

Aus dem
Centrum für Muskuloskeletale Chirurgie
Charité – Universitätsmedizin Berlin
Freie und Humboldt Universität Berlin

ingereicht über das
Institut für Veterinär-Anatomie
des Fachbereiches Veterinärmedizin
der Freien Universität Berlin

Histologische Evaluation eines biodegradierbaren Implantats zur Spondylodese der Halswirbelsäule

(Eine tierexperimentelle Studie im Schafsmodell)

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

vorgelegt von

Tanja Eindorf
Tierärztin aus Berlin

Berlin 2005

Journalnummer: 2889

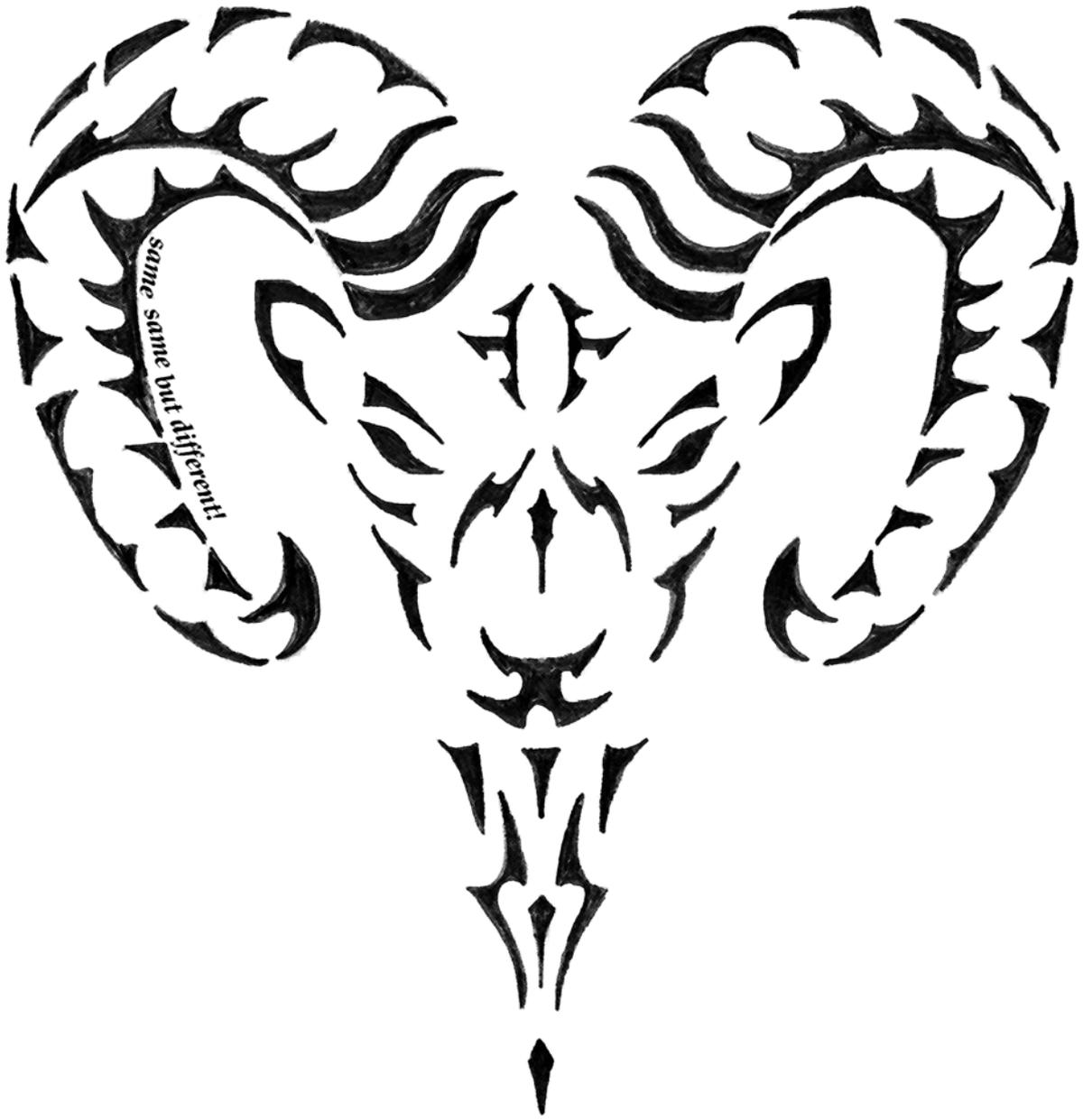
Gedruckt mit Genehmigung
des Fachbereiches Veterinärmedizin
der Freien Universität Berlin

