

Aus der Klinik für Unfall- und Handchirurgie der Heinrich-Heine-
Universität Düsseldorf

Direktor: Prof. Dr. med. Joachim Windolf

Histomorphometrische Analyse des Einheilungsverhaltens von
Kalziumphosphatgranulat am lasttragenden Knochen im Tierversuch

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von
Alina Miriam Kessner

2012

Als Inauguraldissertation gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen
Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

gez. Univ.-Prof. Dr. med. Joachim Windolf
Dekan

Referent: PD Dr. med. Hakimi

Korreferent: PD Dr. med. Kröpil

Anteile dieser Dissertation von Alina Kessner zählten zum Inhalt einer Publikation, die englischsprachig im European journal of medical research unter folgendem Titel veröffentlicht wurde:

□The progress of early phase bone healing using porous granules produced from calcium phosphate cement□

European journal of medical research (2010) 15: 1-8. P. Jungbluth, M. Hakimi, J. P. Grassmann, J. Schneppendahl, A. Kessner, M. Sager, A. R. Hakimi, J. Becker, J. Windolf, M. Wild

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	1
1.1	Die Spongiosaplastik.....	2
1.1.1	Autologe Spongiosaplastik.....	2
1.1.2	Allogene Spongiosaplastik.....	3
1.2	Übersicht der Knochenersatzmaterialien.....	4
1.3	Überblick Studien Kalziumphosphat-Zement-Granulat.....	7
1.4	Zielsetzung der Arbeit.....	9
2	Material und Methoden.....	10
2.1	Tierexperimentelle Versuche.....	10
2.2	Operative Eingriffe.....	11
2.2.1	Prä-/ und intraoperatives Management.....	11
2.2.2	Produktion des Defektes.....	12
2.2.3	Auffüllung des Defektes.....	12
2.2.3.1	Entnahme der autologen Spongiosa.....	13
2.2.3.2	Das Calcibon-Granulat.....	14
2.2.4	Postoperatives Management□ □ □ □ □ □ □ □ □ □ □ □ ...	14
2.2.5	Euthanasie und Präparat-Entnahme□ □ □ □ □ □ □ □ □	15
2.3	Histologische Aufarbeitung.....	15
2.3.1	Vorbehandlung des Gewebes.....	15
2.3.2	Infiltration und Polymerisation.....	16
2.3.3	Trenn-Dünnschliff-Technik.....	17
2.3.4	Färbung.....	18
2.4	Histologische Beurteilung.....	19
2.4.1	Histomorphometrische Auswertung.....	19
2.4.2	Semiquantitative Auswertung.....	19
2.4.3	Beurteilung der Knochengeweberemodellierung.....	20
2.5	Statistische Analyse.....	20
3	Ergebnisse.....	21
3.1	Histomorphometrische Beurteilung.....	21
3.2	Semiquantitative Beurteilung.....	22
3.3	Beurteilung der Remodellierung des Knochengewebes.....	24
4	Diskussion.....	25
4.1	Fazit.....	33

Inhaltsverzeichnis

5	Zusammenfassung.....	34
6	Abkürzungsverzeichnis.....	36
7	Literaturverzeichnis.....	37
8	Danksagungen.....	51
9	Akademische Ausbildung.....	52

1. Einleitung

Deutschland befindet sich im demographischen Wandel [2]. Steigende Lebenserwartungen und sinkende Geburtenzahlen führen zu einer progredienten Alterung der Bevölkerung in den nächsten 30 Jahren (Abb.1). Nach den Ergebnissen der aktuellen Bevölkerungsvorausberechnung wird die Zahl der 60-Jährigen und Älteren bis zum Jahre 2030 um rund 38% von 20,5 Millionen auf voraussichtlich 28,4 Millionen Einwohner und die der über 80-Jährigen vermutlich sogar um 73% von 3,6 Millionen auf 6,3 Millionen ansteigen [4]. Hierdurch ist unser Gesundheitssystem u.a. konfrontiert mit einer steigenden Anzahl der Erkrankungen des Muskel-/Skelettsystems und des Bindegewebes [5].

Große Knochendefekte traumatologischer oder orthopädischer Genese bedürfen der chirurgischen Behandlung, da die körpereigene Knochenheilung auf relativ kleine Defekte beschränkt ist [6].

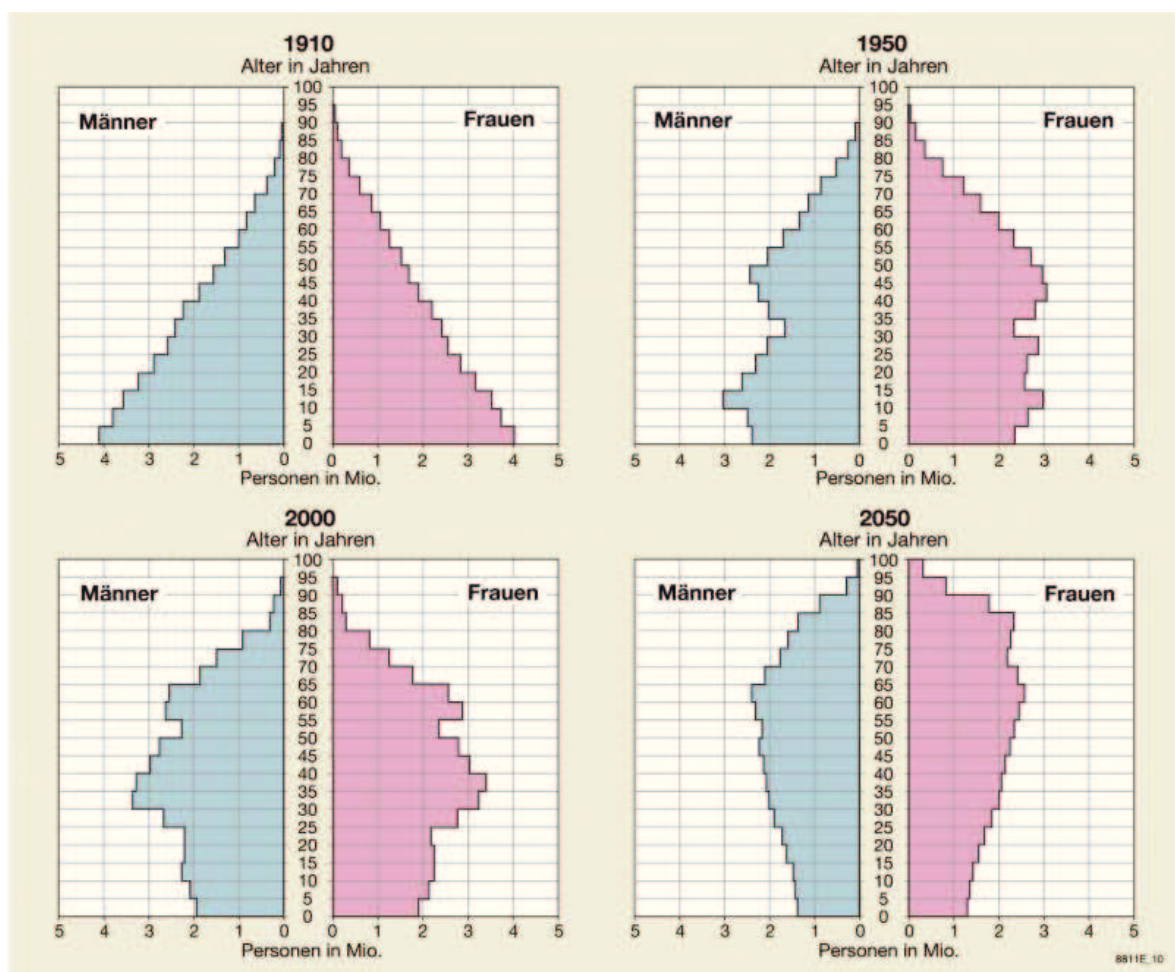


Abb. 1 Altersaufbau der Bevölkerung in Deutschland [1]

1.1 Die Spongiosaplastik

1.1.1 Autologe Spongiosaplastik

Goldstandard bei der Behandlung größerer Defekte ist immer noch die autologe Spongiosaplastik [7-9], die z.B. aus dem Beckenkamm entnommen werden kann.

Einen großen Vorteil der autologen Spongiosa als Transplantatmaterial stellen die Eigenschaften der Osteoinduktion, Osteokonduktion und Fähigkeit zur Osteogenese dar [8-10]. Osteoinduktion bedeutet, dass eine Stimulierung der im Lagergewebe befindlichen oder lokal applizierten Zellen zur Differenzierung in knochenneubildende Zellen stattfindet. Bei der Osteokonduktion wird der Vorgang der Knochenneubildung unterstützt, in dem eine geeignete Leitstruktur bereit gestellt wird, in welche das umgebende Knochengewebe gut einwachsen kann.

Osteogenetische Materialien enthalten lebende Zellen, die Knochen neu bilden können [3]. Die Vereinigung dieser drei Eigenschaften ist der autologen Spongiosa eigen.

Zusätzlich wird bei der autologen Spongiosaplastik eine immunologische Abwehrreaktion des Körpers vermieden, da es sich um körpereigenes Material handelt [8, 9]. Jedoch bringt die Spongiosaplastik auch einige Nachteile mit sich (Tab.1). Die hohe Resorptionsfähigkeit des Materials führt dazu, dass die eingesetzte Spongiosa vom Körper oft schon vollständig abgebaut wird, bevor der knöcherne Defekt vollständig ausheilen konnte [11]. Des Weiteren ist die Größe des Spongiosa-Transplantates auf ungefähr 20 cm³ begrenzt [12-14], was unter Umständen dazu führen kann, dass nicht genügend Material zu Verfügung steht.

Verschiedene Studien haben gezeigt, dass die Entnahme autologer Spongiosa nicht ganz risikofrei ist [15-18]. Neben selteneren Komplikationen wie Beckeninstabilität, Beckenfraktur, tiefe Wundinfektionen, Gefäßverletzungen, chronische Schmerzen an der Entnahmestelle, welche den Patienten im späteren Verlauf in seiner körperlichen Aktivität einschränken, Dysästhesien oder unschöne Narben an der Entnahmestelle sind die häufigsten Probleme [7, 15, 19].

Einleitung

Außerdem bedeutet die Notwendigkeit eines zusätzlichen operativen Verfahrens zur Entnahme der autologen Spongiosa zusätzliche Kosten [15-17] und die Anwendung wird nicht für alte Patienten, Kinder, Patienten mit Infektionskrankheiten oder malignen Prozessen empfohlen [20].

Tabelle 1: Vor- und Nachteile der autologen Spongiosaplastik

Vorteile	Nachteile
Osteoinduktion	Vorschnelle Resorption des Materials im Körper (mangelnde Stabilität)
Osteokonduktion	Begrenzte Größe
Osteogenese	Entnahmemorbidität
Vermeidung immunologischer Abwehrreaktionen	Nicht empfohlen für alte Patienten, Kinder, Patienten mit Infektionskrankheiten oder malignen Prozessen
	Hohe Kosten

1.1.2 Allogene Spongiosaplastik

Alternativ zur autologen Spongiosa lässt sich auch allogene Spongiosa verwenden. Damit lässt sich das Problem umgehen, nicht genügend notwendiges Material vom Patienten selber zu erhalten, allerdings besteht ein Risiko für die Übertragung von Infektionskrankheiten (z.B. HIV) oder einer immunologischen Abstoßungsreaktion, sowie einer fraglichen Transplantatresorption [7, 21]. Eine Standardisierung der Transplantat-Qualität ist nahezu unmöglich, da es sich um verschiedene Spender handelt [7]. Die Kosten, die mit der Entnahme der allogenen Spongiosa und der anschließenden Testungen (Ausschluss HIV, Hepatitis, Syphilis, bakterielle Kontamination) einhergehen, sind außerdem in Betracht zu ziehen [22].

1.2 Übersicht der Knochenersatzmaterialien

Die aufgeführten Nachteile einer autologen Spongiosaplastik sind die Grundlage für die Entwicklungen in der Herstellung von Knochenersatzmaterialien in den letzten Jahrzehnten gewesen [23-25]. Bei den Knochenersatzmaterialien unterscheidet man anorganische von organischen Stoffen (siehe Abb. 2). Außerdem gibt es noch sogenannte **Composites**, welche Kombinationen der verschiedenen Ersatzstoffe beinhalten.

Zu den organischen Knochenersatzmaterialien zählen die (biologischen) allogenen bzw. xenogenen Ersatzstoffe, sowie die (synthetischen) Polymere.

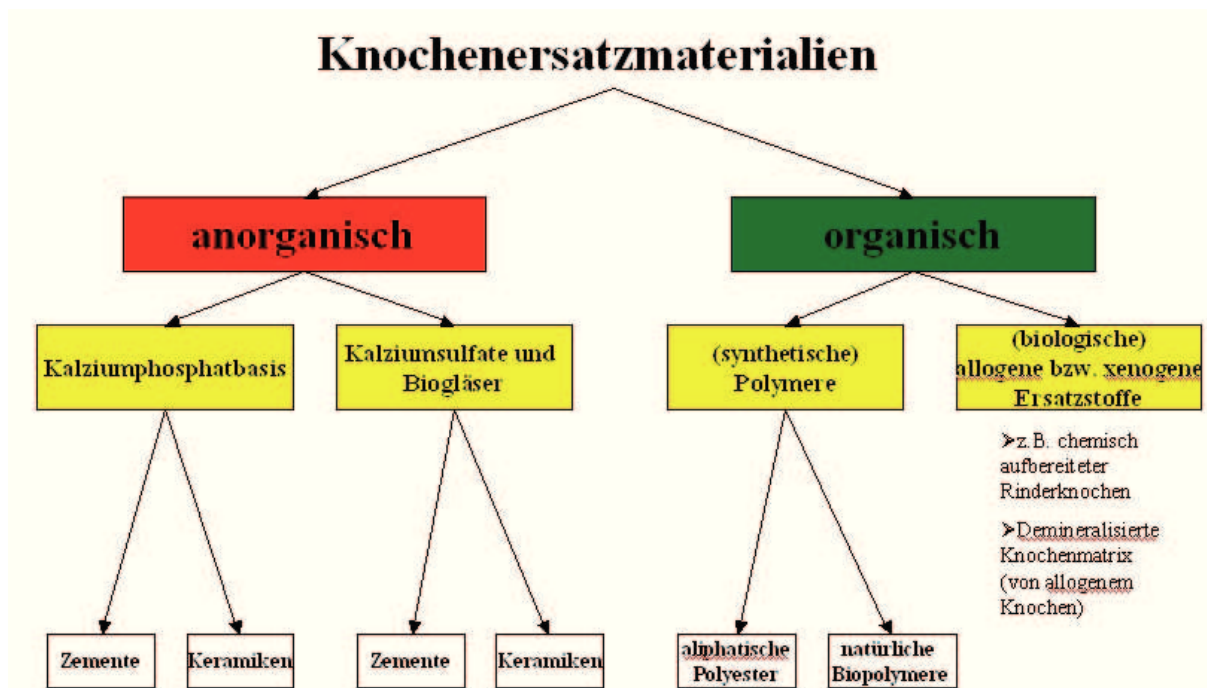


Abb. 2 Übersicht über die verschiedenen Klassen der Knochenersatzmaterialien

Bei den xenogenen (meist spongiöser Rinderknochen) Materialien werden mit Hilfe von chemischen Verfahren die zellulären und antigenen Bestandteile, unter Erhalt der porösen Struktur sowie der Stabilität des Gewebes, entfernt. Ebenso können allogene Implantate chemisch aufbereitet werden [3]. Allerdings darf nicht außer Acht gelassen werden, dass diese xenogenen Materialien fraglich Wachstumsfaktoren im Sinne von Osteoinduktoren

Einleitung

enthalten, da sie nach ihrer Aufarbeitung zur Vermeidung von Transplantatreaktionen lediglich als Osteokonduktoren dienen.

