

Aus dem  
Forschungslabor des Julius- Wolff- Instituts der Charité-  
Campus Virchow- Klinikum der Humboldt- und Freien Universität Berlin

eingereicht über das  
Institut für Veterinär-Pathologie  
des Fachbereichs Veterinärmedizin  
der Freien Universität Berlin

**Osteointegration verschiedener vorgefüllter  
Titan- Mesh- Cages mit osteoinduktiven Materialien zur  
Verbesserung der Spondylodese der Halswirbelsäule  
(Bio- Cage IX)**

- eine experimentelle Studie am Schaf-

Inaugural - Dissertation  
zur Erlangung des Grades eines  
Doktors der Veterinärmedizin  
an der Freien Universität Berlin

vorgelegt von  
**Sonja Dettmann**  
Tierärztin aus Berlin

Berlin 2010

Journal-Nr.: 3468

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin  
der Freien Universität Berlin

Dekan: Univ.-Prof. Dr. L. Brunnberg  
Erster Gutachter: Univ.-Prof. Dr. R. Rudolph  
Zweiter Gutachter: Prof. Dr. C. Klostermann  
Dritter Gutachter: Univ.-Prof. Dr. L. Brunnberg

*Deskriptoren (nach CAB-Thesaurus):*

animal models, sheep, spine, intervertebral discs, histology, parathyrin, fibrin,  
ceramics

Tag der Promotion: 13.07.2011

Bibliografische Information der *Deutschen Nationalbibliothek*

Die Deutsche Nationalbibliothek verzeichnet diese Publikation in der Deutschen  
Nationalbibliografie; detaillierte bibliografische Daten sind im Internet über  
<<http://dnb.ddb.de>> abrufbar.

ISBN: 978-3-86387-003-4

**Zugl.: Berlin, Freie Univ., Diss., 2011**

Dissertation, Freie Universität Berlin

**D 188**

Dieses Werk ist urheberrechtlich geschützt.

Alle Rechte, auch die der Übersetzung, des Nachdruckes und der Vervielfältigung des Buches, oder  
Teilen daraus, vorbehalten. Kein Teil des Werkes darf ohne schriftliche Genehmigung des Verlages in  
irgendeiner Form reproduziert oder unter Verwendung elektronischer Systeme verarbeitet,  
vervielfältigt oder verbreitet werden.

Die Wiedergabe von Gebrauchsnamen, Warenbezeichnungen, usw. in diesem Werk berechtigt auch  
ohne besondere Kennzeichnung nicht zu der Annahme, dass solche Namen im Sinne der  
Warenzeichen- und Markenschutz-Gesetzgebung als frei zu betrachten wären und daher von  
jedermann benutzt werden dürfen.

This document is protected by copyright law.

No part of this document may be reproduced in any form by any means without prior written  
authorization of the publisher.

Alle Rechte vorbehalten | all rights reserved

© Mensch und Buch Verlag 2011

Choriner Str. 85 - 10119 Berlin

[verlag@menschundbuch.de](mailto:verlag@menschundbuch.de) – [www.menschundbuch.de](http://www.menschundbuch.de)

***Gewidmet meinen Eltern und meiner Schwester***



# INHALTSVERZEICHNIS

<b>INHALTSVERZEICHNIS.....</b>	<b>I</b>
<b>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....</b>	<b>IV</b>
<b>1. EINLEITUNG .....</b>	<b>1</b>
<b>2. STAND DES WISSENS .....</b>	<b>3</b>
<b>2.1. Arten des Stützgewebes .....</b>	<b>3</b>
2.1.1. Knochengewebe (Textus osseus) .....	3
2.1.2. Knorpelgewebe (Textus cartilagineus) .....	6
<b>2.2. Die Wirbelsäule (Columna vertebralis).....</b>	<b>7</b>
2.2.1. Allgemeine Funktionen .....	7
2.2.2. Halswirbel (Vertebrae cervicales).....	8
<b>2.3. Spondylodese .....</b>	<b>11</b>
2.3.1. Implantate zur Spondylodese .....	12
<b>2.4. Zusammenfassung v. Wissensstand u. Untersuchungszielen .....</b>	<b>19</b>
<b>3. MATERIAL UND METHODEN .....</b>	<b>20</b>
<b>3.1. Studiendesign.....</b>	<b>20</b>
<b>3.2. Wahl des Modells .....</b>	<b>20</b>
3.2.1. Tiermodell .....	20
3.2.2. Versuchstiere.....	20
<b>3.3. Versuchsaufbau.....</b>	<b>21</b>
3.3.1. Versuchsgruppen.....	21
3.3.2. Implantat .....	22
3.3.3. Implantat-Augmentierung .....	23
3.3.4. Ablauf der Produkt- Zubereitung.....	26
<b>3.4. Operation.....</b>	<b>26</b>
3.4.1. Operationsvorbereitung .....	26
3.4.2. Vorbereitung des Implantat.....	27
3.4.3. Spondylodese .....	27
<b>3.5. Probenentnahme und Aufbereitung der Halswirbelsäule.....</b>	<b>36</b>
<b>3.6. Histologie .....</b>	<b>40</b>
3.6.1. Anfertigung histologischer Präparate.....	41
3.6.2. Histologische Färbungen .....	41
<b>3.7. Immunhistologie.....</b>	<b>43</b>
3.7.1. Immunhistologische Färbungen.....	44
3.7.2. Enzymatische Färbung .....	44

<b>3.8.</b>	<b>Auswertung der Schnittpräparate</b> .....	<b>44</b>
3.8.1.	Deskriptive Analyse der histologischen Präparate .....	44
3.8.2.	Histologische Auswertung .....	46
3.8.3.	Histomorphometrische Auswertung der Präparate.....	47
3.8.4.	Fusionssscore .....	52
3.8.5.	Gefäßzählung.....	53
3.8.6.	Bestimmung der osteoklastischen Dichte .....	55
<b>3.9.</b>	<b>Statistische Auswertung</b> .....	<b>56</b>
3.9.1.	H- Test von Kruskal und Wallis.....	57
3.9.2.	Bonferroni- Korrektur .....	57
3.9.3.	Mann- Whytney- Wilcoxon-Test (U- Test) .....	57
3.9.4.	HMM- Analyse und statistische Auswertung.....	57
<b>4.</b>	<b>ERGEBNISSE</b> .....	<b>58</b>
<b>4.1.</b>	<b>Ergebnisse in vivo</b> .....	<b>58</b>
4.1.1.	Allgemeines .....	58
<b>4.2.</b>	<b>Ergebnisse ex vivo</b> .....	<b>58</b>
4.2.1.	Deskriptive Histologie .....	58
<b>4.3.</b>	<b>Deskriptive Histologie</b> .....	<b>59</b>
4.3.1.	Ventrale region of interest (VrROI) .....	59
4.3.2.	Cage- ROI.....	66
4.3.3.	Dorsale ROI .....	74
4.3.4.	Craniale und caudale ROI .....	76
<b>4.4.</b>	<b>Ergebnisse der histomorphometrischen Analyse</b> .....	<b>79</b>
<b>4.5.</b>	<b>Histomorphometrie</b> .....	<b>80</b>
4.5.1.	Cage- ROI.....	80
4.5.2.	5Teil- ROIs.....	106
4.5.3.	Dorsale ROI .....	126
4.5.4.	Ventrale ROI .....	133
4.5.5.	Craniale ROI .....	141
4.5.6.	Caudale ROI .....	150
4.5.7.	Fusionssscore .....	158
<b>4.6.</b>	<b>Zusammenfassung der Ergebnisse</b> .....	<b>159</b>
4.6.1.	Deskriptive Histologie .....	159
4.6.2.	Ergebnisse der histomorphometrischen Analyse .....	159
<b>5.</b>	<b>DISKUSSION</b> .....	<b>161</b>
<b>5.1.</b>	<b>Zusammenfassung des Themas</b> .....	<b>161</b>
<b>5.2.</b>	<b>Diskussion von Material und Methoden</b> .....	<b>161</b>
5.2.1.	Tiermodell .....	161
<b>5.3.</b>	<b>Versuchsaufbau</b> .....	<b>164</b>
<b>5.4.</b>	<b>Operation und postoperativer Beobachtungszeitraum</b> .....	<b>164</b>
<b>5.5.</b>	<b>Gewinnung und Aufarbeitung der Proben</b> .....	<b>164</b>

5.5.1.	Sägeebene .....	164
5.5.2.	Handeling der fixierten, gesägten Präparate .....	164
<b>5.6.</b>	<b>Analyseverfahren .....</b>	<b>165</b>
5.6.1.	Histomorphometrie .....	165
5.6.2.	Histologie .....	166
<b>5.7.</b>	<b>Diskussion der Ergebnisse .....</b>	<b>168</b>
<b>5.8.</b>	<b>SynCage-C .....</b>	<b>169</b>
<b>5.9.</b>	<b>Hypothesen .....</b>	<b>170</b>
5.9.1.	Histologie und Histomorphometrie.....	171
<b>5.10.</b>	<b>Vergleich der Gruppen untereinander und mit den Kontrollgruppen .....</b>	<b>177</b>
5.10.1.	Kontrollgruppen .....	177
5.10.2.	Versuchsgruppen.....	178
<b>5.11.</b>	<b>Schlussfolgerung .....</b>	<b>179</b>
5.11.1.	Analysemethode .....	179
5.11.2.	Klinische Relevanz .....	179
<b>5.12.</b>	<b>Resümeee.....</b>	<b>180</b>
<b>6.</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG .....</b>	<b>181</b>
<b>7.</b>	<b>SUMMARY.....</b>	<b>183</b>
<b>8.</b>	<b>ANHANG .....</b>	<b>185</b>
8.1.	Materialien und Reagenzien .....	185
8.2.	Färbungen .....	192
8.3.	Statistische Auswertung.....	201
8.3.1.	CROI.....	201
8.3.2.	5TeilROIs.....	202
8.3.3.	Dorsale ROI .....	202
8.3.4.	Ventrale ROI .....	205
8.3.5.	Craniale ROI .....	206
8.3.6.	Caudale ROI .....	207
<b>9.</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS.....</b>	<b>210</b>
<b>10.</b>	<b>DANKSAGUNG .....</b>	<b>222</b>
<b>11.</b>	<b>SELBSTÄNDIGKEITSERKLÄRUNG.....</b>	<b>223</b>

## ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

A.	Arteria
Abb.	Abbildung
Abh.	abhängig
Abs.	absolut
ACTH	Adrenokortikotropes Hormon
AK	Antikörper
AM	Amorphe Massen
Aqua dest.	Aqua destillata
α	Alpha
BAR	bone area = Knochenfläche
biomechan.	biomechanisch
BMdAr	bone mineralized area = mineralisierte Knochenfläche
BMP	bone morphogenetic protein
Bo	mineralisierter Knochen
BW	Brustwirbel
bzgl.	bezüglich
bzw.	beziehungsweise
C3, C4	dritter, vierter Halswirbel
C	Celsius
Ca	Calcium
cdROI	caudale ROI
ca.	circa
CgAr	cartilage area = Knorpelfläche
CoTAr	connective tissue area = Bindegewebsfläche
CoTabsAr	connective tissue abs. area = abs. Bindegewebsfläche
crROI	craniale ROI
CO <sub>2</sub>	Kohlendioxid
cm	Zentimeter
cm <sup>2</sup>	Quadratcentimeter
CROI	Cage- ROI
d.	der
d. h.	das heißt
deg.	degenerativ/ en
demin.	Demineralisiert
deutl.	deutlich
dorsolat.	Dorsolaterale, r
DsROI	dorsale ROI
Ec	Erythrozyt
etc.	et cetera
evtl.	Eventuell
Fa.	Firma
FKRZ	Fremdkörperriesenzelle
For.	Foramen
g	Gramm
Gc	Granulozyt
ggf.	gegebenenfalls
Gr.	Gruppe
h	Stunde
HA	Hydroxyapatit
HVL	Hypophysenvorderlappen
HW	Halswirbel
HWK	Halswirbelkörper
HWS	Halswirbelsäule
i. d. R.	in der Regel

inkl.	inklusive
KCL	Kaliumchlorid
KGW	Kilogramm Körpergewicht
klin.	klinische
KM	Knochenmark
Konzentr.	Konzentration
L	Liter
lat.	lateral
Lc	Lymphozyt
Lig.	Ligamentum
M	Mol
M.	Musculus
max	maximal
Mc	Makrophage
µg	Mikrogramm
mg	Milligramm
ml	Milliliter
Mio.	Millionen
min	Minute
min.	mineralisiert
min	minimal
mind.	mindestens
mm	Millimeter
mm <sup>2</sup>	Quadratmillimeter
µm	Mikrometer
mV	Millivolt
n	Anzahl
NaCl	Natriumchlorid
N.	Nervus
Oc	Osteoklast
OF	Oberfläche
OP	Operation
op.	Operationem
opt.	Optimal, e
P	Phosphat
Pc	Plasmazelle
PI- Sequenz	Plasmin- Substrat- Sequenz
Proc/c.	Processus, Processuus (Fortsatz, Fortsätze)
PTH	Parathormon
resp.	respektive
RÖ	Röntgen
ROI	region of interest
RM	Rückenmark
RT	Raumtemperatur
S.	Seite
s. c.	subkutan
sog.	so genannte(n)
TAr	tricos area = TricOs-Fläche
Tab.	Tabelle
TCP	Tricalciumphosphat
TGpPTH1-34	modifiziertes Parathormon
TG- Sequenz	Transglutaminase- Substrat- Sequenz
TRAP	tartrate resistant acid phosphatase
TSH	thyroideastimulierendes Hormon
TricOs	Zweiphasenkeramik aus Kalziumphosphat, resorbierbares Knochenersatzstoff- Material

u.	und
u. a.	unter anderem
unabh.	unabhängig
undiff.	undifferenziert
usw.	und so weiter
V.	Vena
v.	von
Vit.	Vitamin
v. a.	vor allem
VrROI	ventrale ROI
WK	Wirbelkörper
WS	Wirbelsäule
z. B.	zum Beispiel
z. T.	zum Teil
zw.	zwischen
°	Grad
%	Prozent
% <sub>inkl. Leerflächen</sub>	Prozent inklusive Leerflächen
&	und
2D/ 3D	zwei-, dreidimensional
Ø	Durchmesser
>	mehr als

## 1. EINLEITUNG

Zur Behandlung degenerativer Erkrankungen der Halswirbelsäule sind ventrale dekomprimierende Eingriffe als zuverlässige Operationsverfahren etabliert.

Diese sollen die anschließende knöchernen Fusion des Segments erzielen.

Als Implantat der Wahl galt dafür jahrzehntlang der Beckenkammspan, dessen Entnahme jedoch mit einer erheblichen Morbidität assoziiert ist (Banwart *et al.*, 1995).

Die zahlreich auftretenden Komplikationen, wie z.B. Implantatversagen und -wanderung führten zum zunehmenden Ersatz des autologen Knochenspanns durch intervertebrale Cages, augmentiert mit Spongiosa. In der klinischen Anwendung sind vor allem Metall- und Kunststoffimplantate aus Titan, Carbon und Polymethylmethacrylat relevant.

Nach Weiner und Fraser erfolgte die Einteilung der Implantate in die drei Gruppen Schrauben-, Box- und Zylinder-Design (Weiner und Fraser, 1998).

Die Wirbelsäulen- Arbeitsgruppe um Kandziora *et al.* führte vergleichende Studien zum Cage- Design durch. In den biomechanischen Untersuchungen zeichnete sich der zylindrische Cage nach Harms durch eine hohe Steifigkeit bei Flexion, Extension und Seitwärtsbiegung aus (Kandziora *et al.*, 2001 a; 2002 a, b).

Diese, von ventral in das Bandscheibenfach verbracht, Implantate sollen den Kollaps und eine damit verbundene Kyphosierung der Wirbelsäule und Stenosierung der Foramina intervertebralia verhindern.

Derzeit befinden sich diverse Materialien mit osteogenetischem Potential, wie z.B. Knochenbildung induzierende Proteine (bone morphogenetic proteins, BMP's) und weitere Wachstumsfaktoren in der klinischen Anwendung. Diese sollen, im Vergleich zum autologen Knochen, über möglichst gleichwertige osteoinduktive und osteokonduktive Eigenschaften verfügen.

In der Forschung der Spondylodese ist, neben der stetigen Verbesserung von Operationsverfahren und verwendeten Implantaten, eine Beschleunigung der Spondylodese, verbunden mit einer Verbesserung der biomechanischen Stabilität, anzustreben.

Im Rahmen dieses Projektes wurde nun der Einsatz einer Kombination von intervertebralem Cage, augmentiert mit verschiedenen osteoinduktiven und osteokonduktiven Knochenersatzmaterialien, im Vergleich zum unbefüllten Leercage analysiert.

Ziel dieser Studie war die Überprüfung der Übertragbarkeit der, aus Vorversuchen in anderen orthopädischen Tiermodellen (Genehmigungen 152/1997, 09/2000, 139/2000, 191/2003, 185/2004, Kantonales Veterinäramt Zürich, Schweiz) erzielten Ergebnisse auf die Anwendung bei der intervertebralen Spondylodese. Erwartet wurde ein zumindest gleichwertiges Ergebnis wie bei Verwendung von autologen Knochen.

Es wurde der Einfluss von Parathormon (PTH) und Tricalciumphosphat (TCP) auf die Spondylodese untersucht. Dazu wurde ein neuartiges Knochenersatzmaterial, bestehend aus einer Kombination von TCP, Fibrin und dem darin enthaltenen osteoinduktiven Protein Parathormon verwendet.

Fibrin dient dabei als resorbierbares und biokompatibles Trägermaterial mit darin kovalent gebundenem PTH. Das, die Infiltration von Zellen ermöglichende Fibrin unterstützt den natürlichen Heilungsprozess. Es konnte gezeigt werden, dass die Fibrinmatrix selbst schon einen positiven Effekt auf die Knochenheilung ausübt. Es stellt somit eine exzellente Matrix für die lokale Freisetzung von osteoinduktiven Substanzen zur Unterstützung der intervertebralen Fusion dar (Le Guehennec *et al.*, 2005).

Als osteoinduktives Protein wird eine neuartige, modifizierte Variante von Parathormon (TGpIPTH1-34) verwendet. Durch dessen Proteinmodifikation kann dieses direkt in das Trägermaterial Fibrin eingebunden und anschließend durch Proteolyse freigesetzt werden, so dass eine rein lokale Wirkung erfolgt. Durch die damit verbundene Erhöhung der Effektivität werden bedeutend geringere Mengen benötigt, bei gleichzeitiger Reduktion potentieller systemischer Effekte und Nebenwirkungen.

Am caninen Modell konnten Jung *et al.*, bei Einsatz von PTH zur Behandlung von Osteotomiedefekten, eine Verbesserung der Geweberegeneration sowie die Induktion der Neusynthese von Knochengewebe nachweisen (Jung *et al.*, 2007).

Vor dem Einsatz an der Wirbelsäule des Menschen wurden nun diese Effekte des PTH an der Wirbelfusion im Schafmodell untersucht. Hierfür erfolgte, im Anschluss an die Entfernung der Bandscheibe zwischen dem dritten und vierten Halswirbel (C3 / C4), die Implantation eines, mit neuartigen Knochenersatzmaterialien augmentierten Titan- Cages im Vergleich zu den Kontrollgruppen „Leercage“ sowie „TricOs“. Um Erkenntnisse über die initialen Schritte des Heilungsablaufs zu erhalten, erfolgte die histologische, immunhistologische und histomorphometrische Auswertung des Wirbelsegments C3 / C4 zwölf Wochen nach der Spondylodese.

## 2. STAND DES WISSENS

### 2.1. Arten des Stützgewebes

#### 2.1.1. Knochengewebe (Textus osseus)

##### Allgemeines

Die Stütz- und Stoffwechselfunktion sind die Hauptaufgaben des Knochens. Diese beeinflussen durch enge Wechselbeziehungen entscheidend die Struktur jeden einzelnen Knochens und somit die Architektur des gesamten Körpers. Zur Gewährleistung der statisch- dynamischen Aufgaben finden in der äußeren kompakten Schicht (Substantia compacta) und dem inneren Bälkchenwerk (Substantia spongiosa) zeitlebens adaptive Umbauvorgänge statt. Vor allem stark belastete Knochen, wie z.B. die der Extremitäten, der Wirbelsäule oder der Beckenknochen unterliegen starken Strukturveränderungen. Knochen dient als Speicher von Calcium und Phosphor, dessen Aufrechterhaltung durch verschiedene Hormone und Vitamine reguliert wird (Tab.1).

Tab. 1 Regulation des Ca- u. Phosphorspeicher, (Liebich, 1999)

Wirkstoff	Vorkommen	Funktion	Effekt
PTH	Nebenschilddrüse	Osteoklasten-Aktivierung	Knochenabbau →Ca-Spiegel ↑
Vit D3	lichtinduzierte Synthese d. Haut	Steigerung enteraler Ca- Resorption, Hemmung renaler Ausscheidung	Knochenabbau →Ca-Spiegel ↑
Kalzitonin	C-Zellen d. Schilddrüse	Osteoblasten- Stimulation, Hemmung d. Osteoklasten- aktivität	Ca-Einbau in Knochen ↑
STH	α-Zellen d. HVL	Aktivierung des Knochenwachstum	
ACTH	basophile Zellen d. HVL		
TSH	Hypothalamus		
Geschlechts- hormone	Hypophyse, männl./weibl. Gonaden		
Vit C	Ernährung	Förderung d. Kollagenfaser- synth. in Osteoblasten	Reifung der Osteoblasten

## Zellen des Knochens

Die Entwicklung von Knochengewebe erfolgt aus mesenchymalem Bindegewebe.

Die, sich aus undifferenzierten Mesenchymzellen entwickelnden Präosteoblasten sind die Vorläufer der knochenbildenden Zellen (Osteoblasten). Diese abgeplatteten bis spindelförmigen Zellen finden sich bevorzugt in der Kambiumschicht der Knochenhaut sowie entlang von Gefäßen des primären Knochenmarks. Dort bilden sie ein Zellreservoir, aus dem sich durch mitotische Teilungen syntheseaktive Osteoblasten differenzieren. Diese bilden Kollagenfasern (Typ I) und nicht-kollagene Proteine. Des Weiteren produzieren sie Glykosaminoglykane bzw. Proteoglykane, sind an der Mineralisation des Knochengewebes beteiligt und modulieren die Osteoklastenfunktion. Der Osteoblast entwickelt sich schließlich zur reifen Knochenzelle, dem Osteozyten. Diese dendritische Zelle mit langen, fingerförmigen Zytoplasmafortsätzen ist von mineralisierter Matrix umgeben.

Ein Osteoklast ist eine Riesenzelle mit 10- 20 (max. bis zu 100) Kernen pro Zelle, die sich amitotisch teilen. Meist liegen diese am Knochen bzw. in Lakunen des resorbierten Knochens. Aktive Osteoklasten bilden proteolytische Enzyme, die der Knochenresorption dienen. Die Knochenmatrix besteht aus organischen (Kollagenfasern, glykosaminoglykanreiche Grundsubstanz) und anorganischen Knochenbestandteilen (Mineralstoffe), (Liebich *et al.*, 1999).

## Arten des Knochengewebes

Histologisch unterscheidet man zwei Arten von Knochengewebe, den Geflecht- oder Faserknochen und den Lamellenknochen.

Beim Geflechtknochen (*Os membranaceum reticulofibrosum*) handelt es sich um verknöchertes Bindegewebe, das im Verlauf jeder Knochenneubildung auftritt.

In der Knochenmatrix befindet sich eine große Anzahl ungeordneter Osteozyten. Die geformte Grundsubstanz wird von einem unregelmäßigen Geflecht an Kollagenfaserbündeln sowie wenig anorganischer Substanz durchzogen.

Der Lamellenknochen (*Os membranaceum lamellosum*) ist durch präzise ausgerichtete Knochenlamellen aus Kollagenfasern gekennzeichnet. Strukturelle Grundlage ist das Osteon (Havers- System). Dieses besteht aus einem, mit mesenchymalem Bindegewebe und darin enthaltenem kleinen Gefäß sowie vegetativen Nerven, gefüllten Zentralkanal (Havers Kanal). Weiterer Bestandteil ist eine unterschiedliche Anzahl (5-20) konzentrischer Knochenlamellen (Havers Lamellen, Speziallamellen). Osteozyten liegen in regelmäßiger Anordnung zwischen den konzentrisch geschichteten Lamellen um den Zentralkanal. Sie ermöglichen durch ihre, in den Knochenkanälchen (*Canaliculi ossei*) verlaufenden, Zytoplasmafortsätze den Stofftransport aus dem Havers- Gefäß. Durch Osteone verlaufende Gefäße (Volkman-Gefäße) versorgen die äußere und innere Knochenhaut. Die Knocheninnenstruktur wird bei jeder Änderung der statisch- mechanischen Beanspruchung den neuen Ansprüchen angepasst. Hierbei werden funktionslose Osteone (sog. Schaltlamellen) abgebaut. An der inneren und äußeren Knochenoberfläche sind die Lamellen plattenartig geschichtet. Das Periost liegt der äußeren Grundlamelle außen auf, an die innere Grundlamelle grenzt an das Endost. Bei den sogenannten Sharpey- Fasern (*Fibrae perforantes*) handelt es sich um Kollagenfasern, die in der äußeren Grundlamelle inserieren und das Periost mit dem Knochen verbinden. Die innere Knochenhaut (Endost) besteht aus Fibrozyten und überzieht die Grundlamelle und die Knochenbälkchen (Liebich *et al.*, 1999).

## Knochenbildung

Bei der Knochenbildung (Osteogenese) unterscheidet man zwischen desmaler und chondraler Ossifikation. Das Knochengewebe entsteht bei der desmalen Ossifikation (primäre Osteogenese) direkt aus dem mesenchymalen Bindegewebe. Die Bildung von Bindegewebsknochen erfolgt ohne Ausbildung einer knorpeligen Zwischenstufe. Dieser wird auch im Rahmen der Knochenbruchheilung ausgebildet. Die chondrale Ossifikation (sekundäre oder indirekte Osteogenese) erfolgt unter Ausbildung eines Knorpelmodells, das anschließend abgebaut und durch Knochengewebe ersetzt wird.

Der entstehende „unreife“ Geflechtknochen wird während der weiteren Knochenentwicklung wieder abgebaut und gegen den nun „reifen“ Lamellenknochen (Ersatzknochen) ausgetauscht (Liebich *et al.*, 1999).

## Knochenbruchheilung und Umbau des Knochengewebes

Während der Entwicklung des Knochens bildet die Kambiumschicht sowohl das polyvalente chondro- und osteoblastische als auch das chondro- und osteoklastische Zellmaterial, welches für die Ossifikation verantwortlich ist. Die Zellen des Periosts behalten zeitlebens im Bedarfsfall, z.B. bei Knochenbruch, die Fähigkeit zur Bildung neuen Knochengewebes.

Der zwischen den Bruchenden gebildete Kallus, bestehend aus Knorpel, wird anschließend in Knochenkallus umgewandelt (Nickel *et al.*, 1992). Der dynamische, lebenslange Prozess des Knochen- Umbaus (Remodelling) besteht aus den zwei Stufen Resorption und Formation. Diese sollten sich im Gleichgewicht befinden, um die Stärke und Integrität des Skeletts sicherzustellen (Eli Lilly and Company, 2001). Das, von Wolff aufgestellte Gesetz der Transformation des Knochens beschreibt die Umwandlungen der inneren Architektur sowie die sekundären Umwandlungen der äußeren Form in Folge von sich verändernden Krafteinwirkungen (Wolff, 1892). Einer Regeneration entspricht die primäre, direkte Knochenbruchheilung, bei der die Bruchenden mit einer Toleranzgrenze von etwa 0,5 mm, zur Ermöglichung einer Kontaktheilung, kongruent aneinander liegen müssen (Schenk, Willenegger, 1977). Der Abbau nekrotischen Knochengewebes am Bruchspalt erfolgt durch Osteoklasten, die über die HAVERSchen Kanäle der Kortikalis eingewandert sind. Die knöcherne Überbrückung wird durch Osteoblasten ermöglicht. Diese stammen aus den erweiterten Gefäßkanälen. Bei einer Spaltheilung ist der Bruchspalt bis zu etwa 1 mm weit und kann nicht durch osteogene Verzapfung überbrückt werden. Das Einsprossen von Kapillaren in den Spalt, gefolgt von anschließender Proliferation perikapillärer mesenchymaler Zellen und deren Differenzierung zu Osteoblasten, ermöglicht schließlich die Füllung des Bruchspalts mit Knochengewebe.

Erfolgt die Frakturheilung über Bildung eines Ersatzgewebes, welches durch Knochengewebe ausgetauscht wird, handelt es sich um eine sekundäre oder indirekte Knochenbruchheilung. Diese erfolgt z.B. bei der Spondylodese zweier Wirbelkörper. Dabei wird das bestehende Frakturhämatom organisiert. Der Bluterguss und Gewebetrümmern werden von Exsudatmakrophagen abgebaut, während Osteoklasten die Bruchränder durch Abbau glätten. Das zum Einsatz kommende Ersatzgewebe zur provisorischen Verfestigung des Frakturgebietes ist abhängig von den dort bestehenden mechanischen Einflüssen.

Die sog. „angiogene“ Kallusbildung erfolgt unter neutralen mechanischen Einflüssen. Sie ist gekennzeichnet durch eine, von perivaskulären Osteoblasten induzierte, Knochenbildung. Bei Zugbelastung erfolgt hingegen die „desmale“ Kallusbildung unter Entstehung von kollagenem Fasergewebe. Bei Druckbelastung und zusätzlicher Beweglichkeit der Frakturrenden gegeneinander entsteht, im Rahmen der chondralen Kallusbildung, zunächst Knorpelgewebe, das in Knochengewebe umgebaut wird. Bei der, häufig auftretenden, gemischten Kallusbildung treten die beschriebenen Ausprägungen nebeneinander auf. Das Mesenchym des Markraums, der HAVERSchen Kanäle, des Periosts und das den Knochen umgebende Gewebe stellt das für die Kallusbildung benötigte Zellmaterial bereit (Stünzi, Weiss, 1990).

## Knochenformen

In der deskriptiven Einteilung wird zwischen langen Röhrenknochen (Ossa longa), platten und breiten Knochen (Ossa plana) sowie kurzen Knochen (Ossa brevia) unterschieden. Die, aus Spongiosa bestehenden, kurzen Knochen zeichnen sich durch eine unregelmäßig würfelförmige, zylindrische oder rundliche Gestalt aus und werden von einem dünnen Knochenmantel umgeben. Diese sehr zahlreich auftretenden Knochen, z.B. Wirbelsäule und Fußwurzeln, ermöglichen durch ihre Summierung vielseitige und -gestaltige Bewegungen. Das, die Cellulae medullares der kurzen Knochen, füllende Knochenmark (Medulla osseum) ist aus Myeloblasten und Hämocytyblasten entstanden. Diese sind aus der Kambiumschicht des Periosts eingewandert. Die Spongiosastruktur entspricht in allen Knochen der Beanspruchung des jeweiligen Skelettstücks bei trajektoriellem Aufbau. Es besteht ein direkter Zusammenhang zwischen Art der einwirkenden Kraft und der ausgebildeten Spongiosaarchitektur. So ist bei den Wirbelkörpern eine relativ einfache Erhebung der Spongiosastruktur ausgebildet (Nickel *et al.*, 1999).

### 2.1.2. Knorpelgewebe (Textus cartilagineus)

Dieses, durch besondere Druckelastizität ausgezeichnete Gewebe tritt besonders dort auf, wo mechanische Kräfte elastisch aufgefangen und Weichteile elastisch gestützt werden müssen, wie z.B. an Gelenkenden und den Zwischenwirbelscheiben. Verantwortlich für die biomechanischen Eigenschaften des Knorpelgewebes sind die Fasern und Proteoglykane sowie das hohe Wasserbindungsvermögen deren sulfatierter Glykosaminoglykane. Die Unterscheidung in hyalinen, elastischen sowie Faserknorpel erfolgt nach Art der Faser und deren Verhältnis zur homogenen Grundmasse (Tab. 2).

Tab. 2 Knorpeltypen, (Loeffler, 2002)

Typ	Fasertyp	Charakteristika	Vorkommen
hyaliner Knorpel (Cartilago hyalina)	kollagene Fasern, Typ II	Lichtbrechung wie homogene Grundmasse durch gebundenes Chondroitinsulfat	Gelenk-, Rippenknorpel, Skelettanteile vor Verknöcherung
elastischer Knorpel (Cartilago elastica)	elastische Fasern	dichtes Netzwerk elastischer Fasern mit Hauptverlaufs- richtung ähnlich der kollagenen Faserbündel in hyalinem Knorpel	Kehldeckel, Ohrknorpel
Faserknorpel (Cartilago fibrosa)	kollagene Fasern, Typ I	keine physik. od. chem. Bearbeitung zum Nachweis nötig	Anulus fibrosus, Menisken, Sehnen- Knochen- Übergang

Die Knorpelbildung (Chondrogenese) nimmt ihren Ursprung im mesenchymalen Bindegewebe. Dieses verdichtet sich lamellär und umgibt den Knorpel als Knorpelhaut (Perichondrium), während sich die perichondralen Fibroblasten zu Knorpelmatrix produzierenden Chondroblasten differenzieren. Die Knorpelmatrix besteht aus 70 % Wasser, kollagenen oder elastischen Fasern und Glykosaminoglykanen. Die Zellen weichen auseinander, die zunächst abgeplatteten und randständigen Chondroblasten runden sich allmählich zu großblasigen Knorpelzellen (Chondrozyten). Diese, rundlich bis kürbiskernförmigen Zellen liegen in Knorpelhöhlen und sind von einer Kapsel, die der Interzellulärsubstanz angehört, umgeben.

Ein Hof umgibt häufig mehrere Zellen, die meist von einer Mutterzelle abstammen (isogene Gruppe). Ein Territorium (Chondron) wird vom Knorpelhof und seinem Inhalt gebildet, dazwischen liegt die sog. Interterritorialsubstanz. Die Knorpelzellen bzw. Zellgruppen werden im hyalinen und im Faserknorpel von unterschiedlich verlaufenden kollagenen Fasern umwickelt. Diese lösen sich aus dem, das Knorpelgewebe umgebenden straffen Bindegewebe (Perichondrium). Die Fasern bedingen die Zugfestigkeit des Knorpels, während die Knorpelzellen als Druck aufnehmendes Kissen wirken. Die Druckfestigkeit des Knorpels übertrifft seine Zugfestigkeit. Das Knorpelgewebe enthält nur in Ausnahmefällen Blutgefäße und ist durch sehr schnell fließenden Diffusionsstrom gekennzeichnet (Liebich *et al.*, 1999; Loeffler, 2002).

## **2.2. Die Wirbelsäule (Columna vertebralis)**

### **2.2.1. Allgemeine Funktionen**

Bei dem kennzeichnenden Bauelement der Wirbeltiere handelt es sich um das Achsenskelett des Körpers, welches Beweglichkeit und Stabilität durch die Kombination knöcherner Elemente und Weichteile ermöglicht. Sie dient der Umhüllung und dem Schutz des Rückenmarks und übernimmt für Statik und Dynamik des Tierkörpers eine Tragefunktion. Die dafür benötigte Festigkeit wird durch die einzelnen Wirbel, die Elastizität sowie Verformbarkeit durch die Zwischenwirbelscheiben und die Wirbelgelenke gewährleistet (Budras *et al.*, 1996). Neben der beschriebenen Stützfunktion kommt dem Knochen eine Stoffwechselfunktion zu, die beide in enger Wechselbeziehung stehen und somit die Architektonik des gesamten Körpers beeinflussen (Liebich *et al.*, 1999).

Die Wirbelsäule baut sich aus dem Zusammenschluss mehrerer Wirbel auf. Diese bilden mit ihrem zentralen Wirbelloch (For. vertebrale) zur schützenden Aufnahme des Rückenmarks den Wirbelkanal (Canalis vertebralis). Man unterscheidet Hals-, Brust-, Lenden und Schwanzwirbel. Die, bei allen Wirbeln bestehende Grundform ist an die, in der jeweiligen Körperregion bestehende Funktion angepasst bzw. abgewandelt. An allen Wirbeln unterscheidet man den Körper, den Bogen und die Fortsätze. Der Wirbelkörper gehört zur Gruppe der kurzen Knochen. Deren Entwicklung ist, im Gegensatz zum Röhrenknochen, durch eine überwiegend enchondrale Ossifikation, bei relativ spätem Auftreten des perichondral entstehenden Knochenmantels, gekennzeichnet. Sie bestehen hauptsächlich aus Spongiosa, die außen häufig nur von einer dünnen Kortikalis (Knochenrinde, Substantia corticalis) umgeben wird. Die Beinhaut (Periosteum) besteht aus der äußeren, derbfibrösen Fibrosa und dem Kambium, einer tiefen, locker gefügten, zellreichen Schicht (Nickel *et al.*, 1999). Beim Wirbelkörper handelt es sich um den, dreiseitig prismatischen oder mehr zylindrischen, ventralen Teil des Wirbels. An der Dorsalfläche des Körpers verläuft eine durchgehende Bandleiste und an deren Seite je eine flache Längsrinne zur Aufnahme der Wirbelblutleiter. Es erfolgt eine Durchbohrung des Wirbelkörpers von Gefäßkanälen, die auf seiner Ventralfläche münden, an der sich die Crista ventralis befindet. Der Wirbelbogen (Arcus vertebrae), mit dem gemeinsamen ventralen Stiel (Pediculus) und der sich dorsal anschließenden Bogenplatte (Lamina arcus vertebrae), spannt sich über die Dorsalfläche des Wirbelkörpers und begrenzt gemeinsam mit diesem das Wirbelloch.

Die Aufreihung der einzelnen Wirbellöcher bildet den Wirbelkanal (Canalis vertebralis), der das Rückenmark birgt. Jeder Wirbel besitzt als Fortsätze (Processus vertebrae) einen Dornfortsatz (Proc. spinosus), der sich median auf dem Scheitel des Bogens erhebt.

Zwei Querfortsätze (Procc. transversi) ragen von den beiden Wurzeln des Bogens nach lateral heraus. Vier Gelenkfortsätze (Procc. articulares craniales et caudales), mit Knorpel bedeckten Gelenkflächen, streben seitlich des Dornfortsatzes vom Bogen aus nach cranial bzw. caudal. An den Brust- und Lendenwirbeln befinden sich jeweils zwei cranial gerichtete Zitzenfortsätze (Procc. mamillares), die der Anheftung von Muskeln und Bändern, sowie der gelenkigen Verbindung der Wirbel dienen (König, Liebich, 1999).

### **2.2.2. Halswirbel (Vertebrae cervicales)**

Bei den Säugetieren sind, trotz unterschiedlicher Halslänge, konstant sieben Halswirbel ausgebildet. Als Ausnahmen sind die Sehkuh mit sechs sowie das dreizehige Faultier mit acht bzw. neun Halswirbeln anzuführen. Der 1. und 2. Halswirbel dienen der Kopfbewegung und zeichnen sich, im Gegensatz zu den übrigen Halswirbeln, durch eine unterschiedliche Form aus (Nickel *et al.*, 1999).

Der erste Halswirbel Atlas (Kopfträger) verfügt über keinen Wirbelkörper, sondern über einen dorsalen und ventralen Bogen. Seitlich befinden sich die Atlasflügel und am ventralen Bogen kopfseitig die Gelenkfläche für das Hinterhauptbein. Caudal ist, in der Medianen, die Gelenkfläche (Fovea dentis) für den Zahn (Dens) des 2. Halswirbels (Axis) ausgebildet. Zur Verbindung mit den cranialen Gelenkfortsätzen des Axis befinden sich lateral die flachen Gelenkfortsatzflächen (Foveae articulares caudales). Der Körper des zweiten Halswirbels (Epistropheus, Umdreher) ist zylindrisch geformt und besonders lang, mit ausgeprägter Crista ventralis. Das kopfwärtige Ende ist durch Ausprägung des Zahns hervor gehoben. An diesem ist eine Gelenkfläche (Zapfengelenk) zur Verbindung mit dem Atlas ausgebildet. Der Dornfortsatz (Proc. spinosus) ist bei den Haustieren, im Gegensatz zum Menschen bei dem nur ein Dorn besteht, kammartig verbreitert, während die Querfortsätze nur schwach ausgebildet sind. Die konkav gewölbte Facies articularis caudalis ist glatt und dient der Anlagerung der Zwischenwirbelscheibe.

Die Körper des 3. - 7. Halswirbels werden, im Gegensatz zu denen des Menschen, kaudal allmählich kürzer. An deren Ventralfläche befindet sich bis zum 5. Halswirbel eine stark ausgebildete Crista ventralis, die ab dem 6. Wirbel fehlt oder undeutlich ausgebildet ist.

Die Dornfortsätze sind niedrig, leistenförmig und nehmen caudal allmählich an Länge zu. Die Quer- und Gelenkfortsätze sind kräftig ausgeprägt. Mit Ausnahme des 7. Halswirbels befindet sich an der Basis des jeweiligen Querfortsatzes eine Öffnung (For. transversarium). Deren Summe bildet den beidseits der Wirbelsäule verlaufenden Transversalkanal zur Aufnahme von vertebraler Arterie, Vene und Nerv (König, Liebich, 1999; Loeffler, 2002; Nickel *et al.*, 1999).

### **Verbindung der Wirbel untereinander**

An cranialer (Extremitas cranialis seu Caput vertebrae) und caudaler (Extremitas caudalis seu Caput vertebrae) Endfläche sind benachbarte Wirbel spaltfrei durch die Zwischenwirbelscheiben (Disci intervertebrales) verbunden. Hingegen handelt es sich bei den Wirbelbogengelenken um echte Gelenke mit Spalt und Kapsel.

Bei diesen Schiebegelenken verläuft die Bewegung parallel zu den Gelenkflächen. Der Bandapparat der Wirbelsäule verfügt über lange und kurze Bandzüge zwischen Wirbelkörper und -bogen. Zu den kurzen Bändern gehören die, als elastische Platten den Raum zwischen den Bögen benachbarter Wirbel bedeckenden, Zwischenbogenbänder (Ligg. interarcualia, Ligg. flava), die zwischen den Dornfortsätzen befindlichen Zwischendornenbänder (Ligg. interspinalia) sowie die, zwischen den Querfortsätzen verlaufenden Ligg. intertransversaria. Bei den langen Bändern handelt es sich um das dorsale und ventrale Längsband (Ligg. longitudinalia dorsale et ventrale), das Nackenband (Lig. nuchae) sowie das Rückenband (Lig. supraspinale). Das dorsale Längsband verläuft im Wirbelkanal auf der dorsalen Fläche der Wirbelkörper mit Anheftung an deren Bandleisten sowie den Zwischenwirbelscheiben vom Zahn des Axis bis zum Kreuzbein. Das elastische Nackenband entspringt bei den Wiederkäuern an der Hinterhauptschuppe (Squama occipitalis) und geht in das, bis zum Kreuzbein reichende Rückenband über (Nickel *et al.*, 1999).

### **Aufbau der Zwischenwirbelscheibe**

Zwischen den Wirbelkörpern sind, mit Ausnahme von Atlas und Axis, Zwischenwirbelfugen (Symphyses intervertebrales) ausgebildet. Es handelt sich um Zwischenwirbelscheiben (Disci intervertebrales) und Längsbänder (Ligg. longitudinalis dorsalis et ventralis). Die Zwischenwirbelscheiben bestehen aus einem Gallertkern (Nucleus pulposus), als verbliebener Teil der Chorda dorsalis, umgeben vom Anulus fibrosus, der die Wirbelendflächen bedeckt. Dessen faserknorpeliger Anteil geht peripher allmählich in fibröses Bindegewebe über. Der Anulus fibrosus besteht aus einer äußeren Schicht straffen Bindegewebes und sich senkrecht überlappenden Lamellen von Faserknorpel. Diese bedingen das charakteristische lichtmikroskopische Fischgrätenmuster. Der, im Zentrum des Discus intervertebralis befindliche, Nucleus pulposus besteht aus wenigen runden Zellen, eingebettet in einer amorphen Masse mit enthaltener Hyaluronsäure und Kollagen-II-Fibrillen. Die, bei Bewegungen der Wirbelsäule, auftretenden Kräfte werden durch den, als Wasserkissen dienenden Gallertkern gleichmäßig verteilt und die Fasern des Knorpels und Anulus fibrosus in Spannung versetzt. Auftretende Störungen in diesem komplexen Gefüge können zum Vorfall des Nucleus pulposus führen. Die Bewegungen der einzelnen Wirbel gegeneinander werden durch die Zwischenwirbelscheiben elastisch abgebremst (Junqueira, Carneiro, 2004; Loeffler, 2002; Nickel *et al.*, 1999).

### **Anatomie der Halswirbelsäule des Schafes**

Experimentelle Untersuchungen an der Halswirbelsäule (HWS) des Schafes ermittelten folgende anatomische Unterschiede und Gemeinsamkeiten der HWS von Mensch und Schaf (Cain und Fraser, 1995; Kandziora *et al.*, 2001 b; Wilke *et al.*, 1997 a, b), (Tab. 3).

Tab. 3 Vergleich der Anatomie der HWS von Schaf u. Mensch

Unterschiede	
Schaf	Mensch
Spinalkanal-Querschnitt zirkulär, 13 mm Durchmesser	nierenförmiger Querschnitt, 2x größerer Querdurchmesser
3 - 6 mm max. Querdurchmesser d. Forr. transversaria	4 -7 mm max. Querdurchmesser d. zirkulären Forr. transversaria
Deckplatte konvex, Grundplatte konkav mit craniocaudaler Zunahme der Begrenzung	Deck- u. Grundplatte konkav
Breite u. Tiefe der Bodenplatte größer als der Deckplatte	keine Angaben
Vordere und mediane Bandscheibenraumhöhe signifikant größer	Vordere und mediane Bandscheibenraumhöhe signifikant kleiner
5-7 mm Bandscheibenhöhe	Bandscheibenhöhe 2-3 mm kleiner
1. HW (Atlas) ohne Körper	abweichende Form von Atlas, Axis
2. HW (Axis) mit zylindrischem Körper, Dens Axis	
7. HW ohne For. transversarium, < Länge, stark ausgeprägter Dornfortsatz, Artikulation mit 1. BW	keine Angaben
Querschnitt der HWK konisch, kraniale > kaudale WK - Höhe	Querschnitt zylindrisch, keine Höhenunterschiede
WK schmaler als breit	WK breiter als schmal
WK 1,4-2,8 x schmaler	WK 1,4 - 2,8 x breiter
Höhe, Weite, Tiefe d. HWS am größten	Höhe, Weite, Tiefe d. HWS deutl. kleiner
Pedikel 4,5 - 2,8 x schmaler, keine Unterschiede der Weite	qualitativ vergleichbar ähnl. WK-Größe
Dorn- u. Querfortsätze 2 - 3 x länger	Dorn- u. Querfortsätze 2 - 3 x kürzer
dorsolat. Verlauf der Gelenke zw. WK	keine Angaben
HWK größer	HWK kleiner

Gemeinsamkeiten der HWS v. Mensch u. Schaf
sehr ähnliche Struktur u. Funktion der HWS
vergleichbare Größe der typ. Halswirbelkörper
vergleichbare Größe, Form v. 3. - 6. WK
ähnliche anterioposterioren Dimensionen d. Spinalkanals
ähnliche Funktionen des Atlantoaxialgelenks (freie Rotation ohne Dehnung u. Streckung)
ovale Form, Weite > Tiefe
Höhe, Weite der Gelenke vergleichbar
Forr. transversaria bilden Transversalkanal mit enthaltener Vertebralearterie, -vene, -nerv

## Das Schafmodell

Anhand der oben aufgeführten Studienergebnisse konnte sowohl die anatomische als auch die physiologische Vergleichbarkeit der Halswirbelsäule von Mensch und Schaf verifiziert werden. Somit konnte dessen Eignung als Modell in der HWS – Forschung des Menschen, v.a. des Segments C3 / C4, bestätigt werden.

## 2.3. Spondylodese

Bei dieser operativen Therapie soll u. a. bei verschleißbedingten Wirbelsäuleninstabilitäten (Spondylolisthese), instabilen Wirbelbrüchen und Diskopathien eine Teilversteifung der Wirbelsäule erzielt werden. Die Spondylodese wird aber auch zur Korrektur der Wirbelsäule bei starkem Rundrücken (Kyphose) oder Seitverbiegung (Skoliose) angewendet.

Schon 1911 berichteten Hibbs und Albee von der Wirbelsäulenfusion zur Behandlung von Skoliose und Tuberkulose (Boatright *et al.*, 2005).

Im Jahre 1955 wurde erstmalig die Technik zur anterioren, cervikalen Diskektomie und Fusion unter Nutzung des tricortikalen Beckenkammspans vorgestellt (Robinson, Smith, 1955). Es folgen weitere Publikationen (Robinson *et al.*, 1962; Robinson, 1964). Seitdem dient die, von Smith- Robinson und Cloward entwickelte Methode (Cloward, 1988) zur intervertebralen Spondylodese, bei anteriorem Zugang zur Halswirbelsäule, der chirurgischen Versorgung cervikaler Diskopathien (Aronson *et al.*, 1968). Die anteriore cervikale Diskektomie, mit anschließender Anhebung des Zwischenwirbelraums auf den natürlichen Abstand, sichert die Dekompression des Spinalkanals und Weitung der Foramina intervertebralia. Dies ist gleichzeitig mit der Linderung bzw. Beseitigung der Symptome Schmerz, Radikulopathie und Myelopathie vergesellschaftet (Assietti *et al.*, 2002; Bohlman *et al.*, 1993; Emery *et al.*, 1994). Eine intervertebrale Stabilisierung dient sowohl der Vermeidung eines erneuten Kollaps des Bandscheibenraums als auch des Auftretens kyphotischer Fehlstellung des Wirbelsäulensegments, häufig verbunden mit klinischen und neurologischen Beschwerden (Brodke und Zdeblick, 1992; Robinson, 1963; Savolainen *et al.*, 1994). Diese Stabilisierung wird durch die, nach der Diskektomie angestrebte, intervertebrale Spondylodese des Segments unter Erhalt der Bandscheibenraumhöhe gewährleistet (De Palma *et al.*, 1972; Robinson und Southwick, 1960).

Zur Vermeidung der beschriebenen Nebenwirkungen, bei Erzielung einer dauerhaften knöchernen Fusion der betroffenen Wirbelsäulensegmente, ist, neben der angewendeten Methode zur Spondylodese, das genutzte Implantat relevant. Ein, zur cervikalen Spondylodese, genutztes Implantatmaterial muss in der Lage sein, die Höhe des Intervertebralraumes aufrecht zu erhalten. Dies setzt eine ausreichende mechanische Stabilität voraus, um den bestehenden biomechanischen Beanspruchungen im Zwischenwirbelspalt standzuhalten. Zudem werden osteokonduktive Eigenschaften benötigt um, dem einwachsenden Knochen als Leitschiene zu dienen sowie ein osteoinduktives

Potential zur Induktion weiterer Knochensynthese. Des Weiteren sollte das verwendete Material keine bzw. nur eine geringe immunologische Reaktion, verbunden mit Osteolyse sowie reduzierter Knochenneusynthese induzieren.

### **2.3.1. Implantate zur Spondylodese**

#### **Autologa**

Ein Implantat, das den aufgeführten Kriterien entspricht, stellt der, schon seit Jahrzehnten zur ventralen interkorporellen Spondylodese der Halswirbelsäule genutzte, trikortikale Beckenkammspann dar (Cloward, 1971). Die klinische Erfolgsrate der Spondylodese, unter Erzielung einer soliden knöcherner Durchbauung, liegt bei 88 - 97 % (Bohlman *et al.*, 1993; Brodke und Zdeblick, 1992; De Palma *et al.*, 1972). Das osteokonduktive und -induktive Potential dieses Implantats begründet sich in der vitalen knöchernen Struktur und den darin enthaltenen Osteozyten, Osteoblasten sowie mesenchymalen Zellen. Dies ermöglicht eine vollständige knöcherne Fusion des Zwischenwirbelraums in drei bis sechs Monaten. Bei diesem autologen Transplantat ist, im Vergleich zum Einsatz von Fremdmaterial, auch die Gefahr einer schweren immunologischen Reaktion nicht gegeben. Bedingt durch den nötigen Zweiteingriff zur Entnahme des Spans, ist diese Methodik jedoch mit einer Entnahmemorbidität von 6 bis zu 49 % (z.B. Auftreten von Infektionen und Schmerzen) verbunden. Zudem ist die zu gewinnende Menge an Implantatmaterial begrenzt (Acosta *et al.*, 2009; Banwart *et al.*, 1995).

Vor allem aber handelt es sich um mechanische Probleme, wie kyphotische Deformität nach Versagen oder Wanderung des Implantats (Arrington *et al.*, 1996). Weitere Nebenwirkungen sind das Auftreten von verzögerter Heilung (delayed union) bzw. der Bildung einer Pseudarthrose (non-union), gekennzeichnet durch den Verbleib einer flexiblen Bindegewebsbrücke zwischen den Frakturrenden (De Palma, Cooke, 1968; Denis, 1984; Park, An, 2009). Ursache für deren Entstehung ist eine unzureichende Rekonstruktion und Fixierung der Bruchflächen während des Heilungsvorganges sowie eine Störung der Umwandlung in den knöchernen Kallus (Dahme, Weiss, 2007). Während die hypertrophe Pseudarthrose durch eine gute Vaskularisierung, eine breite Zone an Faserknorpel sowie eine hohe osteogene Kompetenz gekennzeichnet ist, besteht bei der atrophischen Pseudarthrose, durch nekrotische Fragmente, eine verminderte Durchblutung sowie eine ausbleibende Revaskularisierung (Schenk, Willenegger, 1977).

#### **Intervertebrale Cages**

1986 wurde von Harms ein, als Bandscheibenersatz entwickelter, metallischer Cage im Zylinderdesign zur cervikalen Spondylodese eingesetzt. Dieser gewährleistet die mechanische Stabilität des Bewegungssegments und die strukturelle Integrität des Zwischenwirbelraums während des knöchernen Durchbauprozesses (Bagby, 1988; Kuslich *et al.*, 1998). Im Vergleich zum Beckenkammspann konnte dies in biomechanischen Untersuchungen für verschiedenartige Cagedesigns (Abb. 1, 2) nachgewiesen werden (Brodke *et al.*, 1997; Nibu *et al.*, 1997; Rapoff *et al.*, 1997). Bei dem, in diesem Projekt genutzten Implantat, SynCage-C (Synthes®) handelt es sich um einen Cage im Boxdesign. Er soll, neben der Distraction, die Wiederherstellung der Höhe des Bandscheibenraums und Lordose gewährleisten und durch Erweiterung der Foramina eine Kompression der austretenden Nervenbahnen verhindern. Dieser Cage soll durch optimale Passgenauigkeit zwischen Implantat und den Wirbelkörper- Endplatten einen größeren Widerstand gegen das Einsinken in die angrenzenden Wirbelkörper und somit eine Stabilisierung des pathologisch instabilen Segments erzielen. Des Weiteren wird eine Unterstützung der knöchernen Durchbauung des Implantats ermöglicht. Bedingt durch diese Eigenschaften entfällt die Notwendigkeit einer zusätzlichen Sicherung durch eine Osteosyntheseplatte (Bagby, 1988; Kuslich *et al.*, 1998).

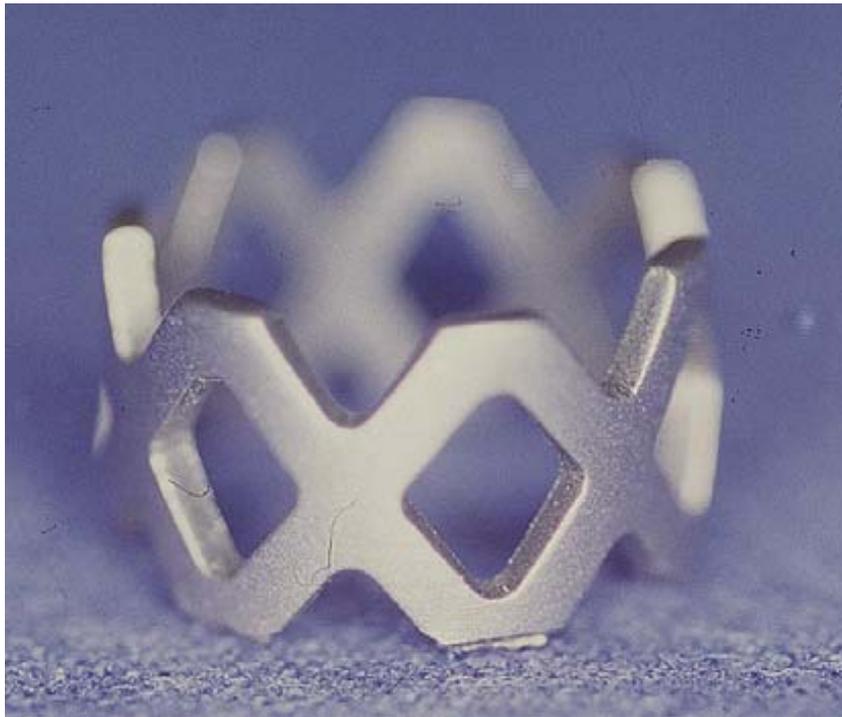


Abb. 1 Cage im Zylinderdesign: Harms- Cage



Abb. 2 Cage im Boxdesign: SynCage-C

## **Titan, Materialeigenschaften**

Der Einsatz von Titan in der Orthopädie und Unfallchirurgie zeichnet sich im Vergleich zu rostfreien Stahlimplantaten durch die Reduktion der Infektionsrate, einer erhöhten Biokompatibilität und Verbesserung biomechanischer Eigenschaften aus (Seebauer *et al.*, 2009). Beim Einsatz von Titan- Implantaten wird deren hohe knöcherne Einbindung in das umliegende Gewebe beschrieben, was eine nötige Entfernung des Implantats erheblich erschwert und mit Auftreten von Frakturen verbunden sein kann (Langhoff, 2008; Michel, 1980; Seebauer *et al.*, 2009).

## **Autologe Spongiosa**

Die, im Rahmen der Spondylodese eingesetzten Cages werden u.a. mit autologer Spongiosa augmentiert. Diese wird den Anforderungen an ein ideales Transplantat in umfassender Weise gerecht und gilt daher seit Jahren als Goldstandard in der Orthopädie und Traumatologie (Hauschild *et al.*, 2007; Roesgen, 1989; Whang, Wang, 2003). Zunächst wird durch das spezifisch übertragene Keimgewebe und anschließend durch die Differenzierung unspezifischer Lagermesenchymzellen zu Osteoblasten eine doppelt wirksame Osteogenese hervorgerufen (Eggers, Wolter, 1986; Saur *et al.*, 1978).

Als Entnahmeorte kommen u.a. der vordere Beckenkamm, Tibiakopf und Trochanter major in Betracht, wobei die höchste Transplantatqualität für die Beckenkammspongiosa nachgewiesen werden konnte (Milachowski *et al.*, 1986).

Die Entnahme von Spongiosa ist zudem mit einer geringeren Morbidität assoziiert als die, des trikortikalen Beckenkammspanns, bedingt durch einen geringeren Verlust und Schädigung von Gewebe (Arrington *et al.*, 1996; Banwart, 1995). Ein weiterer Vorteil bei der Verwendung körpereigener Materialien besteht in der Verhinderung immunologischer Reaktionen, die beim Einsatz von Fremdmaterial auftreten (Saur *et al.*, 1978).

## **Alternative Implantatmaterialien**

Mögliche Nebenwirkungen beim Einsatz von Knochenimplantaten sind Abstoßungsreaktionen, mangelnde mechanische Stabilität, Infektionen und Entzündungen. Diese werden durch schlechtes Integrationsverhalten bzw. mangelhafter aktiver Wechselwirkungen zwischen Implantat und Knochen verursacht. Zur Beschleunigung der Einheilung der Cages bei der intervertebralen Fusion erfolgt die Augmentierung mit osteoinduktiven bzw. osteokonduktiven Materialien. In Tabelle 4 befindet sich eine Zusammenstellung angewendeter Materialien zum Knochenersatz (Bauer, 2007; Beaman *et al.*, 2006; Marchesi, 2000; Sutherland, Bostrom, 2005). Knochenersatzmaterialien werden in sog. Autotransplantate (Empfänger ist gleichzeitig Spender des Materials), Allotransplantate (Implantat stammt von einem Individuum derselben Art) und synthetische Materialien unterteilt, an die die folgenden Anforderungen gestellt werden:

- gute Biokompatibilität bei Fehlen von Toxizität, Antigenität und Kanzerogenität,
- ausgezeichnete Sterilität zum Ausschluss der Übertragung von Krankheitserregern,
- osteoinduktive, osteokonduktive und osteostimulative Eigenschaften,
- biomechanische Eigenschaften, die hinreichende Belastbarkeit ermöglichen,
- universelle Verwendbarkeit unter Operationsbedingungen.

Tab. 4 Übersicht der Knochenersatzmaterialien

Autotransplantat	Knochenkortex
	spongöser Knochen
	Spongiosa der Knochenkortex
	Kombination aus Blutplättchen u. osteochondralem Gewebe (Symphony graft delivery system)
	vaskularisierter Knochen
	Knochenmark
	osteochondrales Gewebe
Allotransplantat	Knochenkortex
	spongöser Knochen
	Spongiosa der Knochenkortex
	Kombination aus Blutplättchen u. osteochondralem Gewebe (Symphony graft delivery system)
	osteochondrales Gewebe
	Demineralisierte Knochenmatrix (Grafton, Osteofil, MTF DBX, Dynagraft, AlloGro, Opteform)
	Wachstumsfaktoren:
	transforming growth factors (TGF`s)
	bone morphogenetic proteins (BMP`s)
	plateled derived growth factors (PDGF`s)
	insulin like growth factors (IGF`s)
	fibroblast growth factors(FGF`s)
epidermal growth factors(EGF`s)	
synthetische Materialien	Keramiken:
	biologisches Hydroxylapatit
	Calcium Carbonat der Koralle (ProOsteon, Biocoral)
	boviner spongöser Knochen (Endobon, Pyrost)
	synthetisches Hydroxyapatit (Synatite, Cerapatite)
	Tricalciumphosphat (Calciresorb, ChronOS, Biosorb)
	Biphasisches Calciumphosphat, Kombination aus Hydroxyapatit u. Tricalciumphosphat (Biocer–Biosel 2, Ceraform, Hatric, Triosite)
	Calciumsulfat (MIIG X3, OsteoSet, Stimulan)
	Materialkombinationen (OsteoSet DBM, Collagraft, Collapat, Conduit, Healos)

Die Eigenschaften der verschiedenen Implantatmaterialien sind in Tabelle 5 aufgeführt (Whang, Wang, 2003).

Tab. 5 Eigenschaften von Implantatmaterialien

Implantate zum Knochenersatz	Osteogene Zellen	Osteoinduktive Faktoren	Osteo-konduktive Matrix	Initiale biomechan. Stabilität	Entnahme-morbidität
autogene Spongiosa	+++	++	+++	-	++
autogener kortikaler Knochen	+	+	+	+++	++
gefrorenes Allograft	-	+	+	++	-
lyophilisiertes Allograft	-	+	+	+	-
Keramiken	-	-	+++	+	-
Demin. Knochenmatrix	-	++	+	-	-
Osteo-induktive Wachstums-faktoren	-	+++	-	-	-
unfraktioniertes KM	++	+	-	-	+
Mesenchymale Stammzellen	+++	-	-	-	+
Autologes Plättchen-konzentrat	-	++	-	-	-
Gentherapie, in vivo	-	+++	-	-	-
Gentherapie, ex vivo	++	+++	-	-	+

Zur Erzielung optimaler Ergebnisse der ventralen cervikalen Spondylodese wird eine Kombination an bioaktiven Materialien benötigt, welche sich durch die Fähigkeit zur Osteointegration, Osteokonduktion und Osteoinduktion auszeichnen (Pou, 2003).

Das Enzym Parathormon stellt dabei eine mögliche osteoinduktive Komponente dar, welche jedoch ein Carrier- System zum verlängerten Verbleib am Ort der Knochenneubildung benötigt. Bei Fibrin handelt es sich um solch ein biokompatibles Trägermaterial, in das osteoinduktive Proteine kovalent gebunden werden können. Bei zusätzlichem Einsatz von Biokeramiken, wie granulärem Hydroxyapatit / Tricalciumphosphat kann dies durch eine osteokonduktive Komponente ergänzt werden.

## **Parathormon (PTH)**

Die Bildung dieses Peptidhormon, aus 84 Aminosäuren, erfolgt in der Nebenschilddrüse. Die systemische Wirkung von diesem Hormon besteht in der primären Regulation des Blutkalziumspiegels. Sinkt die Kalziumkonzentration im Blut erfolgt die Ausschüttung von PTH, wodurch der Abbau von  $\text{Ca}^{2+}$ - Ionen aus dem Knochen, deren Resorption im Darm sowie die Rückresorption aus der Niere gesteigert wird. Kalzitonin aus der Schilddrüse fungiert als Gegenspieler. Es besteht ein direkter Einfluß auf den Knochenumbau unter Stimulation des Knochenabb- und -aufbaus. Durch indirekte Stimulation osteoklastärer Vorläuferzellen wird die Knochenresorption gefördert. Hingegen wird bei Aktivierung der, auf der Oberfläche der Osteoblasten lokalisierten Rezeptoren, durch Bindung von Parathormon, die Lebenszeit und Aktivität der Osteoblasten verlängert, die Knochenneusynthese und somit ein Ersatz des resorbierten Knochens induziert (Poole, Reeve, 2005). Die Verbesserung der Geweberegeneration in Knochendefekten sowie die Induktion der Neusynthese von Knochengewebe durch lokale Freisetzung von Parathormon wurde auch von Bonadio et al. bestätigt (Bonadio *et al.*, 1999). Durch Anhebung des PTH- Spiegels im Blut für unter zwei Stunden pro Tag konnte die Neubildung von Knochenmasse induziert werden (Dobnig, Turner, 1997). Zur Osteoporosetherapie wird die paradoxe Wirkung des Parathormon genutzt, so ist ein pharmazeutisches Produkt (Forteo/Forsteo, Eli Lilly), mit  $\text{PTH}_{1-34}$  als aktiver Substanz, zur Osteoporosetherapie registriert (Whitfield, 2003).

## **Modifiziertes Parathormon (TGpIPTH1-34)**

Bei diesem besteht eine Proteinmodifikation am N- terminalen Ende aus einem Peptid- Tag von 12 Aminosäuren, der eine Transglutaminase- Substrat- Sequenz (TG- Sequenz) sowie eine Plasmin- Substrat- Sequenz (PL- Sequenz) enthält.

Die TG- Sequenz ist die Substrat- Sequenz für Faktor XIII der natürlichen Blutgerinnung und ermöglicht die kovalente Bindung des Proteins in der Fibrin- Matrix. Die Zugabe des modifizierten Proteins zur Fibrinogenkomponente erfolgt vor dem Koagulationsprozess. Das Zuführen der Thrombin- Komponente aktiviert das Enzym zum Faktor XIIIa, mit daraus resultierender Einbindung des modifizierten Proteins, über die Faktor XIIIa- Substrat- Sequenz, in das entstehende Fibrin- Netzwerk (Schense, Hubbell, 1999).

Die PI- Sequenz ist zwischen der TG- Sequenz und der eigentlichen Protein- Sequenz lokalisiert und ermöglicht die lokale, proteolytische Freisetzung bioaktiver Proteine aus der Fibrinmatrix durch zellaktiviertes Plasmin (Sakiyama-Elbert *et al.*, 2001).

Im Rahmen der normalen Geweberegeneration erfolgt, von eingewanderten Zellen, ein Ersatz der Fibrinmatrix durch neu synthetisierte Extrazellulärmatrix, bei gleichzeitiger Sezernierung von Plasmin. Dieses setzt kovalent eingebundene, osteoinduktive Proteine enzymatisch frei.

Durch die lokale, proteolytische Freisetzung des kovalent in Fibrin, als Matrixsystem gebundenen, osteoinduktiven TGpIPTH1-34 wird deren Verweildauer am Ort der gewünschten Knochenneubildung verlängert (Arrighi *et al.*, 2009). Die Verringerung der Proteinkonzentration ist auch mit einer Reduktion möglicher Nebenwirkungen verbunden (Schmoekel *et al.*, 2005).

## Fibrin

Fibrin ist das aktivierte, vernetzte Protein der plasmatischen Blutgerinnung. Dieses wird durch die Einwirkung des Enzyms Thrombin aus der fadenförmigen, löslichen Vorstufe, dem Fibrinogen, gebildet. Gleichzeitig aktiviert Thrombin den fibrinstabilisierenden Faktor XIII, eine Transaminase, die eine kovalente Verbindung der Fibrinfäden erzielt. Durch diese Polymerisation des Fibrins in seine stabile, unlösliche Form erfolgt der Wundverschluss unter Ausbildung eines sog. „weißen Thrombus“ (Meurer, 2007). Als Trägermaterial, in welches osteoinduktive Proteine kovalent gebunden sind, stellt Fibrin die Basis der Knochenersatzmaterialien dar, welches als biokompatibles Carrier- System zum Einsatz kommt. Die Verweildauer am Ort der gewünschten Knochenneubildung ist hierdurch deutlich verlängert, verbunden mit einer verbesserten Einheilung des Cages bei der intervertebralen Spondylodese. Es handelt sich somit um ein resorbierbares und biokompatibles Trägermaterial, welches die Infiltration von Zellen, verbunden mit einem positiven Effekt auf die Knochenheilung, ermöglicht. Klinisch angewendet wird die Variante Tiseel/Tissucol (Baxter AG), bestehend aus den zwei Hauptkomponenten Fibrinogen und Thrombin. Bei Vermischen der beiden Komponenten wird der letzte Schritt der Blut- Gerinnungskaskade, unter Entstehung von Fibrin, nachgeahmt. Dieses ist bei guter Toleranz vom humanen Organismus vollständig degradierbar und stellt somit eine optimale Matrix für die lokale Freisetzung von osteoinduktiven Substanzen dar (Le Guehenec *et al.*, 2005).

## Tricos / Hydroxyapatit / $\beta$ - Tricalciumphosphat

TricOs ist eine CE- zertifizierte Biokeramik, die als Knochenersatzstoff, mit osteokonduktiven Eigenschaften, in der Klinik vielfältig zum Einsatz kommt (Daculsi *et al.*, 1992; Daculsi, Passuti, 1990). Diese Zweiphasenkeramik besteht aus einer Mischung von ca. 60 % Hydroxyapatit (HA) und 40 %  $\beta$ - Tricalciumphosphat ( $\beta$ - TCP). Dieses, schon vor über 20 Jahren, als Knochenersatz entwickelte, resorbierbare und bioaktive Material bedingt eine Erhöhung der mechanischen Stabilität bei ausgezeichneter Biokompatibilität (Le Guehenec *et al.*, 2005). Es handelt sich um ein poröses Granulat mit einer Partikelgröße von 1-2 mm.

Die Mikroporosität von unter 10  $\mu$ m soll die Verteilung von Flüssigkeiten ermöglichen. Eine Besiedlung der Keramik durch osteogene Zellen wird durch die Makroporosität von 300-600  $\mu$ m unterstützt. Dies ermöglicht den allmählichen Ersatz durch neu gebildetes Knochengewebe. Die Makroporen bilden somit einen sehr guten Scaffold für die Einwanderung und Kolonialisierung von Knochenzellen (Daculsi, 1998).

In einer Studie von Franch *et al.* wurde der Einsatz von  $\beta$ - TCP als synthetisches, spongiöses Knochentransplantat beschrieben, wobei dessen Osteokonduktivität bestätigt wurde. Es konnten jedoch weder osteoinduktive noch osteogenetische Wirkung nachgewiesen werden. Gute Ergebnisse erzielte  $\beta$ - TCP als zusätzlicher Füllstoff zur Vergrößerung des Transplantatvolumens, verbunden mit gering ausgeprägten osteoinduktiven und osteogenen Eigenschaften. In dieser Studie wird  $\beta$ - TCP als nützliches Implantatmaterial zur Rekonstruktion krafttragender Skelettanteile beschrieben. In der humanen Orthopädie wird auf Kalzium basierendes, hochporöses synthetisches Implantatmaterial als osteokonduktives Produkt und als Übermittler osteoinduktiver Agentien wie z.B. Wachstumsfaktoren, aber auch in Kombinationen mit osteogenen Zellen genutzt (Franch *et al.*, 2006).

## **2.4. Zusammenfassung v. Wissensstand u. Untersuchungszielen**

Die derzeit angewendeten Materialien zur Erzielung einer optimalen ventralen interkorporellen Spondylodese der Halswirbelsäule sind auch heute noch mit dem Auftreten von Morbidität verbunden, die die Lebensqualität der Patienten teils stark einschränkt. Daher gewinnt die Verbesserung der Voraussetzungen für ein optimales Zwischenwirbelimplantat in der Wirbelsäulenforschung zunehmend an Bedeutung. Der zentrale Punkt ist die Wiederherstellung und Aufrechterhaltung des Wirbelsäulenprofils bei osteoinduktiven und osteokonduktiven Eigenschaften.

Es ist noch nicht ausreichend erforscht, welche Vorteile, bei Einsatz einer Kombination aus intervertebralem Titan- Cage, augmentiert mit verschiedenen osteoinduktiven und osteokonduktiven Materialien, gegenüber dem alleinigen Einsatz eines Titan- Cages, zu erwarten sind.

Anhand histologischer, immunhistologischer und histomorphometrischer Untersuchungen sind folgende Hypothesen zu überprüfen:

- 1) Durch Augmentierung des Titan- Cages mit dem neu entwickelten Knochenersatzmaterial lässt sich die knöcherne Fusion des dritten und vierten Halswirbels im Vergleich zu Kontrollgruppen verbessern.
- 2) Die HA / TCP- Partikel (TricOs) sind nach 3 Monaten vollständig von Knochengewebe umgeben und im Zwischenwirbelraum integriert.
- 3) Der Knochenumbau erfolgt v. a. auf der TricOs- Oberfläche.
- 4) Die Induktion der Knochenheilung ist abhängig von der Parathormonkonzentration.
- 5) Xenogenes Fibrin und / oder TricOs induzieren die Entstehung von Entzündungsreaktionen.
- 6) Die Induktion der Osteoklastenaktivität durch Parathormon ist konzentrationsabhängig.

### **3. MATERIAL UND METHODEN**

#### **3.1. Studiendesign**

Im Rahmen unserer Studie wurde an 48 weiblichen, ausgewachsenen Merino- Mix-Hausschafen eine ventrolaterale Spondylodese der Halswirbelsäule des dritten und vierten Wirbelkörpers (C3 / C4) durchgeführt. Nach operativer Entfernung der Bandscheibe zwischen dem Halswirbelsäulensegment C3 / C4 erfolgte das Einbringen des intervertebralen Implantats SynCage-C (Synthes®). Dieses wurde zuvor mit den von den Firmen Synthes und Kuros bereitgestellten Füllmaterialien augmentiert.

#### **3.2. Wahl des Modells**

##### **3.2.1. Tiermodell**

Die Auswahl der Versuchstierspezies Schaf begründet sich, neben der pflegeleichten und guten Handelbarkeit dieser Spezies, vor allem in der, in vorangegangenen Studien etablierten, Vergleichbarkeit der Halswirbelsäule von Schaf und Mensch.

Die Wirbelsäulen - Arbeitsgruppe der Charité- Berlin, Campus Virchow Klinikum, unter Leitung von Kandziora, hat das Schaf vor einigen Jahren als Modell zur Untersuchung der Spondylodese des Wirbelsäulensegments C3 / C4 etabliert (Kandziora *et al.*, 2001 b).

Wilke *et al.* und Kandziora *et al.* konnten in diversen Studien belegen, dass die Halswirbelsäule des Schafs, anatomisch und biomechanisch zur Halswirbelsäule des Menschen, partiell große Ähnlichkeit aufweist (Kandziora *et al.*, 2001 b; Wilke *et al.*, 1997 a, b). In zuvor durchgeführten Untersuchungen zur ventralen Fusion an der ovinen Halswirbelsäule hat sich das Schaf als Versuchstier in der experimentellen Wirbelsäulenchirurgie bewährt (Tierversuch Nr. G0097/99, G0110/00, G0282/00, 0193/01, G0016/02, G0013/03, G 0185/03).

Da der verwendete intervertebrale Cage für den Einsatz am Menschen vorgesehen ist, bedarf es einer Tierart, bei der sich ein Implantat von angemessener Größe (16 mm Ø, 8 mm Höhe) einbringen lässt. Es kommen somit keine Kleintiere für diese Untersuchung in Frage, während sich das Schaf bezüglich seiner knöchernen Dimension für die traumatologische und orthopädische Forschung eignet.

Um die Standardisierbarkeit des durchgeführten chirurgischen Eingriffs zu gewährleisten, wurden für das Projekt Tiere ausgewählt, bei denen große Übereinstimmungen bezüglich des Alters, der Ausprägung von Körperbau und Habitus sowie ein, als medizinisch unbedenklich einzustufender Gesundheitszustand nachweisbar ist.

Mit einem Alter von zwei Jahren gilt das Schaf als ausgewachsen und es kann von einem vollständigen Epiphysenschluss ausgegangen werden (Duda *et al.*, 1998; Schorlemmer *et al.*, 2003).

##### **3.2.2. Versuchstiere**

Die Einstellung von 48 weiblichen Merino- Mix- Schafen in die tierexperimentelle Einrichtung der Charité erfolgte nach eingehender tierärztlicher Untersuchung. Das erforderliche Alter von mindestens zwei Jahren wurde anhand des Zahnstatus sowie das geforderte durchschnittlichen Gewichts von 65 kg ( $\pm 10$  kg) durch Wiegen überprüft. Schafe unter zwei Jahren, tragende sowie kranke Tiere wurden nicht in den Versuch aufgenommen. Die Einbeziehung von nur weiblichen Tieren in den Versuch diente der Minimierung des Aggressionspotentials und der Vermeidung von, v. a. postoperativer, Beunruhigung innerhalb der Gruppe. Den Tieren wurde das Prostaglandin- Analogon Estrumate® zur Unterbindung einer potentiell bestehenden Frühträchtigkeit verabreicht. Zur Behandlung gegen Ekto- und Endoparasiten wurden die Präparate Ivomec® und Fasinex® 10% eingesetzt. Des Weiteren wurde zur Steigerung der Immunreaktivität und somit der Infektabwehr Zylexis® verabreicht.

Die Tiere wurden von einem amtlich zugelassenen Züchter (Gutshof Langerwisch, K. Bildt, Am Gut 3, 14557 Langerwisch) erworben.

Eine Woche vor der Operation wurden die Schafe in der tierexperimentellen Einrichtung der Charité, Campus Virchow- Klinikum eingestallt, wo zweimal wöchentlich ein Wechsel des Einstreumaterials (Späne, Stroh) erfolgte. Nach durchgeführter Operation verblieben sie dort, für weitere zehn Tage, bis zur Entfernung der Hautfäden bzw. dem Abschluss der Wundheilung. Anschließend wurden sie auf den Forschungs- und Lehrbauernhof der Humboldt Universität Berlin, Lentzeallee 75, 14195 Berlin verbracht, wo sie freien Auslauf erhielten. In beiden Einrichtungen waren veterinärmedizinische und tierpflegerische Aufsicht gewährleistet. Bei den Tieren aller Versuchsgruppen bestanden identische Haltungsbedingungen, bei zweimal täglicher Gabe von Heu. Wasser und Minerallecksteine standen ad libitum zur Verfügung.

Der Versuch wurde vom Landesamt für Arbeitsschutz, Gesundheitsschutz und technischer Sicherheit (LAGetSi, Berlin) unter der amtlichen Tierversuchsnummer G 0331/06 genehmigt.

### 3.3. Versuchsaufbau

#### 3.3.1. Versuchsgruppen

Die Schafe wurden in sechs Versuchsgruppen, zu je acht Tieren, eingeteilt.

In den Gruppen 15 (SynCage-C, Fibrin, 0,2 mg/ml TGpPTH1-34, TricOs), 10 (SynCage-C, Fibrin, 0,4 mg/ml TGpPTH1-34, TricOs), 11 (SynCage-C, Fibrin, TGpPTH1-34, TricOs) und 9 (SynCage-C, Fibrin, 1,0 mg/ml TGpPTH1-34, TricOs) kam der, mit modifiziertem PTH<sub>1-34</sub>, Fibrin und TricOs augmentierte SynCage-C als intervertebrales Implantat zum Einsatz.

Bei zwei Referenzgruppen, ebenfalls je acht Schafe, erfolgte des Weiteren eine Spondylodese der Halswirbelsäule mittels einem isolierten SynCage-C ohne Füllmaterialien (Gr.12, sog. Leercage) bzw. einem mit TricOs augmentierten SynCage-C (Gr.3) durchgeführt. Die Standzeit aller Tiere betrug 12 Wochen.

Daraus ergibt sich die, in Tabelle 6 aufgeführte Gruppeneinteilung.

Tab. 6 Gruppeneinteilung und eingesetzte Implantatmaterialien

Gruppe, Tierzahl n	Versuchsgr./ Kontrollgr.	Implantat	Standzeit
12, n=8	Kontrolle	SynCage-C	12 Wo.
3, n=8	Kontrolle	SynCage-C augmentiert mit TricOs	12 Wo.
15, n=8	Versuch	SynCage-C augmentiert mit Fibrin, TGpPTH1-34 (0,2mg/ml), TricOs	12 Wo.
10, n=8	Versuch	SynCage-C augmentiert mit Fibrin, TGpPTH1-34 (0,4mg/ml), TricOs	12 Wo.
11, n=8	Versuch	SynCage-C augmentiert mit Fibrin, TGpPTH1-34 (0,7mg/ml), TricOs	12 Wo.
9, n=8	Versuch	SynCage-C augmentiert mit Fibrin, TGpPTH1-34 (1,0mg/ml), TricOs	12 Wo.

### 3.3.2. Implantat

Als Bandscheibenersatz diente das Implantat SynCage-C (Synthes®) im Boxdesygn (Abb. 3) mit folgenden Parametern (Tab. 7).