Dekan: Univ.-Prof. Dr. L. Brunnberg
Erster Gutachter: apl.-Prof. Dr. H. Bragulla
Zweiter Gutachter: Prof. Dr. G. Duda
Dritter Gutachter: Univ.-Prof. Dr. L. Brunnberg

Descriptorien: animal model, autologous iliac crest bone graft, bioresorbable, cage, cervical spine, histology, interbody fusion, PLDLLA, poly-lactide, sheep, spinal fusion, spondylodesis

Tag der Promotion: 04. März 2005

Meinen Eltern gewidmet



Abkürzungsverzeichnis.....	III
Abbildungsverzeichnis.....	VI
1. Einleitung.....	1
2. Stand des Wissens.....	3
2.1 Aufbau des Wirbelknochens	3
2.1.1 <i>Aufbau des Knochengewebes</i>	3
2.2 Anteriore intervertebrale Spondylodese der Halswirbelsäule.....	17
2.2.1 <i>Indikationen und Technik</i>	17
2.2.2 <i>Wirbelkörperinterponate</i>	18
2.3 Biodegradierbare Materialien.....	23
2.3.1 <i>Allgemein</i>	23
2.3.2 <i>Polylaktid</i>	25
2.3.3 <i>Biodegradierbare Cages</i>	26
2.4 Beurteilung der Spondylodese	28
2.5 Zusammenfassung des Wissenstandes und Ziele der Untersuchung	30
3. Material und Methoden.....	31
3.1 Wahl des Modells.....	31
3.2 Versuchsaufbau	32
3.2.1 <i>Versuchsgruppen</i>	32
3.2.2 <i>Implantate</i>	33
3.2.3 <i>Operation</i>	34
3.3 Probenentnahme und Aufbereitung der Halswirbelsäule.....	40
3.3.1 <i>Euthanasie und Entnahme des Halswirbelsegmentes</i>	40
3.3.2 <i>Präparation</i>	40
3.3.3 <i>Sägen</i>	42
3.3.4 <i>Fixation und Einbetten</i>	44
3.3.5 <i>Anfertigung der histologischen Präparate</i>	45
3.3.6 <i>Histologische Färbungen</i>	45
3.4 Histologische Auswertung	46
3.4.1 <i>Semiquantitative Methode</i>	46
3.4.2 <i>Quantitative Methode</i>	50
3.5 Statistik.....	55
4. Ergebnisse	57
4.1 Operationsbefunde	57

4.2	Histomorphologische semiquantitative Ergebnisse	57
4.3	Histomorphometrische Ergebnisse.....	75
4.4	Zusammenfassung der Ergebnisse	80
5.	Diskussion	82
5.1	Tiermodell	83
5.2	Operation und postoperativer Beobachtungszeitraum	85
5.3	Herstellung der Präparate	86
5.4	Anmerkung zu den Analysemethoden	86
5.4.1	<i>Histomorphologie</i>	86
5.4.2	<i>Histomorphometrie</i>	86
5.5	Diskussion der Ergebnisse	88
5.5.1	<i>Einfluss des Implantats</i>	88
5.5.2	<i>Beckenkammspan</i>	88
5.5.3	<i>PLDLLA-Cage</i>	90
5.5.4	<i>Beckenkammspan vs. PLDLLA-Cage</i>	96
5.5.5	<i>Vergleich der Analysemethoden</i>	99
5.6	Schlussfolgerung und klinische Relevanz.....	100
6.	Zusammenfassung.....	102
7.	Summary	103
8.	Literatur	104
9.	Anhang	123
10.	Danksagung.....	128
11.	Lebenslauf.....	130
12.	Eidesstattliche Versicherung.....	131

