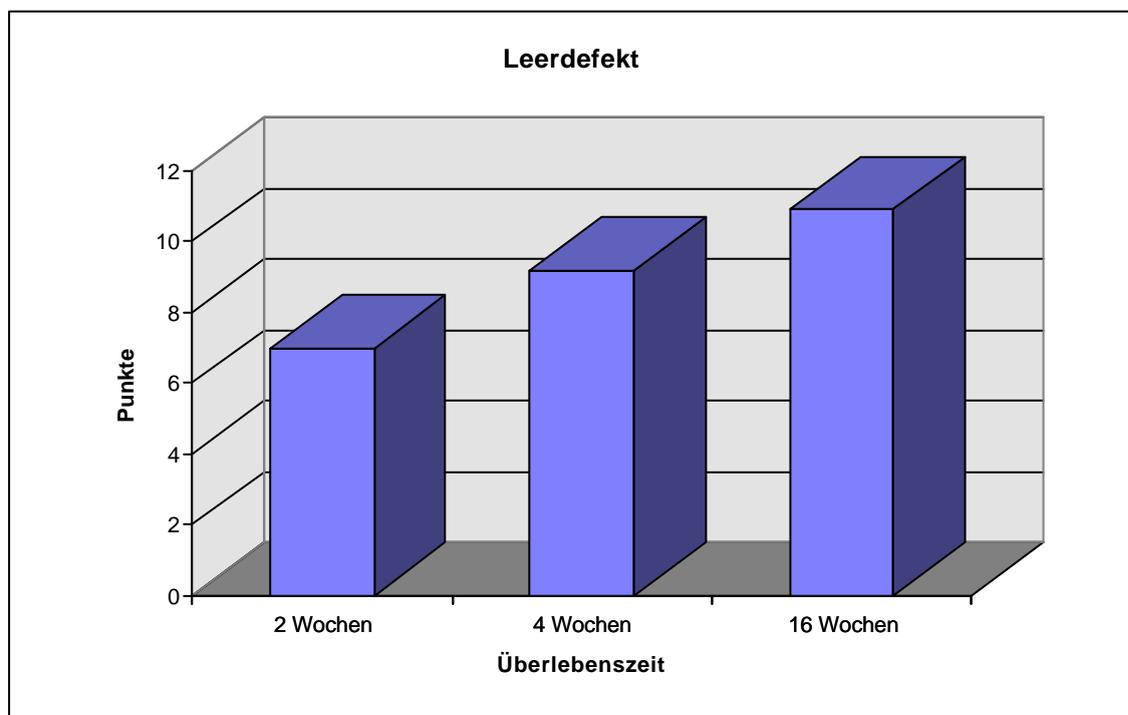


Abbildung 2: Graphische Darstellung der Punktwerte aus der histologischen Untersuchung des Leerdefektes.

## **6.2.2 Hartschnitthistologie und polychrome Sequenzmarkierung**

Die Ergebnisse bei den Leerdefekten sind im Vergleich zu denen bei dem Spongiosatransplantat phasenverschoben. Dies bedeutet, daß die Farbbanden des Calceins, Alizarins und Tetrazyklins erst bei den Tieren mit 16 Wochen Überlebenszeit im Bereich des Defektzentrums deutlich anreichern. Der Defekt ist zwar größtenteils komplett verschlossen, die Spongiosabälkchen haben aber, im Gegensatz zu denen des Lagers, einen starken Saum der applizierten Farbkomplexe. Bei den Tieren der anderen Gruppen sieht man die Farbbanden hauptsächlich im Bereich des Defektrandes und der Epiphysenfuge, bzw. des Endostes.

Dies bedeutet, daß beim Leerdefekt die meiste Knochenneubildung im Zeitraum zwischen der achten und sechzehnten Wochen stattfindet. Auch dies deckt sich mit den Ergebnissen der Paraffinhistologie.

## **7 Vergleich zwischen den Tierarten**

Von den anderen Tierarten dieses Interspeziesvergleiches liegen bisher nur zum Teil Ergebnisse vor. So ist die Dissertation von WOLTER, der die Spezies Schaf untersuchte, bereits abgeschlossen, die Dissertation von BARTH, der die Versuche an den Schweinen durchführte, ist noch in der Vorbereitung. Von der Spezies Kaninchen liegen noch keine Ergebnisse vor. Da die Daten nicht im Einzelnen zur Verfügung stehen, und die Spezies Kaninchen noch nicht ausgewertet ist, muß auf eine ausführliche Gegenüberstellung und Diskussion verzichtet werden. Dies ist an anderer Stelle, im Rahmen der Auswertung des Gesamtprojektes, vorgesehen. Daher werden hier nur die tabellarischen und graphischen Darstellungen der bisher verfügbaren Daten dargestellt.

Die Versuchsanordnungen und die Auswertungen bei den einzelnen Tierarten waren identisch. Der einzige Unterschied bestand in der Größe des Defektes in den

Femurkondylen. So beträgt der Bohrlochdurchmesser beim Schaf elf Millimeter, der beim Schwein neun Millimeter. Dies entspricht einem Drittel der durchschnittlichen Femurkondylenbreite, die vorher anhand von Messungen an Röntgenbildern und Kadaverknochen bestimmt wurde.

Bei den Versuchen am Leerdefekt zeigt sich, daß Schweine und Ratten im Versuchsverlauf in allen Überlebenszeiten einen ähnlichen Punktescore erreichen. Nach zwei Wochen beträgt der Wert bei den Schweinen 6,9 Punkte und bei den Ratten 7 Punkte. Die Schafe hingegen haben nach zwei Wochen Überlebenszeit nur 1,66 Punkte aufzuweisen. Dieses Verhältnis nimmt im Laufe der Zeit ab. So betragen die Werte nach vier Wochen für die einzelnen Spezies 4,66 (Schaf), 7,98 (Schwein) und 10,4 (Ratte). Die tabellarische und graphische Darstellung dieser Werte zeigt Tabelle 10 und Abbildung 3.

