

Aus dem Centrum für Muskuloskeletale Chirurgie
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

**Osteointegration eines biodegradierbaren Implantates zur Spondylodese:
eine histologische und histomorphometrische Analyse im Tiermodell.**

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Antje Schulz

aus Berlin

Gutachter: 1. Prof. Dr.-Ing. G. Duda

2. PD Dr. med. S. Kroppenstedt

3. Prof. Dr. med. T. Mittlmeier

Datum der Promotion: 22.02.2008

Meinen Lehrern in tiefer Dankbarkeit gewidmet.

Zusammenfassung

Für die zervikale ventrale Spondylodese gilt der autologe trikortikale Beckenkammspann bis heute als „gold standard“. Aufgrund seiner Nachteile, wie zum Beispiel einer hohen Entnahmemorbidity, finden seit vielen Jahren auch alternativ allogene Implantate ihre Anwendung. Jedoch weisen auch diese Nachteile auf. So kann die Artefaktbildung in radiologischen Untersuchungen eine Evaluation der Fusion oder die Erkennung von Tumorrezidiven erschweren. Daher werden ständig neue Materialien auf ihre Einsatzmöglichkeiten in der Wirbelsäulenchirurgie untersucht. Biodegradierbare Implantate sind hingegen strahlendurchlässig, was Artefakte in der radiologischen Diagnostik vermindert. Ein weiterer Vorteil ist ihrer biologische Abbaubarkeit, sodass sie keine Dauerimplantate darstellen. Die vorliegende tierexperimentelle Arbeit beschreibt und quantifiziert auf histologischer Ebene die Integration eines biodegradierbaren Implantates für die zervikale Spondylodese der Schafswirbelsäule. Hierzu wurde bei 40 Schafen eine Diskektomie im Segment C3/4 durchgeführt, ein Resorbon[®]-Implantat wurde eingebracht und dessen Lage durch eine ventrale Verplattung gesichert. Die Tiere wurden in Gruppen zu n=8 aufgeteilt. Die Auswertung der Gruppen I und II erfolgte nach drei Monaten, wobei in der Gruppe II mit Wachstumsfaktoren beschichtete Implantate zum Einsatz kamen. Die Auswertung der weiteren Gruppen wurden nach 9, 12 und 24 Monaten (Gruppe III, IV und V) durchgeführt. Eine histomorphometrische und histomorphologische Evaluation erfolgte nach Aufarbeitung der Proben. In der Frühphase der Nachbeobachtung der Spondylodese konnten viel versprechende Ergebnisse hinsichtlich Stabilität, induzierte Entzündungs- und Fremdkörperreaktionen evaluiert werden. Das Material Resorbon[®] verursachte in diesem Zeitraum nur leichte Fremdkörperreaktionen und keine Osteolysen als Ausdruck einer temporär guten Biokompatibilität und offensichtlich hohen Primärstabilität. Dagegen verschlechterten sich die Ergebnisse im Bezug auf Biokompatibilität (Gewebequalität, Fremdkörperreaktion, Osteolysen) im weiteren Beobachtungszeitraum. Aufgrund der vorliegenden Ergebnisse kann geschlussfolgert werden, dass die für den klinischen Einsatz relevanten Materialeigenschaften wie Degradationskinetik-/ dynamik, Induktion inflammatorischer/ immunologischer Reaktionen und allgemeine Biokompatibilität noch weiterer Verbesserungen bedürfen. Daher kann auf Grundlage der vorliegenden Ergebnisse Resorbon[®] in der verwendeten Form als Implantat für die ventrale Spondylodese an der Schafshalswirbelsäule nur mit Zurückhaltung empfohlen werden.

1	Einleitung	7
1.1	Klinische Grundlagen der intervertebralen Spondylodese	7
1.2	Anatomische Grundlagen der unteren humanen Halswirbelsäule	8
1.3	Indikation und Häufigkeiten der zervikalen Spondylodese	9
1.4	Implantate zur zervikalen Spondylodese	10
1.5	Grundlagen zur Biodegradation von Implantaten	11
1.6	Das optimale Implantatdesign zur intervertebralen Spondylodese	13
1.7	Pathophysiologie der ossären intervertebralen Fusion	14
1.8	Stimulation durch Wachstumsfaktoren	15
2	Studienziel	17
3	Material und Methoden	18
3.1	Tiermodell und chirurgische Technik	18
3.1.1	Versuchstiere.....	18
3.1.2	Implantate	18
3.1.3	Gruppeneinteilung und Untersuchungszeiträume.....	20
3.1.4	Operationstechnik, präoperative Vorbereitung und Nachsorge	20
3.1.5	Tötung der Tiere, Präparation und Prozessierung der Wirbelsäulenpräparate.....	25
3.2	Quantitative und histomorphologische Analyse der intervertebralen Fusion	31
3.2.1	Auswertung	31
3.2.2	Statistik.....	37
4	Ergebnisse	38
4.1	Histomorphometrie	38
4.1.1	Prozentualer Anteil der Knochenfläche an der Gesamtfläche der ROI.....	38
4.1.2	Prozentualer Anteil der Knorpelfläche an der Gesamtfläche der ROI.....	39
4.1.3	Prozentualer Anteil der mineralisierten Knorpelfläche an der Gesamtknorpelfläche.....	40
4.2	Histomorphologie des Fusionsspalt	41
4.2.1	Intervertebrale Fusion	41
4.2.2	Gewebetypisierung im Fusionsspalt.....	42
4.2.3	Fremdkörperreaktion im Fusionsspalt.....	42

4.2.4	Vaskularisation im Fusionsspalt.....	43
4.2.5	Osteolysen der angrenzenden Wirbelkörper.....	43
4.2.6	Analyse der Implantatgeometrie im Verlauf.....	44
4.2.7	Analyse der ventralen Kallusstärke im Verlauf.....	44
4.2.8	Sonstiges.....	44
5	Diskussion.....	47
6	Schlussfolgerung.....	56
7	Anhang.....	58
8	Referenzen.....	61
9	Danksagung.....	66

1 Einleitung

1.1 Klinische Grundlagen der intervertebralen Spondylodese

Die Spondylodese ist eine operative Versteifung (Fusion) zweier oder mehrerer benachbarter Wirbelkörper. Ziel dieses Eingriffes ist es Fehlstellungen anatomisch zu reponieren, Einengungen des Spinalkanals zu beseitigen, die Stabilität verletzter Segmente wieder herzustellen und eine frühfunktionelle Behandlung zur Abkürzung der Rehabilitation zu ermöglichen [10].