Außerdem auf dem Markt befindlich ist demineralisierte Knochenmatrix. Diese wurde auf Basis der Arbeit von Urist [26] vor dem Hintergrund des Erhaltes osteoinduktiver Potenz der nichtmineralisierten knöchernen Bestandteile entwickelt, was chemisch durch eine (Teil-) Demineralisierung von allogenem Knochen erreicht wird. Die dann verbleibenden induktiven Faktoren (z.B. BMP) sollen zur Stimulation der Knochenneubildung dienen. Mittlerweile lassen sich osteoinduktive Materialien wie BMP jedoch auch rekombinant herstellen. Im Gegensatz zu den rekombinant hergestellten Wachstumsfaktoren geht der Einsatz der demineralisierten Knochenmatrix häufiger mit allergischen Reaktionen einher.

Zu den Polymeren gehört zum einen die Gruppe der aliphatischen Polyester [3]. Nachteilig ist, dass sie bei der Degradation durch Freisetzung von Säuren zu einer Senkung des lokalen pH-Wertes führen. Des Weiteren zerfallen sie bei diesem Vorgang in Mikrokristallite, was zu einer Immun- und Fremdkörperreaktion führen kann. Aufgrund dieser Vorgänge ist die Verwendung als Knochenersatzmaterial bisher eingeschränkt [27]. Ebenfalls zu den Polymeren zählt die Gruppe der natürlichen Biopolymere. Einige Beispiele hierfür sind Kollagen und Gelatine, die zum Teil aus chemisch aufbereiteter Rinderhaut gewonnen werden.

Die anorganischen Knochenersatzmaterialien lassen sich wiederum unterteilen in Keramiken und Zemente auf Basis von Kalziumsulfaten und Biogläsern, sowie auf Basis von Kalziumphosphat. Größere klinische Bedeutung haben heute allerdings eher Letztere. Zemente und Keramiken auf Kalziumphosphatbasis lassen sich aufgrund ihres Aushärtungsverfahrens und ihrer Eigenschaften unterscheiden.

Der Kalziumphosphatzement entsteht durch Mischung eines Pulvers und einer wässrigen Lösung. Die so entstehende Paste lässt sich dann sofort intraoperativ verwenden und härtet im Defekt bei Körpertemperatur aus.

Die Keramik entsteht durch mehrere aufeinander folgende Sinterungsschritte (Sinterung) bei hohen Temperaturen und ist üblicherweise anschließend im Körper nicht oder nur über sehr lange Zeit hinweg abbaubar. Aufgrund des Ausgangsmaterials kann man in synthetische (Trikalziumphosphat, Hydroxylapatit oder Kombination beider Materialien)

und biologische (bovine Spongiosa, Korallen) Keramiken unterteilen [3]. Keramische Implantate sind intraoperativ nicht verformbar und damit nur eingeschränkt zu verarbeiten [28, 29].

Die Kalziumphosphat-Materialien zeichnen sich allesamt durch die Eigenschaft der Osteokonduktion aus [7]. Das Gerüst für die Einsprossung des neuen Knochens sollte durch Makro- und Mikroporen (Porosität) geprägt sein. Die Makroporen (Porengröße $> 100 \mu\text{m}$) sind wichtig für die Infiltration von fibrovaskulärem Gewebe und Revaskularisierung [20] und spielen somit eine große Rolle bei Einsprossung von neuem Knochen und dem Abbau des Materials [28]. Das Vorhandensein von Mikroporen (Porengröße $< 5 \mu\text{m}$) ist extrem wichtig für die Biodegradation, welche eine "chemische Umsetzung organischen Materials unter physiologischen Bedingungen" [30] beschreibt. Die Adsorption von Proteinen und Wachstumsfaktoren, sowie die Adhäsion und Kolonisation von Osteoprogenitorzellen, sind von der mikroporösen Oberfläche abhängig [11]. Zusätzlich ist die Effektivität der Porosität von der Interkonnektivität der Poren abhängig [31-40]. Interkonnektivität beschreibt das Vorhandensein von Verbindungen der einzelnen Poren untereinander.

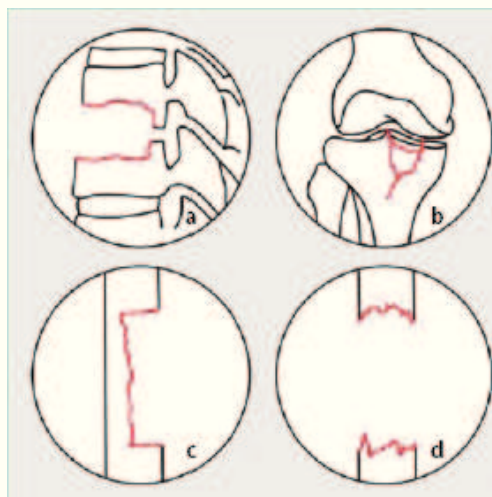
Neben all den Vorteilen, die die Porosität so mit sich bringt, sinkt mit deren Anstieg jedoch die mechanischen Festigkeit [36, 38, 41].

In den letzten 30 Jahren wurde außerdem in verschiedenen Studien berichtet, dass die porösen Kalziumphosphat-Materialien auch osteoinduktive Eigenschaften hätten [42]. Die osteoinduktiven Eigenschaften des Materials können beeinflusst werden, indem man Veränderungen an der chemischen Zusammensetzung (beispielsweise das Hinzufügen von Wachstumsfaktoren), der Oberflächentopographie oder der Geometrie vornimmt, was wiederum die Resorptionsrate und die Zell-Material-Interaktion beeinflusst [28, 43].

Die Verarbeitungsmöglichkeiten eines Knochenersatzmaterials sind zudem direkt abhängig von seiner Form. Experimentelle und klinische Studien konnten nachweisen, dass Kalziumphosphat-Materialien in Form von Granulat besonders gut zu verarbeiten sind [19, 28, 44], da sie sich eher der individuell benötigten Form anpassen. In der Vergangenheit wurde allerdings bei der überwiegenden Anzahl der Granulate die Keramik als Ausgangsmaterial genutzt, da Granulate aus Kalziumphosphat ohne den Sinterungsprozess technisch nicht hergestellt werden konnten [28, 45]. Mit den entsprechenden Techniken ist es mittlerweile jedoch möglich, die Granulate mittels Kalziumphosphat-Zement

Einleitung

herzustellen. Kalziumphosphat-Zemente besitzen im Vergleich zu Kalziumphosphat-Keramiken einige Vorteile, wie z. B. eine besonders hohe spezifische Oberfläche und somit eine bessere Bioresorbierbarkeit durch Osteoklasten. Des Weiteren besitzen sie eine knochenspezifischere Biokompatibilität, da die für die Synthese verwendeten Materialien, im Gegensatz zu den Materialien, die in den Keramiken enthalten sind, allesamt Bestandteile des menschlichen Körpers sind [45, 46]. Diese neue Form der Granulate könnte außerdem durch die große Oberfläche (welche durch die große Anzahl an Mikro- und Makroporen entsteht) potente Trägerstoffe für Medikamente darstellen und biologisch besonders reaktiv sein [29, 45, 46].



Defektart	Optionen
a) Wirbelsäulendefekt	1. autogener Span 2. Metallimplantat + Spongiosa / Wachstumsfaktoren 3. Vertebro-/Kyphoplastie
b) Metaphysärer Defekt	1. autogene Spongiosa / Span 2. Knochenersatzmaterialien 3. Endoprothese 4. Osteochondrale Allo- Transplantate
c) Halbschaftdefekt	1. autogene Spongiosa / Span 2. Knochenersatzmaterialien / Wachstumsfaktoren
d) Schaftdefekt	1. < 3cm: autogene Spongiosa / Wachstumsfaktoren 2. > 3cm: Segmenttransport / Kallusdistraction 3. > 3cm: Mikrovaskuläre autogene Transplantate

Abb. 3 Einteilung der Knochendefekte in 4 Grundtypen und empfohlene Therapieoption [3]

1.3 Überblick Studien Kalziumphosphat-Zement-Granulat

Bisher gibt es nur eine übersichtliche Anzahl an Studien, die sich mit Kalziumphosphat-Zement-Granulat als Material genauer auseinander gesetzt haben [39, 47-70]. Davon wiederum handelt es sich aber nur bei einigen wenigen um in vivo Studien [48, 51, 52, 58, 63, 65].

Die Autoren Öztürkmen et al. [48] untersuchten in einer Studie mit 28 Patienten das klinische und radiologische Outcome nach Behandlung von Tibia-Plateau-Frakturen mit

Einleitung

Kalziumphosphat-Zement-Granulat. Dabei erwies sich das verwendete Material als ein sicheres Biomaterial mit vielen Vorteilen, wie z.B. die unbegrenzte Unterstützung durch das Material, den Wegfall der mit der Entnahme von autologer Spongiosa verbundenen Morbidität, die optimale Füllung von unförmigen Knochendefekten und die Verkürzung der postoperativen Dauer bis zur Vollbelastung des operierten Defekts in der Behandlung von Tibia-Plateau-Frakturen.

Eine weitere klinische Studie führten die Autoren Rajesh et al. mit Patienten durch, die intraossäre periodontale Defekte aufwiesen [58]. Ca. 60 Patienten wurden in der Studie eingeschlossen. Als Vergleichsmaterial zum verwendeten Kalziumphosphat-Zement-Granulat wurde Hydroxyapatit-Keramik-Granulat verwendet. Das Kalziumphosphat-Zement-Granulat zeigte dabei ein signifikant besseres Outcome, als das verwendete Vergleichsmaterial.

Die Autoren Wen et al. untersuchten in einer tierexperimentellen Studie an Hasen die Osteokonduktivität und Bioresorption von Brushit-Kalziumphosphat-Zement-Granulat bei der Verwendung in Rekonstruktionen nach vorderen Kreuzbanddefekten [51]. Dabei stand die Grenzflächen von Knochen und Sehne im Fokus. Intraoperativ wurden die Defekte bilateral gesetzt, sodass eine Seite zusätzlich mit Brushit-Kalziumphosphat-Zement-Granulat behandelt wurde und die andere Seite als Kontroll-Gruppe diente. Die zusätzliche Behandlung mit dem Brushit-Granulat zeigte dabei eine signifikant bessere Sehnenreintegration in den Knochen, als die Kontroll-Gruppe.

Die Autoren Voor et al.[52] evaluierten das in vivo Verhalten von Hydroxylapatit-Zement (HAC) entweder mit einer Mischung aus Kalziumphosphat-Zement-Granulat oder autologer Spongiosa. Dabei wurden im distalen Femur von Kaninchen zylinderförmige Bohrlöcher gesetzt, die jeweils mit einer der Mixturen gefüllt wurden. Als Kontroll-Gruppe dienten leer verbliebene Defekte und Defekte, die mit autologer Spongiosa allein befüllt wurden. In der Auswertung zeigte sich, dass das mit HAC gemischte Kalziumphosphat-Zement-Granulat über acht Wochen in vivo eine große Stabilität mit sich bringt, die Umwandlung in neues Knochengewebe aber deutlich langsamer stattfindet, als bei der autologen Spongiosa allein. Das Gemisch aus HAC und autologer Spongiosa zeigte in diesem Punkt das bessere Verhalten.

1.4 Zielsetzung der Arbeit

Trotz der vielen positiven Eigenschaften von Kalziumphosphat-Zementen gibt es bislang nur wenige in vivo Studien, bei denen sie in Form von Granulat eingesetzt wurden [48, 51, 52, 58, 63, 65]. In den Studien, die Tiermodelle beinhalten, handelt es sich bei den Versuchstieren überwiegend um Kaninchen. Keine dieser Studien untersuchte jedoch den Heilungsprozess an einem lasttragenden langen Röhrenknochen in vivo, was für die Anwendung in der Orthopädie und Unfallchirurgie jedoch essentielle Information bringen kann.

Da die Spongiosaplastik, wie bereits im einführenden Teil erwähnt, derzeit immer noch Goldstandard, aber mit erheblichen Problemen und Risiken belastet ist, befindet sich die Wissenschaft immer noch auf der Suche nach einem vergleichbaren Knochenersatzmaterial.

Vor diesem Hintergrund habe ich es mir in meiner Dissertation zur Aufgabe gemacht, den Prozess der frühen Knochenheilung und Materialdegradation unter Verwendung eines Kalziumphosphat-Granulates (Calcibon® Granules, Biomet Deutschland GmbH, Berlin, Germany; Größe 2 □ 4 mm) und von autologer Spongiosa in der Behandlung eines Defektes kritischer Größe am lasttragenden langen Röhrenknochen von Minipigs mittels Histomorphometrie zu analysieren und zu vergleichen.

Anschließend soll diskutiert werden, ob und in wieweit das verwendete Kalziumphosphat-Granulat eine Alternative zur autologen Spongiosa darstellt.

2. Material und Methoden

Die Durchführung der kompletten Versuchsreihe erfolgte durch das Team [Knocheninduktion] der Klinik für Unfall- und Handchirurgie der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf.

Dazu zählten Frau A. und Frau Alina Miriam Kessner, die von Herrn PD Dr. Mohssen Hakimi und Herrn PD Dr. Pascal Jungbluth betreut wurden. Die operativen Eingriffe, Erfassung der Daten sowie die postoperative Versorgung und anschließende Euthanasie der Versuchstiere in der Tierversuchsanlage der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf wurden von der gesamten Arbeitsgruppe durchgeführt.