Abkürzungsverzeichnis

A./Aa.	Arteria/Arteriae
Abb.	Abbildung
aDSH	average disc space hight, durchschnittliche präoperative Bandscheibenraumhöhe
Anm.	Anmerkung
ant.	anterior; Nomina anatomica, deutsch: vordere
bes.	besonders
BG.	Bindegewebe
BMP	bone morphogenetic protein
BOP	biocompatible osteoconductive polymer
bzw.	beziehungsweise
C	Celsius
ca.	circa
cm	Zentimeter
CT	Computertomographie
d. h.	das heißt
et al.	und Mitarbeiter
evtl.	eventuell
Fa.	Firma
FKR	Fremdkörperreaktion
g	Gramm
ges.	gesamt
h	Stunde
IL	Interleukin
i. m.	intramuskulär
i. v.	intravenös
IVR	Intervertebralraum
KCl	Kaliumchlorid
kg	Kilogramm
Km	Körpermasse
l	Liter
Lig./Ligg.	Ligamentum/Ligamenta
M./Mm.	Musculus/Musculi

Max	Maximum
Min	Minimum
min	Minuten
min.	mineralisiert
ml	Milliliter
mg	Milligramm
mm	Millimeter
mm ²	Quadratmillimeter
µm	Mikrometer
NaCl	Natriumchlorid
o. g.	obengenannte
PEEK	Poly-Ethyl-Ether-Keton
PGA	Polyglycolid
PGE	Prostaglandin
PLA	Polylaktid
PLLA	Poly-(L)-laktid
PDLLA	Poly-(DL)-laktid
PLDLLA	Poly-(L,DL)-laktid
PMMA	Polymethylmethacrylat
ROI	region of interest
S	Baseline
s. c.	subkutan
sog.	sogenannt
s. u.	siehe unten
Tab.	Tabelle
TNF	Tumor-Nekrose-Faktor
u. a.	unter anderem
V./Vv.	Vena/Venae
v. a.	vor allem
vs.	Versus
ventr.	ventral; Nomina anatomica veterinaria (1994), vorn, bauchwärts
W.	Woche
z. B.	zum Beispiel
z. T.	zum Teil