Zur operativen Fusion haben sich verschiedene Vorgehensweisen etabliert [2]. So ist es möglich von ventral [21, 74], dorsal [3, 19, 49] oder auch kombiniert vorzugehen.

Der Vorteil des ventralen Zugangs besteht vor allem im guten und kontrollierbaren Zugang zu den Wirbelkörpern, durch die Präparation entlang der Halsorgane ist die Manipulation des zervikalen Myelons zum Erreichen dieser nicht nötig. Der dorsale Zugang zeichnet sich dagegen durch die gute Darstellbarkeit der Neuroforamina aus [10].

Beim ventralen Vorgehen werden nach Hautschnitt und entsprechender Präparation die Bandscheibe, vorhandene knöcherne Anbauten oder Fragmente entfernt. Ein vorbereitetes Implantat wird eingebracht und, wenn nötig, die Implantatlage durch eine ebenfalls ventrale Verplattung gesichert. Dieses Vorgehen, erstmals in den fünfziger Jahren von Smith und Robinson [74] und ähnlich auch von Cloward [21] publiziert, besitzt ein weites Indikationsspektrum [10, 33].

Beim dorsalen Vorgehen kann nach Hautschnitt über dem gewünschten Segment und Präparation durch die paravertebrale Nackenmuskulatur die Wirbelsäule von dorsal präpariert werden. Ist das Ziel des Eingriffes weiter ventral gelegen, erfolgt der anschließende Teil der Operation am Rückenmark vorbei. Ist eine Stabilisierung notwendig, erfolgt diese durch in die Wirbelkörper eingebrachte Schrauben und Verbindungsstangen.

1.2 Anatomische Grundlagen der unteren humanen Halswirbelsäule

Die untere Halswirbelsäule, bestehend aus den fast rechteckigen Halswirbelkörpern drei bis sieben, weist einen deutlich engeren, jedoch unterhalb von C3 im Durchmesser relativ konstanten, Spinalkanal auf. Ventral werden die Wirbelkörper durch das vordere, dorsal durch das hintere Längsband miteinander verbunden. Ein Teil der Bandscheiben, der Anulus fibrosus, ist neben den Endplatten der Wirbelkörper auch mit den Längsbändern fest verbunden.

Die Querfortsätze der Wirbelkörper, Processus transversi, enden mit einem Tuberculum anterius und mit einem Tuberculum posterius. Zwischen beiden liegt der Sulcus nervi spinalis für die entsprechenden Spinalnerven. In den Querfortsätzen befinden sich die Foramina transversaria welche vom sechsten bis zum ersten Halswirbel die Arteria vertebralis führen. Diese werden von einem Venengeflecht, der Vena vertebralis begleitet. Die sich dorsal des Spinalkanals befindlichen Processus spinosi des zweiten bis sechsten Halswirbels sind gegabelt, der des siebenten Halswirbels vertebra prominens ist nicht gespalten und länger als die übrigen Dornfortsätze der Halswirbelsäule, daher gut tastbar.

Ist der Spinalkanal zu mehr als 40% durch raumfordernde Prozesse jeglicher Art verlegt oder sein verbliebener Querschnitt geringer als 8mm, muss von einer Kompression des Myelons ausgegangen werden [90]. Eine Myelopathie ist die Folge. Im Rahmen der Myelopathie können sowohl die sensiblen, afferenten Bahnen, aber auch die motorischen efferenten Bahnen sowie die 2. Motoneurone betroffen sein. Die absteigenden Bahnen vermitteln die Motorik der distalen Extremitätenmuskeln. Die Feinmotorik wird über die Pyramidenbahnen und die Motorik der Rumpf- und proximalen Extremitätenmuskeln über die extrapyramidalen Bahnen vermittelt. In den absteigenden Bahnen verlaufen weiterhin die viszeroefferenten Fasern und Fasern des vegetativen Nervensystems. Die aufsteigenden Bahnen vermitteln neben epikritischer Sensibilität auch Temperatur-, Schmerzempfinden, Propriozeption und allgemeine Vizeoafferenzen.

Die Symptome einer Myelopathie sind daher vielfältig und abhängig vom Ort der Schädigung. Sie reichen von pathologischen Reflexen über Paresen, Sensibilitäts-, Blasen- und Mastdarmstörungen bis hin zur Tetraplegie. Sie können sich jedoch auch in Übelkeit, Schwindel oder Nackenschmerzen äußern [83], weshalb es zu Verwechslungen mit anderen Verursachern solcher Phänomene kommen kann. So werden zum Beispiel eher segmentbezogene Symptome der Myelopathie häufig mit radikulären Ursachen verwechselt

[90] und behandelt.

1.3 Indikation und Häufigkeiten der zervikalen Spondylodese

Eine Spondylodese ist zur Therapie von Instabilitäten der Wirbelsäule indiziert, unabhängig davon, ob sich die Instabilität mechanisch, zum Beispiel im Rahmen einer posttraumatisch fortschreitenden Kyphosierung, oder neurologisch, zum Beispiel durch die Folge einer Myelopathie äußert. Die Ätiologie der Instabilität ist für die Indikationsstellung ebenfalls von eher untergeordneter Bedeutung, hat jedoch Relevanz bezüglich der Wahl des Operationsverfahrens und einer eventuell begleitenden konservativen Therapie. Eine Instabilität der Wirbelsäule ist dabei definiert als deren Unfähigkeit unter physiologischen Belastungen ihr Gefüge ohne neurologisches Defizit, schwere Fehlstellungen oder invalidisierende Schmerzen aufrechtzuerhalten [54].