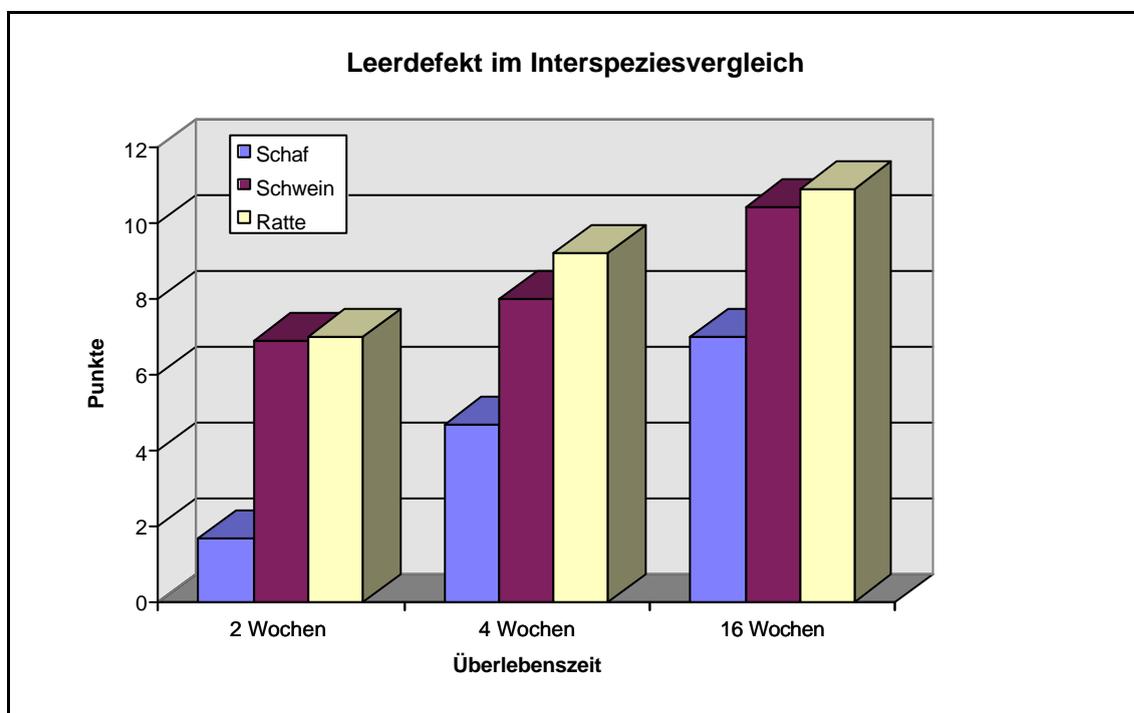


Abbildung 3: Punktwertvergleich der Spezies Schaf, Schwein und Ratte in der histologischen Auswertung am Leerdefekt.

	Schaf	Schwein	Ratte
2 Wochen	1,66	6,9	7
4 Wochen	4,66	7,98	9,2
16 Wochen	7	10,4	10,9

Tabelle 10: Punktwertvergleich der Spezies Schaf, Schwein und Ratte in der histologischen Auswertung am Leerdefekt.

Der Vergleich in der Versuchsgruppe der Spongiosatransplantation zeigt nicht so deutliche Unterschiede zwischen den drei Tierarten. Die Werte sind nach zwei Wochen 3,3 (Schaf), 6,0 (Schwein) und 5,2 (Ratte). Warum der Punktwert der Ratten nach zwei Wochen mit 5,2 unter dem der Schweine liegt ist aus den vorliegenden Daten nicht zu erklären, zumal die Ratten während allen anderen Überlebenszeiten die höchsten Werte aufweisen. Nach vier Wochen betragen die Scores 7,66 (Schaf), 8,85 (Schwein) und 12 (Ratte) und nach 16 Wochen 10,33 (Schaf), 12 (Schwein) und 12 (Ratte). Die tabellarische und graphische Darstellung dieser Werte zeigt Tabelle 11 und Abbildung 4.

	Schaf	Schwein	Ratte
2 Wochen	3,33	6	5,2
4 Wochen	7,66	8,85	12
16 Wochen	10,33	12	12

Tabelle 11: Punktwertvergleich der Spezies Schaf, Schwein und Ratte in der histologischen Auswertung am Spongiosatransplantat.