Tab. 7 SynCage-C

Material	Titan
Höhe	7 mm
Form	gewölbt, keilförmig
Durchmesser der zentralen Pore	
glatte Seite	9 mm <sup>2</sup>
gewölbte Seite	6 mm <sup>2</sup>
9 Poren, als äußere Umrandung	je 3 mm <sup>2</sup>
ausgesparte Fläche lat.	5 mm Höhe x 7mm Breite
ventr.ausgestanzte Fläche f. Implantatgreifer	4 mm Höhe x 7 mm Breite

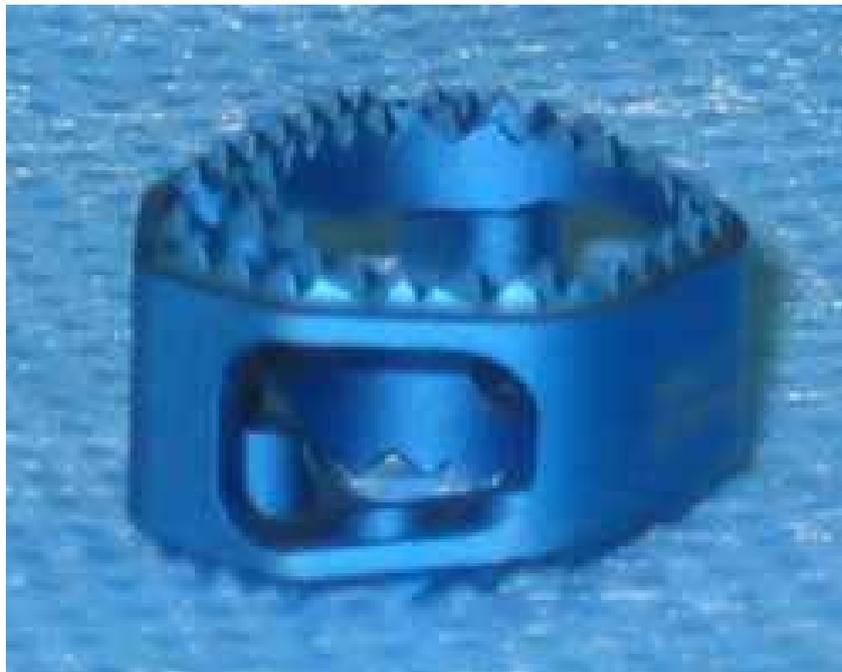


Abb. 3 SynCage-C, Synthes®

Der sterilisierte Cage wurde während der Operation unmittelbar vor dem Einbringen in das entleerte Bandscheibenfach mit dem für die jeweilige Gruppe vorgesehenen Material augmentiert (Abb. 4).



Abb. 4 Cage augmentiert mit TGpIPTH1-34, Fibrin, TricOs

### **3.3.3. Implantat-Augmentierung**

#### **Modifiziertes Parathormon (TGpIPTH1-34)**

Das TGpIPTH1-34 wurde für dieses Projekt von der Firma Kuros zur Verfügung gestellt (Abb. 5). Es besteht eine Proteinmodifikation am N- terminalen Ende aus 12 Aminosäuren, die die kovalente Bindung in der Fibrin- Matrix durch Faktor XIIIa der Blutgerinnungskaskade während der Koagulierung ermöglicht.

#### **Fibrin**

Als Fibrinmatrix wurde FS VH S / D (Fibrin sealant vapour-heat treated solvent detergent treated) der Baxter AG genutzt (Abb. 5). Bei dieser verbesserten Version der schon klinisch angewendeten Fibrinmatrix Tiseel / Tissucol erfolgt zur Erhöhung der Produktsicherheit ein zusätzlicher Virus- Inaktivierungs- Schritt. Bei Vermischen der beiden Hauptkomponenten Fibrinogen und Thrombin entsteht Fibrin als natürliche Matrix analog des letzten Schrittes der Koagulation von Blut.



Abb. 5 Fibrinogen-Thrombin-Komponente und TGpIPTh1-34

### **β- Tricalciumphosphat (TricOs)**

Es handelt sich dabei um ein als Knochenersatzstoff eingebrachtes Material (Abb. 6). Diese Zweiphasenkeramik besteht aus Kalziumphosphat in der Zusammensetzung 60 % Hydroxyapatit, 40 % Beta-, und Tri- Kalziumphosphat. Dieses resorbierbare und bioaktive Knochenersatzstoff- Material bedingt eine Erhöhung der mechanischen Stabilität.



Abb. 6 TricOs

Von den Firmen Synthes und Kuros wurde das zu untersuchende Knochenersatzmaterial bereitgestellt. Die Komponenten TGpPTH1-34 (Konzentration 1- 4), Fibrin und TricOs wurden während der Operation unter sterilen Kautelen vermischt (Abb. 7). Anschließend wurde 1 ml des entstandenen Gels in den Cage gefüllt und dieser sofort in das Bandscheibenfach C3 / C4 eingesetzt.



Abb. 7 Komponenten des Füllmaterials

### **3.3.4. Ablauf der Produkt- Zubereitung**

#### **Zubereitung des Granulats**

Nach Abnahme der Luer- Verschlusskappe wird der Kolben der mit TricOs befüllten Spritze bis auf Höhe des Granulats hinuntergedrückt. Anschließend wird aus einer aufgesteckten Spritze 1 ml steriles Wasser zugegeben. Der Granulatkolben wird nun um ca. 1 ml zurückgezogen und die Wasserspritze abgenommen.

#### **Zubereitung des Duploject Fibrinklebers (FK)**

Die Mischspritze wird fest auf die DUPLOJECT FK- Doppelspritzenhalterung gesteckt und der DUPLOJECT FK mit der Granulatspritze verbunden.

Nun wird der gesamte Fibrinkleber injiziert, der Granulatkolben langsam bis nach oben gezogen. Der DUPLOJECT wird anschließend abgenommen und das Produkt eine Minute in der Spritze belassen, um ein Sedimentieren des Fibrinklebers zu ermöglichen.

Es folgen das vorsichtige Herausdrücken von Luftblasen sowie das Abschrauben des blauen Schraubverschlusses. Das Produkt ist nun innerhalb von einer bis max. zehn Minuten nach dem Mischen zu verbrauchen.

## **3.4. Operation**

### **3.4.1. Operationsvorbereitung**

Am Abend vor der Operation wurde das am nächsten Tag zu operierende Schaf und ein Begleittier in einem Auslauf ohne Futter untergebracht. Dies diente der Gewährleistung einer zwölfstündigen Nahrungskarenz. Wasser stand den Tieren bis zum Morgen des Operationstages zur freien Verfügung.

Die Narkoseeinleitung erfolgte, unter Reflexkontrolle über einen venösen Zugang in der Vena cephalica. Das Tier erhielt bis zum Erlangen der Intubationsfähigkeit gewichtsadaptiert 0,5 - 1,5 g Thiopental- Natrium. Im sedierten Zustand wurde das Tier in rechter Seitenlage auf dem OP- Tisch gelagert. Nach Verbringen in die Einleitung erfolgte unter Verwendung eines Laryngoskops die Intubation mit einem Endotrachealtubus. Dieser wurde nach Überprüfung des korrekten Verlaufs fixiert. Zur Vermeidung der Aufgasung des Pansens (Pansentympanie) wurde den Tieren eine Schlundsonde gelegt.

Das Beatmungsgerät wurde auf kontrollierte Atmung, bei einem Atemzugvolumen von 700 - 800 ml und einer Atemfrequenz von 12 - 14 Atemzügen je Minute, eingestellt und an den Tubus angeschlossen. Die Aufrechterhaltung der Narkose erfolgte über eine Inhalationsnarkose mit Isofluran 2 % und einem Sauerstoff (O<sub>2</sub>) – Lachgas (N<sub>2</sub>O) - Gemisch im Verhältnis 60 zu 40 (O<sub>2</sub>: 6 ml / min, N<sub>2</sub>O: 4 ml / min).

Die linke Halsseite des betreffenden Tieres wurde geschoren und die Klauen aus Hygienegründen mit Krankenunterlagen umwickelt und mit Klebeband fixiert.

Nach Verbringen des Tieres in den Operationssaal wurde der Tubus mit dem Beatmungsgerät mit angeschlossenem Isofluran- Verdampfer verbunden.

Die Kontrolle der eingestellten Werte (ca. 1,6 % Isofluran, 0,8 l / min Lachgas, 0,8 l / min Sauerstoff) erfolgte über ein Anästhesiegas- Monitoring.

Zur Überwachung der O<sub>2</sub>- Sättigung, des CO<sub>2</sub>- Gehaltes des Blutes und der Herzfrequenz wurden die Tiere an ein Monitoring mit der Einstellung „Pädiatrischer Patient“ angeschlossen. Dazu wurde an den Vordergliedmaßen und der linken Hintergliedmaße EKG- Elektroden auf zuvor rasierten Stellen befestigt.

Eine Blutdruckmanschette wurde an den Metatarsus angelegt sowie ein Pulsoxymeter mit einem Ohr- Clip im Bereich der Ohrvene an der linken Ohrmuschel befestigt.

Die zwischen Beckenanteil der rechten Hintergliedmaße und Operationstisch befindliche Neutrale des Cauters wurde mit der Erdung verbunden.

Zur antibiotischen Prophylaxe erfolgte die intravenöse Kurzinfusion von Unacid® 3g und anschließend während der gesamten Operation eine intravenöse Infusion von Jonosteril® 1000 ml zur Aufrechterhaltung des Wasserhaushaltes.

Zur Bestimmung der präoperativen Bandscheibenraumhöhe wurden digitale Röntgenaufnahmen der Halswirbelsäule (60 kV / 28 mAs), in laterolateralem Strahlengang, angefertigt.

Im weiteren Ablauf der OP- Vorbereitung wurde das Schaf am Operationstisch fixiert, die rechte Schulter gepolstert sowie eine Nackenstütze zur Erzeugung eines Gegendrucks befestigt. Das Tier wurde für den Eingriff mit sterilen Operationstüchern abgedeckt, die mittels Hautnaht mit einem Polyesterfaden befestigt wurden. Die sich nun anschließende Hautdesinfektion des Operationsfeldes wurde mit Braunoderm® durchgeführt.

Direkt vor Beginn der Operation erfolgte die intravenöse Gabe von 2 ml Fentanyl® - Janssen 0,5 mg zur Verstärkung der Analgesie. Im Verlauf der Operation erfolgte i. d. R. alle 30 min eine Gabe von 1 ml Fentanyl®, individuell abgestimmt auf die Vitalparameter des Tieres.

### 3.4.2. Vorbereitung des Implantat

Das Implantat wurde steril verpackt zur Verfügung gestellt. Die Produktzubereitung des in den Cage einzubringenden Füllmaterials erfolgte direkt vor dem operativen Einbringen des Implantats (3.3.4).

### 3.4.3. Spondylodese

Nach Palpation des Verlaufes des Vorderrandes des Musculus (M.) sternocleidomastoideus wurde ein ventrolateraler Hautschnitt von ca. 20 cm Länge auf der linken Halsseite in Längsrichtung angelegt (Abb.8).

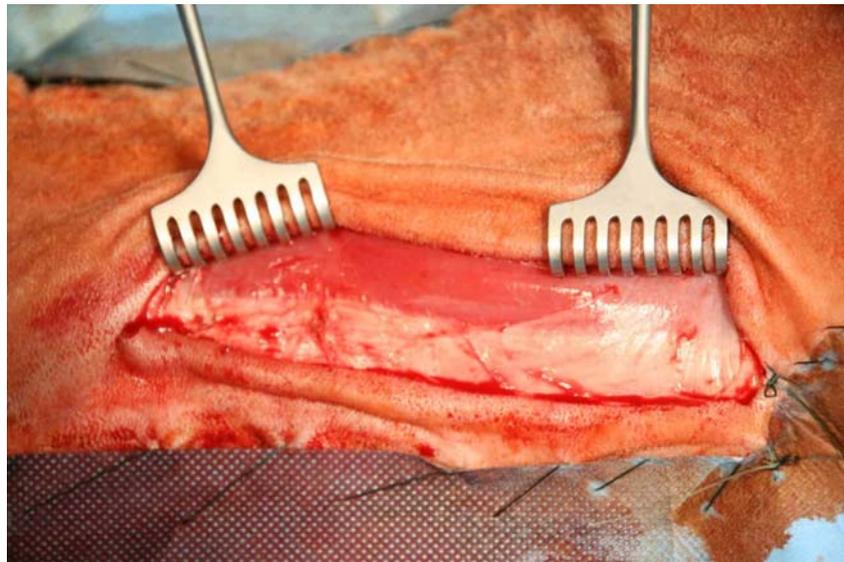


Abb. 8 Hautschnitt

Nach Durchtrennung des Unterhautfettgewebes, der oberflächlichen Faszie und der Hautmuskulatur (Musculi cutanei) konnte der M. sternocleidomastoideus dargestellt werden (Abb.9).

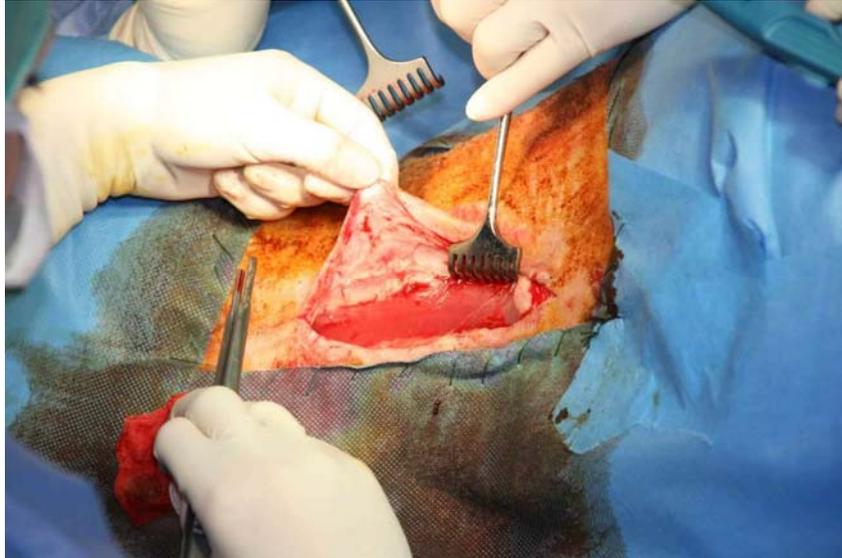


Abb. 9 Darstellung des M. sternocleidomastoideus

Anschließend erfolgte die Durchtrennung der oberflächlichen Stammgliedmaßenmuskulatur (M. sternomandibularis, M. cleidomastoideus des M. sternocleidomastoideus) unter Schonung der in der Drosselrinne (Sulcus jugularis) verlaufenden Drosselvene (Vena jugularis externa), (Abb.10).



Abb. 10 Präparation der Stammgliedmaßenmuskulatur

Dorsal der V. jugularis externa erfolgte die stumpfe Präparation der ventralen Wirbelsäulenmuskeln (M. scalenus ventralis, M. longus capitis, M. longus colli) unter Schonung des Truncus vagosympathicus, der Arteria carotis communis, des Oesophagus, des Nervus laryngeus recurrens, der Trachea und des evtl. in Resten vorhandenen Thymus (Abb.11).

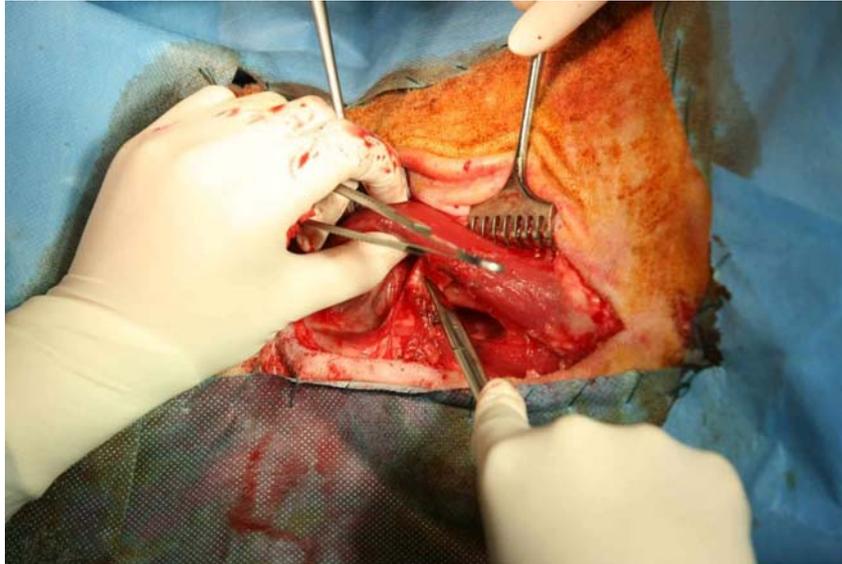


Abb. 11 Präparation der ventralen Halsmuskulatur

Nach Mobilisierung und Ablösung des M. sternocleidomastoideus vom umgebenden Gewebe wurde dieser mittels zweier Langenbeck- Wundhaken in dorsolateraler Richtung angehoben (Abb.12).

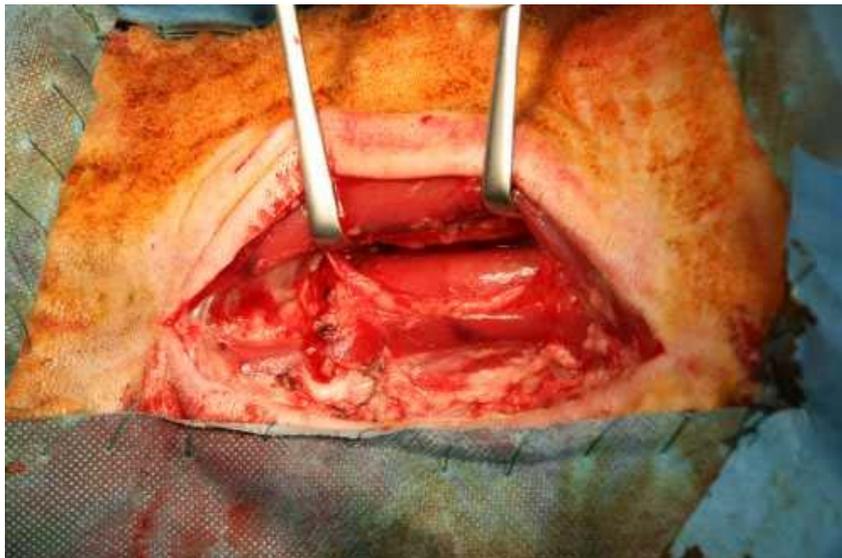


Abb. 12 Dorsolaterale Retraktion des M. sternocleidomastoideus

Nach Darstellung der prävertebralen Muskulatur (M. longus colli) erfolgte die Palpation der nun tastbaren Halswirbelsäule. Dies diente der Identifikation des aus drittem und viertem Halswirbel bestehenden Halswirbelsäulensegments C3 / C4. Zur radiologischen Kontrolle des gewählten Segmentes mittels Bildverstärker erfolgte das Einstechen eines Kirschner- Drahtes in die Bandscheibe (Discus intervertebralis) zwischen C3 / C4 (Abb.13).

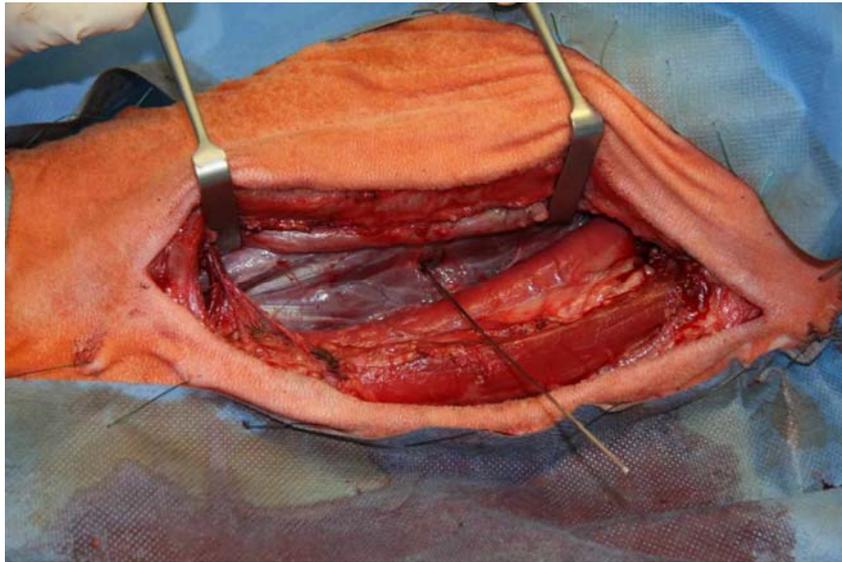


Abb. 13 Darstellung des M. longus colli, Markieren des Intervertebralraums C3 / C4

Nach Entnahme des Kirschner- Drahtes wurde im Bereich des Bandscheibenraumes die Wirbelsäulenmuskulatur mit einem, zum Schneiden und der Blutstillung dienenden, Elektrocauter bis zur Freilegung der angrenzenden Wirbelsäulenendplatten von C3 und C4 präpariert (Abb. 14, 15).

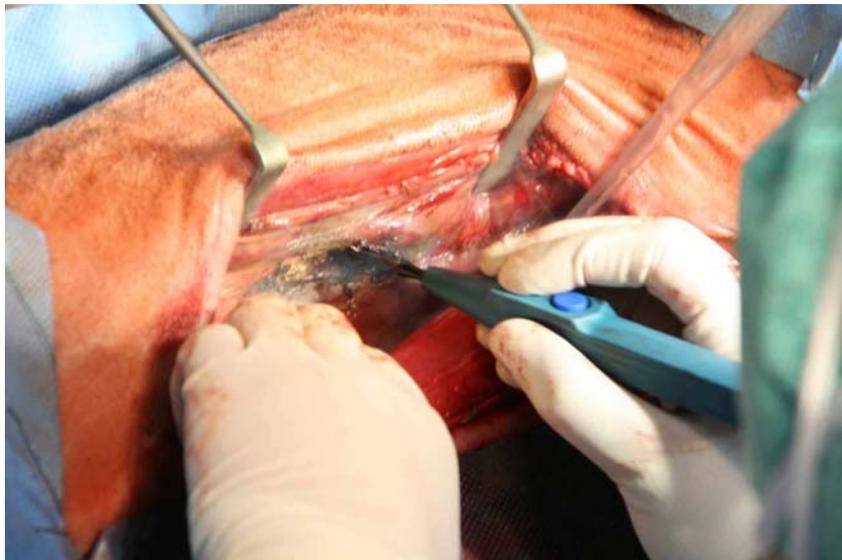


Abb. 14 Spaltung des M. longus colli

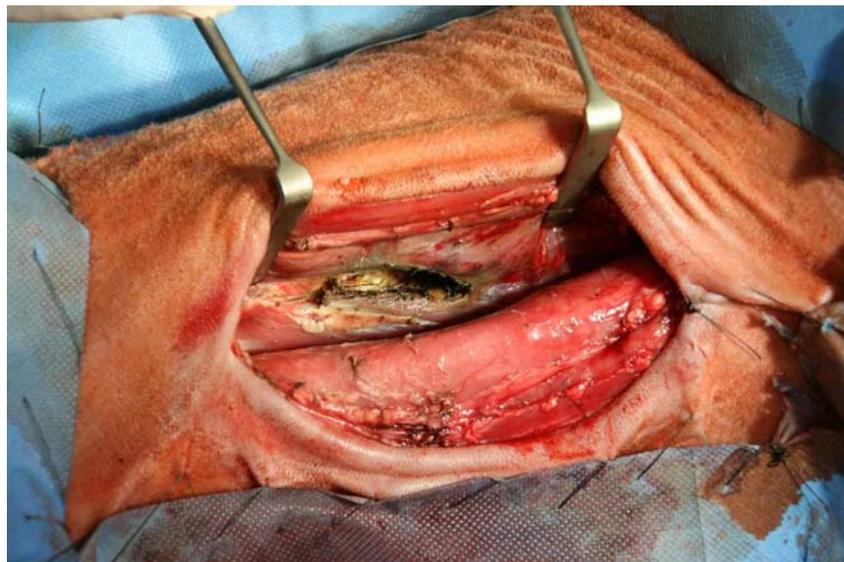


Abb. 15 Sicht auf Intervertebralraum C3 / C4

Mittels Skalpell wurde ein ellipsenförmiger Einschnitt in die Bandscheibe durchgeführt (Abb. 16).

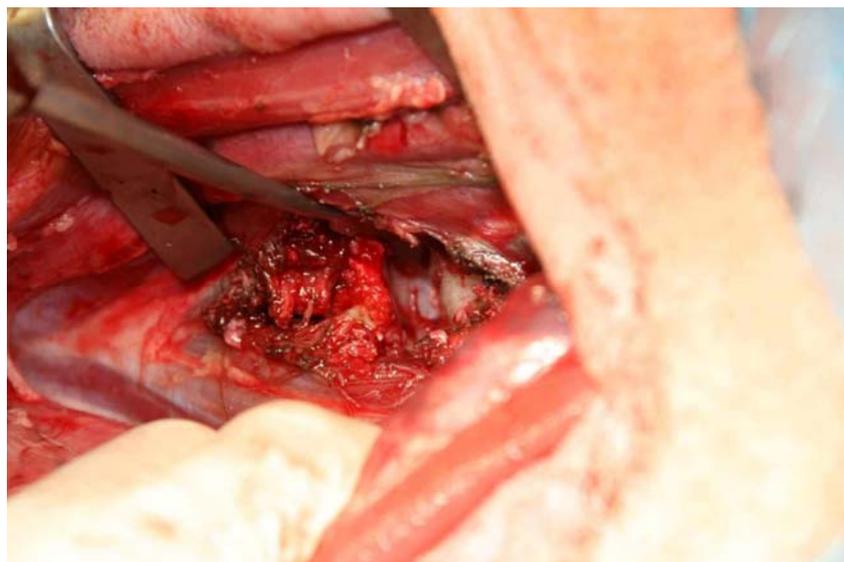


Abb. 16 Einschnitt in Bandscheibe

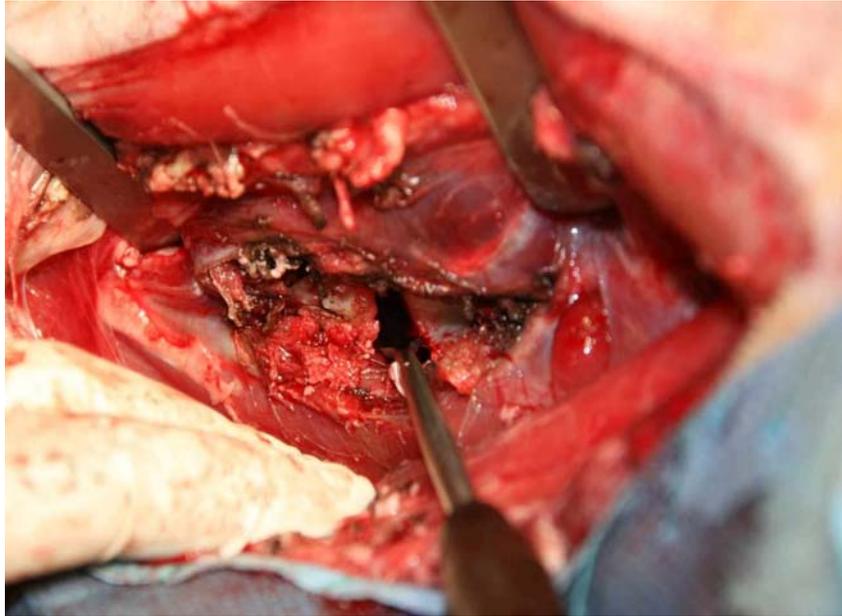


Abb. 17 Aufspannen des Wirbelspalts

Nun wurde der Wirbelspalt mit einem Raspatorium aufgespannt und das Bandscheibenmaterial unter Anwendung einer Hohl- Meißel- Zange nach Luer – Friedmann entnommen (Abb. 17, 18).

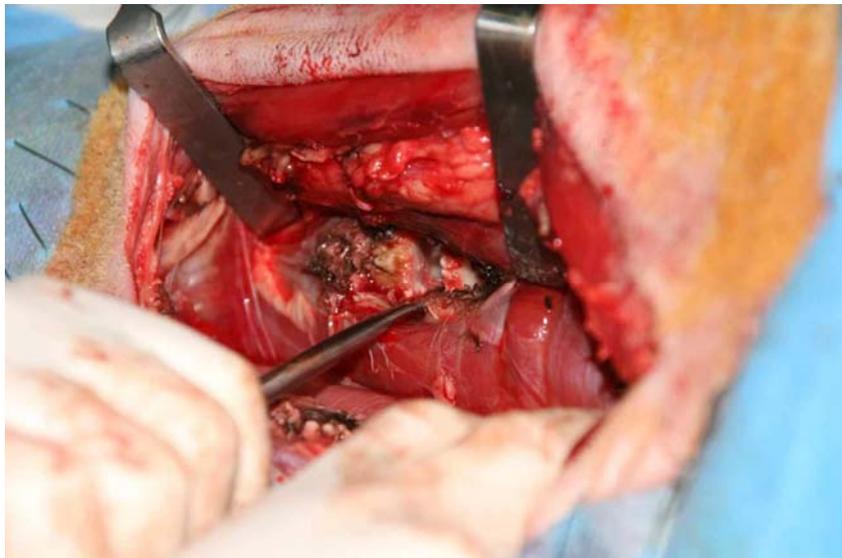


Abb. 18 Diskektomie

Zur vollständigen Entleerung des Bandscheibenraumes von Restbestandteilen der Zwischenwirbelscheibe sowie zum Anfrischen von Grund- und Deckplatte (Extremitas caudalis v. C3, Extremitas cranialis v. C4) wurde ein scharfer Löffel verwendet (Abb. 19, 20).



Abb. 19 Auffrischen von Grund- und Deckplatte, Reinigung des Intervertebralspalts

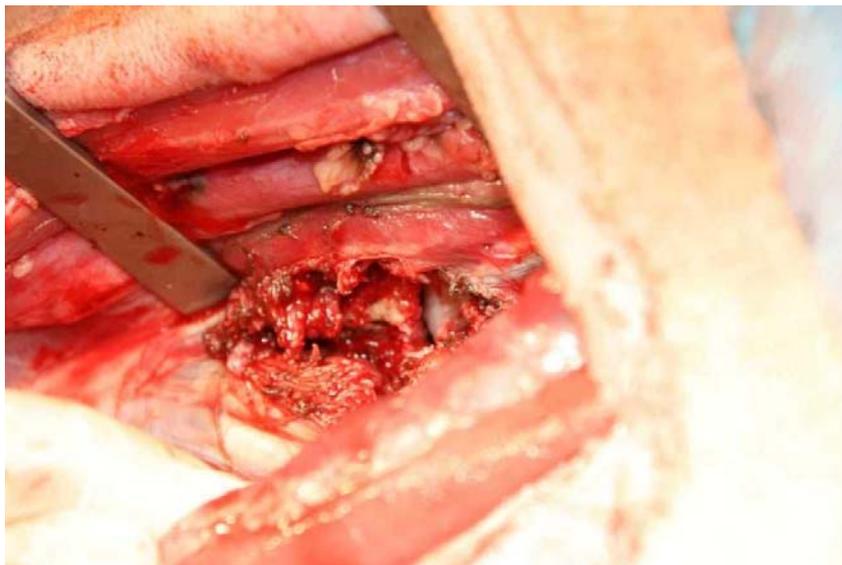


Abb. 20 Darstellung des diskektomierten Bandscheibenraums

Während dieser Arbeiten erfolgte, zum Aufquellen des Bandscheibenmaterials sowie der Reinigung des Bandscheibenraums, das wiederholte Spülen mit NaCl- Lösung. Die Spülflüssigkeit wurde mit einem, über einen Verbindungsschlauch an den Absauger angeschlossenen, OP- Sauger entfernt. Nach Auffrischen und Reinigen des Bandscheibenraumes wurde der befüllte Cage mit Hilfe eines Implantatgreifers und einem Hammer eingebracht (Abb. 21).



Abb. 21 Einbringen des Cage

Zur korrekten Lagerung des SynCage-C erfolgte die Kontrolle mittels Bildverstärker. Vor den Cage wurde der verbliebene Anteil des zuvor angesetzten Materials in den Bandscheibenraum eingebracht (Abb. 22, 23).

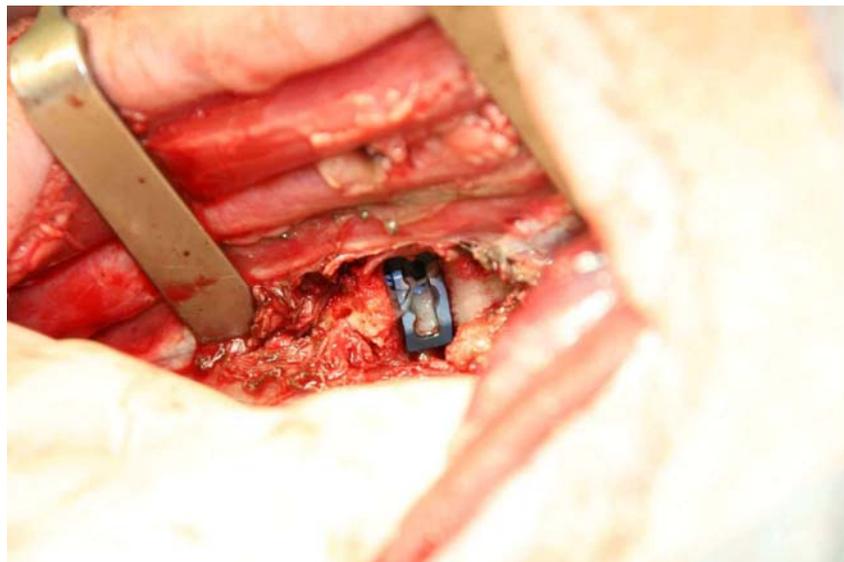


Abb. 22 Implantierter SynCage-C im Bandscheibenfach C3 / C4



Abb. 23 Vor den Cage eingebrachtes Füllmaterial

Der Verschluss des OP- Feldes erfolgte in vier Schichten.  
Zunächst wurde der gesplattene M. longus colli mit einer Sultan`schen Diagonalnaht unter Verwendung von Vicryl® Plus 1, Ethicon coated zusammengefügt (Abb. 24).

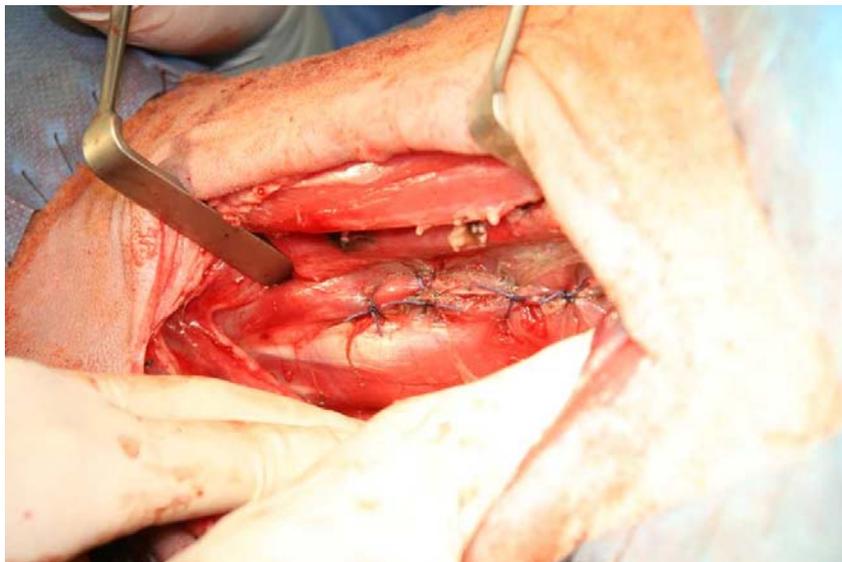


Abb. 24 Sultan`sche Diagonalnaht zum Verschluss des M. longus colli

Der Verschluss der Halsmuskulatur erfolgte mit einer Kirschnernaht bei Verwendung von Vicryl® Plus 2-0, Ethicon coated. Anschließend wurde die Naht der Subkutis mit Donatiheften unter Verwendung von Vicryl® Plus 3-0, Ethicon coated durchgeführt.

Zur abschließend erfolgenden Hautnaht wurden U- Hefte mit Prolene® 3-0, Ethicon coated gesetzt. Nach Entfernung der Operationstücher und dem Aufbringen von Sprühpflaster, im Bereich der Hautnaht, wurde an der linken Vordergliedmaße ein transdermales, analgetisches Pflaster aufgeklebt. Vor Beginn der Narkoseausleitung erfolgte die Anfertigung einer Röntgenaufnahme der Halswirbelsäule im laterolateralen Strahlengang zur Bestimmung der postoperativen Bandscheibenraumhöhe.

Die Schafe wurden anschließend in ihren Stall verbracht und nach dortiger Extubation erfolgte die Aufwachphase unter tierärztlicher Überwachung.

Direkt nach dem Erwachen aus der Narkose stand den Tieren Rauhfutter und Wasser ad libitum zur Verfügung. Die Bewegungsfreiheit war nicht eingeschränkt.

Täglich wurden die Operationswunde sowie der Gesundheits- und Allgemeinzustand des Tieres kontrolliert. Zehn Tage nach der Operation wurden die Hautfäden und das analgetische Durogesic® - Pflaster entfernt und die Tiere anschließend zum Weidegang überführt.

### **3.5. Probenentnahme und Aufbereitung der Halswirbelsäule**

#### **Euthanasie und Entnahme des Halswirbelsegmentes**

Nach Ablauf der Standzeit, von 12 Wochen post operationem, erfolgte die Euthanasie der Tiere. Über einen venösen Zugang in der V. cephalica wurden 20 ml Thiopental- Natrium injiziert. Nach Ausbleiben der Atmung wurden 40 ml Kaliumchlorid intravenös injiziert. Nach auskultatorischer Feststellung des Todes wurde dem in Seitenlage befindlichen Tier die Halswirbelsäule entnommen. Dazu wurde nach Entfernung der Halsweichteile die Wirbelsäule vom Hinterhauptsbein bis zum ersten Brustwirbel durch Präparation mit Skalpell und chirurgischer Pinzette, abgesetzt. Von der entnommenen Halswirbelsäule wurden grob Weichteilreste und Muskulatur entfernt (Abb. 25).



Abb. 25 isolierte Halswirbelsäule

Nach Identifikation des Halswirbelsäulensegmentes C3 / C4 wurden die, für die weitere Untersuchung nicht benötigten, knöchernen Anteile der Wirbelsäule abgesetzt. Dazu wurden mit Skalpell ein cranialer Schnitt zwischen 2. und 3. Halswirbel und ein caudaler zwischen 4. und 5. Halswirbel gesetzt. So konnte das, aus den Wirbelkörpern C3 und C4, bestehende Halswirbelsäulensegment vollständig erhalten werden (Abb. 26).



Abb. 26      Wirbelsäulensegment C3 / C4

Zur Unterbindung der postmortal einsetzenden Veränderungen (Auto- bzw. Heterolyse) wurden die gewonnenen Segmente sofort nach Entnahme für drei Tage in neutraler isotoner Formaldehyd- Alkohol- Lösung fixiert. Diese wurde aus 324 ml 37 % iger Formaldehydlösung, 550 ml absolutem Alkohol, 130 ml 0,1 molarer Barbitol- Natrium- Puffer (pH 7,3) sowie 6 g Glucose hergestellt.

## Sägen

Nach der vorangegangenen Fixation erfolgte das Sägen des Wirbelkörpersegments mit einer wassergekühlten Säge bei craniocaudalem Verlauf durch den Wirbelkörper. Es wurden ein sagittal, sowie je vier parasagittal verlaufende Schnitte unter Gewinnung von acht 4 mm starken Wirbelsäulenpräparaten angefertigt (Abb. 27).

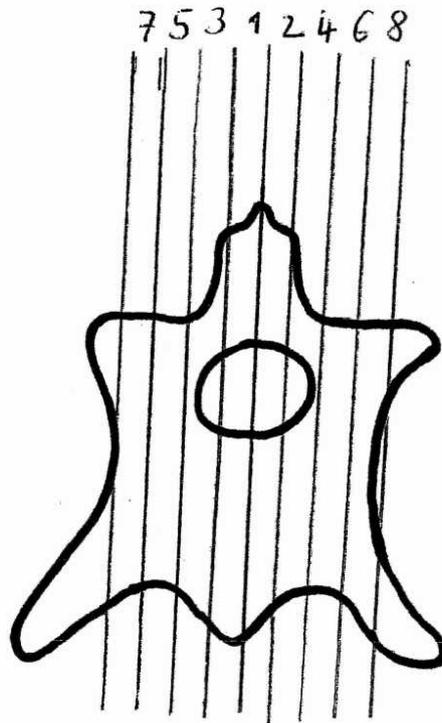


Abb. 27 Sägeschema

### Fixation und Einbetten

Um bei der späteren Auswertung der angefertigten histologischen und immunhistologischen Präparate direkt angrenzende, jeweils medial anliegende Schnittebenen nutzen zu können, wurden die angefertigten Schnitte wie folgt aufgeteilt (Abb. 28).

- Nr. 2, 3, 6 und 7: immunhistologische Präparate
- Nr. 1, 4, 5, und 8: histologische Präparate



Abb. 28 Schnittpräparat

Die Präparate wurden für weitere fünf Tage in Formaldehyd- Alkohol- Lösung fixiert. Nach Erreichen ausreichender Gewebefestigkeit konnten die angeschnittenen Anteile des Titan-Implantats entfernt werden, um die spätere Bearbeitung des Präparats mit einem Hartschnittmikrotom zu ermöglichen. Die zentralen Präparate mit mittigem Cageanschnitt wurden jeweils zur Anfertigung immunhistologischer (Nr. 2, 3) bzw. histologischer (Nr. 1, 4) Präparate weiterbearbeitet. Die übrigen Präparate wurden als Reservepräparate gelagert, während die Restgewebe (laterale Wirbelkörperflächen) verworfen wurden.

### 3.6. Histologie

Die histologischen Präparate wurden in einer aufsteigenden Alkohol- Reihe nach folgendem Schema entfettet.

**Aufsteigende Alkoholreihe**

Dauer in Tagen	Ethanol-Konzentration
7	70%
7	80%
7	80%
7	96%
7	96%
7	100%
7	100%
7	100%

Die Ethanol- Verdünnungen wurden aus absolutem Ethanol und einer entsprechenden Menge destilliertem Wasser hergestellt. Die Lagerung der Präparate erfolgte in luftdicht verschlossenen Gläsern. Diese wurden zur optimalen Infiltration der Präparate mit Ethanol auf einem Horizontalschüttler platziert. Durch dessen Schwingungen erfolgte die stetige Durchmischung und Benetzung mit Alkohol.

Im Anschluss wurden die Präparate für vier Stunden in 100 % iges Xylol verbracht. Dies dient als Intermedium zur Entfettung und Dehydrierung von bestehenden Alkoholresiduen und somit zur optimalen Vorbereitung der nachfolgenden Kunststoffeinbettung.

Das Einbettmedium für die angewendete Hartschnittechnik ist ein Polymerisationsgemisch auf der Basis von Methylmethacrylat (Technovit® 9100 NEU). Dieses wurde aus den drei Komponenten Basislösung (Methylmethacrylat), Weichmacher und Aktivator hergestellt.

Die Verwendung von diesem Kunststoff ermöglichte die Anfertigung histologischer Schnitte mit einer Stärke von 6 µm.

Die chemische Polymerisation von Technovit 9100 NEU erfolgt unter Sauerstoffausschluss, mit Hilfe eines Katalysatorsystems aus Peroxid und Amin. Die zusätzlichen Komponenten PMMA - Pulver und Regler ermöglichen bei Temperaturen von -2 bis -20 ° C die gesteuerte Polymerisation bei vollständiger Ableitung der entstehenden Wärme.

Im Anschluss an eine vierstündige Bedeckung der Präparate mit Xylol wurden diese für drei Tage in mit Präinfiltrationslösung befüllten Gläsern bei Raumtemperatur auf dem Schüttler gelagert. Diese Lösung besteht aus den Komponenten entstabilisierte Basislösung Technovit 9100 NEU und Härter 1.

Die Basislösung Technovit 9100 NEU besteht aus Monomer. Dabei handelt es sich um organische Moleküle mit mindestens einer reaktionsfähigen Kohlenstoff- Kohlenstoff-Doppelbindung. Zur Entstabilisierung der Basislösung durchläuft diese eine mit 50 g Aluminiumoxid gefüllte Chromatographiesäule.

Das Härterpulver 1, eine Peroxidverbindung, ist Teil des verwendeten Initiatorsystems und startet gemeinsam mit dem Härter 2 die Polymerisation.

Anschließend wurde die Präinfiltrationslösung für sieben Tage gegen Infiltrationslösung, bestehend aus Technovit, PMMA- Pulver und Härter 1 ausgetauscht. Die Präparate wurden nun zur vollständigen Durchtränkung mit dem Kunststoff bei 2 – 8 ° C im Kühlschrank gelagert. Direkt vor Gebrauch wurden Stammlösung A (Technovit, PMMA - Pulver, Härter) und B (Basislösung, Polymerisationsregler) hergestellt und im Volumenverhältnis neun zu eins zur Herstellung des Einbettmediums vermischt. Da die Aushärtung der Lösungen sofort nach deren Mischung einsetzt, erfolgte das sofortige Verbringen der Präparate in die Einbettformen und deren vollständige Auffüllung mit dem Polymerisationsgemisch. Durch mehrmaliges Anheben der Präparate mit einer Pinzette vom Boden der Einbettformen wurden etwaige Luftblasen im Kunststoff eliminiert. Anschließend erfolgte die Lagerung der

verschlossenen Formen in einem Eisbett, um die für die Aushärtung erforderliche Temperatur von 0 ° C trotz der entstehenden Wärmeentwicklung zu gewährleisten. Nach 24 Stunden war der Prozess der Polymerisation abgeschlossen und die in Kunststoff eingebetteten Präparate konnten aus den Formen entnommen werden. Bei Bedarf wurden die Plastikpräparate mit Technovit 3040 aufgebockt.

### **3.6.1. Anfertigung histologischer Präparate**

Die in Kunststoff eingebetteten Präparate wurden zunächst mit einem Polier- und Schleifsystem bei 1200 Umdrehungen unter Verwendung von grobem Schleifpapier angeschliffen, um für das anschließende Einspannen im Mikrotom optimalen Halt zu erreichen. Mit einem Leica- SM- 2500S- Mikrotom, ausgerüstet mit einem Hartmetallmesser (Messerwinkel 40°), wurden 6 µm starke, longitudinale Serien- Schnitte in der Sagittalebene der Präparate angefertigt. Die Anfeuchtung der Präparate erfolgte mit Schneidflüssigkeit (200 ml Aqua destillata; 1 ml Triton X 100). Die Präparate wurden auf einen mit 70 % igem Ethanol benetzten Glasobjektträger aufgezogen. Anschließend erfolgte zur Entfaltung und Glättung deren Benetzung mit einer Strecklösung, bestehend aus sieben Teilen 70 % igem Alkohol und drei Teilen 2- Butoxyethyl- Acetat. Im Anschluss wurden sie nach dem Bedecken mit einer Folie aus Kunststoff (Kisol- Folie) für 48 Stunden in einer Presse im Brutschrank bei 50 ° C gepresst und getrocknet.

### **3.6.2. Histologische Färbungen**

Zunächst erfolgte das Entplasten der Schnitte. Durch das Lösen des Kunststoffs aus dem Gewebe wurde dieses zugänglich für die Aufnahme des Farbstoffs. Hierzu wurden die Objektträger dreimal für 30 Minuten in 2- Methoxyethylacetat verbracht und anschließend mittels einer absteigenden Alkoholreihe rehydriert.

#### **Trichromfärbung nach Masson und Goldner**

In der histologischen Färbung nach einem standardisierten Protokoll von Masson und Goldner (1938) färben sich die Zellkerne bräunlich- schwarz an, das Zytoplasma hebt sich ziegelrot hervor. Die kernlosen Erythrozyten unterscheiden sich von den kernhaltigen Zellen in ihrer orangen bis gelben Farbe. Bindegewebe und saure Mukosubstanzen stellen sich grün dar. Die unverkalkten Osteoidsäume werden rot gefärbt. Diese Färbung dient dem Nachweis von kollagenem Bindegewebe. Im vorliegenden Versuch wurde die Trichromfärbung nach Masson- Goldner als Übersichtsfärbung genutzt. Des Weiteren diente sie dem histomorphologischen Nachweis von Entzündungszellen, so zum Beispiel von Fremdkörperriesenzellen (Färbeprotokoll siehe Anhang).

#### **Kombinierte von Kossa / Safranin - O - Färbung**

Die kombinierte Färbung nach von Kossa / Safranin- Orange dient als Kalk- und Knorpelnachweis. Mineralisiertes Knorpel- und Knochengewebe stellen sich schwarz dar, während sich Mineralisationsfronten schwarz granuliert hervorheben.

Hyaliner Knorpel ist intensiv rot angefärbt und Knochen stellt sich blass rot dar.

Diese Färbung wurde für die histomorphometrische Analyse von Knochen und Bindegewebe, einschließlich der Evaluation des Fusionsscores nach Toth *et al.* verwendet (Toth *et al.*, 2002; Färbeprotokoll siehe Anhang).

### **Movat`s Pentachrom- Färbung**

Die Färbung nach Movat`s Pentachrom eignet sich unter anderem zur Anfärbung von Knorpel. Dessen Färbung varriert je nach Mineralisation und Fixierung von blau- grün über rötlich bis gelb. Mineralisierter Knochen und Kollagen stellen sich leuchtend gelb dar.

Osteoid zeichnet sich durch eine dunkelrote Färbung aus, während sich elastische Fasern rot und Zytoplasma rötlich darstellen. Zellkerne sind blauschwarz gefärbt, saure Glukosaminoglykane leuchtend hellblau. Eine lichtmikroskopische Kontrolle der Gewebestrukturen ist zwingend erforderlich, um das Färbergebnis zu verifizieren.

Die nach Movat`s Pentachrom gefärbten Präparate wurden für die histomorphometrische Analyse von Knorpel sowie zur histomorphologischen Darstellung von Osteoklasten verwendet (Färbeprotokoll siehe Anhang).

### **Kombinierte Methylgrün / van Gieson- Färbung**

Diese Färbung eignet sich zur Anfärbung von Knorpel, der sich grün darstellt. Knochen bzw. Kalk färbt sich weinrot an. Das als Trägermaterial in den Cage eingebrachte Tricalciumphosphat (TricOs) stellt sich schwarz dar.

Die nach Methylgrün / van Gieson gefärbten Präparate dienen der histomorphometrischen Auswertung noch nachweisbarer TricOs- Anteile.

Durch die eindeutige farbliche Unterscheidung zum Knochen konnten diese Präparate parallel zur Auswertung der Knochenanteile in den nach von Kossa / Saffranin O gefärbten Präparaten herangezogen werden (Färbeprotokoll siehe Anhang).

### **Toluidinblau- Färbung**

In dieser metachromatischen Färbung stellt sich mineralisierte Hartgewebematrix ungefärbt bis blassblau dar. Zellen und Weichteilgewebe werden metachromatisch bis rotviolett gefärbt. Knochenmatrix, Mastzellengranula und Knorpelmatrix sind ebenfalls metachromatisch bis rotviolett gefärbt. Verkalkte Knorpelmatrix stellt sich dunkelblau dar (Schraven, 2006).

Bei der Leercagegruppe erfolgte die Toluidinblau- Färbung zum Nachweis von neugebildetem Knochen (Färbeprotokoll siehe Anhang).

### **Eindeckeln der Schnitte**

Nach der histologischen Färbung wurden die Präparate zweimal für 5 Minuten in 100 % igem Xylol gelagert und anschließend unter Verwendung von auf Deckgläschen aufgebrachtem Vitroclud® (Einschlussmittel für mikroskopische Technik) eingedeckelt.

### 3.7. Immunhistologie

Zur Herstellung immunhistologischer Präparate wurden diese über acht Wochen in EDTA – Lösung entkalkt. Die Lösung wurde wöchentlich gewechselt. Im Anschluss wurden diese für 71 Stunden in einen Entwässerungsautomaten verbracht.

**Entwässerungsautomat**

Programm 3	
Medium	Verbleib in Stunden (h)
70 %iger Alkohol	8
80 %iger Alkohol	4
80 %iger Alkohol	4
96 %iger Alkohol	8
96 %iger Alkohol	10
100 %iger Alkohol	10
100 %iger Alkohol	10
100 %iger Alkohol	10
Xylol	1
Xylol	1,5
Paraffin	2,5
Paraffin	2
Summe	71

Nach Durchlaufen des Programms erfolgte die Einbettung der Präparate in flüssigem Paraffin. Es handelt sich dabei um ein Einbettmedium für Gewebe in Pelletform, dessen Schmelzpunkt bei 56 ° C liegt.

Die dafür vorgesehenen Einbettformen aus Metall wurden kurz zuvor auf eine auf –12 ° C temperierte Kälteplatte verbracht und mit dem flüssigen Paraffin aus dem auf 62 ° C temperierten Heiztank befüllt. Sofort im Anschluss wurden die Präparate mit der ausgewählten Sägeebene (medial oder lateral) in die Form mit dem noch flüssigen Paraffin verbracht. Nach deren vollständiger Aushärtung wurden die Blöcke in ein Paraffinmikrotom eingespannt. Eine häufig wiederholte Kühlung der Blöcke auf Eis stellte deren Schneidbarkeit sicher. Bei einem Messerwinkel von 0° wurden unter Nutzung der Microtom Klingen Typ N35H 4 µm dicke Längsschnitte in der Sagittalebene der Präparate abgenommen. Diese wurden zunächst in eine mit destilliertem Wasser gefüllte Schale verbracht. Nach Überführung in ein als Strecklösung dienendes Heizbad wurden die Schnitte auf Objektträger aufgezogen und bei 32 ° C in einem Brutschrank über mind. 48 h getrocknet. Als Positivkontrolle der α – SMA - Färbung wurde ein ca. 0,5 cm langes Stück Dünndarm vom Schaf nach Fixierung und Entwässerung in Paraffin eingebettet. Die Anfertigung 4 µm dicker Querschnitte erfolgte bei einem Messerwinkel von 4° unter Nutzung von Microtom Klingen Typ S 22.

### **3.7.1. Immunhistologische Färbungen**

#### **$\alpha$ -SMA ( $\alpha$ -smooth muscle actin) - Färbung**

Es handelt sich dabei um eine Immunfärbung nach dem ABC- System, die der Gefäßdarstellung dient. Es soll die Vaskularisierung vor allem im Bereich der Endplatte und des Bandscheibenfaches ausgewertet werden (Färbeprotokoll siehe Anhang).

### **3.7.2. Enzymatische Färbung**

#### **TRAP (tartrate resistant acid phosphatase) - Färbung**

Bei der tartratresistenten sauren Phosphatase handelt es sich um ein Enzym, das von ausgereiften Osteoklasten gebildet wird. In der TRAP- Färbung stellt es sich rotbraun dar und ermöglicht so den Nachweis aktivierter Osteoklasten. Das Enzym wird dabei indirekt nachgewiesen, indem es von einer phosphatierten Naphtholverbindung Phosphat abspaltet. Das freie Naphthol bindet sich an ein Diazoniumsalz bei Bildung eines rotbraunen Farbstoffs (Färbeprotokoll siehe Anhang).

#### **Eindeckeln der Schnitte**

Das Eindeckeln erfolgte analog der histologischen Präparate.

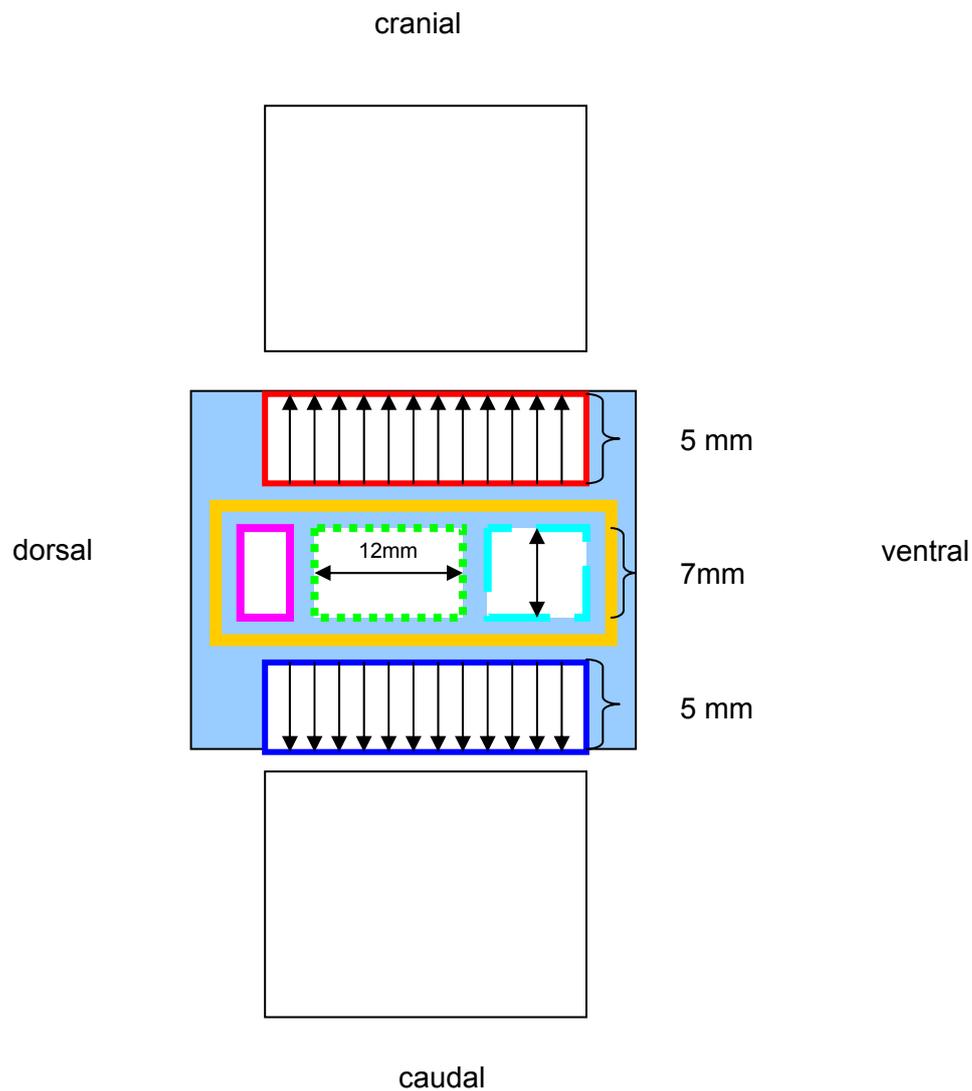
## **3.8. Auswertung der Schnittpräparate**

### **3.8.1. Deskriptive Analyse der histologischen Präparate**

Es wurden bei der Auswertung der angefertigten histologischen und immunhistologischen Präparate direkt angrenzende, jeweils medial anliegende Schnittebenen genutzt.

Die Auswertung der einzelnen, zu untersuchenden Parameter erfolgte mit einem Lichtmikroskop der Firma Leica bei 100- 200 facher Vergrößerung.

Um die Vergleichbarkeit der bei verschiedenen Präparaten ausgewerteten Regionen zu gewährleisten wurden die auch in der quantitativen Histomorphometrie ausgewerteten Gebiete von Interesse (regions of interest / ROI) mit einem feinzeichnenden, wasserfestem Stift (edding 140 S, ohp marker permanent) auf dem zu untersuchenden Objektträger mit folgenden Maßen markiert (Abb. 29).



**Legende:**

- 1. ROI: Bandscheibenraum
- - - 2. ROI: Umfahrung des Cageinhaltes (7 mm Höhe x 12 mm Breite)
- 3. ROI: dorsale Cagebegrenzung
- - - 4. ROI: ventrale Cagebegrenzung
- 5. ROI: craniale Cagebegrenzung à 20 Punkten mit 5 mm Abstand nach cranial
- 6. ROI: caudale Cagebegrenzung à 20 Punkten mit 5 mm Abstand nach caudal
- 7. ROI: Summe der 5Teil-ROIs= CROI + VrROI+ DsROI + CrROI + CdROI

Abb. 29 Schema der regions of interest (ROI's)

### 3.8.2. Histologische Auswertung

Auf eine Digitalisierung der Präparate wurde aufgrund deren Größe verzichtet.

Um die erforderliche Vergrößerung durch das Axio Vision Programm zu ermöglichen, wäre die Aufnahme mehrerer Teilpräparate nötig gewesen. Dies hätte jedoch die Fehlerrate zusätzlich erhöht. Um die Fehlerquelle bei manueller Zählung zu minimieren, wurden Blutgefäße und Osteoklasten dreimal gezählt. Die ermittelten Werte gingen wie nachfolgend beschrieben nicht als Absolutzahlen in die Auswertung ein.

Pro untersuchter Gruppe wurden für die histologische Auswertung je acht Präparate in den Färbungen Masson– Goldner- Trichrom, von Kossa / Saffranin- Orange, Methylgrün / van Gieson und Movat`s Pentachrom untersucht. Dies erfolgt zur deskriptiven Beschreibung der Zellstrukturen der bestehenden Gewebearten Knochen, mineralisierter Knochen, Knorpel, TricOs und Bindegewebe. Folgende Definitionen wurden zur Auswertung der Kortikalisbeteiligung (Tab. 8), der Ausprägung der ventralen Kallusbildung (Tab. 9) in der ventralen ROI sowie des Auftretens von Entzündungsreaktionen (Tab. 10) in den fünf untersuchten ROI`s angewendet.

Tab. 8 Kortikalisbeteiligung an der Kallusbildung

Ausprägung	Definition
viel	Kallusgewebe ausgehend von C3 u. C4, deutl. Spangenbildung
mittel	Kallusgewebe ausgehend von C3 u. / od. C4
wenig	Kallusgewebe ausgehend von C3 od. C4
keine	Keine Kallusbildung ausgehend von C3 u. C4

Tab. 9 Ventrale Kallusbildung

Ausprägung	Definition
stark	fast komplette Überbrückung von C3/C4 mit Geflechtknochen
	ventral des Cage/TricOs-Granulats starke Spangenbildung
	schmaler Spalt gefüllt mit Bindegewebe u./od. TricOs-Granulat
mittel	größerer verbliebener Spalt, geringere Bildung v. Geflechtkochen
gering	wenig Bildung von Geflechtknochen ausgehend von C3/C4
	großer Spalt, angefüllt mit lockerem Bindegewebe u. TricOs-Granulat

Tab. 10 Einteilung der Entzündungsreaktionen

Ausprägung	Definition
leicht	vermehrter Nachweis v. Entzündungszellen, Gefäßen
schwer	vermehrter Nachweis von Entzündungszellen, Gefäßen, Riesenzellen

In der Leercagegruppe wurden zur Differenzierung des neu gebildeten Knochens zusätzlich acht mit Toluidinblau gefärbte Präparate ausgewertet.

### **3.8.3. Histomorphometrische Auswertung der Präparate**

Mit einem computergestützten Auswertungssystem erfolgte die quantitative Beurteilung der histologischen Knochenschnitte. Dies ermöglichte innerhalb der Präparate die Flächenberechnung, der vorher festgelegten Gewebearten Knochen, mineralisierter Knochen, Knorpel, TricOs und Bindegewebe. Diese Werte ermöglichen den direkten Vergleich der untersuchten Gruppen, u. a. bezüglich der angestrebten knöchernen Durchbauung des Intervertebralraumes.

Das angewendete Bildanalyzesystem besteht aus einer Morphometrie- Software, einem Personalcomputer und einem Bildschirm. Zur histomorphometrischen Auswertung erfolgte das Einspannen des Objektträgers mit dem auszuwertenden Präparat an einem Mikroskop der Firma Leica. Nach optimaler Einstellung des Präparates bei 125 bzw. 160 facher Vergrößerung (1,25x, 1,6x Objektiv) erfolgte das Einscannen des auszuwertenden Präparates mit der Carl Zeiss Kamera unter Anwendung des Programms Axio Vision Version 4.6.3.0. Zur anschließenden Flächenberechnung wurde dem Bild des eingescannten Präparats ein entsprechender Maßstabsbalken eingefügt.

Unter Anwendung des Programms AdobePhotoshop CS Version 8.0.1 erfolgte die Kompression der Bildgröße auf 2500 Pixel sowie die Ausrichtung der Präparate, wobei der craniale Abschnitt nach oben, der caudale nach unten gerichtet wurde.

Die dorsale bzw. ventrale Ausrichtung der Präparate konnten vom Anwender makroskopisch nachvollzogen werden.

#### **Erstellung der Region of interest (ROI)**

Die histomorphometrische Auswertung erfolgte mit dem Bildverarbeitungssystem KS 400 3.0 (1997<sup>®</sup>, Carl Zeiss Vision GmbH) mit dem eigens für die versuchsspezifischen Anforderungen erstellten Makro (Programmautor: Mario Thiele, Julius- Wolf- Institut, Charité Berlin, Campus Virchow- Klinikum).

#### **Arbeitsschritte des Makros**

##### **1. Kalibration**

Zunächst erfolgte die Kalibrierung des Präparates anhand des Maßstabsbalkens als Bezugsgröße. Dies diente zur Festlegung der vorliegenden Größen und Einheiten auf das zu analysierende Präparat. Somit wurde die Vergleichbarkeit der ausgewerteten Präparate ermöglicht. Vom Anwender wurde dazu anhand des eingestellten Maßstabsbalkens eine Strecke festgelegt und die passende Maßeinheit, hier Millimeter (mm), angegeben.

Über die Anzahl der Pixel in dieser Strecke definiert das Programm nun in X und Y Richtung die Größe für das Bild.

##### **2. IdWd (intervertebral disc width)**

Die Breite der Bandscheibe wurde vom Anwender durch Setzen eines über die gesamte Breite des Bandscheibenraumes reichenden Vektors in mm berechnet.

Es folgt die Einteilung der Gewebefläche in die fünf folgenden Regions of interest (ROI`s).

### 3. TtROIAr: kompl. Arbeitsfläche, abzgl. Leerfläche = (ldWd x 35 mm) – Leerfläche

Es handelt sich dabei um den Teil der Präparatfläche in dem alle weiteren Berechnungen durchgeführt werden. Die Berechnung erfolgt halbautomatisch (Abb. 30).

Die Y- Achse der Tt- ROI wurde auf 35 mm festgelegt. Dadurch wurde gewährleistet, dass alle Berechnungen innerhalb der vorbestimmten Fläche mit mindestens einer in allen Präparaten identischen Bezugsgröße durchgeführt wurden.

Diese definierte Höhe schließt in allen Präparaten die wichtigsten Stellen um die Bandscheibe mit ein und lässt weiteren Spielraum nach Oben und Unten. Somit konnten weitere Aussagen, z.B. über die Knochendichte, getroffen werden. Die X- Achse der ROI wird durch die Breite „ldWd“ bestimmt, die vor der Erstellung der ROI gesetzt und gesondert von den anderen Messungen berechnet wurde.

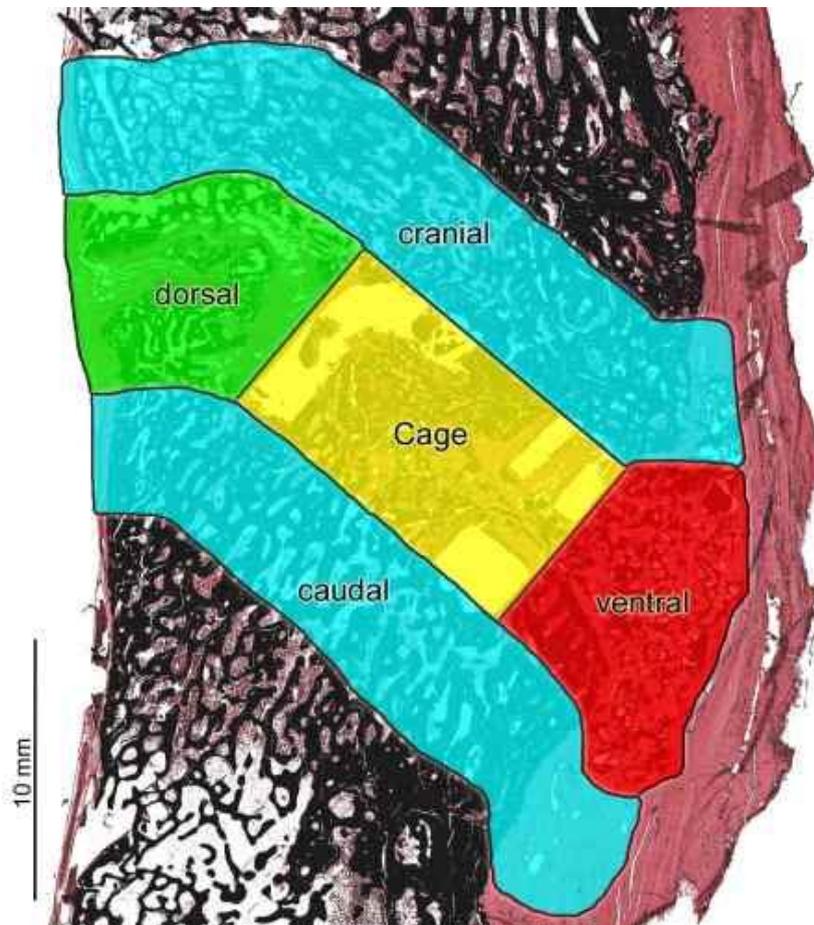


Abb. 30 TtROI

#### 4. CROIAr: totale Cagefläche, abzgl. Leerfläche = (7 mm x 12 mm) – Leerfläche

Die Cage- ROI wurde komplett automatisch berechnet, wobei der Standort der CROI durch Setzen des Implantat- Mittelpunktes vom Anwender selbst bestimmt wurde.

Das Programm errechnet ausgehend von diesem gesetzten Pixel auf der X- Achse in beide Richtungen 6 mm und in der Y- Achse 3,5 mm. Anschließend werden die Strecken vom Programm automatisch zu einem Raum verbunden. Die Maße sind dem Querschnitt der originalen Größe des Cages nachempfunden. Aus den Kantenlängen der X- Achse von 12 mm und Y- Achse von 7 mm errechnet sich somit die Fläche von 84 mm<sup>2</sup> (Abb. 31)

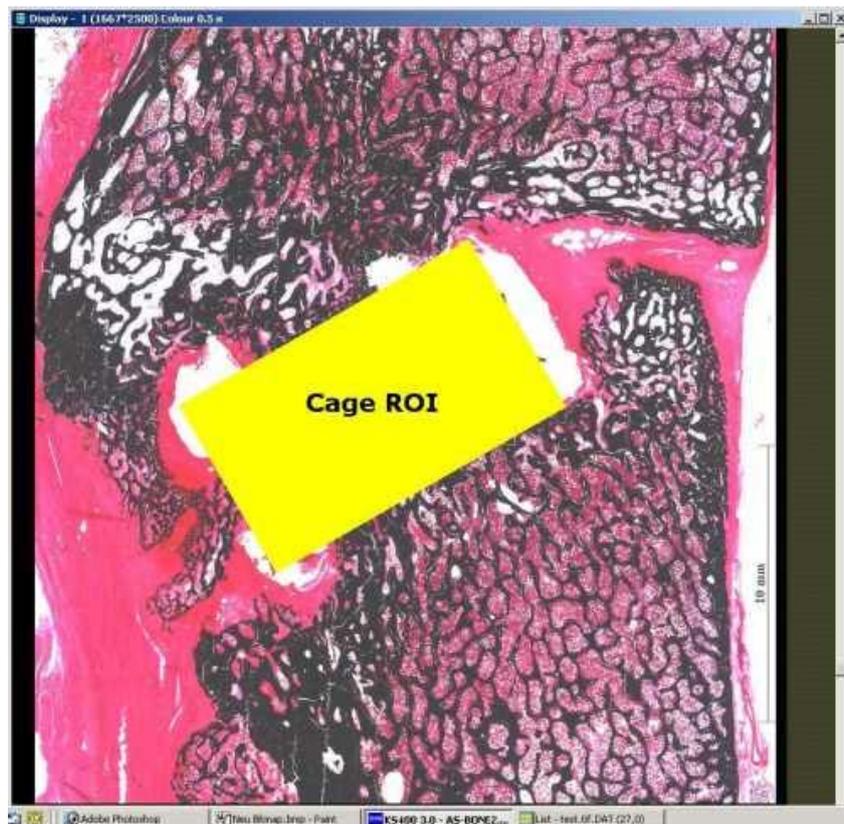


Abb. 31 Cage- ROI

## 5. CVdROIAr: komplette Leerfläche innerhalb der Cage- ROI

Die im Präparat enthaltenen Leerflächen stellten sich weiß dar und wurden als die zu berechnende Fläche definiert (Abb. 32). Alle weißgefärbten Areale werden nun vom Bildanalysesystem grün markiert. In Form einer binären Maske wird ein Abbild der detektierten Farbanteile erstellt. Nicht optimal angefärbtes Gewebe wurde vom Programm als Leerfläche registriert. Um dieses nicht fälschlich in die Rechnung mit einzubeziehen, wurde nachträglich manuell die grüne Markierung entfernt. Aus den markierten Einzelflächen addiert das Programm die Gesamt leerfläche der Cage- ROI.



Abb. 32 Leerflächen

## 6. CrROIAr: komplette craniale ROI, abzgl. Leerfläche

Die Berechnung der cranialen ROI erfolgte halbautomatisch. Hierfür setzt der Anwender 20 Bildpunkte entlang der Bandscheibe nach cranial, direkt cranial der CROI, der DsROI und der VrROI. Das Programm setzt nun 5 mm weiter in Richtung cranial unter jedem der 20 Punkte einen weiteren Punkt, so dass mit insgesamt 40 Punkten die Fläche berechnet werden konnte. Dazu verbindet das Programm die äußeren Punkte miteinander und erhält so eine feste Fläche, die sich zwar der Bandscheibe anpasst, aber trotzdem eine Höhe von 5 mm hat.

## 7. CdROIAr: komplette caudale ROI, abzgl. Leerfläche

Die caudale ROI wurde nach demselben Prinzip wie die craniale erstellt.

## **8. VrROIAr: komplette ventrale ROI, abzgl. Leerfläche**

Zur Erstellung der Fläche, der ventralen ROI wurde diese manuell mit einem Formwerkzeug umzeichnet. Es handelt sich dabei um den Ausschnitt, der die ventral an die Cage ROI angrenzende Fläche wiedergibt. Da es sich bei der ventralen ROI um eine optische Einschätzung des Anwenders handelt, kann die Fläche bei jeder Erstellung variieren.

## **9. DsROIAr: komplette dorsale ROI, abzgl. Leerfläche**

Diese wird nach demselben Prinzip wie die VrROI berechnet.

Nach Berechnung der jeweiligen ROI erfolgte die Markierung der entsprechenden Gewebefläche, wobei die Gewebeanteile auf Grund ihrer unterschiedlichen Anfärbbarkeit vom Bildanalyse- Programm detektiert wurden.

Das digitale Bild des jeweiligen Präparates in der von Kossa / Saffranin- O - Färbung wurde für die Berechnung folgender Parameter genutzt:

- TtBAR: komplette Knochenfläche
- CBAR: Knochenfläche innerhalb der CROI
- CdBAR: Knochenfläche innerhalb der CdROI
- CrBAR: Knochenfläche innerhalb der CrROI
- VrBAR: Knochenfläche innerhalb der VrROI
- DsBAR: Knochenfläche innerhalb der DsROI
- TtBMdAr: komplette mineralisierte Knochenfläche
- CBMdAr: mineralisierte Knochenfläche innerhalb der CROI
- CrBMdAr: mineralisierte Knochenfläche innerhalb der CrROI
- CdBMdAr: mineralisierte Knochenfläche innerhalb der CdROI
- VrBMdAr: mineralisierte Knochenfläche innerhalb der VrROI
- DsBMdAr: mineralisierte Knochenfläche innerhalb der DsROI
- TtCoTAr: komplette Bindegewebsfläche
- CCoTAr: Bindegewebsfläche innerhalb der CROI
- CrCoTAr: Bindegewebsfläche innerhalb der CrROI
- CdCoTAr: Bindegewebsfläche innerhalb der CdROI
- VrCoTAr: Bindegewebsfläche innerhalb der VrROI
- DsCoTAr: Bindegewebsfläche innerhalb der DsROI

In der ROI definiert man das sich schwarz darstellende Knochengewebe als die zu berechnende Fläche. Alle schwarz gefärbten Areale wurden nun vom Bildanalyseprogramm grün markiert. In Form einer binären Maske wird ein Abbild der detektierten Farbanteile erstellt. Nicht optimal gefärbtes Gewebe, welches vom Programm nicht als Zielgewebe registriert wird, wurde manuell markiert und dadurch nachträglich in die Rechnung miteinbezogen. Aus den markierten Einzelflächen addiert das Programm die Gesamtknochenfläche der entsprechenden ROI. Das sich rot darstellende Bindegewebe wird ebenfalls nach obigem Schema definiert und vom System berechnet.

In einem weiteren Programmschritt wurden die mineralisierten Knochen- und Bindegewebsanteile des gesamten Präparates manuell umfahren.

Die Differenzierung des in den Cage eingebrachten Tricalciumphosphats (TricOs) wurde durch dessen schwarze Darstellung in der Methylgrün / van Gieson- Färbung ermöglicht.

Der Nachweis von Knorpel erfolgte in der Movat's Pentachrom- Färbung, wobei eine visuelle mikroskopische Kontrolle der Zellmorphologie bei 200 bis 400 facher Vergrößerung zwingend notwendig war.

Entsprechend dem oben beschriebenen Arbeitsablauf zur Bestimmung der Knochen- und Bindegewebsflächen wurden die TricOs- und Knorpel- Anteile berechnet.

Das sich in der von Kossa / Saffranin- O - Färbung rot darstellende Bindegewebe konnte erst durch Subtraktion der quantifizierten Flächen an TricOs und Knorpel als reines Bindegewebe dargestellt werden (Bindegewebe absolut = Bindegewebe undifferenziert – Knorpel - TricOs).

#### 3.8.4. Fusionsscore

Aus den ermittelten Gewebeflächen der Cage- ROI in der von Kossa / Saffranin- O- Färbung wurde die Fusion des Bandscheibenraumes der untersuchten Präparate bestimmt (Abb. 33).



Abb. 33 Fusionsscore

Bei Nutzung des Scores nach Toth et al. wurde von kompletter Fusion (F-1) bei einer knöchernen Überbrückung der Cagepore zwischen den Halswirbelkörpern C3 und C4 zu über 50 % ausgegangen. Die Fusion wurde als partiell (F-2) bei einer knöchernen Überbrückung von unter 50 % gewertet. Eine nicht stattgefundenene Fusion (F-3) besteht bei einer nicht vorhandenen knöchernen Überbrückung (Toth *et al.*, 2002).

### 3.8.5. Gefäßzählung

Die  $\alpha$ -SMA gefärbten Präparate wurden zur manuellen Auszählung der Blutgefäße anhand der festgelegten 5Teil- ROIs (s. Legende zu Abb. 29, S. 48) unter dem Mikroskop bei 100-200 facher Vergrößerung genutzt. Als Gefäß wurden alle Strukturen gewertet die eine positive Farbreaktion (rot) zeigten und bei denen ein von Endothelzellen umgebenes Lumen nachgewiesen werden konnte (Abb. 34). Als Negativ- Kontrolle wurde bei jeder Färbung ein Schnitt mit Puffer anstelle des Primär- Antikörpers inkubiert (Abb. 35).

Zusätzlich diente bei jeder Färbung ein Präparat „Dünndarm- Querschnitt“ vom Schaf als Positivkontrolle (Abb. 36). Es wurde die Gefässdichte, unter Nutzung der zuvor berechneten absoluten Flächen des nichtmineralisierten Knochens von CROI, DsROI, VrROI, CrROI, CdROI und der 5TeilROIs bestimmt.