Die Ursachen einer Instabilität der Wirbelsäule, welche eine Spondylodese erfordern, sind vielfältig. Sie können zum Beispiel infolge von tumorösen Destruktionen, Degeneration, Wirbelsäulenoperationen (ventrale Bandscheibenoperationen) oder auch infolge eines Unfalles (Spalt- und Berstungsbrüche, verhakte Luxationsfrakturen sowie die diskoligamentären Instabilitäten [10]) auftreten. In beiden Fällen kann das Bewegungssegment instabil werden, was dann eine Spondylodese dieses Segmentes erforderlich macht. Auch degenerative Erkrankungen der Halswirbelsäule können aufgrund ihrer erheblichen Beschwerdesymptomatik eine Spondylodese erforderlich machen.

Zervikale Bandscheibenvorfälle machen nur etwa 30% der Bandscheibenerkrankungen aus, sind jedoch durch ihre Lage bzw. Beziehung zum Myelon von Relevanz. Im Jahr 2003 wurden 20.841 Patienten mit zervikalen Bandscheibenschäden in deutschen Krankenhäusern vollstationär behandelt. 71% (14.807) dieser Fälle traten bei Patienten zwischen dem 35. und 60. Lebensjahr auf [1]. Dabei sind 80% der Bandscheibenvorfälle in der unteren Halswirbelsäule lokalisiert [83]. Im selben Jahr wurden auch 4.696 Frakturen im Halsbereich in deutschen Krankenhäusern versorgt [1]. Auch hier ist das Durchschnittsalter sehr niedrig, wobei doppelt so häufig zwanzig bis dreißigjährige Menschen betroffen sind. In Analogie zu degenerativen Veränderungen sind auch beim Trauma der unteren Halswirbelsäule die Segmente C5/6 und C6/7 in mehr als der Hälfte der Fälle betroffen.

Bei den Ursachen für solche Verletzungen steht ein Hochrasanztrauma im Rahmen eines Verkehrsunfall mit 51% an erster Stelle, gefolgt von einem Fall aus großer Höhe in 25% und immerhin in 20% der Fälle ist ein banaler Sturz ursächlich. Vier Prozent erhalten ihre

Verletzungen durch Gewalteinwirkung Dritter und bei einem Prozent lässt sich kein Unfall eruieren [33].

Aber auch Instabilitäten durch Infektionen wie zum Beispiel Spondylitiden bzw. Spondylodiszitiden oder Veränderungen der Halswirbelsäule durch maligne Erkrankungen können eine operative Spondylodese nötig machen [53, 70]. Der Anteil der Osteomyelitiden der Wirbelsäule an allen Osteomyelitiden, die 2003 stationär behandelt wurden (12.438 Fällen) [1], beträgt etwa zwei bis sieben Prozent. Die Halswirbelsäule betrifft dies in etwa drei bis sechs Prozent [53].

1.4 Implantate zur zervikalen Spondylodese

Um eine gute knöcherne Fusion der betroffenen Wirbelkörper zu erreichen, ist die vollständige Entfernung der nativen Bandscheibe nötig, da auch teilweise belassenes Bandscheibengewebe eine vollständige knöcherne Durchbauung verhindern kann [43]. Um eine Kompression des Myelons und eine Einengung der Neuroforamina zu verhindern, wird nach Entfernung der Bandscheibe die Höhe des Bandscheibenraumes rekonstruiert. Hierfür wird körpereigenes Material wie der autologe trikortikale Beckenkammspan verwendet. Es kommen aber auch verschiedene Implantate zum Einsatz.

Bezüglich des ventralen Vorgehens im Rahmen der zervikalen Spondylodese existieren die meisten Erfahrungen für den trikortikalen Beckenkammspan, dieser wird daher immer noch als „gold standard“ für die ventrale zervikale Spondylodese betrachtet [74].

Der autologe trikortikale Beckenkammspan bietet wesentliche Vorteile. Er besitzt einen ausgesprochenen osteoinduktiven und osteokonduktiven Effekt, den Urits et al. bereits vor 50 Jahren beschrieb [80]. Dieser Effekt kommt vor allem durch das Vorhandensein von Stammzellen und verschiedenen Wachstumsfaktoren innerhalb des autologen Knochenspanns zustande. Durch diese werden schnell neue Knochenformationen aufgebaut. Weiterhin handelt es sich um ein vollständig körpereigenes Material, womit eine potentielle Quelle für das Übertragen von Infektionen ausgeschaltet ist. Der autologe Kochenspan ist in ausreichender Menge vorhanden, die Operationszeit wird nur unwesentlich verlängert, außerdem ist er weniger kostenintensiv als auf dem Markt befindliche Implantate.

Er besitzt jedoch auch einige Nachteile. Einer der schwerwiegendsten ist die nicht unerhebliche Entnahmemorbidity. So ist die Entnahme des trikortikalen Beckenkammspans mit einer direkten Komplikationsrate von bis zu 39% leichten und 10% schweren Komplikationen [4, 5, 30] vergesellschaftet. Diese variieren von oberflächlichen und tiefen

Seromen, Hämatomen und Infektionen über Herniationen, Gefäß- und Nervenverletzungen bis hin zur Revision und somit einem verlängerten Krankenhausaufenthalt [4]. Des Weiteren ist bekannt, dass mehr als ein Drittel der Patienten nach drei Monaten oder mehr noch immer unter Schmerzen an der Entnahmestelle des Beckenkammspann leiden [63, 71]. Nach zwei Jahren liegt diese Zahl immerhin noch bei bis zu 31% [30, 63]. Auch haben sich biomechanische Probleme gezeigt. So kollabiert der Beckenkammspann in bis zu 18% der Fälle, eine Pseudarthrose von bis zu 13% [9, 27, 55, 78] ist die Folge.

Um diese Nachteile zu vermeiden, wurde der autologe trikortikale Beckenkammspann zunehmend durch metallische, Spongiosa augmentierte Implantate ersetzt. Ein Vorteil dieses Verfahrens ist die Vergesellschaftung mit deutlich weniger Komplikationen durch den weniger radikalen Eingriff der Spongiosaentnahme [8, 15, 18]. Obwohl metallische, augmentierte Implantate regelhaft ihre Verwendung finden, haben auch sie einige Nachteile. Zum einen führen metallische Implantate während radiologischer Untersuchungen zu Artefakten, was die frühe Evaluation von zum Beispiel Tumorrezidiven oder die Beurteilung der knöchernen Fusion erschwert [16, 31, 42, 86], zum anderen ist das Langzeitverhalten solcher Implantate derzeit unklar. Ein weiterer Nachteil ist die hohe Kompressionssteifigkeit von metallischen Implantaten. Durch sie wird das so genannte „stress shielding“, die Abschirmung der inkorporierten Spongiosa von Belastungen, ebenfalls erhöht. Dies kann eine verzögerte Einheilung des Implantates zur Folge haben [73].