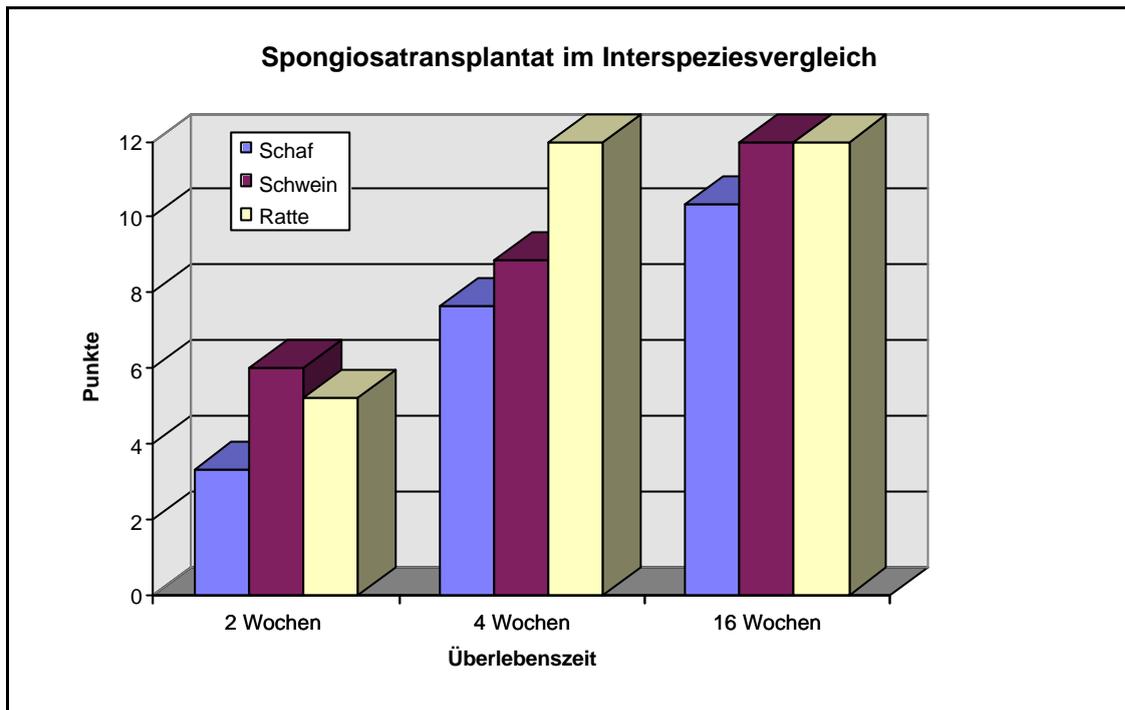


Abbildung 4: Punktwertvergleich der Spezies Schaf, Schwein und Ratte in der histologischen Auswertung am Spongiosatransplantat.

## 8 Diskussion

### 8.1 Diskussion der Methoden

KATTHAGEN stellt fest, daß man sich bei tierexperimentellen Untersuchungen generell die Frage stellen muß, ob die Ergebnisse überhaupt auf die Situation beim Menschen übertragen werden dürfen (KATTHAGEN 1986 S. 145). Da aber frühere Untersuchungen schon in der Lage waren, die Probleme richtig zu erfassen, kommt er zu dem Schluß, daß die gewonnenen Ergebnisse heute allgemein auch für den Menschen als gültig anerkannt werden, und sich diese auch bei der klinischen Anwendung beim Menschen bestätigen (KATTHAGEN 1986 S. 145).

In seinen Arbeiten zur Untersuchung der Übertragbarkeit tierexperimenteller Ergebnisse auf den Regenerationsprozeß des menschlichen Röhrenknochens beschreibt EITEL 1981, daß nur Knochenbezirke gleicher Ordnungsstruktur zum

Vergleich herangezogen werden können (EITEL 1981 S. 262). Der Regenerationsprozeß ist vom onto- und phylogenetischen Differenzierungsgrad der zugrundeliegenden Knochenstruktur abhängig (EITEL 1981 S. 262). So können zum Beispiel primäres, undifferenziertes Knochengewebe, das bei Huftieren große Knochenareale einnimmt, nicht mit sekundärem Knochengewebe von Primaten verglichen werden (EITEL 1981 S. 259). Zu beachten ist desweiteren, daß auch das Alter, die Körpergröße und die Quadrupedie Einfluß auf den Regenerationsprozeß nehmen (EITEL 1981 S. 262, ERTELT 1955 S. 588). EITEL kommt zu dem Schluß, daß zahlreiche in der Literatur niedergelegte Experimentalbefunde sowohl unter sich, als auch mit der Humansituation nicht vergleichbar sind (EITEL 1981 S. 262). Auch FROST postuliert, daß trotz Ähnlichkeit höherer Ordnungsstufen, wie der äußeren Knochenform, Unterschiede in niedrigeren Ordnungsstufen, wie der Osteonenstruktur, bestehen können (FROST 1969 S. 211). Da sich der Regenerationsprozeß auf der zweiten Ordnungsstufe abspielt, können zum Vergleich nur auf dieser Ordnungsstufe homologe Spezies herangezogen werden (EITEL 1981 S. 262). Nach REICH können für die Übertragung auf die Humansituation nur homologe Skelettentwicklungsstufen verwendet werden, wobei laut seinen Angaben ein Hund von einem Jahr einem Menschen von 18 bis 20 Jahren entspricht (REICH 1948 S. 97). EITEL zieht die Schlußfolgerung, daß der menschliche Regenerationsprozeß nur dann im Tierexperiment nachvollzogen werden kann, wenn ähnliche Knochenstrukturen vorliegen. Die Spezies Mensch und die Spezies Hund weisen gleichartige Sekundärstrukturen auf. Weniger Ähnlichkeiten weisen Schafe, Kaninchen, Ratten, Mäuse und Schweine auf, da sie auch im höheren Alter noch Primärstrukturen der Knochenentwicklung besitzen (EITEL 1981 S. 263). Im Gegensatz zu EITEL beschreibt WISSING 1990 in seinen Untersuchungen über die Wertigkeit verschiedener Versuchsspezies für experimentelle Untersuchungen am Knochen, daß das Schaf am ehesten reproduzierbare Rückschlüsse auf die Regenerationsvorgänge beim Menschen zuläßt (WISSING 1990 S. 487). FROST kommt zu dem Schluß, daß ein „standard bone approach“ zu wählen ist, der die speziesabhängige und topographische Variabilität der zu untersuchenden Knochenstruktur berücksichtigt (FROST 1963).