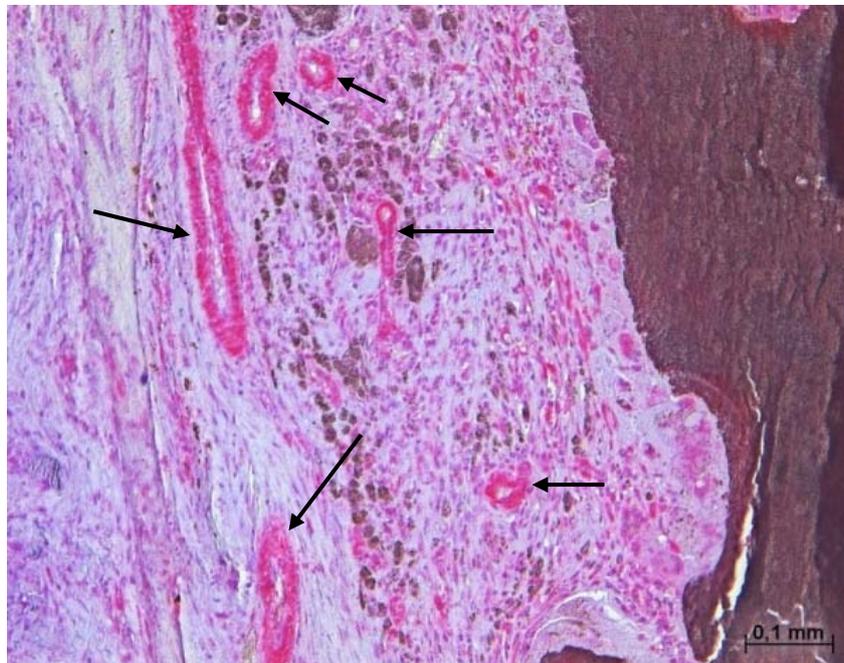


Abb. 34 Gefäße (Pfeile),  $\alpha$ -SMA- Färbung, VrROI, 100fache Vergrößerung, Gr. 10

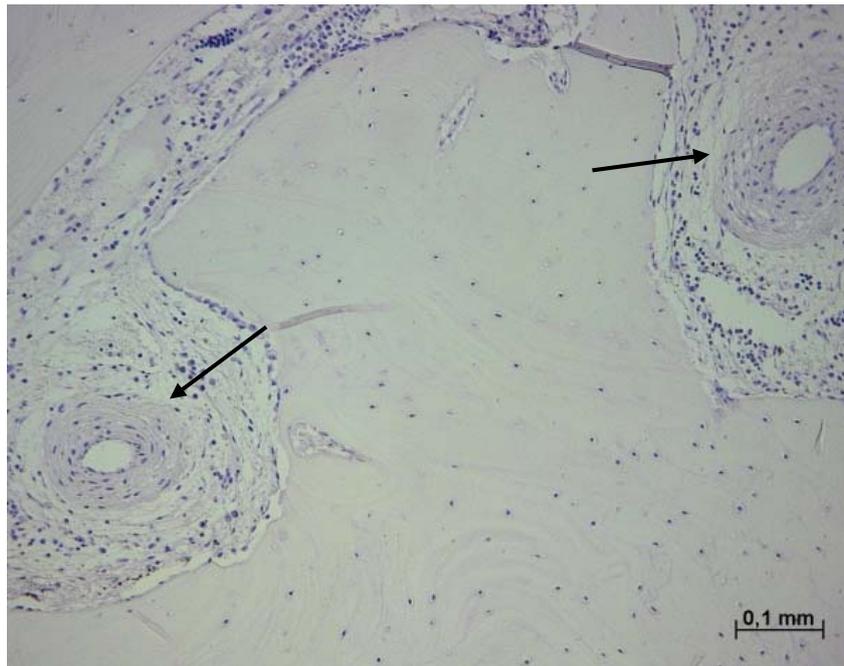


Abb. 35 Gefäße (Pfeile),  $\alpha$ -SMA- Färbung, Negativ- Kontrolle, VrROI, 100fache Vergrößerung, Gr. 15

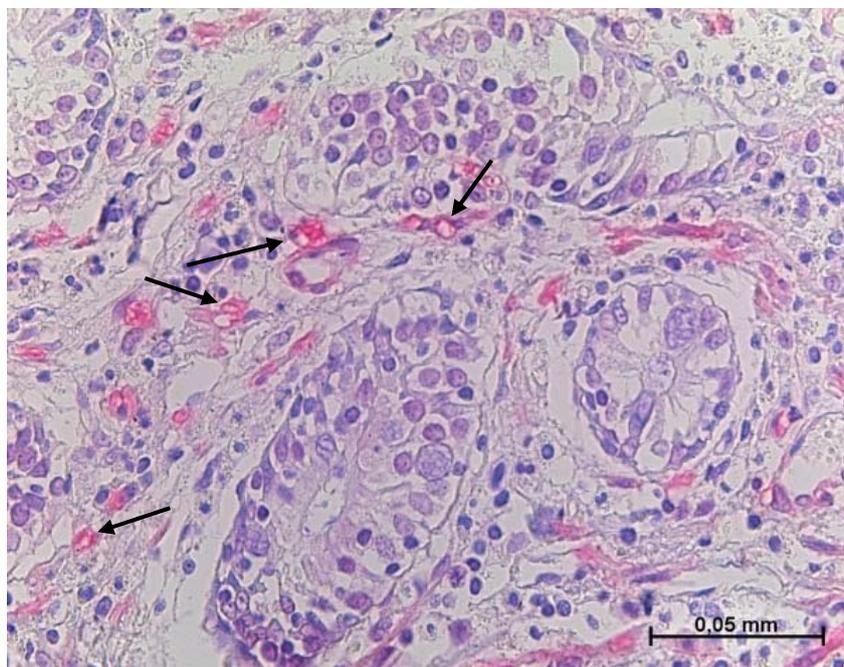


Abb. 36 Gefäße (Pfeile), Dünndarm, Schaf,  $\alpha$ -SMA- Färbung, Positiv- Kontrolle, 400fache Vergrößerung, Gr. 10

### 3.8.6. Bestimmung der osteoklastischen Dichte

Die Auszählung der Osteoklasten erfolgte an den TRAP- gefärbten Präparaten, manuell unter dem Mikroskop bei 200- 400facher Vergrößerung (Abb. 37).

Als Osteoklasten galten alle Zellen, die sich positiv (rosa bis hellbraun gefärbt) durch die Anfärbung des Enzyms saure Phosphatase darstellten und bei denen mehrere Kerne und Vakuolen exprimiert waren. Gewertet wurden weiterhin nur positive Zellen bei Lokalisation im Knochen, am Rand von Blutgefäßen mit Kontakt zu Knochengewebe bzw. angelagert an TricOs- Partikel (Schell *et al.*, 2006). Es wurde die Osteoklastendichte unter Bezug auf die absoluten Flächen an nichtmineralisiertem Knochen und TricOs von CROI, DsROI, VrROI, CrROI, CdROI und der 5TeilROIs bestimmt.

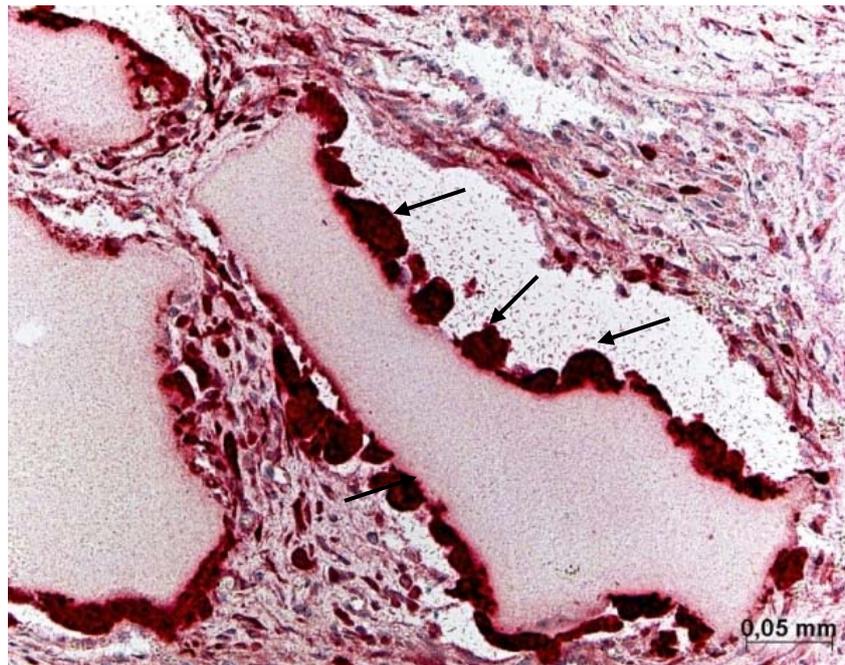


Abb. 37 Osteoklasten (Pfeile), VrROI, TRAP- Färbung, 200fache Vergrößerung, Gr. 15

### 3.9. Statistische Auswertung

Die statistische Analyse erfolgte mit Hilfe des Datenverarbeitungsprogramms SPSS (statistical package for social sciences) Statistics 17.0, SPSS Deutschland GmbH, München Deutschland. Als beschreibende Statistik wurden in tabellarischer Form der Median-, der Minimum- und Maximumwert ( $x_{\min}$ ,  $x_{\max}$ ) sowie der p- Wert angegeben.

Die Ergebnisse der Cage- ROI, dessen Maße von 84 mm<sup>2</sup> sich einheitlich aus den Maßen 7 mm Höhe x 12 mm Breite berechnen, wurden als absolute Werte genutzt.

Die übrigen Flächen, die von Präparat zu Präparat differieren, gehen als prozentuale Anteile in die Auswertung, unter Nutzung nichtparametrischer Verfahren ein.

Die graphische Darstellung der Ergebnisse erfolgte in Form von Boxplots (Abb. 38).

Dabei handelt es sich um eine Fünf- Punkte- Zusammenfassung einer Verteilung, bestehend aus dem Minimumwert ( $x_{\min}$ ), dem 25 %- Perzentil ( $x_{0,25}$ ), dem Median (50 %- Perzentil), dem 75 %- Perzentil ( $x_{0,75}$ ) und dem Maximum- Wert ( $x_{\max}$ ). Diese geben deren Lage und Streuung an. Die konstruierte Box wird vom ersten und dritten Quartil begrenzt (25. Perzentil  $x_{0,25}$  bzw. 75. Perzentil  $x_{0,75}$ ). Aus dem Interquartilsabstand IQR ( $x_{0,75} - x_{0,25}$ ) ergibt sich die Länge der Box. Der Median wird als Linie in der Box und  $x_{\min}$  und  $x_{\max}$  als Linien ("whiskers") außerhalb der Box dargestellt. Die Querstriche, der Whiskers markieren den kleinsten bzw. größten Wert, jedoch ohne Angabe von Ausreißern und Extremwerten.

Ausreißer werden durch einen Kreis dargestellt und umfassen Werte, die zwischen der 1,5 fachen und dreifachen Länge der Box vom 25 % - bzw. 75 % - Perzentilpunkt entfernt liegen. Extremwerte sind mehr als drei Boxenlängen von der Begrenzung des Boxenkörpers entfernt und werden als Stern markiert.

Bei der graphischen Darstellung eines Boxplots können abweichende Mediane dargestellt werden. Es besteht somit die Möglichkeit des Vergleiches von Medianen bzw. von Rängen zweier Gruppen.

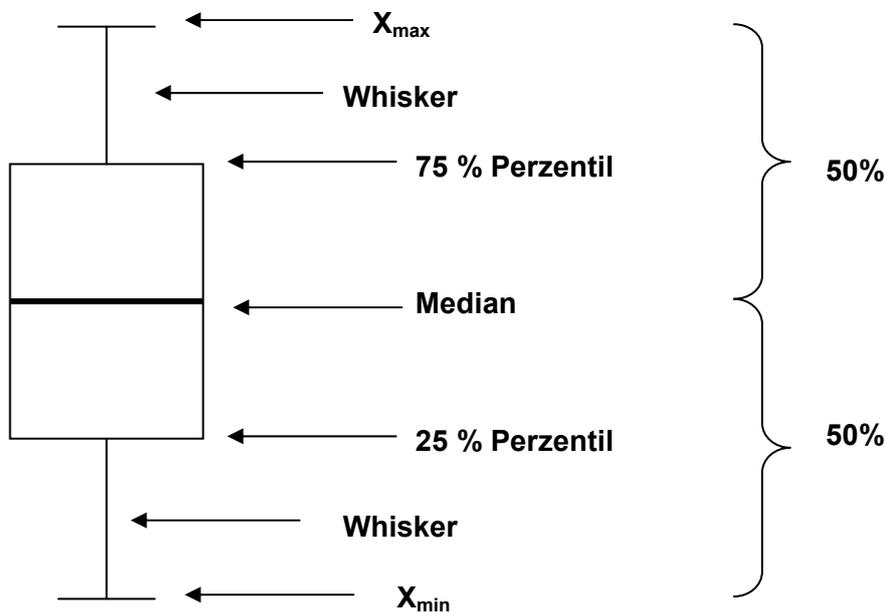


Abb. 38 Boxplot

Es konnte nicht von einer Normalverteilung der betrachteten Parameter ausgegangen werden. Daher erfolgte der Vergleich voneinander unabhängiger Gruppen mit Hilfe folgender nichtparametrischer Tests.

### **3.9.1. H- Test von Kruskal und Wallis**

Mit diesem Test können k unabhängige Stichproben auf bestehende Signifikanzen ( $p \leq 0,05$ ) getestet werden. Es erfolgte der Vergleich aller sechs untersuchten Gruppen gegeneinander.

### **3.9.2. Bonferroni- Korrektur**

Eine Irrtumswahrscheinlichkeit von  $\alpha = 0.05$  pro Einzeltest ist nicht ausreichend, um für die Gruppe aller Tests eine Irrtumswahrscheinlichkeit von  $\alpha = 0,05$  zu garantieren.

Zu deren Festlegung auf  $\alpha = 0.05$ , unabhängig von der Anzahl m durchgeführter Tests, wird die Bonferroni- Korrektur ( $\alpha' = \alpha / m$ ) angewendet.

Hierfür wird zunächst die Anzahl durchzuführender U- Tests (3.9.3) festgelegt.

Unterschreitet mindestens ein Test diese Irrtumswahrscheinlichkeit  $\alpha'$ , so wird die Nullhypothese auf einem  $\alpha$ - Niveau von 0,05 verworfen.

### **3.9.3. Mann- Whytney- Wilcoxon-Test (U- Test)**

Bei diesem Test werden zwei unabhängige Gruppen verglichen.

Nach durchgeführter Bonferroni- Korrektur wurde die zuvor festgelegte Anzahl durchzuführender Tests zweier unabhängiger Gruppen untersucht. Somit kann eine bestehende Signifikanz spezifiziert werden.

### **3.9.4. HMM– Analyse und statistische Auswertung**

Die durch Anwendung des Makros ermittelten Gewebeflächen werden in Form von Boxplots graphisch dargestellt.

Die Untersuchung der zwei Kontroll- und vier Versuchsgruppen erfolgte für die Gewebe Knochen, mineralisierter Knochen, Bindegewebe, Knorpel, TricOs und absolutes Bindegewebe in den fünf Regionen Cage- ROI (CROI), dorsale ROI (DsROI), ventrale ROI (VrROI), craniale ROI (CrROI), caudale ROI (CdROI) und deren Summe (5TeilROIs= CROI + DsROI + VrROI + CrROI + CdROI).

Die jeweils sechs unabhängigen Gruppen wurden unter Anwendung des H- Tests nach Kruskal und Wallis verglichen. Das globale Signifikanzniveau wurde auf  $\alpha = 0,05$  festgelegt.

Bei Vorliegen eines signifikanten Ergebnisses des Kruskal- Wallis- Tests erfolgten Post- hoc- Tests in Form von U- Tests nach Mann und Whitney. Hierzu wurde das globale Signifikanzniveau nach der Bonferroni- Methode korrigiert.

Ist der ermittelte p- Wert kleiner bzw. gleich dem des korrigierten  $\alpha$ - Wert besteht ein signifikanter Unterschied.

## 4. ERGEBNISSE

### 4.1. Ergebnisse in vivo

#### 4.1.1. Allgemeines

Von 48 Tieren erholten sich 44 ohne weitere Komplikationen von dem vorgenommenen Eingriff. Direkt nach Verbringen der Tiere in den Stall erfolgten die ersten Aufstehversuche, wenige Zeit darauf die erste Futteraufnahme bei uneingeschränkter Bewegungsfreiheit.

Bei zwei Tieren bestand am Tag nach der Operation eine einseitige Strecklähmung der Vordergliedmaße. Die betreffende Gliedmaße wurde bis zum Abklingen der Lähmung des Nervus radialis mit Polsterverbänden in fünftägigem Wechsel behandelt. Nach dreimaligem Verbandswechsel waren Gang- und Standbild wieder erfolgreich hergestellt und die Tiere konnten auf die Weide verbracht werden.

Bei zwei Tieren entwickelte sich im Verlauf der Operationswunde ein Hämatom. Dieses wurde täglich mit Ringer- Lösung bis zum Abklingen der Wundexsudation gespült.

Nach zwei bis drei Tagen erfolgte die vollständige Rückbildung ohne weiteren Einfluss auf das Allgemeinbefinden der Tiere zu nehmen.

### 4.2. Ergebnisse ex vivo

#### 4.2.1. Deskriptive Histologie

Für die histologische Auswertung standen pro untersuchter Gruppe je acht Präparate in den Färbungen Trichrom nach Masson und Goldner, von Kossa / Saffranin- O, Methylgrün / van Gieson, Movat's Pentachrom zur Verfügung.

In der Kontrollgruppe 12 (Leercage) wurden zusätzlich acht Präparate zur Differenzierung des neu gebildeten Knochens mit Toluidinblau gefärbt. Das Knochengewebe stellte sich ungefärbt dar. An der Boden- und Deckplatte des dritten und vierten Halswirbels, hier vor allem an den Kontaktflächen zum Cage, stellt sich das Gewebe metachromatisch, rotviolett gefärbt dar. Diese Färbeergebnisse sind sowohl als Nachweis für Knochenmatrix als auch von Mastgranula zu werten (Abb. 39, 40).

Präparationsbedingte Schäden, wie z.B. Präparatrisse waren unvermeidbar, konnten aber eindeutig von pathologischen Veränderungen differenziert werden.

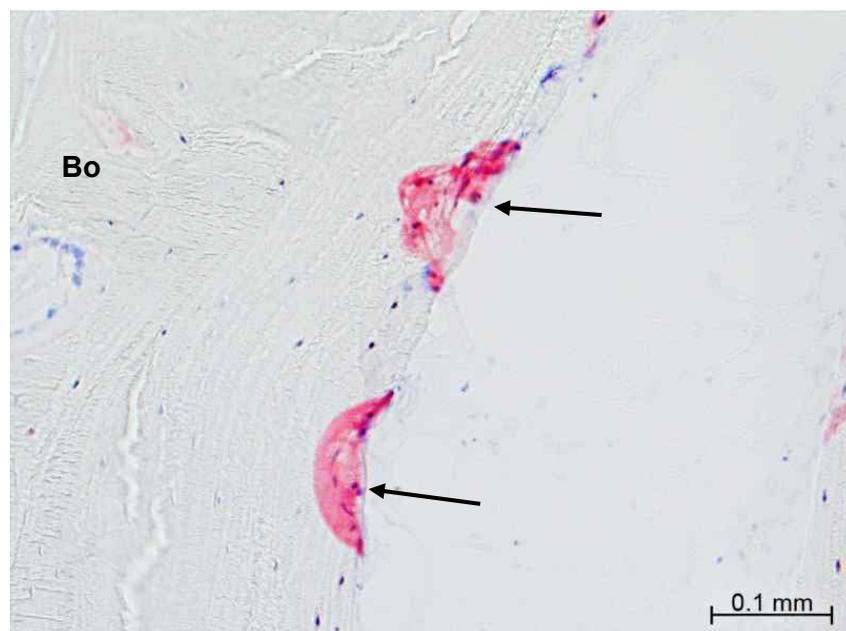


Abb. 39 rot gefärbte Chondroblasten bzw. Mastzellen (Pfeile), min. Knochen (Bo), Toluidinblaufärbung, 200fache Vergrößerung, Gr. 12

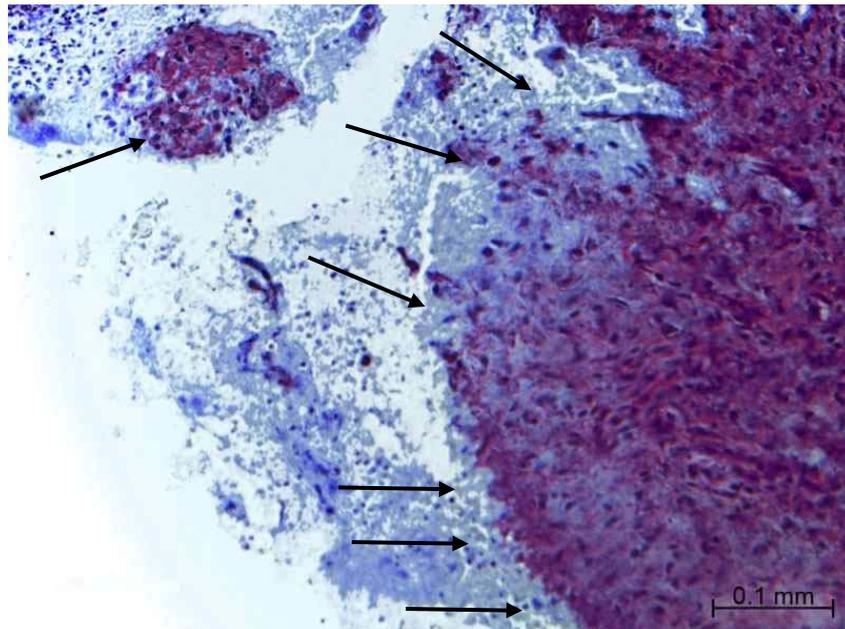


Abb. 40 Neu gebildeter Knochen an Cage (Pfeile), Toluidinblaufärbung, 200fache Vergrößerung, Gr. 12

### 4.3. Deskriptive Histologie

#### 4.3.1. Ventrale region of interest (VrROI)

Die ventrale ROI ist die sich ventral des Cages befindliche Fläche des Bandscheibenraums. Bei deren deskriptiver Beschreibung wurde der von der Kortikalis gebildete Kallus einbezogen. Bei der Leercagegruppe ist in dieser Region überwiegend Geflechtknochen und Bindegewebe ausgeprägt. In allen anderen Gruppen zeichnet sich diese Fläche durch das dominierende Vorkommen von TricOs- Granulat aus.

Eine vollständige ventrale Fusion ist bei keiner Gruppe erfolgt. Bei einem Tier der Kontrollgruppe 3 (SynCage-C, TricOs) besteht eine ventrale Überbrückung des Bandscheibenfachs mit Geflechtknochen und einem schmalen Bindegewebssaum.

Die Kallusbildung erfolgte zu unterschiedlichen Anteilen ausgehend von der Bodenplatte des dritten und der Deckplatte des vierten Halswirbels, wobei eine Unterteilung in die Ausprägungen „viel“, „mittel“, „wenig“ und „keine“ vorgenommen wurde.

Die Gesamtzahlen der ventralen Kortikalisbeteiligung zeigen nur geringe Abweichungen bei 11 Tieren mit mittlerer Ausprägung, je 12 Tieren mit den Ausprägungen viel und keine sowie 13 Tieren mit wenig ausgebildeter Kortikalisbeteiligung (Tab. 11).

Tab. 11 Ventrale Kortikalisbeteiligung

Ausprägung	Kontrollgruppen		Versuchsgruppen				Gesamt
	Gr. 12, Tierzahl n	Gr. 3, Tierzahl n	Gr. 15, Tierzahl n	Gr. 10, Tierzahl n	Gr. 11, Tierzahl n	Gr. 9, Tierzahl n	
viel	4	2	0	1	3	2	12
mittel	2	3	1	1	3	1	11
wenig	1	2	4	3	0	3	13
keine	1	1	3	3	2	2	12

Die Gesamtzahl der Ausprägungen „stark“ und „mittel“ an ventraler Kallusbildung konnte bei je 11 Tieren nachgewiesen werden. Eine geringe Ausprägung ist bei insgesamt 26 Tieren ausgebildet (Tab. 12).

Es befindet sich auch Kallusgewebe mit Kontakt zum Geflechtknochen an der ventralen Begrenzung des cranialen und caudalen Halswirbels, so zum Beispiel bei fünf Tieren der Gruppe 3 (SynCage-C, TricOs) in starker bzw. mittlerer Ausprägung.

Tab. 12 Ventrale Kallusbildung

Ausprägung	Kontrollgruppen		Versuchsgruppen				Gesamt
	Gr. 12, Tierzahl n	Gr. 3, Tierzahl n	Gr. 15, Tierzahl n	Gr. 10, Tierzahl n	Gr. 11, Tierzahl n	Gr. 9, Tierzahl n	
stark	4	2	0	1	3	1	11
mittel	2	3	1	0	2	3	11
gering	2	3	7	7	3	4	26

Die Oberflächenstruktur der TricOs- Partikel stellt sich in der Färbung Methylgrün / van Gieson schwarz dar. Die Partikel waren von zahlreichen Knochen- und Knorpelzellen (Osteoblasten, Chondrozyten, Osteoklasten) umgeben. Auch im Zentrum des Granulats war bei Tieren, der Gruppen 9 (SynCage-C, Fibrin, 1,0 mg/ml TGpPTH1-34, TricOs) und 15 (SynCage-C, Fibrin, 0,2 ml/mg TGpPTH1-34, TricOs) Geflechtkochen nachweisbar (Abb. 41, Tab. 13). Das in Umgebung der TricOs- Partikel befindliche Osteoid stellt sich in der Trichrom- Färbung nach Masson- Goldner rot dar.

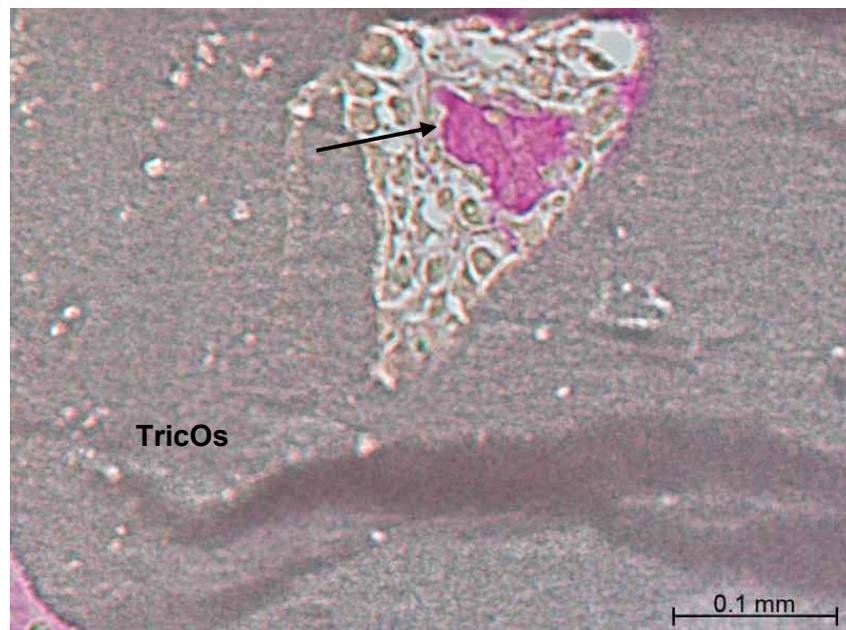


Abb. 41 Knochengewebe (Pfeil) im Zentrum eines TricOs- Partikels (TricOs), Färbung Methylgrün / van Gieson, 200fache Vergrößerung, Gr. 9

Tab. 13 TricOs- Partikel der VrROI

Ausprägung	Kontrollgruppen		Versuchsgruppen				Gesamt
	Gr. 12, Tierzahl n	Gr. 3, Tierzahl n	Gr. 15, Tierzahl n	Gr. 10, Tierzahl n	Gr. 11, Tierzahl n	Gr. 9, Tierzahl n	
von Knochen umgeben		3	5	2	5	3	18
Knochen im Zentrum		0	1	0	0	1	2
Osteoblasten an OF		3	7	5	8	3	26
Osteoklasten an OF		8	7	7	8	8	38
von Binde- gewebe umgeben / abgekapselt		8	8	8	7	7	38
Bindegewebe zw. Partikeln		8	8	7	4	8	35

An der Oberfläche der Partikel ist hyaliner Knorpel, aber auch Faserknorpel nachweisbar. Zwischen diesen befinden sich mit Ausnahme der Gruppe 9 (SynCage-C, Fibrin, 1,0 mg/ml TGpPTH1-34, TricOs) hyaline Knorpelinseln (Abb. 42, Tab. 14).

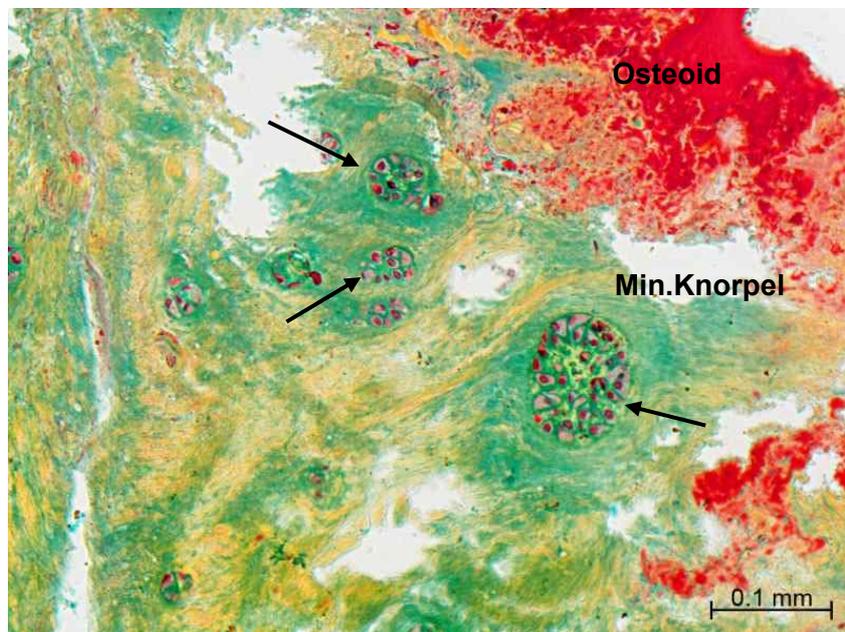


Abb. 42 Chondrozyten, angeordnet in Territorien (Pfeile), 200fache Vergrößerung, Movat- Pentachrom-Färbung, Gr. 9

Tab. 14 Knorpelgewebe der ventralen ROI

Ausprägung	Kontrollgruppen		Versuchsgruppen				Gesamt
	Gr. 12, Tierzahl n	Gr. 3, Tierzahl n	Gr. 15, Tierzahl n	Gr. 10, Tierzahl n	Gr. 11, Tierzahl n	Gr. 9, Tierzahl n	
auf TricOs- Oberfläche		3	5	5	5	2	25
Inseln zwischen Granulat	2	2	1	2	3	0	10
hyaliner Knorpel im/auf Geflecht- knochen	0	2	0	0	0	0	2
hyaliner Knorpel auf Geflecht- knochen	6	6	4	7	2	4	29
C3/C4 über hyalinen Knorpel verbunden	0	0	0	0	0	0	0
Faserknorpel zentral	1	0	1	1	1	0	4
C3/C4 über Faserknorpel verbunden	0	0	0	0	0	0	0

Hyalines Knorpelgewebe ist an Boden- und Deckplatte von 3. und 4. Halswirbel angelagert. Bei Gruppe 3 (SynCage-C, TricOs) befindet sich dieses auch im Geflechtknochen. Es besteht keine Fusion der angrenzenden Halswirbel über hyalinen oder Faserknorpel. Letzterer konnte im Zentrum der VrROI und an der Bodenplatte des 3. Halswirbels nachgewiesen werden. Die Knorpelmatrix befindet sich direkt an der Knochenoberfläche in Mineralisation, was in der Färbung nach Movat- Pentachrom aus der Zunahme der Gelbfärbung ersichtlich ist. Die Chondrozyten werden mit zunehmender Annäherung an den Knochen großblasiger (Abb. 48).

Bei Entzündungsreaktionen wurde zwischen „leichter“ (Zahl an Entzündungszellen und Gefäßen erhöht) und „schwerer“ (Zahl an Entzündungszellen und Gefäßen erhöht, Auftreten von Riesenzellen) Ausprägung unterschieden (Tab. 15).

Entzündungsreaktionen traten in direkter Umgebung zum TricOs- Granulat und, oder in direktem Kontakt zum entnommenen Titanimplantat auf.

In der Gruppe 10 (SynCage-C, Fibrin, 0,4 mg/ml TGpIPTH1-34, TricOs) besteht bei allen acht Tieren eine leichte Entzündungsreaktion.

An der Oberfläche der TricOs- Partikel befinden sich bei den Tieren dieser Gruppe Entzündungszellen (Makrophagen, Granulozyten, Plasmazellen) vergesellschaftet mit einer erhöhten Zahl an Blutgefäßen im umgebenen Bindegewebe (Abb. 43, 44, 46, 47).

Zusätzlich bestehen bei den Gruppen 11 (SynCage-C, Fibrin, 0,7 mg/ml TGpIPTH1-34, TricOs), 12 (SynCage-C) und 15 (SynCage-C, Fibrin, 0,2 mg/ml TGpIPTH1-34, TricOs) schwere Entzündungsreaktionen, verbunden mit dem Auftreten mehrkerniger Riesenzellen (Abb. 45). An der Bodenplatte des dritten Halswirbels besteht bei einem Tier der Gr. 12 (SynCage-C) eine Kalluseinhöhlung (Osteolyse), an deren Oberfläche sich zahlreiche

Osteoklasten befinden. Im angrenzenden Bindegewebe sind zahlreiche Entzündungszellen und Blutgefäße nachweisbar (Tab. 15).

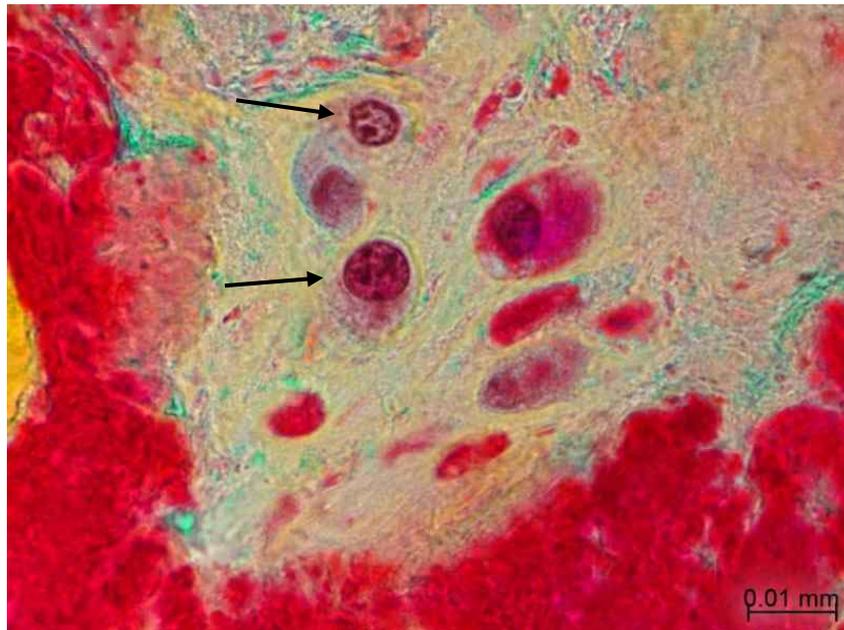


Abb. 43 Plasmazellen (Pfeile), Movat- Pentachrom- Färbung, 1000fache Vergrößerung, Gr.11

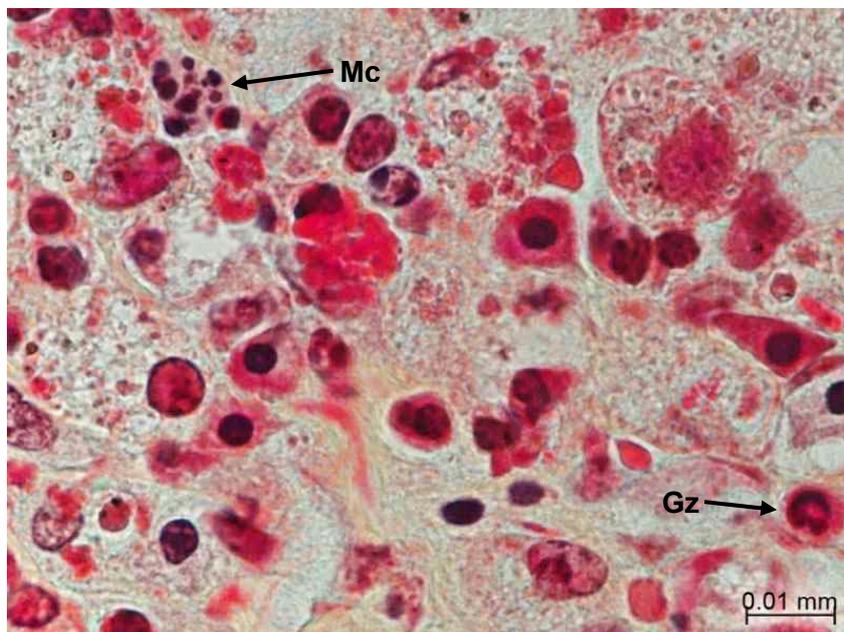


Abb. 44 Entzündungszellen, Makrophage (Mc), Granulozyt (Gz), Movat- Pentachrom- Färbung, 1000fache Vergrößerung, Gr. 11

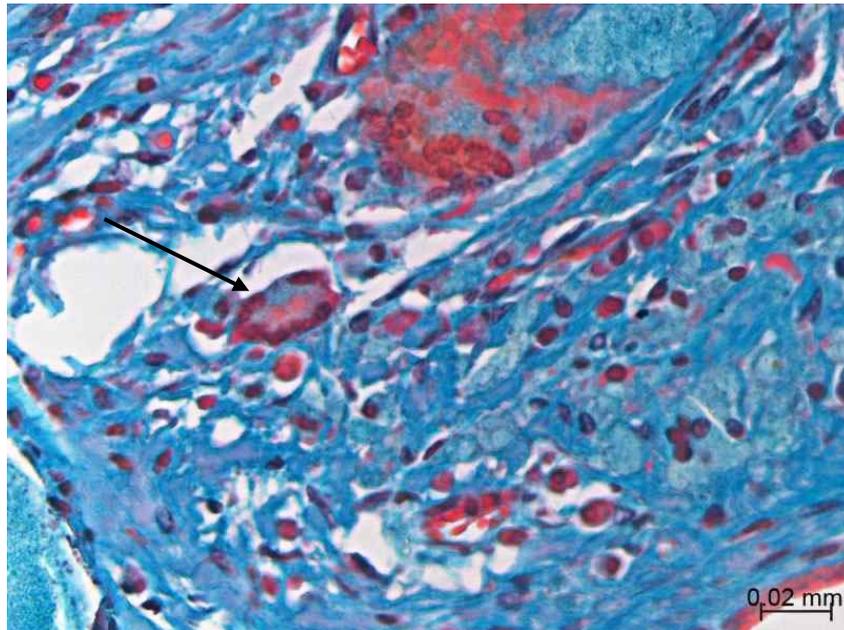


Abb. 45 Fremdkörperriesenzelle (Pfeil), Methylgrün / van Gieson- Färbung, 400fache Vergrößerung, Gr. 11

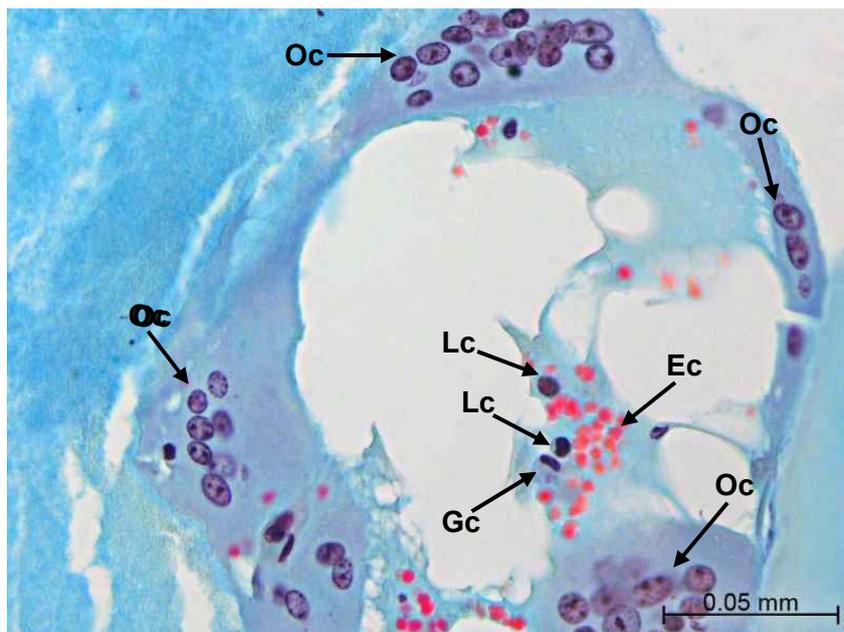


Abb. 46 Osteoklasten (Oc), Lymphozyt (Lc), Granulozyt (Gc), freie Erythrozyten (Ec), Färbung nach Movat- Pentachrom, 400fache Vergrößerung, Gr. 15

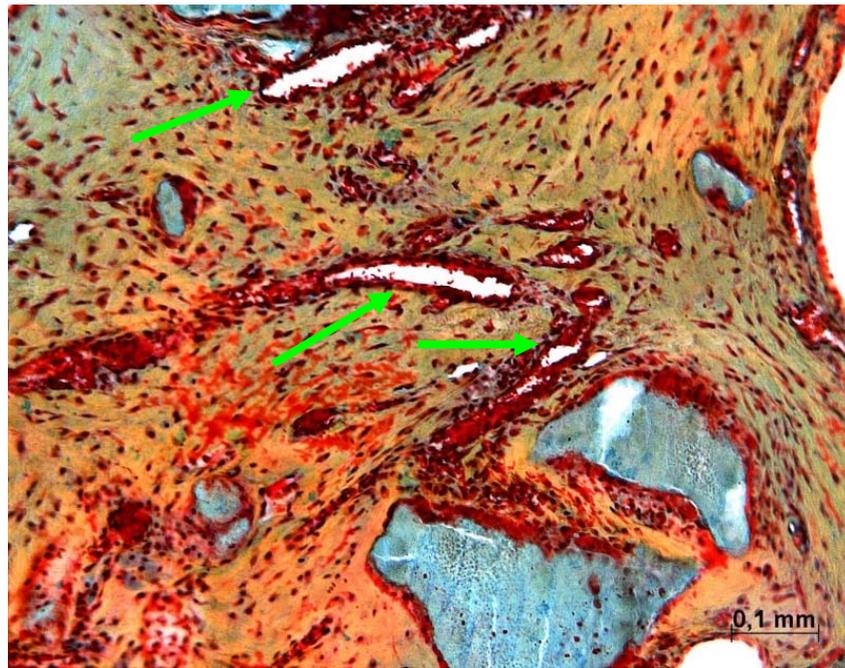


Abb. 47 Gefäße (Pfeile), Färbung nach Movat- Pentachrom, 100fache Vergrößerung, Gr. 9

Tab. 15 Entzündungsreaktion

Ausprägung	Kontrollgruppen		Versuchsgruppen				Gesamt
	Gr. 12, Tierzahl n	Gr. 3, Tierzahl n	Gr. 15, Tierzahl n	Gr. 10, Tierzahl n	Gr. 11, Tierzahl n	Gr. 9, Tierzahl n	
leicht	6	6	7	8	5	5	37
schwer	1	0	1	0	2	0	4
Osteolyse	1	0	0	0	0	0	1

### 4.3.2. Cage- ROI

Die Cage- ROI ist zentral gelegen und wird somit von den anderen ROIs umgeben und beinhaltet die innere Fläche des entnommenen Titanimplantats.

Auch in der Cage- Region dominiert das TricOs- Granulat. Bei Gruppe 15 (SynCage-C, Fibrin, 0,2 mg/ml TGpPTH1-34, TricOs) trifft dies bei 50% der Tiere zu, während bei den übrigen Tieren Geflechtknochen dominiert. In der Leercagegruppe bestehen die, in der VrROI beschriebenen Gewebetypen (Tab. 16).

Tab. 16 Gewebedominanz in Cage- ROI

Ausprägung	Kontrollgruppen		Versuchsgruppen				Gesamt
	Gr. 12, Tierzahl n	Gr. 3, Tierzahl n	Gr. 15, Tierzahl n	Gr. 10, Tierzahl n	Gr. 11, Tierzahl n	Gr. 9, Tierzahl n	
v.a. Geflecht- knochen	5	0	4	0	0	0	9
v.a. TricOs- Granulat		8	4	8	8	8	36
v.a. Binde- gewebe	3	0	0	0	0	0	3

Eine komplette knöcherne Fusion des 3. und 4. Halswirbels (C3 / C4) ist bei keinem Tier erfolgt. Es besteht aber bei den Gruppen 12 (SynCage-C) und 15 (SynCage-C, Fibrin, 0,2 mg/ml TGpPTH1-34, TricOs) eine Fusion über hyalines Knorpelgewebe (Tab. 17).

Tab. 17 Fusion der Cage- ROI

Ausprägung	Kontrollgruppen		Versuchsgruppen				Gesamt
	Gr. 12, Tierzahl n	Gr. 3, Tierzahl n	Gr. 15, Tierzahl n	Gr. 10, Tierzahl n	Gr. 11, Tierzahl n	Gr. 9, Tierzahl n	
C3/C4 komplett knöchern fusioniert	0	0	0	0	0	0	0
C3/C4 mit hyalinem Knorpel fusioniert	3	0	1	0	0	0	4

Das TricOs- Granulat wird mit Ausnahme der Gruppe 3 (SynCage-C, TricOs) von Geflechtknochen umgeben. Bei Gruppe 9 (SynCage-C, Fibrin, 1,0 mg/ml TGpPTH1-34, TricOs) befindet sich auch im Zentrum vereinzelter Partikel Knochengewebe.

In direkter Umgebung bzw. an der Oberfläche der Partikel befinden sich zahlreiche mehrkernige Osteoklasten und von Osteoid umgebene Osteoblasten.

Das Granulat ist durch Bindegewebe abgekapselt. Bei den Gruppen 3 (SynCage-C, TricOs) und 15 (SynCage-C, Fibrin, 0,2 mg/ml TGpPTH1-34, TricOs) befindet sich auch zwischen den Partikeln Bindegewebe. Hyalines Knorpelgewebe ist an der Oberfläche der TricOs-Partikel nachweisbar. Zwischen diesen befinden sich Knorpelinseln, so z.B. bei allen Tieren der Gruppe 15 (SynCage-C, Fibrin, 0,2 mg/ml TGpPTH1-34, TricOs), (Tab. 18).

Tab. 18 Oberfläche und Struktur d. TricOs- Partikel, Cage- ROI

Ausprägung	Kontrollgruppen		Versuchsgruppen				Gesamt
	Gr. 12, Tierzahl n	Gr. 3, Tierzahl n	Gr. 15, Tierzahl n	Gr. 10, Tierzahl n	Gr. 11, Tierzahl n	Gr. 9, Tierzahl n	
von Geflechtknochen umgeben		0	7	8	6	2	23
Knochen im Partikel-Zentrum		0	0	0	0	2	2
Osteoblasten an OF / in direkter Umgebung		4	8	6	5	6	29
Osteoklasten an OF / in direkter Umgebung		8	8	7	7	6	36
von Bindegewebe umgeben / abgekapselt		5	5	2	2	3	17
Bindegewebe zw. Partikeln		8	8	5	5	2	28

Im Unterschied zur ventralen ROI befindet sich bei einer geringen Zahl an Tieren hyalines Knorpelgewebe an der Oberfläche von C3 und C4. Die Chondrozyten sind in Nähe des Knochens säulenartig angeordnet und werden zunehmend hypertroph (Abb. 48, 49, 50). Eine Überbrückung der Wirbelkörper mit hyalinem Knorpel besteht bei Präparaten der Gruppen 10 (SynCage-C, Fibrin, 0,4 mg/ml TGpPTH1-34, TricOs), 12 (SynCage-C) und 15 (SynCage-C, Fibrin, 0,2 mg/ml TGpPTH1-34, TricOs). Im Zentrum der Cage- ROI befindet sich bei Tieren der Gruppen 9 (SynCage-C, Fibrin, 1,0 mg/ml TGpPTH1-34, TricOs), 11 (SynCage-C, Fibrin, 0,7 mg/ml TGpPTH1-34, TricOs) und 15 (SynCage-C, Fibrin, 0,2 mg/ml TGpPTH1-34, TricOs) Faserknorpel ohne Bestehen einer Fusion (Tab. 19).

Tab. 19 Vorkommen, Lokalisation von Knorpel in Cage- ROI

Ausprägung	Kontrollgruppen		Versuchsgruppen				Gesamt
	Gr. 12, Tierzahl n	Gr. 3, Tierzahl n	Gr. 15, Tierzahl n	Gr. 10, Tierzahl n	Gr. 11, Tierzahl n	Gr. 9, Tierzahl n	
an TricOs- Oberfläche		2	8	4	3	6	23
Inseln zw. Granulat		2	8	5	0	2	17
hyaliner Knorpel im/auf Geflecht- knochen	0	0	0	0	0	0	0
hyaliner Knorpel an Geflecht- knochen v. C3/C4	3	1	1	2	2	2	11
C3 / C4 über hyalinen Knorpel verbunden	3	0	1	1	0	0	5
Faser- knorpel zentral	0	0	1	0	2	2	5
C3 / C4 über Faser- knorpel verbunden	0	0	0	0	0	0	0

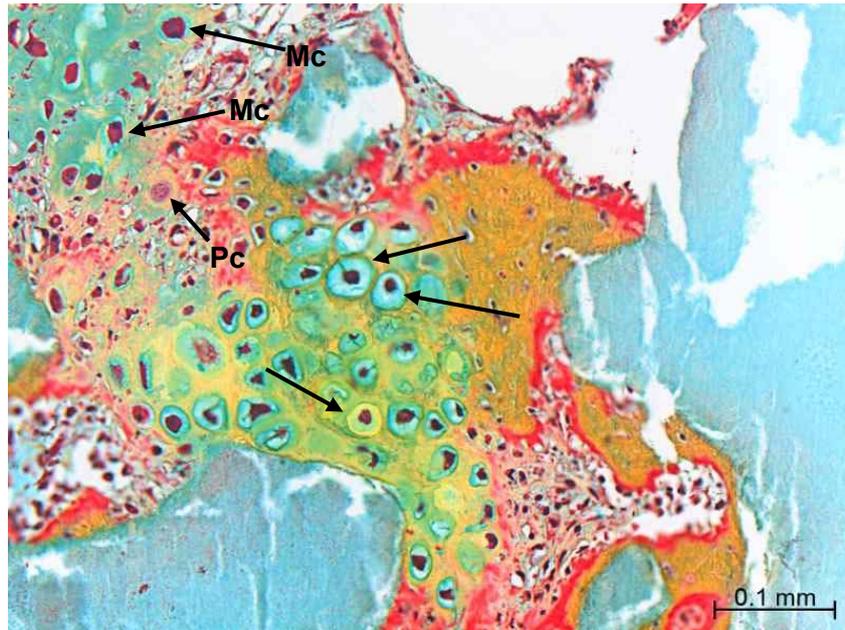


Abb. 48 Chondroblasten in Mineralisation (Pfeile), Makrophagen (Mc), Plasmazelle (Pc), Movat- Pentachrom- Färbung, 200fache Vergrößerung, Gr. 3

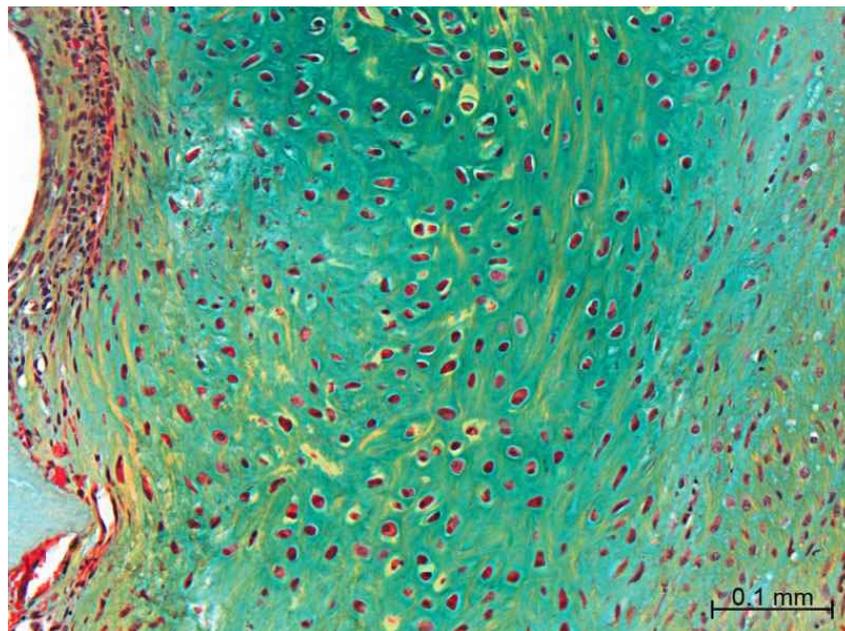


Abb. 49 Enchondrale Ossifikation, neugebildeter Knochen, dargestellt als gelbe Höfe um Chondroblasten, daneben blau-grün gefärbter Knorpel, Movat- Pentachrom- Färbung, 200fache Vergrößerung, Gr. 3

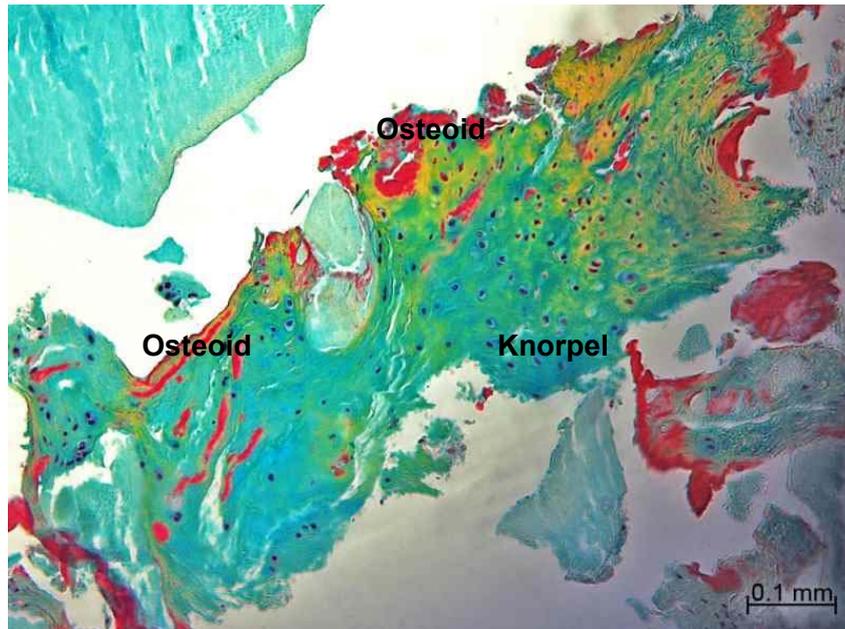


Abb. 50 Hyaliner Knorpel unterschiedlicher Stadien der Mineralisation (Knorpel), roter Saum an Osteoid (Osteoid), Movat-Pentachrom-Färbung, 200fache Vergrößerung, Gr.15

In allen untersuchten Präparaten befinden sich direkt am entnommenen Titan- Implantat und, oder dem TricOs- Granulat Charakteristika einer leichten Entzündungsreaktion. Neben dem vermehrten Auftreten von Gefäßanschnitten konnten Makrophagen, Granulozyten, Lymphozyten und Plasmazellen nachgewiesen werden (Abb. 48, 52). Dies tritt bei den Gruppen 12 (SynCage-C) und 15 (SynCage-C, Fibrin, 0,2 mg/ml TGpPTH1-34, TricOs) bei über 50 % der Tiere auf (Tab. 20).

Tab. 20 Entzündungsreaktion Cage- ROI

Ausprägung	Kontrollgruppen		Versuchsgruppen				Gesamt
	Gr. 12, Tierzahl n	Gr. 3, Tierzahl n	Gr. 15, Tierzahl n	Gr. 10, Tierzahl n	Gr. 11, Tierzahl n	Gr. 9, Tierzahl n	
Leicht	6	4	5	3	3	4	25
schwer	0	1	3	1	1	1	7
Osteolyse	0	0	0	0	0	0	0

Eine schwere Entzündungsreaktion besteht mit Ausnahme der Gruppe 12 (SynCage-C) bei je einem bis zu drei Tieren (Tab. 20). Es wurden direkt am entnommenen Titan- Implantat und, oder dem TricOs- Granulat mehrkernige Riesenzellen nachgewiesen. Diese haben einen Durchmesser von ca. 50 - 75  $\mu\text{m}$  und verfügen über eine geordnete Ansammlung von ca. acht bis zehn, gleichmäßig großen Kernen (Abb. 51). An den Kontaktflächen zum entnommenen Titan- Implantat und an der Oberfläche der TricOs- Partikel befinden sich in der Movat- Pentachrom- Färbung rot gefärbte, überwiegend zell- und faserarme, amorphe Massen. Diese sind bei der Leercagegruppe von einer erhöhten Zahl an Entzündungszellen und Gefäßen begleitet (Abb. 53).

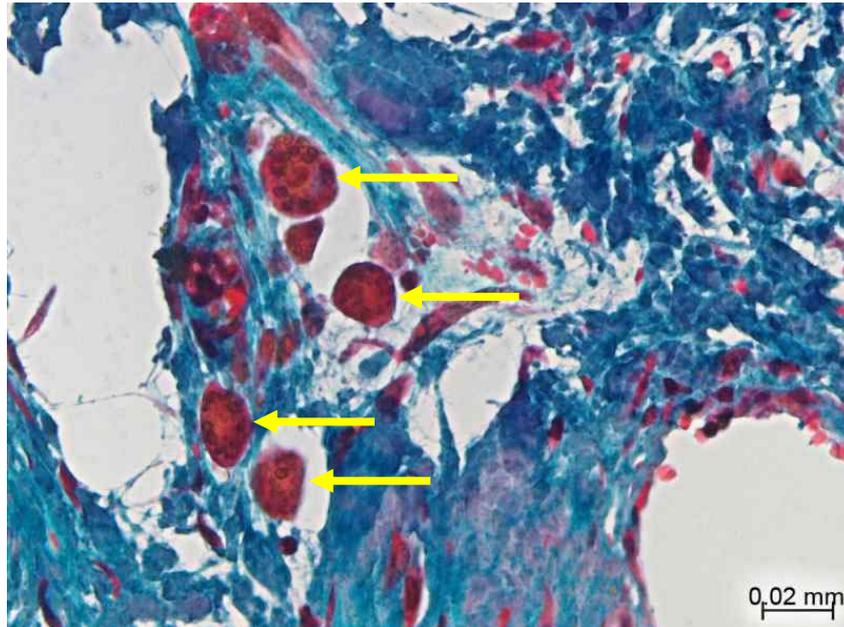


Abb. 51 Fremdkörperriesenzellen (Pfeile), Methylgrün / van Gieson - Färbung, 400fache Vergrößerung, Gr. 11

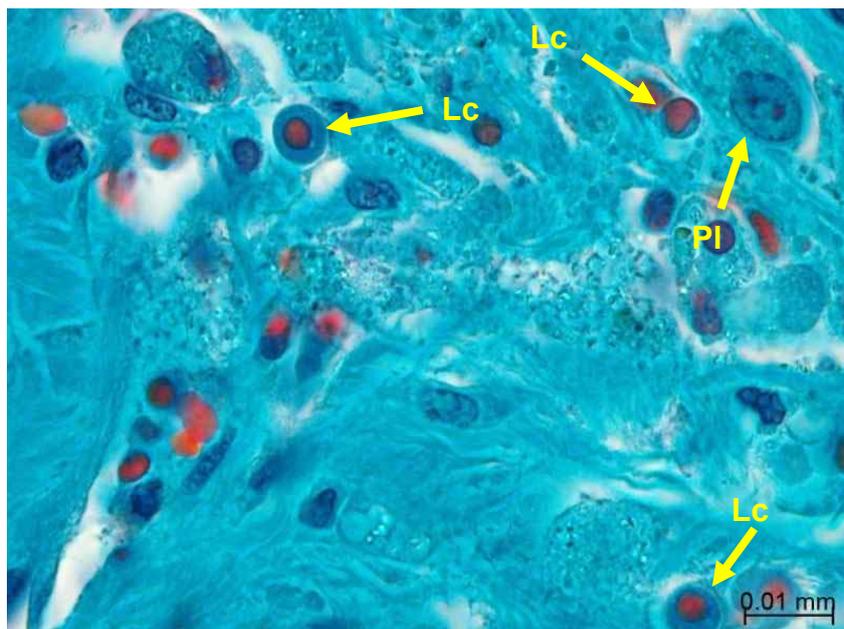


Abb. 52 Plasmazellen (PI), Lymphozyten (Lc), Masson- Goldner- Färbung, 1000fache Vergrößerung, Gr. 11

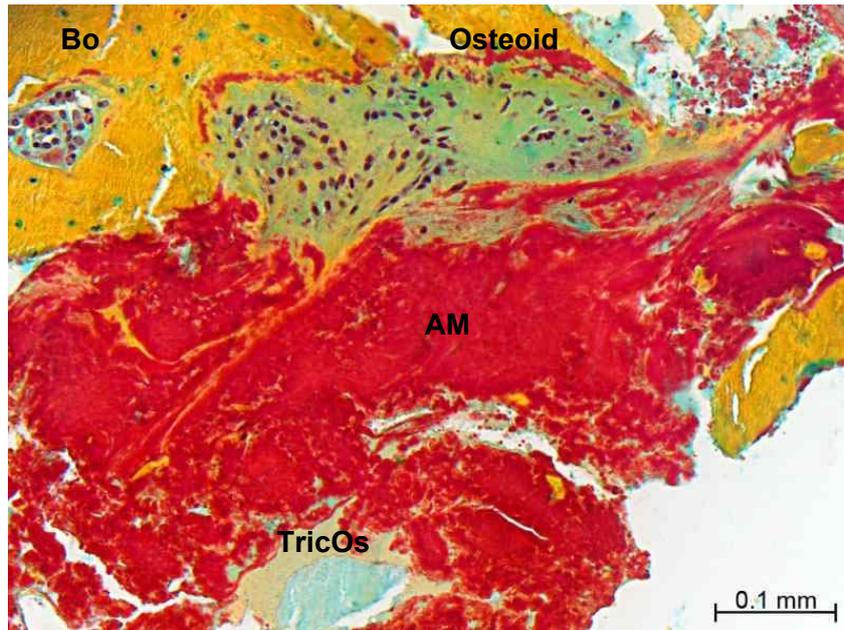


Abb. 53 Amorphe Massen an Cage- Kontakt (AM), Osteoidsaum (Osteoid), min. Knochen (Bo), Tricos, Movat- Pentachrom- Färbung, 200fache Vergrößerung, Gr. 9

Das Auftreten einer Osteolyse konnte nicht nachgewiesen werden (Tab. 20).

Bei fünf Tieren der Kontrollgruppe „Leercage“ sind an Boden- und Deckplatte von C3 und C4 zahlreiche Osteoklasten angelagert, ohne dass eine erhöhte Anzahl an Blutgefäßen und Entzündungszellen im angrenzenden Bindegewebe besteht.

An der Außen- und Innenfläche des entnommenen Titanimplantats bestehen unterschiedliche Gewebetypen. So dominiert an der Außenfläche des Titancages bei 25 Tieren Bindegewebe, bei weiteren 21 Tieren besteht mehr Knochen als Bindegewebe. Bei zwei, der insgesamt 48 Tiere befindet sich in dieser Lokalisation ausschließlich Knochengewebe (Tab. 21).

Tab. 21 Gewebe an Außenfläche des Titancages

Ausprägung	Kontrollgruppen		Versuchsgruppen				Gesamt
	Gr. 12, Tierzahl n	Gr. 3, Tierzahl n	Gr. 15, Tierzahl n	Gr. 10, Tierzahl n	Gr. 11, Tierzahl n	Gr. 9, Tierzahl n	
nur Knochen	1	0	0	0	0	1	2
Knochen > Bindegewebe	4	5	2	5	5	0	21
v.a. Bindegewebe	3	3	6	3	3	7	25

An der Innenfläche befindet sich Geflechtknochen, TricOs- Granulat und Bindegewebe, wobei der Anteil an Geflechtknochen bei allen Gruppen am geringsten ist (Tab. 22).

Während bei den Gruppen 3 (SynCage-C, TricOs), 9 (SynCage-C, Fibrin, 1,0 mg/ml TGpPTH1-34, TricOs), 10 (SynCage-C, Fibrin, 0,4 mg/ml TGpPTH1-34, TricOs), 11 (SynCage-C, Fibrin, 0,7 mg/ml TGpPTH1-34, TricOs) und 15 (SynCage-C, Fibrin, 0,2 mg/ml TGpPTH1-34, TricOs) zu unterschiedlichen Anteilen Bindegewebe und TricOs- Granulat überwiegt, dominiert bei Gruppe 12 (SynCage-C) Geflechtknochen über Bindegewebe.

Tab. 22 Gewebe an Innenfläche des Titancages

Ausprägung	Kontrollgruppen		Versuchsgruppen				Gesamt
	Gr. 12, Tierzahl n	Gr. 3, Tierzahl n	Gr. 15, Tierzahl n	Gr. 10, Tierzahl n	Gr. 11, Tierzahl n	Gr. 9, Tierzahl n	
Knochen > TricOs		1	2	0	1	2	6
TricOs > Knochen		6	2	0	3	1	12
Binde- gewebe >TricOs		1	3	4	3	3	14
TricOs > Binde- gewebe		0	1	4	1	2	6
nur Knochen	2	0	0	0	0	0	2
Knochen > Binde- gewebe	3	0	0	0	0	0	3
v.a. Binde- gewebe	3	0	0	0	0	0	3

An den Kontaktflächen zum entnommenen Implantat besteht bei insgesamt 26 Tieren stark kalifiziertes, hyalines Knorpelgewebe (Tab. 23).

Tab. 23 Hyaliner Knorpel an Titan- Cage

Ausprägung	Kontrollgruppen		Versuchsgruppen				Gesamt
	Gr. 12, Tierzahl n	Gr. 3, Tierzahl n	Gr. 15, Tierzahl n	Gr. 10, Tierzahl n	Gr. 11, Tierzahl n	Gr. 9, Tierzahl n	
Hyaliner Knorpel an Titan- Cage	6	2	7	4	2	5	26

### 4.3.3. Dorsale ROI

Bei dieser ROI handelt es sich um den dorsalen Abschluss des Bandscheibenraumes, der sich vom Cage bis zum Rückenmark erstreckt.

Eine vollständige knöcherne Fusion des dritten und vierten Halswirbels im Bereich der dorsalen ROI ist bei keinem Tier der sechs untersuchten Gruppen erfolgt.

Am dorsalen Abschluss des Bandscheibenraums befindet sich, v. a. bei den Präparaten der Gruppen 12 (SynCage-C) und 15 (SynCage-C, Fibrin, 0,2 mg/ml TGpPTH1-34, TricOs) überwiegend Geflechtknochen (Tab. 24). Die angrenzenden Deckplatten sind durch Osteoidsäume bedeckt.

Tab. 24 Gewebedominanz in dorsaler ROI

Ausprägung	Kontrollgruppen		Versuchsgruppen				Gesamt
	Gr. 12, Tierzahl n	Gr. 3, Tierzahl n	Gr. 15, Tierzahl n	Gr. 10, Tierzahl n	Gr. 11, Tierzahl n	Gr. 9, Tierzahl n	
Geflechtknochen > Bindegewebe	8	5	8	5	3	4	33
Bindegewebe > Geflechtknochen	0	3	0	3	5	4	15

In dieser Region ist der Knorpel vor allem am Knochen des dritten und vierten Halswirbels (C3, C4) lokalisiert. Wie auch schon bei der ventralen und der Cage- ROI beschrieben, verstärkt sich die Mineralisation mit zunehmender Annäherung an den Knochen.

Boden- und Deckplatte von C3 und C4 werden von hyalinem Knorpel in Form eines durchgehenden Saumes oder von isolierten Inseln bedeckt.

Eine Fusion von C3 und C4 über hyalinen Knorpel ist sowohl rückenmarksnah, wie z.B. bei Tieren der Gruppen 3 (SynCage-C, TricOs), 9 (SynCage-C, Fibrin, 1,0 mg/ml TGpPTH1-34, TricOs) und 10 (SynCage-C, Fibrin, 0,4 mg/ml TGpPTH1-34, TricOs), als auch cagenah bei Gruppe 12 (SynCage-C) erfolgt. In der dorsalen ROI befinden sich an den Deckplatten und an den Kontaktflächen zum entnommenen Implantat amorphe Massen und in deren Umgebung eine hohe Zahl an Blutgefäßen.

Mit Ausnahme von Gr. 9 (SynCage-C, Fibrin, 1,0 mg/ml TGpPTH1-34, TricOs) konnte in allen Präparaten eine leichte Entzündungsreaktion nachgewiesen werden. Bei diesen Präparaten befinden sich im Bindegewebe Entzündungszellen und es besteht eine erhöhte Gefäßdichte.

Eine schwere Entzündungsreaktion verbunden mit dem Auftreten mehrkerniger Riesenzellen besteht bei Gruppe 15 (SynCage-C, Fibrin, 0,2 mg/ml TGpPTH1-34, TricOs) in Umgebung von TricOs- Partikeln (Tab. 25, Abb. 54).

Tab. 25 Entzündungsreaktion dorsale ROI

Ausprägung	Kontrollgruppen		Versuchsgruppen				Gesamt
	Gr. 12, Tierzahl n	Gr. 3, Tierzahl n	Gr. 15, Tierzahl n	Gr. 10, Tierzahl n	Gr. 11, Tierzahl n	Gr. 9, Tierzahl n	
leicht	5	1	6	2	7	0	21
schwer	0	0	1	0	0	0	1

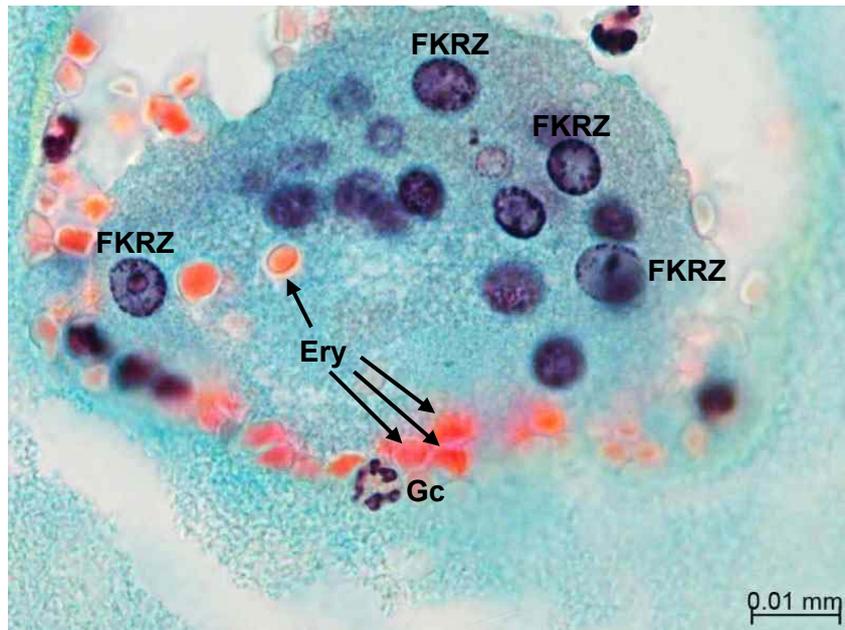


Abb. 54 Fremdkörperriesenzellen (FKRZ), segmentkerniger Granulozyt (Gc), freie Erythrozyten (Ery), Movat- Pentachrom- Färbung, 1000fache Vergrößerung, Gr. 15

Die Knochenoberfläche von C3 bzw. C4 war bei einzelnen Präparaten der Gruppen 10 (SynCage-C, Fibrin, 0,4 mg/ml TGpPTH1-34, TricOs) und 12 (SynCage-C) cagenah zurückgewichen. Der mit Bindegewebe gefüllte Hohlraum wies keine erhöhte Zahl an Osteoklasten, Entzündungszellen oder Blutgefäßen auf. Eine große Zahl an Osteoklasten, ohne Auftreten von Entzündungszellen oder zahlreichen Blutgefäßen, wurde cagenah bei den Gruppen 3 (SynCage-C, TricOs) und 15 (SynCage-C, Fibrin, 0,2 mg/ml TGpPTH1-34, TricOs) an der Knochenoberfläche von C3 und C4 nachgewiesen.

Faserknorpel befindet sich vereinzelt im Zentrum der dorsalen ROI, so bei einem Präparat der Gruppe 9 (SynCage-C, Fibrin, 1,0 mg/ml TGpPTH1-34, TricOs) und zwei der Gruppe 12 (SynCage-C), (Abb. 55). Bei einem Präparat der Gruppe 15 (SynCage-C, Fibrin, 0,2 mg/ml TGpPTH1-34, TricOs) ist dieser direkt an die Knochenoberfläche des 3. Halswirbels angelagert.

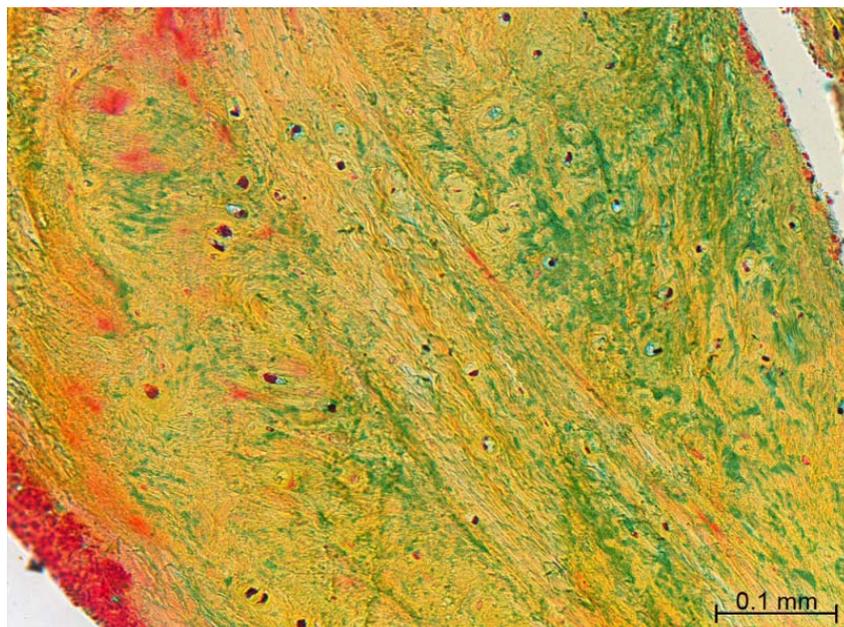


Abb. 55 Faserknorpel, Movat- Pentachrom- Färbung, 200fache Vergrößerung, Gr. 9

Im Zentrum der dorsalen ROI konnten einzelne, von Bindegewebe umgebene Partikel des TricOs- Granulats nachgewiesen werden. An deren Oberfläche sind Osteoklasten und Osteoblasten lokalisiert, so z. B. bei fünf Tieren der Gr. 15 (SynCage-C, Fibrin, 0,2 mg/ml TGplPTH1-34, TricOs). Im Spinalkanal konnte bei keinem Tier TricOs- Granulat nachgewiesen werden.

#### 4.3.4. Craniale und caudale ROI

Diese beiden ROIs beschreiben das, der ventralen ROI, der Cage- ROI und der dorsalen ROI direkt anliegende Gewebe von C3 und C4.

Die aus hyalinem Knorpelgewebe bestehenden Wachstumsfugen sind in allen untersuchten Gruppen im Verlauf der cranialen ROI deutlich stärker ausgeprägt als in der caudalen ROI.

In der Gr. 12 (SynCage-C) konnten weder in der cranialen noch in der caudalen ROI Wachstumsfugen nachgewiesen werden (Tab. 26, 27).

Tab. 26 Wachstumsfugen in cranialer ROI

Ausprägung	Kontrollgruppen		Versuchsgruppen				Gesamt
	Gr. 12, Tierzahl n	Gr. 3, Tierzahl n	Gr. 15, Tierzahl n	Gr. 10, Tierzahl n	Gr. 11, Tierzahl n	Gr. 9, Tierzahl n	
durch gesamten WK	0	0	0	0	0	3	3
Inseln über ges. Verlauf	0	0	1	0	0	0	1
Insel nahe RM	0	2	3	0	1	2	8
RM bis zur DsROI	0	1	0	0	0	0	1
RM bis Cage	0	2	1	1	1	2	7
Insel am Cage	0	0	1	2	0	1	4

Tab. 27 Wachstumsfugen in caudaler ROI

Ausprägung	Kontrollgruppen		Versuchsgruppen				Gesamt
	Gr. 12, Tierzahl n	Gr. 3, Tierzahl n	Gr. 15, Tierzahl n	Gr. 10, Tierzahl n	Gr. 11, Tierzahl n	Gr. 9, Tierzahl n	
durch ges. WK	0	0	0	0	0	0	0
Insel nähe RM	0	6	0	1	1	0	8
RM bis zur DsROI	0	0	0	0	0	0	0
RM bis Cage	0	0	3	0	4	0	7
RM bis dors. Cagerand	0	0	0	0	0	4	4
RM bis ventr. Cage- abschluß	0	0	0	1	0	3	4
Insel am Cage	0	0	1	3	0	1	5

In der Leercagegruppe haben in der cranialen und caudalen ROI im Vergleich zum nativen Wirbelsäulensegment keine Veränderungen stattgefunden.

In den übrigen Gruppen ist das Knochengewebe bei mindestens einem Präparat auf Höhe des Cages an den Kontaktflächen zum entnommenen Titan- Implantat zurückgewichen. Im entstandenen Hohlraum wurde eine Füllung mit Bindegewebe bzw. TricOs- Partikeln nachgewiesen (Tab. 28, 29).

Tab. 28 Osteolyse craniale ROI

Ausprägung	Kontrollgruppen		Versuchsgruppen				Gesamt
	Gr. 12, Tierzahl n	Gr. 3, Tierzahl n	Gr. 15, Tierzahl n	Gr. 10, Tierzahl n	Gr. 11, Tierzahl n	Gr. 9, Tierzahl n	
Hohlraum gefüllt mit Bindegewebe	0	0	0	2	0	0	2
Hohlraum gefüllt mit TricOs, umgeben v. Bindegewebe	0	0	0	0	0	2	2

Tab. 29 Osteolyse caudale ROI

Ausprägung	Kontrollgruppen		Versuchsgruppen				Gesamt
	Gr. 12, Tierzahl n	Gr. 3, Tierzahl n	Gr. 15, Tierzahl n	Gr. 10, Tierzahl n	Gr. 11, Tierzahl n	Gr. 9, Tierzahl n	
Hohlraum gefüllt mit Bindegewebe	0	1	0	1	0	1	2
Hohlraum gefüllt mit TricOs, umgeben von Bindegewebe	0	0	2	0	1	1	4

#### 4.4. Ergebnisse der histomorphometrischen Analyse

In den sechs verschiedenen Gruppen (Tab. 30) wurden je acht Präparate hinsichtlich der folgend aufgeführten Parameter histomorphometrisch untersucht.

Tab. 30      Untersuchte Gruppen

Gr.	Tierzahl n	Versuch/Kontrolle	Implantat	Standzeit
3	8	Kontrolle	SynCage-C, TricOs	12 Wo.
9	8	Versuch	SynCage-C, Fibrin, 1,0 mg/ml TGplPTH1-34, TricOs	12 Wo.
10	8	Versuch	SynCage-C, Fibrin, 0,4 mg/ml TGplPTH1-34, TricOs	12 Wo.
11	8	Versuch	SynCage-C, Fibrin, 0,7 mg/ml TGplPTH1-34, TricOs	12 Wo.
12	8	Kontrolle	SynCage-C (Leercage)	12 Wo.
15	8	Versuch	SynCage-C, Fibrin, 0,2 mg/ml TGplPTH1-34, TricOs	12 Wo.

- Cage- ROI
  - Knochenfläche [mm<sup>2</sup>], [%], [%<sub>inkl. Leerflächen</sub>]
  - mineralisierte Knochenfläche [mm<sup>2</sup>], [%], [%<sub>inkl. Leerflächen</sub>]
  - Bindegewebsfläche [mm<sup>2</sup>], [%], [%<sub>inkl. Leerflächen</sub>]
  - Knorpelfläche [mm<sup>2</sup>], [%], [%<sub>inkl. Leerflächen</sub>]
  - TricOsfläche [mm<sup>2</sup>], [%], [%<sub>inkl. Leerflächen</sub>]
  - Bindegewebsfläche absolut [mm<sup>2</sup>], [%], [%<sub>inkl. Leerflächen</sub>]
- 5Teil- ROIs
  - Knochenfläche [%], [%<sub>inkl. Leerflächen</sub>]
  - mineralisierte Knochenfläche [%], [%<sub>inkl. Leerflächen</sub>]
  - Bindegewebsfläche [%], [%<sub>inkl. Leerflächen</sub>]
  - Knorpelfläche [%], [%<sub>inkl. Leerflächen</sub>]
  - TricOsfläche [%], [%<sub>inkl. Leerflächen</sub>]
  - Bindegewebsfläche absolut [%], [%<sub>inkl. Leerflächen</sub>]
- Dorsale, ventrale, craniale und caudale ROI
  - Knochenfläche [%]
  - mineralisierte Knochenfläche [%]
  - Bindegewebsfläche [%]
  - Knorpelfläche [%]
  - TricOsfläche [%]
  - Bindegewebsfläche absolut [%]

## 4.5. Histomorphometrie

### 4.5.1. Cage- ROI

#### Knochen

Es besteht ein signifikantes Ergebnis der Knochenfläche ([mm<sup>2</sup>], [% inkl. Leerflächen], [%]), der Gruppen 10 (SynCage-C, Fibrin, 0,4 mg/ml TGplPTH1-34, TricOs) und 11 (SynCage-C, Fibrin, 0,7 mg/ml TGplPTH1-34, TricOs) gegen die Leercagegruppe (Tab. 31, Abb. 56, 57, 58).