Um einige dieser Probleme zu vermeiden, wurden biodegradierbare Implantate entwickelt. Diese bilden kaum Artefakte in der radiologischen Bildgebung. Ihre Einheilung ist durch eine verminderte Kompressionssteifigkeit, somit ein vermindertes „stress shielding“ beschleunigt [73]. Außerdem stellen sie infolge ihrer Degradation keine Dauerimplantate dar und würden bei Revisionseingriffen somit keine großen knöchernen Defektzonen hinterlassen. Sie können jedoch durch ihre Degradationseigenschaften zu Fremdkörperreaktion und Osteolysen führen [56].

1.5 Grundlagen zur Biodegradation von Implantaten

In den letzten Jahren wurden viele biodegradierbare Implantate entwickelt. Polylaktide bzw. Polylaktid-Kopolymere sind in der Humanmedizin weit verbreitet. Sie zerfallen durch hydrolytische Spaltung von Esterbindungen oder autokatalytisch. Die durch hydrolytische Spaltung der Esterbindungen frei werdende Milchsäure katalysiert dabei die Spaltung weiterer Bindungen. An der Implantat - Gewebe - Grenze werden diese Milchsäuren neutralisiert bzw.

abtransportiert. Im Inneren eines Implantates geschieht dies jedoch nicht, sodass der pH-Wert hier sinkt, was wiederum die Spaltung neuer Esterbindungen fördert [29]. Polylaktide degradieren sozusagen von innen nach außen. Um diese Anreicherung von sauren Abbauprodukten im Inneren abzupuffern, können basische Valenzen, zum Beispiel Kalziumphosphat, in das Material integriert werden.

Es ist bekannt, dass die Degradation von amorphen biodegradierbaren Implantaten in einer fünf Phasen umfassenden Gewebereaktion stattfindet [11, 17, 58, 82]. Zuerst heilt das unveränderte Implantat in einer bindegewebigen Hülle ein. Diese wird im Verlauf immer zellärmer und faserreicher, ein direkter Knochenkontakt des Implantates ist dabei möglich. Mit dem Start der Degradation und der Freisetzung von Degradationsprodukten beginnt eine leichte Inflammation. Im Zuge dieser werden auch Fremdkörperriesenzellen beobachtet. Diese Reaktion verstärkt sich bis kein Implantatmaterial mehr vorhanden, die Degradation also abgeschlossen ist. Am Ort der ehemaligen Implantatlokalisierung hat sich nun anderes Gewebe, zum Beispiel Knochen [58], gebildet. Eine aseptische Inflammation ist somit durch die Degradation des Implantates bedingt und keine Seltenheit [11, 17, 58, 82]. Diese Inflammation wird Mikrokristallen, die aus dem Implantatmaterial freigesetzt werden, zugeschrieben [13]. Je nach Degradationsgeschwindigkeit kann dies auch noch nach Jahren auftreten und Komplikationen verursachen [84, 85]. Dabei haben langsam degradierende Implantate eine geringere Inzidenz solcher Reaktionen [12].

Um eine gute mechanische Festigkeit zu erreichen, werden gezielt kristalline Bereiche in den Polylaktiden erzeugt. Somit existieren in diesen Implantaten kristalline Bereiche mit erhöhter Druck-, Zug- und Biegefestigkeit und amorphe Bereiche, die mechanisch nicht so belastbar sind und schneller degradieren als die kristallinen Bezirke. Durch diesen schnelleren Verlust der amorphen Substanz, aber auch durch Neukristallisation von vormals amorphen Bereichen, steigt im Verlauf der Degradation der Anteil kristalliner Bezirke [29]. Am Ende des Degradationsprozesses, also nach mehreren Monaten bis Jahren, kommt es dann zur Freisetzung dieser Mikrokristalle, welche, wie bereits beschrieben, als Ursache einer aseptischen Inflammation des Gewebes gelten [13]. Eine Eigenschaft, die auch durch neuere so genannte amorphe Polylaktid-Kopolymere, bei denen der kristalline Anteil sehr gering ist, nicht vollständig behoben werden konnte.

Bestimmte Polylaktidzusammenstellungen scheinen auf das Heilungsverhalten des Knochens einen positiven Effekt zu haben [34, 38, 40, 66-68, 79], so konnten Schmidmaier et al. [66-68] dies speziell für das Poly-(D,L-laktid) (PDLLA) als Beschichtung metallener Implantate

nachweisen. Auch bei der ventralen zervikalen Spondylodese ist eine Beschichtung von Titanimplantaten mit dem degradierbaren PLLA der knöchernen Fusion förderlich [34, 38, 40]. Ein weiterer Vorteil ist laut Schmidmaier et al. [34, 38, 40, 66-68, 79], dass dieses Material ein potenter Träger von Wachstumsfaktoren sein kann, die im Verlauf der Degradation freigesetzt werden, um ihre Wirkung zu entfalten. Diese besteht in der zusätzlichen Beschleunigung der knöchernen Fusion. Die Freisetzung der Wachstumsfaktoren aus der Trägermatrix geschieht hierbei nach einem initialen Peak kontinuierlich bis zum Abschluss der Degradation [66].

Es wurden jedoch auch negative Effekte solcher degradierbaren Implantate beobachtet. So konnten Pflugmacher et al. bei der Verwendung eines PLLA-Cages zur ventralen zervikalen Spondylodese starke Fremdkörperreaktionen, ausgeprägte Osteolysen sowie ein Ausbleiben der knöchernen Fusion beobachten [56]. Auch Weiler et al. konnte bei der Refixation von osteochondralen Fragmenten im Schafknie Fremdkörperreaktionen mit Osteolysen, Infektionen, Fisteln und ein Ausbleiben der Heilung beobachten [84]. Ein weiterer Nachteil dieser Implantate sind natürlich auch die nicht unerheblichen Kosten pro Einsatz.