°	Grad
%	Prozent
Ø	Durchmesser

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Osteoidsynthetisierende Osteoblasten	5
Abb. 2: Polynukleärer Osteoklast in der Howshipschen Lakune	5
Abb. 3: Aufbau von Lamellenknochen	8
Abb. 4: Schafshalswirbelsäule; Medianschnitt durch ein Nativpräparat	10
Abb. 5: Anatomische Zeichnung einer nativen Schafshalswirbelsäule	11
Abb. 6: Halswirbelsäulensegment C 3 / C 4, anatomische Strukturen:	12
Abb. 7: Histologisches Präparat des Segment C 3 / C 4; Safranin - Orange / Lichtgrün.....	14
Abb. 8: Ausschnitt aus einer Wirbelendplatte Übergangsbereich zwischen Wirbelkörper- knochen und faserknorpeligem Bandscheibengewebe	14
Abb. 9: Schematische Darstellung von Diskopathien.....	18
Abb. 10 a u. b: Beispiele für metallische Cages: Harms – Cage [®] , Syncage – C [®]	21
Abb. 11: Polylaktid; chemische Strukturformel.....	25
Abb. 12 a u. b: Die verwendeten Implantate: 70/30-PLDLLA-Cage, autologer trikortikaler Beckenkammspan.....	33
Abb. 13: PLDLLA-Cage mit Spongiosaaugmentation	35
Abb. 14: Darstellung des Musculus sternocleidomastoideus	37
Abb. 15: Mobilisierung des Musculus sternocleidomastoideus und seine Retrahierung.....	37
Abb. 16: Darstellung des M. longus colli und des Intervertebralarraums C 3 / 4.....	38
Abb. 17: Darstellung und Diskektomie der Bandscheibe	38
Abb. 18: Implantierter PLDLLA-Cage im Bandscheibenfach C 3 / C 4	39
Abb. 19: Ventrale Stabilisierung der Implantation mittels Dreilochdrittelrohrplatte	39
Abb. 20: Präparierte Halswirbelsäule	41
Abb. 21: Halswirbelsäulensegment C 2 – C 5, ventrale Ansicht	41
Abb. 22: Sägeschema, ventrale Ansicht. Schematische Darstellung der sagittalen Schnitt- führung am Bewegungssegment C 3 / C 4	42
Abb. 23: Sägeschema; schematische Darstellung der Schnittführung, Ansicht von kranial ...	43
Abb. 24: Sägepräparat zur Herstellung der histologischen Präparate.....	43
Abb. 25: Darstellung der bewerteten Deformationsstadien des Cages.....	52
Abb. 26: Seitliche radiologische Aufnahme des Wirbelsegmentes; Schematische Darstellung der Ermittlung der durchschnittlichen präoperativen Bandscheibenraumhöhe	53
Abb. 27: Schematische Darstellung der Konstruktion der Region Of Interest (ROI) im histologischen Präparat, C 3 / C 4, Trichromfärbung nach Masson und Goldner	53
Abb. 28: Beispiel für die Konstruktion der Region Of Interest	54

Abb. 29: Markierung des mineralisierten Gewebes in der Region Of Interest	54
Abb. 30: Darstellung eines Boxplots und dessen Interpretation	56
Abb. 31: Histologisches Präparat mit Markierung relevanter Knochendefektzonen.....	58
Abb. 32: Defektzonenvermessung und Implantatmigration im histologischen Präparat.....	60
Abb. 33: PLDLLA-Cagegruppe, 12 Wochen; Pseudarthrose	62
Abb. 34: PLDLLA-Cagegruppe, 12 Wochen, 50fache Vergrößerung; Pseudarthrose.....	62
Abb. 35: Beckenkammspanngruppe, 36 Wochen; knöcherne Integration des autologen Beckenkammspanns	63
Abb. 36: Beckenkammspanngruppe, 36 Wochen, 50fache Vergrößerung; Transplantatintegration.....	63
Abb. 37: PLDLLA-Cagegruppe, 36 Wochen; Pseudarthrose.....	64
Abb. 38: Beckenkammspanngruppe, 36 Wochen; Pseudarthrose.....	64
Abb. 39: PLDLLA-Cagegruppe, 12 Wochen; starke Fremdkörperreaktionen	67
Abb. 40: PLDLLA-Cagegruppe, 12 Wochen, 1000fache Vergrößerung; Plasmazellen, freie Erythrozyten, Fibroblasten, Lymphozyten, retikuläres Bindegewebe	67
Abb. 41: PLDLLA-Cagegruppe, 12 Wochen, 400fache Vergrößerung; Fremdkörperriesenzellen, stark vaskularisiertes Bindegewebe.....	68
Abb. 42: PLDLLA-Cagegruppe, 12 Wochen, 1000fache Vergrößerung; Plasmazellen, kollagenfaseriges, blutgefäßführendes Bindegewebe.....	68
Abb. 43: PLDLLA-Cagegruppe, 12 Wochen, 1000fache Vergrößerung; Osteoklasten im Knochengewebe	69
Abb. 44: PLDLLA-Cagegruppe, 12 Wochen, 400fache Vergrößerung; Osteoblasten an einem Knochenbälkchen.....	69
Abb. 45: a) PLDLLA-Cagegruppe, 36 Wochen, b) Beckenkammspanngruppe, 36 Wochen; ventraler Kallus	72
Abb. 46: Prozentualer Anteil der Knochenfläche an der Fläche der ROI.....	76
Abb. 47: Prozentualer Anteil der Knorpelfläche an der Fläche der ROI	77
Abb. 48: Prozentualer Anteil der mineralisierten Knorpelfläche an der gesamten Knorpelfläche	79
Abb. 49: Schematische Darstellung des Auslösemechanismus von Fremdkörperreaktionen im Zusammenhang mit dem verwendeten PLDLLA-Implantat.....	95

9. Anhang

Protokoll 1: Färbeprotokoll Safranin-Orange / von Kossa für histologische Schnitte nach von Kossa (1901) in Romeis (1989).