Tab. 31 Kruskal- Wallis- Test und Bonferroni- Korrektur, Knochen, CROI

Gr., n=8	Knochen	Kruskal- Wallis- Test (p- Wert)	Bonferroni- Korrektur ( $\alpha$ )	Mann-Whitney-U-Test (p-Wert)				
				Gr.9	Gr.10	Gr.11	Gr.12	Gr.15
3	BAr/[mm <sup>2</sup> ]	0,011	0,003	0,798	0,279	0,505	0,015	0,382
	BAr/[% inkl. Leerfl.]	0,01	0,003	/	/	/	/	/
	BAr/[%]	0,022	0,025	0,878	0,279	0,505	0,010	0,382
9	BAr/[mm <sup>2</sup> ]	0,011	0,003	/	0,721	0,959	0,010	0,195
	BAr/[% inkl. Leerfl.]	0,01	0,003	/	/	/	/	/
	BAr/[%]	0,022	0,025	/	0,798	1,000	0,130	0,382
10	BAr/[mm <sup>2</sup> ]	0,011	0,003	/	/	0,721	0,003	0,161
	BAr/[% inkl. Leerfl.]	0,01	0,003	/	/	/	0,003	/
	BAr/[%]	0,022	0,025	/	/	0,645	0,003	0,083
11	BAr/[mm <sup>2</sup> ]	0,011	0,003	/	/	/	0,003	0,028
	BAr/[% inkl. Leerfl.]	0,01	0,003	/	/	/	0,003	/
	BAr/[%]	0,022	0,025	/	/	/	0,003	0,065
12	BAr/[mm <sup>2</sup> ]	0,011	0,003	/	/	/	/	0,050
	BAr/[% inkl. Leerfl.]	0,01	0,003	/	/	/	/	/
	BAr/[%]	0,022	0,025	/	/	/	/	0,050
15	BAr/[mm <sup>2</sup> ]	0,011	0,003	/	/	/	/	/
	BAr/[% inkl. Leerfl.]	0,01	0,003	/	/	/	/	/
	BAr/[%]	0,022	0,025	/	/	/	/	/

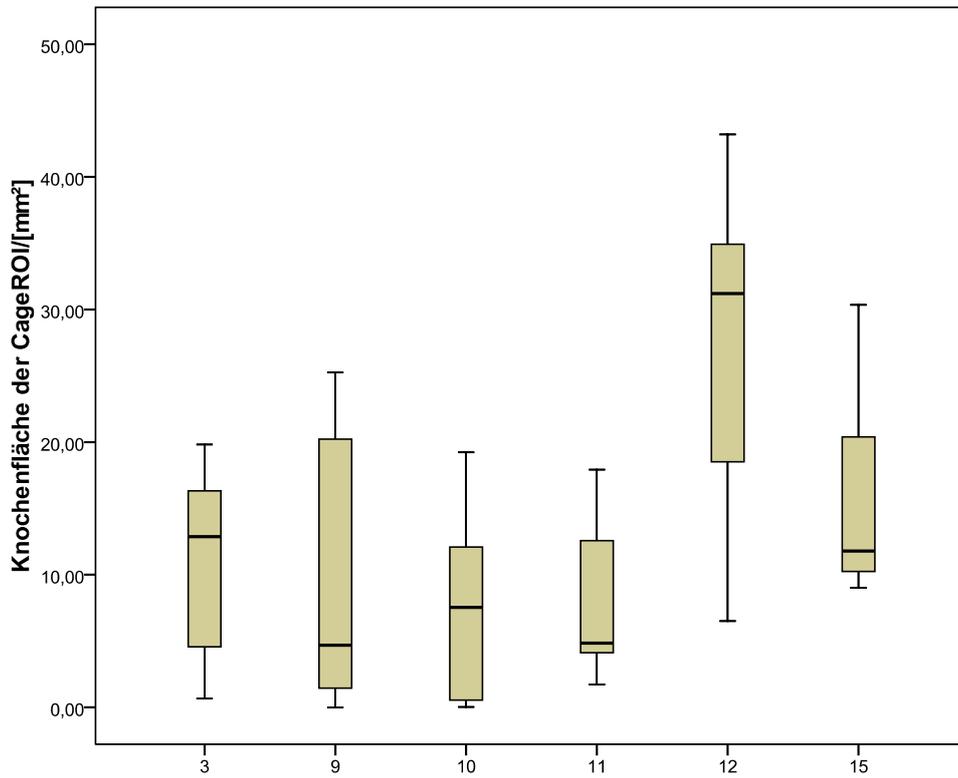


Abb. 56 Knochenfläche der Cage- ROI, [mm<sup>2</sup>]

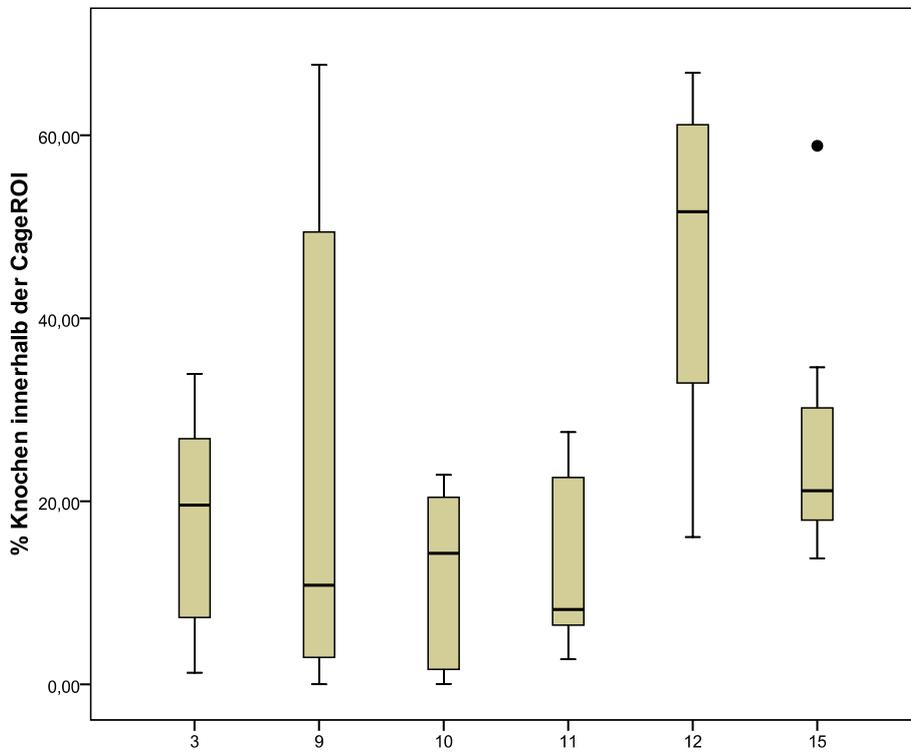


Abb. 57 Knochen innerhalb der Cage- ROI, [%]

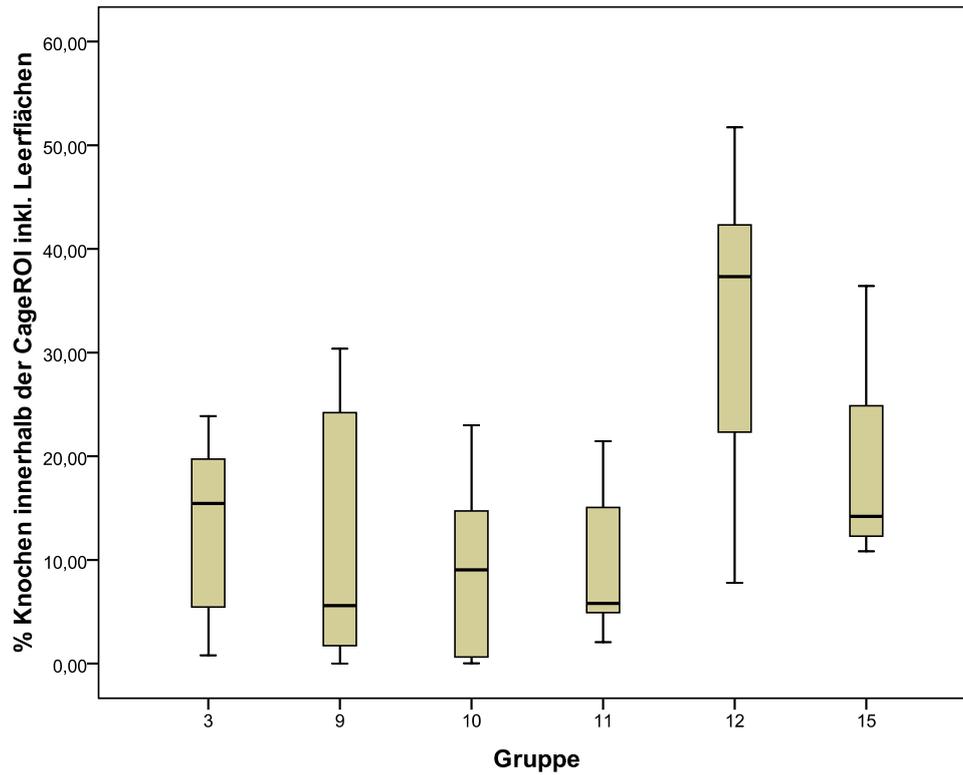


Abb. 58 Knochen innerhalb der Cage- ROI, [% inklusive Leerflächen]

Der Median der Kontrollgruppe 12 (SynCage-C) lag über dem der Kontrollgruppen 10 (SynCage-C, Fibrin, 0,4 mg/ml TGpPTH1-34, TricOs) und 11 (SynCage-C, Fibrin, 0,7 mg/ml TGpPTH1-34, TricOs), ([mm<sup>2</sup>], [%]), (Tab. 32).

Tab. 32 Median, Min- Max- Werte, Knochen, CROI

Gr., n=8	Knochen	Median	Min.	Max.	Perzentile		
					25	50	75
3	BAr/[mm <sup>2</sup> ]	12,875	0,670	19,820	3,813	12,875	16,738
	BAr/[% inkl. Leerfl.]	15,445	0,801	23,885	4,562	15,445	20,311
	BAr/[%]	19,596	1,278	33,947	6,318	19,596	27,699
9	BAr/[mm <sup>2</sup> ]	4,690	0,000	25,240	1,155	4,690	21,185
	BAr/[% inkl. Leerfl.]	5,600	0,000	30,373	1,379	5,600	25,340
	BAr/[%]	10,826	0,000	67,704	2,202	10,826	58,117
10	BAr/[mm <sup>2</sup> ]	7,540	0,030	19,220	0,475	7,540	12,490
	BAr/[% inkl. Leerfl.]	9,048	0,036	22,993	0,568	9,048	15,073
	BAr/[%]	14,320	0,047	22,886	1,621	14,320	21,007
11	BAr/[mm <sup>2</sup> ]	4,840	1,720	17,930	3,843	4,840	14,773
	BAr/[% inkl. Leerfl.]	5,804	2,068	21,460	4,595	5,804	17,712
	BAr/[%]	8,189	2,743	27,568	6,035	8,189	24,068
12	BAr/[mm <sup>2</sup> ]	31,200	6,500	43,200	16,170	31,200	36,565
	BAr/[% inkl. Leerfl.]	37,320	7,804	51,718	19,443	37,320	44,180
	BAr/[%]	51,648	16,101	66,832	27,789	51,648	62,123
15	BAr/[mm <sup>2</sup> ]	11,780	9,020	30,350	10,085	11,780	21,848
	BAr/[% inkl. Leerfl.]	14,200	10,831	36,417	12,076	14,200	26,728
	BAr/[%]	21,161	13,779	58,852	17,641	21,161	32,433

## Mineralisierter Knochen

Es besteht ein signifikantes Ergebnis für die mineralisierte Knochenfläche ( $[\text{mm}^2]$ ,  $[\% \text{ inkl. Leerflächen}]$ ,  $[\%]$ ) bei Test der Gruppe 11 (SynCage-C, Fibrin, 0,7 mg/ml TGpIPTH1-34, TricOs) gegen die Kontrollgruppe 12 (SynCageC), (Tab. 33, Abb. 59, 60, 61).

Tab. 33 Kruskal- Wallis- Test u. Bonferroni-Korrektur, min. Knochen, CROI

Gr., n=8	min. Knochen	Kruskal- Wallis-Test (p-Wert)	Bonferroni- Korrektur ( $\alpha$ )	Mann-Whitney-U-Test (p-Wert)				
				Gr.9	Gr.10	Gr.11	Gr.12	Gr.15
3	BMdAr/ [ $\text{mm}^2$ ]	0,017	0,003	0,442	0,279	0,574	0,015	0,798
	BMdAr/[ $\% \text{ inkl. Leerfl.}$ ]	0,015	0,05					
	BMdAr/[ $\%$ ]	0,023	0,05					
9	BMdAr/ [ $\text{mm}^2$ ]	0,017	0,003		1,000	0,645	0,010	0,195
	BMdAr/[ $\% \text{ inkl. Leerfl.}$ ]	0,015	0,05					
	BMdAr/[ $\%$ ]	0,023	0,05					
10	BMdAr/ [ $\text{mm}^2$ ]	0,017	0,003			0,878	0,005	0,195
	BMdAr/[ $\% \text{ inkl. Leerfl.}$ ]	0,015	0,05					
	BMdAr/[ $\%$ ]	0,023	0,05					
11	BMdAr/ [ $\text{mm}^2$ ]	0,017	0,003				0,003	0,130
	BMdAr/[ $\% \text{ inkl. Leerfl.}$ ]	0,015	0,05				0,003	
	BMdAr/[ $\%$ ]	0,023	0,05				0,005	
12	BMdAr/ [ $\text{mm}^2$ ]	0,017	0,003					0,050
	BMdAr/[ $\% \text{ inkl. Leerfl.}$ ]	0,015	0,05					
	BMdAr/[ $\%$ ]	0,023	0,05					
15	BMdAr/ [ $\text{mm}^2$ ]	0,017	0,0033					
	BMdAr/[ $\% \text{ inkl. Leerfl.}$ ]	0,015	0,05					
	BMdAr/[ $\%$ ]	0,023	0,05					

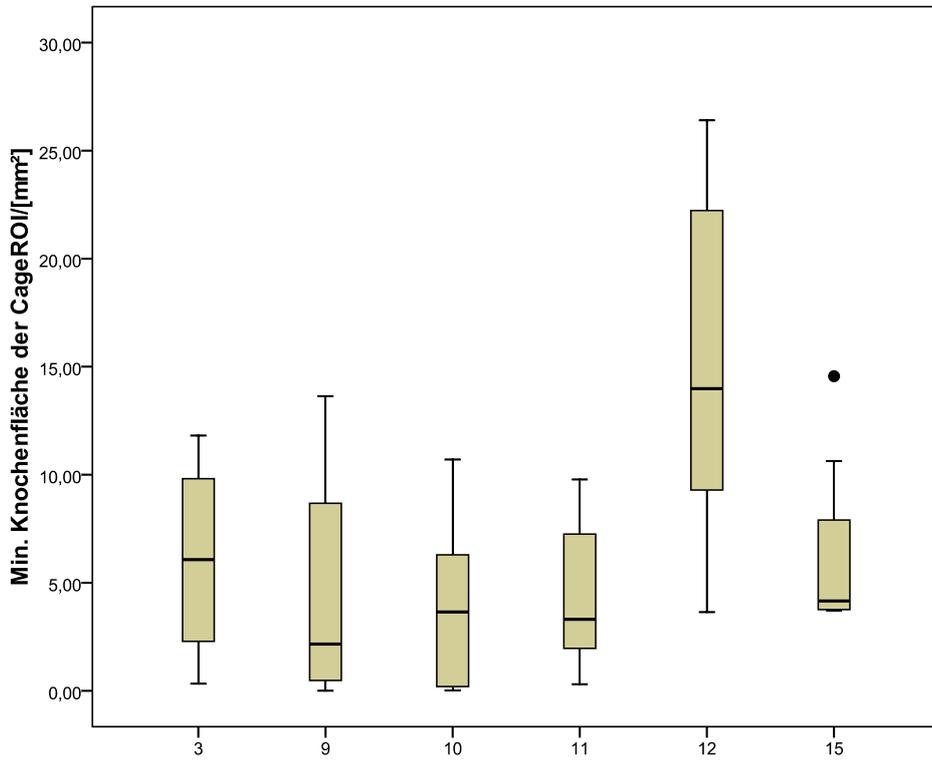


Abb. 59 Mineralisierte Knochenfläche der Cage- ROI, [mm<sup>2</sup>]

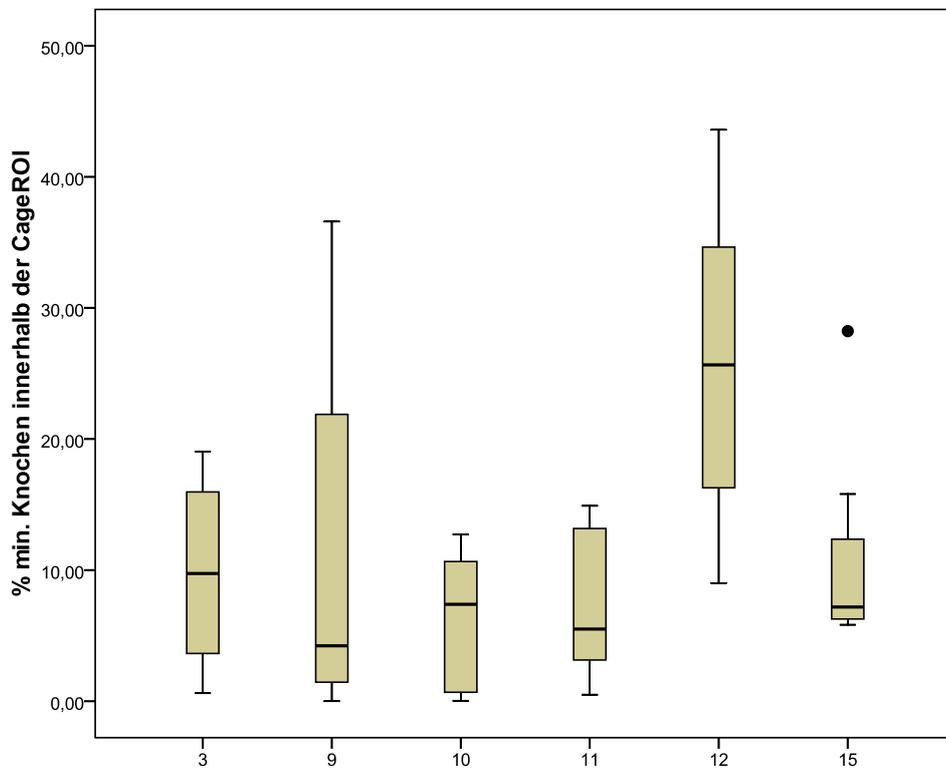


Abb. 60 Mineralisierte Knochenfläche innerhalb der Cage- ROI, [%]

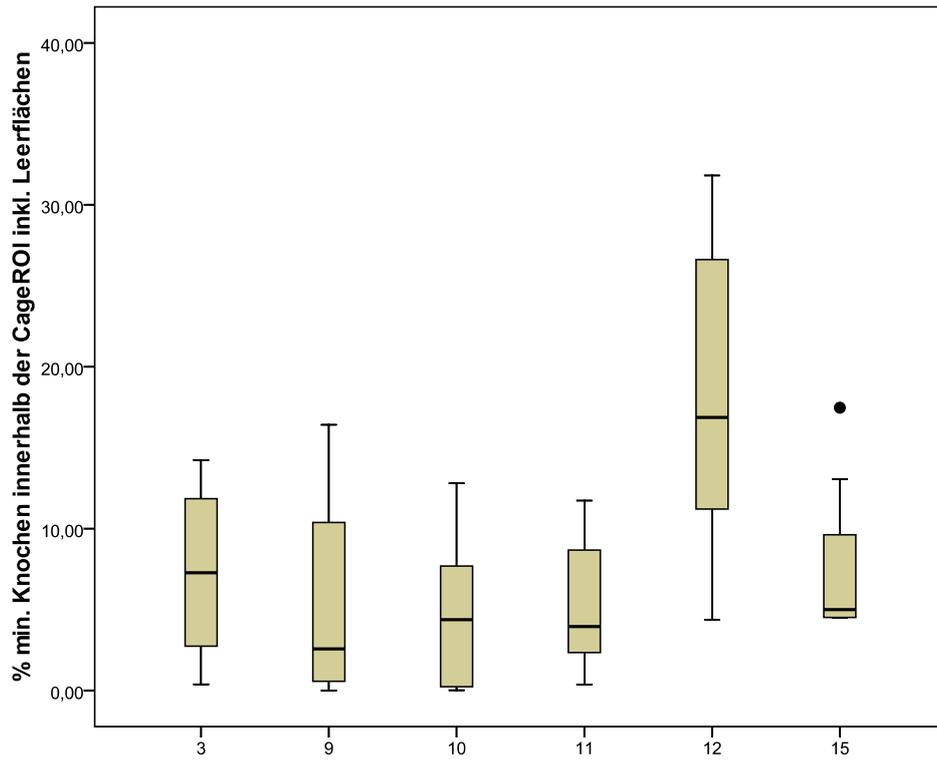


Abb. 61 Mineralisierte Knochenfläche innerhalb der Cage- ROI, [% inklusive Leerflächen]

Der Median der mineralisierten Knochenfläche ( $[\text{mm}^2]$ , [% inklusive Leerflächen], [%]), der Versuchsgruppe 11 (SynCage-C, Fibrin, 0,7 mg/ml TGpPTH1-34, TricOs) unterschreitet den der Kontrollgruppe 12 (SynCage-C) signifikant (Tab. 34).

Tab. 34 Median, Min- Max- Werte, min. Knochen, CROI

Gr., n=8	min.Knochen	Median	Min.	Max.	Perzentile		
					25	50	75
3	BMdAr/ $[\text{mm}^2]$	6,070	0,320	11,810	1,810	6,070	9,913
	BMdAr/[% inkl.Leerfl.]	7,281	0,383	14,232	2,166	7,281	11,924
	BMdAr/[%]	9,742	0,610	19,042	2,980	9,742	16,489
9	BMdAr/ $[\text{mm}^2]$	2,160	0,000	13,640	0,365	2,160	9,623
	BMdAr/[% inkl.Leerfl.]	2,579	0,000	16,414	0,436	2,579	11,508
	BMdAr/[%]	4,228	0,000	36,588	0,935	4,228	26,879
10	BMdAr/ $[\text{mm}^2]$	3,650	0,020	10,700	0,158	3,650	6,760
	BMdAr/[% inkl.Leerfl.]	4,375	0,024	12,801	0,188	4,375	8,344
	BMdAr/[%]	7,390	0,032	12,741	0,491	7,390	11,508
11	BMdAr/ $[\text{mm}^2]$	3,305	0,310	9,780	1,895	3,305	8,473
	BMdAr/[% inkl.Leerfl.]	3,958	0,373	11,731	2,266	3,958	10,139
	BMdAr/[%]	5,500	0,494	14,899	3,068	5,500	13,939
12	BMdAr/ $[\text{mm}^2]$	13,980	3,640	26,400	7,395	13,980	23,088
	BMdAr/[% inkl.Leerfl.]	16,873	4,370	31,815	8,899	16,873	27,649
	BMdAr/[%]	25,655	9,015	43,593	12,650	25,655	35,845
15	BMdAr/ $[\text{mm}^2]$	4,155	3,720	14,560	3,755	4,155	9,265
	BMdAr/[% inkl.Leerfl.]	4,999	4,501	17,471	4,512	4,999	11,333
	BMdAr/[%]	7,186	5,830	28,233	6,224	7,186	14,084

### Undifferenziertes Bindegewebe

Es besteht eine Signifikanz für die undifferenzierte Bindegewebsfläche ( $[\text{mm}^2]$ , [%]) der Gruppen 3 (SynCage-C, TricOs) und 11 (SynCage-C, Fibrin, 0,7 mg/ml TGpIPTH1-34, TricOs) gegen Gruppe 12 (SynCage-C), (Tab. 35, Abb. 62, 63, 64).

Tab. 35 Kruskal- Wallis- Test und Bonferroni- Korrektur, undiff. Bindegewebe, CROI

Gr., n=8	undiff. Binde- gewebe	Kruskal- Wallis-Test (p-Wert)	Bonferroni- Korrektur ( $\alpha$ )	Mann-Whitney-U-Test (p-Wert)				
3	CoTAr/ $[\text{mm}^2]$	0,009	0,003	0,160	0,380	0,440	0,000	0,280
	CoTAr/ $[\%$ inkl. Leerfl.]	0,015	0,025				0,015	
	CotAr/ $[\%$ ]	0,025	0,025				0,010	
9	CoTAr/ $[\text{mm}^2]$	0,009	0,0033		0,105	0,105	0,382	0,382
	CoTAr/ $[\%$ inkl. Leerfl.]	0,015	0,025					
	CotAr/ $[\%$ ]	0,025	0,025					
10	CoTAr/ $[\text{mm}^2]$	0,009	0,0033			0,279	0,021	0,959
	CoTAr/ $[\%$ inkl. Leerfl.]	0,015	0,025					
	CotAr/ $[\%$ ]	0,025	0,025					
11	CoTAr/ $[\text{mm}^2]$	0,009	0,0033				0,001	0,130
	CoTAr/ $[\%$ inkl. Leerfl.]	0,015	0,025				0,003	
	CotAr/ $[\%$ ]	0,025	0,025				0,003	
12	CoTAr/ $[\text{mm}^2]$	0,009	0,0033					0,021
	CoTAr/ $[\%$ inkl. Leerfl.]	0,015	0,025					
	CotAr/ $[\%$ ]	0,025	0,025					
15	CoTAr/ $[\text{mm}^2]$	0,009	0,003					
	CoTAr/ $[\%$ inkl. Leerfl.]	0,015	0,025					
	CotAr/ $[\%$ ]	0,025	0,025					

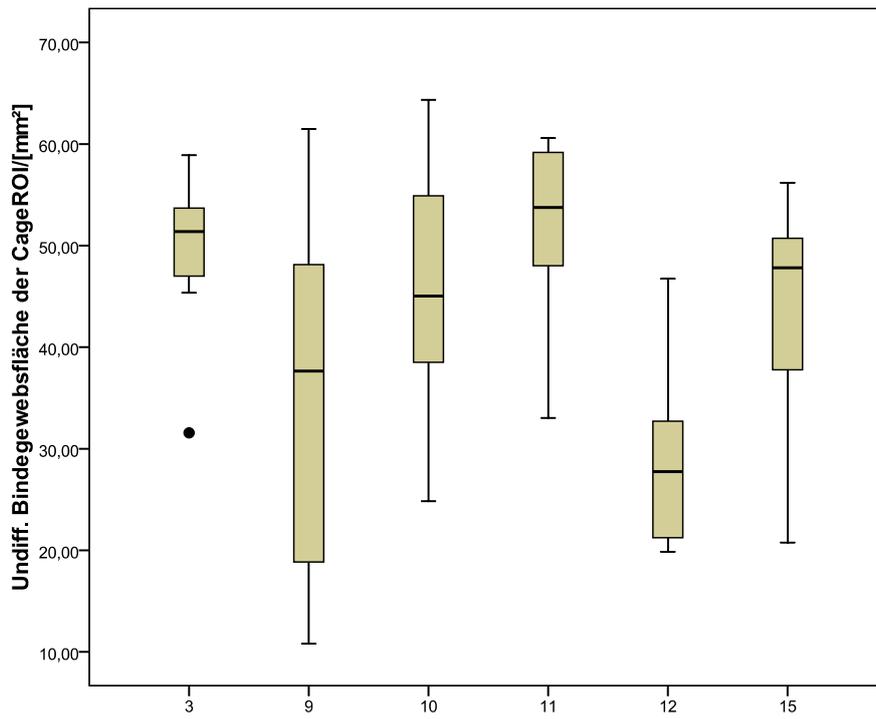


Abb. 62 Undifferenzierte Bindegewebsfläche der Cage- ROI, [mm<sup>2</sup>]

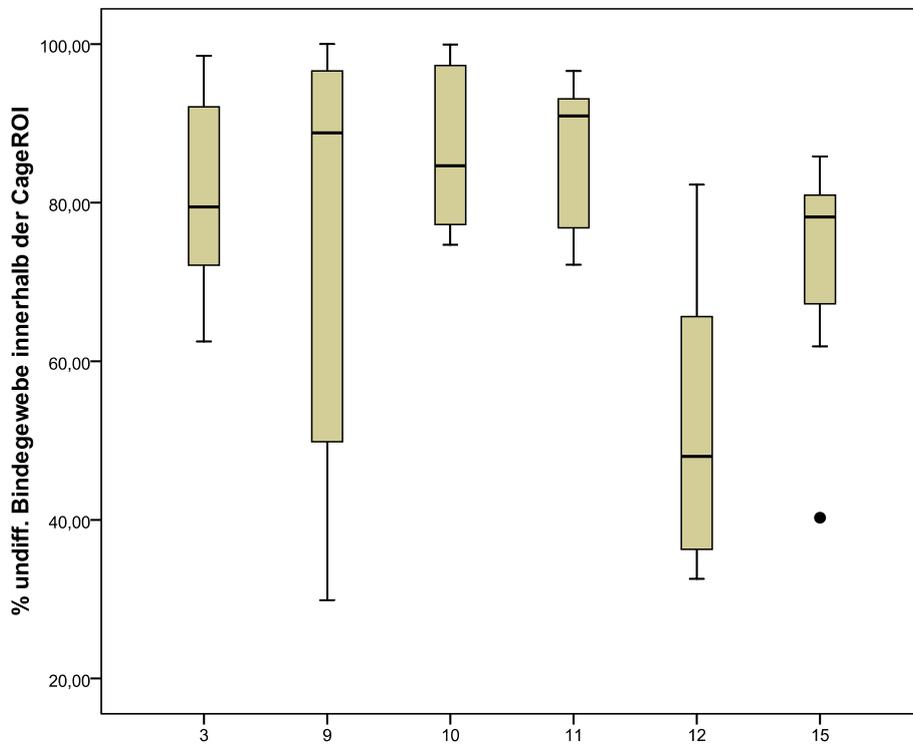


Abb. 63 Undifferenziertes Bindegewebe innerhalb der Cage- ROI, [%]

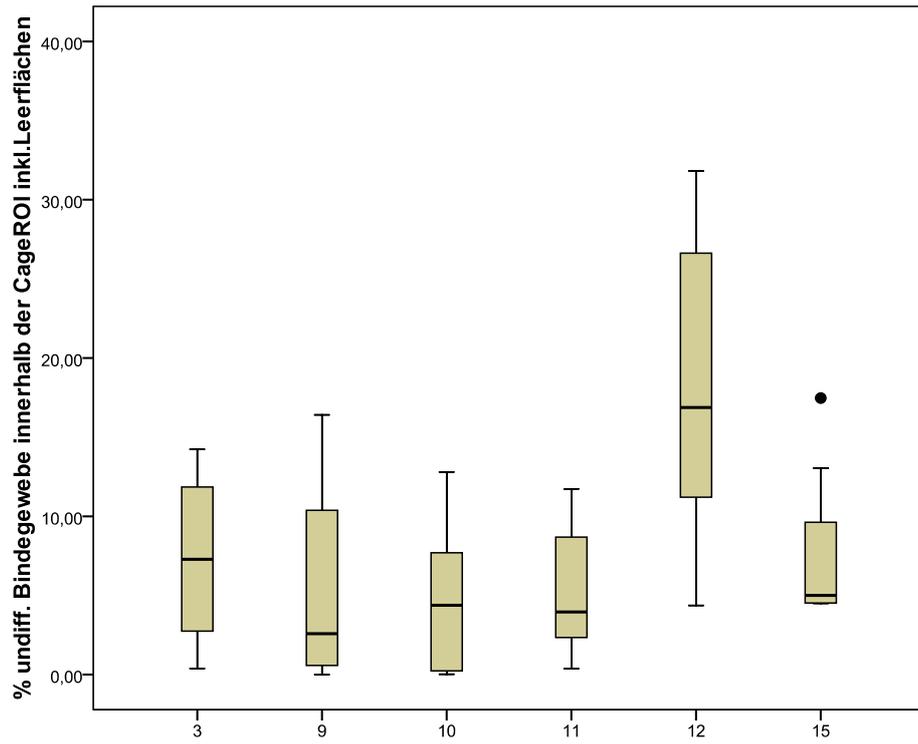


Abb. 64 Undifferenziertes Bindegewebe innerhalb der Cage- ROI, [% inklusive Leerflächen]

Der Median der Gruppe 12 (SynCage-C) unterschreitet absolut und prozentual den der Gruppen 3 (SynCage-C, TricOs) und 11 (SynCage-C, Fibrin, 0,7 mg/ml TGpIPTH1-34, TricOs). Bei Betrachtung der prozentualen Bindegewebsfläche inklusive Leerflächen ist dieser jedoch größer als der der Gruppen 3 (SynCage-C, TricOs) und 11 (SynCage-C, Fibrin, 0,7 mg/ml TGpIPTH1-34, TricOs), (Tab. 36).

Tab. 36 Median, Min- Max- Werte, undiff. Bindegewebe, CROI

Gr., n=8	undiff. Bindegewebe	Median	Min.	Max.	Perzentile		
					25	50	75
3	CoTAr/[mm <sup>2</sup> ]	51,375	31,570	58,900	46,178	51,375	53,855
	CoTAr/[% inkl. Leerfl.]	7,281	0,383	14,232	2,166	7,281	11,924
	CotAr/[%]	79,473	62,490	98,531	71,106	79,473	93,081
9	CoTAr/[mm <sup>2</sup> ]	37,655	10,790	61,490	15,000	37,655	53,045
	CoTAr/[% inkl. Leerfl.]	2,579	0,000	16,414	0,436	2,579	11,508
	CotAr/[%]	88,804	29,882	100,000	41,197	88,804	97,276
10	CoTAr/[mm <sup>2</sup> ]	45,035	24,820	64,370	38,443	45,035	59,103
	CoTAr/[% inkl. Leerfl.]	4,375	0,024	12,801	0,188	4,375	8,344
	CotAr/[%]	84,663	74,701	99,953	76,950	84,663	97,689
11	CoTAr/[mm <sup>2</sup> ]	53,755	33,040	60,570	47,480	53,755	59,470
	CoTAr/[% inkl. Leerfl.]	3,958	0,373	11,731	2,266	3,958	10,139
	CotAr/[%]	90,934	72,171	96,603	75,321	90,934	93,358
12	CoTAr/[mm <sup>2</sup> ]	27,745	19,860	46,730	21,145	27,745	32,960
	CoTAr/[% inkl. Leerfl.]	16,873	4,370	31,815	8,899	16,873	27,649
	CotAr/[%]	48,007	32,565	82,264	35,834	48,007	71,111
15	CoTAr/[mm <sup>2</sup> ]	47,810	20,770	56,190	35,850	47,810	51,128
	CoTAr/[% inkl. Leerfl.]	4,999	4,501	17,471	4,512	4,999	11,333
	CotAr/[%]	78,202	40,275	85,839	64,563	78,202	81,363

**Knorpel**

Es bestehen für die Gruppen 3 (SynCage-C, TricOs), 11 (SynCage-C, Fibrin, 0,7 mg/ml TGpPTH1-34, TricOs) und 15 (SynCage-C, Fibrin, 0,2 mg/ml TGpPTH1-34, TricOs), ([mm<sup>2</sup>], [% inklusive Leerflächen], [%]) signifikante Unterschiede (Tab. 37, Abb. 65, 66, 67).

Tab. 37 Kruskal-Wallis-Test und Bonferroni-Korrektur, Knorpel, CROI

Gr., n=8	Knorpel	Kruskal- Wallis-Test (p-Wert)	Bonferroni- Korrektur ( $\alpha$ )	Mann-Whitney-U-Test (p-Wert)				
				Gr.9	Gr.10	Gr.11	Gr.12	Gr.15
3	CgAr/[mm <sup>2</sup> ]	0,000	0,003	0,721	0,038	0,105	0,007	0,000
	CgAr/[% inkl. Leerfl.]	0,000	0,025					0,000
	CgAr/[%]	0,000	0,025					0,000
9	CgAr/[mm <sup>2</sup> ]	0,000	0,003		0,382	0,130	0,105	0,007
	CgAr/[% inkl. Leerfl.]	0,000	0,025					
	CgAr/[%]	0,000	0,025					
10	CgAr/[mm <sup>2</sup> ]	0,000	0,003			0,021	0,105	0,021
	CgAr/[% inkl. Leerfl.]	0,000	0,025					
	CgAr/[%]	0,000	0,025					
11	CgAr/[mm <sup>2</sup> ]	0,000	0,003				0,007	0,001
	CgAr/[% inkl. Leerfl.]	0,000	0,025					0,001
	CgAr/[%]	0,000	0,025				0,003	0,001
12	CgAr/[mm <sup>2</sup> ]	0,000	0,003					0,234
	CgAr/[% inkl. Leerfl.]	0,000	0,025					
	CgAr/[%]	0,000	0,025					
15	CgAr/[mm <sup>2</sup> ]	0,000	0,003					
	CgAr/[% inkl. Leerfl.]	0,000	0,025					
	CgAr/[%]	0,000	0,025					

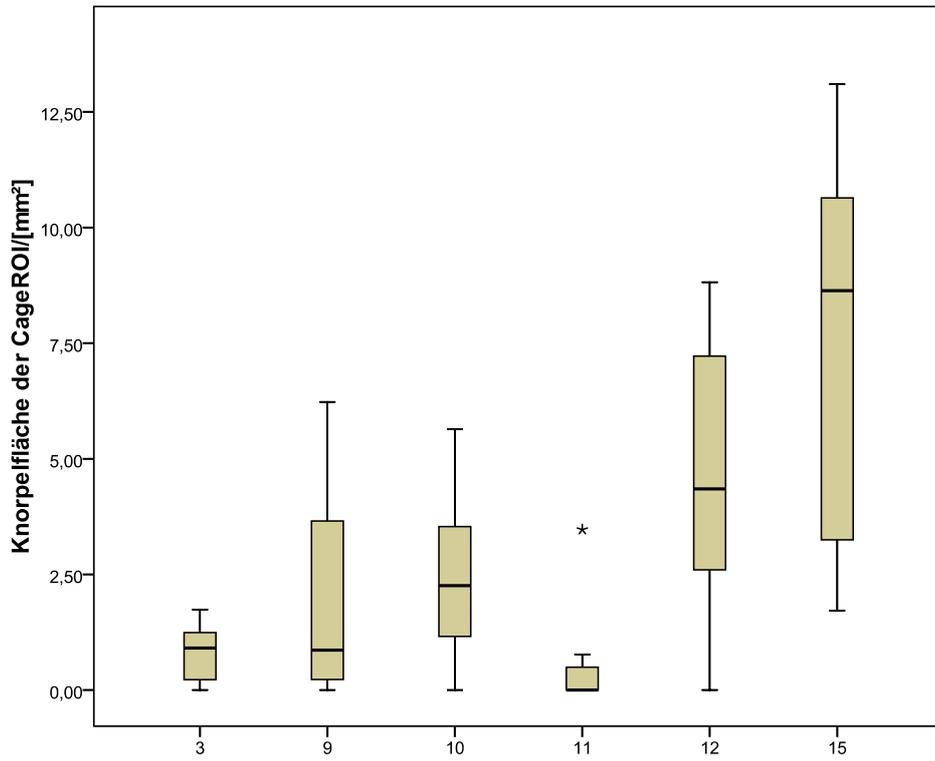


Abb. 65 Knorpelfläche der Cage- ROI, [mm<sup>2</sup>]

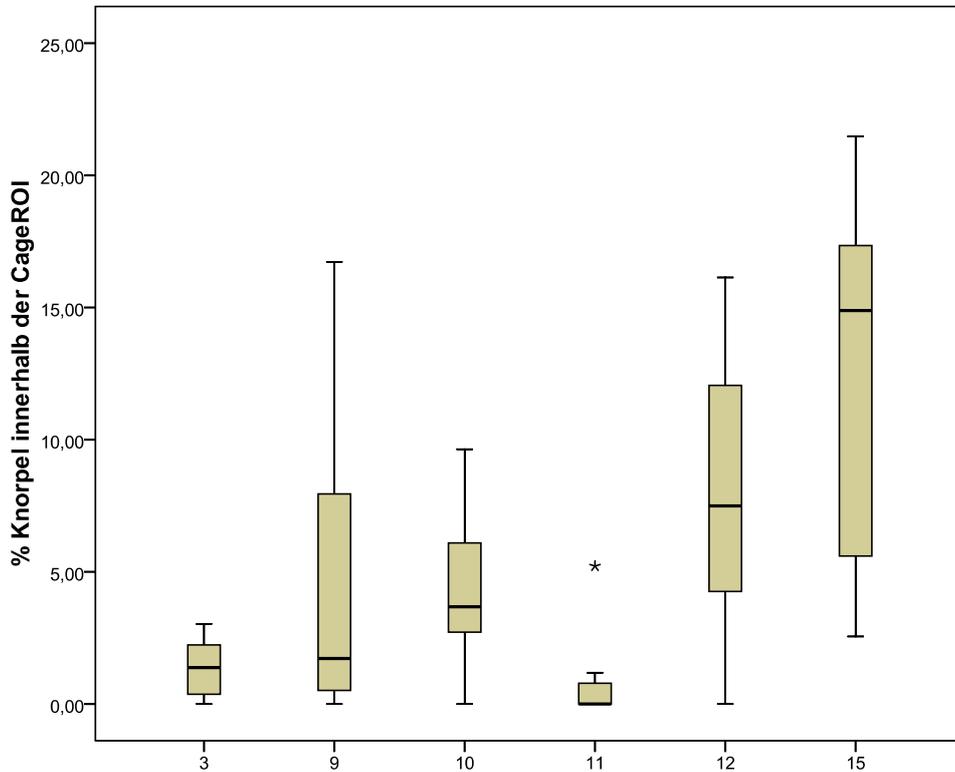


Abb. 66 Knorpelfläche innerhalb der Cage- ROI, [%]

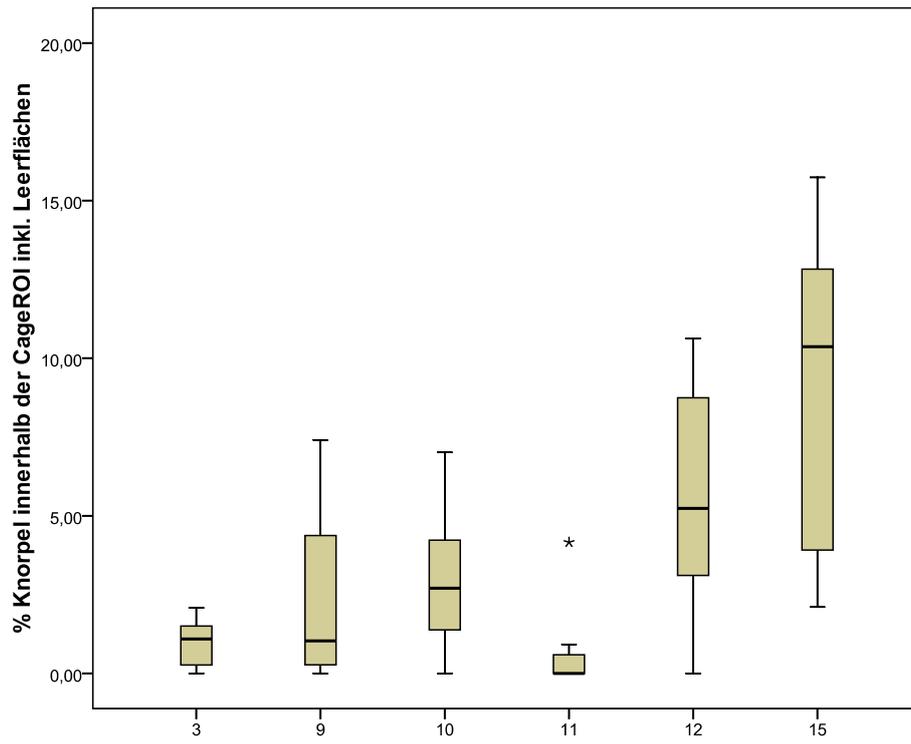


Abb. 67 Knorpelfläche innerhalb der Cage- ROI, [% inklusive Leerflächen]

Der Median der Gruppen 3 (SynCage-C, TricOs) und 11 (SynCage-C, Fibrin, 0,7 mg/ml TGpPTH1-34, TricOs), ([mm<sup>2</sup>], [% inklusive Leerflächen], [%]) unterschreitet den der Gruppe 15 (SynCage-C, Fibrin, 0,2 mg/ml PTH, TricOs), ([mm<sup>2</sup>], [% inklusive Leerflächen], [%]) signifikant (Tab. 38).

Tab. 38 Median, Min- Max- Werte, Knorpel, CROI

Gr., n=8	Knorpel	Median	Min.	Max.	Perzentile		
					25	50	75
3	CgAr/[mm <sup>2</sup> ]	0,910	0,000	1,740	0,178	0,910	1,253
	CgAr/[% inkl. Leerfl.]	1,093	0,000	2,082	0,213	1,093	1,519
	CgAr/[%]	1,380	0,000	3,030	0,310	1,380	2,365
9	CgAr/[mm <sup>2</sup> ]	0,865	0,000	6,230	0,115	0,865	4,593
	CgAr/[% inkl. Leerfl.]	1,036	0,000	7,411	0,137	1,036	5,506
	CgAr/[%]	1,720	0,000	16,729	0,257	1,720	8,823
10	CgAr/[mm <sup>2</sup> ]	2,260	0,000	5,640	0,965	2,260	3,563
	CgAr/[% inkl. Leerfl.]	2,707	0,000	7,015	1,154	2,707	4,262
	CgAr/[%]	3,676	0,000	9,641	2,584	3,676	6,232
11	CgAr/[mm <sup>2</sup> ]	0,000	0,000	3,470	0,000	0,000	0,633
	CgAr/[% inkl. Leerfl.]	0,000	0,000	4,162	0,000	0,000	0,757
	CgAr/[%]	0,000	0,000	5,216	0,000	0,000	0,984
12	CgAr/[mm <sup>2</sup> ]	4,350	0,000	8,820	2,525	4,350	7,920
	CgAr/[% inkl. Leerfl.]	5,240	0,000	10,629	3,016	5,240	9,629
	CgAr/[%]	7,492	0,000	16,136	4,255	7,492	13,308
15	CgAr/[mm <sup>2</sup> ]	8,635	1,720	13,100	2,635	8,635	10,765
	CgAr/[% inkl. Leerfl.]	10,365	2,110	15,738	3,167	10,365	12,950
	CgAr/[%]	14,884	2,558	21,472	5,097	14,884	17,549

**TricOs**

Es bestehen für die Gruppen 10 (SynCage-C, Fibrin, 0,4 mg/ml TGpIPTH1-34, TricOs) und 15 (Syncage-C, Fibrin, 0,2 mg/ml TGpIPTH1-34, TricOs) gegen Gruppe 11 (Syncage-C, Fibrin, 0,7 mg/ml TGpIPTH1-34, TricOs) signifikante Unterschiede der Ergebnisse ([mm<sup>2</sup>], [% inklusive Leerflächen], [%]), (Tab. 39, Abb. 68, 69, 70).

Tab. 39 Kruskal- Wallis- Test und Bonferroni- Korrektur, TricOs, CROI

Gr., n=8	TricOs	Kruskal- Wallis-Test (p-Wert)	Bonferroni- Korrektur (α)	Mann-Whitney-U-Test (p-Wert)			
				Gr.9	Gr.10	Gr.11	Gr.15
3	TAr/[mm <sup>2</sup> ]	0,012	0,005	0,105	0,083	0,279	0,130
	TAr/ [% inkl.Leerfl.]	0,016	0,025				
	TAr/[%]	0,025	0,025				
9	TAr/[mm <sup>2</sup> ]	0,012	0,005		0,382	0,028	0,442
	TAr/ [% inkl.Leerfl.]	0,016	0,025				
	TAr/[%]	0,025	0,025				
10	TAr/[mm <sup>2</sup> ]	0,012	0,005			0,002	0,798
	TAr/ [% inkl.Leerfl.]	0,016	0,025			0,002	
	TAr/[%]	0,025	0,025				0,010
11	TAr/[mm <sup>2</sup> ]	0,012	0,005				0,005
	TAr/ [% inkl.Leerfl.]	0,016	0,025				0,007
	TAr/[%]	0,025	0,025				0,010
15	TAr/[mm <sup>2</sup> ]	0,012	0,005				
	TAr/ [% inkl.Leerfl.]	0,016	0,025				
	TAr/[%]	0,025	0,025				

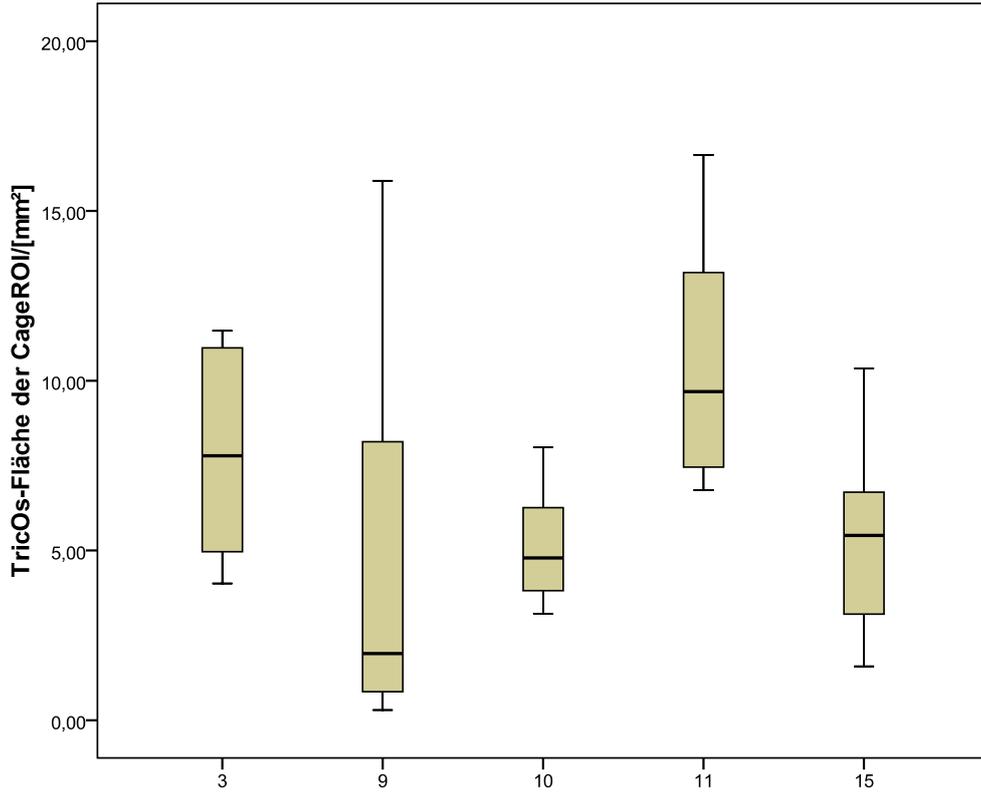


Abb. 68 TricOs- Fläche der Cage- ROI, [mm<sup>2</sup>]

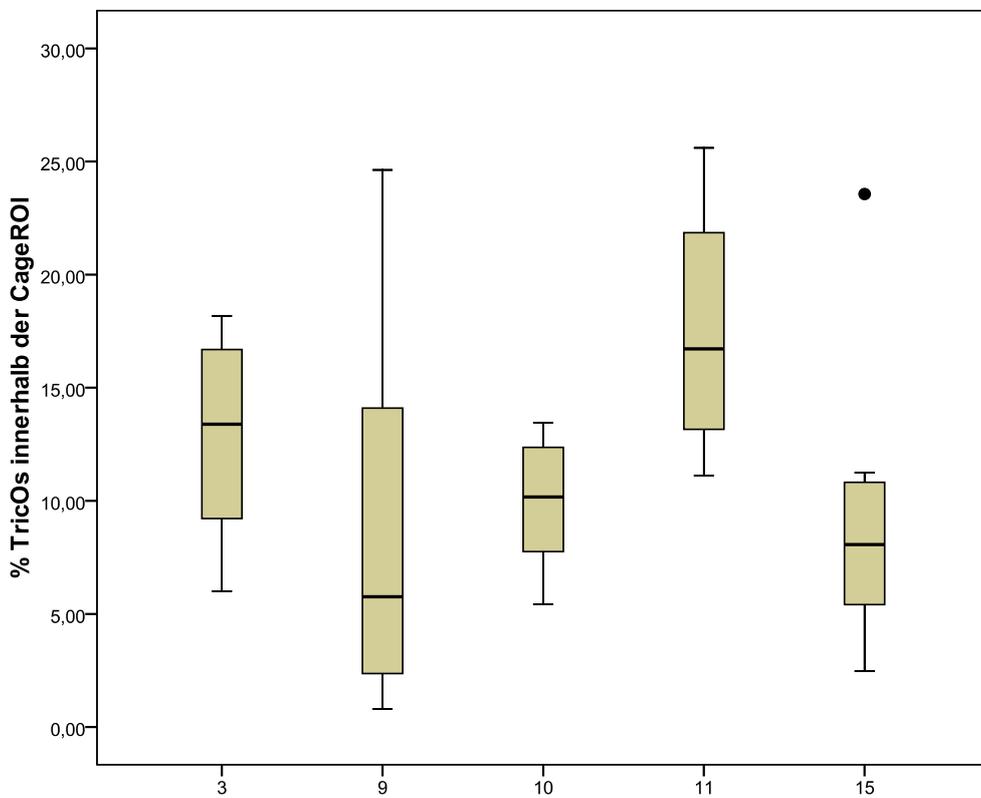


Abb. 69 TricOs- Fläche innerhalb der Cage- ROI, [%]

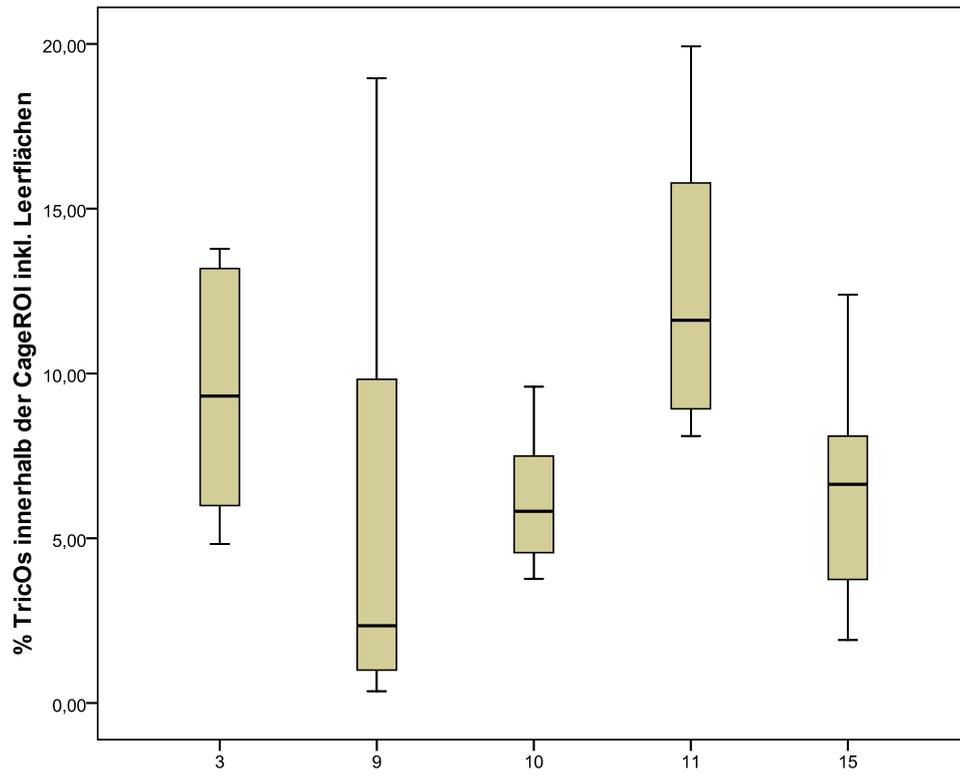


Abb. 70 TricOs- Fläche innerhalb der Cage- ROI, [% inklusive Leerflächen]

Der Median der Gruppen 10 (Syncage-C, Fibrin, 0,4 mg/ml TGpPTH1-34, TricOs) und 15 (Syncage-C, Fibrin, 0,2 mg/ml TGpPTH1-34, TricOs) ist signifikant kleiner als der, der Gruppe 11 (Syncage-C, Fibrin, 0,7 mg/ml TGpPTH1-34, TricOs), ([mm<sup>2</sup>], [% inklusive Leerflächen], [%]), (Tab. 40).

Tab. 40 Median, Min- Max- Werte, TricOs, CROI

Gr., n=8	TricOs	Median	Min.	Max.	Perzentile		
					25	50	75
3	TAr/[mm <sup>2</sup> ]	7,790	4,030	11,470	4,893	7,790	11,045
	TAr/ [% inkl.Leerfl.]	9,318	4,828	13,774	5,932	9,318	13,257
	TAr/[%]	13,388	6,006	18,179	9,060	13,388	17,246
9	TAr/[mm <sup>2</sup> ]	1,965	0,300	15,890	0,745	1,965	8,628
	TAr/ [% inkl.Leerfl.]	2,344	0,361	18,964	0,889	2,344	10,323
	TAr/[%]	5,762	0,805	24,624	2,162	5,762	14,696
10	TAr/[mm <sup>2</sup> ]	4,780	3,140	8,040	3,638	4,780	6,800
	TAr/ [% inkl.Leerfl.]	5,821	3,774	9,598	4,354	5,821	8,137
	TAr/[%]	10,167	5,428	13,458	7,368	10,167	12,531
11	TAr/[mm <sup>2</sup> ]	9,680	6,780	16,650	7,418	9,680	13,713
	TAr/ [% inkl.Leerfl.]	11,616	8,105	19,928	8,877	11,616	16,379
	TAr/[%]	16,716	11,113	25,600	12,241	16,716	22,180
15	TAr/[mm <sup>2</sup> ]	5,445	1,590	10,360	2,543	5,445	7,040
	TAr/ [% inkl.Leerfl.]	6,636	1,908	12,391	3,052	6,636	8,470
	TAr/[%]	8,065	2,472	23,562	4,608	8,065	11,030

### Absolutes Bindegewebe

Der signifikante Unterschied für den Anteil an absolutem Bindegewebe an der CROI ([mm<sup>2</sup>]) konnte im Einzelnen nicht spezifiziert werden. Es bestehen jedoch für den %- Anteil an absolutem Bindegewebe an der Cage- ROI ([%], [% inkl. Leerflächen]) bei den Gruppen 3 (Syncage-C, TricOs), 9 (Syncage-C, Fibrin, 1,0 mg/ml TGpPTH1-34, TricOs), 10 (Syncage-C, Fibrin, 0,4 mg/ml TGpPTH1-34, TricOs), 11 (Syncage-C, Fibrin, 0,7 mg/ml TGpPTH1-34, TricOs) und 15 (Syncage-C, Fibrin, 0,2 mg/ml TGpPTH1-34, TricOs) gegen Gruppe 12 (Syncage-C) signifikante Unterschiede (Tab. 41, Abb. 71, 72, 73).

Tab. 41 Kruskal-Wallis-Test und Bonferroni-Korrektur, abs. Bindegewebe, CROI

Gr., n=8	Abs. Binde- gewebe	Kruskal- Wallis-Test (p-Wert)	Bonferroni- Korrektur ( $\alpha$ )	Mann-Whitney-U-Test (p-Wert)				
				Gr.9	Gr.10	Gr.11	Gr.12	Gr.15
3	CoTabsAr/ [mm <sup>2</sup> ]	0,024	0,003	0,083	0,645	0,721	0,005	0,050
	CoTabsAr/ [% inkl.Leerfl.]	0,000	0,01				0,000	
	CotabsAr/ [%]	0,000	0,003	0,161	0,161	0,105	0,000	0,130
9	CoTabsAr/ [mm <sup>2</sup> ]	0,024	0,003		0,195	0,065	0,645	0,721
	CoTabsAr/ [% inkl.Leerfl.]	0,000	0,01				0,000	
	CotabsAr/ [%]	0,000	0,003		0,505	0,038	0,000	0,798
10	CoTabsAr/ [mm <sup>2</sup> ]	0,024	0,003			0,798	0,028	0,328
	CoTabsAr/ [% inkl.Leerfl.]	0,000	0,01				0,000	
	CotabsAr/ [%]	0,000	0,003			0,010	0,000	0,382
11	CoTabsAr/ [mm <sup>2</sup> ]	0,024	0,003				0,007	0,130
	CoTabsAr/ [% inkl.Leerfl.]	0,000	0,01				0,000	
	CotabsAr/ [%]	0,000	0,003				0,000	0,010
12	CoTabsAr/ [mm <sup>2</sup> ]	0,024	0,003					0,279
	CoTabsAr/ [% inkl.Leerfl.]	0,000	0,01					0,000
	CotabsAr/ [%]	0,000	0,003					0,000
15	CoTabsAr/ [mm <sup>2</sup> ]	0,024	0,003					
	CoTabsAr/ [% inkl.Leerfl.]	0,000	0,01					
	CotabsAr/ [%]	0,000	0,003					

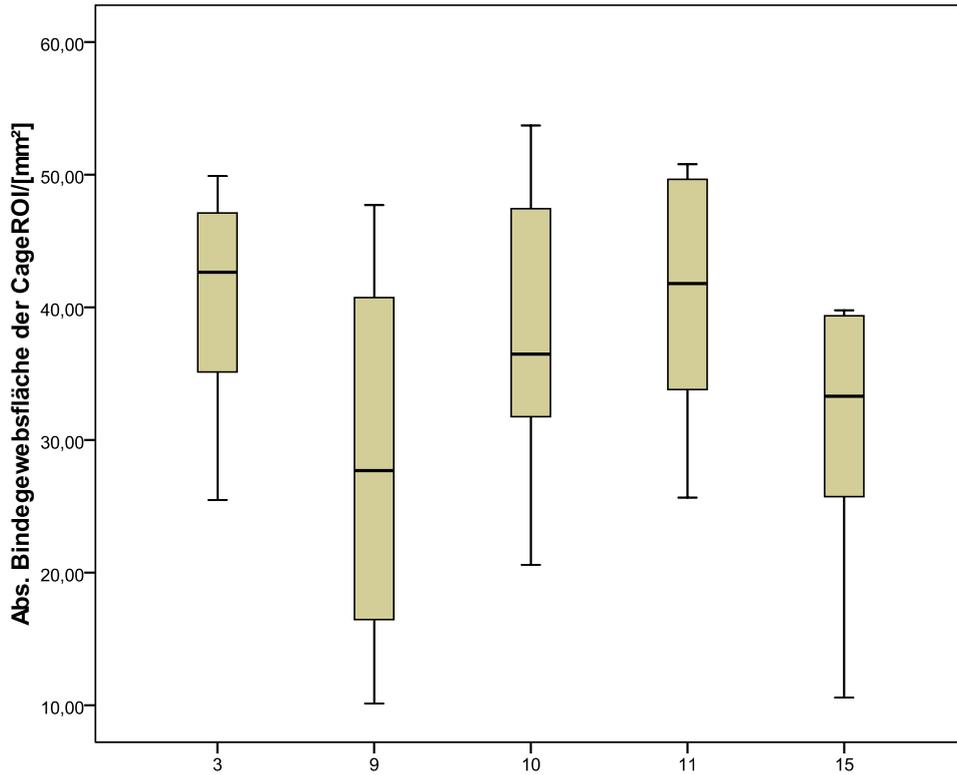


Abb. 71 Absolute Bindegewebsfläche der Cage- ROI, [mm<sup>2</sup>]

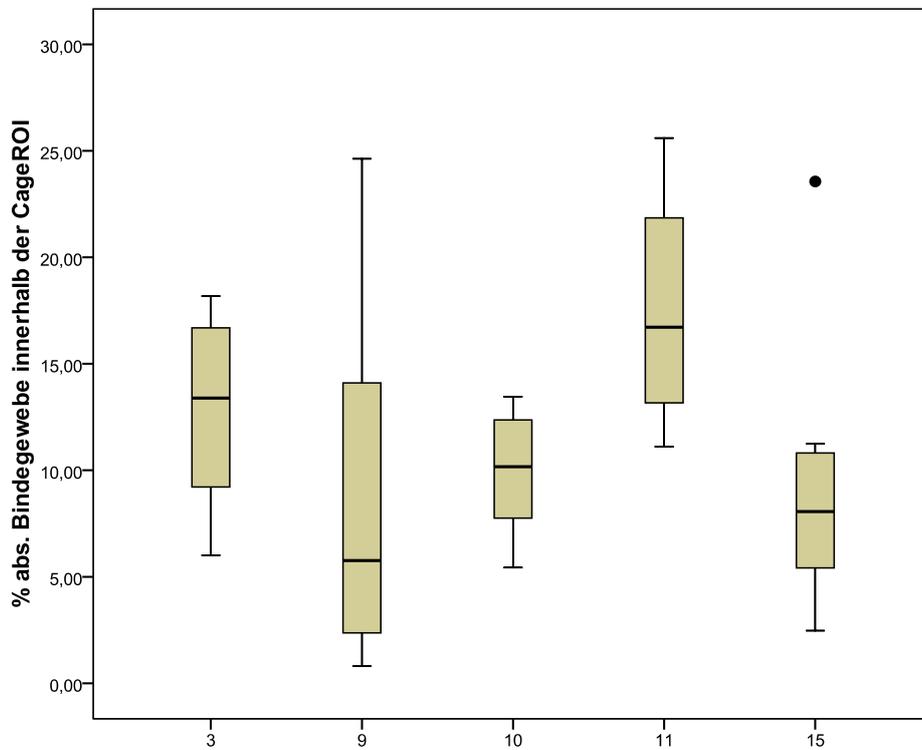


Abb. 72 Absolutes Bindegewebe innerhalb der Cage- ROI, [%]

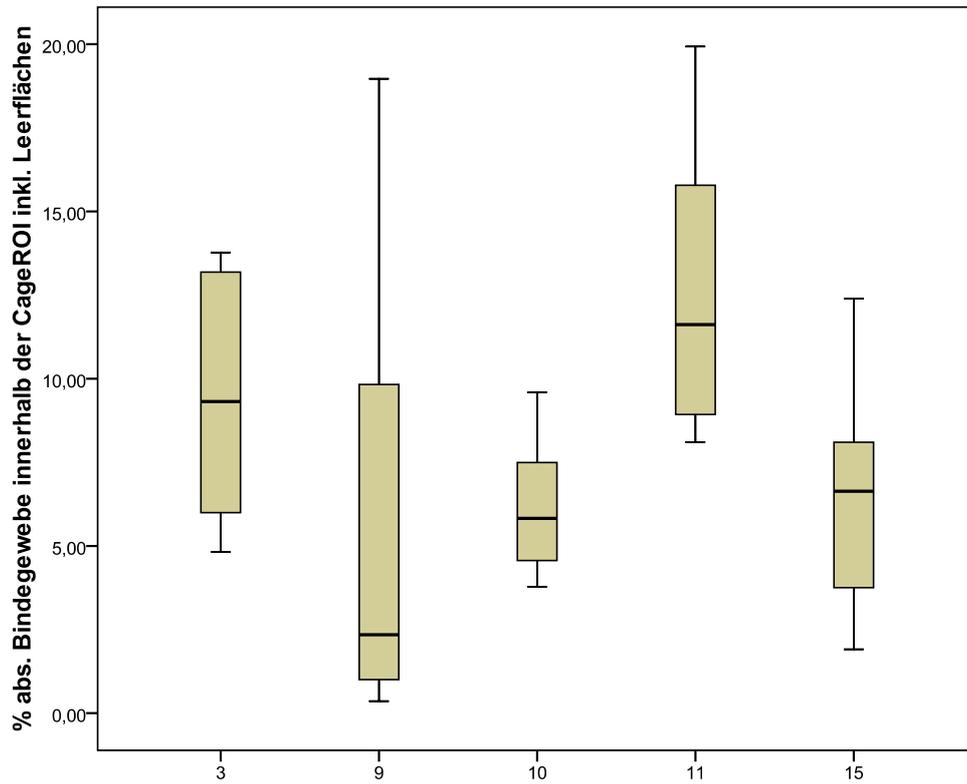


Abb. 73 Absolutes Bindegewebe innerhalb der Cage- ROI, [% inklusive Leerflächen]

Eine graphische Darstellung der Gruppe 12 (Syncage-C) entfällt aufgrund der abweichenden Berechnung der absoluten Bindegewebsfläche (CoTabs. = undiff. Bindegewebe – Knorpel). Der Median der Gruppe 12 (Syncage-C) liegt absolut und prozentual unter denen der Gruppen 3 (Syncage-C, TricOs), 9 (Syncage-C, Fibrin, 1,0 mg/ml TGpPTH1-34, TricOs), 10 (Syncage-C, Fibrin, 0,4 mg/ml TGpPTH1-34, TricOs), 11 (Syncage-C, Fibrin, 0,7 mg/ml TGpPTH1-34, TricOs) und 15 (Syncage-C, Fibrin, 0,2 mg/ml TGpPTH1-34, TricOs), (Tab. 42).

Tab. 42 Median, Min- Max- Werte, abs. Bindegewebe, CROI

Gr., n=8	Abs. Bindegewebe	Median	Min.	Max.	Perzentile		
					25	50	75
3	CoTabsAr/ [mm <sup>2</sup> ]	42,650	25,490	49,890	34,073	42,650	47,143
	CoTabsAr/ [% inkl.Leerfl.]	9,318	4,828	13,774	5,932	9,318	13,257
	CotabsAr/ [%]	13,388	6,006	18,179	9,060	13,388	17,246
9	CoTabsAr/ [mm <sup>2</sup> ]	27,695	10,140	47,700	13,390	27,695	43,170
	CoTabsAr/ [% inkl.Leerfl.]	2,344	0,361	18,964	0,889	2,344	10,323
	CotabsAr/ [%]	5,762	0,805	24,624	2,162	5,762	14,696
10	CoTabsAr/ [mm <sup>2</sup> ]	36,475	20,590	53,710	31,105	36,475	50,443
	CoTabsAr/ [% inkl.Leerfl.]	5,821	3,774	9,598	4,354	5,821	8,137
	CotabsAr/ [%]	10,167	5,428	13,458	7,368	10,167	12,531
11	CoTabsAr/ [mm <sup>2</sup> ]	41,795	25,660	50,790	31,665	41,795	49,923
	CoTabsAr/ [% inkl.Leerfl.]	11,616	8,105	19,928	8,877	11,616	16,379
	CotabsAr/ [%]	16,716	11,113	25,600	12,241	16,716	22,180
12	CoTabsAr/ [mm <sup>2</sup> ]	24,255	11,240	40,910	14,033	24,255	31,918
	CoTabsAr/ [% inkl.Leerfl.]	27,703	19,757	46,661	21,094	27,703	32,948
	CotabsAr/ [%]	27,682	19,699	46,635	21,077	27,682	32,944
15	CoTabsAr/ [mm <sup>2</sup> ]	33,295	10,580	39,790	23,638	33,295	39,525
	CoTabsAr/ [% inkl.Leerfl.]	6,636	1,908	12,391	3,052	6,636	8,470
	CotabsAr/ [%]	8,065	2,472	23,562	4,608	8,065	11,030

**Blutgefäßdichte**

Der Gruppenvergleich ergab bei Anwendung des Kruskal- Wallis- Tests einen signifikanten Unterschied für die Blutgefäßdichte. Die, der Gruppe 3 (Syncage-C, TricOs) ist signifikant höher als die, der Gruppen 10 (Syncage-C, Fibrin, 0,4 mg/ml TGplPTH1-34, TricOs), 11 (Syncage-C, Fibrin, 0,7 mg/ml TGplPTH1-34, TricOs), 12 (Syncage-C) und 15 (Syncage-C, Fibrin, 0,2 mg/ml TGplPTH1-34, TricOs), (Abb. 74, Tab. 43, 44).

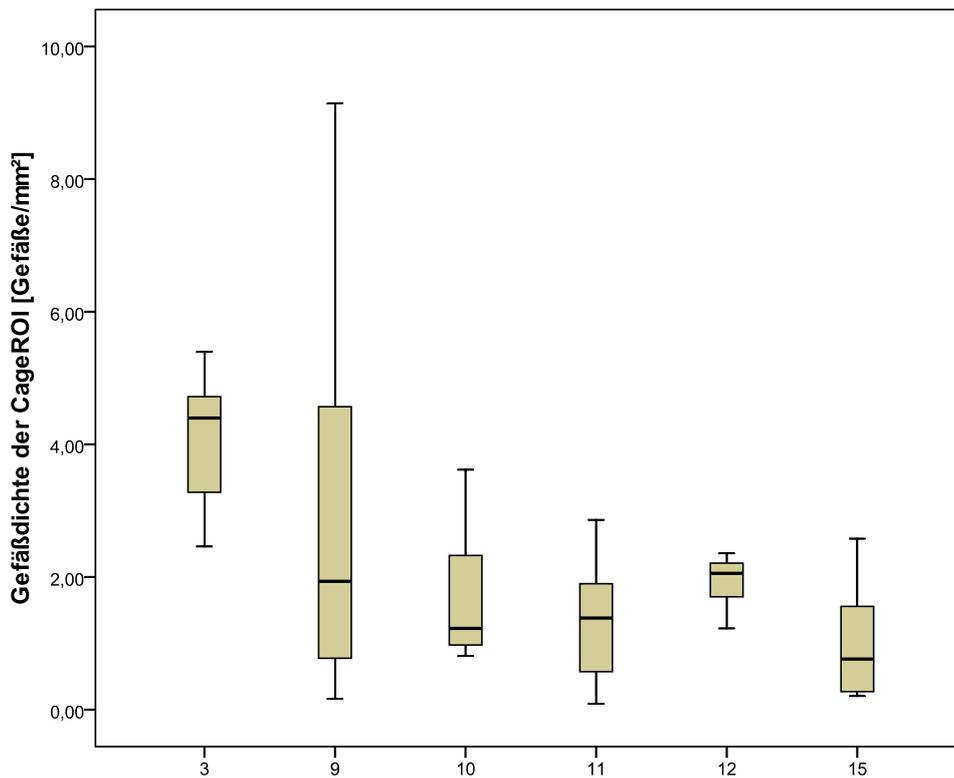


Abb. 74 Gefäßdichte der Cage- ROI, [Gefäße/mm<sup>2</sup>]

Tab. 43 Kruskal-Wallis-Test und Bonferroni-Korrektur, Blutgefäßdichte, Cage- ROI

Gr., n=8	Gefäßdichte	Kruskal- Wallis-Test (p-Wert)	Bonferroni- Korrektur (α)	Mann-Whitney-U-Test (p-Wert)				
				Gr.9	Gr.10	Gr.11	Gr.12	Gr.15
3	[Gefäße/mm <sup>2</sup> ]	0,002	0,003	0,130	0,002	0,000	0,000	0,000
9	[Gefäße/mm <sup>2</sup> ]		0,003	/	0,645	0,328	0,959	0,161
10	[Gefäße/mm <sup>2</sup> ]		0,003	/	/	0,574	0,234	0,195
11	[Gefäße/mm <sup>2</sup> ]		0,003	/	/	/	0,130	0,442
12	[Gefäße/mm <sup>2</sup> ]		0,003	/	/	/	/	0,021
15	[Gefäße/mm <sup>2</sup> ]		0,003	/	/	/	/	/

Tab. 44 Median, Min- Max- Werte der Gefäßdichte der Cage- ROI

Gr., n=8	Gefäßdichte	Median	Min.	Max.	Perzentile		
					25	50	75
3	[Gefäße/mm <sup>2</sup> ]	4,397	2,461	5,393	3,154	4,397	4,742
9	[Gefäße/mm <sup>2</sup> ]	1,935	0,163	9,139	0,623	1,935	5,415
10	[Gefäße/mm <sup>2</sup> ]	1,225	0,808	3,618	0,937	1,225	2,614
11	[Gefäße/mm <sup>2</sup> ]	1,382	0,088	2,863	0,508	1,382	2,042
12	[Gefäße/mm <sup>2</sup> ]	2,056	1,225	2,357	1,695	2,056	2,253
15	[Gefäße/mm <sup>2</sup> ]	0,764	0,206	2,577	0,264	0,764	1,589

### Osteoklastendichte

Der Gruppenvergleich der Osteoklastendichte der Cage- ROI ergab keine signifikanten Unterschiede (Tab. 45).

Tab. 45 Median, Min-Max-Werte;Kruskal-Wallis-Test, Osteoklastendichte, CROI

Gr., n=8	Osteoklasten- dichte	Kruskal- Wallis-Test (p-Wert)	Median	Min.	Max.	Perzentile		
						25	50	75
3	[Oc/mm <sup>2</sup> ]	0,224	18,068	0,616	89,907	9,772	18,068	36,700
9	[Oc/mm <sup>2</sup> ]		9,391	0,108	191,262	2,605	9,391	23,152
10	[Oc/mm <sup>2</sup> ]		24,043	0,491	58,150	10,014	24,043	51,457
11	[Oc/mm <sup>2</sup> ]		13,506	2,787	31,715	8,159	13,506	22,679
12	[Oc/mm <sup>2</sup> ]		9,208	3,846	21,818	6,108	9,208	12,453
15	[Oc/mm <sup>2</sup> ]		21,960	9,373	52,809	12,031	21,960	31,560

## 4.5.2. 5Teil- ROIs

## Knochen

Es besteht ein signifikantes Ergebnis, sowohl für die prozentuale Knochenfläche, als auch für den prozentualen Knochenanteil inklusive Leerflächen der 5Teil- ROIs.

Bei Anwendung des Mann-Whitney-U-Tests lieferten die ermittelten p-Werte im Vergleich zum korrigierten  $\alpha$ -Wert keine Signifikanzen. Der Unterschied zwischen den sechs untersuchten Gruppen konnte nicht spezifiziert werden (Tab. 46, Abb. 75, 76).

Tab. 46 Kruskal-Wallis-Test und Bonferroni-Korrektur, Knochen, 5TeilROIs

Gr., n=8	Knochen	Kruskal-Wallis-Test (p-Wert)	Bonferroni-Korrektur ( $\alpha$ )	Mann-Whitney-U-Test (p-Wert)				
				Gr.9	Gr.10	Gr.11	Gr.12	Gr.15
3	BAr/ [% inkl.Leerfl.]	0,015	0,003	0,105	0,442	0,645	0,010	0,161
	BAr/[%]	0,027	0,003	0,382	0,382	0,442	0,010	0,234
9	BAr/ [% inkl.Leerfl.]	0,015	0,003	/	0,574	0,161	0,007	0,574
	BAr/[%]	0,027	0,003	/	0,798	0,382	0,005	0,721
10	BAr/ [% inkl.Leerfl.]	0,015	0,003	/	/	0,721	0,010	0,798
	BAr/[%]	0,027	0,003	/	/	0,959	0,010	0,574
11	BAr/ [% inkl.Leerfl.]	0,015	0,003	/	/	/	0,021	0,195
	BAr/[%]	0,027	0,003	/	/	/	0,021	0,328
12	BAr/ [% inkl.Leerfl.]	0,015	0,003	/	/	/	/	0,010
	BAr/[%]	0,027	0,003	/	/	/	/	0,021
15	BAr/ [% inkl.Leerfl.]	0,015	0,003	/	/	/	/	/
	BAr/[%]	0,027	0,003	/	/	/	/	/

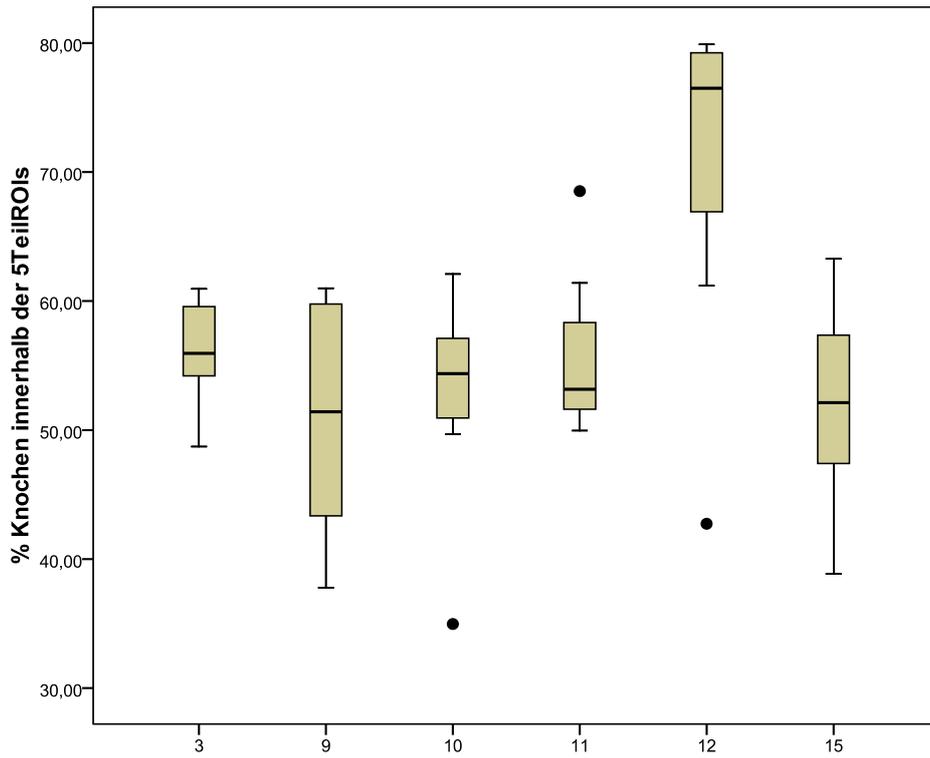


Abb. 75 Knochen innerhalb der 5TeilROIs, [%]

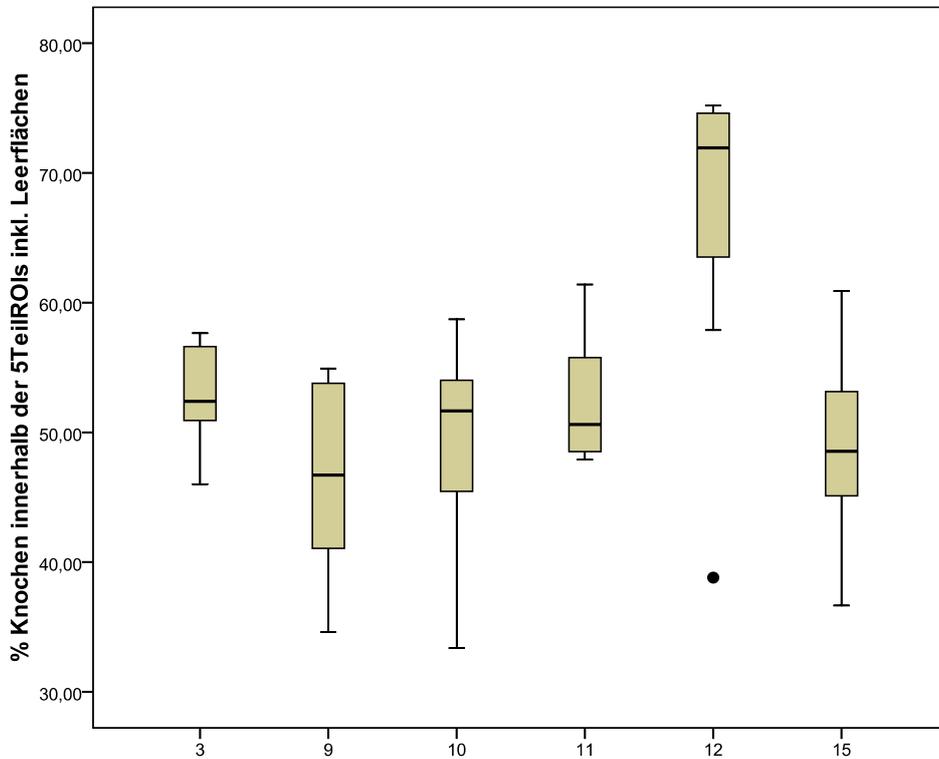


Abb. 76 Knochengewebe innerhalb der 5TeilROIs, [% inklusive Leerflächen]

Der Median der Leercagegruppe (SynCage-C) ist prozentual am größten, während dieser bei Gruppe 9 (SynCage-C, Fibrin, 1,0 mg/ml TGpIPTH1-34, TricOs) prozentual am kleinsten ist (Tab. 47).