Das Gesagte zeigt, wie wichtig es ist, im Bereich der Knochenregeneration einen Vergleich zwischen den gebräuchlichen Tierspezies zu ziehen, der im Rahmen eines standardisierten Gesamtversuches durchgeführt wird. Bisher sind in der Literatur zwar viele tierexperimentelle Versuche zur Defektheilung beschrieben, die aber häufig mit unterschiedlichen Parametern bezüglich Tierart, Defektlokalisierung und Defektgröße durchgeführt wurden (ECKE 1964, SCHWEIBERER 1970, JOHNER 1972, WOLTER 1975, KATTHAGEN 1986, SCHOCH 1994). Dem wurde in dem vorliegendem Versuchsvorhaben Rechnung getragen, indem als Transplantationsort die distale Femurmetaphyse gewählt wurde, die nach EITEL bei allen Individuen in der gleichen ossären Entwicklungsstufe vorliegt, und die erst mit zunehmendem Alter durch Sekundärstrukturen ersetzt wird (EITEL 1981 S. 257). Als Versuchsaufbau wurde der sogenannte „Spongiosatest“ verwandt, der erstmals von MAATZ beschrieben wurde, um knöcherne Transplantate zu testen (MAATZ 1954). In der Folge wurde dieser Test von vielen weiteren Autoren übernommen und gilt heute als das Standardverfahren zur Prüfung der Wertigkeit ossärer Transplantate (HOPF 1957, SCHWEIBERER 1970, KATTHAGEN 1986, SCHOCH 1994). Uneinigkeit herrscht bei den verschiedenen Autoren über den Durchmesser des Bohrlochdefektes. HOPF berichtet 1957, daß bei zu klein gewählten Defekten beim Kaninchen zu positive Ergebnisse resultieren, da das Bohrloch nach kurzer Zeit überbaut ist. SCHWEIBERER entschied sich an der proximalen Tibia des Hundes für einen Defekt von 10mm, da nach seiner Aussage bei einem Defekt von 5mm die Regenerationsleistung des Knochenlagers alle anderen Prozesse überdeckt (SCHWEIBERER 1970 S. 51). KATTHAGEN kommt zu dem Schluß, daß an den Femurkondylen des Kaninchens ein Defekt von 6mm nicht aus eigener Kraft knöchern durchbaut wird (KATTHAGEN 1986 S. 58). SCHOCH zeigte, daß an den Femurkondylen des Kaninchens sogar ein Bohrlochdurchmesser von 4mm nur am Rand verstärkt wird (SCHOCH 1994 S. 35).

In unserem Versuch haben wir uns an die Vorgehensweise von SCHOCH (1994) angelehnt. Durch radiologische Messungen fanden wir heraus, daß ein Bohrloch von 4mm beim Kaninchen einem Drittel des Kondylendurchmessers entspricht. Dieses

Verhältnis wurde bei allen Spezies eingehalten und ergab für das Schaf einen Durchmesser von 11mm, beim Schwein von 9mm und bei der Ratte von 2mm. Die Übertragung dieses Verhältnisses (Bohrloch zu Lager) auf die anderen Spezies führten wir auf Grund der Aussage KATTHAGENS durch, der annahm, daß die Relation des Knochendefekts zu seinem Lager eine entscheidende Rolle spielt (KATTHAGEN 1986 S. 146).

Bei der Planung eines tierexperimentellen Versuches steht man vor der grundsätzlichen Frage, welche Spezies verwendet werden sollen. Auf der einen Seite muß die Übertragbarkeit der Ergebnisse auf den Menschen gegeben sein, was eine Tierart erfordert, die möglichst weit entwickelt ist, um die Humansituation möglichst gut zu simulieren. Auf der anderen Seite steht die Forderung des Tierschutzgesetzes, Untersuchungen an möglichst einfachen Tieren durchzuführen. Nicht zuletzt stehen Großtiere wie der Affe oder der Hund aus Kostengründen oft nicht zur Verfügung (KATTHAGEN 1986 S. 57). Für das Gesamtvorhaben wurden daher die Tierarten Schaf, Schwein, Kaninchen und Ratte ausgewählt, da diese Spezies in der Literatur am häufigsten für Versuche im Rahmen der Knochenregeneration verwendet wurden. Der Hund wurde aus finanziellen Gründen bewußt nicht herangezogen.

In der vorliegenden Arbeit wurden die Ergebnisse an der Ratte erörtert. KATTHAGEN führte aus, daß die Ratte wegen der kleinen Dimension ihrer Knochen nur mit Einschränkungen in Betracht kommt (KATTHAGEN 1986 S.55). Diese Aussage können wir bestätigen. So haben wir von vornherein auf bestimmte Untersuchungstechniken, wie die Kernspintomographie und die Szintigraphie, verzichten müssen, da die Auflösung der Verfahren bei der Defektgröße von 2mm nicht ausreichend ist. Während der experimentellen Phase des Versuches mußten weitere Untersuchungsmethoden verlassen werden, da erkannt wurde, daß die Methoden aufgrund der kleinen Dimension der Ratte entweder nicht durchführbar waren oder zu nicht interpretierbaren Ergebnissen geführt haben. So mußte wir auf die Auswertungen der Radiologie, der Mikroangiographie und der Mikroradiologie verzichten.

WOLTER beschreibt bei seinen Versuchen am Schaf, daß die Verwendung handelsüblicher Spiralbohrer ungünstig erscheint, da das Bohrloch schlecht geräumt wird und meist Reste der Spongiosa verbleiben. Außerdem hat er festgestellt, daß die Spongiosa ungleichmäßig zerkleinert wird und einzelne Fragmente in das verbleibende Trabekelgerüst gedrückt werden (WOLTER 1995 S. 70). Diesen Beobachtungen können wir uns anschließen. Zusätzlich haben wir bemerkt, daß die gewonnene Menge der Spongiosa sehr gering ist und den Defekt oft nicht vollständig ausgefüllt hat. Daher haben wir uns entschlossen, den kortikalen Anteil des Bohrmehles nicht vom spongiösen Anteil zu trennen. Die kleine Dimension der Ratte machte es schwierig, den Bohrkanal exakt in der Kondylenachse zu plazieren. Dies führte dazu, daß die Schnitte für die histologische Bearbeitung nicht in jedem Fall senkrecht zum Bohrkanal angefertigt werden konnten und somit ein elliptisch verzogener Defekt am Präparat zu sehen war. Auch wurde bei einigen Operationen die Epiphysenfuge oder die ventrale beziehungsweise dorsale Kortikalis angebohrt. Es zeigte sich, daß sowohl durch die Zerstörung der Epiphysenfuge, als auch der Kortikalis, und damit des Periostes eine enorme Steigerung der Knochenneubildung resultierte. Diese ging meist mit der Ausbildung von Knorpel einher. ECKE hat 1964 in diesem Zusammenhang geäußert, daß die distalen Femura zur Prüfung von Knochentransplantaten vor allem bei jungen Tieren ungeeignet sind, da hier die Wachstumsfugen den Regenerationsprozeß stimulieren können (ECKE 1964 S. 174). Daher haben wir auf die Auswertung dieser Tiere verzichtet.