Dabei war die Aufgabe von Frau Kessner die Herstellung der histologischen Knochenpräparate sowie die Durchführung und die Analyse der histomorphometrischen Vermessungen unter der Anleitung der Betreuer der Arbeitsgruppe. Zudem führte sie bei diesen Präparaten eine semiquantitative Auswertung der histologischen Präparate bezüglich der Knochenneubildung, sowie der Resorptionsrate vom eingesetzten Knochenersatzmaterial durch.

Die Aufgaben von Frau A. bestanden aus der Gewinnung, der Analyse der Qualität und der Quantität des autolog hergestellten Platelet-Rich-Plasmas (PRP), gewonnen aus dem Vollblut der Versuchstiere, sowie dem Nachweis von vorhandenen Wachstumsfaktoren in dem gewonnenen PRP.

2.1 Tierexperimentelle Versuche

Dieses Versuchsvorhaben wurde gemäß § 8 Absatz 1 des Tierschutzgesetzes beantragt und genehmigt (Protokollnummer 50.05-230-78/06).

Das Schwein ist bzgl. der anatomischen Verhältnisse und physiologischen Vorgänge dem Menschen sehr ähnlich. Die Rate für neuen Knochenaufbau beträgt 1.2 – 1.5 mm/Tag und ist somit den Reparaturkapazitäten des Menschen für Knochen ähnlich [71]. Außerdem ist der Organismus im Vergleich mit anderen möglichen Versuchstieren relativ

unempfindlich. Aufgrund der erwünschten Belastung des betroffenen Knochendefektes muss ein Großtierversuch gewählt werden. Das Schweinmodell bietet bzgl. der Tierhaltung und -pflege einige Vorteile und wurde deshalb dem Hundmodell vorgezogen, zumal es in Bezug auf die Knochenbiologie keine Nachteile mit sich bringt. Aus diesen Gründen wurde es als Versuchstier für diese Studie ausgewählt.

Bei den in der vorliegenden Dissertationsarbeit verwendeten Versuchstieren handelte es sich um 16 weibliche Schweine der Rasse Göttinger Minipigs. Alle Tiere befanden sich durchschnittlich im Alter von 18-30 Monaten. Das durchschnittliche Gewicht betrug 25-35 kg. Die Tierversuchsanlage des Klinikums der Heinrich Heine Universität in Düsseldorf sorgte für die Unterbringung der Tiere in 16 m² großen Ställen. Die Tiere wurden randomisiert zu je acht der Calcibon- und der Spongiosa-Gruppe zugeteilt.

2.2 Operative Eingriffe

2.2.1 Prä-/ und intraoperatives Management

Zunächst erfolgte die Rasur der Operationsgebiete bei den Tieren, wobei in der Gruppe mit autologer Spongiosa neben der Rasur der rechten Tibia zusätzlich der rechte Beckenkamm enthaart wurde. Als Narkoseform wurde die Kombination aus intravenöser und inhalativer Intubationsnarkose gewählt, wobei zur intravenösen Narkose Thiopental (Inresa Arzneimittel GmbH, Freiburg, Germany) und zur inhalativen Narkose ein Gemisch aus 0,9 l Lachgas zu 2 l Sauerstoff und 1- 1,5 % Isofluran verwendet wurde. Der intravenöse Zugang diente hier zusätzlich zur perioperativen Analgesie, wobei zu diesem Zweck Piritramid (Dipidolor®, Janssen-Cilag GmbH, Neuss, Germany) eingesetzt wurde.

Um einer Dehydratation und/oder kardialen Arrhythmien vorzubeugen, erfolgte eine kontinuierliche Infusion mit einem Gemisch aus 5 % iger Glucose-Lösung (Delta-Select, Pfullingen, Germany), 10 ml Inzolen (Dr. Franz Köhler Chemie GmbH, Alsbach-Hähnlein, Germany) und 5 ml Lidocain 2 % (Lidocain-HCl, B.Braun, Melsungen, Germany).

Der Narkosemonitor (Capnomac, Hoyer Medizintechnik, Bremen, Germany) überwachte während der gesamten Operationsdauer die Sauerstoff-, Lachgas- und

Isoflurankonzentration. Die kardiale Funktion der Versuchstiere überwachte ein EKG-Gerät (Cardiofax V, Nihon Kohden, Bad Homburg, Germany). Darüber hinaus wurden zur Infektprophylaxe 3,3 ml Lincomycin (Lincomycin 20 %, WDT, Garbsen, Germany) verabreicht.

2.2.2 Produktion des Defektes

Unter Zuhilfenahme von Skinsept® (Henkel-Ecolab Deutschland GmbH, Düsseldorf) erfolgte die Herstellung aseptischer Verhältnisse im Operationsgebiet. Nach steriler Abdeckung wurde über einen 10 cm langen Hautschnitt an der proximalen rechten Tibia medial der Knochen freigelegt. Anschließend wurde über einen eingebrachten Kirschner-Draht 10 mm distal des Gelenkes und 12 mm ventral der Tibiahinterkante mittels Hohlfräse (Aesculap AG & Co. KG, Tuttlingen, Germany) ein monokortikaler Knochendefekt von 11 mm Durchmesser und 25mm Tiefe kreiert.

In vorherigen Experimenten erzeugten wir einen Defekt genau dieser Art und Weise in der Tibia von 4 Minipigs, jedoch ohne anschließende Füllung dessen. Innerhalb des ersten bis dritten postoperativen Tages mussten jedoch alle Tiere aufgrund einer proximalen Tibiafraktur eingeschläfert werden. Dies belegt, dass es sich bei dem erzeugten Defekt um einen Defekt kritischer Größe handelt.

Um einen weiteren unnötigen Verlust an Tieren zu vermeiden, wurde in dieser Studie auf eine Kontroll-Gruppe mit Tieren, bei denen der Defekt ohne anschließende Füllung gesetzt wurde, verzichtet.

2.2.3 Auffüllung des Defektes

Die Auffüllung des Defektes erfolgte bei acht Tieren mit Calcibon-Granulat (Calcibon® Granules, Biomet Deutschland GmbH, Berlin, Germany) und bei acht Tieren mit autologer Spongiosa, welche zuvor aus dem Beckenkamm der Tiere entnommen wurde. So entstanden nun zwei Versuchsgruppen:

- 1) Calcibon-Granulat-Gruppe
- 2) Autologe Spongiosa-Gruppe

Nach Setzung des Defektes wurde die Blutung zunächst ausgiebig mit Kochsalzlösung gespült und unter sanftem Druck mit Mullbinden kontrolliert. Dann wurde der Defekt mit dem jeweiligen Material (siehe Abb. 4) gefüllt (Calcibon / Spongiosa) und das innen

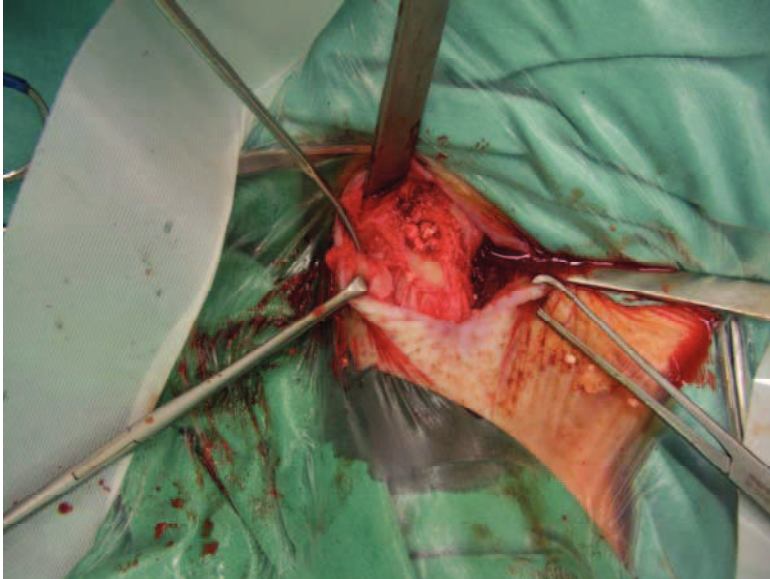


Abb. 4 Mit Calcibon-Granulat aufgefüllter Defekt

liegende Gewebe mittels resorbierbarer Fäden (Vicryl®, Ethicon Products, Norderstedt, Germany) adaptiert. In allen Fällen der Spongiosa-Gruppe war die Menge des gewonnenen autologen Knochenmaterials hinreichend für die Defektfüllung, ebenso die Menge des verwendeten Calcibon-Granulat in der

Calcibon-Gruppe. Auf die Hautnaht kam ein Sprühverband (Aluminium-Spray, Fa. Selectavet, Weyarn-Holzolling, Germany).

2.2.3.1 Entnahme der autologen Spongiosa

Nach Rasur der entsprechenden Stelle am linken Beckenkamm, Desinfektion mit Skinsept® (Henkel-Ecolab Deutschland GmbH, Düsseldorf) und steriler Abdeckung erfolgte ein Hautschnitt mit anschließender Präparation und Darstellung der Beckenkammkortikalis. Eröffnung des Periost und einbringen eines Kirschner-Drahtes. Erneut wurde mittels Hohlfräse (Aesculap AG & Co. KG, Tuttlingen, Germany) ein, in Durchmesser und Tiefe der tibialen Defektzone identisches, Spongiosastück entnommen, welches dann mühelos in den erzeugten Defekt der Tibia des Versuchstieres eingesetzt werden konnte (siehe dazu auch Abb. 5 +6). Danach schichtweiser Wundverschluss mittels resorbierbarer Fäden (Vicryl®, Ethicon Products, Norderstedt, Germany). Auf die Hautnaht kam ein atmungsaktiver Sprühverband (Aluminium-Spray, Fa. Selectavet, Weyarn-Holzolling, Germany).

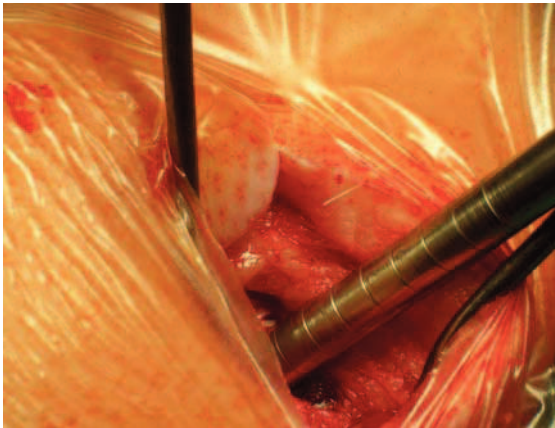


Abb. 5 Einbringen der Hohlfräse, Detailansicht



Abb. 6 Entnommenes Spongiosastück

2.2.3.2 Das Calcibon-Granulat

Das Calcibon-Granulat (Biomet Deutschland GmbH, Berlin, Germany) ist synthetisch



Abb. 7 Calcibon® Granules

hergestellt. Es weist eine Partikelgröße von 2-4 mm auf (siehe Abb. 7). Es besteht aus alpha-Tri-Kalziumphosphat, Kalziumhydrogenphosphat, Kalziumcarbonat und präzipitiertem Hydroxylapatit. Die Mikro- und Makroporen ($<10 - 550 \mu\text{m}$), die die Besonderheit der Beschaffenheit von Calcibon-Granulat ausmachen, gestatten als osteokonduktive Komponente das Einwandern von Zellen in das Granulat. Gleichzeitig gewährleistet die poröse Struktur eine Kompressionsfestigkeit von 4-7 MPa [72].

2.2.4 Postoperatives Management

Nach Beendigung der chirurgischen Maßnahmen wurden die Narkosegase abgestellt. Bis zum Wiedereinsetzen der Spontanatmung und der daran anschließenden Extubation erfolgte eine vorübergehende Bebeutelung. Nach Aufwachen aus der Narkose konnte das operierte Bein direkt voll belastet werden. Postoperativ erhielten die Tiere drei Tage lang

oral zur Prophylaxe Lincomycin (3,3 ml Lincomycin 20%, WDT, Grabsen, Germany), sowie zur Schmerzlinderung Carprofen (Rimadyl®, Pfizer Pharma GmbH, Karlsruhe, Germany) und Piritramid (Dipidolor®, Janssen-Cilag GmbH, Neuss, Germany) subkutan.

2.2.5 Euthanasie und Präparatentnahme

Sechs Wochen nach der Operation erfolgte die Euthanasie der Versuchstiere durch Barbituratüberdosierung (Eutha 77, Essex Pharma GmbH, München, Germany).

Zur Entnahme der Tibia wurde analog zur vorherigen Operation an der selben Stelle ein medialer Hautschnitt gesetzt. Erneutes Durchtrennen der Faszien und stumpfe Präparation durch die Muskulatur. Wie zuvor wurde das Kniegelenk zur Orientierung mit freigelegt. Präparation der Defektstelle. Die Ligamenta cruciata genus wurden durchtrennt, um die Lösung der Tibia vom Femur zu ermöglichen. Das distale Ende der Tibia wurde mit einer elektrischen Säge (Aesculap Oscillant, Aesculap AG & Co. KG, Tuttlingen, Germany) vom proximalen Anteil, der die Defektstelle beinhaltete, gelöst.

Die so entnommene Tibia wurde auf die Größe der Region des Interesses mittels einer Bandsäge (MBS 220/E, Proxxon GmbH, Niersbach, Germany) getrimmt.

2.3 Histologische Aufarbeitung

2.3.1 Vorbehandlung des Gewebes

Nach Euthanasie der Versuchstiere und der anschließenden Entnahme der Tibia-Stücke wurden diese zur **Fixierung** in 10 % gepufferter Formalinlösung (Abb. 8) bei 4 °C für 14 Tage im Kühlschrank aufbewahrt. Dies war notwendig, um die intra- und supravitalen Stoffwechselprozesse, sowie die postmortalen Zerfallsprozesse zu unterbrechen. Zur Vermeidung von kristallinen Niederschlägen durch das Fixationsmedium in den späteren fertigen Blöcken, war eine Wässerung der Proben erforderlich. Nach zweistündiger Wässerung der Präparate mit Leitungswasser erfolgte die **Dehydratation** in aufsteigender Alkoholreihe (70%, 80%, 90%, 96% und 2 x 100% für jeweils eine Woche) bei Raumtemperatur. Zur Entfettung wurde als **Intermedium** zwischen dem Prozess der



Abb. 8 *Tibia-Stück in 10 % gepufferter Formalinlösung*

Entwässerung und der Infiltration Xylol eingesetzt, in welches die Proben weitere zweimal für je zwei Tage eingelegt wurden.

Die **Präinfiltration** erfolgte in drei Schritten über je vier Tage Dauer zunächst mit einem Gemisch aus Xylol und endstabilisierter Basislösung Technovit® 9100 Neu (Heraeus Kulzer, Werheim, Germany) im Verhältnis 1:1.