Tab. 47 Median, Min- Max- Werte, Knochen, 5TeilROIs

Gr., n=8	Knochen	Median	Min.	Max.	Perzentile		
					25	50	75
3	BAr/ [% inkl.Leerfl.]	52,395	46,004	57,644	50,631	52,395	56,927
	BAr/[%]	55,952	48,720	60,944	53,863	55,952	59,768
9	BAr/ [% inkl.Leerfl.]	46,708	34,603	54,931	40,588	46,708	54,045
	BAr/[%]	51,417	37,784	60,989	42,942	51,417	60,050
10	BAr/ [% inkl.Leerfl.]	51,658	33,375	58,722	45,135	51,658	54,308
	BAr/[%]	54,379	34,970	62,098	50,312	54,379	57,491
11	BAr/ [% inkl.Leerfl.]	50,608	47,899	61,404	48,230	50,608	57,353
	BAr/[%]	53,167	49,953	68,518	51,148	53,167	59,865
12	BAr/ [% inkl.Leerfl.]	71,938	38,808	75,210	60,702	71,938	74,695
	BAr/[%]	76,494	42,740	79,892	64,054	76,494	79,368
15	BAr/ [% inkl.Leerfl.]	48,540	36,662	60,896	44,334	48,540	54,726
	BAr/[%]	52,118	38,855	63,269	46,724	52,118	59,635

### Mineralisierter Knochen

Es bestehen bei Testung der Gruppen 9 (SynCage-C, Fibrin, 1,0 mg/ml TGpPTH1-34, TricOs) und 15 (SynCage-C, Fibrin, 0,2 mg/ml TGpPTH1-34, TricOs) gegen Gruppe 12 (SynCage-C) signifikante Ergebnisse bzgl. der prozentualen mineralisierten Knochenfläche mit und ohne Leerflächen (Tab. 48, Abb. 77, 78).

Tab. 48 Kruskal- Wallis- Test und Bonferroni- Korrektur, min. Knochen, 5TeilROIs

Gr., n=8	min. Knochen	Kruskal- Wallis-Test (p-Wert)	Bonferroni- Korrektur ( $\alpha$ )	Mann-Whitney-U-Test (p-Wert)				
				Gr.9	Gr.10	Gr.11	Gr.12	Gr.15
3	BMdAr/ [% inkl.Leerfl.]	0,002	0,003	0,021	0,161	0,798	0,021	0,028
	BMdAr/[%]	0,002	0,025					
9	BMdAr/ [% inkl.Leerfl.]	0,002	0,003		0,382	0,038	0,003	1,000
	BMdAr/[%]	0,002	0,025				0,002	
10	BMdAr/ [% inkl.Leerfl.]	0,002	0,003			0,195	0,007	0,328
	BMdAr/[%]	0,002	0,025					
11	BMdAr/ [% inkl.Leerfl.]	0,002	0,003				0,021	0,038
	BMdAr/[%]	0,002	0,025					
12	BMdAr/ [% inkl.Leerfl.]	0,002	0,003					0,003
	BMdAr/[%]	0,002	0,025					0,002
15	BMdAr/ [% inkl.Leerfl.]	0,002	0,003					
	BMdAr/[%]	0,002	0,025					

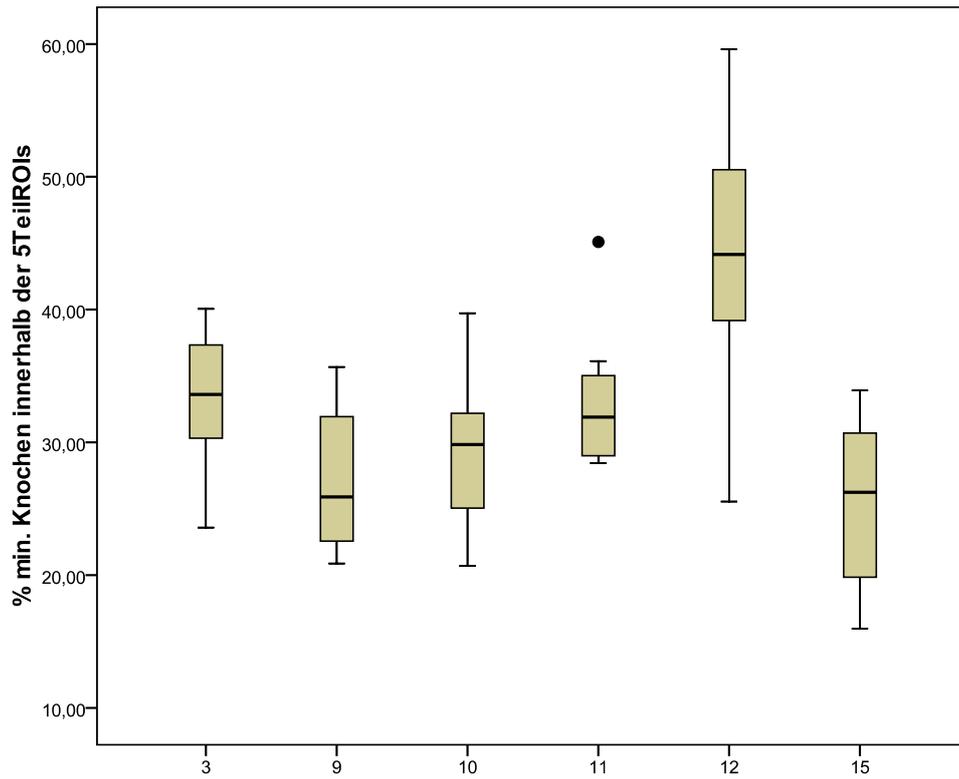


Abb. 77 Mineralisierter Knochen innerhalb der 5TeilROIs, [%]

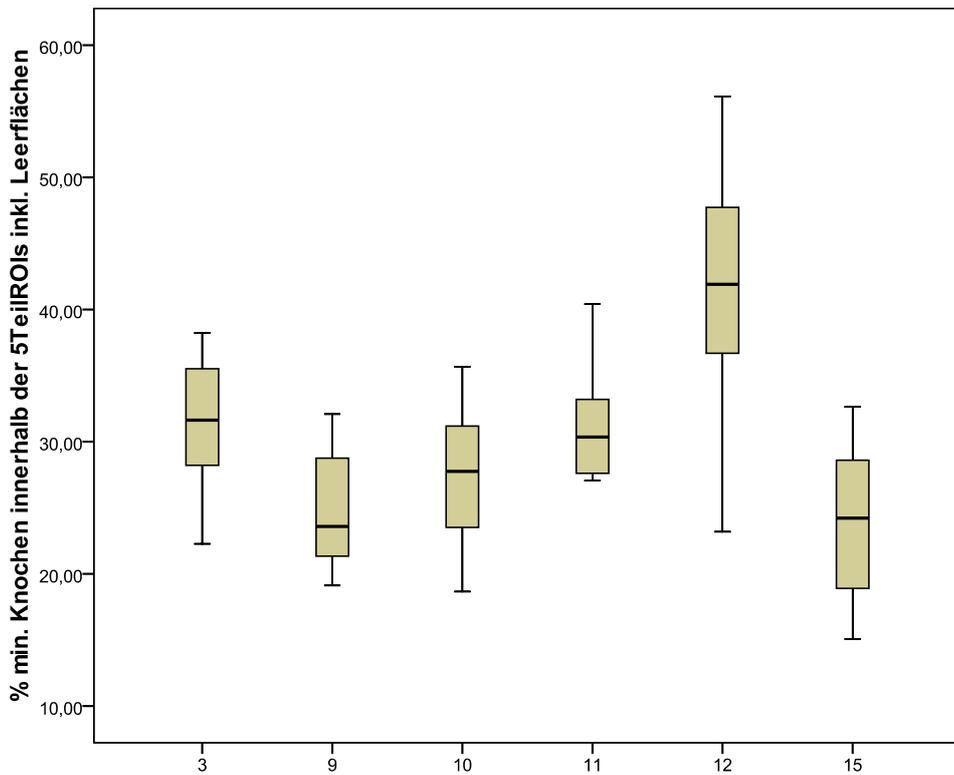


Abb. 78 Mineralisierter Knochen innerhalb der 5TeilROIs, [%<sub>inkl. Leerflächen</sub>]

Der Median der Gruppen 9 (SynCage-C, Fibrin, 1,0 mg/ml TGpIPTH1-34, TricOs) und 15 (SynCage-C, Fibrin, 0,2 mg/ml TGpIPTH1-34, TricOs) unterschreitet den der Gruppe 12 (SynCage-C) signifikant (Tab. 49).

Tab. 49 Median, Min- Max- Werte, min. Knochen, 5TeilROIs

Gr., n=8	min. Knochen	Median	Min.	Max.	Perzentile		
					25	50	75
3	BMdAr/ [% inkl.Leerfl.]	31,635	22,271	38,227	27,176	31,635	35,690
	BMdAr/[%]	33,610	23,586	40,046	29,524	33,610	37,627
9	BMdAr/ [% inkl.Leerfl.]	23,581	19,122	32,093	20,942	23,581	28,821
	BMdAr/[%]	25,890	20,880	35,678	22,174	25,890	32,050
10	BMdAr/ [% inkl.Leerfl.]	27,757	18,656	35,681	22,556	27,757	31,337
	BMdAr/[%]	29,830	20,687	39,725	23,842	29,830	32,705
11	BMdAr/ [% inkl.Leerfl.]	30,355	27,050	40,409	27,518	30,355	33,938
	BMdAr/[%]	31,900	28,436	45,091	28,797	31,900	35,576
12	BMdAr/ [% inkl.Leerfl.]	41,913	23,193	56,122	35,772	41,913	49,128
	BMdAr/[%]	44,151	25,543	59,615	38,008	44,151	51,805
15	BMdAr/ [% inkl.Leerfl.]	24,219	15,067	32,634	17,358	24,219	29,175
	BMdAr/[%]	26,238	15,968	33,906	18,144	26,238	31,704

### Undifferenziertes Bindegewebe

Der Kruskal- Wallis- Test ergab bei Vergleich der Gruppen 3 bis 15 ein signifikantes Ergebnis für die prozentuale Bindegewebsfläche ([%], [%<sub>inklusive Leerflächen</sub>]), (Tab. 50).

Die Gruppen 3 (SynCage-C, TricOs), 9 (SynCage-C, Fibrin, 1,0 mg/ml TGpIPTH1-34, TricOs) und 10 (SynCage-C, Fibrin, 0,4 mg/ml TGpIPTH1-34, TricOs) haben signifikant größere Anteile an undifferenziertem Bindegewebe als Gruppe 12 (SynCage-C), (Tab. 50, Abb. 79, 80).

Bei den prozentualen Bindegewebsflächen inklusive Leerflächen konnte der Unterschied zwischen den sechs untersuchten Gruppen nicht spezifiziert werden.

Tab. 50 Kruskal-Wallis-Test, Bonferroni- Korrektur, undiff. Bindegewebe, 5TeilROIs

Gr., n=8	undiff. Binde- gewebe	Kruskal- Wallis-Test (p-Wert)	Bonferroni- Korrektur ( $\alpha$ )	Mann-Whitney-U-Test (p-Wert)				
				Gr.9	Gr.10	Gr.11	Gr.12	Gr.15
3	CoTAr/ [% inkl.Leerfl.]	0,039	0,003	0,721	0,574	0,505	0,010	0,279
	CotAr/[%]	0,025	0,01				0,010	
9	CoTAr/ [% inkl.Leerfl.]	0,039	0,003		1,000	0,645	0,007	0,878
	CotAr/[%]	0,025	0,01				0,005	
10	CoTAr/ [% inkl.Leerfl.]	0,039	0,003			0,798	0,010	0,574
	CotAr/[%]	0,025	0,01				0,010	
11	CoTAr/ [% inkl.Leerfl.]	0,039	0,003				0,015	0,505
	CotAr/[%]	0,025	0,01				0,021	
12	CoTAr/ [% inkl.Leerfl.]	0,039	0,003					0,015
	CotAr/[%]	0,025	0,01					0,015
15	CoTAr/ [% inkl.Leerfl.]	0,039	0,003					
	CotAr/[%]	0,025	0,01					

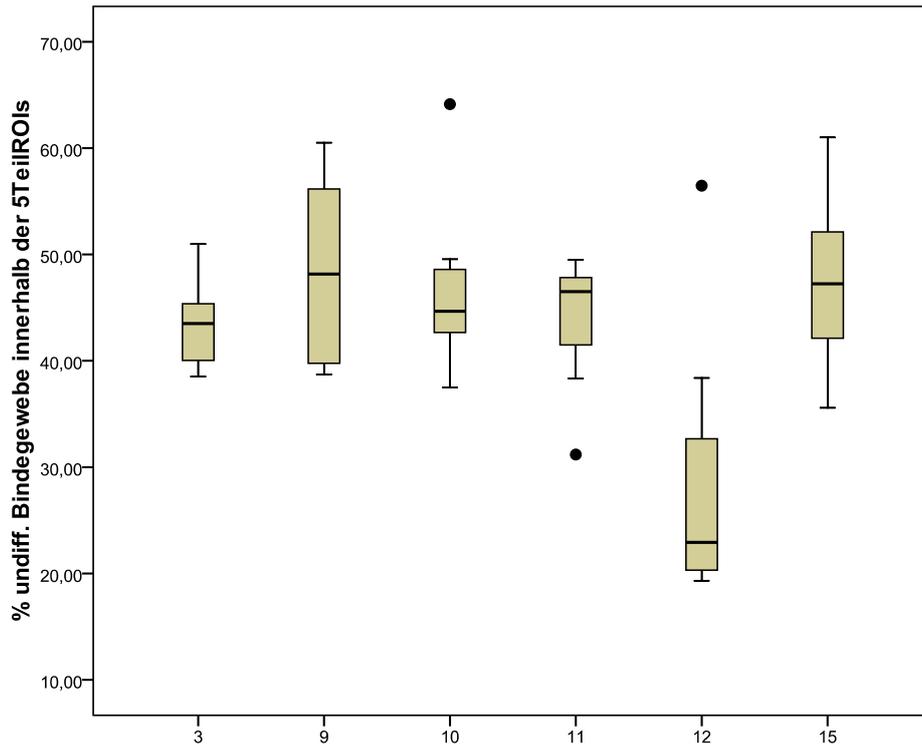


Abb. 79 Undifferenzierte Bindegewebsfläche innerhalb der 5TeilROIs, [%]

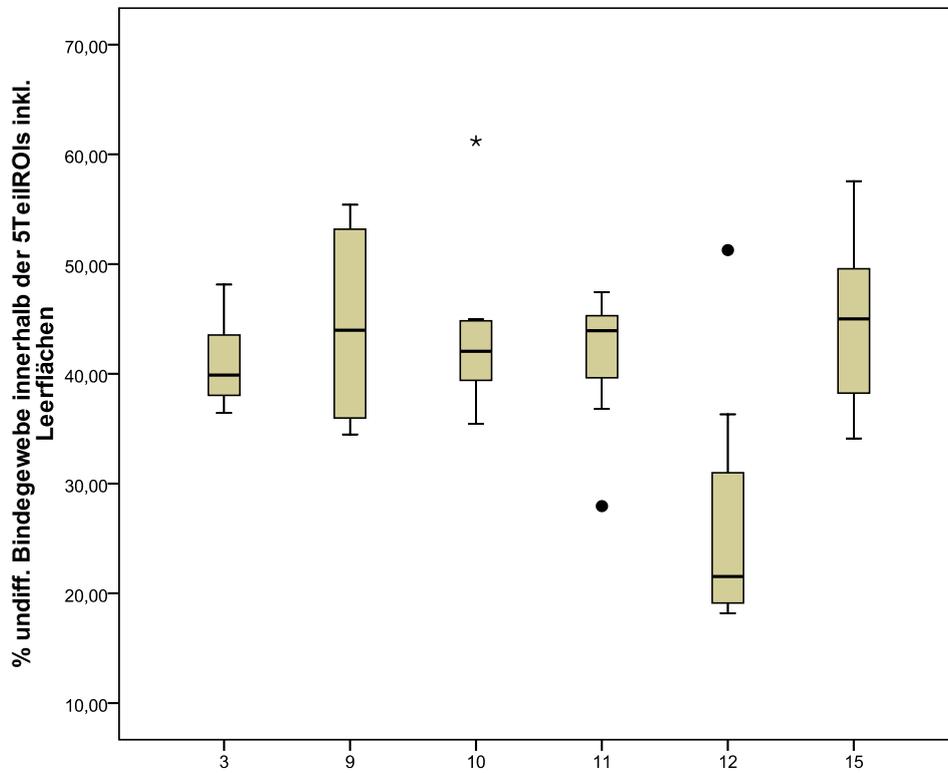


Abb. 80 Undiff. Bindegewebsfläche innerhalb der 5TeilROIs [%inkl. Leerflächen]

Der Median der Leercagegruppe (SynCage-C) ist prozentual ([%], [% inkl. Leerflächen]) am niedrigsten, während dieser bei Gruppe 15 (SynCage-C, Fibrin, 0,2 mg/ml TGpIPTH1-34, TricOs) am höchsten ist (Tab. 51).

Tab. 51 Median, Min- Max- Werte, undiff. Bindegewebe, 5TeilROIs

Gr., n=8	undiff. Binde- gewebe	Median	Min.	Max.	Perzentile		
					25	50	75
3	CoTAr/ [% inkl.Leerfl.]	39,884	36,433	48,136	37,984	39,884	43,872
	CotAr/[%]	43,502	38,518	50,977	39,882	43,502	45,657
9	CoTAr/ [% inkl.Leerfl.]	43,972	34,473	55,412	35,755	43,972	53,427
	CotAr/[%]	48,161	38,717	60,506	39,390	48,161	56,531
10	CoTAr/ [% inkl.Leerfl.]	42,061	35,450	61,206	38,542	42,061	44,898
	CotAr/[%]	44,656	37,488	64,132	42,303	44,656	49,076
11	CoTAr/ [% inkl.Leerfl.]	43,935	27,949	47,457	38,227	43,935	45,761
	CotAr/[%]	46,501	31,187	49,492	39,918	46,501	48,347
12	CoTAr/ [% inkl.Leerfl.]	21,541	18,187	51,273	18,857	21,541	33,646
	CotAr/[%]	22,924	19,319	56,468	20,086	22,924	35,526
15	CoTAr/ [% inkl.Leerfl.]	45,012	34,113	57,565	36,239	45,012	49,994
	CotAr/[%]	47,236	35,573	61,007	39,813	47,236	52,700

**Knorpel**

Der Kruskal- Wallis- Test ergab bei Vergleich der Gruppen 3 bis 15 ein signifikantes Ergebnis für die prozentuale Knorpelfläche (Tab. 52, Abb. 81, 82).

Tab. 52 Kruskal- Wallis- Test und Bonferroni- Korrektur, Knorpel, 5TeilROIs

Gr., n=8	Knorpel	Kruskal- Wallis-Test (p-Wert)	Bonferroni- Korrektur ( $\alpha$ )	Mann-Whitney-U-Test (p-Wert)				
				Gr.9	Gr.10	Gr.11	Gr.12	Gr.15
3	CgAr/[% inkl.Leerfl.]	0,001	0,003	0,798	0,038	0,105	0,007	0,000
	CgAr/[%]	0,001	0,025					0,000
9	CgAr/[% inkl.Leerfl.]	0,001	0,003		0,382	0,130	0,105	0,007
	CgAr/[%]	0,001	0,025					
10	CgAr/[% inkl.Leerfl.]	0,001	0,003			0,015	0,130	0,021
	CgAr/[%]	0,001	0,025					
11	CgAr/[% inkl.Leerfl.]	0,001	0,003				0,007	0,001
	CgAr/[%]	0,001	0,025					0,001
12	CgAr/[% inkl.Leerfl.]	0,001	0,003					0,234
	CgAr/[%]	0,001	0,025					
15	CgAr/[% inkl.Leerfl.]	0,001	0,003					
	CgAr/[%]	0,001	0,025					

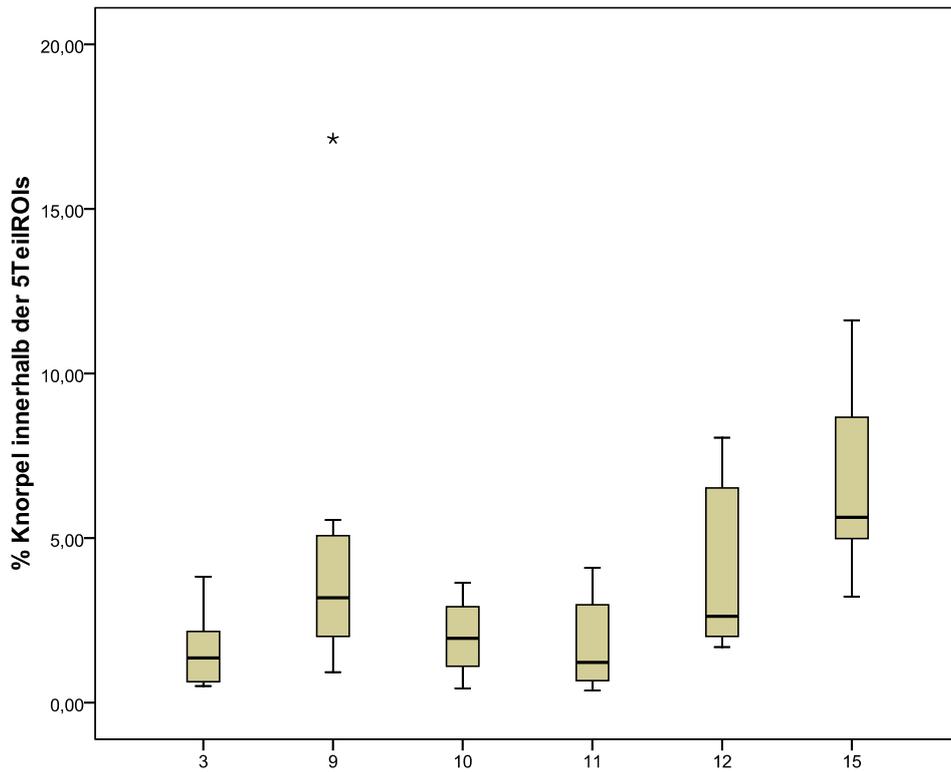


Abb. 81 Knorpel innerhalb der 5TeilROIs, [%]

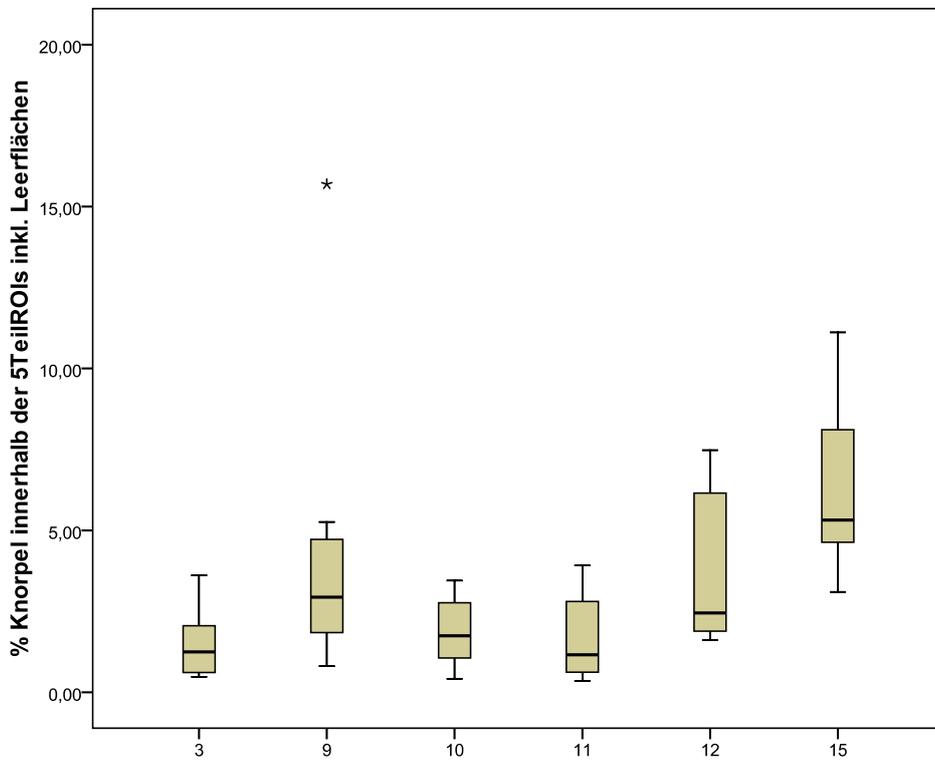


Abb. 82 Knorpel innerhalb der 5TeilROIs, [%inkl. Leerflächen]

Der Median der Gruppen 3 (SynCage-C, TricOs) und 11 (SynCage-C, Fibrin, 0,7 mg/ml TGpPTH1-34,TricOs) liegt signifikant unter dem der Gruppe 15 (SynCage-C, Fibrin, 0,2 mg/ml TGpPTH1-34, TricOs), (Tab. 53).

Tab. 53 Median, Min- Max- Werte, Knorpel, 5TeilROIs

Gr., n=8	Knorpel	Median	Min.	Max.	Perzentile		
					25	50	75
3	CgAr/[% inkl.Leerfl.]	1,250	0,478	3,613	0,584	1,250	2,286
	CgAr/[%]	1,361	0,505	3,826	0,608	1,361	2,412
9	CgAr/[% inkl.Leerfl.]	2,938	0,811	15,692	1,739	2,938	4,992
	CgAr/[%]	3,185	0,928	17,134	1,866	3,185	5,312
10	CgAr/[% inkl.Leerfl.]	1,746	0,420	3,449	0,965	1,746	3,000
	CgAr/[%]	1,958	0,440	3,639	1,036	1,958	3,165
11	CgAr/[% inkl.Leerfl.]	1,157	0,349	3,920	0,606	1,157	3,211
	CgAr/[%]	1,224	0,367	4,092	0,643	1,224	3,423
12	CgAr/[% inkl.Leerfl.]	2,451	1,610	7,476	1,795	2,451	6,513
	CgAr/[%]	2,626	1,691	8,053	1,900	2,626	6,912
15	CgAr/[% inkl.Leerfl.]	5,319	3,103	11,114	4,562	5,319	9,383
	CgAr/[%]	5,629	3,224	11,618	4,979	5,629	9,947

**TricOs**

Der Kruskal- Wallis- Test ergab bei Vergleich der Gruppen 3 bis 15 ein signifikantes Ergebnis für die prozentuale TricOs- Fläche inklusive Leerflächen. Der p- Wert der prozentualen TricOs- Anteile war hingegen nicht signifikant (Tab. 54, Abb. 83).

Tab. 54 Kruskal- Wallis- Test und Bonferroni- Korrektur, TricOs, 5TeilROIs

Gr., n=8	TricOs	Kruskal- Wallis-Test (p-Wert)	Bonferroni- Korrektur (α)	Mann-Whitney-U-Test (p-Wert)			
				Gr.9	Gr.10	Gr.11	Gr.15
3	TAr/ [% - inkl.Leerfl.]	0,05	0,005	0,105	0,105	0,279	0,161
	TAr/[%]	0,057	0,005	0,382	0,083	0,130	0,721
9	TAr/ [% - inkl.Leerfl.]	0,05	0,005	/	0,382	0,038	0,442
	TAr/[%]	0,057	0,005	/	0,798	0,028	0,382
10	TAr/ [% - inkl.Leerfl.]	0,05	0,005	/	/	0,002	0,878
	TAr/[%]	0,057	0,005	/	/	0,001	0,505
11	TAr/ [% - inkl.Leerfl.]	0,05	0,005	/	/	/	0,007
	TAr/[%]	0,057	0,005	/	/	/	0,328
15	TAr/ [% - inkl.Leerfl.]	0,05	0,005	/	/	/	/
	TAr/[%]	0,057	0,005	/	/	/	/

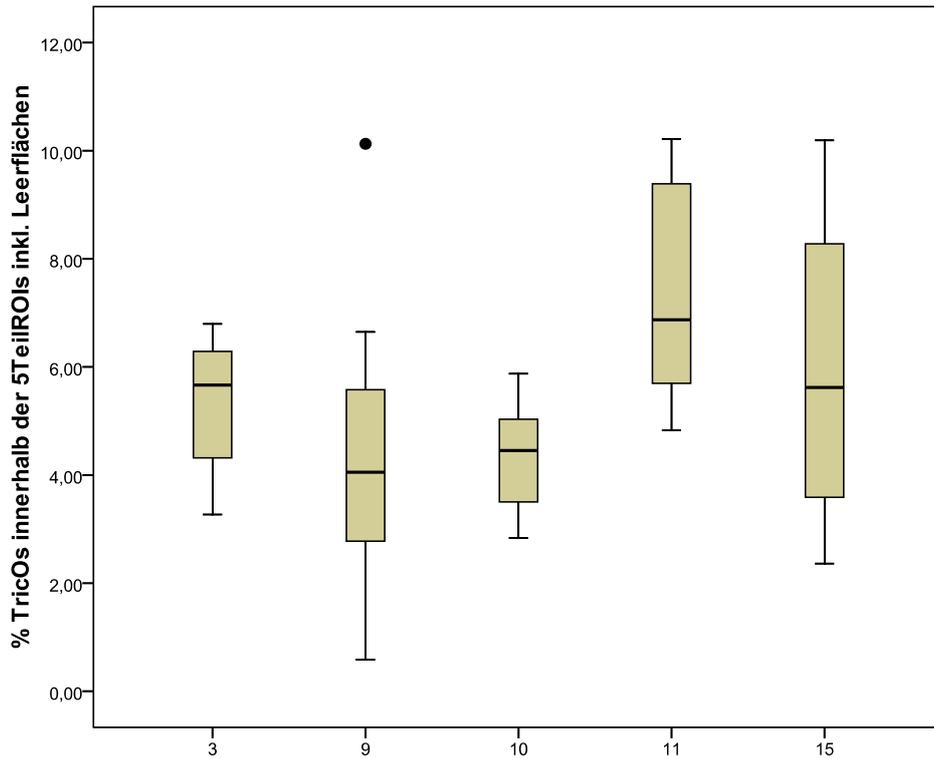


Abb. 83 TricOs innerhalb der 5TeilROIs, [%<sub>inkl. Leerflächen</sub>]

Der Median der Gruppe 10 (SynCage-C, Fibrin, 0,4 mg/ml TGpIPTH1-34, TricOs) der prozentualen TricOs- Fläche inklusive Leerflächen ist signifikant niedriger als der der Gruppe 11 (SynCage-C, Fibrin, 0,7 mg/ml TGpIPTH1-34, TricOs), (Tab. 55).

Tab. 55 Median, Min- Max- Werte, TricOs, 5TeilROIs

Gr., n=8	TricOs	Median	Min.	Max.	Perzentile		
					25	50	75
3	TAr/ [% - inkl.Leerfl.]	5,663	3,270	6,794	3,885	5,663	6,435
	TAr/[%]	6,019	3,596	7,060	4,099	6,019	6,802
9	TAr/ [% - inkl.Leerfl.]	4,052	0,586	10,127	2,251	4,052	6,113
	TAr/[%]	4,461	0,640	10,649	2,513	4,461	6,498
10	TAr/ [% - inkl.Leerfl.]	4,454	2,840	5,874	3,200	4,454	5,085
	TAr/[%]	4,798	3,063	6,198	3,493	4,798	5,345
11	TAr/ [% - inkl.Leerfl.]	6,872	4,833	10,213	5,596	6,872	9,659
	TAr/[%]	7,217	5,393	10,797	5,872	7,217	10,276
15	TAr/ [% - inkl.Leerfl.]	5,621	2,362	10,192	3,313	5,621	8,645
	TAr/[%]	5,982	2,454	10,773	3,504	5,982	9,164

**Absolutes Bindegewebe**

Der Median der Gruppe 12 (SynCage-C) unterschreitet den prozentualen Anteil ([%], [%inklusive Leerflächen]) an absolutem Bindegewebe der Gruppen 3 (SynCage-C, TricOs), 9 (SynCage-C, Fibrin, 1,0 mg/ml TGpPTH1-34, TricOs), 10 (SynCage-C, Fibrin, 0,4 mg/ml TGpPTH1-34, TricOs), 11 (SynCage-C, Fibrin, 0,7 mg/ml TGpPTH1-34, TricOs) und 15 (SynCage-C, Fibrin, 0,2 mg/ml TGpPTH1-34, TricOs) signifikant (Tab. 56, 57, Abb. 84, 85).

Tab. 56 Kruskal- Wallis- Test, Bonferroni- Korrektur, abs. Bindegewebe, 5TeilROIs

Gr., n=8	abs. Binde- gewebe	Kruskal- Wallis-Test (p-Wert)	Bonferroni- Korrektur ( $\alpha$ )	Mann-Whitney-U-Test (p-Wert)				
				Gr.9	Gr.10	Gr.11	Gr.12	Gr.15
3	CoTabsAr/ [% inkl.Leerfl.]	0,04	0,003	0,105	0,105	0,279	0,000	0,161
	CoTabsAr/ [%]	0,031	0,0083	/	/	/	0,000	/
9	CoTabsAr/ [% inkl.Leerfl.]	0,04	0,003	/	0,382	0,038	0,000	0,442
	CoTabsAr/ [%]	0,031	0,0083	/	/	/	0,000	/
10	CoTabsAr/ [% inkl.Leerfl.]	0,04	0,003	/	/	0,002	0,000	0,878
	CoTabsAr/ [%]	0,031	0,0083	/	/	0,010	0,000	/
11	CoTabsAr/ [% inkl.Leerfl.]	0,04	0,003	/	/	/	0,000	0,007
	CoTabsAr/ [%]	0,031	0,0083	/	/	/	0,000	/
12	CoTabsAr/ [% inkl.Leerfl.]	0,04	0,003	/	/	/	/	0,000
	CoTabsAr/ [%]	0,031	0,0083	/	/	/	/	0,000
15	CoTabsAr/ [% inkl.Leerfl.]	0,04	0,003	/	/	/	/	/
	CoTabsAr/ [%]	0,031	0,0083	/	/	/	/	/

Tab. 57 Median, Min- Max- Werte, abs. Bindegewebe, 5TeilROIs

Gr., n=8	abs. Bindegewebe	Median	Min.	Max.	Perzentile		
					25	50	75
3	CoTabsAr/ [% inkl.Leerfl.]	34,182	27,922	41,072	31,347	34,182	36,537
	CoTabsAr/ [%]	36,335	29,521	43,496	33,058	36,335	38,906
9	CoTabsAr/ [% inkl.Leerfl.]	35,668	26,828	46,307	29,440	35,668	40,488
	CoTabsAr/ [%]	39,189	29,463	49,097	32,973	39,189	42,970
10	CoTabsAr/ [% inkl.Leerfl.]	35,771	30,263	55,647	31,419	35,771	39,403
	CoTabsAr/ [%]	37,210	32,003	58,307	34,503	37,210	43,619
11	CoTabsAr/ [% inkl.Leerfl.]	34,522	22,468	36,629	29,984	34,522	36,442
	CoTabsAr/ [%]	36,265	25,071	38,506	31,446	36,265	38,135
12	CoTabsAr/ [% inkl.Leerfl.]	17,964	11,313	49,198	15,238	17,964	29,170
	CoTabsAr/ [%]	18,918	12,017	54,182	16,377	18,918	30,796
15	CoTabsAr/ [% inkl.Leerfl.]	30,445	24,408	45,329	28,662	30,445	36,167
	CoTabsAr/ [%]	32,968	26,834	48,040	29,903	32,968	37,757

Aufgrund der abweichenden Formel zur Berechnung der absoluten Bindegewebsfläche (CoTabs. = undifferenziertes Bindegewebe – Knorpel) entfällt Gruppe 12 (SynCage-C) bei der graphischen Darstellung dieser Auswertung (Abb. 84, 85).

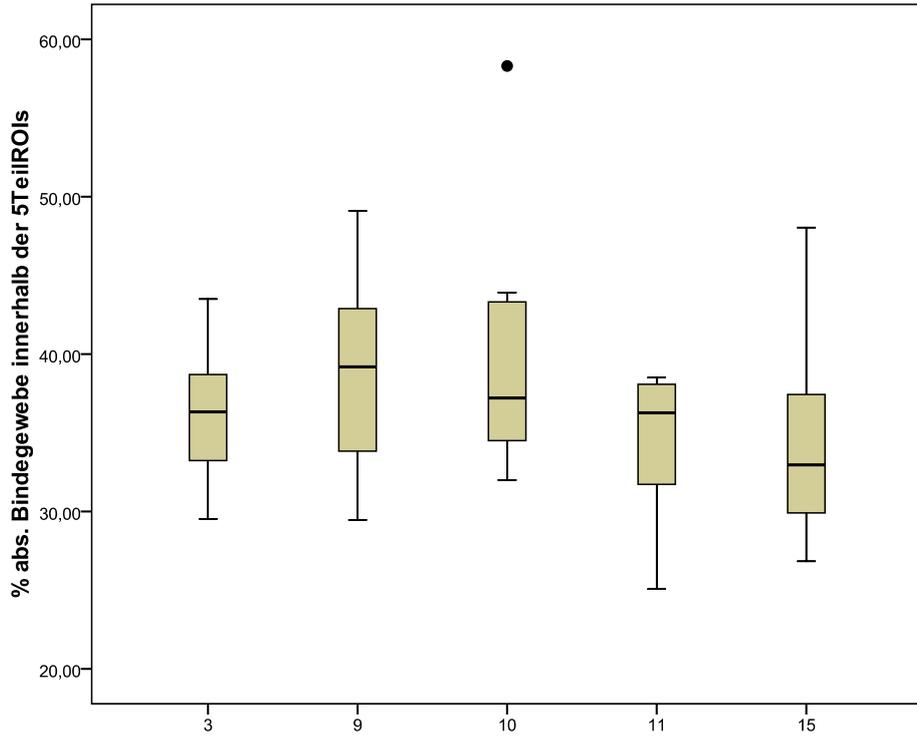


Abb. 84 Absolutes Bindegewebe innerhalb der 5TeilROIs, [%]

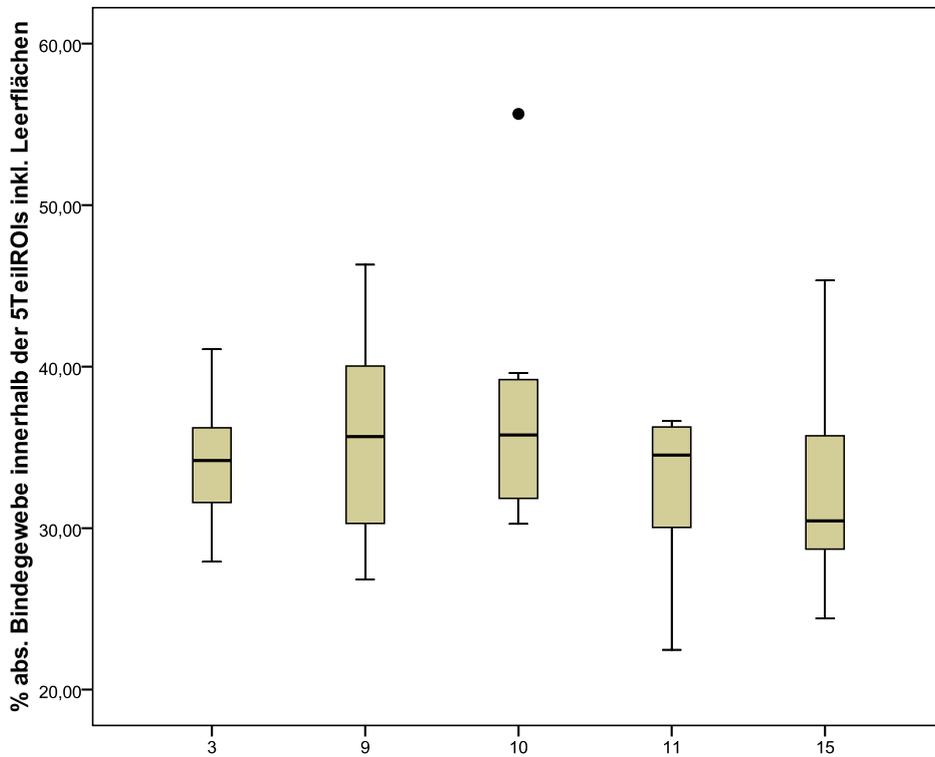


Abb. 85 Absolutes Bindegewebe innerhalb der 5TeilROIs, [%inkl. Leerflächen]

## Blutgefäßdichte

Der Gruppenvergleich ergab einen signifikanten Unterschied für die Blutgefäßdichte. Der Median der Blutgefäßdichte der Gruppe 3 (SynCage-C, TricOs) ist in der Summe der 5TeilROIs signifikant höher als der der Gruppen 9 (SynCage-C, Fibrin, 1,0 mg/ml TGpPTH1-34, TricOs), 10 (SynCage-C, Fibrin, 0,4 mg/ml TGpPTH1-34, TricOs), 11 (SynCage-C, Fibrin, 0,7 mg/ml TGpPTH1-34, TricOs), 12 (SynCage-C) und 15 (SynCage-C, Fibrin, 0,2 mg/ml TGpPTH1-34, TricOs), (Tab. 58, 59, Abb. 86).

Tab. 58 Kruskal- Wallis- Test und Bonferroni- Korrektur, Gefäßdichte, 5TeilROIs

Gr., n=8	Gefäßdichte	Kruskal- Wallis-Test (p-Wert)	Bonferroni- Korrektur ( $\alpha$ )	Mann-Whitney-U-Test (p-Wert)				
				Gr.9	Gr.10	Gr.11	Gr.12	Gr.15
3	[Gefäße/mm <sup>2</sup> ]	0,000	0,003	0,001	0,000	0,000	0,001	0,000
9	[Gefäße/mm <sup>2</sup> ]		0,003	/	0,878	0,505	0,328	0,130
10	[Gefäße/mm <sup>2</sup> ]		0,003	/	/	0,442	0,195	0,065
11	[Gefäße/mm <sup>2</sup> ]		0,003	/	/	/	0,038	0,279
12	[Gefäße/mm <sup>2</sup> ]		0,003	/	/	/	/	0,007
15	[Gefäße/mm <sup>2</sup> ]		0,003	/	/	/	/	/

Tab. 59 Median, Min- Max- Werte der Gefäßdichte der 5TeilROIs

Gr., n=8	Gefäßdichte	Median	Min.	Max.	Perzentile		
					25	50	75
3	[Gefäße/mm <sup>2</sup> ]	3,303	2,771	4,822	2,797	3,303	4,553
9	[Gefäße/mm <sup>2</sup> ]	1,220	0,729	3,161	0,787	1,220	2,276
10	[Gefäße/mm <sup>2</sup> ]	1,322	0,779	2,109	0,927	1,322	1,754
11	[Gefäße/mm <sup>2</sup> ]	0,972	0,472	2,208	0,826	0,972	1,523
12	[Gefäße/mm <sup>2</sup> ]	1,635	0,896	2,791	1,331	1,635	2,279
15	[Gefäße/mm <sup>2</sup> ]	0,686	0,216	1,661	0,385	0,686	1,319

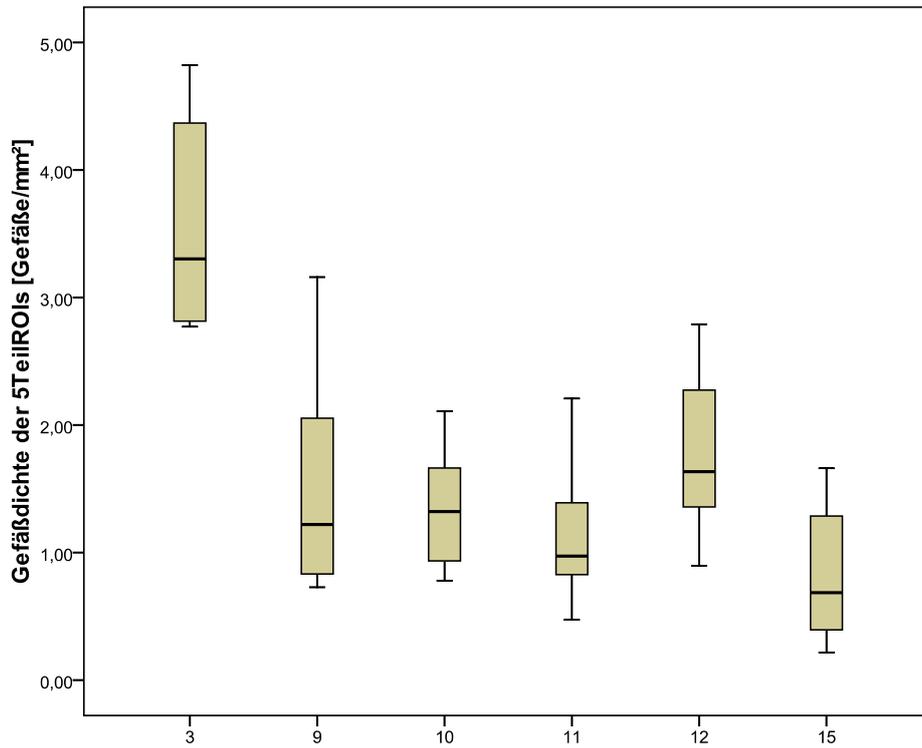


Abb. 86 Gefäßdichte der 5TeilROIs, [Gefäße/mm<sup>2</sup>]

### Osteoklastendichte

Die Osteoklastendichte der Gruppe 15 (SynCage-C, Fibrin, 0,2 mg/ml TGpIPTH1-34, TricOs) ist signifikant höher als die der Gruppe 12 (SynCage-C), (Tab. 60, Abb. 87).

Tab. 60 Kruskal- Wallis- Test, Bonferroni- Korrektur, Osteoklastendichte, 5TeilROIs

Gr., n=8	Osteoklasten- dichte	Kruskal- Wallis-Test (p-Wert)	Bonferroni- Korrektur (α)	Mann-Whitney-U-Test (p-Wert)				
				Gr.9	Gr.10	Gr.11	Gr.12	Gr.15
3	[Oc/mm <sup>2</sup> ]	0,022	0,003	0,721	0,796	0,645	0,130	0,234
9	[Oc/mm <sup>2</sup> ]		0,003	/	0,959	0,878	0,161	0,105
10	[Oc/mm <sup>2</sup> ]		0,003	/	/	0,798	0,105	0,038
11	[Oc/mm <sup>2</sup> ]		0,003	/	/	/	0,038	0,010
12	[Oc/mm <sup>2</sup> ]		0,003	/	/	/	/	0,000
15	[Oc/mm <sup>2</sup> ]		0,003	/	/	/	/	/

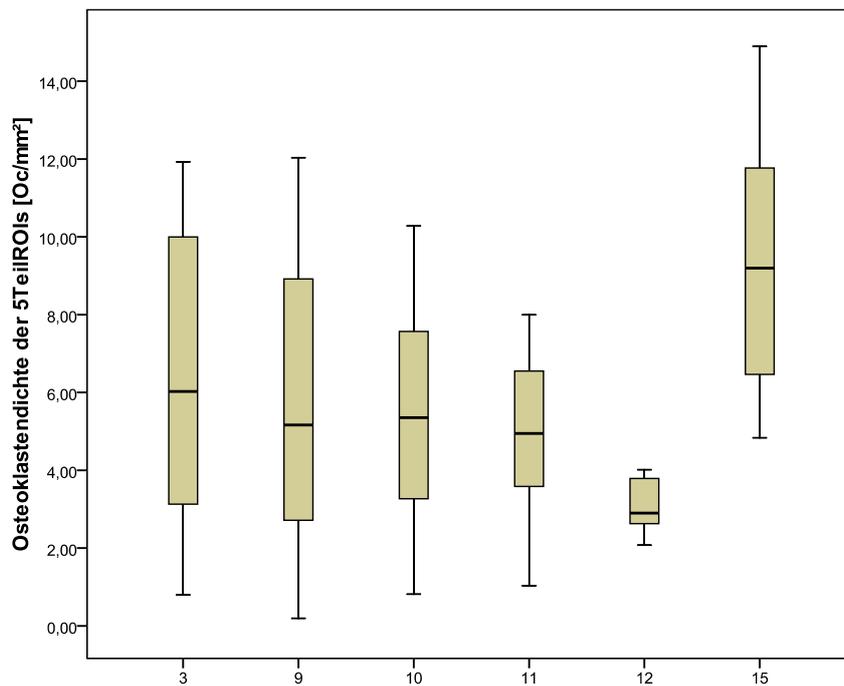


Abb. 87 Osteoklastendichte der 5TeilROIs, [Oc/mm<sup>2</sup>]

Der Median der Gruppe 15 (SynCage-C, Fibrin, 0,2 mg/ml TGpPTH1-34, TricOs) ist signifikant größer als der der Leercagegruppe (SynCage-C), (Tab. 61).

Tab. 61 Median, Min- Max- Werte, Osteoklastendichte, 5TeilROIs

Gr., n=8	Osteoklasten- dichte	Median	Min.	Max.	Perzentile		
3	[Oc/mm <sup>2</sup> ]	6,024	0,801	11,927	2,931	6,024	10,018
9	[Oc/mm <sup>2</sup> ]	5,166	0,197	12,037	2,457	5,166	9,355
10	[Oc/mm <sup>2</sup> ]	5,352	0,814	10,279	2,935	5,352	7,769
11	[Oc/mm <sup>2</sup> ]	4,945	1,034	7,994	3,416	4,945	6,633
12	[Oc/mm <sup>2</sup> ]	2,901	2,074	4,014	2,626	2,901	3,836
15	[Oc/mm <sup>2</sup> ]	9,198	4,835	14,893	6,442	9,198	11,834

**4.5.3. Dorsale ROI**

**Knochen**

Es bestehen keine Signifikanzen bzgl. der prozentualen Knochenfläche.  
 Der Median der Gruppe 9 (SynCage-C, Fibrin, 1,0 mg/ml TGpPTH1-34, TricOs) ist im Gruppenvergleich am niedrigsten, der der Gruppe 12 (SynCage-C) am höchsten (Tab. 62).

Tab. 62 Median, Min- Max- Werte, Knochen, DsROI

Gr., n=8	Knochen	Kruskal- Wallis-Test (p-Wert)	Median	Min.	Max.	Perzentile		
						25	50	75
3	BAr/[%]	0,126	46,925	34,670	58,728	37,214	46,925	55,863
9	BAr/[%]		34,750	24,395	43,448	28,261	34,750	42,973
10	BAr/[%]		41,895	10,784	59,892	32,218	41,895	54,943
11	BAr/[%]		50,144	16,376	89,098	30,678	50,144	64,461
12	BAr/[%]		56,607	28,349	75,744	41,392	56,607	68,171
15	BAr/[%]		52,720	28,341	62,779	35,546	52,720	59,323

**Mineralisierter Knochen**

Bei Durchführung des Kruskal- Wallis- Test für den Gruppenvergleich bzgl. der prozentualen mineralisierten Knochenfläche [%] besteht eine Signifikanz. Der Unterschied zwischen den sechs untersuchten Gruppen konnte jedoch nicht spezifiziert werden (Tab. 63, 64, Abb. 88).

Tab. 63 Mann- Whitney- U- Test, Bonferroni- Korrektur, min. Knochen, DsROI

Gr., n=8	min. Knochen	Kruskal- Wallis-Test (p-Wert)	Bonferroni- Korrektur ( $\alpha$ )	Mann-Whitney-U-Test (p-Wert)				
				Gr.9	Gr.10	Gr.11	Gr.12	Gr.15
3	BMdAr/[%]	0,038	0,0033	0,010	0,105	0,959	0,505	0,105
9	BMdAr/[%]		0,0033	/	0,234	0,050	0,007	0,328
10	BMdAr/[%]		0,0033	/	/	0,328	0,130	0,645
11	BMdAr/[%]		0,0033	/	/	/	0,959	0,234
12	BMdAr/[%]		0,0033	/	/	/	/	0,083
15	BMdAr/[%]		0,0033	/	/	/	/	/

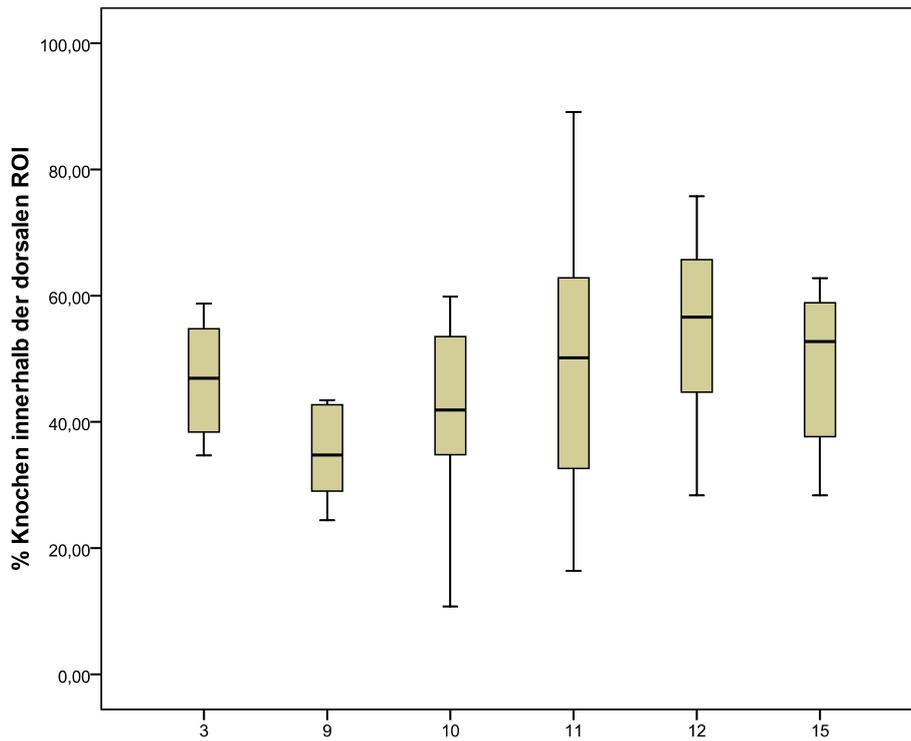


Abb. 88 Mineralisierter Knochen innerhalb der dorsalen ROI, [%]

In Übereinstimmung mit den Ergebnissen der Gesamtknochenfläche ist auch beim mineralisierten Knochen der Median bei Gruppe 12 (SynCage-C) am höchsten und bei Gruppe 9 (SynCage-C, Fibrin, 1,0 mg/ml TGpPTH1-34, TricOs) im Gruppenvergleich am niedrigsten (Tab. 64).

Tab. 64 Median, Min-Max-Werte, min. Knochen, DsROI

Gr., n=8	min. Knochen	Median	Min.	Max.	Perzentile		
					25	50	75
3	BMdAr[%]	29,499	18,230	45,824	22,007	29,499	34,034
9	BMdAr[%]	17,235	11,040	24,643	11,375	17,235	23,595
10	BMdAr[%]	24,572	4,760	30,396	13,525	24,572	28,653
11	BMdAr[%]	27,844	6,930	55,066	19,108	27,844	47,028
12	BMdAr[%]	32,392	13,900	48,658	23,946	32,392	45,961
15	BMdAr[%]	22,036	10,290	33,468	12,246	22,036	25,728

### Undifferenziertes Bindegewebe

Der Gruppenvergleich der undifferenzierten Bindegewebsflächen ergab keine signifikanten Unterschiede. Während der Median der Gruppe 9 (SynCage-C, Fibrin, 1,0 mg/ml TGpPTH1-34, TricOs) die höchsten Werte erzielte, ist dieser bei Gruppe 12 (SynCage-C) am kleinsten (Tab. 65).

Tab. 65 Median, Min- Max- Werte, undiff. Bindegewebe, DsROI

Gr., n=8	undiff. Binde- gewebe	Kruskal-Wallis- Test (p-Wert)	Median	Min.	Max.	Perzentile		
						25	50	75
3	CotAr/[%]	0,149	52,732	40,933	64,219	43,861	52,732	62,173
9	CotAr/[%]		64,739	55,949	73,020	56,536	64,739	70,036
10	CotAr/[%]		56,172	39,756	89,089	44,003	56,172	67,333
11	CotAr/[%]		49,174	10,731	79,288	33,686	49,174	69,124
12	CotAr/[%]		42,442	23,992	71,161	30,974	42,442	58,270
15	CotAr/[%]		46,058	35,756	71,581	39,497	46,058	64,208

### Knorpel

Es besteht im Gruppenvergleich ein signifikanter Unterschied der prozentualen Knorpelflächen ([%]). Der Unterschied zwischen den sechs untersuchten Gruppen konnte jedoch nicht spezifiziert werden (Tab. 66, Abb. 89).

Tab. 66 Mann- Whitney- U- Test, Bonferroni- Korrektur, Knorpel, DsROI

Gr., n=8	Knorpel	Kruskal-Wallis- Test (p-Wert)	Bonferroni- Korrektur ( $\alpha$ )	Mann-Whitney-U-Test (p-Wert)				
				Gr.9	Gr.10	Gr.11	Gr.12	Gr.15
3	CgAr/[%]	0,024	0,0033	0,798	0,959	0,050	1,000	0,015
9	CgAr/[%]		0,0033	/	0,645	0,050	0,878	0,038
10	CgAr/[%]		0,0033	/	/	0,574	0,878	0,015
11	CgAr/[%]		0,0033	/	/	/	0,130	0,005
12	CgAr/[%]		0,0033	/	/	/	/	0,050
15	CgAr/[%]		0,0033	/	/	/	/	/

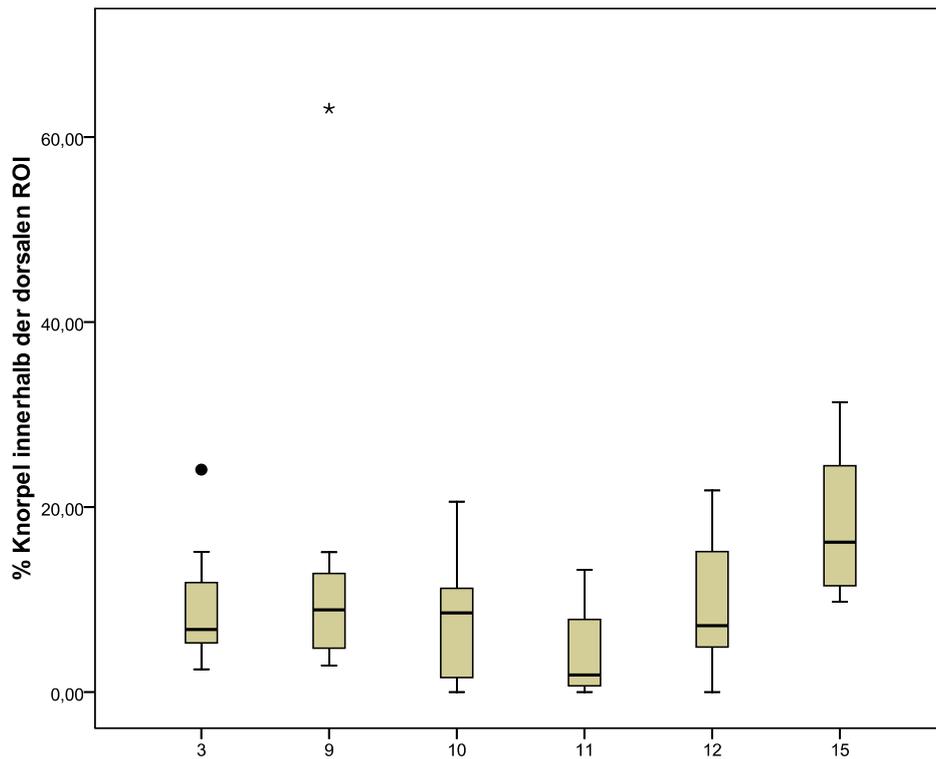


Abb. 89 Knorpel innerhalb der dorsalen ROI, [%]

Der Median der Gruppe 11 (SynCage-C, Fibrin, 0,7 mg/ml TGpIPTH1-34, TricOs) bildet im Gruppenvergleich das Minimum und der der Gruppe 15 (SynCage-C, Fibrin, 0,2 mg/ml TGpIPTH1-34, TricOs) das Maximum (Tab. 67).

Tab. 67 Median, Min- Max- Werte, Knorpel, DsROI

Gr., n=8	Knorpel	Median	Min.	Max.	Perzentile		
					25	50	75
3	CgAr/[%]	6,776	2,479	24,051	5,150	6,776	13,511
9	CgAr/[%]	8,897	2,884	63,079	4,594	8,897	13,977
10	CgAr/[%]	8,564	0,000	20,596	0,790	8,564	11,321
11	CgAr/[%]	1,859	0,000	13,202	0,656	1,859	10,051
12	CgAr/[%]	7,187	0,000	21,804	4,551	7,187	17,267
15	CgAr/[%]	16,210	9,799	31,362	11,220	16,210	26,131

## TricOs

Der Gruppenvergleich der prozentualen Anteile an TricOs ergab keine signifikanten Unterschiede. Der Median der Gruppe 15 (SynCage-C, Fibrin, 0,2 mg/ml TGpIPTH1-34, TricOs) ist am größten, während der der Gruppen 3 (SynCage-C, TricOs) und 9 (SynCage-C, Fibrin, 1,0 mg/ml TGpIPTH1-34, TricOs) am kleinsten ist (Tab. 68).

Tab. 68 Median, Min- Max- Werte, TricOs, DsROI

Gr., n=8	TricOs	Kruskal-Wallis- Test (p-Wert)	Median	Min.	Max.	Perzentile		
						25	50	75
3	TAr/[%]	0,644	0,000	0,000	4,856	0,000	0,000	0,138
9	TAr/[%]		0,000	0,000	0,464	0,000	0,000	0,273
10	TAr/[%]		0,104	0,000	0,867	0,000	0,104	0,375
11	TAr/[%]		0,042	0,000	8,059	0,000	0,042	1,277
15	TAr/[%]		0,309	0,000	4,512	0,000	0,309	3,458

## Absolutes Bindegewebe

Der Gruppenvergleich der prozentualen Anteile an absolutem Bindegewebe (CoTabs = CoT – Cg - T) ergab keine signifikanten Unterschiede. Gruppe 15 (SynCage-C, Fibrin, 0,2 mg/ml TGpIPTH1-34, TricOs) weist den niedrigsten und Gruppe 9 (SynCage-C, Fibrin, 1,0 mg/ml TGpIPTH1-34, TricOs) den höchsten Median auf (Tab. 69).

Tab. 69 Median, Min- Max- Werte, abs. Bindegewebe, DsROI

Gr., n=8	abs. Binde- gewebe	Kruskal- Wallis-Test (p-Wert)	Median	Min.	Max.	Perzentile		
						25	50	75
3	CoTabsAr/ [%]	0,190	40,851	35,139	56,805	38,120	40,851	47,641
9	CoTabsAr/ [%]		52,511	5,762	69,672	42,039	52,511	63,846
10	CoTabsAr/ [%]		47,510	19,133	77,487	34,403	47,510	67,333
11	CoTabsAr/ [%]		41,875	9,791	77,623	32,402	41,875	59,371
12	CoTabsAr/ [%]		32,208	16,283	66,935	17,296	32,208	49,548
15	CoTabsAr/ [%]		30,769	1,703	50,414	23,460	30,769	46,233

**Blutgefäßdichte**

Der Median der Blutgefäßdichte der Gruppe 3 (SynCage-C, TricOs) ist signifikant höher als der der Gruppen 9 (SynCage-C, Fibrin, 1,0 mg/ml TGpPTH1-34, TricOs), 10 (SynCage-C, Fibrin, 0,4 mg/ml TGpPTH1-34, TricOs) und 15 (SynCage-C, Fibrin, 0,2 mg/ml TGpPTH1-34, TricOs), (Tab. 70, 71, Abb. 90).

Tab. 70 Kruskal- Wallis- Test, Bonferroni- Korrektur, Blutgefäßdichte, dorsale ROI

Gr., n=8	Gefäßdichte	Kruskal- Wallis-Test (p-Wert)	Bonferroni- Korrektur (α)	Mann-Whitney-U-Test (p-Wert)				
				Gr.9	Gr.10	Gr.11	Gr.12	Gr.15
3	[Gefäße/mm <sup>2</sup> ]	0,001	0,003	0,003	0,000	0,010	0,015	0,000
9	[Gefäße/mm <sup>2</sup> ]		0,003	/	/	/	/	/
10	[Gefäße/mm <sup>2</sup> ]		0,003	/	/	/	/	/
11	[Gefäße/mm <sup>2</sup> ]		0,003	/	/	/	/	/
12	[Gefäße/mm <sup>2</sup> ]		0,003	/	/	/	/	0,021
15	[Gefäße/mm <sup>2</sup> ]		0,003	/	/	/	/	/

Tab. 71 Median, Min- Max- Werte der Blutgefäßdichte dorsale ROI

Gr., n=8	Median	Min.	Max.	Perzentile		
				25	50	75
3	4,039	1,842	6,580	2,176	4,039	6,307
9	0,760	0,240	5,479	0,293	0,760	1,072
10	0,978	0,105	1,159	0,480	0,978	1,131
11	1,117	0,419	5,561	0,655	1,117	2,228
12	1,554	0,309	2,946	0,648	1,554	2,437
15	0,566	0,172	0,921	0,252	0,566	0,789

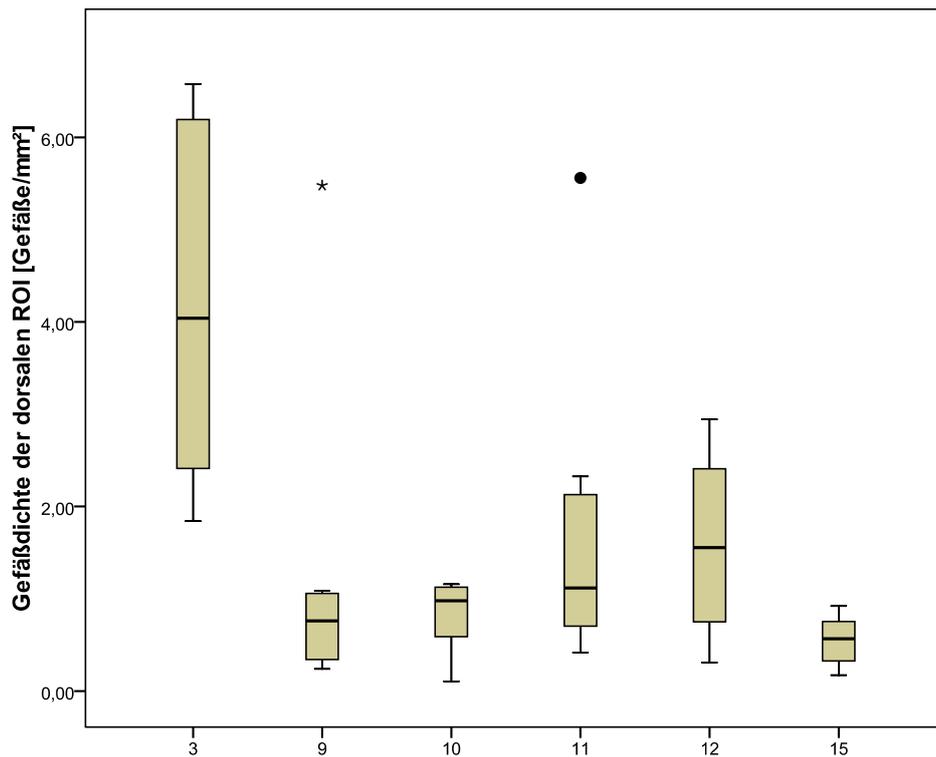


Abb. 90 Gefäßdichte der dorsalen ROI, [Gefäße/mm<sup>2</sup>]

### Osteoklastendichte

Der Gruppenvergleich der Osteoklastendichte der dorsalen ROI ergab keine signifikanten Unterschiede. Den höchsten Median erzielte Gruppe 11 (SynCage-C, Fibrin, 0,7 mg/ml TGpPTH1-34, TricOs) und den niedrigsten Gruppe 10 (SynCage-C, Fibrin, 0,4 mg/ml TGpPTH1-34, TricOs), (Tab. 72).

Tab. 72 Median, Min-Max-Werte der Osteoklastendichte, DsROI

Gr., n=8	Median	Min.	Max.	Perzentile		
				25	50	75
3	7,376	0,000	49,591	2,357	7,376	16,814
9	6,920	0,420	53,295	1,161	6,920	22,232
10	1,960	1,086	40,441	1,288	1,960	25,671
11	8,264	2,320	26,257	5,603	8,264	14,455
12	3,298	1,588	8,156	2,059	3,298	7,750
15	7,649	3,385	33,172	5,954	7,649	19,081

#### 4.5.4. Ventrale ROI

##### Knochen

Bei Durchführung des Kruskal- Wallis- Test für den Gruppenvergleich bzgl. der prozentualen Knochenfläche ([%]) besteht eine Signifikanz. Der Unterschied zwischen den sechs untersuchten Gruppen konnte jedoch im Einzelnen nicht spezifiziert werden (Abb. 91, Tab. 73).

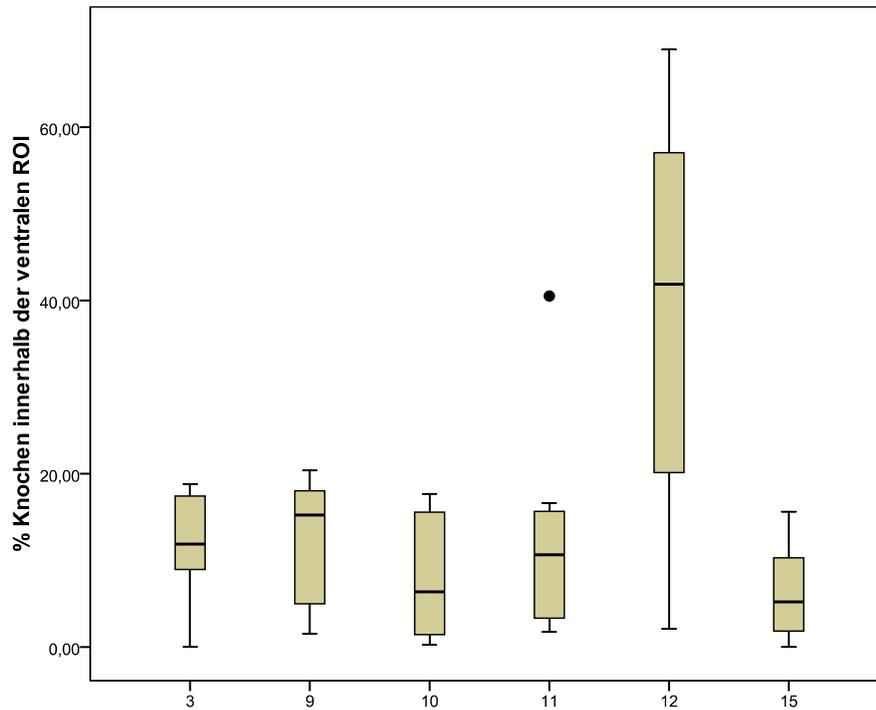


Abb. 91 Knochen innerhalb der ventralen ROI, [%]

Tab. 73 Kruskal- Wallis- Test und Bonferroni- Korrektur, Knochen, ventrale ROI

Gr., n=8	Knochen	Kruskal- Wallis-Test (p-Wert)	Bonferroni- Korrektur ( $\alpha$ )	Mann-Whitney-U-Test (p-Wert)				
				Gr.9	Gr.10	Gr.11	Gr.12	Gr.15
3	BAr/[%]	0,015	0,003	0,798	0,382	0,721	0,021	0,065
9	BAr/[%]		0,003	/	0,279	0,721	0,015	0,083
10	BAr/[%]		0,003	/	/	0,645	0,007	0,645
11	BAr/[%]		0,003	/	/	/	0,021	0,279
12	BAr/[%]		0,003	/	/	/	/	0,005
15	BAr/[%]		0,003	/	/	/	/	/

Der Median ist bei Gruppe 12 (SynCage-C) am höchsten, während er bei Gruppe 15 (SynCage-C, Fibrin, 0,2 mg/ml TGplPTH1-34, TricOs) das Minimum erreicht (Tab. 74).

Tab. 74 Median, Min- Max- Wert, Knochen, ventrale ROI

Gr., n=8	Knochen	Median	Min.	Max.	Perzentile		
					25	50	75
3	BAr/[%]	11,876	0,000	18,794	7,858	11,876	17,529
9	BAr/[%]	15,239	1,527	20,374	3,840	15,239	18,758
10	BAr/[%]	6,379	0,266	17,694	0,971	6,379	15,903
11	BAr/[%]	10,651	1,735	40,514	2,741	10,651	16,124
12	BAr/[%]	41,875	2,099	68,967	18,537	41,875	58,435
15	BAr/[%]	5,202	0,000	15,614	1,684	5,202	10,558

### Mineralisierter Knochen

Der Kruskal- Wallis- Test ergab bei Vergleich der Gruppen 3 bis 15 ein signifikantes Ergebnis für die prozentuale mineralisierte Knochenfläche (Tab. 75, Abb. 92).

Tab. 75 Kruskal- Wallis- Test, Bonferroni- Korrektur, min. Knochen, VrROI

Gr., n=8	min. Knochen	Kruskal- Wallis-Test (p-Wert)	Bonferroni- Korrektur ( $\alpha$ )	Mann-Whitney-U-Test (p-Wert)				
				Gr.9	Gr.10	Gr.11	Gr.12	Gr.15
3	BMdAr/[%]	0,009	0,007	/	/	/	0,028	0,015
9	BMdAr/[%]		0,007	/	/	/	0,021	0,083
10	BMdAr/[%]		0,007	/	/	/	0,005	/
11	BMdAr/[%]		0,007	/	/	/	0,028	/
12	BMdAr/[%]		0,007	/	/	/	/	0,007
15	BMdAr/[%]		0,007	/	/	/	/	/

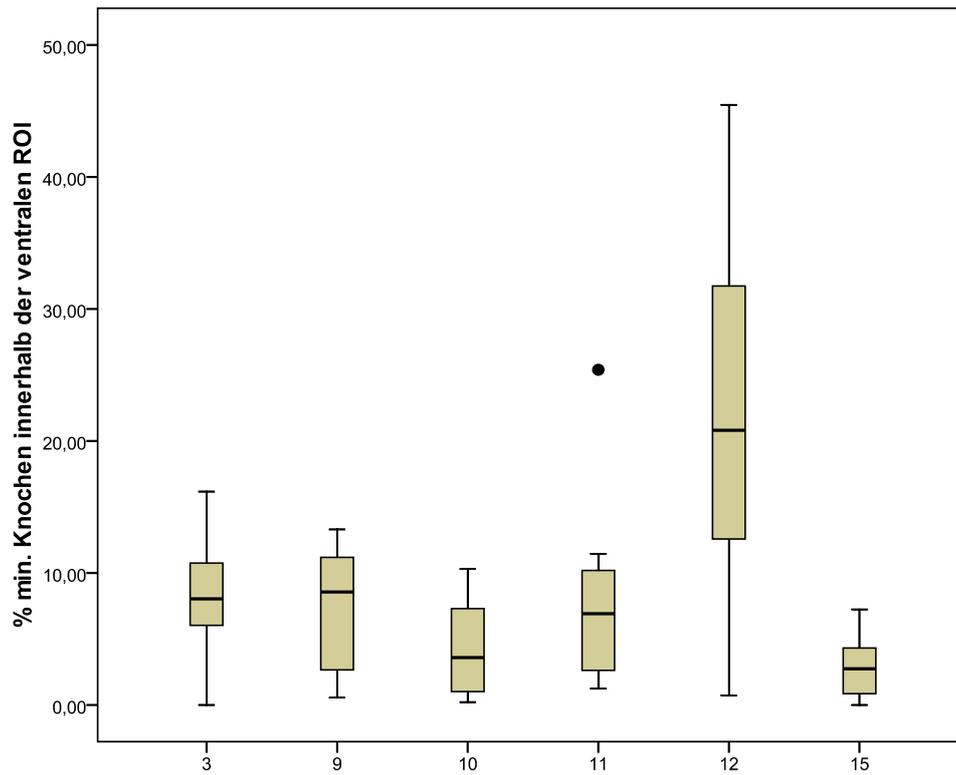


Abb. 92 Mineralisierter Knochen innerhalb der ventralen ROI, [%]

Der Median der Gruppe 12 (SynCage-C) an mineralisiertem Knochen ist prozentual signifikant höher als der der Gruppe 10 (SynCage-C, Fibrin, 0,4 mg/ml TGpIPTH1-34, TricOs), (Tab. 76).

Tab. 76 Median, Min- Max- Wert, min. Knochen, ventrale ROI

Gr., n=8	min. Knochen	Median	Min.	Max.	Perzentile		
					25	50	75
3	BMdAr/[%]	8,034	0,000	16,162	5,627	8,034	11,526
9	BMdAr/[%]	8,560	0,560	13,304	1,730	8,560	11,805
10	BMdAr/[%]	3,585	0,213	10,300	0,681	3,585	8,200
11	BMdAr/[%]	6,919	1,245	25,390	2,146	6,919	10,820
12	BMdAr/[%]	20,806	0,719	45,457	12,275	20,806	33,083
15	BMdAr/[%]	2,746	0,000	7,240	0,841	2,746	4,376

**Undifferenziertes Bindegewebe**

Der Median der Bindegewebsfläche der Gruppen 10 (SynCage-C, Fibrin, 0,4 mg/ml TGpPTH1-34, TricOs) und 15 (SynCage-C, Fibrin, 0,2 mg/ml TGpPTH1-34, TricOs) ist signifikant höher als der der Gruppe 12 (SynCage-C), ( Abb. 93, Tab. 77, 78).

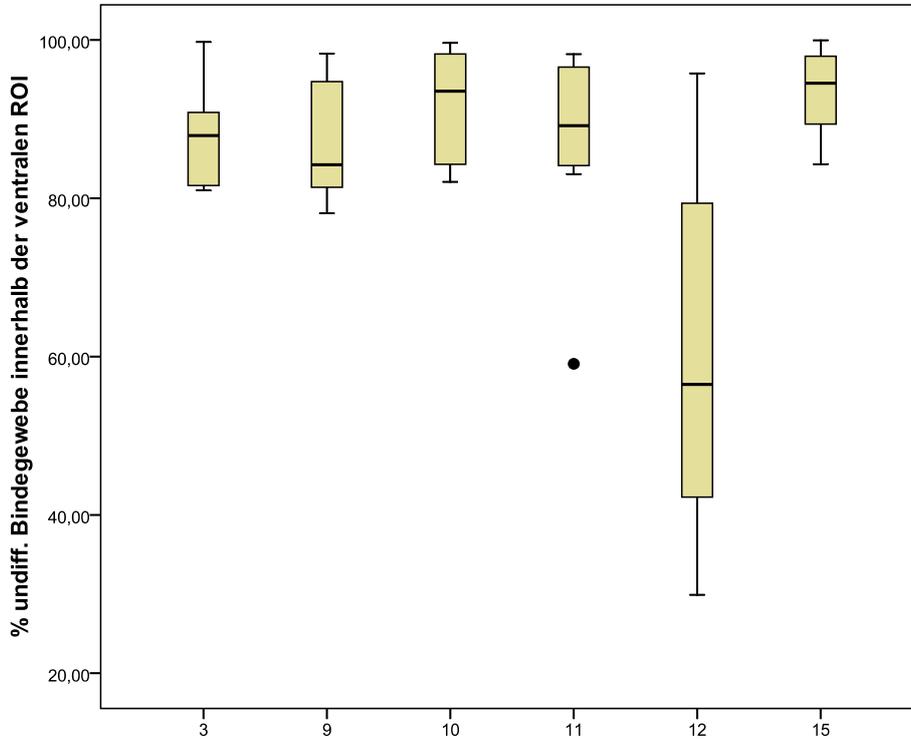


Abb. 93 Undiff. Bindegewebe innerhalb der ventralen ROI, [%]

Tab. 77 Kruskal- Wallis- Test, Bonferroni- Korrektur, undiff. Bindegewebe, VrROI

Gr., n=8	undiff. Binde- gewebe	Kruskal- Wallis-Test (p-Wert)	Bonferroni- Korrektur ( $\alpha$ )	Mann-Whitney-U-Test (p-Wert)				
				Gr.9	Gr.10	Gr.11	Gr.12	Gr.15
3	CotAr/[%]	0,009	0,003	0,798	0,279	0,721	0,021	0,083
9	CotAr/[%]		0,003	/	0,279	0,574	0,015	0,083
10	CotAr/[%]		0,003	/	/	0,645	0,003	0,574
11	CotAr/[%]		0,003	/	/	/	0,015	0,279
12	CotAr/[%]		0,003	/	/	/	/	0,002
15	CotAr/[%]		0,003	/	/	/	/	/

Tab. 78 Median, Min- Max- Wert, undiff. Bindegewebe, ventrale ROI

Gr., n=8	undiff. Bindegewebe	Median	Min.	Max.	Perzentile		
					25	50	75
3	CotAr[%]	87,926	80,979	99,731	81,471	87,926	91,884
9	CotAr[%]	84,234	78,109	98,286	80,810	84,234	95,896
10	CotAr[%]	93,523	82,069	99,627	83,969	93,523	98,850
11	CotAr[%]	89,174	59,090	98,210	83,608	89,174	97,162
12	CotAr[%]	56,483	29,916	95,783	40,618	56,483	81,091
15	CotAr[%]	94,546	84,319	99,963	89,033	94,546	98,156

### Knorpel

Die prozentuale Knorpelfläche der Gruppen 10 (SynCage-C, Fibrin, 0,4 mg/ml TGpPTH1-34, TricOs) und 15 (SynCage-C, Fibrin, 0,2 mg/ml TGpPTH1-34, TricOs) ist signifikant geringer als die der Gruppe 12 (SynCage-C), (Abb. 94, Tab. 79, 80).