- | | | |
|-----|---|----------------------|
| 1. | Entplasten von MMA (Methylmethacrylate)- Schnitten:
3 x 20 min in MEA (2-methoxyethylacetat) | |
| 2. | Schnitte zum Rehydrieren in absteigende Alkoholreihe geben:
2 x 100 % Alkohol
1 x 96 % Alkohol
1 x 80 % Alkohol
1 x 70 % Alkohol, | <i>jeweils 2 min</i> |
| 3. | Spülen in Aqua dest. | <i>kurz</i> |
| 4. | Färben in 3 %iger wässriger Silbernitratlösung im Dunkeln | <i>5 min</i> |
| 5. | 3 x Spülen in Aqua dest. | |
| 6. | Reduzieren in Natrium- Formaldehydlösung | <i>2 min</i> |
| 7. | Spülen in Leitungswasser | <i>10 min</i> |
| 8. | Fixieren in 5 % Natriumthiosulfatlösung | <i>5 min</i> |
| 9. | Spülen in Leitungswasser | <i>10 min</i> |
| 10. | Spülen in Aqua dest. | <i>kurz</i> |
| 11. | Färben mit Safranin Orange | <i>8 min</i> |
| 12. | Spülen in Aqua dest. | <i>kurz</i> |
| 13. | Entwässern in aufsteigender Alkoholreihe:
1 x 80 % Alkohol
1 x 96 % Alkohol
2 x 100 % Alkohol, | <i>jeweils kurz</i> |
| 14. | Entfetten in Xylol, Vorbereitung zur Eindeckung | <i>2 x 5min</i> |
| 15. | Eindecken mit Vitroclud und Deckgläschen | |

Protokoll 2: Färbeprotokoll: Trichrome-Färbung für histologische Schnitte nach Masson und Goldner (1938) in Romeis (1989).

1. Entplasten von MMA (Methylmethacrylate)- Schnitten:
3 x 20 min in MEA (2-methoxyethylacetat)
2. Schnitte zum Rehydrieren in absteigende Alkoholreihe geben:
2 x 100 % Alkohol
1 x 96 % Alkohol
1 x 80 % Alkohol
1 x 70 % Alkohol, *jeweils 2 min*
3. Kernfärbung mit Weigerts Eisenhämatoxylin *2-4 min*
4. Spülen in Leitungswasser *10 min*
5. Färben in Säurefuchsin- Ponceau *5 min*
6. Spülen in 1 %iger Essigsäure
7. Differenzieren in Phosphomolybdänsäure- Orange G
(bis das Bindegewebe vollständig entfärbt ist) *18- 20 min*
8. Spülen in 1 %iger Essigsäure
9. Gegenfärben mit Lichtgrün *10 min*
10. Spülen in 1 %iger Essigsäure *kurz*
11. Entwässern in aufsteigender Alkoholreihe:
1 x 80% Alkohol
1 x 96% Alkohol
2 x 100% Alkohol, *jeweils kurz*
12. Entfetten in Xylol *2 x 5 min*
13. Eindecken mit Vitroclud und Deckgläschen

Protokoll 3: Färbeprotokoll Safranin-Orange / Lichtgrün für histologische Schnitte nach Geitler 1949 in Romeis (1989).