Darauf folgte ein Gemisch aus 200 ml entstabilisiertem Technovit 9100 Neu Basis und 1 g Härter-1 und im Anschluss daran eine Lösung aus 200 ml stabilisiertem Technovit 9100 Neu Basis und 1 g Härter-1.

2.3.2 Infiltration und Polymerisation

Ein Gemisch aus 60 g Polymethylmethacrylat (PMMA-Pulver, Heraeus Kulzer, Werheim, Germany) und 750 ml Technovit® 9100 Basislösung entstabilisiert (Heraeus Kulzer, Werheim, Germany) diente als Medium zur Infiltration der Proben mit dem eigentlichen Kunststoff. In metallenen Förmchen wurden die Proben mit dieser Substanz übergossen und für vier Tage gelagert.

Für die Polymerisation war die Herstellung zweier Stammlösungen notwendig. Stammlösung A setzte sich zusammen aus 107 g PMMA-Pulver und 667 ml Technovit® 9100 Basislösung entstabilisiert.

Stammlösung B setzte sich zusammen aus 4,4 ml Polymerisationsregler (Heraeus Kulzer, Werheim, Germany) und 100 ml Technovit® 9100 Basislösung entstabilisiert. Die jeweilige Lösung wurde nach Herstellung für eine Nacht zur

besseren Lösung bei 4°C in den Kühlschrank verbracht. Am nächsten Tag wurde Stammlösung A 4 g Härter-1 (Heraeus Kulzer, Werheim, Germany) und Stammlösung B 8 ml Härter-2 (Heraeus Kulzer, Werheim, Germany) zugesetzt. Dann wurde Stammlösung A mit Stammlösung B im Verhältnis 9:1 gemischt, die Tibia-Resektate wiederum in metallenen Förmchen darin eingebettet und bei 4°C für 20 Stunden gelagert.



Abb. 9 In Kunststoff eingebettete Tibia-Resektate

2.3.3 Trenn-Dünnschliff-Technik

Um nun aus den in Kunststoff eingebetteten Präparaten (Abb. 9) ein mikroskopierbares Objekt herzustellen, mussten aus den Blöcken dünne Scheiben angefertigt werden.

Nach Überprüfung auf vollständige Aushärtung wurden die Präparate mittels Diamantbandsäge (Exakt®, Apparatebau, Norderstedt, Germany; siehe Abb. 10) in axialer Richtung zum Bohrlochdefekt geschnitten. Es wurden pro Block je drei Schnitte mit einer



Abb. 10 Diamantbandsäge der Firma Exakt

Dicke von ca. 320 μm aus der zentralen Defektzone angefertigt. Das auf dem Prinzip einer Bandsäge arbeitende Trennschleifsystem besteht aus Trenneinheit, Präzisionsparallelführung, dosierbarem Vorschub und einem Kühlsystem. Die Werkstückführung pendelt bei dem Sägevorgang um

ihre eigene Achse. Dadurch kann man bei relativ hohen Schnittgeschwindigkeiten saubere Schnittflächen erhalten. Der Probenvorschub wird über Gewichte gesteuert. Diese können in Abhängigkeit des zu verarbeitenden Materials eingestellt werden, was notwendig ist, um beispielsweise ein Ausbrechen von Knochenbälkchen zu verhindern.

Die so hergestellten Schnitte wurden mit Technovit® 4000(Haereus Kulzer) auf Objektträger (50 x 100 x 2 mm, Firma Dia-Plus, Walter Messner GmbH, Oststeinbeck, Germany) aufgebracht. Technovit 4000 ist ein schnellhärtender kaltpolymerisierender Drei-Komponenten-Kunststoff, dessen Besonderheit in den guten Fließeigenschaften, optimalem Randschluss, extrem guter Haftung, sowie optimalen Schleif- und Poliereigenschaften besteht.

Zur Anwendung werden laut Angaben des Herstellers die drei Komponenten, welche aus einem Pulver, einem Sirup I und einem Sirup II bestehen, im Verhältnis 2:2:1 gemischt. Im Anschluss daran ist das Gemisch ungefähr vier Minuten gießfähig, nach acht Minuten ist es ausgehärtet.

Den Feinschliff auf durchschnittlich 60 µm erledigte das EXAKT 400CS Schleifsystem (Firma Exakt, Norderstedt, Germany).

Nach Politur der Schliffe erfolgte das Aufkleben der Deckgläser mit lichthärtendem Transparentkleber (Technovit 7210 VLC, Haereus Kulzer).

2.3.4 Färbung

Zur histomorphometrischen Auswertung wählten wir die Toluidinblaufärbung nach Romeis. Diese Färbung zeichnet sich durch Einfachheit und gute Standardisierung aus. Durch die in der Färbesubstanz enthaltenen Thiazinfarbstoffe entstehen metachromatische Farbeffekte, welche gute Eigenschaften zur Differenzierung bieten. Mineralisierte Hartgewebe bleiben ungefärbt bis blaßblau, Zellen, Zellkerne, Osteoidsäume, Kittlinien, Kollagenfasern sind blau, Mastzellengranula, Knorpelmatrix, frühe Wundheilungsareale metachromatisch rotviolett gefärbt.

Zur Herstellung der Färbelösung wurden drei verschiedene Lösungen (Tabelle 2) angesetzt, die dann im Verhältnis 6:3:1 (Lsg.1:Lsg.2:Lsg.3) gemischt wurden.

Tabelle 2: Inhaltsstoffe der Lösungsansätze 1-3

Lösung 1	1,0 g Toluidinblau in 100 ml Aqua dest.
Lösung 2	2,5 g Natriumkarbonat in 100 ml Aqua dest.
Lösung 3	70%iger Ethylalkohol

Die zu färbenden Feinschliffe wurden nun für 10-15 Minuten mit der hergestellten Toluidinblau-Lösung gefärbt und anschließend mit Aqua dest. gespült. Als die Schliffe wieder abgekühlt waren, wurden sie mit 30 % igem Ethanol entfärbt und anschließend für 5 bis 10 Minuten in Xylol getaucht.

2.4 Histologische Beurteilung

2.4.1 Histomorphometrische Auswertung

Mit Hilfe des Software-Programms Cell D (Olympus GmbH, Hamburg, Germany) erfolgte die histomorphometrische Auswertung der histologischen Schnitte. Dazu wurde zunächst jeder Schnitt mittels Farb-CCD-Kamera (Color View III, Olympus, Hamburg, Germany), welche auf einem binokularem Lichtmikroskop (Olympus SZ 61, Olympus, Hamburg, Germany) saß, digitalisiert. Die so gewonnenen Bilder (Vergrößerung X 6.7) konnten nun hinsichtlich neuer Knochenbildung quantitativ analysiert werden (Cell D , Olympus GmbH, Hamburg, Germany). Dazu wurden zwei Regionen definiert, in denen jeweils gemessen wurde. Eine Region befand sich in der kortikalen Defektzone (Größe: 1500 x 7000 Pixel), die Andere in der Mitte des Defekts (Größe: 3000 x 7000 Pixel). Bestimmt wurde die Fläche der neuen Knochenbildung in μm^2 , sowie der Prozentanteil der absoluten neuen Knochenbildung.

2.4.2 Semiquantitative Auswertung

Zusätzlich wurden die Schnitte in den selben Regionen semiquantitativ mittels Lichtmikroskop (Olympus SZ 61, Olympus) in 20 facher Vergrößerung beurteilt. Dazu wurde folgender Score (Tabelle 3) verwendet:

Tabelle 3: Score für die semiquantitative Auswertung der histologischen Präparate

0	keine Überbrückung des Defekts
1	unvollständige Überbrückung
2	komplette Überbrückung des Defekts mit mineralisiertem Knochen

2.4.3 Beurteilung der Knochengeweberemodellierung

In der selben Vergrößerung (X 20) erfolgte die Beurteilung der Knochengeweberemodellierung.

Die Knochengewebemodellierung verhilft dem Körper, bei kleinen Strukturschäden oder auch Frakturen, ein funktionsfähiges Skelettsystem zu erhalten. Dazu findet ein ständiger Gewebsabbau und Wiederaufbau durch Osteoklasten und Osteoblasten statt, wodurch sich der Organismus den ständig wechselnden Anforderungen anpassen kann [73].

Um einen genaueren Eindruck des Remodellierungsprozesses des Knochengewebes unserer Versuchstiere zu bekommen, wurden die Präparate unter dem Lichtmikroskop (Olympus SZ 61, Olympus) auf Vorhandensein von Osteoklasten und Osteoblasten untersucht.

2.5 Statistische Analyse

Die statistische Analyse der Daten erfolgte mit SPSS® (Version 17.0, SPSS Inc., Chicago, Illinois, USA). Der Mittelwert und die Standardabweichung wurden für beide Gruppen bestimmt. Um einen statistischen Vergleich zwischen beiden Gruppen anstellen zu können, wurde der unabhängige t-Test verwendet. Als Signifikanzniveau wurde $p < 0.05$ definiert.

3. Ergebnisse

Im Rahmen der postoperativen Phase konnte bei keinem der Tiere eine Auffälligkeit beobachtet werden. Es traten innerhalb der gesamten Studie keine Komplikationen, wie z.B. allergische Reaktionen, Abszesse oder Infektionen auf.

3.1 Histomorphometrische Beurteilung

Nach einem Heilungszeitraum von sechs Wochen zeigten die histomorphometrischen Analysen (Abb. 11) in der Spongiosa-Gruppe, verglichen mit denen der Calcibon-Gruppe, eine signifikant größere Fläche von neuem Knochen in der zentralen Defektzone ($p < 0,001$), als auch in der kortikalen Defektzone ($p < 0,002$).

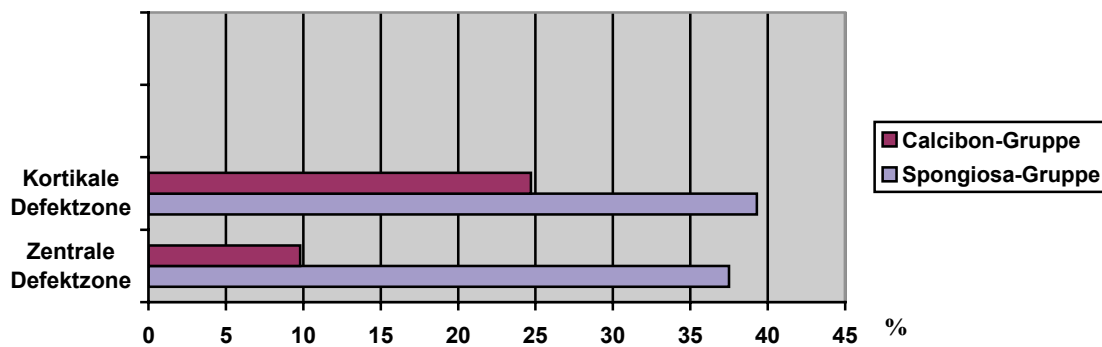


Abb. 11 Histomorphometrische Analyse der Fläche neu gebildeten Knochens hinsichtlich der Defektzone im kortikalen, sowie zentralen Areal. (Prozentualer Anteil der Fläche neu gebildeten Knochens in Relation zur gesamten Fläche des jeweiligen Defektareals auf der x-Achse) Siehe dazu auch Tabelle 4

Ergebnisse

Tabelle 4: Daten der histomorphometrischen Analyse der Fläche neu gebildeten Knochens hinsichtlich der Defektzone im kortikalen, sowie zentralen Areal in tabellarischer Übersicht: Der Vergleich der beiden Gruppen ergab eine signifikant höhere Knochenneubildung in der Spongiosa-Gruppe in beiden Defektzonen.

	Spongiosa-Gruppe	Calcibon-Gruppe
Kortikale Defektzone (Fläche des neu gebildeten Knochens / absolute Defektfläche in %)	39,3 ± 7,4	24,7 ± 7,6
Zentrale Defektzone (Fläche des neu gebildeten Knochens/absolute Defektfläche in %)	37,5 ± 7,9	9,8 ± 8,6

Insgesamt zeigten alle Defekte in beiden Gruppen neue Knochenformationen, aber nur in der Spongiosa-Gruppe fand sich bei vier Defekten eine vollkommene Überbrückung mit neuem Knochen.

In einigen Fällen der Calcibon-Gruppe wurde das Granulat von neu gebildetem Knochen eingebettet. In diesen Fällen wurden die Oberflächen der Granulat-Körner von neu gebildetem Knochen überzogen. Nur in kleinen isolierten Gebieten innerhalb des Granulates infiltrierte neuer Knochen auch die Poren

Die Knochenheilung war in allen Tieren der beiden Gruppen regelrecht.

3.2 Semiquantitative Beurteilung

Bei der semiquantitativen Beurteilung in 20 facher Vergrößerung zeigte sich ebenfalls die Spongiosa-Gruppe hinsichtlich der ossären Überbrückung in beiden Defektbereichen (siehe Abb.12 & 13) den Ergebnissen der Calcibon-Gruppe überlegen. Es traten keine mit dem Transplantat-Material in Verbindung stehenden Entzündungsreaktionen auf.