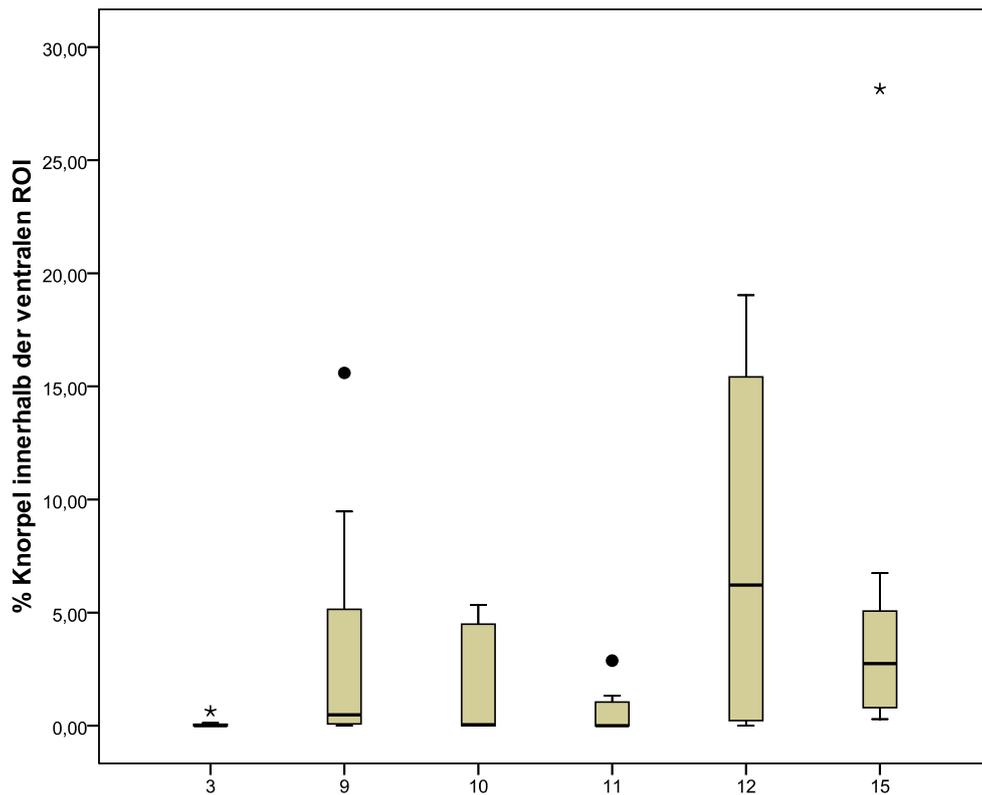


Abb. 94 Knorpel innerhalb der ventralen ROI, [%]

Tab. 79 Kruskal- Wallis- Test, Bonferroni- Korrektur, Knorpel, VrROI

Gr., n=8	Knorpel	Kruskal- Wallis-Test (p-Wert)	Bonferroni- Korrektur ( $\alpha$ )	Mann-Whitney-U-Test (p-Wert)				
				Gr.9	Gr.10	Gr.11	Gr.12	Gr.15
3	CgAr/[%]	0,017	0,003	0,798	0,279	0,721	0,021	0,083
9	CgAr/[%]		0,003	/	0,279	0,574	0,015	0,083
10	CgAr/[%]		0,003	/	/	0,645	0,003	0,574
11	CgAr/[%]		0,003	/	/	/	0,015	0,279
12	CgAr/[%]		0,003	/	/	/	/	0,002
15	CgAr/[%]		0,003	/	/	/	/	/

Tab. 80 Median, Min- Max- Wert, Knorpel, ventrale ROI

Gr., n=8	Knorpel	Median	Min.	Max.	Perzentile		
					25	50	75
3	CgAr/[%]	0,000	0,000	0,643	0,000	0,000	0,096
9	CgAr/[%]	0,482	0,000	15,595	0,038	0,482	7,309
10	CgAr/[%]	0,047	0,000	5,339	0,000	0,047	4,814
11	CgAr/[%]	0,000	0,000	2,877	0,000	0,000	1,184
12	CgAr/[%]	6,219	0,000	19,034	0,112	6,219	16,112
15	CgAr/[%]	2,743	0,293	28,151	0,559	2,743	5,910

## TricOs

Der Gruppenvergleich der prozentualen Anteile an TricOs ergab keine signifikanten Unterschiede. Der Median der Gruppe 11 (SynCage-C, Fibrin, 0,7 mg/ml TGpIPTH1-34, TricOs) ist am größten und der der Gruppe 10 (SynCage-C, Fibrin, 0,4 mg/ml TGpIPTH1-34, TricOs) am kleinsten (Tab. 81).

Tab. 81 Median, Min- Max- Wert, TricOs, ventrale ROI

Gr., n=8	TricOs	Kruskal- Wallis-Test (p-Wert)	Median	Min.	Max.	Perzentile		
						25	50	75
3	TAr/[%]	0,160	16,083	9,316	32,982	13,717	16,083	21,158
9	TAr/[%]		15,884	1,342	20,679	7,216	15,884	18,762
10	TAr/[%]		15,141	8,042	18,259	10,424	15,141	17,709
11	TAr/[%]		19,954	13,344	36,844	16,540	19,954	30,711
15	TAr/[%]		17,496	7,955	33,921	12,028	17,496	29,987

**Absolutes Bindegewebe**

Der Gruppenvergleich der prozentualen Anteile an absolutem Bindegewebe ergab keine signifikanten Unterschiede. Der Median der Gruppe 10 (SynCage-C, Fibrin, 0,4 mg/ml TGpPTH1-34, TricOs) ist am größten und der der Gruppe 12 (SynCage-C) am kleinsten (Tab. 82).

Tab. 82 Median, Min- Max- Wert, abs. Bindegewebe, ventrale ROI

Gr., n=8	abs. Bindegewebe	Kruskal-Wallis-Test (p-Wert)	Median	Min.	Max.	Perzentile		
						25	50	75
3	CoTabsAr/ [%]	0,125	68,324	55,793	84,766	60,521	68,324	81,275
9	CoTabsAr/ [%]		73,043	55,657	80,916	63,263	73,043	75,551
10	CoTabsAr/ [%]		78,304	58,620	86,476	68,590	78,304	82,428
11	CoTabsAr/ [%]		65,069	45,746	78,261	59,012	65,069	69,583
12	CoTabsAr/ [%]		45,366	15,889	95,783	36,858	45,366	76,890
15	CoTabsAr/ [%]		71,340	38,158	86,007	61,212	71,340	76,604

**Blutgefäßdichte**

Der Median der Blutgefäßdichte der Gruppe 3 (SynCage-C, TricOs) ist signifikant höher als der der Gruppen 9 (SynCage-C, Fibrin, 1,0 mg/ml TGpPTH1-34, TricOs), 10 (SynCage-C, Fibrin, 0,4 mg/ml TGpPTH1-34, TricOs), 11 (SynCage-C, Fibrin, 0,7 mg/ml TGpPTH1-34, TricOs) und 15 (SynCage-C, Fibrin, 0,2 mg/ml TGpPTH1-34, TricOs), (Abb. 95, Tab. 83, 84).

Tab. 83 Kruskal- Wallis- Test, Bonferroni- Korrektur, Gefäßdichte, ventrale ROI

Gr., n=8	Gefäßdichte	Kruskal-Wallis-Test (p-Wert)	Bonferroni-Korrektur (α)	Mann-Whitney-U-Test (p-Wert)				
				Gr.9	Gr.10	Gr.11	Gr.12	Gr.15
3	[Gefäße/mm <sup>2</sup> ]	0,000	0,003	0,001	0,001	0,000	0,195	0,001
9	[Gefäße/mm <sup>2</sup> ]		0,003	/	0,798	0,050	0,038	0,028
10	[Gefäße/mm <sup>2</sup> ]		0,003	/	/	0,130	0,028	0,083
11	[Gefäße/mm <sup>2</sup> ]		0,003	/	/	/	0,015	0,442
12	[Gefäße/mm <sup>2</sup> ]		0,003	/	/	/	/	0,028
15	[Gefäße/mm <sup>2</sup> ]		0,003	/	/	/	/	/

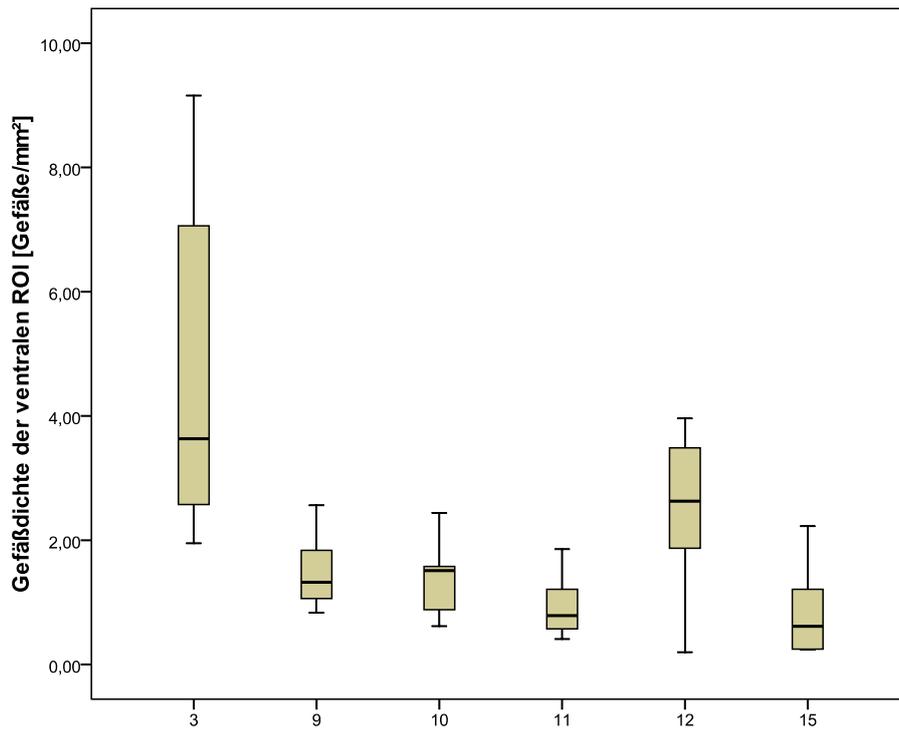


Abb. 95 Gefäßdichte der ventralen ROI, [Gefäße/mm<sup>2</sup>]

Tab. 84 Median, Min- Max- Werte der Gefäßdichte, ventrale ROI

Gr., n=8	Gefäßdichte	Median	Min.	Max.	Perzentile		
					25	50	75
3	[Gefäße/mm <sup>2</sup> ]	3,634	1,950	9,156	2,395	3,634	7,428
9	[Gefäße/mm <sup>2</sup> ]	1,324	0,833	2,563	0,974	1,324	1,898
10	[Gefäße/mm <sup>2</sup> ]	1,512	0,619	2,441	0,798	1,512	1,583
11	[Gefäße/mm <sup>2</sup> ]	0,788	0,409	1,855	0,546	0,788	1,295
12	[Gefäße/mm <sup>2</sup> ]	2,630	0,199	3,959	1,817	2,630	3,697
15	[Gefäße/mm <sup>2</sup> ]	0,614	0,236	2,226	0,247	0,614	1,218

**Osteoklastendichte**

Der Gruppenvergleich der Osteoklastendichte der ventralen ROI ergab keine signifikanten Unterschiede. Der Median der Osteoklastendichte ist bei Gruppe 12 (SynCage-C) am kleinsten. Gruppe 15 (SynCage-C, Fibrin, 0,2 mg/ml TGpIPTH1-34, TricOs) weist den höchsten Median bei geringer Differenz zu Gruppe 10 (SynCage-C, Fibrin, 0,4 mg/ml TgplPTH1-34, TricOs) auf, (Tab. 85).

Tab. 85 Median, Min- Max- Werte der Osteoklastendichte, ventrale ROI

Gr., n=8	Osteoklasten- dichte	Kruskal- Wallis-Test (p-Wert)	Median	Min.	Max.	Perzentile		
						25	50	75
3	[Oc/mm <sup>2</sup> ]	0,221	16,745	2,202	29,178	8,222	16,745	22,062
9	[Oc/mm <sup>2</sup> ]		11,404	0,384	37,118	5,455	11,404	22,604
10	[Oc/mm <sup>2</sup> ]		18,019	1,233	25,032	12,283	18,019	19,445
11	[Oc/mm <sup>2</sup> ]		9,302	2,394	15,690	3,283	9,302	14,643
12	[Oc/mm <sup>2</sup> ]		7,502	4,650	339,474	7,339	7,502	14,390
15	[Oc/mm <sup>2</sup> ]		18,406	7,200	53,075	9,553	18,406	31,544

**4.5.5. Craniale ROI**

**Knochen**

Die prozentuale Knochenfläche der Gruppe 9 (SynCage-C, Fibrin, 1,0 mg/ml TGpIPTH1-34, TricOs) ist im Median signifikant geringer als die der Gruppen 11 (SynCage-C, Fibrin, 0,7 mg/ml TGpIPTH1-34, TricOs) und 12 (SynCage-C), (Abb. 96, Tab. 86, 87).

Tab. 86 Kruskal- Wallis- Test, Bonferroni- Korrektur, Knochen, craniale ROI

Gr., n=8	Knochen	Kruskal- Wallis-Test (p-Wert)	Bonferroni- Korrektur (α)	Mann-Whitney-U-Test (p-Wert)				
				Gr.9	Gr.10	Gr.11	Gr.12	Gr.15
3	BAr/[%]	0,035	0,003	0,021	0,442	0,645	0,105	1,000
9	BAr/[%]		0,003	/	0,442	0,010	0,007	0,065
10	BAr/[%]		0,003	/	/	0,195	0,130	0,382
11	BAr/[%]		0,003	/	/	/	0,328	0,721
12	BAr/[%]		0,003	/	/	/	/	0,130
15	BAr/[%]		0,003	/	/	/	/	/

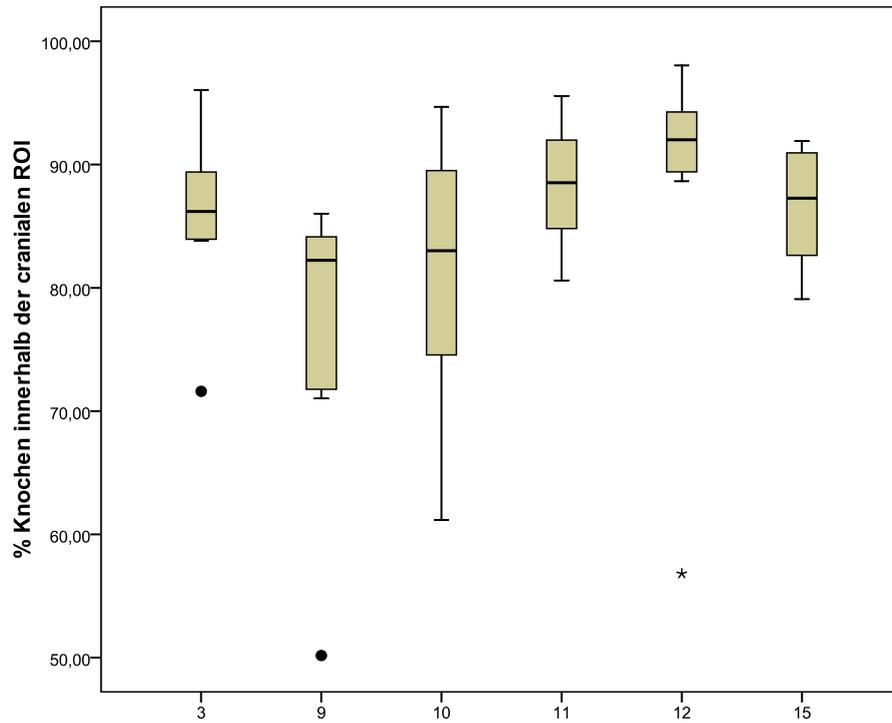


Abb. 96 Knochen innerhalb der cranialen ROI, [%]

Tab. 87 Median, Min- Max- Werte, Knochen, craniale ROI

Gr., n=8	Knochen	Median	Min.	Max.	Perzentile		
					25	50	75
3	BAr/[%]	86,194	71,608	96,058	83,876	86,194	89,942
9	BAr/[%]	82,229	50,174	86,032	71,393	82,229	84,669
10	BAr/[%]	83,017	61,182	94,697	73,802	83,017	90,393
11	BAr/[%]	88,530	80,604	95,567	84,371	88,530	93,336
12	BAr/[%]	92,010	56,815	98,035	89,024	92,010	94,374
15	BAr/[%]	87,275	79,095	91,895	82,188	87,275	91,195

**Mineralisierter Knochen**

Die prozentuale mineralisierte Knochenfläche der Gruppe 9 (SynCage-C, Fibrin, 1,0 mg/ml TGpPTH1-34, TricOs) ist signifikant geringer als die der Gruppen 11 (SynCage-C, Fibrin, 0,7 mg/ml TGpPTH1-34, TricOs) sowie 12 (SynCage-C). Letztere verfügt ebenfalls über eine signifikant höhere prozentuale mineralisierte Knochenfläche als Gruppe 15 (SynCage-C, Fibrin, 0,2 mg/ml TGpPTH1-34, TricOs), (Abb. 97, Tab. 88, 89).

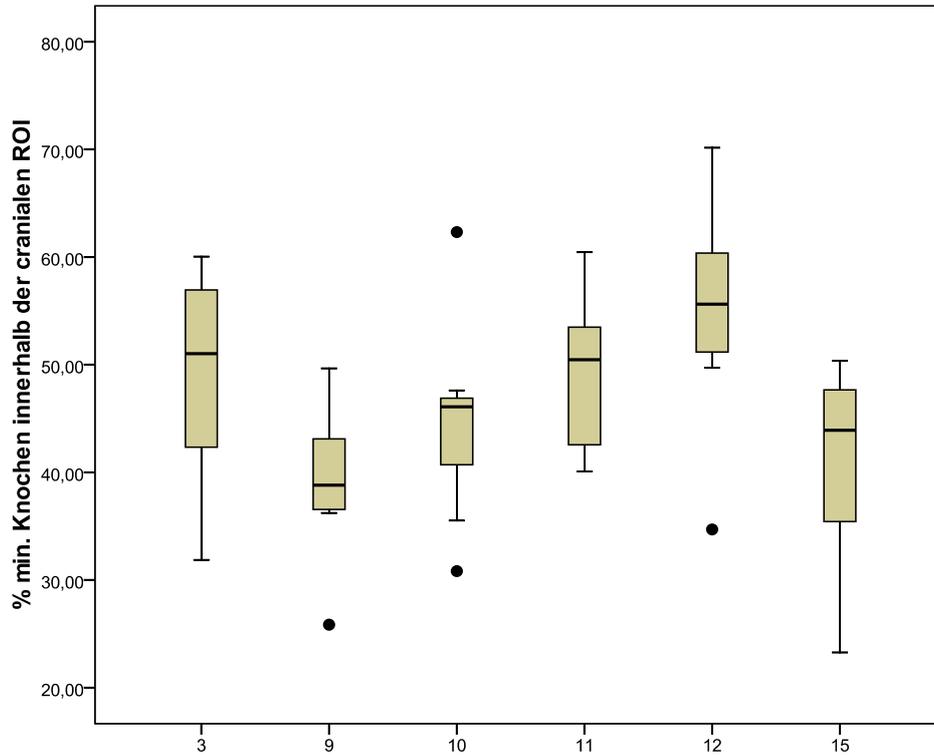


Abb. 97 Mineralisierter Knochen innerhalb der cranialen ROI, [%]

Tab. 88 Kruskal- Wallis- Test, Bonferroni- Korrektur, min. Knochen, craniale ROI

Gr., n=8	min. Knochen	Kruskal- Wallis-Test (p-Wert)	Bonferroni- Korrektur ( $\alpha$ )	Mann-Whitney-U-Test (p-Wert)				
				Gr.9	Gr.10	Gr.11	Gr.12	Gr.15
3	BMdAr[%]	0,015	0,003	0,050	0,442	0,959	0,279	0,161
9	BMdAr[%]		0,003	/	0,195	0,010	0,007	0,574
10	BMdAr[%]		0,003	/	/	0,382	0,038	0,959
11	BMdAr[%]		0,003	/	/	/	0,161	0,065
12	BMdAr[%]		0,003	/	/	/	/	0,007
15	BMdAr[%]		0,003	/	/	/	/	/

Tab. 89 Median, Min- Max- Werte, min. Knochen, craniale ROI

Gr., n=8	min. Knochen	Median	Min.	Max.	Perzentile		
					25	50	75
3	BMdAr[%]	51,031	31,872	60,038	40,582	51,031	57,155
9	BMdAr[%]	38,807	25,849	49,671	36,394	38,807	43,779
10	BMdAr[%]	46,094	30,824	62,322	38,111	46,094	47,250
11	BMdAr[%]	50,466	40,077	60,445	42,523	50,466	54,224
12	BMdAr[%]	55,626	34,699	70,149	50,441	55,626	61,648
15	BMdAr[%]	43,912	23,272	50,342	34,637	43,912	48,163

### Undifferenziertes Bindegewebe

Der Median der prozentualen Bindegewebsfläche der Gruppe 9 (SynCage-C, Fibrin, 1,0 mg/ml TGpPTH1-34, TricOs) ist signifikant höher als der der Gruppen 11 (SynCage-C, Fibrin, 0,7 mg/ml TGpPTH1-34, TricOs) und 12 (SynCage-C), (Abb. 98, Tab. 90, 91).

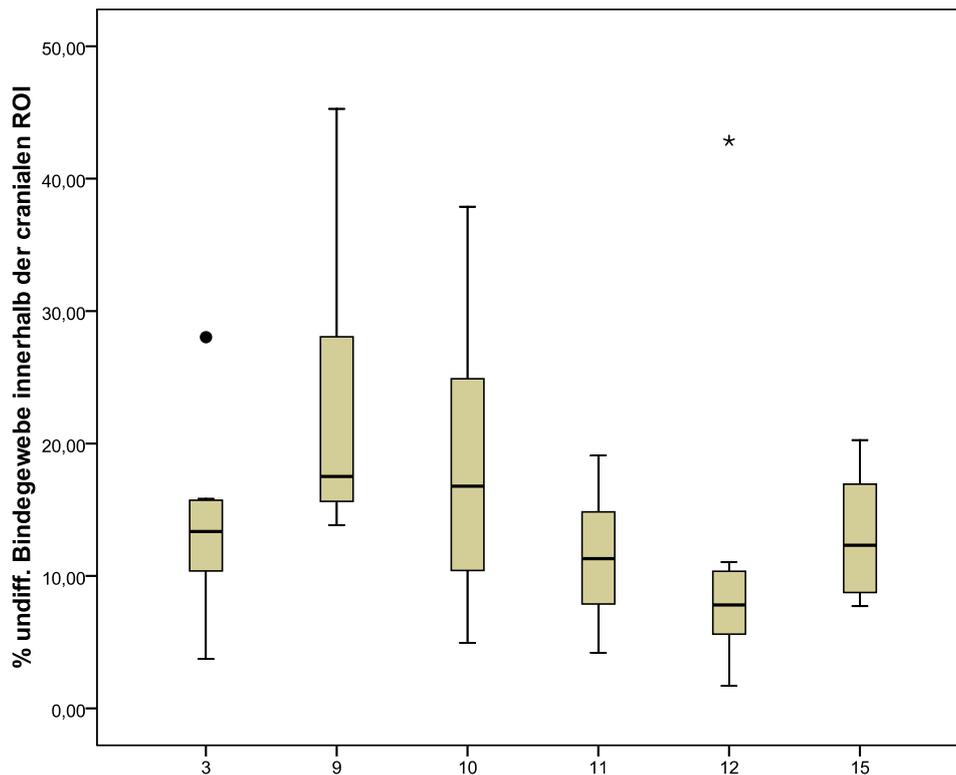


Abb. 98 undifferenziertes Bindegewebe innerhalb der cranialen ROI, [%]

Tab. 90 Kruskal- Wallis- Test, Bonferroni- Korrektur, undiff. Bindegewebe, CrROI

Gr., n=8	undiff. Binde- gewebe	Kruskal- Wallis-Test (p-Wert)	Bonferroni- Korrektur ( $\alpha$ )	Mann-Whitney-U-Test (p-Wert)				
				Gr.9	Gr.10	Gr.11	Gr.12	Gr.15
3	CotAr/[%]	0,033	0,003	0,021	0,442	0,574	0,105	0,959
9	CotAr/[%]		0,003	/	0,442	0,010	0,007	0,065
10	CotAr/[%]		0,003	/	/	0,161	0,130	0,382
11	CotAr/[%]		0,003	/	/	/	0,279	0,721
12	CotAr/[%]		0,003	/	/	/	/	0,130
15	CotAr/[%]		0,003	/	/	/	/	/

Tab. 91 Median, Min- Max- Werte, undiff. Bindegewebe, craniale ROI

Gr., n=8	undiff. Binde- gewebe	Median	Min.	Max.	Perzentile		
					25	50	75
3	CotAr/[%]	13,358	3,726	28,035	9,871	13,358	15,776
9	CotAr/[%]	17,510	13,845	45,273	15,094	17,510	28,449
10	CotAr/[%]	16,773	4,960	37,881	9,535	16,773	25,650
11	CotAr/[%]	11,310	4,202	19,094	6,571	11,310	15,145
12	CotAr/[%]	7,806	1,695	42,862	5,468	7,806	10,706
15	CotAr/[%]	12,320	7,714	20,264	8,506	12,320	17,452

## Knorpel

Bei Gruppe 9 (SynCage-C, Fibrin, 1,0 mg/ml TGpIPTH1-34, TricOs) überschreitet der prozentuale Knorpelanteil den der Gruppen 3 (SynCage-C, TricOs) und 10 (SynCage-C, Fibrin, 0,4 mg/ml TGpIPTH1-34, TricOs) signifikant (Abb. 99, Tab. 92).

Tab. 92 Kruskal- Wallis- Test, Bonferroni- Korrektur, Knorpel, craniale ROI

Gr., n=8	Knorpel	Kruskal- Wallis-Test (p-Wert)	Bonferroni- Korrektur ( $\alpha$ )	Mann-Whitney-U-Test (p-Wert)				
				Gr.9	Gr.10	Gr.11	Gr.12	Gr.15
3	CgAr/[%]	0,007	0,003	0,003	0,505	0,328	0,574	0,105
9	CgAr/[%]		0,003	/	0,000	0,105	0,050	0,798
10	CgAr/[%]		0,003	/	/	0,065	0,195	0,010
11	CgAr/[%]		0,003	/	/	/	0,878	0,234
12	CgAr/[%]		0,003	/	/	/	/	0,234
15	CgAr/[%]		0,003	/	/	/	/	/

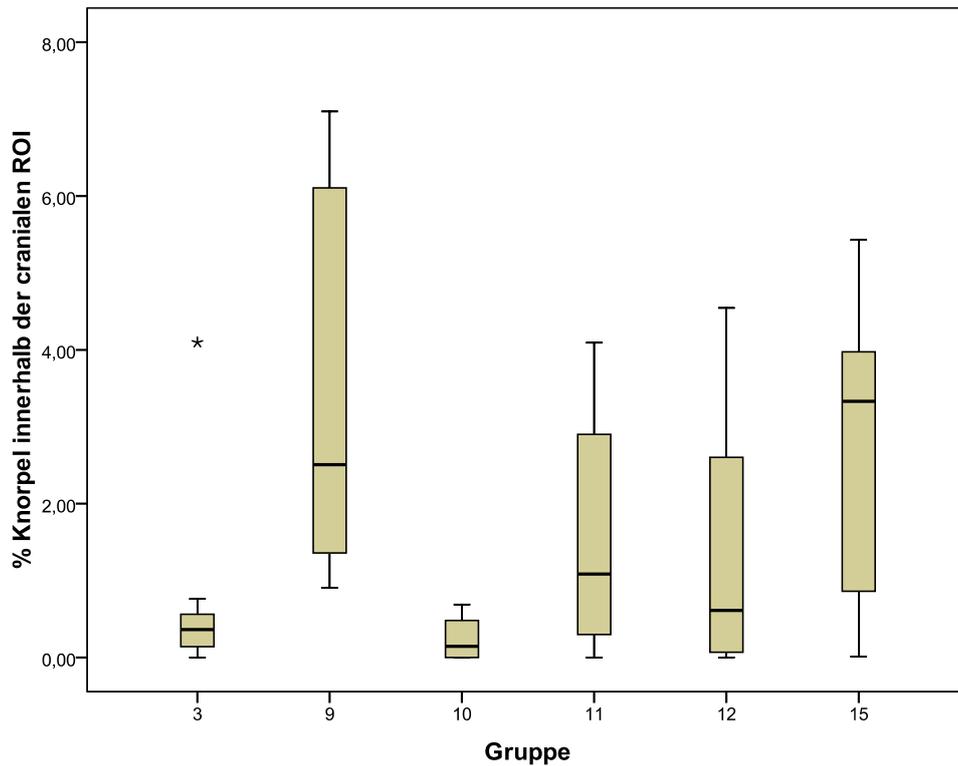


Abb. 99 Knorpel innerhalb der cranialen ROI, [%]

Der Median ist im Gruppenvergleich bei Gruppe 15 (SynCage-C, Fibrin, 0,2 mg/ml TGpPTH1-34, TricOs) am größten und bei Gruppe 3 (SynCage-C, TricOs) am kleinsten (Tab. 93).

Tab. 93 Median, Min- Max- Werte, Knorpel, craniale ROI

Gr., n=8	Knorpel	Median	Min.	Max.	Perzentile		
					25	50	75
3	CgAr/[%]	0,363	0,000	4,097	0,071	0,363	0,662
9	CgAr/[%]	2,507	0,909	7,101	1,313	2,507	6,545
10	CgAr/[%]	0,145	0,000	0,690	0,000	0,145	0,525
11	CgAr/[%]	1,086	0,000	4,094	0,149	1,086	3,255
12	CgAr/[%]	0,611	0,000	4,545	0,034	0,611	3,123
15	CgAr/[%]	3,332	0,012	5,430	0,464	3,332	4,098

## TricOs

Der Median der prozentualen Anteile an TricOs- Granulat weist im Gruppenvergleich bei Gruppe 10 (SynCage-C, Fibrin, 0,4 mg/ml TGpIPTH1-34, TricOs) den höchsten und bei Gruppe 3 (SynCage-C, TricOs) den niedrigsten Wert auf. Es bestehen jedoch keine Signifikanzen (Tab. 94).

Tab. 94 Median, Min- Max- Werte, TricOs, CrROI

Gr., n=8	TricOs	Kruskal- Wallis-Test (p-Wert)	Median	Min.	Max.	Perzentile		
						25	50	75
3	TAr[%]	0,366	0,003	0,000	0,905	0,000	0,003	0,028
9	TAr[%]		0,009	0,000	2,235	0,000	0,009	1,748
10	TAr[%]		0,442	0,000	3,961	0,002	0,442	2,857
11	TAr[%]		0,042	0,000	1,538	0,000	0,042	0,151
15	TAr[%]		0,033	0,008	0,649	0,016	0,033	0,113

## Absolutes Bindegewebe

Der Gruppenvergleich der prozentualen Anteile an absolutem Bindegewebe ergab keine signifikanten Unterschiede. Der Median ist bei Gruppe 10 (SynCage-C, Fibrin, 0,4 mg/ml TGpIPTH1-34, TricOs) am höchsten und bei Gruppe 12 (SynCage-C) am niedrigsten ausgeprägt (Tab. 95).

Tab. 95 Median, Min- Max- Werte, abs. Bindegewebe, CrROI

Gr., n=8	abs. Binde- gewebe	Kruskal- Wallis-Test (p-Wert)	Median	Min.	Max.	Perzentile		
						25	50	75
3	CoTabsAr/ [%]	0,058	12,780	3,444	23,932	9,554	12,780	15,672
9	CoTabsAr/ [%]		15,315	10,430	38,287	11,045	15,315	24,432
10	CoTabsAr/ [%]		16,190	3,304	33,912	9,361	16,190	23,143
11	CoTabsAr/ [%]		8,916	4,202	18,498	4,755	8,916	13,574
12	CoTabsAr/ [%]		6,752	1,695	38,317	4,299	6,752	9,208
15	CoTabsAr/ [%]		9,867	3,466	17,947	5,230	9,867	14,735

**Blutgefäßdichte**

Der Median der Blutgefäßdichte der Gruppe 3 (SynCage-C, TricOs) ist signifikant höher als der der Gruppen 9 (SynCage-C, Fibrin, 1,0 mg/ml TGpPTH1-34, TricOs), 10 (SynCage-C, Fibrin, 0,4 mg/ml TGpPTH1-34, TricOs), 11 (SynCage-C, Fibrin, 0,7 mg/ml TGpPTH1-34, TricOs), 12 (SynCage-C) und 15 (SynCage-C, Fibrin, 0,2 mg/ml TGpPTH1-34, TricOs), (Abb. 100, Tab. 96, 97).

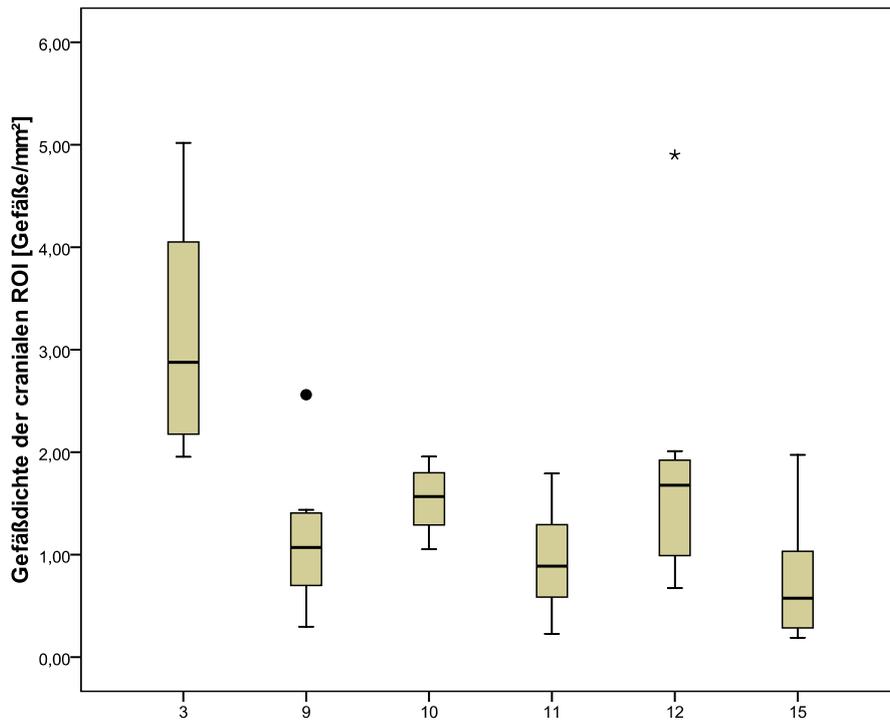


Abb. 100 Gefäßdichte der cranialen ROI, [Gefäße/mm<sup>2</sup>]

Tab. 96 Kruskal- Wallis- Wert, Bonferroni- Korrektur, Gefäßdichte, craniale ROI

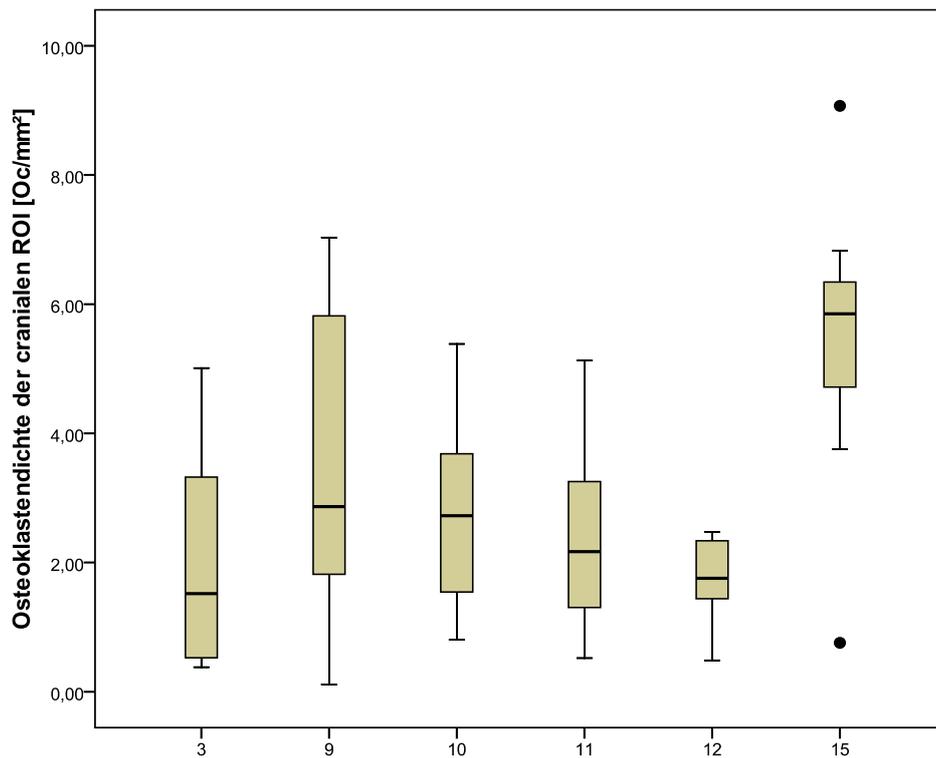
Gr., n=8	Gefäßdichte	Kruskal- Wallis-Test (p-Wert)	Bonferroni- Korrektur (α)	Mann-Whitney-U-Test (p-Wert)				
				Gr.9	Gr.10	Gr.11	Gr.12	Gr.15
3	[Gefäße/mm <sup>2</sup> ]	0,000	0,01	0,001	0,000	0,000	0,010	0,000
9	[Gefäße/mm <sup>2</sup> ]		0,01	/	/	/	/	/
10	[Gefäße/mm <sup>2</sup> ]		0,01	/	/	/	/	/
11	[Gefäße/mm <sup>2</sup> ]		0,01	/	/	/	/	/
12	[Gefäße/mm <sup>2</sup> ]		0,01	/	/	/	/	/
15	[Gefäße/mm <sup>2</sup> ]		0,01	/	/	/	/	/

Tab. 97 Median, Min- Max- Werte, Gefäßdichte, craniale ROI

Gr., n=8	Gefäßdichte	Median	Min.	Max.	Perzentile		
					25	50	75
3	[Gefäße/mm <sup>2</sup> ]	2,877	1,954	5,019	2,097	2,877	4,274
9	[Gefäße/mm <sup>2</sup> ]	1,070	0,297	2,561	0,630	1,070	1,422
10	[Gefäße/mm <sup>2</sup> ]	1,566	1,053	1,957	1,283	1,566	1,835
11	[Gefäße/mm <sup>2</sup> ]	0,888	0,227	1,791	0,574	0,888	1,294
12	[Gefäße/mm <sup>2</sup> ]	1,678	0,674	4,901	0,973	1,678	1,967
15	[Gefäße/mm <sup>2</sup> ]	0,574	0,189	1,974	0,273	0,574	1,049

### Osteoklastendichte

Der Gruppenvergleich ergab einen signifikanten Unterschied für die Osteoklastendichte. Nach erfolgter Bonferroni- Korrektur bestehen bei Anwendung des U- Tests bei Gruppe 3 (SynCage-C, TricOs) eine signifikant kleinere Osteoklastendichte als bei Gruppe 15 (SynCage-C, Fibrin, 0,2 mg/ml TGpIPTH1-34, TricOs), (Abb. 101, Tab. 98, 99).

Abb. 101 Osteoklastendichte der cranialen ROI, [Oc/mm<sup>2</sup>]

Tab. 98 Kruskal- Wallis- Test, Bonferroni- Korrektur, Osteoklastendichte, CrROI

Gr., n=8	Osteoklasten- dichte	Kruskal- Wallis-Test (p-Wert)	Bonferroni- Korrektur ( $\alpha$ )	Mann-Whitney-U-Test (p-Wert)				
				Gr.9	Gr.10	Gr.11	Gr.12	Gr.15
3	[Oc/mm <sup>2</sup> ]	0,018	0,003	0,279	0,279	0,574	1,000	0,003
9	[Oc/mm <sup>2</sup> ]		0,003	/	0,505	0,234	0,083	0,195
10	[Oc/mm <sup>2</sup> ]		0,003	/	/	0,442	0,130	0,021
11	[Oc/mm <sup>2</sup> ]		0,003	/	/	/	0,442	0,015
12	[Oc/mm <sup>2</sup> ]		0,003	/	/	/	/	0,007
15	[Oc/mm <sup>2</sup> ]		0,003	/	/	/	/	/

Tab. 99 Median, Min- Max- Werte der Osteoklastendichte, CrROI

Gr., n=8	Osteoklasten- dichte	Median	Min.	Max.	Perzentile		
					25	50	75
3	[Oc/mm <sup>2</sup> ]	1,520	0,379	5,010	0,469	1,520	3,417
9	[Oc/mm <sup>2</sup> ]	2,865	0,113	7,033	1,457	2,865	5,926
10	[Oc/mm <sup>2</sup> ]	2,724	0,806	5,384	1,261	2,724	3,911
11	[Oc/mm <sup>2</sup> ]	2,168	0,520	5,128	1,091	2,168	3,675
12	[Oc/mm <sup>2</sup> ]	1,756	0,486	2,469	1,438	1,756	2,370
15	[Oc/mm <sup>2</sup> ]	5,851	0,757	9,070	4,236	5,851	6,587

#### 4.5.6. Caudale ROI

##### Knochen

Der Gruppenvergleich der prozentualen Anteile an Knochengewebe ergab keine signifikanten Unterschiede. Der größte Median besteht bei Gruppe 12 (SynCage-C) und der niedrigste bei Gruppe 15 (SynCage-C, Fibrin, 0,2 mg/ml TGpPTH1-34, TricOs), (Tab. 100).

Tab. 100 Median, Min- Max- Werte, Knochen, caudale ROI

Gr., n=8	Knochen	Kruskal- Wallis-Test (p-Wert)	Median	Min.	Max.	Perzentile		
						25	50	75
3	BAr/[%]	0,082	84,059	70,538	93,955	78,299	84,059	91,218
9	BAr/[%]		77,019	50,057	91,848	67,351	77,019	85,760
10	BAr/[%]		81,833	51,650	90,950	75,496	81,833	87,631
11	BAr/[%]		82,929	77,693	95,358	78,038	82,929	91,419
12	BAr/[%]		90,124	63,300	96,753	83,422	90,124	94,346
15	BAr/[%]		74,599	56,796	87,992	65,376	74,599	81,994

**Mineralisierter Knochen**

Der Kruskal- Wallis- Test ergab bei Vergleich der Gruppen 3 bis 15 ein signifikantes Ergebnis für die prozentuale mineralisierte Knochenfläche. Diese ist bei Gruppe 11 (SynCage-C, Fibrin, 0,7 mg/ml TGpPTH1-34, TricOs) signifikant größer als bei den Gruppen 9 (SynCage-C, Fibrin, 1,0 mg/ml TGpPTH1-34, TricOs) und 15 (SynCage-C, Fibrin, 0,2 mg/ml TGpPTH1-34, TricOs). Letztere ist wiederum signifikant geringer als die der Gruppe 12 (SynCage-C), (Abb. 102, Tab. 101, 102).

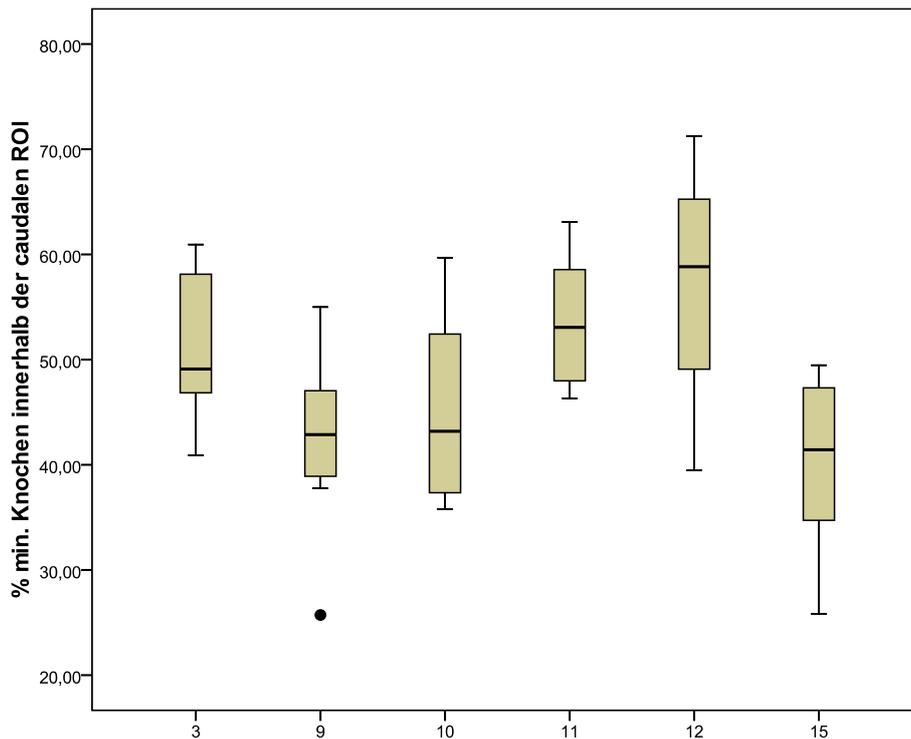


Abb. 102 Mineralisierter Knochen innerhalb der caudalen ROI, [%]

Tab. 101 Kruskal- Wallis- Test, Bonferroni- Korrektur, min. Knochen, caudale ROI

Gr., n=8	min. Knochen	Kruskal- Wallis-Test (p-Wert)	Bonferroni- Korrektur (α)	Mann-Whitney-U-Test (p-Wert)				
				Gr.9	Gr.10	Gr.11	Gr.12	Gr.15
3	BMdAr/[%]	0,005	0,0033	0,028	0,161	0,645	0,234	0,028
9	BMdAr/[%]		0,0033	/	0,878	0,007	0,015	0,798
10	BMdAr/[%]		0,0033	/	/	0,105	0,050	0,505
11	BMdAr/[%]		0,0033	/	/	/	0,382	0,005
12	BMdAr/[%]		0,0033	/	/	/	/	0,005
15	BMdAr/[%]		0,0033	/	/	/	/	/

Tab. 102 Median, Min- Max- Werte, min. Knochen, caudale ROI

Gr., n=8	min. Knochen	Median	Min.	Max.	Perzentile		
					25	50	75
3	BMdAr/[%]	49,105	40,905	60,942	46,657	49,105	59,125
9	BMdAr/[%]	42,876	25,727	54,987	38,334	42,876	47,886
10	BMdAr/[%]	43,182	35,786	59,703	37,066	43,182	52,944
11	BMdAr/[%]	53,072	46,329	63,082	47,720	53,072	58,874
12	BMdAr/[%]	58,826	39,473	71,248	48,762	58,826	66,769
15	BMdAr/[%]	41,429	25,809	49,476	33,599	41,429	47,571

### Undifferenziertes Bindegewebe

Der Gruppenvergleich der prozentualen Anteile an undifferenziertem Bindegewebe ergab keine signifikanten Unterschiede (Tab. 103).

Tab. 103 Median, Min-Max-Werte, undiff. Bindegewebe, caudale ROI

Gr., n=8	undiff. Binde- gewebe	Kruskal- Wallis-Test (p-Wert)	Median	Min.	Max.	Perzentile		
						25	50	75
3	CotAr/[%]	0,090	15,719	5,928	29,176	8,553	15,719	21,581
9	CotAr/[%]		22,532	8,033	49,336	13,511	22,532	32,145
10	CotAr/[%]		17,439	8,600	46,858	11,270	17,439	24,381
11	CotAr/[%]		16,762	4,541	21,981	8,377	16,762	21,139
12	CotAr/[%]		9,650	3,222	36,022	5,472	9,650	16,266
15	CotAr/[%]		25,214	11,402	43,082	17,085	25,214	34,196

### Knorpel

Der Kruskal- Wallis- Test ergab bei Vergleich der Gruppen 3 bis 15 ein signifikantes Ergebnis für die prozentuale Knorpelfläche (Abb. 103, Tab. 104).

Der Median der prozentualen Knorpelfläche der Gruppe 12 (SynCage-C) ist signifikant kleiner als der der Gruppe 15 (SynCage-C, Fibrin, 0,2 mg/ml TGpIPTH1-34, TricOs), (Tab. 105).

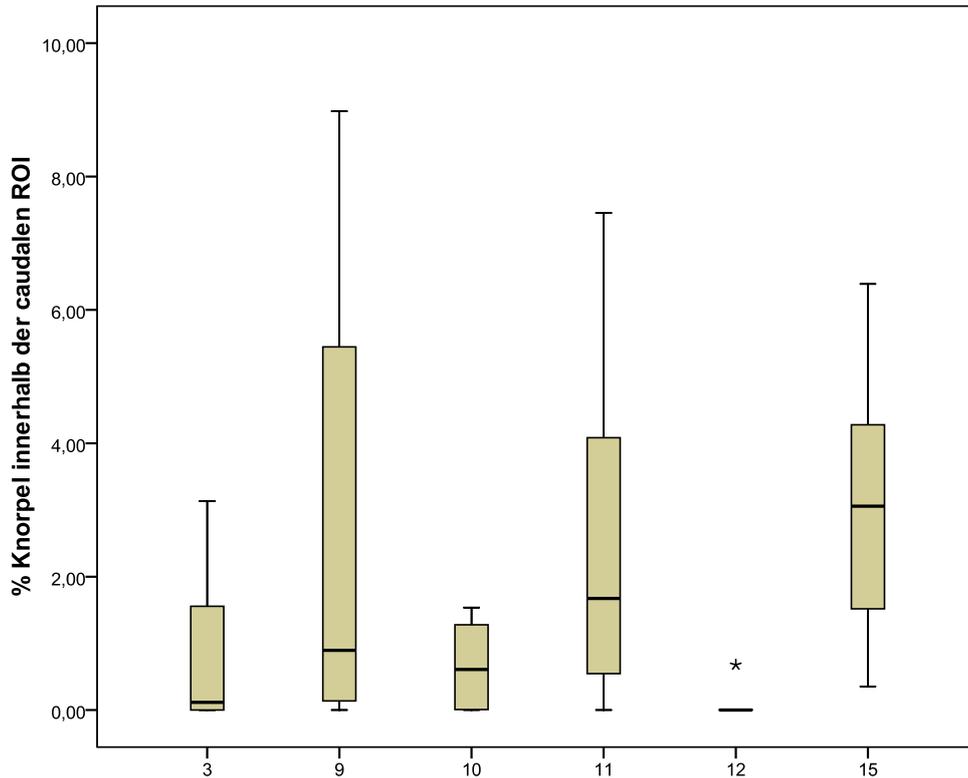


Abb. 103 Knorpel innerhalb der caudalen ROI, [%]

Tab. 104 Kruskal- Wallis- Test, Bonferroni- Korrektur, Knorpel, caudale ROI

Gr., n=8	Knorpel	Kruskal- Wallis-Test (p-Wert)	Bonferroni- Korrektur ( $\alpha$ )	Mann-Whitney-U-Test (p-Wert)				
				Gr.9	Gr.10	Gr.11	Gr.12	Gr.15
3	CgAr/[%]	0,005	0,0033	0,195	0,712	0,195	0,161	0,010
9	CgAr/[%]		0,0033	/	0,442	0,959	0,038	0,505
10	CgAr/[%]		0,0033	/	/	0,130	0,038	0,007
11	CgAr/[%]		0,0033	/	/	/	0,021	0,442
12	CgAr/[%]		0,0033	/	/	/	/	0,000
15	CgAr/[%]		0,0033	/	/	/	/	/

Tab. 105 Median, Min- Max- Werte, Knorpel, caudale ROI

Gr., n=8	Knorpel	Median	Min.	Max.	Perzentile		
					25	50	75
3	CgAr/[%]	0,116	0,000	3,134	0,000	0,116	2,239
9	CgAr/[%]	0,895	0,000	8,979	0,068	0,895	5,602
10	CgAr/[%]	0,608	0,000	1,537	0,004	0,608	1,302
11	CgAr/[%]	1,672	0,000	7,455	0,273	1,672	4,551
12	CgAr/[%]	0,000	0,000	0,677	0,000	0,000	0,006
15	CgAr/[%]	3,057	0,354	6,388	1,351	3,057	4,640

**TricOs**

Der Gruppenvergleich der prozentualen Anteile an TricOs ergab keine signifikanten Unterschiede (Tab. 106).

Tab. 106 Median, Min- Max- Werte, TricOs, caudale ROI

Gr., n=8	TricOs	Kruskal- Wallis-Test (p-Wert)	Median	Min.	Max.	Perzentile		
						25	50	75
3	TAr/[%]	0,188	0,013	0,000	1,571	0,000	0,013	0,144
9	TAr/[%]		0,010	0,000	8,276	0,000	0,010	0,124
10	TAr/[%]		0,043	0,000	0,366	0,003	0,043	0,276
11	TAr/[%]		0,013	0,000	0,556	0,000	0,013	0,118
15	TAr/[%]		0,169	0,011	3,084	0,041	0,169	0,848

**Absolutes Bindegewebe**

Es bestehen beim prozentualen Anteil an absolutem Bindegewebe keine Signifikanzen (Tab. 107).

Tab. 107 Median, Min- Max- Werte, abs. Bindegewebe, CdROI

Gr., n=8	abs. Binde- gewebe	Kruskal- Wallis-Test (p-Wert)	Median	Min.	Max.	Perzentile		
						25	50	75
3	CoTabsAr/ [%]	0,255	14,096	5,902	26,042	8,397	14,096	21,021
9	CoTabsAr/ [%]		19,822	4,028	43,451	7,401	19,822	31,246
10	CoTabsAr/ [%]		16,636	8,356	46,511	10,266	16,636	23,148
11	CoTabsAr/ [%]		14,789	2,654	18,070	8,238	14,789	15,783
12	CoTabsAr/ [%]		9,650	3,222	36,022	5,466	9,650	15,758
15	CoTabsAr/ [%]		22,503	6,342	41,051	14,102	22,503	29,394

**Blutgefäßdichte**

Der Gruppenvergleich ergab einen signifikanten Unterschied für die Gefäßdichte. Der Median der Gruppe 3 (SynCage-C, TricOs) ist signifikant höher als der der Gruppen 10 (SynCage-C, Fibrin, 0,4 mg/ml TGpIPTH1-34, TricOs), 12 (SynCage-C) und 15 (SynCage-C, Fibrin, 0,2 mg/ml TGpIPTH1-34, TricOs), (Abb. 104, Tab. 108, 109).

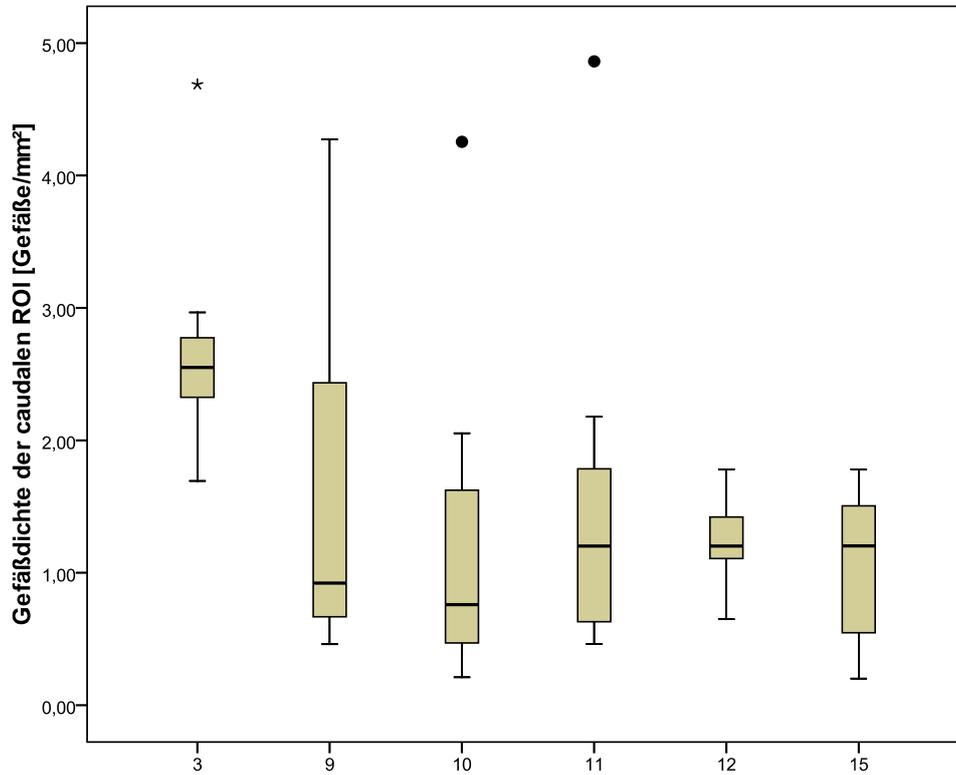


Abb. 104 Gefäßdichte der caudalen ROI, [Gefäße/mm<sup>2</sup>]

Tab. 108 Kruskal- Wallis- Test, Bonferroni- Korrektur, Gefäßdichte, caudale ROI

Gr., n=8	Gefäßdichte	Kruskal- Wallis-Test (p-Wert)	Bonferroni- Korrektur (α)	Mann-Whitney-U-Test (p-Wert)				
				Gr.9	Gr.10	Gr.11	Gr.12	Gr.15
3	[Gefäße/mm <sup>2</sup> ]	0,022	0,01	0,065	0,010	0,015	0,000	0,000
9	[Gefäße/mm <sup>2</sup> ]		0,01	/	/	/	/	/
10	[Gefäße/mm <sup>2</sup> ]		0,01	/	/	/	/	/
11	[Gefäße/mm <sup>2</sup> ]		0,01	/	/	/	/	/
12	[Gefäße/mm <sup>2</sup> ]		0,01	/	/	/	/	/
15	[Gefäße/mm <sup>2</sup> ]		0,01	/	/	/	/	/

Tab. 109 Median, Min- Max- Werte, Gefäßdichte, caudale ROI

Gr., n=8	Gefäßdichte	Median	Min.	Max.	Perzentile		
					25	50	75
3	[GefäÙe/mm <sup>2</sup> ]	2,551	1,693	4,688	2,276	2,551	2,871
9	[GefäÙe/mm <sup>2</sup> ]	0,922	0,461	4,272	0,662	0,922	2,552
10	[GefäÙe/mm <sup>2</sup> ]	0,760	0,211	4,254	0,379	0,760	1,839
11	[GefäÙe/mm <sup>2</sup> ]	1,202	0,463	4,861	0,568	1,202	1,981
12	[GefäÙe/mm <sup>2</sup> ]	1,202	0,650	1,781	1,088	1,202	1,436
15	[GefäÙe/mm <sup>2</sup> ]	1,203	0,202	1,782	0,545	1,203	1,512

### Osteoklastendichte

Die Dichte an Osteoklasten der Gruppe 12 (SynCage-C) ist signifikant kleiner als die der Gruppe 15 (SynCage-C, Fibrin, 0,2 mg/ml TGpPTH1-34, TricOs), (Abb. 105, Tab. 110, 111).

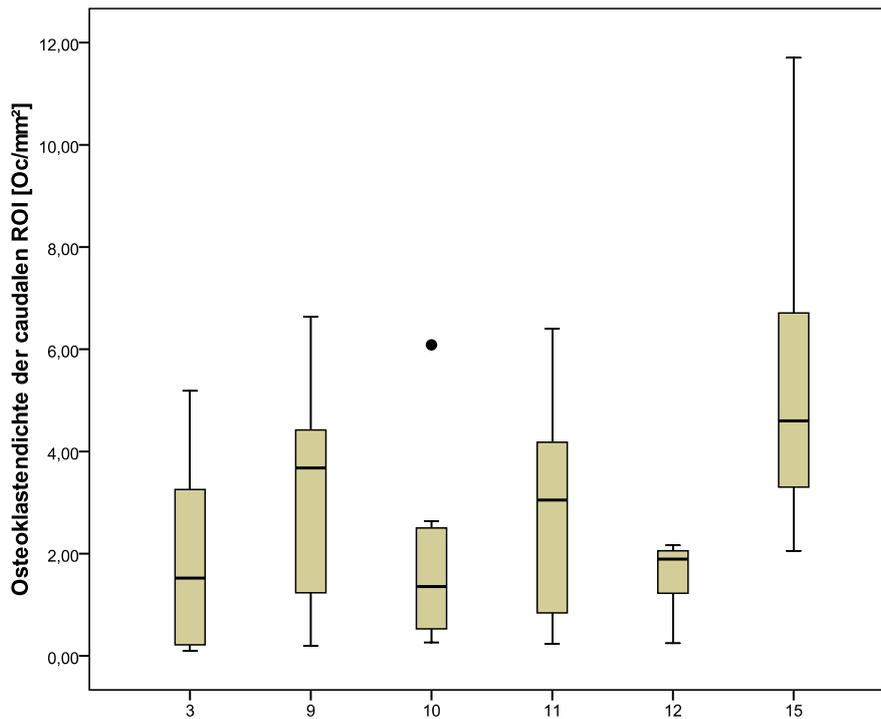


Abb. 105 Osteoklastendichte der caudalen ROI, [Oc/mm<sup>2</sup>]

Tab. 110 Kruskal- Wallis- Test, Bonferroni- Korrektur, Osteoklastendichte, CdROI

Gr., n=8	Osteoklasten- dichte	Kruskal- Wallis-Test (p-Wert)	Bonferroni- Korrektur ( $\alpha$ )	Mann-Whitney-U-Test (p-Wert)				
				Gr.9	Gr.10	Gr.11	Gr.12	Gr.15
3	[Oc/mm <sup>2</sup> ]	0,031	0,0033	0,234	0,798	0,328	0,959	0,021
9	[Oc/mm <sup>2</sup> ]		0,0033	/	0,279	0,798	0,195	0,195
10	[Oc/mm <sup>2</sup> ]		0,0033	/	/	0,382	0,959	0,007
11	[Oc/mm <sup>2</sup> ]		0,0033	/	/	/	0,279	0,065
12	[Oc/mm <sup>2</sup> ]		0,0033	/	/	/	/	0,001
15	[Oc/mm <sup>2</sup> ]		0,0033	/	/	/	/	/

Tab. 111 Median, Min- Max- Werte, Osteoklastendichte, caudale ROI

Gr., n=8	Osteoklasten- dichte	Median	Min.	Max.	Perzentile		
					25	50	75
3	[Oc/mm <sup>2</sup> ]	1,521	0,093	5,187	0,158	1,521	3,671
9	[Oc/mm <sup>2</sup> ]	3,678	0,195	6,637	0,875	3,678	4,540
10	[Oc/mm <sup>2</sup> ]	1,355	0,264	6,084	0,463	1,355	2,570
11	[Oc/mm <sup>2</sup> ]	3,050	0,235	6,407	0,592	3,050	4,568
12	[Oc/mm <sup>2</sup> ]	1,893	0,247	2,161	1,035	1,893	2,084
15	[Oc/mm <sup>2</sup> ]	4,598	2,056	11,704	3,251	4,598	6,720

#### 4.5.7. Fusionsscore

Eine vollständige knöcherner Fusion des Bandscheibenraumes (F1) ist bei keinem Präparat, der sechs untersuchten Gruppen erfolgt. Es besteht überwiegend keine knöcherner Fusion zwischen C3 und C4 (F3). Eine partielle Fusion (F2) wurde bei den Gruppen 3 (SynCage-C, TricOs), 11 (SynCage-C, Fibrin, 0,7 mg/ml TGpPTH1-34, TricOs) und 15 (SynCage-C, Fibrin, 0,2 mg/ml TGpPTH1-34, TricOs) bei jeweils zwei Tieren pro Gruppe nachgewiesen (Tab. 112).

Tab. 112 Fusionsscore

Gruppe	Anzahl Tiere	Fusion			Gesamt
		F1	F2	F3	
3	absolut	0	2	6	8
	%	0,00%	25,00%	75,00%	100,00%
9	absolut	0	0	8	8
	%	0,00%	0,00%	100,00%	100,00%
10	absolut	0	1	7	8
	%	0,00%	12,50%	87,50%	100,00%
11	absolut	0	2	6	8
	%	0,00%	25,00%	75,00%	100,00%
12	absolut	0	1	7	8
	%	0	12,50%	87,50%	100,00%
15	absolut	0	2	6	8
	%	0,00%	25,00%	75,00%	100,00%
Gesamt	absolut	0	8	40	48
	%	0,00%	16,67%	83,33%	100,00%

## 4.6. Zusammenfassung der Ergebnisse

### 4.6.1. Deskriptive Histologie

In den Gruppen 3, 9, 10, 11 und 15 besteht ein ähnliches histologisches Erscheinungsbild, welches sich nur bei der Leercagegruppe unterscheidet.

Eine vollständige knöcherne Fusion des dritten und vierten Halswirbels (C3, C4) ist nicht erfolgt. In allen Gruppen erfolgte jedoch ventral eine, wenn auch unterschiedlich stark ausgeprägte, knöcherne Kallusbildung.

Die ventrale und die Cage- ROI werden von TricOs- Granulat dominiert. Dessen Oberfläche ist durch das Vorkommen von Osteoblasten und Osteoklasten gekennzeichnet.

Des Weiteren befindet sich in der Umgebung und im Zentrum der Partikel Knochen-, Knorpel- und Bindegewebe, während bei Gruppe 12 Geflechtknochen und Bindegewebe überwiegen. Hyalines Knorpelgewebe befindet sich an Deck- und Bodenplatte von C3 und C4, außerdem konnte vereinzelt Faserknorpel im Zentrum des Bandscheibenfachs nachgewiesen werden. Im Bereich der Cage- ROI, in Nähe des Rückenmarks bzw. am dorsalen Cageabschluss ist eine Fusion über hyalines Knorpelgewebe erfolgt.

In Umgebung des Titanimplantats befindet sich Knochen, Bindegewebe, Knorpel und TricOs-Granulat. Im Bereich der cranialen und caudalen ROI ist Knorpelgewebe der verbliebenen Wachstumsfugen nachweisbar.

In den 5Teil- ROIs besteht in direktem Kontakt zum TricOs- Granulat bzw. dem Titan-Implantat eine überwiegend leichte Entzündungsreaktion. Eine schwere Entzündungsreaktion verbunden mit dem Auftreten von Fremdkörperriesenzellen konnte hingegen, wie auch das Bestehen von Osteolyse, nur vereinzelt nachgewiesen werden.

### 4.6.2. Ergebnisse der histomorphometrischen Analyse

Nach Unterscheidung der Gesamtfläche in Knochen, mineralisierten Knochen, undifferenziertes Bindegewebe, Knorpel, TricOs- Granulat und absolutes Bindegewebe bestehen bei Betrachtung der Gesamtfläche der 5TeilROIs und der isolierten Flächen signifikante Unterschiede.

In der Cage- ROI sowie in der Summe der 5TeilROIs erzielte Gruppe 12 (Leercage) die absolut bzw. prozentual signifikant größte Knochenfläche sowie eine im Gruppenvergleich signifikant geringere undifferenzierte Bindegewebsfläche. Die Werte der gemessenen Knorpel-, TricOs- und absoluten Bindegewebsflächen ergaben in der CROI und den 5TeilROIs eine inhomogene Gruppenverteilung. Gruppe 15 weist im Gruppenvergleich eine signifikant größere Knorpelfläche auf, während die signifikant größte Fläche an TricOs-Granulat bei Gruppe 11 besteht. Gruppe 12 erzielte jedoch einheitlich signifikant geringere Flächen an absolutem Bindegewebe.

In der dorsalen ROI bestehen signifikante Unterschiede bezüglich der mineralisierten Knochen- und Knorpelfläche, jedoch ohne mögliche Gruppenspezifizierung.

Der Gruppenvergleich der Anteile an Knochen, TricOs, undifferenziertem und absolutem Bindegewebe ergab keine signifikanten Unterschiede.

Auch in der ventralen ROI besteht im Gruppenvergleich bei der Leercagegruppe eine signifikant größere mineralisierte Knochenfläche, während die Bindegewebs- und Knorpelfläche bei Gruppe 9 signifikant hohe Werte aufweist. Bei den prozentualen Anteilen an TricOs- Granulat und absolutem Bindegewebe ergaben sich keine signifikanten Unterschiede.

In der cranialen ROI bestehen bei Gruppe 9 im Gruppenvergleich signifikant geringere Anteile an Knochengewebe, bei einer gleichzeitig signifikant größeren Bindegewebs- und Knorpelfläche. Es ergaben sich bei den Flächen an TricOs- Granulat und absolutem Bindegewebe keine signifikanten Unterschiede.

In der caudalen ROI bestehen bei Vergleich der Knochenflächen keine signifikanten Unterschiede. Die Gruppen 11 und 12 weisen hingegen bei der mineralisierten Knochenfläche im Gruppenvergleich Signifikanzen auf. Bei Vergleich der Knorpelfläche sind die Werte der Gruppe 12 signifikant geringer als die der Gruppe 15.

Für die Flächen an undifferenziertem Bindegewebe, Tricos und absolutem Bindegewebe ergaben sich prozentual keine signifikanten Unterschiede.

### **Fusionsscore**

Eine vollständige knöcherne Fusion ist nicht erfolgt, während eine partielle Fusion bei acht Tieren (16,67%) vorkommt und bei weiteren 40 Tieren (83,33%) keine knöcherne Fusion zwischen den Halswirbeln C3 und C4 besteht.

### **Blutgefäßdichte**

Es besteht bei allen Gruppen eine hohe Gefäßdichte, wobei Gruppe 3 sowohl in den einzelnen als auch in den aufsummierten 5TeilROIs eine signifikant höhere Blutgefäßdichte als die Gruppen 9, 10, 11, 12 und 15 aufweist.

### **Osteoklastendichte**

Bei allen Gruppen besteht in der ventralen und der Cage- ROI eine hohe Osteoklastendichte, die jedoch trotz bestehender Signifikanz in den 5TeilROIs nicht spezifiziert werden konnte.

## **5. DISKUSSION**

### **5.1. Zusammenfassung des Themas**

Die vorliegende Arbeit ist Teilstudie eines sowohl komplexen als auch umfangreichen Projekts. Es wurde die intervertebrale Spondylodese nach Implantation eines mit Knochenersatzmaterial augmentierten Bandscheibenersatz aus Titan (SynCage-C, Synthes) untersucht. Dies besteht aus dem osteoinduktiven Protein Parathormon, kovalent gebunden an das als Trägermaterial fungierende Fibrin sowie der osteokonduktiven Biokeramik TricOs. Im Vergleich hierzu erfolgte die histologische Evaluation der Spondylodese bei Einsatz des unbefüllten (Leercage) bzw. des mit TricOs augmentierten Titan– Cages.

Die histomorphologischen und histomorphometrischen Auswertungen des Bewegungssegmentes C3 / C4, bestehend aus drittem und viertem Halswirbel, ermöglichten die Darstellung des Fusionsverlaufes sowie der Beurteilung des Einflusses des Implantats auf die Knochenneubildung im Zwischenwirbelraum.

Durch die Untersuchung der verschiedenen Materialien im identischen In– Vivo– Modell war eine vergleichende Aussage über die knöcherne Integration dieser Materialien möglich.

Eine gute Integration konnte beim Einsatz des mit modifiziertem Parathormon in der niedrigsten eingesetzten Dosierung (0,2 mg/ml), TricOs und Fibrin augmentierten Titan– Cages, aber auch bei Einsatz des unbefüllten Cages nachgewiesen werden. Es ist jedoch weder bei den untersuchten Versuchsgruppen und somit unabhängig von der Parathormon-Konzentration, noch bei den Kontrollgruppen eine vollständige knöcherne Fusion erfolgt.

Eine überwiegend leichte Entzündungsreaktion besteht bei allen untersuchten Gruppen in direktem Kontakt zum TricOs- Granulat bzw. dem Titan- Implantat. Eine schwere Entzündungsreaktion konnte, wie auch das Bestehen von Osteolyse, nur vereinzelt nachgewiesen werden.

### **5.2. Diskussion von Material und Methoden**

#### **5.2.1. Tiermodell**

Trotz jahrzehntelanger Forschung im Bereich der ventralen interkorporellen Spondylodese der Halswirbelsäule ist die Erforschung neuer Füllmaterialien zur Erzielung einer beschleunigten und nahezu komplikationsfreien Fusion der Wirbelkörper beim Einsatz von intervertebralen Cages zwingend notwendig. Da dies durch rein klinische Untersuchungen nicht erreichbar ist, muss vor der klinischen Anwendung dieser Kombination aus osteoinduktiven und osteokonduktiven Materialien eine Untersuchung im Tiermodell zur Darstellung der interossären und intervertebralen Biokompatibilität erfolgen.

Zunächst muss bei der Wahl des Tiermodells jedoch sichergestellt werden, dass die im Tierversuch gewonnenen Daten mit hoher Wahrscheinlichkeit auf den Einsatz beim Menschen übertragbar sind. Im Folgenden sind die, bei der Auswahl der Versuchstierspezies zu berücksichtigenden Kriterien aufgeführt (Wissing *et al.*, 1990).

### Kriterien bei Auswahl von Versuchstierspezies

- Knochengröße, -form und -festigkeit ermöglichen Einsatz von humanen Instrumenten und Implantaten.
- Biomechanische Belastung in der untersuchten Region ist zwischen Mensch und Versuchstier vergleichbar.
- Versuchstierspezies und Mensch verfügen über vergleichbare Knochenregeneration.
- Bestehen uniformer Reproduzierbarkeit der Reaktion auf Versuchsbedingungen.
- Ablauf zu erwartender Langzeitfolgen beim Menschen in kürzeren Versuchszeiten beim Tier auswertbar.
- Kostengünstige und unter guten Laborbedingungen erfolgende Projektdurchführung.

Wissing et al. bewerteten die Eignung der Tierspezies Kaninchen, Hund und Schaf für die Brauchbarkeit als Modell der menschlichen Knochenregeneration, wobei es beim Schaf am ehesten möglich erscheint reproduzierbare Rückschlüsse auf die untersuchte Frakturheilung, in diesem Versuch an der Tibia, zu ziehen (Tab. 113).

Tab. 113 Bewertung v. Tierspezies als Modell menschl. Knochenregeneration

Knochen	Kaninchen	Hund	Schaf
Größe, Form, Festigkeit	--	++	++
Biomechanische Belastung	--	-	++
Struktur, Vaskularisierung	+	++	++
Regeneration	-	+	++
Tier	Kaninchen	Hund	Schaf
Reproduzierbare Reaktionen	+	-	++
Leichtes Laborhandling	++	+	+
Einfache Haltung	++	+	+
Kosteneffektivität	++	+	+

Die Nutzung von Versuchstieren im Rahmen von vergleichenden Studien für einen späteren Einsatz beim Menschen wird jedoch durch mehrere Faktoren eingeschränkt. So stellen z.B. McAfee et al. (McAfee *et al.*, 1988) bei der Bewertung der Ergebnisse der Wirbelkörperfusion an Versuchstieren die folgend aufgeführten limitierenden Faktoren auf.

- Qualitative und quantitative Unterschiede bzgl. Krafteinwirkung auf horizontal getragene WS des Versuchstiers (Quadrupede) und vertikal stehender WS des Menschen (Bipede).
- Unterschiede zw. artifiziell induzierter Instabilität der WS als Idealbild und in praxi bestehenden degenerativen Prozessen, Spondylolisthesen, Scoliose od. thorakolumbalen Frakturen.
- Übertragung der, aus 2D- histolog. Präparaten gewonnenen Ergebnisse auf 3D-Körper abh. von angewandeter mikroskopischer Technik u. Bewertungskriterien.

Die Eignung des Schafes für dieses Tiermodell wurde bei Einsatz in diversen Projekten in der Wirbelsäulen- Forschung bestätigt. Es konnten große Ähnlichkeiten bei Vergleich der Halswirbelsäule von Schaf und Mensch, vor allem im Bewegungssegment C3 / C4, bzgl. biomechanischer als auch anatomischer Gegebenheiten, nachgewiesen werden (Kandziora, 2001 a, b; Wilke, 1997 a, b).

Es ist jedoch zu berücksichtigen, dass der Regenerationsprozess beim Mensch nur bei Vorliegen ähnlicher Knochenstrukturen im tierexperimentellen Modell nachvollzogen werden kann. Somit ist ein direkter Vergleich der Osteonenregeneration von Schaf und Mensch nicht möglich, da systematische Unterschiede in der Osteonentopographie und der Lamellenstruktur des Knochengewebes beider Spezies bestehen. Hingegen weisen die Spezies Hund und Primat, unter Berücksichtigung des Skelettalters und der Topographie, gleichartige Sekundärstrukturen wie der Mensch auf und wären somit zur Untersuchung der Knochenregeneration besser geeignet (Eitel *et al.*, 1981 a, b). Ein Einsatz dieser Tierarten ist jedoch, v. a. von Primaten, aus ethischen Gründen umstritten.

Auf Grund der bestehenden anatomischen Gegebenheiten der Halswirbelsäule des Schafs ist zudem die Verwendung von Implantaten möglich, die bei chirurgischen Eingriffen an der Wirbelsäule des Menschen eingesetzt werden.

Die Nutzung des Tiermodells Schaf ist zudem mit weiteren Vorteilen verknüpft (Brill, 1992).

### **Vorteile des Tiermodells Schaf**

- mehrere Monate Überlebenszeit ermöglicht klin. Untersuchungen u. Diagnostik klin. Veränderungen.
- landwirtschaftl. Nutztier Schaf ist an Umgang mit Menschen gewöhnt u. klin. Untersuchung gut zugänglich.
- Im Vergleich zum Hund kein starker Bindungsaufbau des Schafs zum Untersucher.
- mäßig starke Fluchtreaktion ermöglicht vergleichbar ablaufende Befunderhebung.
- Möglichkeit der Zusammenstellung homogener, vergleichbarer Gruppen.
- Zusammensetzung großer Zahl genetisch verwandter Individuen gleichen Alters, Gewichts, Größe ermöglicht Bildung einer standardisierten Versuchsgrundlage.

Als Nachteil führt Brill in seiner Dissertation die nicht realisierbare Wahl einheitlichen Tiermaterials trotz gleichen Geschlechts und Rasse auf. Bedingt ist dies durch unterschiedliche Lebensumstände während der Verwendungszeit als landwirtschaftliches Nutztier (Zahl der Nachkommen, Erkrankungen, Haltungsbedingungen).

Im Rahmen der durchgeführten Studie stellte sich der Umgang mit den Schafen weitgehend unkompliziert dar, während jedoch das weitere Management (Unterbringung, Fütterung, Personal, Medikamentenkosten, Tierkörperbeseitigung) relativ aufwendig war. Dem Auftreten von Wundinfektionen wurde durch tägliche postoperative Wundkontrolle und Aufbringen eines Sprühpflasters vorgebeugt, zudem entfiel die Gefahr einer Kontamination durch gegenseitiges Belecken oder Beknabbern, wie bei Hunden und Schweinen üblich. Extrembelastungen der Halswirbelsäule wurden, durch Herdenhaltung von im Temperament gemäßiger weiblicher Tiere, Bodenfütterung und behutsames Einfangen und Behandeln, vermieden oder zumindest möglichst gering gehalten.

Durch diese Versuchsbedingungen, den Erfahrungen der Arbeitsgruppe mit dem Schaf als Versuchstier sowie der vorliegenden Literatur kann, auch unter den strengen ethischen Grundsätzen des Tierschutzes, das Schaf als ein geeignetes Modell für die cervikale intervertebrale Spondylodese angesehen werden.

### **5.3. Versuchsaufbau**

In diesem Versuch erfolgte an vier Versuchsgruppen zu je acht Schafen eine ventrale interkorporelle Spondylodese des dritten und vierten Halswirbels unter Implantation des, mit Parathormon vier verschiedener Konzentrationen, Fibrin und TricOs gefüllten SynCage-C. Es sollen Aussagen über die Dosisabhängigkeit des Hormons aufgestellt und somit die optimale Konzentration zur Induktion der intervertebralen Fusion ermittelt werden. Bei den zwei Kontrollgruppen erfolgte der Einsatz des ohne Füllmaterial implantierten Titan- Cages SynCage-C (Leercage) bzw. der des mit TricOs augmentierten SynCage-C.

### **5.4. Operation und postoperativer Beobachtungszeitraum**

Bei der, im Rahmen dieser Studie durchgeführten Operationstechnik handelt es sich um eine etablierte Methode zur Spondylodese der Halswirbelsäule unter Einbringen eines intervertebralen Implantats in das Bandscheibenfach C3 / C4 (Aronson *et al.*, 1968; Cloward, 1988; Robinson und Smith, 1955). Die Wahl der Versuchsdauer von 12 Wochen begründet sich in der weit fortgeschrittenen, jedoch nicht vollständig abgeschlossenen Spondylodese des untersuchten Halswirbelsäulensegments C3 / C4 beim Schaf (Cunningham *et al.*, 1999; Sandhu und Boden, 1998). In dieser Phase sind daher histologische Unterschiede im Einheilungsverhalten der unterschiedlich augmentierten Cages besonders gut zu demonstrieren (Cunningham *et al.*, 1999). Bei der Gruppengröße von acht Tieren konnten Aussagen über das Einheilungsverhalten getroffen werden. Diese haben jedoch bedingt durch die geringen Tierzahlen nur beschreibenden Charakter und keine allgemeine Aussagekraft. Die gewählte Anzahl an Tieren basiert auf biometrischen Berechnungen, die in Kooperation mit dem Institut für medizinische Statistik der Charité- Berlin durchgeführt wurden.

### **5.5. Gewinnung und Aufarbeitung der Proben**

#### **5.5.1. Sägeebene**

Die Nutzung von Schnitten mit mittig angeschnittenem Cage gewährleistete einen repräsentativen Überblick im Bereich des zentralen Intervertebralraums, wobei die Cage-Pore mit enthaltenem Core- Material sowie die angrenzenden Endplatten des dritten und vierten Halswirbels erfasst wurden. Somit konnten im zweidimensionalen histologischen Schnitt das bestehende Stadium der Fusion, Ab- und Umbau des Core- Materials sowie das Bestehen von Entzündungsreaktionen beurteilt werden. Es muss jedoch berücksichtigt werden, dass jeweils ein selektives Bild der Spondylodese ausgewertet wurde. Dies ließ keine Aussage über die Gesamtheit der Fusion von 3. und 4. Halswirbel beim entsprechenden Tier zu. Um auszuschließen, dass nicht fusionierte Präparate in anderen Ebenen Fusionen zwischen den Wirbelkörpern aufwiesen, erfolgte eine makroskopische Beurteilung aller angefertigten Schnitte.

#### **5.5.2. Handling der fixierten, gesägten Präparate**

Die, zur Aushärtung der Gewebeschnitte, durchgeführte Fixierung der angefertigten Schnitte sollte eine Entfernung des Titan- Implantats unter möglichst geringer Ablösung der angrenzenden Gewebeschichten ermöglichen. Dies war meist erst nach langem Verbleib in der Fixierungslösung (> 10 Tage) und bei sehr vorsichtigem Handling ohne Herauslösen von TricOs- Partikeln durchführbar.

## 5.6. Analyseverfahren

### 5.6.1. Histomorphometrie

Die Auswertung histomorphometrisch zu erhebender Daten wird durch Nutzung der computergestützten Bildanalyse erleichtert (Hunt und Williams, 1995).

Diese Methode wird seit dem Jahr 2002 von der Wirbelsäulen- Arbeitsgruppe an der Charité Berlin, Campus Virchow- Klinikum zur Quantifizierung der bei der Fusion zweier Wirbelkörper auftretenden Gewebetypen angewendet (Kandziora *et al.*, 2002 a, b, c).