## **8.2 Diskussion der histologischen Auswertungen**

Um eine Aussage treffen zu können über die Eigenschaften eines Transplantates muß ausgeschlossen sein, daß das Knochenlager, das das Transplantat aufnehmen soll, durch seine Eigenleistung den Defekt verschließen kann (KATTHAGEN 1986 S. 146). Dazu müssen Leerdefekte mit dem selben Bohrlochdurchmesser und an der gleichen Lokalisation angefertigt werden. Wir haben dazu das Femur der Gegenseite verwendet. Die histologischen Auswertungen haben ergeben, daß dieser Leerdefekt innerhalb von 16 Wochen vollständig knöchern durchbaut werden kann und der Defekt nicht mehr zu identifizieren ist. Da der Punktescore nach vier Wochen

Überlebenszeit ebenfalls schon einen Wert von neun Punkten erreicht hat, muß man davon ausgehen, daß diese Durchbauung irgendwann zwischen der vierten und der sechzehnten Woche stattfindet.

Bei den Präparaten mit Spongiosatransplantat stellt man fest, daß bereits nach vier Wochen ein Defekt nicht mehr zu identifizieren ist, und der maximal mögliche Punktwert erreicht wird. Da sich unter dem hier vorliegenden Tiermaterial die Spongiosatransplantate von den Leerdefekten nicht genügend differenzieren lassen, scheinen Ratten für diese Art von Untersuchungen nicht geeignet zu sein.

Eine Erklärung hierfür kann in der Stoffwechselrate der Ratte liegen. KIRCHGESSNER stellte fest, daß der Grundumsatz eines Warmblüters direkt proportional dem metabolischen Körpergewicht ist, das sich aus dem Gewicht in Kilogramm potenziert mit 0,75 errechnet. Dabei weist die Ratte eine, im Vergleich zum Schaf, ungleich höhere Stoffwechselrate auf (KIRCHGESSNER 1992 S. 114). Auch URIST gibt den „Metabolic Activity Index“ für die Ratte mit 5,15 und den des Hundes mit 1,5 an (URIST 1989 S. 5). Die Zahlen von KIRCHGESSNER und URIST belegen, daß die Ratte eine deutlich erhöhte Stoffwechselrate im Vergleich zu den anderen Versuchsspezies aufweist. Dies läßt ebenso auf eine erhöhte Knochenregenerationspotenz schließen. Auch das Alter hat einen Einfluß auf die Regeneration des Knochens, da diese mit zunehmendem Alter abnimmt (WOLTER 1995). Es stellt sich somit die Frage, ob bei diesem Versuchsansatz der Defekt im Verhältnis zur Regenerationspotenz zu klein gewählt wurde und ob die Tiere zu jung waren.

## 9            **Schlußfolgerung**

Bei abschließender Betrachtung der Ergebnisse aus dem vorliegenden Versuch an der Ratte muß festgehalten werden, daß, bei den hier verwendeten Versuchsparametern, die Ratte unseres Erachtens kein geeignetes Tier ist, um Versuche zur Knochenregeneration durchzuführen.

Die Gründe sind vielschichtig. Zum Einen scheint die Ratte eine, im Vergleich zu den anderen Versuchstieren, deutlich erhöhte Regenerationspotenz zu besitzen. Defekte, die bei anderen Spezies groß genug sind, um nicht verschlossen zu werden, werden bei der Ratte spontan durchbaut. Eventuell könnte dieses Problem durch die Wahl eines größeren Defektdurchmessers umgangen werden. Zum Anderen ergeben sich aus der Größe des Versuchstieres Probleme, die sowohl die technische Durchführung der Operationen, als auch die Möglichkeiten der späteren Untersuchungen und Auswertungen betreffen. Dies kann nur durch die Wahl eines größeren Versuchstieres vermieden werden.

## 10 Zusammenfassung

Das Gesamtprojekt ist angelegt als Interspeziesvergleich zwischen den Tierarten Schaf, Schwein, Kaninchen und Ratte. Es wird die Dynamik der Knochendefektheilung mit und ohne Spongiosatransplantat am standardisierten Bohrlochdefekt dargestellt. In der hier vorliegenden Arbeit werden die Ergebnisse der Untersuchungen an der Ratte erörtert.

18 Ratten werden in drei Gruppe mit unterschiedlichen Überlebenszeiten (zwei, vier und 16 Wochen) aufgeteilt. Es wird ein transkondylärer Bohrlochdefekt an beiden Femura gesetzt, der im Durchmesser ein Drittel des Femurkondylendurchmessers beträgt (entspricht zwei Millimetern). Die Spongiosa wird gesammelt und in eines der beiden Bohrlöcher gefüllt. Das andere Bein dient als Leerdefekt.

Die Ergebnisse werden mittels Paraffinhistologie, Hartschnitt histologie und polychromer Sequenzmarkierung erhoben. Weitere Untersuchungsmethoden (Kernspintomographie, Szintigraphie, Radiologie), die bei den anderen Spezies angewendet werden, können bei der Ratte aus verschiedenen, dargestellten Gründen nicht zur Anwendung kommen.