Ergebnisse

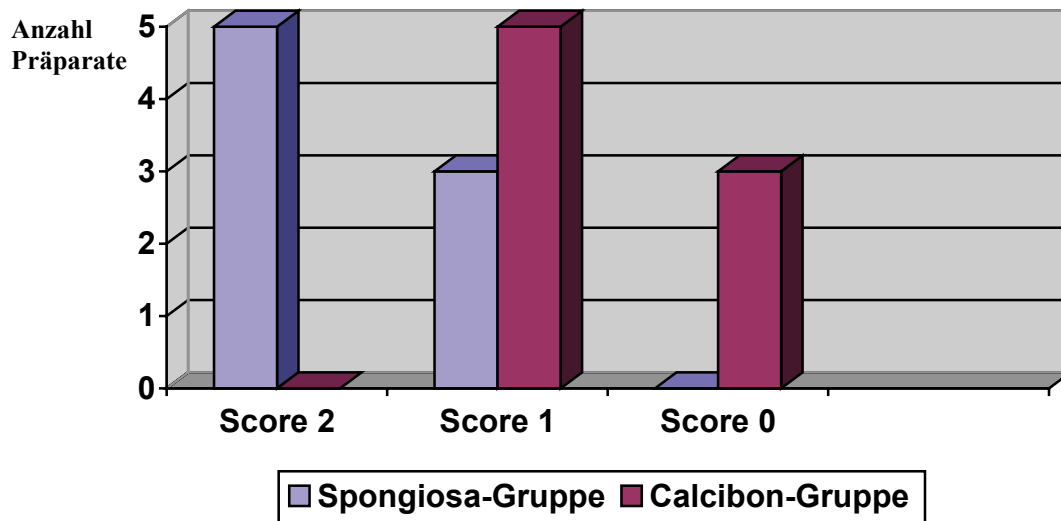


Abb. 12 Semiquantitative Analyse der kortikalen Defektzone: komplette Überbrückung des Defekts mit mineralisiertem Knochen (Score 2); unvollständige Überbrückung (Score 1); keine Überbrückung des Defekts (Score 0)

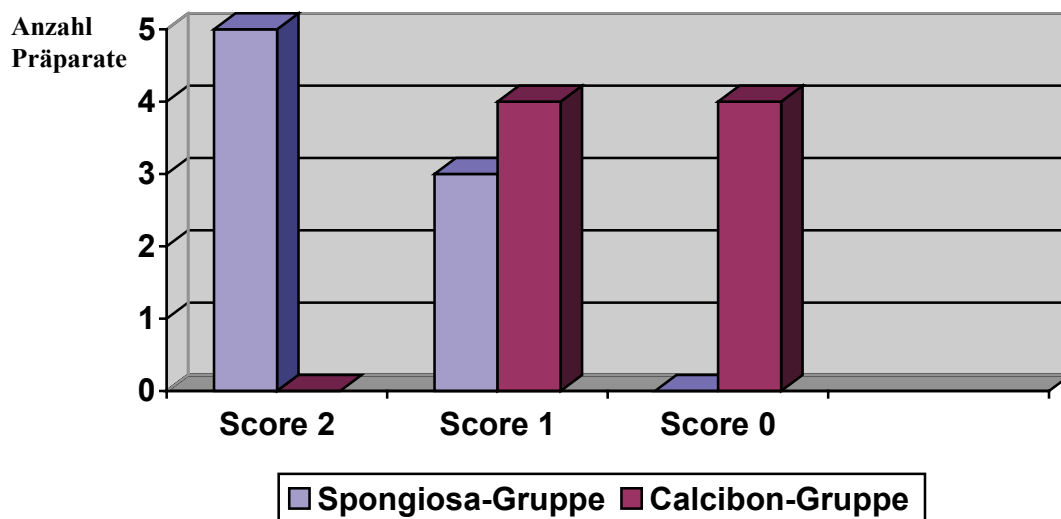


Abb. 13 Semiquantitative Analyse der zentralen Defektzone: komplette Überbrückung des Defekts mit mineralisiertem Knochen (Score 2); unvollständige Überbrückung (Score 1); keine Überbrückung des Defekts (Score 0)

3.3 Beurteilung der Remodellierung des Knochengewebes

Die mit Toluidinblau gefärbten Schliffe zeigten eine physiologische Remodellierung des Knochengewebes in allen Proben. Die Präsenz der Makrophagen bzw. Osteoklasten war jedoch in der Spongiosa-Gruppe deutlicher ausgeprägt. In der Spongiosa-Gruppe konnte an den Rändern des Zentrums der Defektzone intensivere Resorption und neue Knochenbildung beobachtet werden. Außerdem zeigten sich stärkere Umbauvorgänge an den angrenzenden kortikalen Knochen.

4. Diskussion

Im Rahmen dieser Studie konnte mittels der histomorphometrischen Analyse und der histologischen Auswertung nachgewiesen werden, dass die autologe Spongiosaplastik bei der Behandlung von metaphysären Defekten in Minipigs nach sechs Wochen bezüglich der Knochenregeneration der Behandlung mit Kalziumphosphat-Granulat signifikant überlegen ist.

Der Einsatz von Knochenersatzmaterialien zur Behandlung von knöchernen Defekten, die zu groß für eine Auffüllung mit autologer Spongiosa sind, wird in der Literatur durchaus kontrovers diskutiert [11, 43, 71, 74-76]. In diesem Zusammenhang konnten Wheeler et al. in einer tierexperimentellen Studie an Ziegen unter Einsatz von β -Trikalzium-Phosphat-Keramiken (β -TCP-Keramiken) in Form von Granulat an einem metaphysären Defekt kritischer Größe an der proximalen Tibia, eine signifikant höhere Knochenneubildungsrate im Vergleich zu einer Spongiosa-Gruppe nachweisen. Das von Wheeler et al. dabei eingesetzte Defektmodell ist dem in der vorliegenden Studie verwendeten Modell zudem recht ähnlich. Der Zeitpunkt für die Nachuntersuchungen war hier jedoch erst nach drei Monaten [75]. Die Autoren wiesen in der zentralen Defektzone mittels histomorphometrischer Messungen eine Knochenregeneration von 24 % in der β -TCP-Gruppe nach, während in der Spongiosa-Gruppe in der gleichen Region ungefähr 15 % Knochen neu gebildet wurden [75]. Im Vergleich dazu konnten wir in unserer Studie nachweisen, dass es sowohl in der zentralen (37,5%:9,8%) als auch in der kortikalen Defektzone (39,3%:24,7%) nach sechs Wochen in der Spongiosa-Gruppe zu einer signifikant größeren Knochenneubildung im Vergleich zur Calcibon-Gruppe kam. Im Gegensatz zu Wheeler et al. wurden in unserer Studie bei einem vergleichbaren Defektmodell bewusst Minipigs als Versuchstiere eingesetzt, da ihre Knochenneubildungsrate von 1.2-1.5 mm/Tag mit der knöchernen Reparaturkapazität des Menschen nahezu identisch ist [77].

Yuan et al. verglichen die Knochenneubildung an Defekten kritischer Größe an Darmbeinen von Schafen [43]. Als einen Defekt kritischer Größe bezeichnet man einen Defekt, der, bedingt durch seine Größe, innerhalb des gesamten Lebens eines Individuums ohne entsprechende Therapie nicht heilen kann [78].

Die verwendete TCP-Keramik (33,9%) erzielte hierbei in der histomorphometrischen Auswertung ähnliche Ergebnisse wie die verwendete autologe Spongiosa (32,2%) [43].

Diskussion

Auch hier erfolgte die histologische Untersuchung der Präparate zu einem weitaus späteren Zeitpunkt als in unserer Studie, nämlich nach zwölf Wochen. Als zusätzlichen Vorteil im knöchernen Heilungsprozess beschrieben die Autoren ein geringeres Aufkommen von Bindegewebe bei der Verwendung von TCP verglichen mit der Spongiosa. Die Ausbildung von Bindegewebe als Zwischenstufe stellt im knöchernen Heilungsprozess eine der Hauptursachen für eine verzögerte oder ausbleibende knöcherne Heilung mit den Folgen von Implantatversagen und Pseudarthrosenbildung dar [43]. Da es sich bei dieser Studie, abgesehen vom unterschiedlichen Versuchstier (Schaf), jedoch um einen Defekt kritischer Größe handelte, der sich nicht an einem lasttragenden langen Röhrenknochen befand, fällt der Vergleich mit unserer Studie ein wenig schwerer.

Steffen et al. führten, ebenfalls an Schafen, eine vergleichende Untersuchung von Spongiosa und β -TCP-Granulat nach einer Implantation des Materials in den Zwischenwirbelabschnitten L2/L3 und L4/L5 nach vorheriger Entfernung der Bandscheiben in diesen Bereichen durch [21]. Besonders interessant sind hier die unterschiedlichen histologischen Untersuchungszeitpunkte nach 8, 16 und 32 Wochen. Die histologische Auswertung erfolgte lichtmikroskopisch mit einem semiquantitativen Score und leider nicht histomorphometrisch.

Nach acht Wochen zeigte sich die Spongiosa-Gruppe der β -TCP-Gruppe überlegen. Nach 16 Wochen schloss die β -TCP-Gruppe zu den Ergebnissen der Spongiosa-Gruppe auf und zeigte ähnliche Ergebnisse. Nach 32 Wochen allerdings war die Spongiosa-Gruppe wieder klar führend in den Ergebnissen bzgl. der Anteile der knöchernen Regeneration [21]. Trotz des zu unseren Versuchen unterschiedlichen Versuchsaufbaus, verdeutlichen diese Ergebnisse den Stellenwert des gleichen Untersuchungszeitpunktes zweier Studien, die man miteinander vergleichen möchte, da sich der knöcherne Heilungsprozess nicht proportional zur Zeit vollziehen zu scheint, sondern nach unterschiedlichen Zeitpunkten unterschiedliche Entwicklungsschübe je nach verwendetem Material aufweist. Ein weiterer Aspekt, der entscheidend für die Vergleichbarkeit der Methoden und daraus resultierenden Ergebnissen der Studien von größter Bedeutung ist, ist die Art und Weise des Nachweises der Knochenneubildung. Dabei ist die Histomorphometrie als der Goldstandard zu betrachten [79].

Die ungleiche Studienlage macht es jedoch schwierig, auf dieses Phänomen im Vergleich genauer einzugehen. Außerdem interessant ist, dass bei Wheeler et al. nach zwölf Wochen (drei Monaten) die β -TCP-Gruppe der Spongiosa-Gruppe überlegen ist, wobei das gleiche

Diskussion

β -TCP-Material wie bei Steffen et al. verwendet wurde und Steffen et al. nach 16 Wochen über gleichwertige Ergebnisse zwischen Spongiosa und β -TCP berichteten. Zu berücksichtigen ist hier jedoch, dass es sich in beiden Studien um unterschiedliche Versuchstiere, sowie unterschiedliche untersuchte Körperregionen handelte. Folglich wäre auch eine regionsspezifische Anwendung einzelner Präparate denkbar.

Kalziumphosphat-Zemente besitzen im Vergleich zu Kalziumphosphat-Keramiken einige Vorteile. Kalziumphosphat-Zemente haben eine besonders hohe spezifische Oberfläche [46]. Dadurch können Werte von ca. 100 m²/g erreicht werden. Die Größe der spezifischen Oberfläche des natürlichen Knochens beträgt über 80 m²/g beim Menschen [80]. Im Vergleich dazu haben gesinterte Keramiken Oberflächen von ca. 1 m²/g [28, 46]. Auch ist die Zusammensetzung der Kalziumphosphat-Zemente dem menschlichen Knochen ähnlicher als die Komponenten der Kalziumphosphat-Keramiken [46].

Dennoch konnten wir im Rahmen unserer Studie mit Kalziumphosphat-Granulat (Calcibon® Granules, Biomet Deutschland GmbH, Berlin, Germany), welches aus einem selbstabbindenden Kalziumphosphat-Zement-Pulver hergestellt wurde, in der Frühphase der Defektheilung keine zu Kalziumphosphat-Keramiken vergleichbar guten Ergebnisse bei der Auffüllung von Knochendefekten an lasttragenden Knochenabschnitten demonstrieren. Hier ist jedoch anzumerken, dass sich die Literaturergebnisse von Kalziumphosphat-Keramiken im Gegensatz zu den Ergebnissen dieser Arbeit auf Langzeitverläufe beziehen.

Zu den gleichen Ergebnissen wie in unserer Studie bzgl. der knöchernen Regeneration kamen auch die Autoren Puricelli et al., die Defekte an den Femur-Diaphysen von Ratten setzten und diese dann wahlweise mit einem Kalziumphosphat-Zement (auf Basis von α -TCP) oder autologer Spongiosa füllten [81]. Im Gegensatz zu unserer Studie wurde hier jedoch als autologe Spongiosa das Material verwendet, welches aus der Defekt-Erstellung gewonnen wurde und nicht, wie bei uns, aus einem der Implantationsstelle ortsfremden Bereich. Histologische Untersuchungen fanden nach 3, 7, 14, 21 und 60 Tagen postoperativ statt [81]. Die Untersuchungsergebnisse von Puricelli et al. beschreiben nach einem Intervall von 60 Tagen, der unserem Zeitraum von sechs Wochen ziemlich nahe kommt, eine Überlegenheit der mit autologer Spongiosa gefüllten Defekte. Allerdings wurden die histologischen Präparate nur qualitativ unter dem Lichtmikroskop beurteilt und keine histomorphometrischen Daten ermittelt, wodurch subjektive Eindrücke das Ergebnis

beeinflusst haben könnten. Neben der Spongiosa- und der Zement-Gruppe wurde in der tierexperimentellen Studie von Puricelli et al. noch eine Kontroll-Gruppe angelegt, bei welcher der Defekt ohne jegliche Füllung verblieb. Diese Gruppe zeigte ähnlich gute Ergebnisse wie die Spongiosa-Gruppe, was allerdings zeigt, dass es sich bei den hier gesetzten Defekten nicht um Defekte einer kritischen Größe handelt, wie in unserer Studie, da die Defekte sonst nicht von alleine heilen würden.

Einen weiteren tierexperimentellen Vergleich zwischen autologer Spongiosa und Kalziumphosphat-Zement stellten die Autoren Welch et al. an Tibiaplateau-Defekten in Ziegen an [82]. Die Defektfüllung mit Kalziumphosphat-Zement zeigte in der Auswertung hinsichtlich der Knochenneubildung gleichwertige Ergebnisse wie die autologe Spongiosa, die auch hier wieder, wie bei Puricelli et al., aus den zuvor erstellten Defekten gewonnen wurde. Da in dieser Studie neben einem Score-System zur histologischen Auswertung auch durch histomorphometrische Messmethoden prozentuale Ergebnisse für neu gebildeten Knochen ermittelt wurden, lässt sie sich gut mit unseren Ergebnissen vergleichen. Histologische Untersuchungen fanden nach 24 Stunden, drei Wochen, sechs Wochen, sechs Monaten, zwölf Monaten und 18 Monaten statt. In der Zement-Gruppe zeigte sich bei der Untersuchung nach 24 Stunden ein im Defekt liegender Zement-Anteil von $94,0\% \pm 5\%$. Nach drei Wochen wurde bereits viel Zement resorbiert (verbleibender Anteil $64,25\%$). Bindegewebe durchzog jedoch die Defektstelle (Anteil $25,5\%$) und trennte so ossäre Einschlüsse vom Zement ab. In der Spongiosa-Gruppe zeigte sich nach drei Wochen ein Knochenanteil von $15,0\% \pm 8\%$. Nach sechs Wochen war ein Großteil des Spongiosa-Transplantates umgebaut und durch neuen Knochen ersetzt. Leider fehlen zu diesem Zeitpunkt die prozentualen Angaben des Anteils neu gebildeten Knochens von Seiten der Autoren. In der Zement-Gruppe zeigt sich zu diesem Zeitpunkt ein Anteil von $12,57\% \pm 4\%$ an neu gebildetem Knochen. Ein Großteil des Zementes wurde nun bereits resorbiert und durch Bindegewebe ersetzt (Anteil $35,42\%$) [82]. Hätte man an diesem Punkt die histologischen Untersuchungen eingestellt, wären die Autoren vermutlich zu dem gleichen Ergebnis gekommen, wie die vorliegende Studie. Zwar fehlt in der Arbeit von Welch et al. bei dem Untersuchungszeitpunkt nach sechs Wochen die Angabe über den genauen prozentualen Anteil neu gebildeten Knochens, doch der Wert von $15,0\% \pm 8\%$ bei der Untersuchung nach drei Wochen, lässt mutmaßen, dass die Spongiosa auch nach sechs Wochen in ihrem Anteil an neu gebildeten Knochen dem des Kalziumphosphat-Zementes überlegen ist. Nach sechs Monaten jedoch zeigte sich in der Studie der Autoren

Diskussion

Welch et al. jedoch nun ein knöcherner Anteil von $38,57\% \pm 14\%$, mit rückläufigem Bindegewebeanteil von $6,92\% \pm 3\%$ in der Zement-Gruppe. Die Spongiosa-Gruppe präsentierte sich zu diesem Zeitpunkt mit einem Anteil von $35,35\% \pm 12\%$, also leicht hinter dem Ergebnis des Kalziumphosphat-Zementes. Nach zwölf Monaten zeigten die histologischen Untersuchungen einen knöchernen Anteil von $32\% \pm 4\%$ in der Spongiosa-Gruppe und von $40,51\% \pm 5\%$ in der Zement-Gruppe. Nach 18 Monaten besetzte der neue Knochen die Defektzone der Spongiosa-Gruppe mit $36,21\% \pm 8\%$ und mit $35,52\% \pm 12\%$ in der Zement-Gruppe. Hier präsentierte sich außerdem trabekulärer Knochen mit normaler Struktur. Somit zeigte die Zement-Gruppe nach 18 Monaten gleichwertige Ergebnisse, wie die Spongiosa-Gruppe.