1.6 Das optimale Implantatdesign zur intervertebralen Spondylodese

Es gibt diverse Implantate mit den verschiedensten mechanischen Konzepten zur zervikalen Spondylodese. All diese Implantate werden in der Intention verwandt, dass sie in der Lage sind, ein behandeltes Bewegungssegment zu stabilisieren. Dies geschieht um die bestmögliche Umgebung zu schaffen, bis eine Fusion stattgefunden hat [86]. Hierzu muss das Bewegungssegment gut stabilisiert werden, um die Bildung einer bindegewebigen Pseudarthrose zu verhindern. Es hat sich gezeigt, dass Implantate im Boxdesign anderen Formen hierbei überlegen sind [35]. Ein weitaus wichtigerer Parameter für die erfolgreiche Wirbelkörperfusion scheint die Größe der Implantatpore zu sein. Die Grenze zwischen dem Schutz der in das Implantat eingebrachten Spongiosa und deren komplette Abschirmung vor mechanischer Beanspruchung ist jedoch sehr schmal. Wird die inkorporierte Spongiosa zu starken Druckbelastungen ausgesetzt, geht sie zugrunde. Wird sie jedoch vollständig vor solchen Belastungen geschützt, ist dies ebenso der Fall. Es konnte gezeigt werden, dass Implantate mit geringem Porendurchmesser zwar einen guten Schutz der inkorporierten Spongiosa bieten, dies jedoch zu einer schlechteren Einheilung führt. Hingegen weisen Implantate mit größeren, zylindrischen Porendurchmessern, die eine geringe Belastung der

Spongiosa zulassen, ein besseres Einheilungsverhalten auf [25, 39]. Folglich sollte ein Implantat zur Spondylodese eine Boxform besitzen, um eine gute Stabilisierung des entsprechenden Bewegungssegmentes sicher zu stellen und gleichzeitig einen großen, zylindrischen Porendurchmesser aufweisen.

1.7 Pathophysiologie der ossären intervertebralen Fusion

Bei der Spondylodese wird das gesamte Bandscheibengewebe entfernt und die Deck- und Grundplatten aufgeraut bis Blutungen auftreten. Man versucht hierdurch körpereigene Heilungsmechanismen in Form von Kallusbildung und Knochenregeneration in Gang zu setzen wie sie auch bei der Frakturheilung langer Röhrenknochen vorkommen.

Bei der Frakturheilung langer Röhrenknochen kann man prinzipiell zwei Arten unterscheiden: Die primäre und die sekundäre Frakturheilung. Die primäre Frakturheilung setzt den direkten Kontakt der Fraktarenden voraus, was jedoch in den seltensten Fällen gegeben ist. Die sekundäre Heilung von Frakturen verläuft in fünf Phasen, wie es Bassett et al. 1966 bereits beschrieben haben [7]. Zuerst entsteht ein so genanntes Frakturhämatom, gefolgt von einer Inflammation. Es schließt sich eine Proliferationsphase, eine Ossifikationsphase und eine Phase des Remodeling an.

Im Zuge einer Fraktur und des damit entstehenden Hämatom strömen verschiedenste Zellen, unter anderem Entzündungszellen, zum Ort des Geschehens und setzen Entzündungsmediatoren und Wachstumsfaktoren frei. Diese bewirken zum einen eine Angiogenese und zum anderen die Proliferation und Differenzierung pluripotenter, mesenchymaler Stammzellen. Über Progenitorzellen entwickeln sich Osteo-, Chondro- oder Fibroblasten. In der vierten Phase kommt es durch verschiedene Faktoren zu einer enchondralen – bzw. intermembranösen Ossifikation des entstandenen Kallus. In diesem mineralisierten Material findet nun, während der letzten Phase der Frakturheilung, das so genannte Remodeling statt [6, 7, 20, 57, 80]. Dies bezeichnet den Umbau des unstrukturierten mineralisierten Kallus in reifen, an seine Belastungen angepassten Knochen.

Die Bildung von verschiedenen Geweben während der Frakturheilung hängt unter anderem von der mechanischen Beanspruchung während dieser Phase ab. So haben Carter et al. [20] beschrieben, dass sich bei leichter Zugspannung während der proliferativen Phase Knochen bildet. Wird diese mechanische Beanspruchung jedoch zu stark, bildet sich Bindegewebe. Im Gegensatz dazu entwickelt sich bei Kompressionsbeanspruchung Knorpel. Auch in der Ossifikationsphase der Frakturheilung spielt mechanische Beanspruchung eine wesentliche

Rolle. So scheint leichte hydrostatische Kompression eine enchondrale Ossifikation von Knorpel zu verhindern, wohingegen leichte Scherspannungen diese zu fördern scheinen [20]. Ist die entsprechende Scherspannung zu stark kann dies zu einer Zerreißung der einsprossenden Gefäße führen. Es ist bekannt, dass bei zu geringen Konzentrationen von Sauerstoff und Nährstoffen im Gewebe, zum Beispiel durch inadäquate Angiogenese, eher Knorpel entsteht [6, 46]. Ein verlängertes Vorhandensein von Knorpel durch ungenügende Frakturstabilisation, scheint bei problematischen, verlängerten Heilungsprozessen am Knochen eine der Hauptursachen zu sein [26, 44]. Eine genügende Stabilisation beeinflusst demnach nicht nur die Dauer des Heilungsprozesses, sondern auch den Verlauf der Heilung [64].

Für eine erfolgreiche zervikale Spondylodese ist demnach eine ausreichend hohe postoperative Primärstabilität erforderlich, um Pseudarthrosen zu vermeiden.

1.8 Stimulation durch Wachstumsfaktoren

Wachstumsfaktoren sind Polypeptide, die von verschiedenen Geweben in geringen Mengen produziert werden und zur Regulation von Zellfunktionen dienen. In dieser Arbeit wurden zwei verschiedene Wachstumsfaktoren eingesetzt.