Bereits nach vier Wochen zeigt sich ein kompletter Durchbau des Spongiosatransplantates. Auch im Leerdefekt kann nach 16 Wochen kein Defekt mehr identifiziert werden.

Dies veranlaßt zu der Schlußfolgerung, daß zur Beurteilung der Knochenregeneration bei der hier gewählten Versuchsanordnung die Ratte weniger geeignet ist, als die anderen untersuchten Spezies. Sie sollte daher für Versuche der hier untersuchten Art nicht verwendet werden.

**Algire Gh**, Weavve GM, Prehn RT

Growth of cells in vivo in diffusion chambers survival in homograft in immunized mice.  
J Natl Cancer Inst 15 (1954) 493

**Barth G**

Untersuchungen zur Dynamik der Knochendefektheilung beim Schwein am standardisierten Bohrlochdefekt in den Femurkondylen und dem Femurschaft nach autogener Spongiosatransplantation.  
Med Diss TU München (in Vorb.)

**Bassett CA**

Biologic significance of piezoelectricity.  
Calc Tiss Res 1 (1967) 252-269

**Belanger LF**

Osteocytic ostolysis  
Calcif Tissue res 4 (1969) 1-12

**Bohr H**, Ravn O, Werner H

The osteogenetic effect of bone transplants in rabbits.  
J Bone Joint Surg 50B (1968) 866-873

**Burchardt H**

The biology of bone graft repair.  
Clin Orthop Rel Res 174 (1983) 28-42

**Burchardt H**

Biology of bone graft repair.  
Orthop Clin North Am 1 (1987) 187-196

**Burck HC**

Histologische Technik.  
Leitfaden für die Herstellung mikroskopischer Präparate in Unterricht und Praxis.  
6. Aufl, Stuttgart - New York, Georg Thieme 1988

**Burwell RG**

Studies in the transplantation of bone VII: The fresh composite homograft-autograft of cancellous bone.

J Bone Joint Surg 46B (1964) 110-140

**Craig Gray J, Elves MW**

Early osteogenesis in compact bone isografts: A quantitative study of the contributions of the different graft cells.

Calcif Tissue Int 29 (1979) 225-237

**Craig Gray J, Elves MW**

Donor cell contribution to osteogenesis in experimental cancellous bone grafts.

Clin Orthop Rel Res 163 (1982) 261-271

**Drenhaus U, Imhoff M, Tassler H**

Über lagerungsbedingte Veränderungen autologer Spongiosa.

Unfallchirurg 91 (1988) 165-173

**Ecke H, Rompel K, Grabow L**

Tierexperimentelle Untersuchungen zur Bestimmung der Qualität von Knochenspänen verschiedener biologischer Herkunft für Transplantationszwecke.

Langenbecks Arch klein Chir 307 (1964) 169-194

**Eitel F, Seiler H, Schweiberer L**

Vergleichende morphologische Untersuchung zur Übertragbarkeit tierexperimenteller Ergebnisse auf den Regenerationsprozeß des menschlichen Röhrenknochens.

Unfallheilkunde 84 (1981) 250-264

**Erhardt W, Geissdörfer K, Schindele M, Stephan M, Blümel G**

Die Anästhesie bei Hasen und Nagetieren.

Kleintierpraxis 31 (1986) 333-341

**Ertelt W**

Untersuchungen über Körpergröße und Knochenstruktur bei Säugetieren.

Zool Jahrb Abt Anat 74 (1955) 588

**Franke J**, Runge H

Osteoporose - Diagnose, Differentialdiagnose und Therapie unter Berücksichtigung der Natriumfluoridbehandlung.

Berlin, VEB Verlag Volk und Gesundheit, 1987

**Frost HM**

Tetracycline based histological analysis of bone remodeling.

Calcif Tissue Res 3 (1969) 211

**Glowacki J**, Altobelli D, Milliken JB

Fate of mineralized and demineralized osseous implants in cranial defects.

Calcif Tissue Int 33 (1981) 71-79

**Göthlin G**, Ericsson JLE

The osteoclast.

Clin Orthop Rel Res 120 (1976) 201-231

**Gowen M**, Beresford J, Gallagher J, Wood DD, Russel RGC

Actions of interleucin1 on bone metabolism in vitro.

Calcif Tissue Int 35 (1983) 642

**Heiple KG**, Golberg VM, Powell AE, Bos GD, Zika JM

Biology of cancellous bone graft repair.

In: Friedlaender GE, Mankin HJ, Sell KW (Eds.): Osteochondral allografts.

Little, Brown and Company, Boston - Toronto (1984) 37-49

**Hopf A**

Diskussionsbemerkung.

Verh Dtsch Ges Orthop 90 440 (1957)

**Horowitz MC**, Friedlaender GE

Induction of specific T-cell responsiveness to allogeneic bone.

J Bone Joint Surg 73A (1991) 1157-1168

**Horton MA**, Rimmer EF, Lewis D

Cell surface characterisation of the human osteoclast: Phenotypic relationship to other bone marrow-derived cell types.

J Pathology 144 (1984) 281-294

**Jee WSS**

The skeletal tissues.

In: Histology - Cell and tissue biology,

Weiss L (Ed.), Macmillan Press, 1983 5<sup>th</sup> edition, 200-255

**Johner R**

Zur Knochenheilung in Abhängigkeit von der Defektgröße.

Helv Chir Acta 39 (1972) 409-411

**Junqueira LC, Carneiro J**

Histologie

Springer-Verlag

Berlin - New York - London - Paris - Tokyo - Hong Kong - Barcelona - Budapest

1991, 3. Auflage, 190-217

**Justus R, Luft JH**

A mechanochemical hypothesis for bone remodeling induced by mechanical stress.