Ähnlich wie bei Steffen et al. demonstriert auch diese Studie, dass der Zeitpunkt der histologischen Auswertung einen relevanten Einfluss darauf hat, wie das Ergebnis und dessen Interpretation ausfällt.

Bei der Bewertung der Ergebnisse der Studie von Welch et al. gilt es außerdem zu beachten, dass die Knochenumbau-Kapazität von Ziegen, welche bei der tierexperimentellen Untersuchung der Autoren verwendet wurden, doppelt so schnell wie beim Menschen ist.

Möchte man die Ergebnisse der Studie von Welch et al. nun also auf den Menschen anwenden, stellt sich die Frage nach der Möglichkeit, ob und wie der gesamte Prozess der Knochenheilung beschleunigt werden kann.

Die zuvor beschriebenen Studien [21, 43, 71, 75, 81, 82] sind Beispiele dafür, wie kontrovers die Meinungen bzgl. Überlegenheit oder Unterlegenheit von autologen Spongiosa-Transplantaten, Kalziumphosphat-Keramiken und -Zementen sind. Angemerkt werden muss, dass das primäre Zement-Pulver, und damit das Ausgangsmaterial des untersuchten Kalziumphosphat-Granulates der vorliegenden Studie, bereits erfolgreich sowohl in tierexperimentellen als auch in klinischen Studien eingesetzt wurde [44, 83].

Die Implantat-Porosität und die Porenstruktur scheinen bei Knochenersatzmaterialien auf Kalzium-Phosphat-Basis eine wichtige Rolle bei der in vivo Resorption und dem Einwachsen von neuem Knochen zu spielen [19, 29, 46].

In diesem Zusammenhang untersuchten Walsh et al. die Knochenneubildung und Implantatresorption von drei TCP-Keramiken in Form von Granulat mit gleicher chemischer Zusammensetzung, aber unterschiedlicher Porosität in einem standardisierten

tibialen Defekt-Model mit Kaninchen [19]. Die Autoren konnten nachweisen, dass alle drei Materialien die Bildung von neuem Knochen unterstützten, ihre Resorptionszeit jedoch unterschiedlich war [19].

Das Material mit der größten Porosität und der größten Porengröße wurde schneller resorbiert als die anderen Materialien (Porosität 75%; Porengröße 100-400 μm) [19]. Auch von anderen Autoren wird bestätigt, dass Interkonnektionen, also Verbindungen zwischen den Poren, entscheidend für die Integration von neuem Knochen in das Material sind [20, 33, 84, 85]. Die in unserer Studie eingesetzten Kalziumphosphat-Zement-Granulate weisen im Vergleich zu den von Walsh et al. eingesetzten TCP-Keramiken, eine niedrigere Porosität (50%) und Porengröße (50-550 μm) auf. Dies könnte eine Erklärung für die Unterlegenheit des in der vorliegenden Studie angewendeten Kalziumphosphat-Zement-Granulates gegenüber der autologen Spongiosa sein, vor allem, weil vergleichend dazu die Porengröße in humanem kortikalen Knochen 1 bis 100 μm und in trabekulärem Knochen von 200 bis 700 μm variiert [86].

Ein Problem, welches mit einer hohen Porosität einhergeht, ist allerdings die sich antiproportional zur Porosität verhaltenden mechanischen Eigenschaften [20, 35, 37, 40], was vor allem in orthopädischen Bereichen für lasttragende Knochen besonders wichtig ist. Hier werden wohl noch weitere Untersuchungen von Nöten sein, um die optimale Zusammensetzung von Porosität und Porengröße für Materialien, die an lasttragenden langen Röhrenknochen verwendet werden, zu entwickeln.

Generell ist die Anzahl an klinischen und experimentellen Studien, die sich mit den Möglichkeiten der Kalziumphosphat-Zement-Granulate beschäftigt haben, in der Literatur noch deutlich begrenzt [47, 48, 52, 56, 61-63, 65, 68]. Diese lassen sich zudem nur eingeschränkt mit unserem Tiermodell vergleichen. Hauptsächlich wurden Untersuchungen mit in vitro Zellkulturen [80, 87, 88] und einige wenige in vivo Implantationen durchgeführt [21, 89].

Einige weitere aufschlussreiche Entdeckungen machten die Autoren Smartt et al. in ihrer tierexperimentellen Studie zu Kalottendefekten nicht kritischer Größe in Yorkshire-Schweinen [90]. Die intraoperativ gesetzten Defekte wurde wahlweise mit autologer Spongiosa, die auch hier, wie bereits in einigen zuvor erwähnten Studien, aus dem zuvor erstellten Defekt gewonnen wurde, einem Kalziumphosphat-Zement oder einer Kalziumphosphat-Keramik gefüllt oder als Kontrollgruppe leer belassen. Die

Versuchstiere gliederten sich in zwei Altersgruppen auf. Die eine Hälfte der Tiere war erst drei Wochen alt und wies somit ein noch unreifes kraniofaziales Skelett auf. Die andere Hälfte der Tiere hatte ein Alter von 16 Wochen und somit ein reifes kraniofaziales Skelett. In jedem Tier wurden vier Defekte in die Kalotte gesetzt und mit dem jeweiligen Material befüllt oder, im Fall der Kontrollgruppe, leer belassen. Radiologische, sowie histologische Untersuchungen fanden nach 30 Tagen (ca. 4 Wochen) und 90 Tagen (ca. 13 Wochen) statt. Leider fanden in der Auswertungsmethodik kein Score-System oder histomorphometrische Verfahren Anwendung, was die Vergleichbarkeit mit der vorliegenden Studie erschwert. In der histologischen Auswertung der Kontrollgruppe von Smartt et al. zeigte sich nach 30, sowie nach 90 Tagen eine unvollständige Heilung der Defektstelle, durch welche sich eine Schicht dichten Bindegewebes zog. Die Neubildung von Knochen wurde als minimal beschrieben. Diese Ergebnisse bezogen sich sowohl auf die Gruppe der unreifen Schweine, als auch auf die Gruppe der bzgl. des Skeletts ausgereiften Tiere. In der Spongiosa-Gruppe war, ebenfalls zu beiden Zeitpunkten in beiden Tiergruppen, ein progressiver Einbau des Transplantatmaterials, sowie starke Umbaubestrebungen und Ansammlungen von Faserknochen zu verzeichnen. Die Keramik-Gruppe demonstrierte ebenfalls zu beiden Zeitpunkten in beiden Tiergruppen kein Einwachsen von neuem Knochen, sowie eine unverschlossene Defektstelle. In der Zement-Gruppe zeigte sich bei den ausgereiften Tieren ein minimales Einwachsen von neuem Knochen von Seiten der Peripherie, aber kein signifikanter Ersatz oder Umbau des Kalziumphosphat-Zementes nach 30, sowie nach 90 Tagen postoperativ.

Bei den erst drei Wochen alten Yorkshire-Schweinen konnte nach 30 Tagen jedoch ein progressives Einwachsen von neuem Knochen in den Defekt von allen Seiten und eine solide Verbindung mit dem umliegenden Knochengewebe nachgewiesen werden. Nach 90 Tagen zeigten sich innerhalb des gesamten Kalziumphosphat-Zementes Heilungs- und Umbauvorgänge.

Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass ein Verlust der intrinsischen Kapazität der Knochengeweberemodellierung, die offensichtlich mit der Ausreifung des Skelettes einhergeht, erheblichen Einfluss auf den Erfolg einer Behandlung mit Kalziumphosphat-Zement haben kann [90]. Zum Einen könnte dies ein Ansatz sein, das Kalziumphosphat-Zemente hinsichtlich ihrem Einsatz in der Kinderorthopädie und -traumatologie, wo Skelettabschnitte zum Teil auch noch nicht ausgereift sind, mit ganz anderen Aussichten einzusetzen sind. Zum Anderen gibt es bzgl. des Einsatzes in der Erwachsenen Chirurgie Anregung zur Frage, wie man die Umgebung der Kalziumphosphat-Zemente bei ihrem

Einsatz oder sogar vielleicht die Zemente selbst verändern kann, dass sie der osteogenen Kapazität eines unreifen Skeletts entspricht.

Zur Optimierung der Knochenheilung werden Knochenersatzmaterialien zunehmend in Kombination mit osteoinduktiven Substanzen (autolog oder rekombinant hergestellt) oder mesenchymale Stammzellen eingesetzt [6, 49, 91-96].

Mesenchymale Stammzellen sind multipotente Zellen, welche in Osteoblasten, Chondrozyten, Adipozyten, Fibrozyten, Myoblasten oder Knochenmark-Stroma differenzieren können [97]. Mesenchymale Stammzellen können aus Knochenmarkaspirat isoliert und in vitro angereichert werden [91]. Eine Vielzahl präklinischer Studien hat gezeigt, dass mesenchymale Stammzellen, die in vitro angereichert wurden, erheblich zur Heilung von Knochendefekten kritischer Größe beitragen können, wenn sie mit entsprechenden Knochenersatzmaterialien kombiniert werden [23, 98, 99].

Wachstumsfaktoren beeinflussen die Chemotaxis, Differenzierung, Proliferation und synthetische Aktivität von Zellen des Knochens. Dabei regulieren sie zusätzlich die physiologische Knochengewebsremodellierung und die Frakturheilung [91]. Mehrere Wachstumsfaktoren, wie z.B. BMPs (bone morphogenetic proteins), PDGF (platelet-derived growth factor), TGF- β (transforming growth factor- β) und IGF (insulin-like growth factors) haben einen stimulierenden Effekt auf die Knochenheilung [100].

Kasten et al. führten eine tierexperimentelle Studie mit Defekten kritischer Größe an Diaphysen von Kaninchen durch [91]. Im Blickfeld des Interesses stand der Vergleich zwischen einer Defektauffüllung mit : (1) einer Kalziumphosphat-Keramik, (2) der Kalziumphosphat-Keramik in Kombination mit autologen Wachstumsfaktoren, (3) der Kalziumphosphat-Keramik in Kombination mit mesenchymalen Stammzellen und (4) der Kalziumphosphat-Keramik in Kombination mit autologen Wachstumsfaktoren und mesenchymalen Stammzellen. Nach 16 Wochen postoperativ fand die Euthanasie der Tiere zwecks Präparatentnahme statt, worauf eine histologische Einbettung und Auswertung dieser stattfand. Als zusätzliche Methodik fand die Mikro-Computertomographie Anwendung. In der Auswertung zeigte die mit autologen Wachstumsfaktoren angereicherte Keramik bessere Ergebnisse hinsichtlich der Knochenneubildung, als die Keramik alleine. Zu den gleichen Ergebnissen führte die Auswertung der mit mesenchymalen Stammzellen kombinierten Keramik. Eine Kombination der Keramik mit autologen Wachstumsfaktoren und mesenchymalen Stammzellen brachte hingegen keine

zusätzliche Verbesserung. Hier blieben die Ergebnisse gleichauf mit denen der einfachen Kombination aus Keramik mit autologen Wachstumsfaktoren oder mesenchymalen Stammzellen.

4.1 Fazit

Ganz entscheidend für Beurteilbarkeit der wahren Qualität der osteoinduktiven, osteokonduktiven Materialien, sowie der Composites im Vergleich zum Goldstandard autologer Spongiosa bei der Knochenneubildung ist der Einsatz einer validierten und objektivierbaren Auswertungsmethoden, die sowohl das Ausmaß des neugebildeten Knochens, als auch das Ausmaß der resorbierten Menge des Knochenersatzmaterials qualitativ und quantitativ bewertet. So sind Ergebnisse von Welch et al. [82], sowie die Resultate dieser Arbeit durch das eingesetzte Verfahren zur Beurteilung der Knochenneubildung im Vergleich zu den Daten von Puricelli et al. [81], Steffen et al.[21] [21] und Smartt et al. [90] als objektiv nachvollziehbar zu erachten, da bei den erstgenannten Arbeiten die Beurteilung der Knochenneubildung nicht auf semiquantitativ oder untersucherabhängige Verfahren basierte.

So konnte im Rahmen dieser Arbeit der Nachweis dafür erbracht werden, dass die knöcherne Ausheilung unter alleinigem Einsatz von Kalziumphosphat-Granulat denen der autologen Spongiosaplastik unterlegen war. Jedoch zeigte sich das Kalziumphosphat-Granulat durch die adäquate Resorptionsrate innerhalb des Zeitintervalls von sechs Wochen als ein geeignetes Transportmedium für Medikamente und ähnliche Substanzen, weshalb eine Kombination von diesem Knochenersatzmaterial mit osteoinduktiven Substanzen (sowohl autologer Natur, als auch rekombinant hergestellt) im Sinne eines Composites sinnvoll erscheint [46].

Die Histomorphometrie dient dabei als überaus geeignetes Mittel, den Anteil der Knochenneubildung objektiv zu erfassen, was die Qualität der Vergleichbarkeit verschiedener Studien untereinander verbessert, da Fehler durch subjektive Wahrnehmung, z.B. bei Betrachtung histologischer Präparate unter dem Mikroskop und Auswertung mittels semiquantitativer Scores, umgangen werden.