1.) TGF β -1 (transforming growth factor-beta), ein Wachstumsfaktor aus der TGF- β -Familie:

Diese stimulieren u.a. undifferenzierte pluripotente Zellen mesenchymalen Ursprungs [57, 75]. TGF- β 's werden u.a. von Osteoblasten produziert und können nach Einbau in die extrazelluläre Knochen- und Knorpelmatrix aus dieser auch wieder freigesetzt werden. Osteoblasten besitzen, verglichen mit anderen Zellen, die höchste Rezeptordichte für diese Wachstumsfaktoren [75], was eine Autoinduktion dieser Zellen ermöglicht. Die Expression von TGF- β 's wird durch Autoinduktion aber auch durch mechanische Stimulation erhöht [45]. Durch ihren Einbau in Extrazellulärmatrix wirken TGF- β 's als Gegenregulatoren bei resorptiven Prozessen am Knochen. Für TGF- β 1 ist experimentell nachgewiesen, dass es die Proliferation von pluripotenten mesenchymalen Zellen und Osteoblasten in Frakturen und frischen Knochendefekten fördert [75]. Auch konnte gezeigt werden, dass TGF- β 's sowohl die Proliferation von Fibroblasten als auch die Produktion von verschiedenen Kollagentypen durch Fibroblasten induzieren. Sie sind somit wichtige Faktoren bei der Produktion von Bestandteilen des Knochens und Knorpels [14]. Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass TGF- β 's sowohl osteoinduktiv also auch osteokonduktiv wirken.

2.) IGF-1 (insulin-like growth factor), ein Wachstumsfaktor aus der IGF-Familie:

Diese Wachstumsfaktoren werden von Osteoblasten und Chondroblasten produziert. Sie können wie auch die TGFβ's in extrazellulärer Knochen- und Knorpelmatrix eingebaut und aus ihnen wieder freigesetzt werden. IGF's werden für die Proliferation und Differenzierung von Osteoprogenitorzellen sowie für eine erhöhte Synthese von Kollagen 1, einem wichtigen Bestandteil der Knochenmatrix, verantwortlich gemacht [45, 57]. Außerdem wirken sie auf Osteoblasten chemotaktisch [65]. IGF-1 soll für die Rekrutierung von Zellen mesenchymalen Ursprungs sowie deren Differenzierung zu Osteoblasten verantwortlich sein [45, 51, 75]. Außerdem scheint eine überschießende Inflammation, welche eine Resorption der Frakturrenden induzieren kann, durch IGF-1 verhindert zu werden [51]. IGF's sind wie TGFβ's am balancierten Knochenumbau beteiligt [45].

Es hat sich gezeigt, dass die Kombination beider Wachstumsfaktoren TGFβ-1 und IGF-1 eine bessere Wirkung im Bezug auf die Frakturheilung erzielt als jeder für sich allein [76]. Diese Kombination scheint die knöcherne Durchbauung der Fusions- bzw. Defektzone in vielversprechender Art zu beschleunigen [36, 38, 40, 66-68, 76], sodass TGFβ-1 und IGF-1 zusammen durchaus einen, dem Bone-Morphogenic-Protein-2 (BMP-2) vergleichbaren Effekt aufweisen [36, 40]. BMP-2 ist ein in der experimentellen Forschung oft verwandter Wachstumsfaktor. Dieser ist für die Angiogenese, Chemotaxis, Proliferation und Differenzierung von pluripotenten mesenchymalen Stammzellen zu Osteoprogenitorzellen sowie deren weiterer Differenzierung zu Osteoblasten verantwortlich [57]. Es ist jedoch bekannt, dass er aufgrund seines hohen Potentials zur de novo Knochenbildung auch mit einem gewissen Risiko zur Ossifikation von Weichteilen assoziiert ist [52].

2 Studienziel

Das Ziel dieser Studie war es, in einem zervikalen Schafsmodell das Langzeitverhalten eines experimentellen degradierbaren Implantates zur ventralen zervikalen intervertebralen Spondylodese histologisch zu untersuchen. Es soll gezeigt werden, dass das verwendete Implantat in der Lage ist dem operierten Bewegungssegment zu einer ausreichenden Primärstabilität zu verhelfen und somit für hohe Fusionsraten zu sorgen. Außerdem war es Ziel zu zeigen, dass während der Degradation des Implantates keine wesentlichen negativen Effekte wie Fremdkörperreaktionen, Osteolysen oder Implantatdislokationen, wie bei anderen degradierbaren Implantaten bereits publiziert, zu beobachten sind. Ein weiterer untersuchter Aspekt ist die Optimierung der knöchernen Fusion durch den Einsatz von Wachstumsfaktoren. Es sollte gezeigt werden, dass durch die Beschichtung der Implantate mittels eines PDLLA-Carriers und den Wachstumsfaktoren TGF β -1 und IGF-1 die ventrale zervikale intervertebrale Spondylodese beschleunigt und die Qualität des Kallusgewebes in der Frühphase der Fusion verbessert werden kann.

Bei dieser Arbeit handelt es sich um den histologischen Teil eines Gesamtprojekts, in dessen Rahmen auch radiologische und biomechanische Untersuchungen durchgeführt wurden. Diese Arbeit beschäftigt sich mit histomorphometrischen und histomorphologischen Aspekten der Degradation des zu untersuchenden Implantates im Verlauf von zwei Jahren.

3 Material und Methoden

3.1 Tiermodell und chirurgische Technik

3.1.1 Versuchstiere

Der Versuch wurde als „Langzeit-Osteointegration eines biodegradierbaren Cages zur Spondylodese der Schafshalswirbelsäule“ von den lokalen Tierschutzbehörden genehmigt (G0 193/01 am 16.10.01).