Mit Hilfe der Bildanalyse ist die Quantifizierung bestimmter Parameter mittels repräsentativer Messung sowie einer relativ benutzerunabhängigen und einfachen Auswertung der Präparate möglich. Durch Modifikationen können die Programme an die Anforderungen der jeweiligen Arbeitsgruppe individuell angepasst werden.

Bei der histomorphometrischen Analyse ist zu berücksichtigen, dass zur Quantifizierung der Gewebe Knochen, mineralisierter Knochen, undifferenziertes Bindegewebe, Tricalciumphosphat sowie Knorpel pro Tier ein Schnitt in drei verschiedenen Färbungen, bei Nutzung drei entsprechend modifizierter Makros, ausgewertet wurde.

Das, aus Tricalciumphosphat bestehende, Knochenersatzmaterial TricOs konnte durch dessen schwarze Farbgebung in der Methylgrün / van Gieson- Färbung eindeutig von Knochengewebe differenziert und anschließend quantifiziert werden.

Erst nach erfolgter Auswertung der Serienschritte eines Tieres in den drei Färbungen konnte durch Subtraktion der berechneten Knorpel- und TricOs- Flächen von der undifferenzierten, die absolute Bindegewebsfläche ermittelt werden (Bindegewebe absolut= Bindegewebe undifferenziert- Knorpel- TricOs).

Die von Kossa / Saffranin-Orange- Färbung diente auch der histomorphometrischen Bestimmung der knöchernen und bindegewebigen Strukturen im Paraffinschnitt, da Osteoklasten und Gefäße nicht als Absolutzahl, sondern deren Dichte im Gewebe bestimmt werden sollte. Dies konnte jedoch nur durch die histomorphometrische Analyse der Knochen- bzw. Bindegewebsfläche ermöglicht werden. Im nach von Kossa / Safranin - Orange gefärbten Präparat wurde zwar die Knochen- und Bindegewebsfläche des betreffenden Tieres bestimmt. Es handelte sich jedoch um einen anders gefärbten Schnitt des jeweiligen Tieres als der der in die Osteoklasten- bzw. Gefäßzählung einging.

Bei der Auswertung der Ergebnisse der computergestützten, histomorphometrischen Flächenberechnung müssen die verschiedenen Schnittebenen der Präparate berücksichtigt werden. Zur Berechnung der einzelnen Gewebetypen wurden histologische Präparate sowohl von median als auch von paramedian angeschnittenen Wirbeln verwendet. Bei der Auswertung verschiedener Schnittebenen kann dies zur Bestimmung unterschiedlich großer Gewebeflächen und abweichender Verhältnisse zwischen den fünf untersuchten Teilflächen führen, wodurch die Ergebnisse der Gewebeflächenberechnung nicht zwischen den Präparaten vergleichbar wären. Um diese Einschränkung möglichst zu minimieren, wurden zur Anfertigung der verschiedenen Färbungen nur direkt benachbarte Serienschritte verwendet, die eine größtmögliche Entsprechung der Gewebeanteile in den Schnittebenen ermöglichen.

Bei der folgenden Interpretation der Ergebnisse ist es zwingend notwendig sowohl die unterschiedliche Qualität als auch die Vielfältigkeit der Präparate zu berücksichtigen. Trotz der Minimierung von intra- und interindividuellen Unterschieden bei Einsatz von standardisierten Methoden ist eine völlige Vermeidung subjektiver Entscheidungen nicht möglich (Wright *et al.*, 1992).

## Wirbelkörperperfusion

Bei der Auswertung der erzielten Ergebnisse der Wirbelkörperperfusion ist nach Anwendung des Scores nach Toth et al. (Toth *et al.*, 2002) zu berücksichtigen, dass immer nur komplett mit Knochengewebe fusionierte Anteile des Segmentes C3 / C4 berücksichtigt wurden. In den untersuchten Präparaten befinden sich im Bereich der Cagepore (Ausnahme Leercagegruppe) erhebliche Anteile an TricOs- Partikeln, die jedoch durchaus von Knochengewebe durchbaut sind.

### 5.6.2. Histologie

#### Deskriptive Histologie

Die Beschreibung der Präparate erfolgte nach von der Untersucherin selbst erstellten Gesichtspunkten und ist daher rein subjektiv. Im Gegensatz zur Verwendung eines validierten Scores ist keine Wertung möglich. Die angewendete Kombination der subjektiven Beurteilung mit den Ergebnissen der Histomorphometrie scheint eine objektive Beurteilung des Heilungsverlaufes zu ermöglichen. Eine hohe Genauigkeit in der histologischen Auswertung wurde durch die sehr geringe Schnittdicke der histologischen Präparate von 6 µm sichergestellt. Bei dieser bestehen kaum Überlagerungen von Gewebeschichten.

Bedingt durch die Entfernung der Titan- Implantate kam es in einigen Fällen zu präparationsbedingten Schäden, die sich in Brüchen des Präparats und Ablösung der angrenzenden Gewebeschicht äußerten. Diese präparationsbedingten Risse im histologischen Präparat konnten jedoch histomorphologisch identifiziert und im Rahmen der histomorphometrischen Auswertung manuell nachgebessert werden.

In diesem Projekt wurden immunhistochemische Verfahren zum direkten Nachweis von Blutgefäßen und Osteoklasten genutzt. Die Durchführung dieser Nachweismethoden ist mit einem hohen Zeit- und Kostenaufwand verknüpft sowie nicht immer optimalen Färbeergebnissen. Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten immunhistochemischen Nachweisverfahren werden jedoch in diesem Forschungshaus erfolgreich angewendet (Lienau *et al.*, 2005; Schell *et al.*, 2006).

#### Gefäßzählung

Es wurde in Anlehnung an Literaturangaben (Lienau *et al.*, 2005) der immunhistochemische Nachweis des  $\alpha$ - smooth muscle actin durchgeführt. Es erfolgte eine manuelle Zählung, an in Paraffin eingebetteten Präparaten unter dem Lichtmikroskop in 100 bzw. 200facher Vergrößerung, da auf eine Digitalisierung bedingt durch deren Größe verzichtet werden musste (Abb. 34, S. 53). Zur Reduktion der mit der manuellen Zählung verbundenen Fehlerquellen erfolgte die Dreifachzählung der Blutgefäße anhand der festgelegten 5Teil-ROIs (Abb. 29, S. 45).

Es besteht jedoch der Nachteil, dass neu gebildete Kapillaren, die nur aus Endothelzellen bestehen, mit dieser Färbung nicht dargestellt werden können (Lienau *et al.*, 2005). Trotzdem erwies sich die  $\alpha$ - smooth muscle actin (sma)- Färbung als zuverlässig, so traten keine Präparat- individuellen Unterschiede in der Anfärbung der Gefäße auf. Bei allen Präparaten erfolgte die Anfärbung der Gefäße gleichermaßen. Es färbten sich jedoch auch hier nicht alle Gefäße, die glatte Muskelzellen aufwiesen, deutlich positiv. Bei der Identifizierung schwach positiv gefärbter Gefäße traten somit interindividuelle Unterschiede auf. Die Anzahl nicht gefärbter Gefäße wird in der Literatur mit unter 10 % angegeben (Lienau *et al.*, 2005).

### **Osteoklastenzählung**

Die Darstellung der Osteoklasten beruht auf der Anfärbarkeit der lysosomenständigen Tartrat-resistenten sauren Phosphatase. Auch hier erfolgte eine dreifache manuelle Zählung der Knochen resorbierenden Zellen unter dem Lichtmikroskop in 200 bzw. 400facher Vergrößerung (Abb. 37, S. 55). Die Intensität der Anfärbung war in den verschiedenen Präparaten unterschiedlich stark ausgeprägt, jedoch innerhalb eines Präparates ähnlich. Eine mögliche Ursache ist die unterschiedliche Aktivität der sauren Phosphatase und der damit verbundenen unterschiedlichen Signalintensität. Eine weitere Erklärung für eine schwache Anfärbung ist eine mögliche Hitzeinstabilität des Enzyms. So werden während der Einbettung Temperaturen von bis zu 60 ° C erreicht, die zu einer Denaturierung des Enzyms führen könnten (Peters, 2007).

## 5.7. Diskussion der Ergebnisse

Zur Therapie von Knochendefekten bleibt v. a. an der Wirbelsäule auch nach über 100 Jahren der Entwicklung von Knochenersatzmaterialien die autologe Knochentransplantation trotz Bestehen einer erhöhten Entnahmemorbidität der sog. „goldene Standard“ (Schieker und Mutschler, 2006). Die spinale Fusion ist die chirurgische Behandlungsmethode der Wahl zur Stabilisierung der Wirbelsäule bei Bestehen von struktureller Deformierung, traumatischer und degenerativer Instabilität sowie Anomalitäten der Wirbelsäule.

Von einer Fusion (Arthrodese) zwischen anliegenden Wirbelkörpern als zusammenhängendem Bewegungssegment spricht man nach erfolgter Ausbildung einer knöchernen Brücke (O'Loughlin *et al.*, 2009).

Der Einsatz osteoinduktiver und osteokonduktiver Materialien in der Wirbelsäulenchirurgie dient der Stimulation der Spondylodese verbunden mit einer beschleunigten Fusion sowie der Senkung der Komplikationsrate, v. a. der Pseudarthrose. Diese tritt mit einer Inzidenz von 0 bis zu 50% auf (Park und An, 2009). Die somit forcierte Ausheilung der Patienten würde neben der Minimierung, der bislang zum Teil erheblichen physischen und psychischen Belastung, auf lange Sicht auch die Kosten der Behandlung reduzieren (Boden, 1998; a, b; 2002; Sandhu und Boden, 1998).

Ziel der vorliegenden Studie war die histologische Evaluation und der Vergleich der Spondylodese des Halswirbelsäulensegments drei / vier bei Einsatz eines, mit modifiziertem Parathormon (vier verschiedener Konzentrationen), Fibrin und TricOs augmentierten Cages (Versuchsgruppen) sowie des unbefüllten bzw. des mit TricOs befüllten Cages (Kontrollgruppen). Durch histomorphometrische Flächenberechnungen sowie beschreibender histologischer Untersuchungen, Gefäß- und Osteoklastenzählung konnte der Einfluss des mit dem zu untersuchenden Füllmaterial augmentierten SynCage-C (TitanCage im Boxdesign) auf die Knochenneubildung im Intervertebralraum im Vergleich zu den Kontrollgruppen bestimmt werden.

Das in der vorliegenden Studie erprobte Knochenersatzmaterial besteht aus einer Kombination von Hydroxyapatit / Tricalciumphosphat (HA/TCP) - Granules, Fibrin und dem darin enthaltenen osteoinduktiven Parathormon. Dieses ist durch eine Proteinmodifikation der N- terminalen 12 Aminosäuren modifiziert (TGpIPTH1-34). Hierdurch wird eine kovalente Bindung am resorbierbaren und biokompatiblen Trägermaterial Fibrin und dessen anschließende proteolytische Freisetzung ermöglicht. Die durch die rein lokale Wirkung erzielte Erhöhung der Effektivität ist, neben einer deutlichen Reduktion der benötigten Konzentrationen, gleichzeitig auch mit einer Verringerung potentieller systemischer Effekte und Nebenwirkungen assoziiert. In einer Studie von Le Guehenec *et al.* konnte der positive Effekt der Fibrinmatrix auf die Knochenheilung nachgewiesen werden (Le Guehenec *et al.*, 2005). Fibrin stellt somit eine exzellente Matrix für die lokale Freisetzung von osteoinduktiven Substanzen zur Unterstützung der intervertebralen Fusion dar.

Die erwünschte Verbesserung der Geweberegeneration sowie die Induktion der Neusynthese von Knochengewebe konnte bei Einsatz von Parathormon zur Behandlung von Osteotomiedefekten am caninen Modell nachgewiesen werden (Jung *et al.*, 2007). Im vorliegenden Projekt wurden nun die osteoinduktiven Eigenschaften des bioaktiven Proteins Parathormon zur Verbesserung der Spondylodese der Schafhalswirbelsäule untersucht.

## 5.8. SynCage-C

Von Harms wurde 1986 erstmalig ein metallischer Cage im Zylinderdesign als Bandscheibenersatz zur cervikalen Spondylodese eingesetzt. Dieser wurde mit dem Ziel der Gewährleistung von mechanischer Stabilität des Bewegungssegments und struktureller Integrität des Zwischenwirbelraums während des knöchernen Durchbauprozesses entwickelt (Bagby, 1988; Kuslich *et al.*, 1998).

Bei dem, in der vorliegenden Studie eingesetzten, intervertebralen Implantat SynCage-C (Synthes<sup>®</sup>) handelt es sich um einen Titan- Cage im Boxdesign, der ebenfalls über diese hohe mechanische Stabilität verfügt. Durch die Distraction des Bandscheibenraums gewährleistet dieser die Wiederherstellung der Bandscheibenraumhöhe und der Lordose. Des Weiteren wird durch Erweiterung der Foramina eine Kompression der austretenden Nervenbahnen verhindert. Dieser Cage soll durch optimale Passgenauigkeit zwischen Implantat und den Wirbelkörper- Endplatten einen größeren Widerstand gegen das Einsinken in die angrenzenden Wirbelkörper erzielen. Somit entfällt die Notwendigkeit einer zusätzlichen Sicherung mittels einer Osteosyntheseplatte durch diese Stabilisierung des pathologisch instabilen Segments.

Der Einsatz von Stahlimplantaten fördert die Bildung sog. „Biofilme“, bestehend aus wirtseigenem Zelldetritus und in extrazellulärer Matrixstruktur eingebetteten Mikroorganismen. Titan hemmt hingegen die Adhärenz von Bakterien und verfügt über eine lokal bakterizide Wirkung (Schmelz *et al.*, 2007). Diese Eigenschaft bedingt vor allem im Rahmen der Revisionschirurgie den favorisierten Einsatz von Titanimplantaten. So konnten Korrovessis *et al.* für die Verwendung eines Titan- Mesh- Cages bei Bestehen einer Spondylitis nachweisen, dass die Verwendung eines Titan- Implantats keinen negativen Einfluss auf die Ausheilung der bestehenden Infektion ausübte. Zusätzlich wurde der stabilisierende Effekt des betroffenen Wirbelsegments und das daraus resultierende, ausreichende sagittale Wirbelsäulenprofil betont (Korrovessis *et al.*, 2006). Die Möglichkeit des Einsatzes von Metall- Implantaten zur Behandlung von Spondylodiscitis wird von Robinson *et al.* in der sehr gut ausgeprägten Immunität im Bereich der Wirbelsäule begründet (Robinson *et al.*, 2008). Der Einsatz von Metall- Implantaten ist zwar bei bestehender Knocheninfektion strikt abzulehnen, diese können jedoch bei spinalen Infektionen durchaus eingesetzt werden.

Robinson *et al.* beschreiben ebenfalls die ausgezeichnete Heilungsrate und Stabilität des betroffenen Wirbelsegments sowie eine geringe Komplikationsrate bei Nutzung von Titan- Implantaten. Titan ist somit ein optimales Material zur Überbrückung großer Defekte und gewährleistet die, zur Erzielung eines optimalen Heilungsverlaufs, unabdingbare Lastenaufnahme bis zur totalen knöchernen Fusion.

## 5.9. Hypothesen

Die Auswertung der Ergebnisse der durchgeführten histologischen, immunhistologischen und histomorphometrischen Untersuchungen erfolgte zur Überprüfung der aufgestellten Hypothesen:

- 1) Durch Augmentierung des Titan- Cages mit dem entwickelten Knochenersatzmaterial lässt sich die knöcherne Fusion des dritten und vierten Halswirbels im Vergleich zu den untersuchten Kontrollgruppen (Leercage, TricOs) verbessern.
- 2) Die HA / TCP- Partikel (TricOs) sind nach drei Monaten vollständig von Knochengewebe umgeben und im Zwischenwirbelraum integriert.
- 3) Der Knochenumbau erfolgt v. a. auf der TricOs- Oberfläche.
- 4) Die Induktion der Knochenheilung ist abhängig von der Parathormonkonzentration.
- 5) Xenogenes Fibrin und, oder TricOs induzieren die Entstehung von Entzündungsreaktionen.
- 6) Die Induktion der Osteoklastenaktivität durch Parathormon ist konzentrationsabhängig.

### 5.9.1. Histologie und Histomorphometrie

#### Hypothese 1): Verbesserung der Osteoinduktion

Insgesamt konnte nach 12 Wochen keine eindeutige Aussage bezüglich des Einflusses der angewandten Parathormon- Konzentration auf die Qualität und Quantität der Spondylodese ermittelt werden. Die erfolgte Fusion der Cagepore bei Tieren, denen ein mit einer Kombination aus osteokonduktiven und osteoinduktiven Materialien augmentierter Cage implantiert wurde, war nicht fortgeschrittener als bei den Tieren, denen ein unbefüllter Cage eingesetzt wurde.

Bei Auswertung der histomorphometrischen Flächenberechnung trat im Bereich der Cage-ROI ein unerwartetes Ergebnis bei Vergleich der prozentualen undifferenzierten Bindegewebsfläche inklusive Leerflächen auf. Diese ist bei der als Kontrolle dienenden Gruppe 12 (SynCage-C) signifikant größer als bei der zweiten Kontrollgruppe 3 (SynCage-C, TricOs) und der Versuchsgruppe 11 (SynCage-C, Fibrin, 0,7 mg/ml TGpIPTH1-34, TricOs).

Dieses Ergebnis könnte im geringsten Gewebe- und Materialverlust während der Entfernung des Titancages bei Präparaten der Leercagegruppe begründet sein.

Eine vollständige knöcherne Fusion des Bandscheibenraumes (F1) ist bei keinem Präparat der sechs untersuchten Gruppen erfolgt. Es besteht überwiegend keine knöcherne Fusion zwischen C3 und C4 (F3). Eine partielle Fusion (F2) besteht bei den Gruppen 3 (SynCage-C, TricOs), 11 (SynCage-C, Fibrin, 0,7 mg/ml TGpIPTH1-34, TricOs) und 15 (SynCage-C, Fibrin, 0,2 mg/ml TGpIPTH1-34, TricOs) bei jeweils 25 % der Tiere pro Gruppe. Somit scheint keine direkte Abhängigkeit des Fusionsergebnisses von der Parathormonkonzentration zu bestehen.

Mögliche Ursachen des Ausbleibens der Fusion des dritten und vierten Halswirbels im vorgestellten Modell sind vielseitig und nicht allein auf ein Versagen der eingesetzten osteoinduktiven und osteokonduktiven Füllmaterialien zurückzuführen.

Lacroix und Prendergast untersuchten an einem biomechanischen Regulationsmodell die auf die Knochenbruchheilung Einfluss nehmenden Parameter (Lacroix und Prendergast, 2002). Sie konnten nachweisen, dass die Geweberegeneration von einer Kombination aus den innerhalb des Gewebes bestehenden Scherkräften und dem Flüssigkeitsstrom kontrolliert wird. So führen hohe Scher- und Dehnungskräfte sowie ein großer Flüssigkeitsstrom zur Deformierung von Vorläuferzellen mit anschließender Bildung fibrösen Bindegewebes. Bei geringem Level an einwirkenden Stressfaktoren erfolgt hingegen zunächst Knorpel- und bei weiterem Absinken letztlich Knochenbildung. So konnten auch Loba et al. in einer Studie zur Frakturheilung nachweisen, dass die Knochenneubildung erst nach entsprechender Stabilisierung des Frakturspaltes durch Knorpel bzw. Bindegewebe und bei einem vergleichsweise niedrigen Flüssigkeitsfluss bzw. hydrostatischen Stress möglich zu sein scheint (Loba *et al.*, 2001).

Diese Erkenntnisse liefern bei Übertragung auf die in dieser Studie bestehenden Verhältnisse nach erfolgter Discektomie sowohl eine mögliche Erklärung für die vermehrte Zubildung an Bindegewebe als auch für die bei der Mehrzahl der Präparate ausgebliebene knöcherne Durchbauung. Die Kombination von erhöhter Beweglichkeit im Bandscheibenfach, assoziiert mit Scherungsstress sowie einem hohen hydrostatischen Stress hemmt das Knorpel- und Knochenwachstum und begünstigt die Bildung von Bindegewebe sowie die Resorption von Knochengewebe. Die während einer Entzündungsreaktion bestehende Hypervaskularisation bedingt diesen erhöhten hydrostatischen Stress.

Die Ergebnisse der histomorphometrischen Flächenberechnung lieferten im Bereich der Cagepore und der Summe der fünf untersuchten Regionen eine signifikant größere gesamte bzw. mineralisierte Knochenfläche bei der Leercagegruppe. Dies könnte zur Ablehnung der Hypothese, die von einer verbesserten Osteoinduktion bei Einsatz des neuen Knochenersatzmaterials ausgeht, führen. Bei der ermittelten Knochenfläche der Leercagegruppe konnte jedoch nicht ausgeschlossen werden, dass es sich nicht nur um neu

gebildetes Knochengewebe, sondern auch um das Gewebe der angenäherten Wirbelkörper handelt. Die zur Differenzierung von neu gebildetem Knochengewebe bei der Leercagegruppe durchgeführte Toluidinblau- Färbung erzielte jedoch im Gegensatz zu Literaturangaben keine auswertbaren Ergebnisse (Arrighi *et al.*, 2009).

In der Literatur wird in mehreren Studien der Einsatz eines unbefüllten Titan- Cages in der klinischen Anwendung bei Vermeidung der mit Entnahme des Beckenkammspanns assoziierten Komplikationen beschrieben (Krayenbuhl *et al.*, 2008; Lange *et al.*, 2000; Schröder *et al.*, 2007). Diese positiven Studienergebnisse konnten in der von uns durchgeführten Studie bei Auswertung der Ergebnisse der Leercagegruppe sowohl bestätigt als auch widerlegt werden.

Eine solide Knochenformation durch das Cageinnere wurde, wie auch von Schröder *et al.* beschrieben, im Rahmen der histologischen Untersuchungen nachgewiesen. Krayenbühl *et al.* erzielten bei dem Einsatz eines mit Plasmapore® veredelten, unbefüllten Titan- Cages nach ventraler cervikaler Microdiscektomie eine hohe Fusionsrate der Wirbelkörper. Dies konnte in der hier, besprochenen Studie unter Anwendung des Fusionscores nach Toth *et al.* nicht bestätigt werden. Es besteht überwiegend keine knöcherne Verbindung des Halswirbelsegments C3 / C4, wobei sich die Einheilung des verwendeten SynCage-C ohne Komplikationen vollzog. Das Material wurde vom umliegenden Gewebe überwiegend gut toleriert und bindegewebig, teils knöchern bzw. knorpelig integriert.

Für das Material Titan wurde in klinischen Studien, so zum Beispiel bei Einsatz eines Tibia-Nagels im Rahmen der Osteosynthese (Seebauer *et al.*, 2009), eine osteoinduzierende Wirkung nachgewiesen.

## **Hypothese 2): Abbau der HA / TCP- Partikel (TricOs)**

Die Ergebnisse des nicht vollständigen Abbaus der TricOs- Partikel wurden ebenfalls in einer von Katthagen und Mittelmeier durchgeführten Studie zur Knochenregeneration bei Einsatz eines Collagen- Apatit- Mischpräparats beschrieben (Katthagen und Mittelmeier, 1984).

Im Gegensatz zu deren Ausführungen ergab die Auswertung in der vorliegenden Studie jedoch, dass die HA / TCP- Partikel (TricOs) nach drei Monaten Standzeit weder vollständig von Knochengewebe umgeben, noch im Zwischenwirbelraum integriert sind. Die dort beschriebene Ermöglichung der direkten Wechselwirkung zwischen Knochenneubildung und den sich sehr langsam abbauenden Apatit- Kristallen kann nur bei Gruppe 15 (SynCage-C, Fibrin, 0,2 mg/ml TgP1PTH1-34, TricOs), der Versuchsgruppe mit der niedrigsten enthaltenen Parathormon- Konzentration, vermutet werden.

In einem technischen Report über zur spinalen Fusion eingesetzte Knochenersatzmaterialien geben Whang und Wang eine Übersicht über die Vor- und Nachteile der verwendeten Keramiken Hydroxylapatit und Tricalciumphosphat (Whang und Wang, 2003). Deren Vorteile, u. a. nicht toxisch, nicht immunogen, leichte Sterilisierbarkeit sowie unbegrenzte Verfügbarkeit konnten im Rahmen der vorliegenden Studie bestätigt werden. Die angeführten Nachteile der Materialeigenschaften bei Einsatz von osteokonduktiven Keramiken könnten eine Ursache für die unzureichende Integration der TricOs- Partikel im Zwischenwirbelraum darstellen. So wird eine geringe Scherkraft und Frakturresistenz bei minimaler mechanischer Stabilität direkt nach erfolgter Operation angegeben. Zum Ausgleich wird die Kombination mit weiteren osteogenen bzw. osteoinduktiven Materialien sowie einer rigiden internen Fixation zum Schutz vor Lastaufnahme bis zur Fusion der Keramik mit dem umgebenden Knochen empfohlen. Somit konnten in der von uns durchgeführten Studie trotz Einsatz eines über große mechanische Stabilität verfügenden Titancages, augmentiert mit einer Kombination der osteoinduktiven Materialien Fibrin und Parathormon sowie der osteokonduktiven Keramik TricOs, noch nicht die optimale Kombination der eingesetzten Materialkonzentrationen etabliert werden.

### Hypothese 3): Osteosynthese an der TricOs- Oberfläche

Die durchgeführten histologischen Untersuchungen im Rahmen dieser Studie dienten auch der Bestätigung der von der Firma Baxter veröffentlichten TricOs- Produktinformation. Die Besiedelung der Keramik durch osteogene Zellen soll durch die Makroporosität (Porendurchmesser von 300 bis 600  $\mu\text{m}$ ), bei Bildung neuen Knochenmaterials, ermöglicht werden. Bei Auswertung der Ergebnisse der deskriptiven Histologie konnten an der Oberfläche der TricOs- Partikel bzw. in deren direkter Umgebung Geflechtknochen, Osteoklasten und Osteoblasten nachgewiesen und somit der v. a. auf der TricOs- Oberfläche erfolgende Knochenumbau bestätigt werden. Es konnte bei einem Präparat im Zentrum eines TricOs- Partikels neu gebildeter Knochen dargestellt werden (Abb. 41, S. 60). Die eindeutige Differenzierung der TricOs- Partikel von Knochengewebe war durch die angewendete Methylgrün / van Gieson- Färbung sichergestellt.

Der osteoinduktive Effekt von Hydroxylapatit auf die Knochenneubildung konnte schon 1981 nachgewiesen werden (Nizard, 1981). Im Jahre 2006 wurde in einer klinischen Studie der Einsatz von  $\beta$ - Tricalciumphosphat ( $\beta$ -TCP) als synthetisches, spongiöses Knochentransplantat bei Hunden und Katzen untersucht (Franch *et al.*, 2006). Es konnte dessen Osteokonduktivität bestätigt werden und  $\beta$ - TCP wurde als nützliches Implantatmaterial zur Rekonstruktion krafttragender Skelettanteile beschrieben. Des Weiteren erzielte  $\beta$ - TCP in diesen Untersuchungen gute Ergebnisse als zusätzlicher Füllstoff zur Vergrößerung des Transplantatvolumens, verbunden mit gering ausgeprägten osteoinduktiven und osteogenen Eigenschaften. Dieses hochporöse, auf Calcium basierende, synthetische Implantatmaterial wird in der Orthopädie beim Menschen als osteokonduktive Trägermatrix für weitere osteokonduktive Agentien (z.B. Wachstumsfaktoren, Fibrin) genutzt. Des Weiteren dient es, wie auch in dieser Studie, dem lokalen Einsatz des osteoinduktiven Parathormons.

### Hypothese 4): Induktion der Knochenbildung abh. von der PTH- Konzentration

Die Abhängigkeit der Induktion der Knochenheilung von der Parathormonkonzentration konnte indirekt nachgewiesen werden. So war eine abnehmende PTH- Konzentration mit einer Zunahme der knöchernen Durchbauung der TricOs- Partikel in der Cage- Pore assoziiert. Verbunden war dies mit einer gut durchführbaren Entfernung der Cageanschnitte ohne Substanzverlust aus den 6 mm dicken Knochenscheiben. Eine Zunahme der PTH- Konzentration war hingegen mit einer Abnahme der knöchernen Durchbauung der TricOs- Partikel in der Cage- Pore verbunden. Daher musste bei den Gruppen mit erhöhten PTH- Konzentrationen während des Lösens des Titancages ein besonders vorsichtiges Handling zur Vermeidung des Herauslösen von TricOs- Partikeln erfolgen.

In der deskriptiven Histologie fanden sich entlang der Boden- und Deckplatte des dritten und vierten Halswirbels hyaline Knorpelzellsäulen, die sich bei zunehmender Annäherung an den Geflechtknochen des Wirbelkörpers großblasiger darstellten. Es handelt sich dabei um Stufen der chondralen Ossifikation, deren Ablauf und klinische Relevanz von Schiedt eindeutig nachgewiesen werden konnte (Schiedt, 1955). Die Zone der Knorpelsäulen ist durch isogene Knorpelzellen gekennzeichnet, angeordnet in parallelen Säulen. Die in Nähe des Knochens befindliche Zone des großblasigen Knorpels verfügt in den letzten drei, dem Knochen direkt anliegenden Reihen über hypertrophe Zellen mit schon teilweise verkalkter Interzellulärsubstanz (Bucher und Wartenberg, 1997).

Die histomorphometrische Analyse der ausgewerteten Fläche der Cage- ROI und der Summe der 5 Teilbereiche des untersuchten Wirbelsegments C3 / C4 ergab sowohl absolut als auch prozentual signifikant höhere Anteile an Knorpelgewebe für Gruppe 15 (SynCage- C, Fibrin, 0,2 mg/ml TGpiPTH1-34, TricOs). Dies kann als verbesserte Induktion der chondralen Ossifikation bei geringer Parathormonkonzentration gewertet werden. Das Knorpelgewebe bildet somit die Vorstufe und Leitschiene für die nachfolgende Ossifikation und ist als Teil der Frakturheilung zu werten (Braun und Ruter, 1996).

Neer et al. untersuchten die Wirkung der täglichen Injektion von rekombinantem humanem PTH<sub>1-34</sub> (rhPTH) zur Behandlung der Osteoporose bei Frauen in der Menopause (Neer *et al.*, 2001). Es konnte eine erhöhte mineralisierte Knochendichte der Lendenwirbelsäule und des proximalen Femurs nachgewiesen werden, bei zugleich signifikant niedrigerer Inzidenz für das Auftreten von Frakturen.

Der Effekt von injiziertem Parathormon auf die Knochenkortex des Menschen stellt sich jedoch kontrovers dar. So wurde in einigen klinischen Studien eine abnehmende Knochendichte des Bewegungsapparates bei Behandlung mit Parathormon nachgewiesen, während von zunehmender vertebraler Knochendichte berichtet wurde (Hodsman *et al.*, 1991; Reeve *et al.*, 1991; Slovik *et al.*, 1986). Dem gegenüber konnte in weiteren Studien kein Einfluss auf die Knochendichte des distalen Radius bzw. des Femurhalses bei Therapie mit Parathormon nachgewiesen werden (Finkelstein *et al.*, 1998; Hodsman *et al.*, 1997; Lane *et al.*, 1998; Lindsay *et al.*, 1997). Dies führte zu der Vermutung, dass der anabole Effekt des rhPTH auf den spongiösen Knochen auf Kosten des kortikalen Knochens erzielt wurde.

In einer von Jiang et al. durchgeführten Studie wurden ebenfalls die Effekte des rhPTH<sub>1-34</sub> (Teriparatide) auf spongiösen und kortikalen Knochen untersucht (Jiang *et al.*, 2003). Die Behandlung mit Teriparatide stimulierte trabekuläre und kortikale Knochenformation mit daraus resultierender erhöhter kortikaler Dichte sowie Vergrößerung des spongiösen Knochenvolumens, einem besseren Verbund des spongiösen Knochens und einem Wandel der trabekulären Knochenstruktur. Durch den Einsatz von Parathormon wurde eine ausgeprägte Reduktion der Frakturrate erzielt. Es wurde der Nachweis der Aufhebung osteoporotischer Knocheneigenschaften erbracht.

#### **Hypothese 5): Entzündungsreaktionen durch xenogenes Fibrin und / oder TricOs**

An den Kontaktflächen zum Implantat, sowie in direkter Umgebung zum TricOs- Granulat waren Fremdkörperreaktionen erkennbar. Das Ausmaß dieser Reaktionen war durchaus im Rahmen der Untersuchung zu erwarten und wurde in der Literatur beschrieben (Bauer, 2007; Kandziora *et al.*, 2002 a, b, c). Der einzige Fall einer bestehenden Osteolyse konnte bei einem Präparat der Kontrollgruppe „Leercage“ an der Bodenplatte des dritten Halswirbels nachgewiesen werden. In direktem Kontakt zum TricOs- Granulat bzw. dem Titan- Implantat konnten Infiltrate von Makrophagen, Granulozyten (Abb. 44, S. 63), Plasmazellen, Lymphozyten (Abb. 52, S. 71) sowie vereinzelt auch Fremdkörperriesenzellen (Abb. 51, S. 71) nachgewiesen werden.

In der Summe der fünf untersuchten Regionen besteht gegenüber den übrigen untersuchten Gruppen eine signifikant höhere Blutgefäßdichte der Kontrollgruppe „TricOs“.

Dies kann als Nachweis der osteoinduktiven Eigenschaften des isoliert eingebrachten TricOs- Granulats gewertet werden. Die Keramik konnte vermutlich als optimale Leitschiene für die im Zuge der beginnenden Spondylodese erfolgende Vaskularisierung dienen und somit den Transport von benötigtem Zellmaterial sicherstellen.

Das Auftreten freier Erythrozyten im Rahmen der Gefäßneubildung ist bedingt durch die noch nicht vollständige Ausbildung eines zusammenhängenden, geschlossenen Endothels, der neu eingesprossenen Kapillaren.

Das in der Literatur beschriebene frühe Auftreten von immunologischen Reaktionen (Abbas, Lichtmann, Pober, 1996; Junqueira, Carneiro, 2004), gekennzeichnet durch Entzündungsreaktionen im Bereich der Implantationsstelle, ließ sich in der vorliegenden Studie zwar nachweisen, trotzdem war auf Grund des Zellbildes nach 12 Wochen von einer guten Akzeptanz des Materials auszugehen. Immunreaktionen konnten anhand spezifischer Zellen wie Makrophagen, Granulozyten, Lymphozyten, vereinzelt Plasmazellen und Fremdkörperriesenzellen histologisch dargestellt werden. Deren Einfluss auf den Ablauf der Spondylodese der Halswirbelsäule im Schafmodell schien aber von untergeordneter Rolle zu sein und keinen Einfluss auf das Heilungsgeschehen zu nehmen.

Moore et al. untersuchten die biologische Reaktion auf direkt in die lumbosakrale Dura und die Nervenwurzeln implantierte Partikel eines intervertebralen Bandscheibenersatz-Materials. Die Ergebnisse dieser Studie verdeutlichen, dass das eingesetzte Material eine

lokale Gewebereaktion vergleichbar mit einer physiologisch erfolgenden Fremdkörperreaktion auf große nichttoxische Partikel induzierte (Moore *et al.*, 2002).

Im Jahr 2008 wurde unter identischem Titel und bei vergleichbarer Methodik ebenfalls eine Studie im Schafmodell über die ausgelösten biologischen Effekte bedingt durch abgetragene Partikeltrümmer eines möglichen Implantatmaterials in neurologischem Gewebe durchgeführt (Shimamura *et al.*, 2008). In diesem Projekt wurden jedoch artifiziell produzierte Partikel des Materials Sinux (DePuy Spine, Raynham, MA) von kristalloider Struktur implantiert. Die Ergebnisse der histopathologischen Untersuchungen ergaben kein signifikantes Auftreten von Entzündungen, verbunden mit dem vermehrten Auftreten von Makrophagen oder anderer Gewebereaktionen.

Eine vergleichbare Immunreaktion, wie die von Shimamura *et al.* beschriebene, vereinzelt bestehende Lymphozyteninfiltration, wurde auch in der von uns durchgeführten Studie beobachtet. Es konnte bei der deskriptiven Auswertung der histologischen Präparate von Gruppe 15 (SynCage-C, Fibrin, 0,2 mg/ml TGpIPTH1-34, TricOs) im Bereich des dorsalen Abschlusses des Bandscheibenraums eine schwere Entzündungsreaktion, verbunden mit dem Auftreten mehrkerniger Riesenzellen in Umgebung von TricOs- Partikeln, nachgewiesen werden (Abb. 54, S. 75). Diese aus dem Zentrum des Cages bis kurz vor den Übergang zum Rückenmark geschobenen, vereinzelt TricOs- Partikel wurden dort bindegewebig induriert und von Abwehrzellen des Immunsystems umgeben. Es ist jedoch kein Eintritt dieser Partikel in das Rückenmark erfolgt.

Neben dem Becken und der Schulter zeichnet sich die Wirbelsäule im Vergleich zum Unterschenkel und Fuß durch eine deutlich geringere Infektanfälligkeit aus. Begründet ist dies in der guten Durchblutung dieser Skelettabschnitte, verbunden mit dem vermehrten Auftreten immunkompetenter Zellen (Schmelz *et al.*, 2007). Die sehr gut ausgebildete Vaskularisierung der Wirbelsäule ist bedingt durch deren vollständige Ummantelung mit Muskulatur (Robinson *et al.*, 2008). Trotzdem sollte nicht unterschätzt werden, dass bei Vorliegen von Fremdmaterial (Implantate) schon  $10^2$  Keime in der Wunde genügen, um eine Infektion hervorzurufen (Schmelz *et al.*, 2007).

Der Cage als Fremdmaterial wurde zusätzlich mit der im Füllmaterial enthaltenen xenogenen Fibrinmatrix FS VH S/D (Fibrin sealant vapour-heat treated solvent detergent treated) der Baxter AG augmentiert. Bei dessen Herstellung erfolgt ein zusätzlicher Virus- Inaktivierungsschritt, um eine erhöhte Produktsicherheit zu gewährleisten. Diese konnte im Rahmen der histologischen Untersuchungen bei Ausbleiben des Nachweises allergischer Reaktionen bestätigt werden.

Der Einsatz von Hydroxyl- Implantaten wird in mehreren Studien als ein gut vom Gewebe toleriertes Knochenersatzmaterial beschrieben. So untersuchten Katthagen und Mittelmeier in einer Studie am Kaninchen mit Collapat gefüllte Defekte an den distalen Femurkondylen. Dabei handelte es sich um eine Kombination aus Kollagen und Hydroxyapatit- Partikeln. In den durchgeführten histologischen Untersuchungen konnten weder Fremdkörperreaktionen noch allergische Reaktionen nachgewiesen werden (Katthagen und Mittelmeier, 1984).

Schon im Jahr 1981 beschrieb Nizard in seinen Experimenten am Tiermodell Kaninchen die Knochenneubildung und Organisation des Gewebes nach Defektbohrungen am Femur und dessen anschließender Auffüllung mittels industriell und manuell gefertigter Kollagen-Hydroxylapatit- Gemische (Nizard, 1981). Er beobachtete eine vom randständigen Knochengewebe ausgehende Knochenneubildung, die mit zunehmender Gefäßversorgung langsam zentralwärts vordrang. Anfänglich konnte er eingewanderte Makrophagen, Fibroblasten und Angioblasten in lockerem Bindegewebe nachweisen. Die Zahl der Makrophagen verringerte sich jedoch mit Abklingen der Organisationsphase und Resorption des Apatitmaterials.

Im Gegensatz zu Nizards Untersuchungsergebnissen konnten in der vorliegenden Studie vereinzelt Fremdkörperriesenzellen sowie eine große Zahl Osteoklasten (Abb. 46, S. 64) nachgewiesen werden. Deren Funktion bestand in der Resorption der mineralisierten Komponente.

**Hypothese 6): Induktion der Osteoklastenaktivität abh. von PTH- Konzentration**

Osteoklastische Aktivitäten waren vor allem in den Bereichen des Cages und der ventralen ROI verbunden mit der Anwesenheit von TricOs- Partikeln nachweisbar.

Im Bereich der Fläche der aufsummierten 5TeilROIs sowie der caudalen ROI weist die Gruppe 15 (SynCage-C, Fibrin, 0,2 mg/ml TGpPTH1-34, TricOs) eine signifikant höhere Osteoklastendichte als Gruppe 12 (SynCage-C) auf. Somit ist bei der Gruppe mit der geringsten PTH- Konzentration die höchste Osteoklastendichte nachweisbar, während die geringste Osteoklastendichte bei der Leercagegruppe besteht. Dabei ist jedoch zu berücksichtigen, dass eine verstärkte Osteoklastenaktivität scheinbar durch das Vorhandensein von Hydroxyapatit- Keramiken induziert wurde. Analog der Resultate der vorliegenden Studie konnten von Wenisch et al. nach Implantation von Calcium- Phosphat- Partikeln (Ca- P- Partikeln) an der Gliedmaße im Schafmodell in direkter Umgebung bzw. an der Oberfläche der Ca- P- Partikel mehrkernige Zellen nachgewiesen werden (Wenisch *et al.*, 2003).

Diese wurden nach erfolgter enzymatischer TRAP- Färbung, wie auch in der vorliegenden Studie durchgeführt, als Osteoklasten identifiziert. Des Weiteren gelang in vivo der Nachweis der Degradation von Ca- P- Keramiken im Zuge der simultanen Resorption und Phagozytose durch Osteoklasten analog der Abläufe an der Knochenoberfläche. Die raue Oberflächenstruktur des Apatits bildet optimale Voraussetzungen für die Bindung von Osteoklasten und der anschließenden Resorption der Ca- P- Keramik. Die Resorptionsrate wird jedoch auch durch die Löslichkeit der Implantate beeinflusst, wobei eine hohe Löslichkeit mit einem Mangel an osteoklastärer Resorption assoziiert ist (Wenisch *et al.*, 2003). Bei dem, in der vorliegenden Studie eingesetzten Knochenersatzstoff TricOs (Baxter Healthcare S. A.) handelt es sich um eine Zweiphasenkeramik aus Kalziumphosphat. Die Auswertung der Präparate wies die gute Bindung der Osteoklasten an der Oberfläche der Keramik- Partikel nach. Die Mischung aus 60 % Hydroxyapatit (HA), der stabileren Komponente und 40 %  $\beta$ - Tri- Kalziumphosphat ( $\beta$ - TCP), der bioaktiveren Komponente sollen in Verbindung mit zwei unterschiedlichen Porositätstypen eine kontrollierte Bioaktivität sowie ein Gleichgewicht zwischen der Resorption der Keramik und dem Ersatz durch neu gebildetes Knochenmaterial ermöglichen. Die bei diesem Produkt bestehende Mikroporosität (Porendurchmesser kleiner als 10  $\mu$ m) zwischen den Zwischenräumen der Keramik- Granula soll die Verteilung der, für den Ionenaustausch nötigen, biologischen Flüssigkeiten ermöglichen. Hingegen soll die Makroporosität (Porendurchmesser von 300 - 600  $\mu$ m) die Besiedlung der Keramik durch osteogene Zellen optimieren und fördern.

Diese Produkteigenschaften konnten in der vorliegenden Studie nur bedingt bestätigt werden. So konnte weder eine komplette Resorption der TricOs- Partikel, noch eine vollständige knöcherne Integration im Zwischenwirbelspalt nach dreimonatiger Standzeit erzielt werden.

## 5.10. Vergleich der Gruppen untereinander und mit den Kontrollgruppen

### 5.10.1. Kontrollgruppen

#### Leercage

Die beschriebenen Titan- Cages werden in der klinischen Anwendung auch ohne Füllmaterial bei Vermeidung der Spongiosaentnahme eingesetzt. Eine von Lange et al. publizierte Studie ergab bei Einsatz des RABEA- Titan- Cages ohne Füllmaterial zur ventralen cervikalen Wirbelkörperfusion bei 63 Patienten gute klinische Resultate bei Vermeidung der mit Entnahme des Beckenkammspanns verbundenen Komplikationen (Lange et al., 2000).

Auch Schröder et al. untersuchten die knöchernen Fusion bei Einsatz eines ungefüllten Halswirbelsäulen- Implantats. Nach dessen Revision konnte bei einem Patienten eine projektionsradiographische Fusion bei solider Knochenformation durch das Cageinnere histologisch nachgewiesen werden. Die Formation von solidem Knochen in einem leer eingebrachten Halswirbelsäulen- Cage wird bestätigt und als mögliche Alternative zum Knochenersatzmaterial beschrieben (Schröder et al., 2007). Eine klinische Studie kommt zu dem Resultat, dass der Einsatz eines mit Plasmapore<sup>®</sup> veredeltem, unbefüllten Titan- Cages nach ventraler cervikaler Microdiscektomie mit einer hohen Fusionsrate der Wirbelkörper und geringem Auftreten von Komplikationen verbunden ist (Krayenbühl et al., 2008).

Auch in der vorliegenden Studie erzielte die Leercagegruppe im Vergleich mit den Versuchsgruppen gleichwertige Ergebnisse bzgl. der Fusionsrate. Dabei sollte jedoch die deutlich reduzierte Knorpelsynthese berücksichtigt werden. Dies weist auf eine kaum erfolgende chondrale Ossifikation im Rahmen der Spondylodese hin. Deren Ablauf sollte jedoch auch im Bereich der Wirbelsäule zur Gewährleistung optimaler Voraussetzungen zur Frakturheilung sichergestellt werden (Schiedt, 1955).

#### SynCage-C augmentiert mit TricOs

Bei alleinigem Einsatz des Knochenersatzstoff TricOs konnten im Rahmen dieser Studie dessen osteokonduktiven Eigenschaften statistisch nachgewiesen werden. Dies erfolgte durch Nachweis der signifikant erhöhten Blutgefäßdichte im Bereich der Bandscheibe.

Diese Hypervaskularisierung könnte jedoch auch als Zeichen für das Bestehen einer Entzündungsreaktion gewertet werden, assoziiert mit einem hohen hydrostatischen Stress. Besteht zusätzlich eine hohe Beweglichkeit im Bandscheibenfach und somit ein erhöhter Scherungsstress wird das Knorpel- und Knochenwachstum gehemmt und die Bildung von Bindegewebe sowie die Resorption von Knochengewebe begünstigt (Lacroix und Prendergast, 2002; Loba et al., 2001).

Zur Erzielung optimaler Voraussetzungen zur Knochenneubildung sollte eine Augmentierung der als Trägermaterial dienenden osteokonduktiven Keramik (z.B. TricOs) mit einer weiteren, über osteoinduktive Eigenschaften verfügenden Komponente (z. B. Parathormon, Fibrin) erfolgen. Arrighi et al. untersuchten den Einsatz von mit Fibrin derivatisiertem Parathormon im Schafmodell zur Knochendefektheilung. Die von der Peripherie und dem Zentrum des Defekts ausgehende Knochenneusynthese galt als Nachweis osteokonduktiver und osteoinduktiver Eigenschaften. Bei alleinigem Einsatz von Fibrin zeichnete sich das Heilmuster hingegen nur durch Osteokonduktivität aus (Arrighi et al., 2009).

### 5.10.2. Versuchsgruppen

Die besten Ergebnisse bzgl. der Integration des eingebrachten Implantatmaterials erzielte die Gruppe mit der geringsten Konzentration an Parathormon (Gruppe 15: SynCage-C, Fibrin, 0,2 ml/mg TGpIPTH1-34, TricOs). Dies konnte jedoch im Rahmen der histomorphometrischen Flächenberechnungen im Bereich des Cages sowie des Bandscheibenraumes nur für Knorpelgewebe statistisch bestätigt werden. Es konnte zumindest rein subjektiv bei der Entfernung der Cages zur Vorbereitung der Wirbelkörper auf die histologische Weiterverarbeitung bestätigt werden. Die Herauslösung des Titanimplantats erfolgte nach entsprechender Fixierung nahezu ohne Substanzverlust und das Füllmaterial stellte sich als zusammengehöriger Verbund dar.

In einer von Mark et al. vorgestellten Studie wird der Einfluss von in einem Trägermaterial aus Fibrin und Hydroxylapatit / Trikalziumphosphat (HA / TCP) gebundenem Parathormon (TGpIPTH1-34) auf die Knochenheilung nach Setzung eines Defekts an der Diaphyse der Tibia untersucht (Mark *et al.*, 2007). Bei Einsatz niedriger Konzentrationen TGpIPTH1-34 (0,4; 1 mg / ml) wurde im Rahmen der Frakturheilung eine Knochenneubildung vergleichbar dem Einsatz eines Autografts erzielt. Diese Voruntersuchungen überprüften die auch in der vorliegenden Studie eingesetzte Materialkombination aus TGpIPTH1-34, Fibrin und HA / TCP. Man kam zu dem Ergebnis, dass es sich bei Etablierung der adequate Parathormonkonzentration, um einen viel versprechenden Kandidaten zur Entwicklung eines neuen Knochenersatzstoffes für den klinischen Einsatz handelt.

In einer weiteren Studie zur Knochendefektheilung im Schafmodell konnte bei lokalem Einsatz von TGpIPTH1-34, gebunden an eine Fibrinmatrix, die Abhängigkeit der Knochenneubildung von der Parathormon- Konzentration bestätigt werden. Es ergaben sich bei der höchsten Konzentration an eingesetztem TGpIPTH1-34 dreifach höhere Anteile an neu gebildetem Knochen im Vergleich zum alleinigem Einsatz von Fibrin (Arrighi *et al.*, 2009).

In den von mir durchgeführten Untersuchungen konnte ich ebenfalls eine Abhängigkeit der Knochenneubildung von der Parathormon- Konzentration zumindest indirekt nachweisen. Bei identischem Material mit Ausnahme des zusätzlichen Einsatzes von  $\beta$ - Tricalciumphosphat war eine abnehmende PTH- Konzentration mit einer Zunahme der knöchernen Durchbauung der TricOs- Partikel in der Cage- Pore assoziiert.

## 5.11. Schlussfolgerung

### 5.11.1. Analysemethode

Die in dieser Studie durchgeführten histomorphologischen und histomorphometrischen Untersuchungen dienten der Betrachtung und Auswertung der während der Spondylodese abgelaufenen Prozesse und dem Erhalt eines gesamthistologischen Bildes.

Die histomorphometrischen Messwerte konnten mit Hilfe der histomorphologischen Ergebnisse verglichen und kontrolliert werden. Dies ermöglichte den quantitativen Vergleich der auf die Frakturheilung Einfluss nehmenden Gewebe Knochen, mineralisierter Knochen, undifferenziertes und absolutes Bindegewebe sowie Knorpel und der Keramik TricOs.

Vor dem Einsatz am Menschen war die feingewebliche Untersuchung der in dieser Studie eingesetzten Fremdmaterialien zwingend erforderlich, um ein mögliches Auftreten schwerwiegender immunologischer Reaktionen auszuschließen. Aus diesem Grund wäre der Verzicht auf die Histomorphologie zu Gunsten einer alleinigen histomorphometrischen Beurteilung der Spondylodese als äußerst kritisch zu bewerten und abzulehnen.

Im Rahmen der zusätzlich durchgeführten immunhistologischen Färbung „ $\alpha$ - smooth muscle actin“ und der enzymatischen Färbung „tartrate resistant acid phosphatase“ war es möglich Blutgefäße und Osteoklasten eindeutig nachzuweisen und zu quantifizieren. Die auf Grund der Größe der Präparate bei entsprechender Vergrößerung nicht mögliche Digitalisierung stellt zwar einen kritisch anzumerkenden Punkt dar. Dieser konnte jedoch durch die dreimalige Zählung jedes ausgewerteten Präparats abgesichert werden.

### 5.11.2. Klinische Relevanz

In dieser Studie ergaben sich für die Kontrollgruppen „Leercage“ und „SynCage-C + TricOs“ bzgl. der erzielten Wirbelkörperfusion vergleichbare Ergebnisse mit den Versuchsgruppen, insbesondere der Gruppe mit der geringsten Konzentration an Parathormon (Gruppe 15: SynCage-C, Fibrin, 0,2 ml/mg TGpIPTH1-34, TricOs).

Der Einsatz des industriell hergestellten Produktes zeichnet sich durch regelmäßige Kontrolle gesicherte, standardisierte osteokonduktive und osteoinduktive Produkteigenschaften aus. Dem gegenüber erfolgt die Spondylodese bei Einsatz des unbefüllten Titancages ausgehend von der Osteoinduktivität des Implantatmaterials Titan und dem osteogenen Potential des Wirtsorganismus. Zur Erzielung einer effektiven und v. a. dauerhaften Spondylodese ist somit das Bestehen von zellulären Komponenten, die eine Knochenneubildung induzieren, eine wichtige Voraussetzung (Helm *et al.*, 2001). Vor allem bei multimorbiden Patienten mit systemischen Erkrankungen, wie z.B. Osteoporose und Diabetes, ist daher der Einsatz eines mit einer Kombination aus osteoinduktiven und osteokonduktiven Materialien augmentierten Titancages dem Einsatz des unbefüllten Cages vorzuziehen. Zudem könnte bei Einsatz des in dieser Studie untersuchten Füllmaterials (TGpIPTH1-34, Fibrin, TricOs) die Entnahme autologer Spongiosa und damit die Setzung eines Zweitdefekts entfallen.

Trotz viel versprechender Resultate bei Einsatz der in dieser Studie getesteten Materialien Parathormon, Fibrin und TricOs konnte nicht die eindeutig überzeugende Materialkombination ermittelt werden. Daher sollte vor Einsatz an der Wirbelsäule des Menschen zur Erzielung einer optimalen, komplikationsfreien und langfristig stabilen Spondylodese eine Überprüfung der eingesetzten Materialien bei verschiedenen Konzentrationen an Parathormon in Langzeitstudien am Tiermodell erfolgen.

## 5.12. Resümee

- Niedrigste PTH- Konzentration erzielt opt. Cageintegration in Bandscheibenfach.
- Leercage erzielt gleichwertige Ergebnisse bzgl. Spondylodese.
- Keine vollständige Fusion von C3 u. C4 unabhg. v. Füllmaterial.
- Kein totaler Abbau u. Integration des TricOs- Granulats.
- Hohe Osteoklastendichte in Nähe von TricOs unabh. v. PTH- Konzentration.
- Mäßig ausgeprägte Fremdkörperreaktionen bei hoher Blutgefäßdichte.

## 6. ZUSAMMENFASSUNG

Die Spondylodese ist ein etabliertes Therapieverfahren zur Behandlung degenerativer Erkrankungen der Halswirbelsäule. Bei deren operativer Durchführung galt jahrzehntelang der Einsatz des autologen Beckenkammspans als goldener Standard (Banwart *et al.*, 1995). Das gehäufte Auftreten von Versagen des Implantats führte jedoch zum zunehmenden Ersatz des autologen Knochenspans durch Spongiosa augmentierte, intervertebrale Cages. Diese Metall- und Kunststoffimplantate sollen nach ventraler Verbringung in das Bandscheibenfach die intraoperativ erzielte Distraction erhalten, einen Kollaps verbunden mit Kyphosierung der Wirbelsäule sowie die Stenosierung der Foramina intervertebralia verhindern (Korovessis *et al.*, 2006).

In der Forschung der Spondylodese ist neben der stetigen Verbesserung von Operationsverfahren und verwendeten Implantaten eine Beschleunigung der Spondylodese zur Erzielung einer erhöhten biomechanischen Stabilität anzustreben. Ein weiteres Ziel ist die Entwicklung von Alternativen zum Einsatz der autologen Spongiosa und somit der Vermeidung der hiermit assoziierten erheblichen Entnahmemorbidität (Park und An, 2009).

Im Rahmen dieses Projektes wurde nun das in vivo- Spondylodeseverhalten eines intervertebralen Titan- Cages im Boxdesign (SynCage-C), augmentiert mit einer Kombination aus verschiedenen osteoinduktiven bzw. osteokonduktiven Knochenersatzmaterialien, untersucht und analysiert. Als Kontrolle dienten die Gruppen „Leercage“ sowie „SynCage-C + TricOs“. Ziel dieser Studie war die Überprüfung der Übertragbarkeit der aus Vorversuchen in anderen orthopädischen Tiermodellen (Genehmigungen 152/1997, 09/2000, 139/2000, 191/2003, 185/2004, Kantonales Veterinäramt Zürich, Schweiz) erzielten Ergebnisse auf die Anwendung bei der intervertebralen Spondylodese. Erwartet wurde ein zumindest gleichwertiges Ergebnis wie bei Verwendung von autologen Knochen.

48 zweijährige, weibliche Merino- Mix- Schafe wurden am Halswirbelsäulensegment C3 / C4 standardisiert diskektomiert und mittels Implantation des SynCage-C nach folgender, randomisierter Gruppenaufteilung fusioniert.

Die Gruppen 3 und 12 ( $n_{3, 12} = 8$ ) wurden als Kontrollgruppen mitgeführt, bei Gruppe 12 wurde ein unbefüllter Cage (sog. Leercagegruppe) und bei Gruppe 3 ein mit TricOs-Granulat augmentierter Cage implantiert.

Die Gruppen 9, 10, 11, 15 dienten als Versuchsgruppen ( $n_{9, 10, 11, 15} = 8$ ). Deren implantierte Titan- Cages wurden mit dem kovalent an das Trägermaterial Fibrin gebundenen Parathormon vier verschiedener Konzentrationen (1,0; 0,7; 0,4; 0,2 mg / ml) und TricOs augmentiert.

12 Wochen post operationem wurden die Tiere euthanasiert, das Bewegungssegment C3 / C4 entnommen und histologisch, immunhistologisch sowie histomorphometrisch untersucht.

Die jeweils quantitativ berechneten absoluten Knochen- und TricOs- Flächen dienten zusätzlich der Bestimmung des Fusionsscores sowie der Osteoklasten- und Blutgefäßdichte. In den untersuchten Gruppen besteht ein überwiegend ähnliches histologisches Erscheinungsbild. Dieses unterscheidet sich nur in der Kontrollgruppe „Leercage“ deutlich durch die Abwesenheit von TricOs- Granulat.

Die angestrebte knöcherne Fusion des dritten und vierten Halswirbels (C3, C4) konnte nach 12 Wochen Standzeit im Rahmen der Auswertung der Ergebnisse von deskriptiver Histologie und Fusionsscore bei keiner Gruppe nachgewiesen werden.

Bei Einsatz des trikortikalen Beckenkammspans besteht hingegen eine klinische Erfolgsrate der Spondylodese bei Bestehen einer soliden knöchernen Durchbauung von 88 – 97 % (Bohlmann *et al.*, 1993; Brodke und Zdeblick, 1992; De Palma *et al.*, 1972).

Somit wurde der Nachweis eines zumindest gleichwertigen Ergebnisses wie bei Verwendung von autologem Knochen nicht erzielt.

Die von Knochen-, Knorpel- und Bindegewebe umgebenen TricOs- Partikel dominieren mit Ausnahme des dorsalen Abschnitts das Bandscheibenfach.

Der nicht vollständige Abbau der TricOs- Partikel entspricht den Studienergebnissen von Katthagen und Mittelmeier (Katthagen und Mittelmeier, 1984). In der vorliegenden Studie waren die TricOs- Partikel jedoch zusätzlich weder vollständig von Knochengewebe

umgeben noch im Zwischenwirbelraum integriert. In diesen Bereichen besteht im Gruppenvergleich ebenfalls eine signifikant hohe Osteoklastendichte. Versuchsgruppe 15 weist in der cranialen und caudalen ROI im Vergleich mit den Kontrollgruppen signifikant höhere Werte auf. Es konnte somit sowohl der in der Literatur beschriebene osteoinduktive Effekt auf die Knochenneubildung (Nizard, 1981) als auch dessen Osteokonduktivität bei Einsatz als Trägermatrix für den lokalen Einsatz des osteoinduktiven Parathormons bestätigt werden (Franch *et al.*, 2006).

In direktem Kontakt zum TricOs- Granulat bzw. dem Titan- Implantat besteht eine überwiegend leichte Entzündungsreaktion, während eine schwere Ausprägung nur vereinzelt nachgewiesen werden konnte. Dies bestätigt das in der Literatur beschriebene Ausmaß der zu erwartenden Fremdkörperreaktion (Bauer, 2007; Kandziora *et al.*, 2002 a, b, c).

Die Präparate zeichnen sich insgesamt durch eine hohe Blutgefäßdichte aus, mit den signifikant größten Werten bei Kontrollgruppe 3 „TricOs“.

Das Auftreten von Hypervaskularisation weist neben der Osteokonduktivität des Knochenersatzstoffs TricOs auch das Bestehen einer Entzündungsreaktion in Verbindung mit hohem hydrostatischen Stress nach (Lacroix und Prendergast, 2002; Lobo *et al.*, 2001).

Zur Erzielung optimaler Ergebnisse während der Knochenneubildung sollte neben einer osteokonduktiven Keramik zusätzlich eine Kombination aus osteoinduktiven Komponenten, wie in dieser Studie PTH und Fibrin, zum Einsatz kommen (Arrighi *et al.*, 2009).

Im Gruppenvergleich ergaben sich für die Flächen an Knochen, mineralisiertem Knochen, undifferenziertem Bindegewebe, Knorpel, TricOs- Granulat sowie absolutem Bindegewebe signifikante Unterschiede. So erzielte die Kontrollgruppe „Leercage“ die signifikant größte Knochenfläche im Bereich des Bandscheibenfachs. Auch in mehreren klinischen Studien erfolgte der Einsatz eines Titan- Cages ohne Füllmaterial zur Wirbelkörperfusion beim Menschen mit guten klinischen Resultaten und Vermeidung der mit Entnahme des Beckenkammspanns verbundenen Komplikationen (Lange *et al.*, 2000; Schröder *et al.*, 2007; Krayenbühl *et al.*, 2008). Die Werte der gemessenen Knorpel-, TricOs- und absoluten Bindegewebsflächen ergaben hingegen sehr inhomogene Gruppenverteilungen.

Der ohne Füllmaterial implantierte Cage stimulierte die Spondylodese zwar in ähnlicher Weise, jedoch blieb hier die Neusynthese von Knorpelgewebe vollständig aus. In dieser Kontrollgruppe erfolgte somit kaum eine chondrale Ossifikation, die als Voraussetzung zur Sicherstellung optimal verlaufender Frakturheilung gilt (Schiedt, 1955).

Die Differenzierung schon bestehenden Knochengewebes der Wirbelkörper von neu gebildetem Knochen nach erfolgter Diskektomie war nicht möglich. Die zu diesem Zweck durchgeführte Toluidinblau- Färbung von Präparaten der Kontrollgruppe „Leercage“ erzielte diesbezüglich keine Ergebnisse. Dies steht im Gegensatz zu den Resultaten einer Studie von Arrighi *et al.* in der die Toluidinblau- Färbung erfolgreich zum Nachweis von neu gebildetem Knochen angewendet wurde (Arrighi *et al.*, 2009).

Die vorliegende Studie zeigt, dass das untersuchte Knochenersatzmaterial eine Kombination aus Wirkstoffen darstellt, die die Osteointegration beschleunigt und in der Lage ist unabhängig von der Patientenmorbidity die Knochenneubildung zu forcieren.

Die optimale Konzentration von Parathormon konnte im Rahmen dieser Studie jedoch noch nicht abschließend etabliert werden.

## 7. SUMMARY

### **Histological evaluation of a new implant filling material for spondylodesis in the cervical spine (an experimental study in a sheep model)**

The fusion of vertebral segments is an established treatment for degenerative diseases of the cervical spine. For decades the autologous tricortical iliac crest bone graft has been used as gold standard (Banwart *et al.*, 1995). The increased incidence of implant failure with kyphotic malposition and moving led to the increased use of intervertebral cages augmented with cancellous bone. These metallic and plastic implants are introduced via a ventral surgical access in an intervertebral disc space in order to prevent the collapse associated with kyphosis of the cervical spine and stenosis of the exit openings for the spinal nerves (foramina intervertebralia), (Korovessis *et al.*, 2006).

Emphasis of spondylodesis research is placed on improving surgical procedures and implants used. Further, it aims at acceleration of spondylodesis to increase biomechanical stability and at the development of alternatives for the use of autologous bone grafts to avoid relevant removal morbidity (Park and An, 2009).

In this in vivo study the use of an intervertebral box-design cage made of titanium (Syncage-C) augmented with a combination of different osteoinductive or osteoconductive bone replacement materials was investigated. The groups "unfilled cage" and "cage augmented with TricOs" were used as controls. The objective of the study was the examination of the transferability of the results of other orthopedically studies in the animal model (permission 152/1997, 09/2000, 139/2000, 191/2003, 185/2004, cantonal veterinary office Zurich, Switzerland) to the use in intervertebral spondylodesis. It was expected that the results are at least comparable with the use of autologous bone.

For this purpose forty-eight two year old merino-mix female sheeps underwent a standardized procedure of discectomy of C3 / C4 and were, divided into the following randomised groups, by means of implantation of a cage fused.

Group 3 and 12 ( $n_{3, 12} = 8$ ) served as control groups, which received either unfilled cages (group 12) or TricOs-granules augmented implants (group 3).

Group 9, 10, 11, 15 served as study-groups ( $n_{9, 10, 11, 15} = 8$ ), who's implanted cages were augmented with TricOs and the parathormone in four different concentrations (1,0; 0,4; 0,7; 0,2 mg / ml) covalently bound to the substrate fibrin.

Twelve weeks after operation euthanasia of the animals took place followed by histological, immunohistological and histomorphometrical evaluation of the vertebral segment.

In addition, the quantitatively calculated absolute areas of bone and TricOs are used to establish the fusion score, the density of osteoclasts and the vascular density. The histological appearance of all groups is comparable, only the control group "unfilled cage" differs because of the absence of TricOs-granules.

On the one hand, by analyzing the results of the descriptive histology and fusion score after the twelve weeks of lifetime the desired complete vertebral bone fusion of C3 / C4 could not be detected. On the other hand, the use of an iliac crest graft achieved a solid spinal fusion from 88 up to 97% (Bohlmann *et al.*, 1993; Brodke and Zdeblick, 1992; De Palma *et al.*, 1972). A conclusive scientific evidence of at least equivalent results by use of the analysed bone substitution material has not been achieved

The TricOs-particles, surrounded by bone, cartilage and connective tissue, dominates the disc, with the exception of the dorsal region.

The incomplete degradation of the TricOs-particles conforms to the results of a study from Katthagen and Mittelmeier (Katthagen and Mittelmeier, 1984). In the present study the TricOs-particles were additionally neither completely surrounded by bone nor integrated in the intervertebral space. In these areas a significant high density of osteoclasts was detected, which was significantly higher in the cranial and caudal regions of study group 15 than in the control groups. The osteoinductive effect was established by formation of new bone such as described in an other source (Nizard, 1981) as well as its osteoconductivity as support matrix for the local use of the osteoinductive parathormone (Franch *et al.*, 2006).

There is a mainly light inflammatory reaction in direct contact to TricOs- granules and the titanium implant, whereas severe cases are only occasionally detected. This confirms the expected extent of inflammation described in literature (Bauer, 2007; Kandziora *et al.*, 2002 a, b, c). All histological preparations are characterized by a generally high vascular density with the significantly greatest value for control group 3 “TricOs”. Occurrence of hypervascularisation validate, in addition to the osteoconductivity of the bone substitute TricOs, an inflammatory reaction associated with high hydrostatic stress (Lacroix and Prendergast, 2002; Loba *et al.*, 2001). To obtain excellent results during bone formation besides the osteoconductive ceramic, a combination of osteoinductive components like PTH and fibrin, as in this study, should be employed (Arrighi *et al.*, 2009).

By comparison between the six groups there are significant differences for the areas of bone, mineralized bone, undifferentiated connective tissue, cartilage, TricOs-granules and absolute connective tissue. The control group “unfilled cage” is characterized by the significant greatest bone area within the intervertebral disc space.

Several studies obtained by use of an unfilled cage made of titanium to reach vertebral fusion in humans good clinical results without the complications associated with extraction of an Iliac crest graft (Lange *et al.*, 2000; Schröder *et al.*, 2007; Kraysenbühl *et al.*, 2008). An inhomogeneous group distribution was determined for the measured areas of cartilage, TricOs and connective tissue.

On the other hand the measured areas of cartilage, TricOs, absolute connective tissue show inhomogeneous differences between the groups.

Spondylodesis, stimulated by the unfilled cage, is comparable, but no de-novo-synthesis of cartilage has taken place. This control group formed practically no cartilage. But chondral ossification is necessary to achieve optimal process during fracture healing (Schiedt, 1955).

Differentiation between already existing and newly formed bone following discectomy was not possible. Therefore used toluidine blue staining preparations of the controlgroup “unfilled cage” were unfortunately not rateable. This is in contrast to the results of a study carried out by Arrighi *et al.* where the toluidine blue staining is successful used to differentiate newly formed bone (Arrighi *et al.*, 2009).

This study in sheep revealed, that this material for bone replacement, despite outstanding of establishment of the optimum concentration of parathormone, is a composition of active ingredients, which accelerate the osteointegration and de-novo-synthesis of bone independent of the patients morbidity.

## **8. ANHANG**

### **8.1. Materialien und Reagenzien**

#### **Prostaglandin- Analogon**

- Estrumate<sup>®</sup> ad. us. vet. Injektionslösung; Wirkstoff: Cloprostenol, Essex Tierarznei, München, Deutschland

#### **Ekto- und Endoparasitika**

- Ivomec<sup>®</sup> ad. us. vet. Injektionslösung, Wirkstoff: Ivermectin; Firma: Merial GmbH, Am Söldnermoos 6, D-85399 Hallbergmoos
- Fasinex<sup>®</sup> 10 %, Wirkstoff: Triclabendazol, Firma: Novartis Tiergesundheit GmbH

#### **Paramunitätsinducer**

- Zylexis<sup>®</sup> ad. us. vet., Wirkstoff: ovines Parapoxvirus; Firma: Pfizer AG, Karlsruhe

#### **Thiopental- Natrium**

- Trapanal<sup>®</sup> 2,5 g, Firma: Altana Pharma Deutschland GmbH, Konstanz

#### **Isofluran 2%**

- Isofluran-Lilly<sup>®</sup>, Lilly, Bad Homburg, Deutschland

#### **Analgetika**

- Fentanyl<sup>®</sup> - Janssen 0,5 mg, Firma: Janssen- Cilag GmbH, Neuss, Deutschland
- Pflaster Durogesic<sup>®</sup> SMAT 75 µg / h, Firma: Janssen-Cilag GmbH, Neuss, Deutschland

#### **Antibiose**

- Unacid<sup>®</sup> 3g, Firma: Pfizer Pharma GmbH, Karlsruhe, Deutschland

#### **Infusionslösung**

- Jonosteril<sup>®</sup> 1000 ml, Firma: Fresenius Kabi, Bad Homburg v. d. H., Deutschland

#### **Kochsalz- Spüllösung**

- NaCl 0,9% Fresenius Spüllösung, 100 ml Plastipur<sup>®</sup>, Fresenius Deutschland GmbH, D-61346 Bad Homburg v. d .H.

### **Ringer- Lösung**

- Baxter Deutschland GmbH, Edisonstrasse 4, 85716 Unterschleissheim, Deutschland

### **Kaliumchlorid 7,45 %**

- Braun, Firma: B. Braun Melsungen AG, Melsungen

### **37% Formaldehydlösung**

- 7040, Fa. J.T. Baker, Griesheim, Deutschland

### **Absoluter Alkohol**

- Herbeta-Arzneimittel, Schafhausenerstr.28-32, 12099 Berlin

### **Aqua destilatta**

- zentrale Charité-Versorgung

### **Barbital- Natrium- Puffer**

- Fa. Dr. K. Hollborn & Söhne, CH.B. 1207

### **D- + - Glucose- Monohydrat**

- Fa. Merck 1.04074.100

### **Xylol**

- Fa. J. T. Baker, Deventer, Holland; Lot. Nr. 0824203003, 8080, 5 l

### **Methylmethacrylat**

- Technovit® 9100 NEU, Heraeus Kulzer GmbH & Co KG, Wehrheim

### **Aluminiumoxid**

- Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, 90 aktiv neutral, Bestellnr. 1.010 77.1000, Firma Merck

### **Triton X 100**

- Fa. Sigma, T 8787

## **2- Butoxyethyl- Acetat**

- Bestellnr. 8. 01395. 1000, Merck Schuchardt OHG, 85662 Hohenbrunn, Deutschland

## **2- Methoxyethylacetat**

- Merck 808061, Merck, Darmstadt

## **Vitroclud®**

- R. Langenbrink, Emmendingen, Deutschland

## **EDTA – Lösung**

- Herbeta- Arzneimittel, Schafhausenerstr.28-32, D-12099 Berlin

## **Kisol- Folie**

- Kettenbach, Eschenburg / Eibelshausen

## **Paraffin**

- Mc Cormick Scientific Paraplast Plus, Tissue Embedding Medium

## **Venenverweilkanüle**

- „BD Venflon™ Pro“; Ø: 1,3 x 45 mm; Firma: Becton Dickinson GmbH, Heracle / Serf, Deutschland

## **Laryngoskop**

- Firma Heine, Optotechnik, Kientalstrasse 7, D-82211 Herrsching

## **Endotrachealtubus**

- „Hi-Contour™“, Ø 9,0 mm, Firma: Mallinderodt Medical, Irland

## **Schlundsonde**

- Rüsç, Ø 14 mm

### **Schermaschiene**

- Favorita II, GT 104, Firma: Aesculap

### **Krankenunterlagen**

- 40 x 60 cm, Hartmann, Deutschland

### **Klebeband**

- Leukoplast, Beiersdorf AG

### **Beatmungsgerät**

- Siemens Ventilator Typ 711, Deutschland
- Datex, Capnomac, Instrumentarium corp., Helsinki, Finnland

### **Isofluran- Verdampfer**

- ISOTEC 5, Ohmeda, Boc Health Care

### **Anästhesiegas- Monitoring**

- NGM 1000, F. Stephan GmbH, Medizintechnik, Kirchstraße 19, D- 56412 Gackenbach

### **Vitalparameter- Monitoring**

- Hewlett Packard, M11 66A, Modell 66S

### **EKG- Elektroden**

- BM Monitoring Electrode, BM Health Care, 41453 Neuss, Deutschland

### **Blutdruckmanschette**

- Ø 10 -15 cm, Typ M187 A, Philips

### **Pulsoxymeter**

- Nellcor, DS 100A

### **Cauter**

- ErbotomT 400C, Erbe Elektromedizin

### **Röntgengerät, Zubehör**

- Mobilette, Mobilett Plus, Siemens
- digitale Röntgenfilme: Fuji IP 24 x 30 cm, Cassette type cc, Fujifilm Corporation, Japan
- C – Bogen: „Siremobil Iso-C“, Firma: Siemens AG, München, Deutschland

### **Nahtmaterial**

- Polyesterfaden: MERSILENE<sup>®</sup>, Ethicon a Johnson & Johnson company

### **OP- Tücher**

- 3M 9000 Steri- Drape <sup>TM</sup>, chirurg. Basispaket, 3M Health Care, D- 41453 Neuss

### **Desinfektionsspray**

- Braunoderm<sup>®</sup>, B. Braun Melsungen AG, Carl-Braun-Straße 1, D-34212 Melsungen

### **Langenbeck- Wundhaken**

- Maße: 21cm lang, 30 mm Höhe x 11 mm Breite

### **Scharfer Löffel**

- nach Volkmann, Ø 14 x 20 mm

### **Verbindungsschlauch**

- Vacutex<sup>®</sup>, B.Braun Melsungen AG, D-34209

### **Absauger**

- MEDAP, Bora Universal Power 2080

### **OP- Sauger**

- Tyco Healthcare Tullamore, Ireland

### **Säge**

- Makrotrennschleifsystem, Typ 36/79, Fa. Exakt, Norderstedt, Deutschland

### **Horizontalschüttler**

- Gerhardt Laboshake, C. Gerhardt GmbH & Co. KG, Cäsariusstraße 97, D- 53639 Königswinter

### **Chromatographiesäule**

- Ø 600 mm, VWR International GmbH, Supplier Partnerships for customer solutions

### **Polier -und Schleifsystems**

- Jesan Wirtz Phoenix 3000, Buehler KgoA, Darmstadt, Deutschland

### **Schleifpapier**

- Grit 80/80, Buehler, Buehler-Met II, Silicon carbide Grinding Paper

### **Leica- SM- 2500S- Mikrotom**

- Leica Mikrosysteme Vertrieb GmbH, Ernst-Leitz-Strasse 17-37, 35578 Wetzlar, Deutschland

### **Hartmetallmesser**

- Leica C, 16 cm Länge, Leica Biosystems GmbH, Heidelberger Str.17-19, Postfach 1120, D-69222 Nussloch

### **Brutschrank**

- Typ B6, Heraeus Instruments, Function Line, Kendro Laboratory Products, D-6346 Hanau

### **Entwässerungsautomat**

- Leica, Modell TP 1020, Leica Mikrosysteme Vertrieb GmbH, Ernst-Leitz-Strasse 17-37, D-35578 Wetzlar

### **Kälteplatte**

- Leica, Modell EG 1130

### **Heiztank**

- Modell EG 1120, Leica Mikrosysteme Vertrieb GmbH, Ernst-Leitz-Strasse 17-37, D-35578 Wetzlar

### **Paraffinmikrotom**

- Modell RM 2125, Leica Mikrosysteme Vertrieb GmbH, Ernst-Leitz-Strasse 17-37, D-35578 Wetzlar

### **Microtom Klingen**

- Typ N35H, Typ S 22, Feather Microtome Blade, Stainless Steel

### **Skalpell- Klingen**

- Feather Surgical Blade, Stainless stell, No 21, for No. 4 handle, Ref: 02.010.00.021; No. 11 for No. 3 handle, Ref. 02.101.00.011; pfm, Wankelstr.60, 50996 Köln, Deutschland

### **Brutschrank**

- Typ B6, Heraeus Instruments, Function Line, Kendro Laboratory Products, D-6346 Hanau

## 8.2. Färbungen

### Protokoll 1:

Trichrome-Färbung für histologische Schnitte nach Masson und Goldner (1938), Romeis, mikroskopische Technik, 17. neubearbeitete Auflage (1989), herausgegeben von P. Böck, Urban Schwarzenberg Verlag.

- Entplasten von MMA (Methylmethacrylat) - Schnitten:
  - MEA (2-Methoxyethylacetat) *3x 30 min*
- Schnitte zum Rehydrieren in absteigende Alkoholreihe geben:
  - 1x 100% Alkohol
  - 1x 96% Alkohol
  - 1x 80% Alkohol
  - 1x 70% Alkohol
  - 1x Aqua dest. *jeweils 2 min*
- Kernfärbung mit Weigerts Eisenhämatoxylin *2-4 min*
- Spülen in fließendem Leitungswasser *10 min*
- Färben in Säurefuchsin-Ponceau *5 min*
- Spülen in 1%iger Essigsäure *kurz*
- Differenzieren in Phosphormolybdänsäure – Orange G (bis das Bindegewebe vollständig entfärbt ist) *15-30 min*
- Spülen in 1%iger Essigsäure *kurz*
- Gegenfärben mit Lichtgrün *10 min*
- Spülen in 1%iger Essigsäure *kurz*
- Entwässern in 3 Portionen absolutem Alkohol *kurz*
- Entfetten in Xylol *2x 5 min*
- Eindeckeln mit Vitroclud und Deckgläschen

**Protokoll 2:**

Färbung für histologische Schnitte nach Methylgrün/ van Gieson, Romeis, mikroskopische Technik, 17. neubearbeitete Auflage (1989), herausgegeben von P. Böck, Urban Schwarzenberg Verlag.

- Entplasten von MMA (Methylmethacrylat) - Schnitten:
  - MEA (2-Methoxyethylacetat) *3x 30 min*
- Schnitte zum Rehydrieren in absteigende Alkoholreihe geben:
  - 1x 100% Alkohol
  - 1x 96% Alkohol
  - 1x 80% Alkohol
  - 1x 70% Alkohol *jeweils 2 min*
- Aqua dest. *kurz*
- Färbung in Methylgrün *40 min*
- Aqua dest. *kurz*
- 70% Alkohol *2x eintauchen*
- van Gieson- Gemisch *2 min*
- aufsteigende Alkoholreihe *je 30 sec*
- Xylol *2x 5 min*
- Eindeckeln mit Vitroclud und Deckgläschen

### Protokoll 3:

Kombinierte Färbung für histologische Schnitte nach von Kossa/ Saffranin O, Romeis, mikroskopische Technik, 17. neubearbeitete Auflage (1989), herausgegeben von P. Böck, Urban Schwarzenberg Verlag.

- Entplasten von MMA (Methylmethacrylat) - Schnitten:
  - MEA (2- Methoxyethylacetat) *3x 30 min*
- Schnitte zum Rehydrieren in absteigende Alkoholreihe geben:
  - 1x 100% Alkohol
  - 1x 96% Alkohol
  - 1x 80% Alkohol
  - 1x 70% Alkohol *jeweils 2 min*
- Aqua dest. *kurz*
- Färben in 3%iger wässriger Silbernitratlösung *5 min*
- in Aqua dest. Spülen (in 2 Küvetten) *3x eintauchen*
- Reduzieren in Natrium- Formaldehydlösung *2 min*
- Wässern in Leitungswasser *10 min*
- 5% Natriumthiosulfat *5 min*
- Wässern mit Leitungswasser *10 min*
- Spülen in Aqua dest. *5x kurz eintauchen*
- Färben in Saffranin O *8 min*
- Spülen in Aqua dest.
- Entwässern in:
  - 2x 96% Alkohol
  - 2x 100% Alkohol *kurz*
- Entfetten in Xylol *2x 5 min*
- Eindeckeln mit Vitroclud und Deckgläschen

**Protokoll 4:**

Färbung für histologische Schnitte nach Movat und Pentachrom, Romeis, mikroskopische Technik, 17. neubearbeitete Auflage (1989), herausgegeben von P. Böck, Urban Schwarzenberg Verlag.