- | | | |
|-----|--|----------------------|
| 1. | Entplasten von MMA (Methylmethacrylat)- Schnitten:
3 x 20 min in MEA (2-methoxyethylacetat) [Merck 806061] | |
| 2. | Schnitte zum Rehydrieren in absteigende Alkoholreihe geben:
2 x 100 % Alkohol
1 x 96 % Alkohol
1 x 80 %Alkohol
1 x 70 %Alkohol | <i>jeweils 2 min</i> |
| 3. | Spülen in Aqua dest | <i>kurz</i> |
| 4. | Färben in Safranin- Orange- | <i>8 - 10 min</i> |
| 5. | 3 x Spülen in Aqua dest. | <i>kurz</i> |
| 6. | Färben in Pikrinsäure | <i>10 min</i> |
| 7. | Spülen in Aqua dest. | <i>kurz</i> |
| 8. | Spülen in 1 % iger Essigsäure | <i>kurz</i> |
| 9. | Färben in Lichtgrünlösung | <i>8 - 10 min</i> |
| 10. | Spülen in 1 % iger Essigsäure | <i>kurz</i> |
| 11. | Entwässern in aufsteigender Alkoholreihe:
1 x 80 % Alkohol
1 x 96 % Alkohol
2 x 100 % Alkohol, | <i>jeweils kurz</i> |
| 12. | Entfetten in Xylol | <i>2 x 5 min</i> |
| 13. | Eindecken mit Vitroclud und Deckgläschen | |

Protokoll 4: Färbeprotokoll Astrablau für histologische Schnitte modifiziert nach Bail (2000), in Romeis (1989)

- | | | |
|-----|---|----------------------|
| 1. | Entplasten von MMA (Methylmethacrylate)- Schnitten:
3 x 20 min in MEA (2-methoxyethylacetat) | |
| 2. | Schnitte zum Rehydrieren in absteigende Alkoholreihe geben:
2 x 100 % Alkohol
1 x 96 % Alkohol
1 x 80 % Alkohol
1 x 70 % Alkohol, | <i>jeweils 2 min</i> |
| 3. | Spülen in Aqua dest. | <i>kurz</i> |
| 4. | Färben in 1 %iger Astrablau – Färbelösung | <i>8 min</i> |
| 5. | Spülen in 1 %iger Essigsäure | <i>kurz</i> |
| 6. | Spülen in Aqua dest. | <i>kurz</i> |
| 7. | Färben in Kernechtrot | <i>10 min</i> |
| 8. | Spülen in Aqua dest. | <i>kurz</i> |
| 9. | Entwässern in aufsteigender Alkoholreihe:
1 x 80 % Alkohol
1 x 96 % Alkohol
2 x 100 % Alkohol | <i>jeweils kurz</i> |
| 10. | Entfetten in Xylol | <i>2 x 5 min</i> |
| 11. | Eindecken mit Vitroclud und Deckgläschen | |

Tabelle 9: Darstellung der Signifikanzniveaus (p) des nichtparametrischen Mann-Whitney-Test

	U-Test p	U-Test p	U-Test p
PLDLLA-Cage 12 W.+ Beckenkammspan 12 W.	0,321	0,606	0,606
PLDLLA-Cage 36 W.+ Beckenkammspan 36.W.	0,236	0,743	0,059
PLDLLA-Cage 12 W. + PLDLLA-Cage 36 W.	0,297	0,796	0,113
Beckenkammspan 12 W. + Beckenkammspan 36 W.	0,065	0,645	0,01
PLDLLA-Cage 12 W.+ Beckenkammspan 36 W.	0,015	0,743	0,015
Beckenkammspan 12 W. + PLDLLA-Cage 36 W.	0,673	0,888	0,139
	Knochenfläche / Fläche der ROI [%]	Knorpelfläche ges. / Fläche d. ROI [%]	Mineralisierte Knorpelfläche / Knorpelfläche ges [%]

10. Danksagung

Herrn **PD Dr. med. F. Kandziora** als meinem wissenschaftlichen Betreuer möchte ich für die freundliche Überlassung des Themas und für seinen vielseitigen fachlichen Rat danken. Ich verdanke ihm hilfreiche Unterstützung, Motivation und inspirierende Gespräche.