5. Zusammenfassung

Zielsetzung:

Die autologe Spongiosaplastik gilt als der Goldstandard bei der Behandlung knöcherner Defekte jeglicher Genese, obwohl sie einige Nachteile, wie z.B. das Risiko für chronische Schmerzen an der Entnahmestelle und tiefe Wundinfektionen, begrenzte Menge, zusätzliche Kosten und Narbenbildung an der Entnahmestelle mit sich bringt. Aus diesen Gründen wurde in den letzten Jahren eine ganze Reihe von Knochenersatzmaterialien entwickelt, um den Bedarf an autologen Transplantaten zu verringern oder sogar komplett zu ersetzen.

Das Ziel der vorliegenden Dissertationsarbeit bestand darin, den Prozess der Knochenheilung und Materialdegradation unter Verwendung der Methode der Histomorphometrie zu evaluieren.

Dabei wurde der Einsatz von einem Kalziumphosphat-Zement-Granulat (Calcibon® Granules, Biomet Deutschland GmbH, Berlin) im Vergleich zum Einsatz autologer Spongiosa zwecks Behandlung eines Defektes kritischer Größe am lasttragenden langen Röhrenknochen von Minipigs untersucht. Die Ausheilungsergebnisse sechs Wochen postoperativ wurden mittels Histomorphometrie bezüglich der Knochenneubildung ermittelt und verglichen.

Methoden:

Es wurde eine Versuchsreihe durchgeführt, bei der ein intraoperativ erzeugter Defekt kritischer Größe an der Metaphyse der Tibia von 16 Göttinger Minipigs entweder mit autologer Spongiosa oder einem Kalziumphosphat-Zement-Granulat (Calcibon® Granules, Biomet Deutschland GmbH, Berlin, Germany; Größe 2 □ 4 mm) gefüllt wurde. Nach sechs Wochen erfolgte die Auswertung der entnommenen Präparate. Dabei war es meine Aufgabe, die histologischen Knochenpräparate unter der Anleitung der Betreuer der Arbeitsgruppe herzustellen, sowie zur Ermittlung des neu gebildeten Knochenanteils die histomorphometrischen Vermessungen durchzuführen und auszuwerten.

Ergebnisse:

Nach einem Heilungszeitraum von sechs Wochen zeigten die histomorphometrischen Analysen in der Spongiosa-Gruppe, verglichen mit der Calcibon-Gruppe, eine signifikant größere Fläche von neuem Knochen in der zentralen Defektzone ($p < 0,001$), als auch in der kortikalen Defektzone ($p < 0,002$). Insgesamt zeigten alle Defekte neue Knochenbildung, aber nur in der Spongiosa-Gruppe konnte eine vollkommene Regeneration der Defekte beobachtet werden.

Auch in der semiquantitativen Auswertung der histologischen Präparate zeigte sich im Vergleich mit der Calcibon-Gruppe eine Überlegenheit der Spongiosa-Gruppe hinsichtlich der knöchernen Überbrückung in beiden Defektzonen.

Insgesamt lässt sich sagen, dass sich nach sechs Wochen Heilungsprozess in der Spongiosa-Gruppe, verglichen mit der Calcibon-Gruppe, eine bessere knöcherne Überbrückung der Defekte zeigte.

Schlussfolgerungen:

Die Histomorphometrie erweist sich als eine geeignete Methode, objektiv und nachvollziehbar eine Beurteilung der Knochenneubildungsrate durchzuführen. Dadurch kann die Qualität der Vergleichbarkeit verschiedener Studien untereinander verbessert werden, da Fehler durch subjektive Wahrnehmungen, z.B. bei Betrachtung histologischer Präparate unter dem Mikroskop und Auswertung mittels semiquantitativer Scores umgangen werden können.

Mittels der histomorphometrischen Untersuchung und Auswertung konnte somit in der vorliegenden Dissertationsarbeit demonstriert werden, dass die Spongiosaplastik nach sechs Wochen, verglichen mit der Verwendung eines Kalziumphosphat-Zement-Granulates, zu signifikant besseren Ergebnissen bzgl. der Knochenheilung und -neubildung führt. In der frühen Phase der Knochenheilung scheint die alleinige Applikation von Kalziumphosphat-Zement-Granulat der der autologen Spongiosaplastik in in vivo Defekten kritischer Größe in lasttragenden langen Röhrenknochen von Minipigs unterlegen zu sein.

6. Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
ad lib	ad libitum
Aqua dest.	Aqua destillata
BMP	bone morphogenetic protein
bzgl.	bezüglich
bzw.	beziehungsweise
°C	Grad Celsius
ca.	Circa
cm	Zentimeter
cm ³	Kubikzentimeter
et al.	et alteres
g	Gramm
HIV	humanes Immundefizienz-Virus
HAC	Hydroxylapatit-Zement
kg	Kilogramm
KG	Körpergewicht
l	Liter
m ²	Quadratmeter
mg	Milligramm
ml	Milliliter
mm	Millimeter
µm	Mikrometer
µm ²	Quadratmikrometer
PRP	platelet-rich-plasma
TCP	Trikalzium-Phosphat
z.B.	zum Beispiel

7. Literaturverzeichnis

1. Diercke, *Zugriff am 22.10.2013*
cited; Available from: http://www.diercke.de/bilder/omeda/800/8811E_10.jpg
2. Statistisches Bundesamt. Bevölkerung Deutschlands bis 2060, 12. Koordinierte Bevölkerungsvorausberechnung. Wiesbaden 2009
3. Schieker, M., C. Heiss, and W. Mutschler, *Bone substitutes*. Unfallchirurg, 2008. **111**(8): p. 613-9; quiz 620.
4. *Statistisches Bundesamt. Pressemitteilung Nr. 121 vom 19.03.2008. Jahr 2030: Alterung führt zu mehr Pflegebedürftigen und Krankenhauspatienten.* www.destatis.de. Zugriff am 08.02.2011. Der Beitrag ist verfügbar unter http://www.destatis.de/jetspeed/portal/cms/Sites/destatis/Internet/DE/Presse/pm/2008/03/PD08__121__12421,templateId=renderPrint.psml. cited.
5. Biermann, J., et al., *Influence of the demographic change on hospital admissions and costs in Germany*. Med Klin (Munich), 2010. **105**(12): p. 876-81.
6. Sarkar, M. R., et al., *Bone formation in a long bone defect model using a platelet-rich plasma-loaded collagen scaffold*. Biomaterials, 2006. **27**(9): p. 1817-23.
7. Burger, E. L. and V. Patel, *Calcium phosphates as bone graft extenders*. Orthopedics, 2007. **30**(11): p. 939-42.

8. Schlegel, K. A., et al., *Histologic findings in sinus augmentation with autogenous bone chips versus a bovine bone substitute*. Int J Oral Maxillofac Implants, 2003. **18**(1): p. 53-8.
9. Chiriac, G., et al., *Autogenous bone chips: influence of a new piezoelectric device (Piezosurgery) on chip morphology, cell viability and differentiation*. J Clin Periodontol, 2005. **32**(9): p. 994-9.
10. Helm, G. A., H. Dayoub, and J. A. Jane, Jr., *Bone graft substitutes for the promotion of spinal arthrodesis*. Neurosurg Focus, 2001. **10**(4): p. E4.
11. Fellah, B. H., et al., *Osteogenicity of biphasic calcium phosphate ceramics and bone autograft in a goat model*. Biomaterials, 2008. **29**(9): p. 1177-88.
12. Zarate-Kalfopulos, B. and A. Reyes-Sanchez, *Bone grafts in orthopedic surgery*. Cir Cir, 2006. **74**(3): p. 217-22.
13. Rajan, G. P., et al., *Cancellous allograft versus autologous bone grafting for repair of comminuted distal radius fractures: a prospective, randomized trial*. J Trauma, 2006. **60**(6): p. 1322-9.
14. Burchardt, H., *Biology of bone transplantation*. Orthop Clin North Am, 1987. **18**(2): p. 187-96.

Literaturverzeichnis

15. Banwart, J. C., M. A. Asher, and R. S. Hassanein, *Iliac crest bone graft harvest donor site morbidity. A statistical evaluation*. Spine (Phila Pa 1976), 1995. **20**(9): p. 1055-60.
16. Younger, E. M. and M. W. Chapman, *Morbidity at bone graft donor sites*. J Orthop Trauma, 1989. **3**(3): p. 192-5.
17. Summers, B. N. and S. M. Eisenstein, *Donor site pain from the ilium. A complication of lumbar spine fusion*. J Bone Joint Surg Br, 1989. **71**(4): p. 677-80.
18. Arrington, E. D., et al., *Complications of iliac crest bone graft harvesting*. Clin Orthop Relat Res, 1996(329): p. 300-9.
19. Walsh, W. R., et al., *Beta-TCP bone graft substitutes in a bilateral rabbit tibial defect model*. Biomaterials, 2008. **29**(3): p. 266-71.
20. Van Lieshout, E. M., et al., *Microstructure and biomechanical characteristics of bone substitutes for trauma and orthopaedic surgery*. BMC Musculoskelet Disord, 2011. **12**(1): p. 34.
21. Steffen, T., et al., *Porous tricalcium phosphate and transforming growth factor used for anterior spine surgery*. Eur Spine J, 2001. **10 Suppl 2**: p. S132-40.
22. Torwesten, G. and M. Braun, *Cost analysis of a bone bank*. Z Orthop Ihre Grenzgeb, 1993. **131**(1): p. 51-6.

Literaturverzeichnis

23. Petite, H., et al., *Tissue-engineered bone regeneration*. Nat Biotechnol, 2000. **18**(9): p. 959-63.
24. Okafuji, N., et al., *Three-dimensional observation of reconstruction course of rabbit experimental mandibular defect with rhBMP-2 and atelocollagen gel*. Eur J Med Res, 2006. **11**(8): p. 351-4.
25. Cornell, C. N., *Osteoconductive materials and their role as substitutes for autogenous bone grafts*. Orthop Clin North Am, 1999. **30**(4): p. 591-8.
26. Urist, M. R., *Bone: formation by autoinduction*. Science, 1965. **150**(698): p. 893-9.
27. Ignatius, A. A., et al., *In vivo investigations on composites made of resorbable ceramics and poly(lactide) used as bone graft substitutes*. J Biomed Mater Res, 2001. **58**(6): p. 701-9.
28. Chow, L. C., *Next generation calcium phosphate-based biomaterials*. Dent Mater J, 2009. **28**(1): p. 1-10.
29. Böhner, M., et al., *Synthesis and characterization of porous beta-tricalcium phosphate blocks*. Biomaterials, 2005. **26**(31): p. 6099-105.
30. *Biodegradation, Zugriff am 24.02.2011.* cited; Available from: <http://www.ufz.de/index.php?de=18260>.

Literaturverzeichnis

31. White, E. and E. C. Shors, *Biomaterial aspects of Interpore-200 porous hydroxyapatite*. Dent Clin North Am, 1986. **30**(1): p. 49-67.
32. van Eeden, S. P. and U. Ripamonti, *Bone differentiation in porous hydroxyapatite in baboons is regulated by the geometry of the substratum: implications for reconstructive craniofacial surgery*. Plast Reconstr Surg, 1994. **93**(5): p. 959-66.
33. Lu, J. X., et al., *Role of interconnections in porous bioceramics on bone recolonization in vitro and in vivo*. J Mater Sci Mater Med, 1999. **10**(2): p. 111-20.
studied in rabbits. Acta Orthop Scand, 1994. **65**(3): p. 246-52.
35. Hulbert, S. F., et al., *Potential of ceramic materials as permanently implantable skeletal prostheses*. J Biomed Mater Res, 1970. **4**(3): p. 433-56.
36. Holmes, R., et al., *A coralline hydroxyapatite bone graft substitute. Preliminary report*. Clin Orthop Relat Res, 1984(188): p. 252-62.
37. Hing, K. A., et al., *Mediation of bone ingrowth in porous hydroxyapatite bone graft substitutes*. J Biomed Mater Res A, 2004. **68**(1): p. 187-200.
38. Hing, K. A., S. M. Best, and W. Bonfield, *Characterization of porous hydroxyapatite*. J Mater Sci Mater Med, 1999. **10**(3): p. 135-45.
39. Gauthier, O., et al., *Macroporous biphasic calcium phosphate ceramics: influence of macropore diameter and macroporosity percentage on bone ingrowth*. Biomaterials, 1998. **19**(1-3): p. 133-9.

40. Eggli, P. S., W. Muller, and R. K. Schenk, *Porous hydroxyapatite and tricalcium phosphate cylinders with two different pore size ranges implanted in the cancellous bone of rabbits. A comparative histomorphometric and histologic study of bony ingrowth and implant substitution*. Clin Orthop Relat Res, 1988(232): p. 127-38.
41. Blokhuis, T. J., et al., *Properties of calcium phosphate ceramics in relation to their in vivo behavior*. J Trauma, 2000. **48**(1): p. 179-86.
42. LeGeros, R. Z., *Calcium phosphate-based osteoinductive materials*. Chem Rev, 2008. **108**(11): p. 4742-53.
43. Yuan, H., et al., *Osteoinductive ceramics as a synthetic alternative to autologous bone grafting*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2010. **107**(31): p. 13614-9.
44. Hillmeier, J., et al., *The evaluation of balloonkyphoplasty for osteoporotic vertebral fractures. An interdisciplinary concept*. Orthopade, 2004. **33**(8): p. 893-904.
45. Bohnner, M., *Calcium orthophosphates in medicine: from ceramics to calcium phosphate cements*. Injury, 2000. **31 Suppl 4**: p. 37-47.
46. Bohnner, M., U. Gbureck, and J. E. Barralet, *Technological issues for the development of more efficient calcium phosphate bone cements: a critical assessment*. Biomaterials, 2005. **26**(33): p. 6423-9.