Calc Tiss Res 5 (1970) 222-235

**Katthagen BD**

Knochenregeneration mit Knochenersatzmaterialien.

Heft z Unfallheilkunde 178 (1986)

**Keck E.**

Physiologie des Knochenstoffwechsels.

Z Rheumatol 48 Suppl 1 (1989) 3-14

**Keck E**

Calcitonin und Calcitonintherapie

Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft Stuttgart (1988) 1-32

**Kirchgeßner M**

Tierernährung

DLG-Verlag, Frankfurt/Main (1992) 113-116

**Lane JM, Sandhu HS**

Current approaches to experimental bone grafting.

Orthop Clin North Am 18 (1987) 213-225

**Maatz R**, Lentz W, Graf R  
Spogiosa test of bone grafts for transplantation.  
J Bone Joint Surg 36A (1954) 721-731

**Matti H.**  
Über freie Transplantation von Knochenspongiosa.  
Langenbecks Arch Chir 168 (1932) 236-242

**Milch RA**, Rall DP, Tobie JE  
Fluorescence of tetracycline antibiotics in bone.  
J Bone Joint Surg 40A (1958) 897-910

**Modis L**, Petko M, Földes I  
Histochemical examination of supporting tissues by means of fluorescence: II.  
Fluorochromes as an indicator of lamellar bone mineralization.  
Acta Morph Acad Sci Hung 17 (1969) 157-166

**Nade S**  
Osteogenesis after bone and bone marrow transplantation  
Acta Orthop Scand 48 (1977) 572-579

**Owen M.**  
The Origin of bone cells in the postnatal organism.  
Arthr Rheumat 23 (1980) 1073-1079

**Plank J**, Pychlo A  
Eine Schnellentkalkungsmethode.  
Zentralbl allg Pathol Anat 89 (1952) 252-254

**Rahn BA**, Perren SM  
Xylenolorange, a fluorochrome useful in polychrome sequential labeling of calcifying tissues.  
Stain Tech 46 (1971) 125-128

**Rahn BA**, Perren SM  
Alizarinkomplexon - Fluorochrom zur Markierung von Knochen- und Dentinanbau.  
Experientia 28 (1972) 180

**Raisz LG**, Trummel CL, Simmons H

Induktion of bone resorption in tissue culture: Prolonged response after brief exposure to parathyroid hormone or 25-hydroxycholecalciferol  
Endocrinology 90 (1972) 744-751

**Reddi AH**, Wientroub S, Muthukumaren N

Biologic principles of bone induction.  
Orthop Clin North Am 18 (1987) 207-212

**Reich H**

Die Infektion und Regeneration des frischen Knochenbruches unter besonderer Berücksichtigung der Marknagelung nach Küntscher.  
Z Orthop 77 (1948) 97

**Romanowski R**, Jundt G, Termine JD, von der Mark K, Schulz A

Immunelctron microscopy of osteonectin and type 1 collagen in osteoblasts and bone matrix.  
Calif Tissue Int 46 (1990) 353-360

**Romeis B**

Mikroskopische Technik  
Urban & Schwarzenberg, München - Wien - Baltimor, 1989

**RosinA**, Freiberg H, Zalicek G

The fate of rat bone marrow, spleen and periosteum cultivated in vivo in the diffusion chamber, with special reference to bone formation.  
Exp Cell Res 29 (1963) 176

**Rutherford B**, Trummel LC

Monocyte-mediated bone resorption involves release of nondialysable substances in addition to prostaglandin.  
RES 33 (1983) 175-184

**Schoch T**

Knochenregeneration mit frischen und sterilisierten Auto- und Allografts - Experimentelle Untersuchungen mit morphometrischen Methode.  
Med Diss, TU München (1994) 1-179

**Schweiberer L**

Experimentelle Untersuchungen von Knochentransplantaten mit unveränderter und denaturierter Knochengrundsubstanz.

Hefte Unfallheilk 103 (1970) 1-70

**Segmüller G**

Spongiosaregeneration in der Milliporekammer.

Helv Chir Acta 34 (1967) 5

**Smith A, Burton J, Lütjen-Drecoll E**

Farbatlas histologischer Färbemethoden.

F.K. schattauer Verlag, Stuttgart - New York, 1979

**Suzuki HK, Mathews A**

Two-color fluorescencelabeling of mineralizing tissues with tetracycline and 2.4-bis(N,N-di-(carbomethyl)aminomethyl) fluorescein.

Stain Tech 41 (1966) 57-60

**Thielmann FW, Schmid U, Holz U, Herr G**

Osteoinduction Part II: Purification of the osteoinductive activities of bone matrix.

Arch Orthop Trauma Surg 100 (1982) 73-78

**Urist MR**

Bone: Formation by autoinduction.

Science 150 (1965) 893-899

**Urist MR, Strates BS**

Bone morphogenetic protein.

J Dent Res 50 (1971) 1392-1406

**Urist MR, Mikulski A, Lietze A**

Solubilized and insolubilized bone morphogenetic protein.

Proc Natl Acad Sci USA 76 (1979) 1828-1832

**Urist MR, De Lange RJ, Finerman GAM**

Bone cell differentiation and growth factors.

Science 220 (1983) 680-686

**Urist MR**

Bone transplantation.

In: Urist MR (Ed.): Fundamental and clinical bone physiology.  
JB Lippincott Company, Philadelphia (1980) 331-368

**Urist MR**

Introduction to update on osteochondral allograft surgery.

In: Aebi M, Regazzoni P (Eds.): Bone transplantation  
Springer, Berlin - Heidelberg (1989) 1-6

**Vitali HP**

Knochenerkrankungen.

Hrsg. V. Sandoz (1970)

**Wissing H, Stürmer KM, Breidenstein G**

Die Wertigkeit verschiedener Versuchsspezies für experimentelle Untersuchungen  
am Knochen.