Mein Dank gilt ebenso Herrn **Prof. Dr. Ing. G. Duda** in seiner Funktion als Gutachter für diese Arbeit. Letztlich schulde ich ihm Dank für die Schaffung eines freundlichen und kollegialen Arbeitsumfeldes, welches mich unter seiner Leitung das Forschen erleben lies.

Meinem Doktorvater, Herrn **Prof. Dr. med. vet. H. Bragulla**, danke ich herzlich für seine prompte und immer konstruktive Kritik bei der Durchsicht der Arbeit und die vielfältigen Anregungen, die zur Fertigstellung dieses Manuskriptes geführt haben. Auch für die Möglichkeit, die Arbeit extern anfertigen zu können möchte ich mich gerne bedanken.

Bei Herrn **Dr. med. R. Pflugmacher** möchte ich mich für die Durchführung der Operationen an den Schafen bedanken.

Den Kollegen aus den histologischen Laboren, Frau **G. Hardung**, Frau **M. Princ** und Frau **C. Bergmann** sei für die stete Diskussions- und Hilfsbereitschaft sowie ein jederzeit freundliches Arbeitsklima herzlichst gedankt.

Frau **G. Heymann** aus der Grafikabteilung danke ich hiermit für die Anfertigung der anatomischen Zeichnungen.

Mein Dank geht auch an Frau **K. Hornemann** aus dem Institut für Biometrie und Informationsverarbeitung vom Fachbereich Veterinärmedizin der FU Berlin für die aufopferungsvolle Hingabe der statistischen Aufarbeitung meiner Daten und die weitere Betreuung des statistischen Teils dieser Arbeit.

Nicht zuletzt will ich tiefsten Dank und aufrichtige Wertschätzung den zwei außerordentlichen Mitgliedern der **B₀N₀B₀-AG** zollen:

In Herrn **Christian Koch** habe ich über den langjährigen Freund und den „Bruder im Geiste“ hinaus einen schlagkräftigen Teamkollegen gefunden, dessen Humor und Freude an auch ausgefalleneren Diskussionsthemen ich nicht missen wollen würde.

Frau **Dr. med. vet. Hanna Schell** gebührt meine Dankbarkeit für jedweden Beistand und unvergessene Erläuterungen und Aufklärungen in Sachen Katalysatoren, Kinohelden und Klippan.

Schließlich gilt mein Dank auch meiner **Familie**, die mir ein passendes Rüstzeug mit auf den Abschnitt des Weges gab, der mit dieser Zeile endet.

- DANKE -

11. Lebenslauf

PERSÖNLICHE ANGABEN

Name Eindorf
Vorname Tanja
Geburtsdatum 30.03.1977
Geburtsort Berlin

SCHULISCHE AUSBILDUNG

1981 - 1985 Renée Sintenis Grundschule Berlin
1985 - 1996 Gabriele von Bülow Gymnasium Berlin

UNIVERSITÄRE AUSBILDUNG

1996 – 2002 Studium an der Freien Universität Berlin
(Abschluss des dritten Teils der Tierärztlichen Prüfung am 13.03.2002)

2000 – 2002 Studienbegleitende Praktika:

St. Francis Veterinary Clinic, Cape Town, *South Africa*

Ulladulla Veterinary Clinic, Ulladulla, New South Wales, *Australia*

Fleischuntersuchungsamt Relzow, *Mecklenburg-Vorpommern*

04/2002 Approbation

BERUFSERFAHRUNG

seit 04/2002 Wissenschaftliche Mitarbeiterin in dem Centrum für Muskuloskeletale Chirurgie Charité – Universitätsmedizin Berlin Freie und Humboldt Universität Berlin, Beginn der Promotion

12. Eidesstattliche Versicherung

Die vorgelegte Arbeit ist ohne unzulässige Hilfe Dritter von mir selbst verfasst worden und stellt – auch in Anteilen – keine Kopie anderer Arbeiten dar. Verwendete Hilfsmittel und Literatur sind vollständig angegeben.

Berlin, den 31. Dezember 2004

Tanja Eindorf