47. Tas, A. C., *Preparation of porous apatite granules from calcium phosphate cement*. J Mater Sci Mater Med, 2008. **19**(5): p. 2231-9.
48. Ozturkmen, Y., et al., *Calcium phosphate cement augmentation in the treatment of depressed tibial plateau fractures with open reduction and internal fixation*. Acta Orthop Traumatol Turc. **44**(4): p. 262-9.
49. Masago, H., et al., *Alveolar ridge augmentation using various bone substitutes--a web form of titanium fibers promotes rapid bone development*. Kobe J Med Sci, 2007. **53**(5): p. 257-63.
50. Zaffe, D., *Some considerations on biomaterials and bone*. Micron, 2005. **36**(7-8): p. 583-92.
51. Wen, C. Y., et al., *The use of brushite calcium phosphate cement for enhancement of bone-tendon integration in an anterior cruciate ligament reconstruction rabbit model*. J Biomed Mater Res B Appl Biomater, 2009. **89B**(2): p. 466-74.
52. Voor, M. J., et al., *Is hydroxyapatite cement an alternative for allograft bone chips in bone grafting procedures? A mechanical and histological study in a rabbit cancellous bone defect model*. J Biomed Mater Res B Appl Biomater, 2004. **71**(2): p. 398-407.
53. Theiss, F., et al., *Biocompatibility and resorption of a brushite calcium phosphate cement*. Biomaterials, 2005. **26**(21): p. 4383-94.

54. Takagi, S. and L. C. Chow, *Formation of macropores in calcium phosphate cement implants*. J Mater Sci Mater Med, 2001. **12**(2): p. 135-9.
55. Sun, M., et al., *Preparation and osteogenic activity of combining calcium phosphate cement with bone morphogenetic protein composite as a bone graft material*. Zhonghua Wai Ke Za Zhi, 2002. **40**(12): p. 932-5.
56. Stallmann, H. P., et al., *In vitro gentamicin release from commercially available calcium-phosphate bone substitutes influence of carrier type on duration of the release profile*. BMC Musculoskelet Disord, 2006. **7**: p. 18.
57. Sanzana, E. S., et al., *Of the in vivo behavior of calcium phosphate cements and glasses as bone substitutes*. Acta Biomater, 2008. **4**(6): p. 1924-33.
58. Rajesh, J. B., et al., *Calcium phosphate cement as a "barrier-graft" for the treatment of human periodontal intraosseous defects*. Indian J Dent Res, 2009. **20**(4): p. 471-9.
59. Park, J. Y., et al., *Cement paste column for simultaneous removal of fluoride, phosphate, and nitrate in acidic wastewater*. Chemosphere, 2008. **70**(8): p. 1429-37.
60. Nishii, T., et al., *Multidetector-CT evaluation of bone substitutes remodeling after revision hip surgery*. Clin Orthop Relat Res, 2006. **442**: p. 158-64.

61. Nich, C. and L. Sedel, *Bone substitution in revision hip replacement*. Int Orthop, 2006. **30**(6): p. 525-31.

62. Mohanty, S. S., et al., *The haemophilic pseudotumour - surgical treatment by excision and filling the defect with calcium-phosphate cement granules*. Haemophilia, 2007. **13**(2): p. 217-20.

63. Lekovic, V. and E. B. Kenney, *Guided tissue regeneration using calcium phosphate implants together with 4 different membranes. A study on furcations in dogs*. J Periodontol, 1993. **64**(11 Suppl): p. 1154-6.

64. Jungbluth, P., et al., *The progress of early phase bone healing using porous granules produced from calcium phosphate cement*. Eur J Med Res. **15**(5): p. 196-203.

65. Jegoux, F., et al., *In vivo biological performance of composites combining micro-macroporous biphasic calcium phosphate granules and fibrin sealant*. Arch Orthop Trauma Surg, 2005. **125**(3): p. 153-9.

66. Gisep, A., et al., *Resorption patterns of calcium-phosphate cements in bone*. J Biomed Mater Res A, 2003. **66**(3): p. 532-40.

67. Flautre, B., et al., *Bone colonization of beta-TCP granules incorporated in brushite cements*. J Biomed Mater Res, 2002. **63**(4): p. 413-7.

68. Daculsi, G., et al., *Crystal polymer interaction with new injectable bone substitute; SEM and Hr TEM study*. J Biomed Mater Res, 2000. **50**(1): p. 1-7.
69. Chen, Q., Y. D. Zhou, and R. X. Ma, *Repair of bone defect due to tumour resection with self-setting calcium phosphate cement in children*. Zhongguo Xiu Fu Chong Jian Wai Ke Za Zhi, 2003. **17**(6): p. 450-2.
70. Cancian, D. C., et al., *Utilization of autogenous bone, bioactive glasses, and calcium phosphate cement in surgical mandibular bone defects in Cebus apella monkeys*. Int J Oral Maxillofac Implants, 2004. **19**(1): p. 73-9.
71. Lange, T. A., et al., *Granular tricalcium phosphate in large cancellous defects*. Ann Clin Lab Sci, 1986. **16**(6): p. 467-72.
72. *Calcibon® Granules*, Zugriff am 01.03.2011. cited; Available from: <http://www.biomet.at/at-medical/at-biomaterials/at-calcibon-granules>.
73. *Knochengeweberemodellierung*, Zugriff am 01.03.2011. cited; Available from: <http://de.wikipedia.org/wiki/Knochengeweberemodellierung>.
74. Wiltfang, J., et al., *Degradation characteristics of alpha and beta tri-calcium-phosphate (TCP) in minipigs*. J Biomed Mater Res, 2002. **63**(2): p. 115-21.
75. Wheeler, D. L., et al., *Grafting of massive tibial subchondral bone defects in a caprine model using beta-tricalcium phosphate versus autograft*. J Orthop Trauma, 2005. **19**(2): p. 85-91.

Literaturverzeichnis

76. Jensen, S. S., et al., *Comparative study of biphasic calcium phosphates with different HA/TCP ratios in mandibular bone defects. A long-term histomorphometric study in minipigs*. J Biomed Mater Res B Appl Biomater, 2009. **90**(1): p. 171-81.
77. Schlegel, K. A., et al., *Osseous defect regeneration using autogenous bone alone or combined with Biogran or Algipore with and without added thrombocytes. A microradiologic evaluation*. Mund Kiefer Gesichtschir, 2003. **7**(2): p. 112-8.
78. Schmitz, J. P. and J. O. Hollinger, *The critical size defect as an experimental model for craniomandibulofacial nonunions*. Clin Orthop Relat Res, 1986(205): p. 299-308.
79. Donath, K., *The diagnostic value of the new method for the study of undecalcified bones and teeth with attached soft tissue (Sage-Schliff (sawing and grinding) technique)*. Pathol Res Pract, 1985. **179**(6): p. 631-3.
80. Kasten, P., et al., *Comparison of human bone marrow stromal cells seeded on calcium-deficient hydroxyapatite, beta-tricalcium phosphate and demineralized bone matrix*. Biomaterials, 2003. **24**(15): p. 2593-603.
81. Puricelli, E., et al., *Characterization of bone repair in rat femur after treatment with calcium phosphate cement and autogenous bone graft*. Head Face Med. **6**: p. 10.

82. Welch, R. D., H. Zhang, and D. G. Bronson, *Experimental tibial plateau fractures augmented with calcium phosphate cement or autologous bone graft*. J Bone Joint Surg Am, 2003. **85-A**(2): p. 222-31.
83. Ooms, E. M., et al., *Histological evaluation of the bone response to calcium phosphate cement implanted in cortical bone*. Biomaterials, 2003. **24**(6): p. 989-1000.
84. Hing, K. A., et al., *Microporosity enhances bioactivity of synthetic bone graft substitutes*. J Mater Sci Mater Med, 2005. **16**(5): p. 467-75.
85. Habibovic, P., et al., *3D microenvironment as essential element for osteoinduction by biomaterials*. Biomaterials, 2005. **26**(17): p. 3565-75.
86. LeGeros, R. Z., *Properties of osteoconductive biomaterials: calcium phosphates*. Clin Orthop Relat Res, 2002(395): p. 81-98.
87. Reinstorf, A., et al., *Phosphoserine--a convenient compound for modification of calcium phosphate bone cement collagen composites*. J Mater Sci Mater Med, 2004. **15**(4): p. 451-5.
88. Hempel, U., et al., *Proliferation and differentiation of osteoblasts on Biocement D modified with collagen type I and citric acid*. J Biomed Mater Res B Appl Biomater, 2004. **71**(1): p. 130-43.

89. Kasten, P., et al., *Induction of bone tissue on different matrices: an in vitro and a in vivo pilot study in the SCID mouse*. Z Orthop Ihre Grenzgeb, 2004. **142**(4): p. 467-75.
90. Smartt, J. M., Jr., et al., *Repair of the immature and mature craniofacial skeleton with a carbonated calcium phosphate cement: assessment of biocompatibility, osteoconductivity, and remodeling capacity*. Plast Reconstr Surg, 2005. **115**(6): p. 1642-50.
91. Kasten, P., et al., *The effect of platelet-rich plasma on healing in critical-size long-bone defects*. Biomaterials, 2008. **29**(29): p. 3983-92.
92. Kasten, P., et al., *Influence of platelet-rich plasma on osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells and ectopic bone formation in calcium phosphate ceramics*. Cells Tissues Organs, 2006. **183**(2): p. 68-79.
93. Plachokova, A. S., et al., *Early effect of platelet-rich plasma on bone healing in combination with an osteoconductive material in rat cranial defects*. Clin Oral Implants Res, 2007. **18**(2): p. 244-51.
94. Nair, M. B., et al., *Reconstruction of goat femur segmental defects using triphasic ceramic-coated hydroxyapatite in combination with autologous cells and platelet-rich plasma*. Acta Biomater, 2009. **5**(5): p. 1742-55.
95. Kilian, O., et al., *Effects of platelet growth factors on human mesenchymal stem cells and human endothelial cells in vitro*. Eur J Med Res, 2004. **9**(7): p. 337-44.

96. Kasten, P., et al., *Effect of platelet-rich plasma on the in vitro proliferation and osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells on distinct calcium phosphate scaffolds: the specific surface area makes a difference*. J Biomater Appl, 2008. **23**(2): p. 169-88.
97. Prockop, D. J., *Marrow stromal cells as stem cells for nonhematopoietic tissues*. Science, 1997. **276**(5309): p. 71-4.
98. Quarto, R., et al., *Repair of large bone defects with the use of autologous bone marrow stromal cells*. N Engl J Med, 2001. **344**(5): p. 385-6.
99. Bruder, S. P., et al., *The effect of implants loaded with autologous mesenchymal stem cells on the healing of canine segmental bone defects*. J Bone Joint Surg Am, 1998. **80**(7): p. 985-96.
100. Bostrom, M. P., K. J. Saleh, and T. A. Einhorn, *Osteoinductive growth factors in preclinical fracture and long bone defects models*. Orthop Clin North Am, 1999. **30**(4): p. 647-58.

8. Danksagung

Als erstes möchte ich Herrn Univ.-Prof. Dr. med. Joachim Windolf für die Möglichkeit der Durchführung meiner Dissertation an seiner Klinik danken.

Meinem Doktorvater, Herrn PD Dr. med. Mohssen Hakimi, sowie PD Dr. med. Pascal Jungbluth danke ich für die Expertise, die permanente Unterstützung und die exzellente Betreuung bei der Durchführung dieser Doktorarbeit.

Frau Dr. med. vet. Eva Engelhardt, Herrn Dr. med. vet. Martin Sager und Frau Iris Schrey danke ich für die stete und kompetente Unterstützung bei den Arbeiten in der TVA Düsseldorf.

Ebenfalls möchte ich Frau Dr. rer. nat. Monika Herten, sowie den Mitarbeitern des orthopädischen Forschungslabors für den fachlichen Beistand und die Bereitstellung von Räumlichkeiten und Laborgeräten danken.

Bei Frau Brigitte Hartig und Herrn Vladimir Golubovic möchte ich mich herzlich für die freundliche und rege Unterstützung bei der Herstellung der histologischen Schnitte bedanken.

Ganz besonders möchte ich mich bei meiner Familie und meinem Freund für deren Unterstützung während meines Studiums und meiner Dissertation bedanken.

AKADEMISCHE AUSBILDUNG

BIELERTSTRASSE 32 □ 51379 LEVERKUSEN
TELEFON 01577-1478819 □ E-MAIL ALINAMK@WEB.DE

ALINA MIRIAM KESSNER

PERSÖNLICHE INFORMATIONEN

- Geburtsdatum: 25.04.1985
- Geburtsort: Langenfeld
- Familienstand: ledig
- Nationalität: deutsch
- Konfession: römisch-katholisch

AKADEMISCHE AUSBILDUNG

November 2010	Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung, (Universität zu Köln) Gesamtnote der Ärztlichen Prüfung: gut
08/2009 □ 07/2010	Praktisches Jahr (Universität zu Köln)
08/2006	Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung (Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf)
10/2004 □ 09/2009	Studium der Humanmedizin (Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf)
08/1999 □ 06/2004	Erzbischöfliche Marienschule Leverkusen-Opladen (Gymnasium)
08/1995 □ 07/1999	Bettine-von-Arnim-Gesamtschule, Langenfeld
1991-1995	Brüder-Grimm-Schule (Grundschule), Langenfeld

BERUFSERFAHRUNG

Seit August 2011	Assistenzärztin in Weiterbildung zur Fachärztin für Gynäkologie und Geburtshilfe, Städtisches Klinikum Solingen
------------------	---

FAMULATUREN

12. Feb. □ 28. März 2007	Universitätsklinikum Düsseldorf, Klinik für Unfall- und Handchirurgie, Ambulanz, Prof. Dr. med. J. Windolf
30. Juli □ 28. Aug. 2007	St. Martinus Krankenhaus Langenfeld, Abteilung für Gynäkologie und Geburtshilfe, Dr. med. D. Katzwinkel
21. Aug. □ 04. Sep. 2008	Klinikum Leverkusen, Klinik für Kinder und Jugendliche, Neonatologie, Prof. Dr. med. P. Groneck
02. März □ 03. April 2009	Universitätsklinikum Düsseldorf, Klinik für Unfall- und Handchirurgie, Prof. Dr. med. J. Windolf

NEBENTÄTIGKEITEN

06/2001 □ 08/2007	Schauplatz Langenfeld GmbH, Kartenvorverkauf, Abendkasse, Garderobe, Einlass
09/2007 □ 11/2009	St. Josef Krankenhaus Monheim GmbH, Pflegerische Hilfskraft in der Chirurgischen Abteilung

SONSTIGES

Sprachkenntnisse	Deutsch (Muttersprache), Englisch (fließend), Italienisch (Grundkenntnisse), Latein (Grundkenntnisse)
Hobbys	Reiten, Tanzen, Yoga, Joggen, Reisen
Besondere Kenntnisse	Grundlagen der TCM und Akupunktur, Ultraschall-Grundkurs, EKG-Grundkurs, praktische Maßnahmen bei Schulterdystokie

Eidesstattliche Versicherung

Ich versichere an Eides statt, dass die Dissertation selbstständig und ohne unzulässige fremde Hilfe erstellt worden ist und die hier vorgelegte Dissertation nicht von einer anderen Medizinischen Fakultät abgelehnt worden ist.

Leverkusen,, Alina Miriam Kessner