- Entplasten von MMA (Methylmethacrylat)- Schnitten:
  - MEA (2- Methoxyethylacetat) *3x 30 min*
- Schnitte zum Rehydrieren in absteigende Alkoholreihe geben:
  - 1x 100% Alkohol
  - 1x 96% Alkohol
  - 1x 80% Alkohol
  - 1x 70% Alkohol
  - 1x Aqua dest. *jeweils 2 min*
- Alcianblau *10 min*
- Spülen in Leitungswasser *5 min*
- alkalischer Alkohol (Ethylalkohol) *1h*
- fließendes Leitungswasser *10 min*
- Aqua dest. *eintauchen*
- Weigerts Eisenhämatoxylin *10 min*
- Aqua dest. *spülen*
- fließendes Leitungswasser *15 min*
- Brilliant Crocein-Säurefuchsin *10-15 min*
- in 0,5% Hac (Essigsäure) spülen *kurz*
- 5% PWS (Phosphorwolframsäure) *20 min*
- 0,5% Hac (Essigsäure), bewegen! *2 min*
- 100% Alkohol *3 x 5 min*
- Saffron du Gâtinais *1 h*
- 100% Alkohol *3 x spülen*
- 100% Alkohol *2 min*
- Xylol *2 x 5 min*
- Eindeckeln mit Vitroclud und Deckgläschen

**Protokoll 5:**

Färbeprotokoll: Toluidinblau-Färbung für histologische Schnitte, Romeis, mikroskopische Technik, 17. neubearbeitete Auflage (1989), herausgegeben von P. Böck, Urban Schwarzenberg Verlag.

- Entplasten von MMA (Methylmethacrylat)- Schnitten:
  - MEA (2- Methoxyethylacetat) *3x 30 min*
- Schnitte zum Rehydrieren in absteigende Alkoholreihe geben:
  - 1x 100% Alkohol
  - 1x 96% Alkohol
  - 1x 80% Alkohol
  - 1x 70% Alkohol *jeweils 2 min*
- Aqua dest. *kurz*
- Färben in Toluidinblau- Farblösung *5-10 min*
- mit Leitungswasser spülen
- in 75%igem Alkohol differenzieren
- Entwässern in
  - 1x 96% Alkohol
  - 2x 100% Alkohol *je 2 min*
- Entfetten in Xylol *2x 5 min*
- Eindeckeln mit Vitroclud und Deckgläschen

**Protokoll 6:**

Färbearbeitung für die (Strept)Avidin-Biotin-Methode,  $\alpha$ -SMA- Färbung, zur Verfügung gestellt vom Forschungslabor des Julius- Wolff-Institut, Charité- Berlin, Campus Virchow-Klinikum, basierend auf Vector Laboratories, Vectastain<sup>®</sup> Elite<sup>®</sup> ABC KIT, Instructions for immunohistochemical staining (8/06). Dieses standardisierte Protokoll wurde durch projektgebundene Optimierung der Konzentrationen eingesetzter Reagenzien sowie Reaktionszeiten von Sonja Dettmann etabliert (2008).

- Schnitte entparaffinieren (Xylol) od. entplasten (MEA):
  - Xylol *2x je 10 min*
  - MEA (2- Methoxyethylacetat) *3x je 20 min*
- Schnitte zum Rehydrieren in absteigende Alkoholreihe geben:
  - 1x 100% Alkohol
  - 1x 96% Alkohol
  - 1x 80% Alkohol
  - 1x 70% Alkohol
  - 1x Aqua dest. *jeweils 2 min*
- Spülen in 1:10 verdünntem Puffer *2 x 5 min*
- Umrandung der Präparate mit Fettstift
- Inkubation mit Normalserum bei Raumtemp. *20 min*
- Lagerung in einer feuchten Kammer *20 min*
- Inkubation mit Primärantikörper *über Nacht bei 4° C od. 1 h bei 37° C*
- Spülen im 1:10 verdünntem Puffer *2 x 5 min*
- Inkubation mit biotinyliertem Zweitantikörper bei Raumtemp. *30 min*
- Spülen im 1:10 verdünnten Phosphat-Puffer *2 x 5 min*
- Inkubation mit AB- Komplex bei Raumtemp. *50 min*
- Spülen im 1:10 verdünnten Phosphat-Puffer *2 x 5 min*
- Inkubation mit Chromogenpuffer *2 x 5 min*
- Inkubation mit AP- Substrat u. Entwicklung unter Sichtkontrolle
- Nach Abstoppen der Reaktion spülen im Puffer

**Paraffinschnitte:**

**Kern Gegenfärbung mit Hämatoxylin nach Mayer (1:2), aus Romeis, 17. Auflage (1989).**

- aus dem Puffer nehmen
- in Aqua dest. spülen *kurz*
- in Hämatoxylin eintauchen *ca. 3 – 6 x*
- in Aqua dest. spülen *kurz*
- mit Leitungswasser spülen *1-2 min*
- aufsteigende Alkoholreihe:
  - 1x 70% Alkohol
  - 1x 80% Alkohol
  - 1x 96% Alkohol
  - 1x100% Alkohol *je 2 min*
- Xylol *2 x 5 min*
- Eindeckeln mit Vitroclud

**Kunststoffschnitte:**

**Kern Gegenfärbung in Hämatoxylin nach Gill, aus Kulzer (1985).**

- aus dem Puffer
- in Aqua dest. spülen *kurz*
- Schnitte färben in Hämatoxylin nach Gill (die Farbstofflösung filtrieren) *15 min*
- in H<sub>2</sub>O spülen
- Gegenfärben in HCL- Alkohol *ca. 8x eintauchen*
- Bläuen im Leitungswasser *10 min*
- in Aqua dest. spülen
- Aufsteigende Alkoholreihe:
  - 1x 70% Alkohol
  - 1x 80% Alkohol
  - 1x 96% Alkohol
  - 1x100% Alkohol *je 2 min*
- Xylol *2x 5 min*
- Eindeckeln mit Vitroclud

### Eingesetzte Substanzen:

- Phosphatpuffer-Lösung pH 7,2, Waldeck GmbH & CoKG, Division Chroma®
- Normalserum: Vetastain®Elite ABC Kit PK 6200, Vector Laboratories, Inc.-30 Ingold Rod-Burlingame, CA 94010 USA
- Primär- AK:  $\alpha$ - SMA- AK, Dako, Monoclonal Mouse AntiHuman Smooth Muscle Actin, Clone A4, 70mg/l, Dako Deutschland GmbH, Hamburger Str. 181, D-22083 Hamburg
- Zweit- AK: Vetastain®Elite ABC Kit PK 6200, Vector Laboratories, Inc.-30 Ingold Rod-Burlingame, CA 94010 USA)
- AB- Komplex: Vetastain® Alkaline Phosphatase Standard Kit AK 5000, Vector Laboratories, Inc.-30 Ingold Rod-Burlingame, CA 94010 USA
- Chromogenpuffer: 3,96g Sigma®, T-3253 Trizma Hydrochloride, Sigma-Aldrich Chemie GmbH P.O. 1120, D-89552 Steinheim
- 0,54 g Sigma®, T-15033 Trizma Base
- 2,63 g NaCl zur Analyse, 6404, Merck® KGaA, D-64271 Darmstadt
- AP- Substrat: Vector® Red Alkaline Phosphatase Substrate Kit I, Cat.No.SK-5100, Vector Laboratories, Inc.-30 Ingold Rod-Burlingame, CA 94010 USA)
- Mayers Hämatoxylin- Lösung, Bestell- Nr. MHS, Zertifiziertes Hämatoxylin (1,0 g/l), Natriumjodat (0,2 g/l), Aluminiumammoniumsulfat- $12 \text{ H}_2\text{O}$  (50 g/l), Chloralhydrat (50 g/l), Zitronensäure (1 g/l), Sigma- Aldrich Chemie GmbH.
- Hämatoxylin- Lösung, Gill Nr. 3, Bestell- Nr. GHS-3, zertifiziertes Hämatoxylin, 6 g/l, Natriumjodat, 0,6 g/l, Aluminumsulfat, 52,8 g/l, Stabilisatoren, Sigma- Aldrich Chemie GmbH.

### Herstellung:

- Normalserum: 5 ml Spülpuffer, 1 Tropfen Normalserum, beides Vermischen
- Prim.- AK: Verdünnung 1:100, mit Dako-Antibody-Diluent (Dako-Diluent) ansetzen
- Zweit- AK: 5 ml Spülpuffer, 2 Tropfen Normalserum, 2 Tropfen biotinylierter AK
- AB- Komplex: 5 ml Spülpuffer, 1 Tropfen Reagenz A, 1 Tropfen Reagenz B, mischen
- Chromogenpuffer: Chroma- Phosphatpufferkonzentrat 1Teil, Aqua dest. 9Teile
- AP- Substrat:
  - 5ml Chromogenpuffer,
  - 1 Tropfen Reagenz 1           mischen
  - 1 Tropfen Reagenz 2           mischen
  - 1 Tropfen Reagenz 3           mischen
- Röhrcchen mit Alu- Folie umwickeln, als Schutz vor Licht

**Protokoll 7:**

Färbearbeitung für die TRAP- Färbung, zur Verfügung gestellt vom Forschungslabor des Julius- Wolff- Institut, Charité- Berlin, Campus Virchow- Klinikum, aus Romeis, 17. Auflage (1989). Dieses standardisierte Protokoll wurde durch projektgebundene Optimierung der verwendeten Reagenzien sowie Reaktionszeiten von Sonja Dettmann etabliert (2008).

- Entplasten in MEA bzw. *3 x 30 min*
- Entparaffinieren der Schnitte in Xylol *3 x 5 min*
- Absteigende Alkoholreihe:
  - 1x 100% Alkohol
  - 1x 96% Alkohol
  - 1x 80% Alkohol
  - 1x 70% Alkohol
  - 1x Aqua dest. *jeweils 2 min*
- TRAP- Puffer *10 min*
- TRAP- Färbelösung (37° C) *2 h*
- Spülen in Aqua dest.
- Gegenfärben mit Hämatoxylin nach Meyer (S. 243) *5 min*
- Bläuen in Leitungswasser *10 min*
- Spülen in Aqua dest.
- Eindeckeln in Aquatex® (Merck, Darmstadt)

**Eingesetzte Substanzen**

- Zur Verwendung kam der „Leucocyte Acid Phosphatase Kit“ (Procedure No. 387) von Sigma Diagnostics, St. Louis, USA.

**TRAP- Puffer pH 5,0:**

- 3,28g Na- Acetat und 46,01g Na- Tartrat mit Aqua dest. auf 1L auffüllen

**TRAP- Färbelösung:**

- 200ml TRAP- Puffer
- 4ml N,N- Dimethylformamid Sigma D4551
- 2ml Triton X
- 40mg Naphtol AS- Mix- Phosphat (-20° C) Sigma N5000
- 240mg Fast Red Violett LB Salt (-20° C) Sigma F3381

### 8.3. Statistische Auswertung

Dargestellte Boxplots ohne Bestehen von Signifikanzen im Gruppenvergleich

#### 8.3.1. CROI

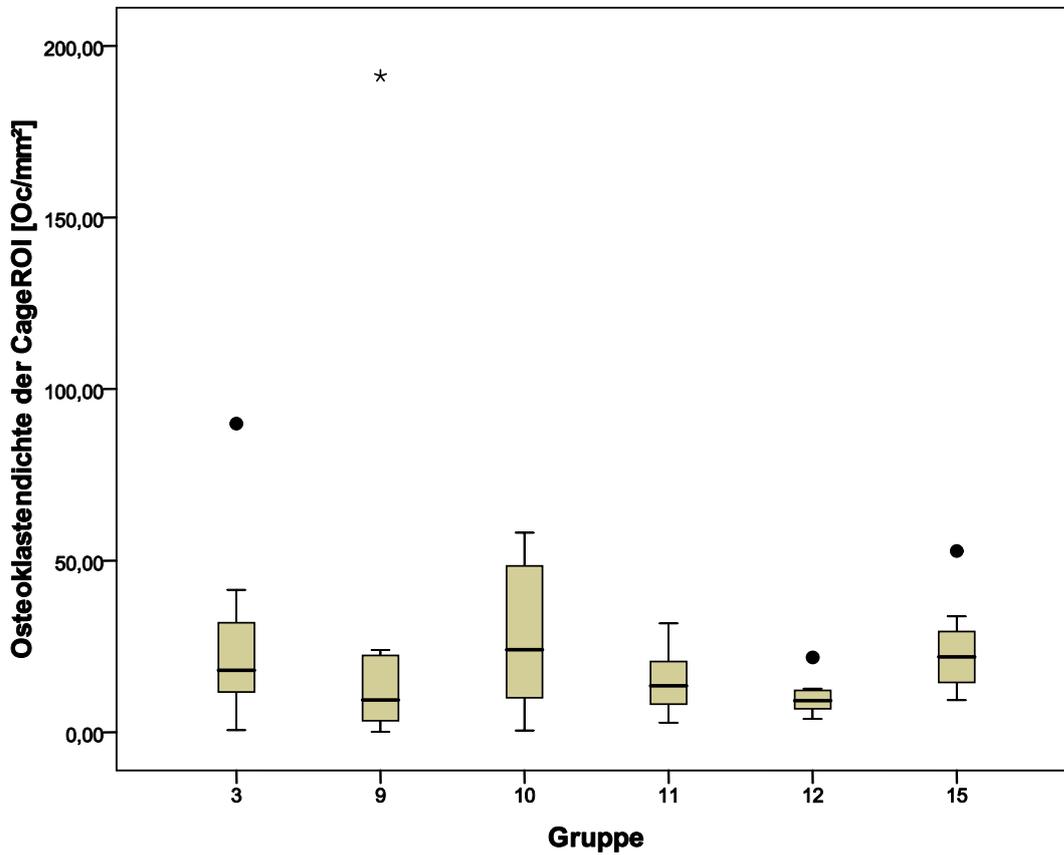


Abb. 106 Osteoklastendichte [Oc/mm<sup>2</sup>] der CageROI

### 8.3.2. 5TeilROIs

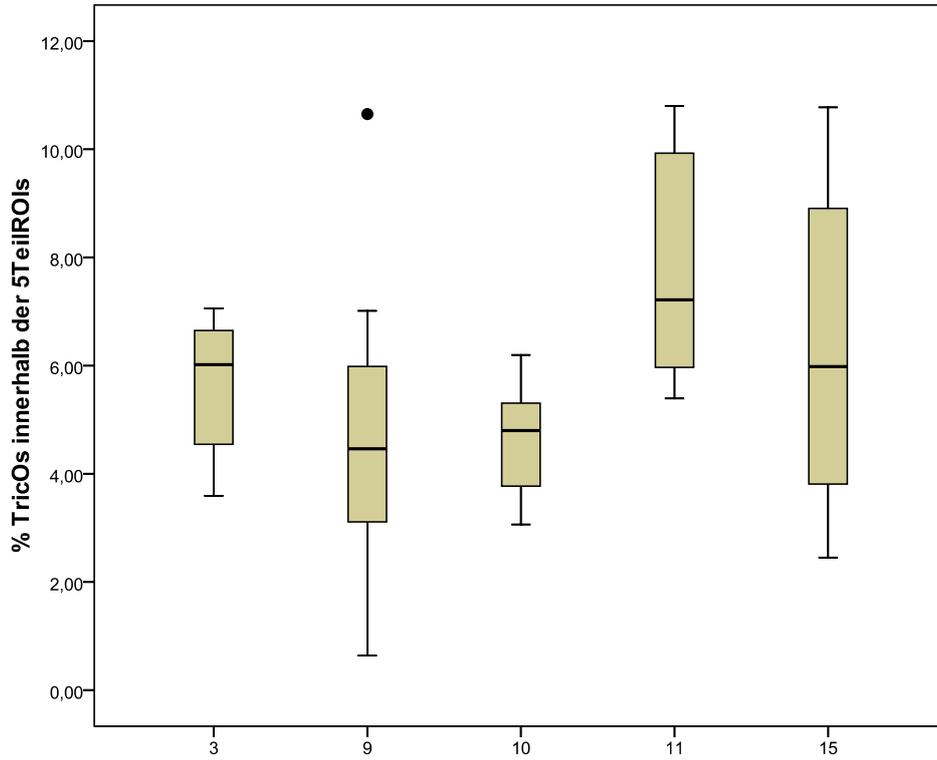


Abb. 107 TricOs innerhalb der 5Teil- ROIs, [%]

### 8.3.3. Dorsale ROI

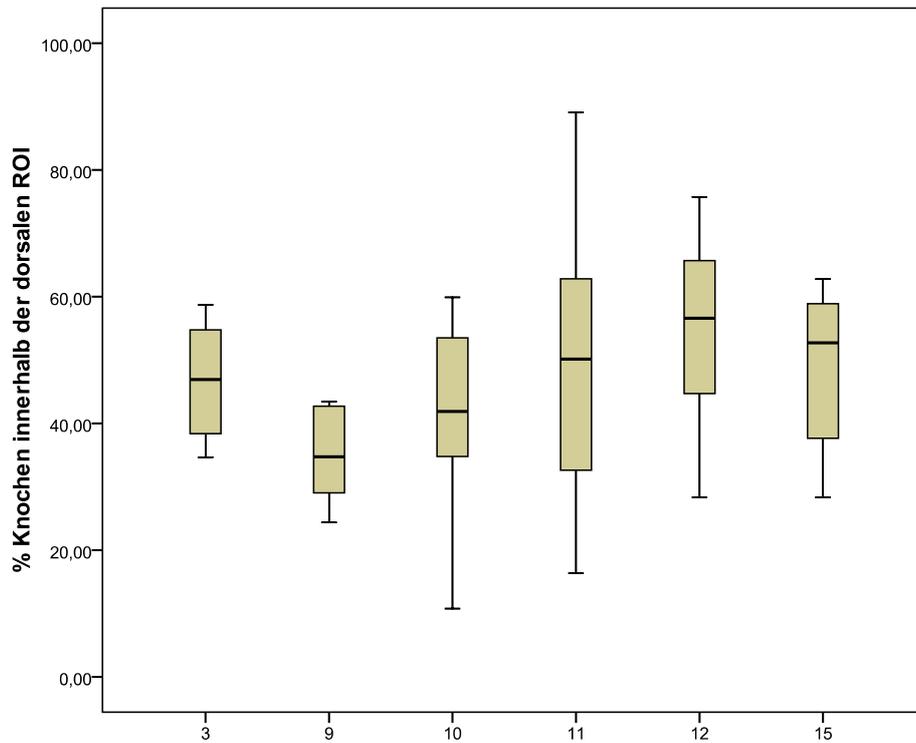


Abb. 108 Knochen innerhalb der dorsalen ROI, [%]

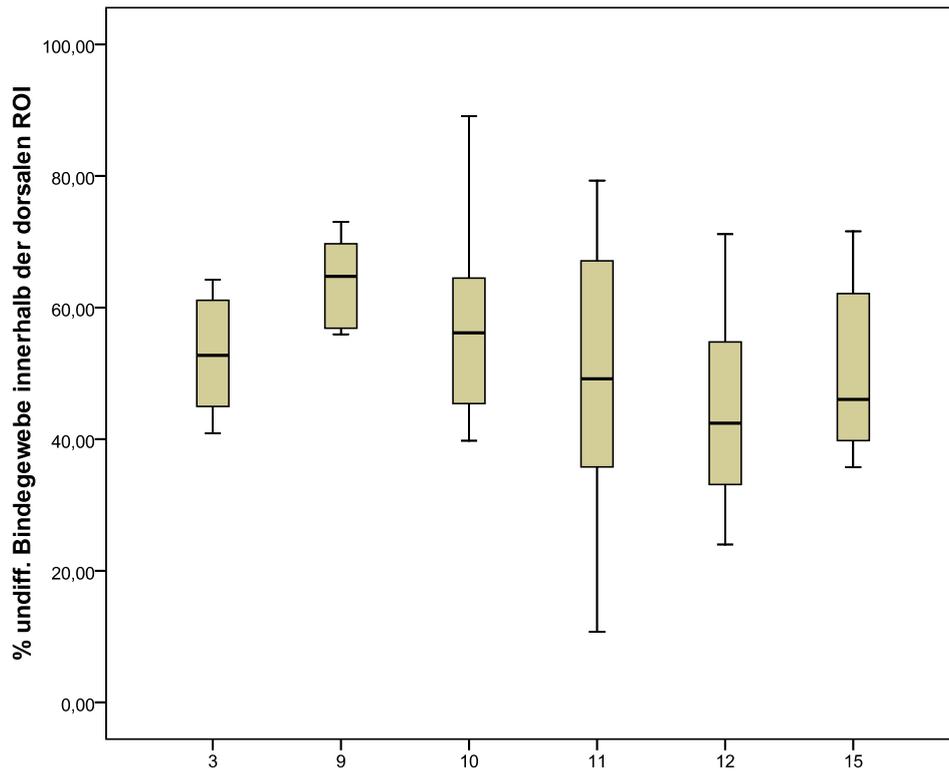


Abb. 109 Undiff. Bindegewebe innerhalb der dorsalen ROI, [%]

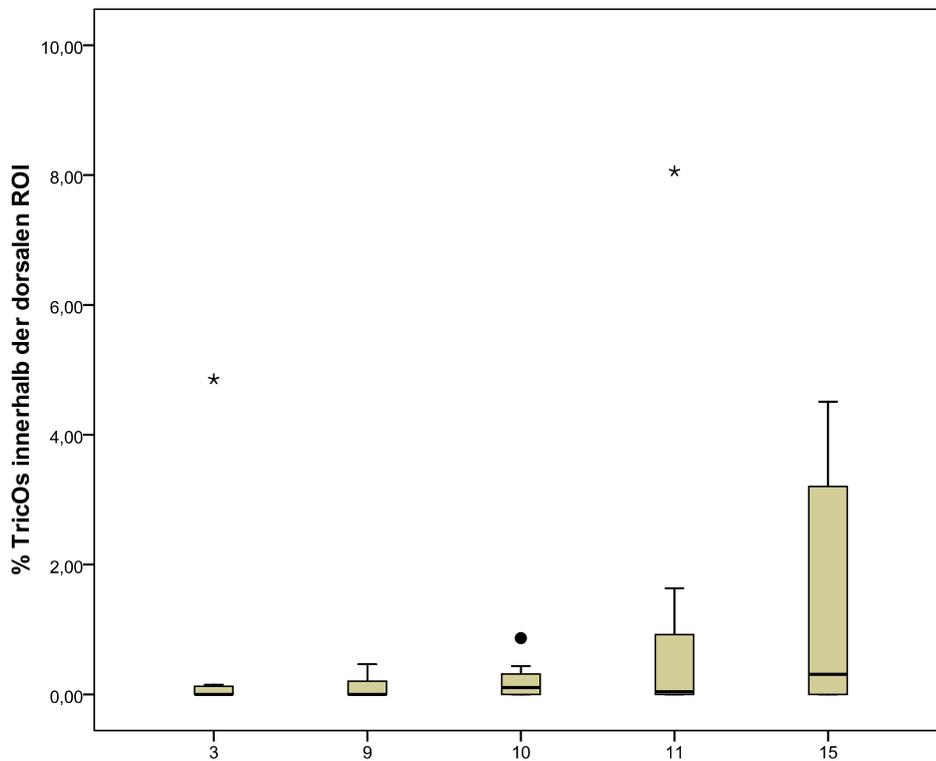


Abb. 110 TricOs innerhalb der dorsalen ROI, [%]

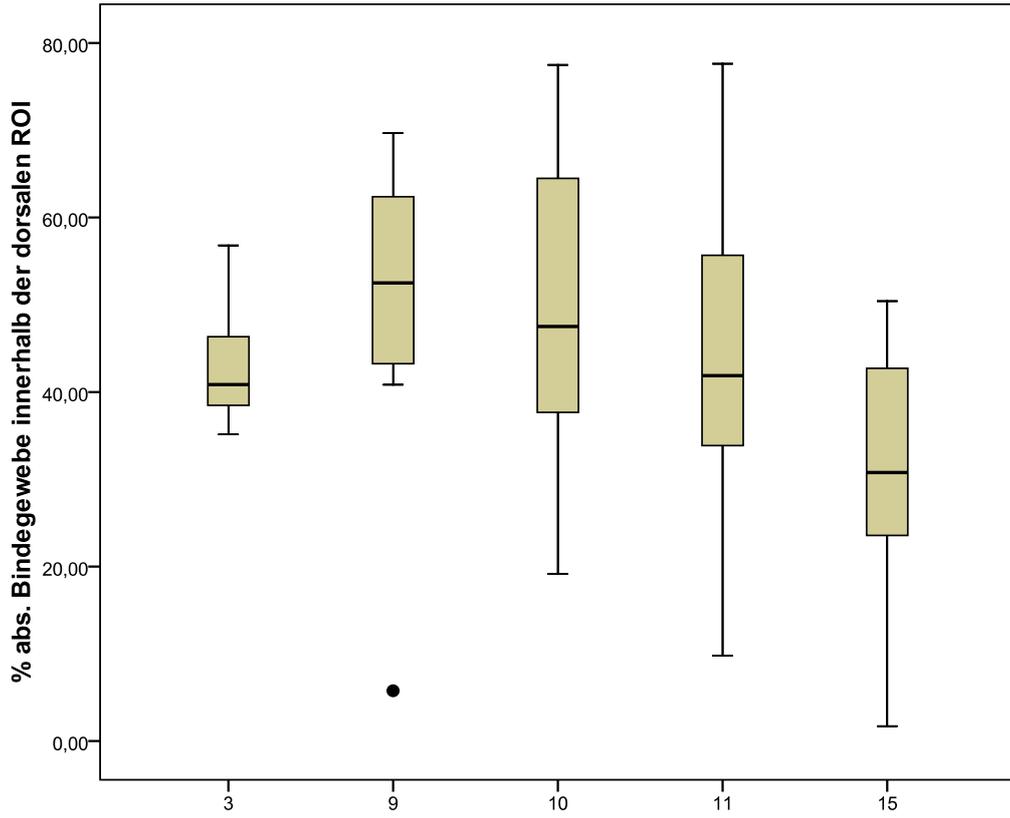


Abb. 111 Absolutes Bindegewebe innerhalb der dorsalen ROI, [%]

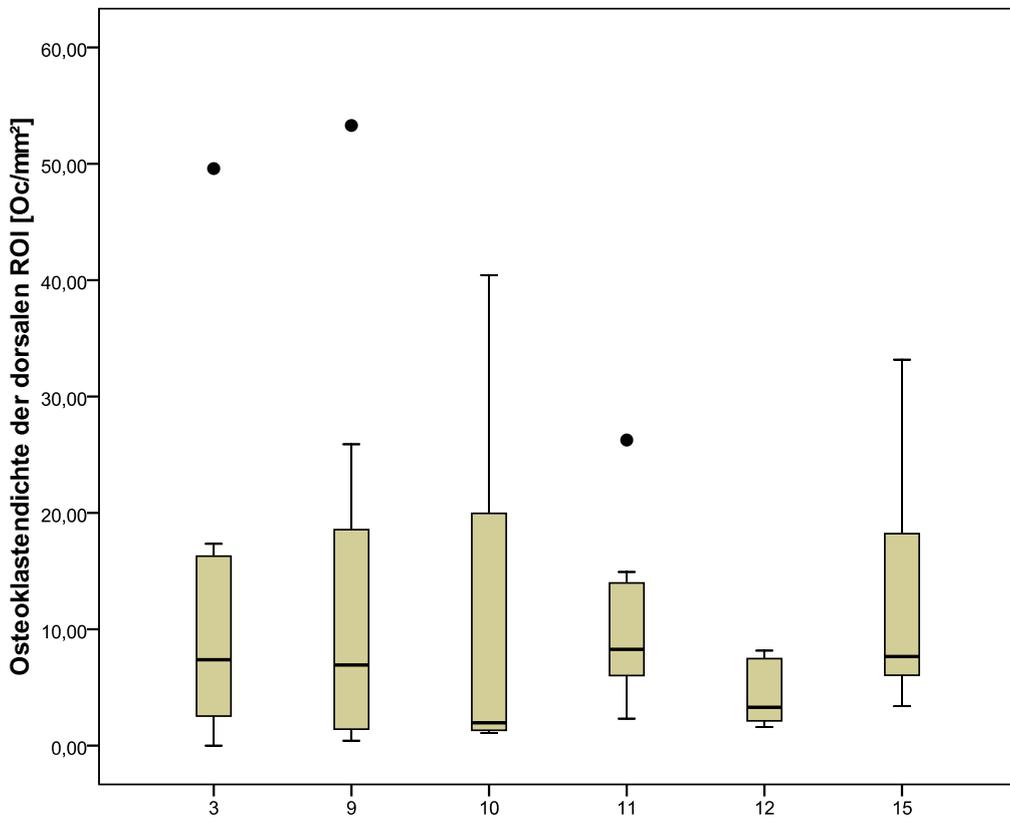


Abb. 112 Osteoklastendichte der dorsalen ROI, [Oc/mm<sup>2</sup>]

8.3.4. Ventrale ROI

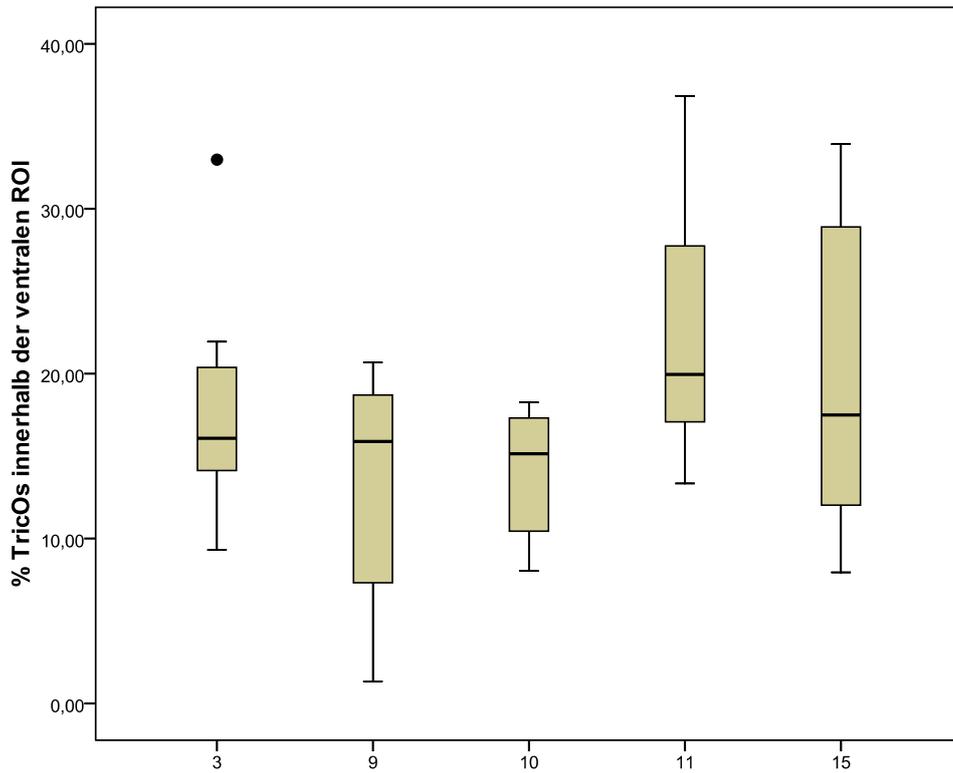


Abb. 113 TricOs innerhalb der ventralen ROI, [%]

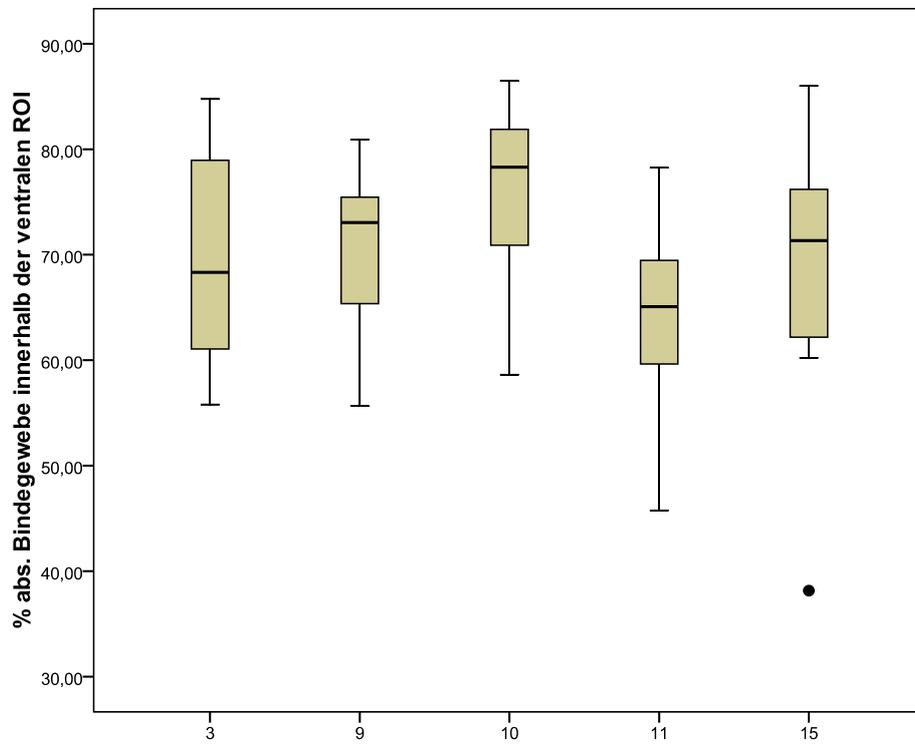


Abb. 114 Absolutes Bindegewebe innerhalb der ventralen ROI, [%]

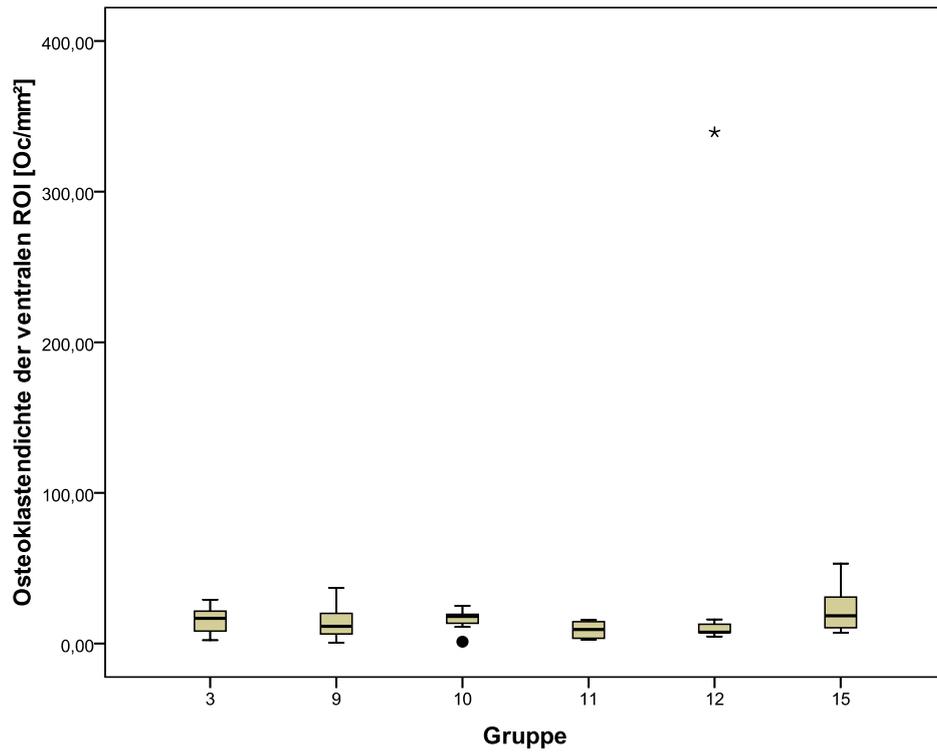


Abb. 115 Osteoklastendichte der ventralen ROI, [Oc/mm<sup>2</sup>]

### 8.3.5. Craniale ROI

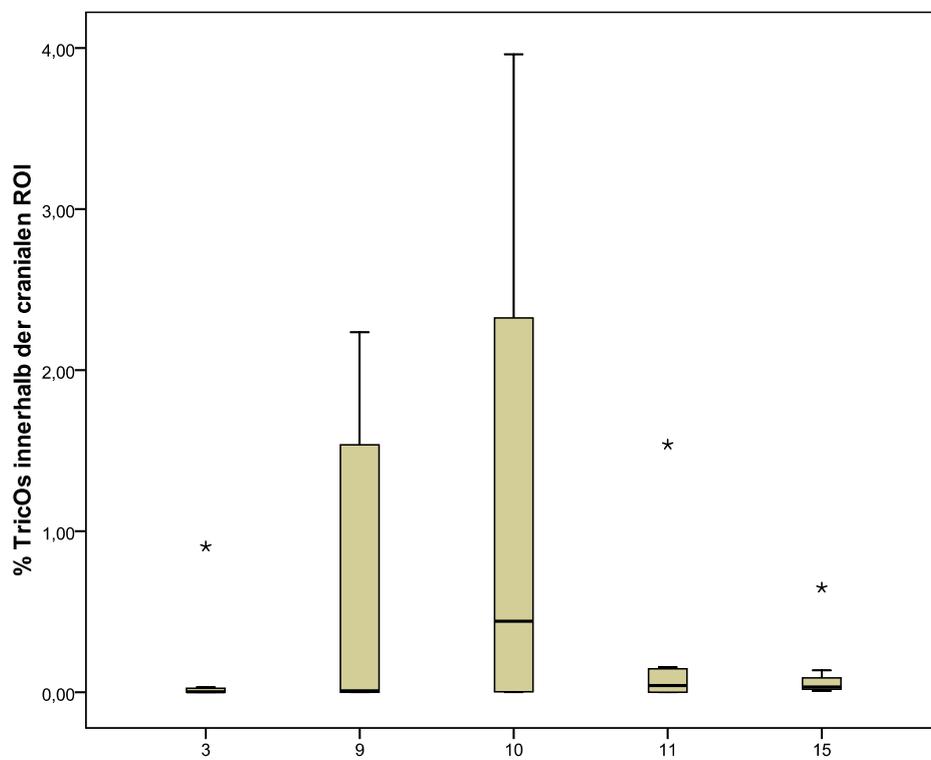


Abb. 116 TricOs innerhalb der cranialen ROI, [%]

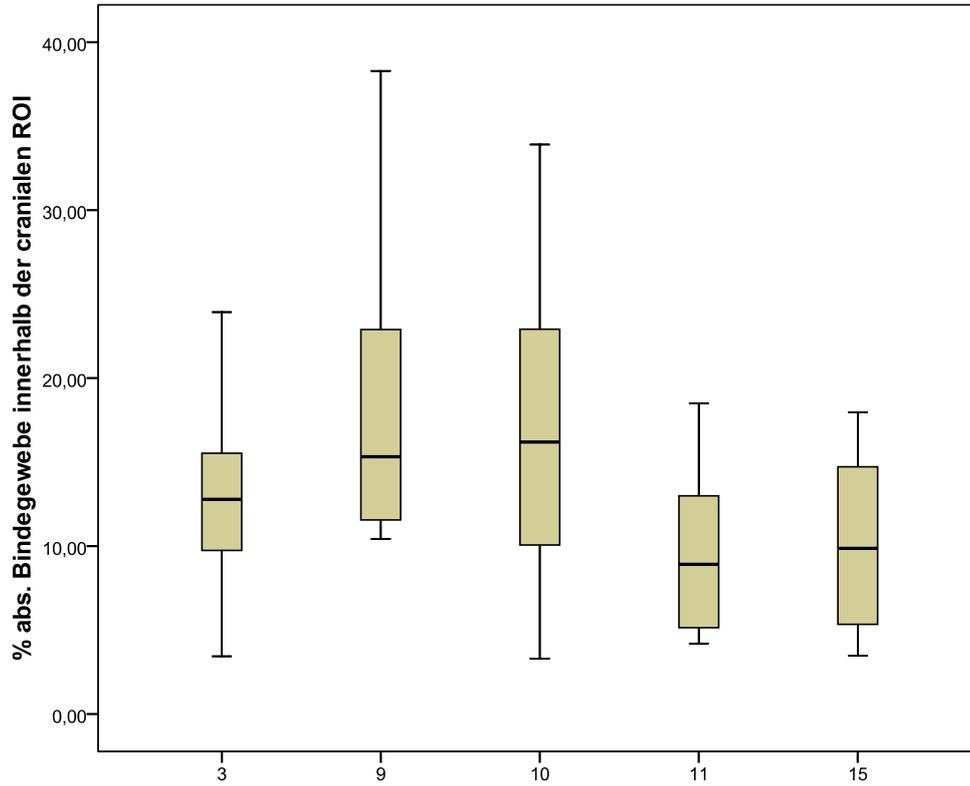


Abb. 117 Absolutes Bindegewebe innerhalb der cranialen ROI, [%]

### 8.3.6. Caudale ROI

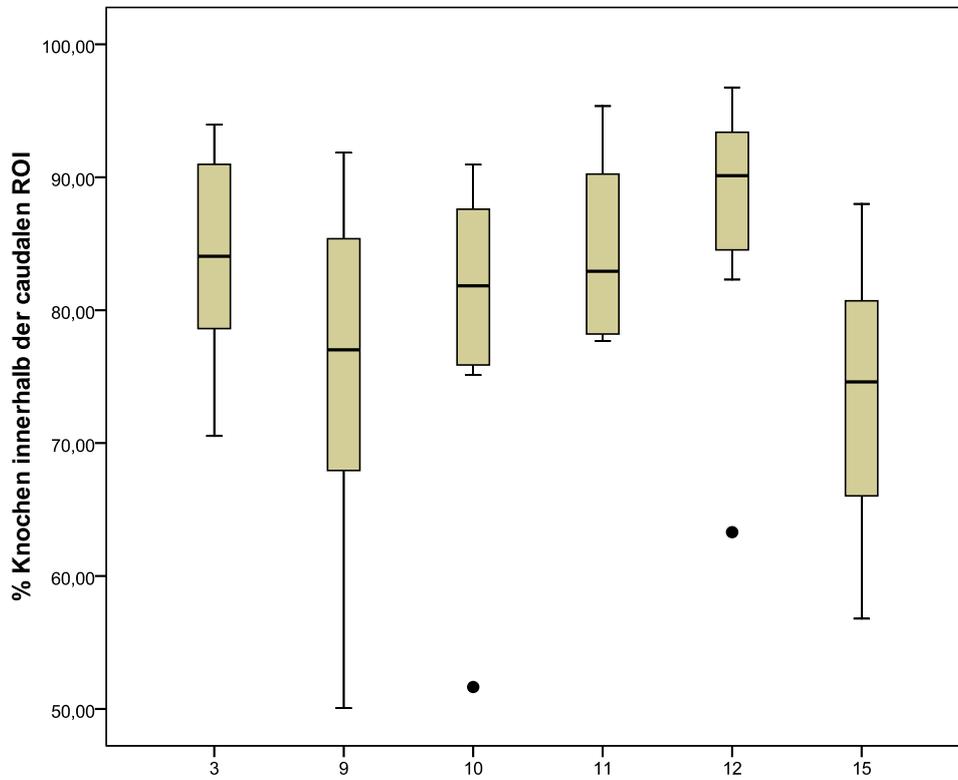


Abb. 118 Knochen innerhalb der caudalen ROI, [%]

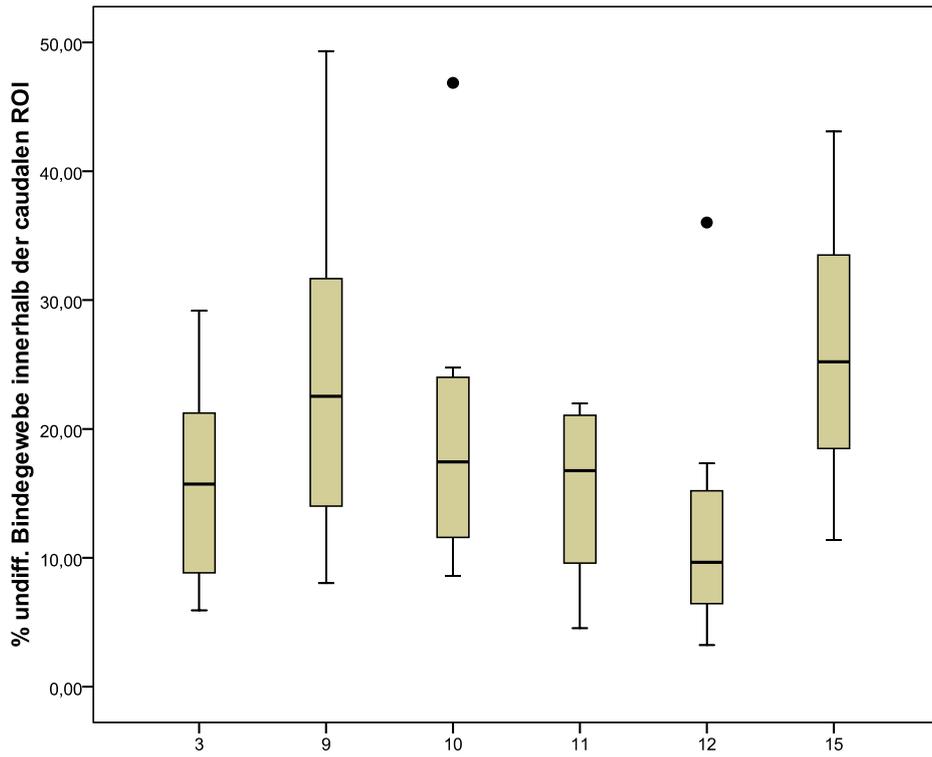


Abb. 119 Undifferenziertes Bindegewebe innerhalb der caudalen ROI, [%]

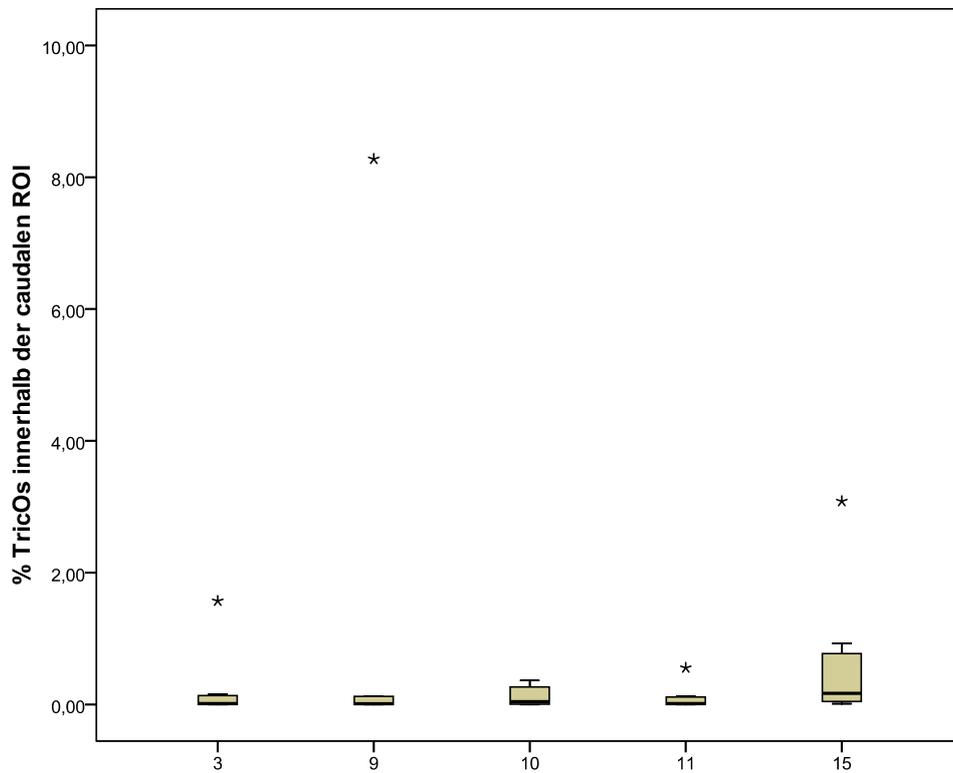


Abb. 120 TricOs innerhalb der caudalen ROI, [%]

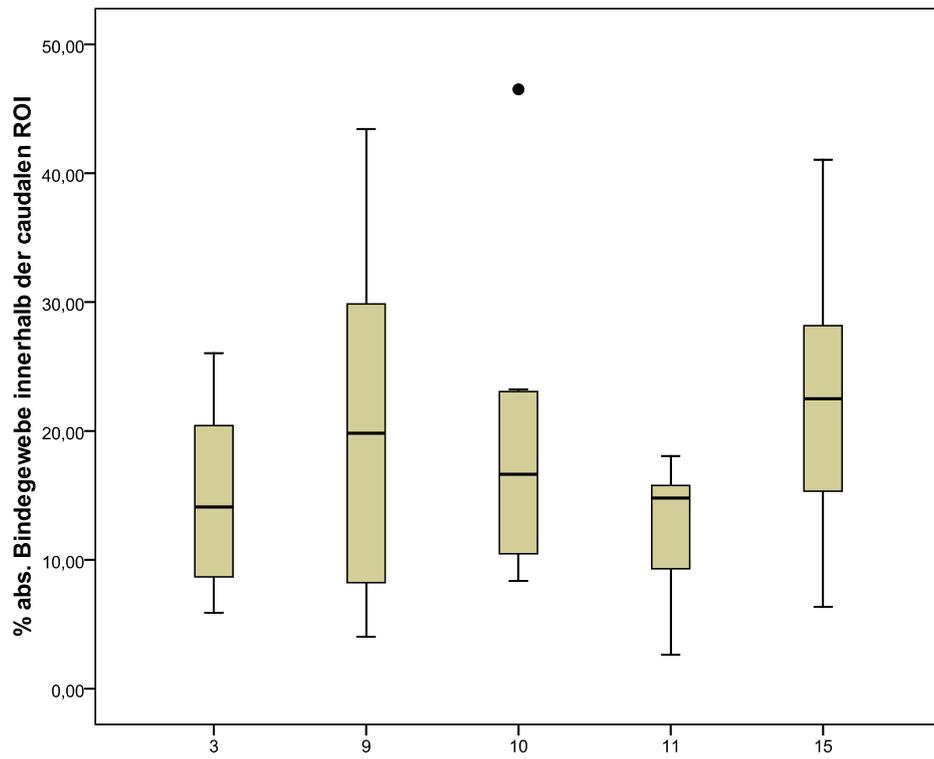


Abb. 121 Absolutes Bindegewebe innerhalb der caudalen ROI, [%]

## 9. LITERATURVERZEICHNIS

### A:

- ABBAS, A. K.; Lichtmann, A. H.; POBER, J. S. (1996)  
Immunologie. -1. Aufl.  
Bern, Verlag Hans Huber, ISBN-10: 345682596X
- ACOSTA, F. L., CLOYD, J. M., ARYAN, H. E. AMES, C. P. (2009)  
Patient satisfaction and radiographic outcomes after lumbar spinal fusion without iliac bone graft or transverse process fusion.  
J Clin Neurosci
- ARONSON, N., FILTZER, D. L. BAGAN, M. (1968)  
Anterior cervical fusion by the smith-robinson approach.  
J Neurosurg **29**(4): 396-404
- ARRIGHI, I., MARK, S., ALVISI, M., VON RECHENBERG, B., HUBBELL, J. A., SCHENSE, J. C. (2009)  
Bone healing induced by local delivery of an engineered parathyroid hormone prodrug.  
Biomaterials **30**(9)
- ARRINGTON, E. D., SMITH, W. J., CHAMBERS, H. G., BUCKNELL, A. L. DAVINO, N. A. (1996)  
Complications of iliac crest bone graft harvesting.  
Clin Orthop Relat Res(329): 300-9
- ASSIETTI, R., BERETTA, F. ARIENTA, C. (2002)  
Two-level anterior cervical discectomy and cage-assisted fusion without plates.  
Neurosurg Focus **12**(1): E3

### B:

- BAGBY, G. (1988)  
Arthrodesis by the distraction-compression method using a stainless steel implant.  
Orthopedics: 931-4
- BANWART, J. C., ASHER, M. A., HASSANEIN, R. S. (1995)  
Iliac crest bone graft harvest donor site morbidity. A statistical evaluation.  
Spine.
- BAUER, T. W. (2007)  
An overview of the histology of skeletal substitute materials.  
Arch Pathol Lab Med **131**(2): 217-24
- BEAMAN, F. D., BANCROFT, L. W., PETERSON, J. J., KRANSDORF, M. J. (2006)  
Bone graft materials and synthetic substitutes.  
Radiol Clin North Am **44**(3): 451-61
- BOATRIGHT, K. CRAIG; BODEN, SCOTT D. (2005)  
Biology of spine fusion.  
Totowa, NJ, J.R.Lieberman and G:E. Friedlaender C Humana Press Inc.,
- BODEN, S. D. (1998 a)  
Bone repair and enhancement clinical trial design. Spine applications.  
Clin Orthop Relat Res(355 Suppl): S336-46

- BODEN, S. D. (1998 b)  
Outcome assessment after spinal fusion: why and how?  
Orthop Clin North Am **29**(4): 717-28
- BODEN, S. D. (2002)  
Overview of the biology of lumbar spine fusion and principles for selecting a bone graft substitute.  
Spine **27**(16 Suppl 1): S26-31
- BOHLMAN, H. H., EMERY, S. E., GOODFELLOW, D. B. JONES, P. K. (1993)  
Robinson anterior cervical discectomy and arthrodesis for cervical radiculopathy. Long-term follow-up of one hundred and twenty-two patients.  
J Bone Joint Surg Am **75**(9): 1298-307
- BONADIO, S., PATIL, GOLDSTEIN (1999)  
Localized, direct plasmid gene delivery in vivo: prolonged therapy results in reproducible tissue regeneration.  
Nat Med
- BRAUN, W., RUTER, A. (1996)  
[Fracture healing. Morphologic and physiologic aspects].  
Unfallchirurg **99**(1): 59-67
- BRILL, T. (1992)  
Prä- und postoperative Untersuchungen zur Standardisierung der Auswahlkriterien für Schafe zur experimentellen orthopädischen Operationen und zur Bewertung von Operationsergebnissen.  
Dissertation, Fachbereich Veterinärmedizin, München, Ludwig Maximilian Universität
- BRODKE, D. S., DICK, J. C., KUNZ, D. N., MCCABE, R., ZDEBLICK, T. A. (1997)  
Posterior lumbar interbody fusion. A biomechanical comparison, including a new threaded cage.  
Spine **22**(1): 26-31
- BRODKE, D. S., ZDEBLICK, T. A. (1992)  
Modified Smith-Robinson procedure for anterior cervical discectomy and fusion.  
Spine **17**(10 Suppl): S427-30
- BUCHER, O., Wartenberg, H. (1997)  
Cytologie, Histologie und mikroskopische Anatomie des Menschen. -12., vollst. überarb. Aufl., Bern, Göttingen, Verlag Hans Huber
- BUDRAS, K.-D.;FRICKE, W.; RICHTER, R. (1996)  
Atlas der Anatomie des Hundes. -5., erweiterte und vervollständigte Auflage  
Schlütersche Verlagsanstalt und Druckerei GmbH&Co, ISBN 3-87706-495-7

**C:**

- CAIN, C. C., FRASER, R. D. (1995)  
Bony and vascular anatomy of the normal cervical spine in the sheep.  
Spine **20**(7): 759-65
- CLOWARD, R. B. (1971)  
Complications of anterior cervical disc operation and their treatment.  
Surgery **69**(2): 175-82

CLOWARD, R. B. (1988)

The anterior surgical approach to the cervical spine: the Cloward Procedure: past, present, and future. The presidential guest lecture, Cervical Spine Research Society. Spine **13**(7): 823-7

CUNNINGHAM, B. W., KANAYAMA, M., PARKER, L. M., WEIS, J. C., SEFTER, J. C., FEDDER, I. L., MCAFEE, P. C. (1999)

Osteogenic protein versus autologous interbody arthrodesis in the sheep thoracic spine. A comparative endoscopic study using the Bagby and Kuslich interbody fusion device. Spine **24**(6): 509-18

**D:**

DACULSI, G. (1998)

Biphasic calcium phosphate concept applied to artificial bone, implant coating and injectable bone substitute. Biomaterials **19**(16): 1473-8

DACULSI, G., BAGOT D'ARC, M., CORLIEU, P., GERSDORFF, M. (1992)

Macroporous biphasic calcium phosphate efficiency in mastoid cavity obliteration: experimental and clinical findings. Ann Otol Rhinol Laryngol **101**(8): 669-74

DACULSI, G., PASSUTI, N. (1990)

Effect of the macroporosity for osseous substitution of calcium phosphate ceramics. Biomaterials **11**: 86-7

DAHME, E., Weiss, E. (2007)

Grundriss der speziellen pathologischen Anatomie der Haustiere. 5., neu bearbeitete u. erweiterte Auflage  
Enke Verlag, ISBN-10: 3432809050

DENIS, F. (1984)

Spinal instability as defined by the three-column spine concept in acute spinal trauma. Clin Orthop Relat Res (189): 65-76

DE PALMA, AF, Cooke, AJ. (1968)

Results of anterior interbody fusion of the cervical spine. Clin Orthop Relat Res. **60**:169-85.

DE PALMA, AF; ROTHMAN, RH; LEWINNEK, GE; CANALE, ST (1972)

Anterior interbody fusion for severe cervical disc degeneration. Surg Gynecol Obstet **134**(5): 755-8

DOBNIG, T. (1997)

The effects of programmed administration of human parathyroid hormone fragment (1-34) on bone histomorphometry and serum chemistry in rats. Endocrinology: **138**(11):4607-12

DUDA, G. N., ECKERT-HUBNER, K., SOKIRANSKI, R., KREUTNER, A., MILLER, R., CLAES, L. (1998)

Analysis of inter-fragmentary movement as a function of musculoskeletal loading conditions in sheep. J Biomech **31**(3): 201-10

**E:**

- EGGERS, C., WOLTER, D. (1986)  
[Autologous spongiosaplasty in the treatment of chronic osteomyelitis].  
Unfallchirurgie **12**(2): 104-6
- EITEL, F., KLAPP, F., JACOBSON, W., SCHWEIBERER, L. (1981 a)  
Bone regeneration in animals and in man. A contribution to understanding the relative  
value of animal experiments to human pathophysiology.  
Arch Orthop Trauma Surg **99**(1): 59-64
- EITEL, F., SEILER, H., SCHWEIBERER, L. (1981 b)  
[Morphological examination of animal-experiment results: comparison with  
regeneration of the human bone-structure. II. Research results (author's transl)].  
Unfallheilkunde **84**(6): 255-64
- ELI LILLY AND COMPANY (2001)  
The bone remodelling process.  
URL: [http://www.lilly.com/pdf/bone\\_remodeling\\_process\\_1003.pdf](http://www.lilly.com/pdf/bone_remodeling_process_1003.pdf) (01.10.2010)
- EMERY, S. E., BOLESTA, M. J., BANKS, M. A., JONES, P. K. (1994)  
Robinson anterior cervical fusion comparison of the standard and modified  
techniques.  
Spine **19**(6): 660-3

**F:**

- FINKELSTEIN, J. S., KLIBANSKI, A., ARNOLD, A. L., TOTH, T. L., HORNSTEIN, M. D.,  
NEER, R. M. (1998)  
Prevention of estrogen deficiency-related bone loss with human parathyroid hormone-  
(1-34): a randomized controlled trial.  
Jama **280**(12): 1067-73
- FRANCH, J., DIAZ-BERTRANA, C., LAFUENTE, P., FONTECHA, P., DURALL, I. (2006)  
Beta-tricalcium phosphate as a synthetic cancellous bone graft in veterinary  
orthopaedics: a retrospective study of 13 clinical cases.  
Vet Comp Orthop Traumatol **19**(4): 196-204

**H:**

- HAUSCHILD, BADER, UHR, MEYER-LINDENBERG, FEHR (2007)  
Klinischer Einsatz von  $\beta$ -Tricalciumphosphat-Erfahrungen mit einem  
matrixorientierten Ansatz zur Osteoregeneration.  
Tierärztliche Praxis: 5-13
- HELM, G. A., DAYOUB, H., JANE, J. A., JR. (2001)  
Bone graft substitutes for the promotion of spinal arthrodesis.  
Neurosurg Focus **10**(4): E4
- HODSMAN, A. B., FRAHER, L. J., WATSON, P. H., OSTBYE, T., STITT, L. W., ADACHI, J.  
D., TAVES, D. H., DROST, D. (1997)  
A randomized controlled trial to compare the efficacy of cyclical parathyroid hormone  
versus cyclical parathyroid hormone and sequential calcitonin to improve bone mass  
in postmenopausal women with osteoporosis.  
J Clin Endocrinol Metab **82**(2): 620-8

HODSMAN, A. B., STEER, B. M., FRAHER, L. J., DROST, D. J. (1991)  
Bone densitometric and histomorphometric responses to sequential human parathyroid hormone (1-38) and salmon calcitonin in osteoporotic patients. *Bone Miner* **14**(1): 67-83

HUNT, J. A., WILLIAMS, D. F. (1995)  
Quantifying the soft tissue response to implanted materials. *Biomaterials* **16**(3): 167-70

**J:**

JIANG, Y., ZHAO, J. J., MITLAK, B. H., WANG, O., GENANT, H. K. ERIKSEN, E. F. (2003)  
Recombinant human parathyroid hormone (1-34) [teriparatide] improves both cortical and cancellous bone structure. *J Bone Miner Res* **18**(11): 1932-41

JUNG, R. E., COCHRAN, D. L., DOMKEN, O., SEIBL, R., JONES, A. A., BUSER, D., HAMMERLE, C. H. (2007)  
The effect of matrix bound parathyroid hormone on bone regeneration. *Clin Oral Implants Res* **18**(3): 319-25

JUNQUEIRA, L. C., CARNEIRO, J. (2004)  
Histologie, Springer-Lehrbuch. -6., neu übers. überarbeitete Auflage. ISBN 3-5402-1965-X, M. Gratzl (Hrsg.), Springer Verlag GmbH

**K:**

KANDZIORA, F., PFLUGMACHER, R., SCHAFFER, J., BORN, C., DUDA, G., HAAS, N. P., MITTLMEIER, T. (2001 a)  
Biomechanical comparison of cervical spine interbody fusion cages. *Spine* **26**(17): 1850-7

KANDZIORA, F., PFLUGMACHER, R., SCHOLZ, M., SCHAFFER, J., SCHOLLMEIER, G., SCHNAKE, K. J., BAIL, H., DUDA, G., HAAS, N. P. (2002 a)  
[Experimental fusion of the sheep cervical spine. Part I: Effect of cage design on interbody fusion]. *Chirurg* **73**(9): 909-17

KANDZIORA, F., PFLUGMACHER, R., SCHOLZ, M., SCHNAKE, K., LUCKE, M., SCHRÖDER, R., MITTLMEIER, T. (2001 b)  
Comparison between sheep and human cervical spines: an anatomic, radiographic, bone mineral density, and biomechanical study. *Spine* **26**(9): 1028-37

KANDZIORA, F., SCHOLLMEIER, G., SCHOLZ, M., SCHAEFER, J., SCHOLZ, A., SCHMIDMAIER, G., SCHRÖDER, R., BAIL, H., DUDA, G., MITTLMEIER, T. HAAS, N. P. (2002 b)  
Influence of cage design on interbody fusion in a sheep cervical spine model. *J Neurosurg* **96**(3 Suppl): 321-32

KANDZIORA, F., SCHOLZ, M., PFLUGMACHER, R., KRUMMREY, G., SCHOLLMEIER, G., SCHMIDMAIER, G., SCHNAKE, K. J., DUDA, G., RASCHKE, M., HAAS, N. P. (2002 c)  
[Experimental fusion of the sheep cervical spine. Part II: Effect of growth factors and carrier systems on interbody fusion]. *Chirurg* **73**(10): 1025-38

- KATTHAGEN, B. D., MITTELMEIER, H. (1984)  
Experimental animal investigation of bone regeneration with collagen-apatite.  
Arch Orthop Trauma Surg **103**(5): 291-302
- KÖNIG, H.E.; LIEBICH, H.-G. (1999)  
Anatomie der Haussäugetiere, Band I Bewegungsapparat, 1. Auflage.  
Stuttgart; New York: Schattauer  
ISBN 3-7945-1861-6
- KOROVESSIS, P., PETSINIS, G., KOUREAS, G., ILIOPOULOS, P., ZACHARATOS, S. (2006)  
Anterior surgery with insertion of titanium mesh cage and posterior instrumented fusion performed sequentially on the same day under one anesthesia for septic spondylitis of thoracolumbar spine: is the use of titanium mesh cages safe?  
Spine (Phila Pa 1976) **31**(9): 1014-9
- KRAYENBUHL, N., SCHNEIDER, C., LANDOLT, H., FANDINO, J. (2008)  
Use of an empty, Plasmapore-covered titanium cage for interbody fusion after anterior cervical microdiscectomy.  
J Clin Neurosci **15**(1): 11-7
- KUSLICH, S. D., ULSTROM, C. L., GRIFFITH, S. L., AHERN, J. W., DOWDLE, J. D. (1998)  
The Bagby and Kuslich method of lumbar interbody fusion. History, techniques, and 2-year follow-up results of a United States prospective, multicenter trial.  
Spine (Phila Pa 1976) **23**(11): 1267-78; discussion 1279
- L:**
- LACROIX, D., PRENDERGAST, P. J. (2002)  
A mechano-regulation model for tissue differentiation during fracture healing: analysis of gap size and loading.  
J Biomech **35**(9): 1163-71
- LANE, N. E., SANCHEZ, S., MODIN, G. W., GENANT, H. K., PIERINI, E., ARNAUD, C. D. (1998)  
Parathyroid hormone treatment can reverse corticosteroid-induced osteoporosis. Results of a randomized controlled clinical trial.  
J Clin Invest **102**(8): 1627-33
- LANGE, M., PHILIPP, A., FINK, U., OECKLER, R. (2000)  
Anterior cervical spine fusion using RABEA-Titan-Cages avoiding iliac crest spongiosa: first experiences and results.  
Neurol Neurochir Pol **34**(6 Suppl): 64-9
- LANGHOFF, M., FABER, KAESTNER, GUIBERT, ZLINSZKY, AUER, VON RECHENBERG (2008)  
Does surface anodisation of titanium implants change osseointegration and make their extraction from bone any easier?  
VCOT - Veterinary and Comparative Orthopaedics and Traumatology
- LE GUEHENNEC, L., GOYENVALLE, E., AGUADO, E., PILET, P., BAGOT D'ARC, M., BILBAN, M., SPAETHE, R., DACULSI, G. (2005)  
MBCP biphasic calcium phosphate granules and tissucol fibrin sealant in rabbit femoral defects: the effect of fibrin on bone ingrowth.  
J Mater Sci Mater Med **16**(1): 29-35

- LIEBICH, H.-G. (1999)  
Funktionelle Histologie der Haussäugetiere: Lehrbuch und Farbatlas für Studium und Praxis. - 3., neubearb. und erw. Aufl. - Stuttgart; New York: Schattauer Verlag, ISBN 3-7945-1899-3
- LIENAU, J., SCHELL, H., DUDA, G. N., SEEBECK, P., MUCHOW, S., BAIL, H. J. (2005)  
Initial vascularization and tissue differentiation are influenced by fixation stability.  
J Orthop Res **23**(3): 639-45
- LINDSAY, R., NIEVES, J., FORMICA, C., HENNEMAN, E., WOELFERT, L., SHEN, V., DEMPSTER, D., COSMAN, F. (1997)  
Randomised controlled study of effect of parathyroid hormone on vertebral-bone mass and fracture incidence among postmenopausal women on oestrogen with osteoporosis.  
Lancet **350**(9077): 550-5
- LOBOA, E. G., BEAUPRE, G. S., CARTER, D. R. (2001)  
Mechanobiology of initial pseudarthrosis formation with oblique fractures.  
J Orthop Res **19**(6): 1067-72
- LOEFFLER, K. (2002)  
Anatomie und Physiologie der Haustiere. - 10., aktualisierte und korrigierte Auflage.  
Verlag Eugen Ulmer Stuttgart, ISBN 3-8252-0013-2
- M:**
- MARCHESI, D. G. (2000)  
Spinal fusions: bone and bone substitutes.  
Eur Spine J **9**(5): 372-8
- MARK, S., SCHENSE J., ARRIGHI ET AL. (2007)  
Enhancement of bone healing by locally delivered parathyroid hormone fusion peptide in a diaphyseal defect in the sheep tibia.  
Paper 53rd, Poster No:14452007
- MCAFEE, P. C., REGAN, J. J., FAREY, I. D., GURR, K. R. WARDEN, K. E. (1988)  
The biomechanical and histomorphometric properties of anterior lumbar fusions: a canine model.  
J Spinal Disord **1**(2): 101-10
- MEURER, D. G., Wolf, S. (2007)  
Allgemeine Pathologie, Kompendium für die Veterinärmedizin. - 2. neu bearb. u. erw. Aufl. - Stuttgart, Schattauer Verlag, ISBN: 3-7945-2459-4
- MICHEL, H., HOLM, ZILKENS (1980)  
Penetration of Corrosion Products of Stainless Steel Implants into Surrounding Tissue.  
Z Orthop Ihre Grenzgeb **118**:793-803
- MILACHOWSKI, K., SAUER, W., WIRTH, C. J., KRIEGEL, H., ERHARDT, W. (1986)  
The Ingrowth Quota of Autologous Spongiosa from Different Points of Removal-Experimental Study in Sheep  
Res Exp Med **186**: 93-102

MOORE, R. J., FRASER, R. D., VERNON-ROBERTS, B., FINNIE, J. W., BLUMBERGS, P. C., HAYNES, D. R., HUTCHENS, M. J., WALTERS, R. M., KAMAT, A. S., KOSZYCA, B. (2002)

The biologic response to particles from a lumbar disc prosthesis.  
Spine (Phila Pa 1976) **27**(19): 2088-94

**N:**

NEER, R. M., ARNAUD, C. D., ZANCHETTA, J. R., PRINCE, R., GAICH, G. A., REGINSTER, J. Y., HODSMAN, A. B., ERIKSEN, E. F., ISH-SHALOM, S., GENANT, H. K., WANG, O., MITLAK, B. H. (2001)

Effect of parathyroid hormone (1-34) on fractures and bone mineral density in postmenopausal women with osteoporosis.  
N Engl J Med **344**(19): 1434-41

NIBU, K., PANJABI, M. M., OXLAND, T., CHOLEWICKI, J. (1997)

Multidirectional stabilizing potential of BAK interbody spinal fusion system for anterior surgery.  
J Spinal Disord **10**(4): 357-62

NICKEL, R., SCHUMMER, A., SEIFERLE, E. (1999)

Lehrbuch der Anatomie der Haustiere, Band I: Bewegungsapparat.  
8., vollst. Neubearb. Aufl., ISBN: 3-8263-3179-6  
Berlin, Paul Parey Verlag

NIZARD, M. (1981)

Knochengewebsneubildung durch Collagen-Apatit-Implantation: tierexperimentelle, histopathologische Untersuchungen und klinische Erfahrungen.  
Dissertation, orthopädische Universitätsklinik und Poliklinik.  
Saarbrücken, Homburg, Saarland: 90

**O:**

O'LOUGHLIN, P. F., CUNNINGHAM, M. E., BUKATA, S. V., TOMIN, E., POYNTON, A. R., DOTY, S. B., SAMA, A. A., LANE, J. M. (2009)

Parathyroid hormone (1-34) augments spinal fusion, fusion mass volume, and fusion mass quality in a rabbit spinal fusion model.  
Spine **34**(2): 121-30

**P:**

PARK, D. K., AN, H. S. (2009)

Problems related to cervical fusion: malalignment and nonunion.  
Instr Course Lect **58**: 737-45

PETERS, A. (2007)

Einfluss autologer pluripotenter mesenchymaler Stammzellen auf die Knochenheilung im Modell der atrophischen Pseudarthrose der Ratte unter Berücksichtigung der periostalen Rekonstruktion.  
Dissertation, Fachbereich Veterinärmedizin, Berlin, Freie Universität

POOLE, K. E., REEVE, J. (2005)

Parathyroid hormone - a bone anabolic and catabolic agent.  
Curr Opin Pharmacol **5**(6): 612-7

POU, A. M. (2003)

Update on new biomaterials and their use in reconstructive surgery.  
Curr Opin Otolaryngol Head Neck Surg **11**(4): 240-4

**R:**

RAPOFF, A. J., GHANAYEM, A. J. ZDEBLICK, T. A. (1997)

Biomechanical comparison of posterior lumbar interbody fusion cages.  
Spine **22**(20): 2375-9

REEVE, J., BRADBEER, J. N., ARLOT, M., DAVIES, U. M., GREEN, J. R., HAMPTON, L.,  
EDOUARD, C., HESP, R., HULME, P., ASHBY, J. P. ET AL. (1991)

hPTH 1-34 treatment of osteoporosis with added hormone replacement therapy:  
biochemical, kinetic and histological responses.  
Osteoporos Int **1**(3): 162-70

ROBINSON, R., SMITH, G. (1955)

Antero-lateral cervical disc removal and interbody fusion for cervical disc syndrome.  
Bull John Hopkins Hosp

ROBINSON, R. A., SOUTHWICK, W. O. (1960)

Indications and technics for early stabilization of the neck in some fracture  
dislocations of the cervical spine  
South Med J **53**: 565-79

ROBINSON, R. A. (1963)

The problem of neck pain: its alleviation by anterior removal of intervertebral disc with  
interbody fusion in the cervical spine.  
J Med Assoc State Ala **33**: 1-14

ROBINSON, R. A. (1964)

Anterior and posterior cervical spine fusions.  
Clin Orthop Relat Res **35**: 34-62

ROBINSON, R. A., WIECKING, D. K., WALKER, A. E., FERLIC, D. C. (1962)

The results of anterior interbody fusion of the cervical spine.  
J Bone Joint Surg Am

ROBINSON, Y., TSCHOEKE, S. K., FINKE, T., KAYSER, R., ERTEL, W., HEYDE, C. E.  
(2008)

Successful treatment of spondylodiscitis using titanium cages: a 3-year follow-up of  
22 consecutive patients.  
Acta Orthop **79**(5): 660-4

ROESGEN, M. (1989)

Verfahrensweisen der freien autogenen Spongiosaplastik.  
Aktuelle Chirurgie: 83-95

**S:**

SAKIYAMA-ELBERT, P., HUBBELL (2001)

Development of growth factor fusion proteins for cell-triggered drug delivery.  
FASEB J.

- SANDHU, H. S., BODEN, S. D. (1998)  
Biologic enhancement of spinal fusion.  
Orthop Clin North Am **29**(4): 621-31
- SAUR, K., DAMBE, L. T., SCHWEIBERER, L. (1978)  
[Experimental studies of autograft with cancellous bone in the diaphysis of long bone (author's transl)].  
Arch Orthop Trauma Surg **92**(2-3): 211-9
- SAVOLAINEN, S., USENIUS, J. P., HERNESNIEMI, J. (1994)  
Iliac crest versus artificial bone grafts in 250 cervical fusions.  
Acta Neurochir (Wien) **129**(1-2): 54-7
- SCHELL, H., LIENAU, J., EPARI, D. R., SEEBECK, P., EXNER, C., MUCHOW, S., BRAGULLA, H., HAAS, N. P., DUDA, G. N. (2006)  
Osteoclastic activity begins early and increases over the course of bone healing.  
Bone **38**(4): 547-54
- SCHENK, W. (1977)  
Histology of primary bone healing: modifications and limits of recovery of gaps in relation to extent of the defect.  
Unfallheilkunde **80**(5):155-160
- SCHENSE, J. C., HUBBELL, J. A. (1999)  
Cross-linking exogenous bifunctional peptides into fibrin gels with factor XIIIa.  
Bioconjug Chem **10**(1): 75-81
- SCHIEDT, E. (1955)  
Beitrag zur Ossifikation der Wirbelsäule.  
Langenbeck's Archives of Surgery **280**: 241-260
- SCHIEKER, M., MUTSCHLER, W. (2006)  
[Bridging posttraumatic bony defects. Established and new methods].  
Unfallchirurg **109**(9): 715-32
- SCHMELZ, A., KINZL, L., EINSIEDEL, T. (2007)  
[Osteitis. Infections of the locomotive system].  
Unfallchirurg **110**(12): 1039-58
- SCHMOEKEL, H. G., WEBER, F. E., HURTER, K., SCHENSE, J. C., SEILER, G., RYZZ, U., SPRENG, D., SCHAWALDER, P. HUBBELL, J. (2005)  
Enhancement of bone healing using non-glycosylated rhBMP-2 released from a fibrin matrix in dogs and cats.  
J Small Anim Pract **46**(1): 17-21
- SCHRAVEN, JANNA (2006)  
Biokompatibilität eines neuartigen Knochenklebstoffes im Großtiermodell.  
Dissertation, Fachbereich Medizin, Justus-Liebig-Universität Gießen
- SCHORLEMMER, S., GOHL, C., IWABU, S., IGNATIUS, A., CLAES, L., AUGAT, P. (2003)  
Glucocorticoid treatment of ovariectomized sheep affects mineral density, structure, and mechanical properties of cancellous bone.  
J Bone Miner Res **18**(11): 2010-5

- SCHRÖDER, J., SCHUL, C., HASSELBLATT, M., WASSMANN, H. (2007)  
Bony fusion through an empty cervical disc interspace implant.  
Zentralbl Neurochir **68**(3): 139-41
- SEEBAUER, C. J., VAN SCHERPENZEEL, K. M., HAAS, N. P., BAIL, H. J. (2009)  
Tibia fracture following removal of the ETN((R)) (Expert Tibia Nail): a case report.  
Arch Orthop Trauma Surg
- SHIMAMURA, Y., HOLDING, C., HAYNES, D. R., VERNON-ROBERTS, B., BLUMBERGS, P. C., FRASER, R. D., MOORE, R. J. (2008)  
The biologic response to particles from a potential disc prosthesis material.  
Spine **33**(4): 351-5
- SLOVIK, D. M., ROSENTHAL, D. I., DOPPELT, S. H., POTTS, J. T., JR., DALY, M. A., CAMPBELL, J. A., NEER, R. M. (1986)  
Restoration of spinal bone in osteoporotic men by treatment with human parathyroid hormone (1-34) and 1,25-dihydroxyvitamin D.  
J Bone Miner Res **1**(4): 377-81
- STÜNZI, H., Weiss, E. (Hrsg.), (1990)  
Allgemeine Pathologie für Tierärzte und Studierende der Tiermedizin  
(begründet von Walter Frei), 8. Auflage.  
Berlin, Hamburg, Paul Parey Verlag
- SUTHERLAND, B. (2005)  
Bone Regeneration and Repair, Biology and Clinical Applications Graft and bone graft substitutes.  
Humana Press
- T:**
- TOTH, J. M., WANG, M., SCIFERT, J. L., CORNWALL, G. B., ESTES, B. T., SEIM, H. B., 3RD TURNER, A. S. (2002)  
Evaluation of 70/30 D,L-PLA for use as a resorbable interbody fusion cage.  
Orthopedics **25**(10 Suppl): s1131-40
- W:**
- WEINER, B. K., FRASER, R. D. (1998)  
Spine update lumbar interbody cages.  
Spine **23**(5): 634-40
- WENISCH, S., STAHL, J. P., HORAS, U., HEISS, C., KILIAN, O., TRINKAUS, K., HILD, A., SCHNETTLER, R. (2003)  
In vivo mechanisms of hydroxyapatite ceramic degradation by osteoclasts: fine structural microscopy.  
J Biomed Mater Res A **67**(3): 713-8
- WHANG, P. G., WANG, J. C. (2003)  
Bone graft substitutes for spinal fusion.  
Spine J **3**(2): 155-65
- WHITFIELD (2003)  
How to grow bone to treat osteoporosis and mend fractures.  
Curr Osteoporos Rep.: 32-40

- WILKE, H. J., KETTLER, A., CLAES, L. E. (1997 a)  
Are sheep spines a valid biomechanical model for human spines?  
Spine **22**(20): 2365-74
- WILKE, H. J., KETTLER, A., WENGER, K. H. CLAES, L. E. (1997 b)  
Anatomy of the sheep spine and its comparison to the human spine.  
Anat Rec **247**(4): 542-55
- WISSING, H., Stürmer, K. M., BREIDENSTEIN, G. (1990)  
Wertigkeit verschiedener Versuchstierspezies für experimentelle Untersuchungen am  
Knochen.  
Heft Unfallheilkunde **212**: 479-488
- WOLFF, J. (1892)  
Das Gesetz der Transformation der Knochen.  
Berlin, Verlag von August Hirschwald
- WRIGHT, C. D., VEDI, S., GARRAHAN, N. J., STANTON, M., DUFFY, S. W., COMPSTON,  
J. E. (1992)  
Combined inter-observer and inter-method variation in bone histomorphometry.  
Bone **13**(3): 205-8

## 10. DANKSAGUNG

Dr. med. Robert Pflugmacher möchte ich dafür danken, dass er mir dieses überaus interessante Thema überließ. Dank der fachkundigen Betreuung und der mir zuteil gewordenen finanziellen Unterstützung war es mir möglich mich der Dissertation intensiv zu widmen.

Ein herzliches Dankeschön an Univ.-Prof. Dr. R. Rudolph für die Übernahme der Betreuung meiner Dissertation.

Herrn Univ.-Prof. Dr.-Ing. G.N. Duda möchte ich dafür danken, dass er mir zur Durchführung des Projekts die Nutzung der Labore und Räumlichkeiten des Julius- Wolff- Instituts ermöglichte.

Bei den Mitarbeitern des Forschungslabors möchte ich mich für die Unterstützung bei der Durchführung der Laborarbeit bedanken. Mein besonderer Dank gilt Silke Kappler und Gabriela Korus.

Bei Mario Thiele möchte ich mich für seine Geduld und die Erstellung der Makros bedanken.

Dipl. Biomath. Anja Lüdecke aus dem Institut für Biometrie und Informationsverarbeitung des Fachbereichs Veterinärmedizin, danke ich für die statistische Betreuung dieser Arbeit.

Anne- Marie Pobloth danke ich für die gewissenhafte Durchführung der Operationen und des Projektablaufs.

Weiterhin möchte ich mich bei meinen Mitdoktoranden für die freundschaftliche Unterstützung bedanken. Mein besonderer Dank gilt Christine Hanke und Cornelia Nestel.

Friederike Bieler danke ich für die Durchsicht meines Manuskripts, Motivation und Unterstützung.

Meinem Lebensgefährten Andreas Charell danke ich für die Liebe, Motivation und Hilfe bei der endgültigen Formatierung zur Drucklegung.

Meiner Familie danke ich für Ihre Liebe und Unterstützung.

## **11. SELBSTÄNDIGKEITSERKLÄRUNG**

Hiermit bestätige ich, dass ich die vorliegende Dissertation selbstständig und ohne Hilfe Dritter angefertigt habe. Sie stellt auch in Teilen keine Kopie anderer Arbeiten dar. Ich versichere, dass ich ausschließlich die hier angegebenen Quellen, Hilfsmittel und Literaturstellen verwendet habe.

Berlin, den 05. November 2010

Sonja Dettmann