Hefte Unfallheilk 212 (1990) 479-488

**Wlodarski KH**

Normal and heterotopic periosteum.

Clin Orthop 241 (1989) 265-277

**Wlodarski KH**

Properties and origin of osteoblasts.

Clin Orthop 252 (1990) 276-293

**Wolter D, Hutzschenreuter P, Burri C, Steinhardt B**

Einbau autologer Spongiosa am Kompaktknochen in Abhängigkeit von der Vitalität  
der transplantierten Zellen.

Langebecks Arch Chir Suppl Chir Forum (1975) 383-387

**Wolter W**

Untersuchungen zur Dynamik der Knochendefektheilung beim Schaf am  
standardisierten Bohrlochdefekt in den Femurkondylen und dem Femurschaft nach  
Spongiosatransplantation.

Med Diss TU München (1995)

**Yee JA**

Properties of osteoblast-like cells isolated from the cortical endosteal bone surface of adult rabbits.

Calcif Tissue Int 35 (1983) 571-577

**Yoneda T, Mundy GR**

Monocytes regulate OAF production by releasing prostaglandines.

J Exp Med 150 (1979) 357-370

**Young RW**

Cell proliferation and spezialisation during enchondral osteogenesis in young rats.

J Cell Biol 14 (1962) 357-370

## 12 **Abbildungsverzeichnis**

Abbildung 1: Graphische Darstellung der Punktwerte aus der histologischen Untersuchung des Spongiosatransplantates.

Abbildung 2: Graphische Darstellung der Punktwerte aus der histologischen Untersuchung des Leerdefektes.

Abbildung 3: Punktwertvergleich der Spezies Schaf, Schwein und Ratte in der histologischen Auswertung am Leerdefekt.

Abbildung 4: Punktwertvergleich der Spezies Schaf, Schwein und Ratte in der histologischen Auswertung am Spongiosatransplantat.

## 13 Tabellenverzeichnis

- Tabelle 1: Internationale Terminologie der Transplantatart.
- Tabelle 2: Gruppeneinteilung und Überlebenszeiten.
- Tabelle 3: Zusammensetzung der Entkalkungslösung nach Plank.
- Tabelle 4: Alkoholreihe zur Entwässerung und Entfettung der Proben.
- Tabelle 5: Markierungsschema der Fluorochrome.
- Tabelle 6: Bewertungsschema des Spongiosatransplantates.
- Tabelle 7: Bewertungsschema des Leerdefekts.
- Tabelle 8: Histologische Ergebnisse des Spongiosatransplantates nach dem Punktescore aus Tabelle 6.
- Tabelle 9: Histologische Ergebnisse des Leerdefektes nach dem Punktescore aus Tabelle 7.
- Tabelle 10: Punktwertvergleich der Spezies Schaf, Schwein und Ratte in der histologischen Auswertung am Leerdefekt.
- Tabelle 11: Punktwertvergleich der Spezies Schaf, Schwein und Ratte in der histologischen Auswertung am Spongiosatransplantat.

## 14 Danksagungen

Folgenden Personen gebührt mein Dank für ihre Unterstützung bei der Planung und Durchführung meiner Dissertationsarbeit:

dem leider bereits verstorbenen Herrn Prof. Dr. med. G. Blümel, der mir die Einrichtungen seines Institutes zur Verfügung stellte, ohne deren diese Arbeit nicht durchzuführen gewesen wäre.

Herrn Prof. Dr. med. R. Ascherl, der mir das Thema zur Verfügung gestellt hat und mich nach besten Kräften bei der Durchführung unterstützte.

Herrn Prof. Dr. med. R. Gradinger, der mir wieder neuen Ansporn gab, die Arbeit weiterzuführen und zu vollenden, und die Vaterschaft für die Arbeit übernahm.

Herrn Priv. Doz. Dr. med. G. Metak, der mir trotz starker wissenschaftlicher Beanspruchung bei der Durchführung der Operationen wesentliche Hilfe war.

Frau Dr. med. vet. S. Kerschbaumer, die mich unermüdlich bei der histologischen Auswertung unterstützte.

allen Mitarbeitern des Institutes für Experimentelle Chirurgie ohne deren Hilfe die Durchführung der Arbeit nicht möglich gewesen wäre.

und nicht zuletzt, und ganz besonders meinen Eltern und allen Freunden und Bekannten, die meine Launen auf dem steinigen Weg vom euphorischen Beginn, schon der ersten Arbeit, über die tiefe Desillusion und jahrelange Resignation, bis hin zum nun doch erfreulichen Ende ertragen mußten.

## 15 Lebenslauf

Name: Markus Volker Keydel

Geburtsdatum: 12. August 1967

Geburtsort: Straubing

Familienstand: ledig, keine Kinder

Eltern: Ortraud Keydel, geb. Volker, Hausfrau  
Dr. Friedrich Keydel, Vizepräsident der Bayerischen Landesanstalt für Bodenkultur und Pflanzenbau in Freising / Weihenstephan

Grundschule: von 1973 bis 1977 Grundschule Freising / Vötting

Gymnasium: von 1977 bis 1986 Josef-Hofmiller-Gymnasium Freising  
allgemeine Hochschulreife 1986

Grundwehrdienst: von 1986 bis 1987

Studium: vorklinischer Teil an der Uni Regensburg von 1987 bis 1990  
klinischer Teil an der TU München von 1990 bis 1994

Beruf: von 01. Januar 1995 bis 30. Juni 1996 Arzt im Praktikum in der Klinik und Poliklinik für Orthopädie und Sportorthopädie der TU München  
von 01. Juli 1996 bis dato Assistenzarzt in der Klinik und Poliklinik für Orthopädie und Sportorthopädie der TU München