Das Schaf ist in der unfallchirurgischen und orthopädischen Forschung ein bewährtes und häufig verwendetes Versuchstier. Obwohl es Unterschiede in Geometrie, Höhe und Mineralisation zwischen der ovinen und humanen Wirbelsäule existieren, wurde gezeigt, dass sich diese Parameter innerhalb der einen Spezies im Verlauf der Wirbelsäule im selben Maße ändern wie in der anderen Spezies [87, 88]. Auch konnte gezeigt werden, dass im Fall der Halswirbelsäule diese Unterschiede im Bewegungssegment C3/4 am geringsten ausfallen [37]. Ein weiterer Vorteil des zervikalen Schafmodells ist die Möglichkeit der Verwendbarkeit von Implantaten mit humanen Ausmaßen. Aufgrund dieser Gegebenheiten kamen auch in dieser Studie Schafe zum Einsatz. Bei den Versuchstieren handelte es sich um ausgewachsene Merinoschafe mit einem Alter von zwei Jahren und einem Körpergewicht von $65 \text{ kg} \pm 10 \text{ kg}$. Aufgrund ihres geringeren Aggressionspotentials und somit ihrer besseren Umgänglichkeit wurden ausschließlich weibliche Tiere verwendet.

Die Tiere wurden zu Beginn der Studie tierärztlich untersucht, erhielten eine Paraimmunisierung mit Parapox ovis (Baypamune[®], Bayer Tiergesundheit AG, Leverkusen, Deutschland) sowie eine Prophylaxe gegen Endo- und Ektoparasiten mit Ivermectin (Ivomec[®], Merial Deutschland, Halbergmoos Deutschland) und Triclabendazol (Fasinex[®], Novartis Tiergesundheits AG, Wehr / Baden, Deutschland). Die tierärztliche Betreuung durch medizinisches Fachpersonal des Biomedizinischen Forschungszentrums wurde während des gesamten Versuches sichergestellt.

3.1.2 Implantate

Cage

Das quaderförmige, im Boxdesign gestaltete Implantat aus Resorbon[®] (Biomet Deutschland, Berlin, Deutschland) ist mit einer 8 mm messenden Pore versehen. Es ist kaudal plan und

kranial konvex gearbeitet. Daraus ergibt sich eine Implantathöhe von 7 – 8 mm, eine Breite von 16 mm und eine Tiefe von 15 mm (Abb. 1).

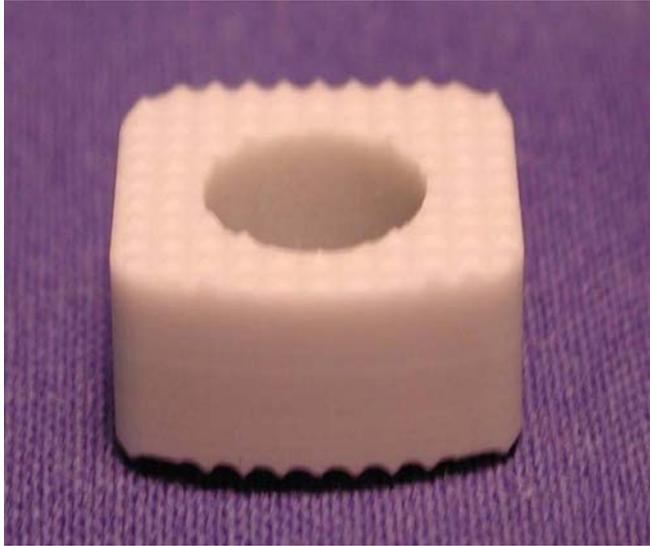


Abbildung 1:

Darstellung des Resorbon®-Implantates der Firma Biomet, Deutschland

Resorbon® ist ein degradierbares Polymerkomposit, bestehend aus einer hochvernetzten amorphen Matrix (Polymer), die sich um einen Füllstoffpartikel bildet. Die Geschwindigkeit der Degradation ist von der Zusammensetzung und Vernetzungsdichte des Polymers abhängig. Die mechanische Festigkeit wird dabei im Wesentlichen durch den Füllstoff, hier Kalziumphosphat, bestimmt. Bei der Herstellung des Polymers kommen das resorbierbare Ethylenglykol-oligolactid-dimethacrylat (ELAMA), Methylmethacrylat (MMA) sowie Dibenzoylperoxid (DBPO) und Polyethylenglykol-propylenglycol zur Anwendung. MMA und DBPO sind als Komponenten von Knochenzement seit Jahrzehnten in der Medizin zugelassen. Dieses Polymer wird im Körper in die wasserlöslichen Substanzen Milchsäure, Ethylenglycol und Oligomethacrylsäure gespalten. Milchsäure findet Eingang in den Zuckerstoffwechsel, Ethylenglycol wird wie Oligomethacrylsäure über die Niere ausgeschieden oder zum Teil zu Wasser und Kohlendioxid oxydiert.

Beschichtung

Ein Teil der Implantate wurde mit den rekombinanten humanen (rh) Wachstumsfaktoren transforming growth factor-beta1 (TGF-β1, R&D System, Wiesbaden, Deutschland) und insulin-like growth factor-I (IGF-I, R&D System, Wiesbaden, Deutschland) beschichtet. Bei diesem Verfahren handelt es sich um eine „kalte Beschichtung“ [69]. Als Trägermatrix hierfür dienten 50 mg Poly(D,L-laktid) (PDLLA, Boehringer, Ingelheim, Deutschland). Dieses wurde unter sterilen Bedingungen in 0,75 ml Chloroform gelöst und mit 0,5 mg TGF-β1 und 2,5 mg

IGF-I versetzt. In die entstandene Lösung wurden acht von 40 Resorbon[®]-Implantate zweimal getaucht bis sie vollständig benetzt waren. Die im Anschluss folgende Trocknung der Beschichtung erfolgte unter Rotation. Auf diese Weise wurde eine gleichmäßige Beschichtung von durchschnittlich $5,02 \pm 0,12$ mg mit einem Wachstumsfaktoranteil von 30 µg TGF-β1 und 150µg IGF-I je Implantat aufgetragen.

3.1.3 Gruppeneinteilung und Untersuchungszeiträume

40 Versuchstiere wurden in fünf Gruppen zu je acht Tieren aufgeteilt. Jedes Tier erhielt einen mit autologer Spongiosa augmentiertes Resorbon[®]-Implantat, welches ausschließlich in Gruppe II zusätzlich mit Wachstumsfaktoren beschichtet war. Der Untersuchungszeitraum der Gruppen I und II betrug 12 Wochen, die der Gruppe III 9 Monate, in Gruppe IV war die Studiendauer 12 Monaten und in Gruppe V 24 Monate. Somit wurden fünf Gruppen á 8 Tiere gebildet.

3.1.4 Operationstechnik, präoperative Vorbereitung und Nachsorge

Präoperative Vorbereitung

Unmittelbar vor und nach der Operation waren die Tiere in artgerechten Stallungen der tierexperimentellen Einrichtung der Charité Campus Virchow Klinikum untergebracht. Mit Beginn der dritten postoperativen Woche erfolgte die Unterbringung in Freilandhaltung.

Um eine präoperative Nahrungskarenz sicher zu stellen wurden die Versuchstiere einen Tag vor der Operation in einem Stall ohne Futter untergebracht. Trinkwasser stand ständig zur Verfügung.

Nach Anlage einer Venenverweilkanüle in die Vena brachiocephalica erfolgte eine Antibiotikaphylaxe mit 2,2g Amoxicillin/Clavulansäure (Augmentan[®] i.v., SmithKline Beecham Pharma, München, Deutschland). Die Narkose wurde intravenös mit 0,5-1,5 g Thiopenthal-Natrium (Trapanal[®], Altana Pharma AG, Konstanz, Deutschland) und Fentanylhydrogencitrat (Fentanyl-Janssen[®], Janssen-Cilag, Neuss, Deutschland) eingeleitet. Es folgte die Intubation mit einem Endotrachealtubus (Ø 8-9mm, Mallinckrodt, Irland) und die Anlage einer Magensonde (Ø 14mm, Rüschi, Deutschland) zur Dekompression des Pansens. Die Beatmung wurde kontrolliert (Anästhesie Sulla 800V, Draegerwerke AG, Lübeck, Deutschland) mit einem Atemzugvolumen von 600-700 ml und einer Atemfrequenz von 12 pro Minute durchgeführt. Zur Aufrechterhaltung der Narkose diente eine balancierte

Anästhesie mit Isofluran (Isofluran-Lilly[®], Lilly, Bad Homburg, Deutschland), Fentanylhydrogencitrat und Lachgas. Zeitgleich erfolgte die Überwachung von Herzaktion und -frequenz, peripherer Sauerstoffsättigung (hp M1166A, Hewlett-Packard GmbH, Böblingen, Deutschland) und des expiratorischen Kohlendioxidgehaltes. Zum Volumenausgleich wurden jedem Tier im Operationsverlauf 1000 ml kristalloide Infusionslösung (Thomaejonin[®], DeltaSelect, Pfullingen, Deutschland) infundiert.

Nach Anfertigung eines seitlichen Röntgenbildes der Halswirbelsäule (Mobilett Plus, Siemens-Elma AG, Solna, Schweden / Fuji CR 24x30, Fuji, Düsseldorf, Deutschland) und Rasur der Operationsbereiche wurden die Tiere, in Rechtsseitenlage gelagert, auf einem mobilen Operationstisch in den Operationsaal gefahren. Das OP-Gebiet wurde mit Braunoderm[®] (B.Braun, Melsungen, Deutschland) abgewaschen und mit sterilen Tüchern abgedeckt.

Operationstechnik

Spongiosaentnahme

Die zur Befüllung des Cages benötigte Spongiosa wurde aus dem dorsalen Anteil des linken Beckenkamms gewonnen. Zu diesem Zweck wurde, nach scharfer Durchtrennung von Haut und Subcutis das Periost mit Hilfe eines Elektrokauters auf einer Länge von ca. 5 cm inzidiert. Nach Eröffnung der Kortikalis wurde die Spongiosa mit Hilfe eines scharfen Löffels gewonnen und in die Implantat-Pore gefüllt. Die Lagerung des so vorbereiteten Implantates erfolgte unter sterilen Bedingungen in einem feuchten Milieu. Der Wundverschluss erfolgte anschließend schichtweise.

Spondylodese

Am Vorderrand des linken M. sternocleidomastoideus erfolgte ein circa 12 cm langer Hautschnitt mit anschließender Durchtrennung von Subcutis und oberflächlicher Halsfaszie. Nach Darstellung des M. sternocleidomastoideus, der Trachea, des Ösophagus sowie der Gefäß-Nerven-Scheide der großen Halsgefäße wurde unter stumpfer Präparation die prävertebrale Halsmuskulatur aufgesucht und der M. longus colli dargestellt (Abb. 2).

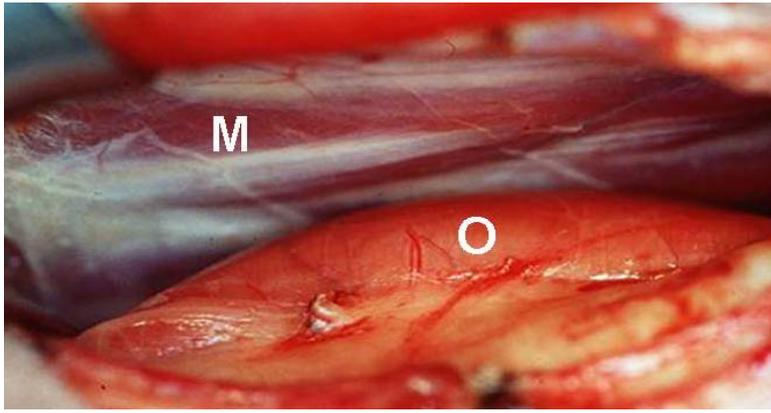


Abbildung 2:

Operations-Situs mit in der Tiefe erkennbarem Oesophagus (O) sowie der prävertebralen Muskulatur (M). Der linke Bildrand zeigt craniale, der untere Bildrand mediale Abschnitte.

Das Bewegungssegment C3/C4 wurde mit Hilfe eines Bildwandlers (BV 25, Philips GmbH, Hamburg, Deutschland) dargestellt und der M. longus colli über der Bandscheibe C3/C4 in Faserrichtung gespalten. Das darunter liegende vordere Längsband wurde horizontal zur Grund- bzw. Deckplatte inzidiert. Nach Entfernung der Bandscheibe erfolgte die Aufrauung der Deck- sowie Grundplatte mit einer Fräse bis Blutungen am subchondralen Knochen auftraten (Abb. 3).

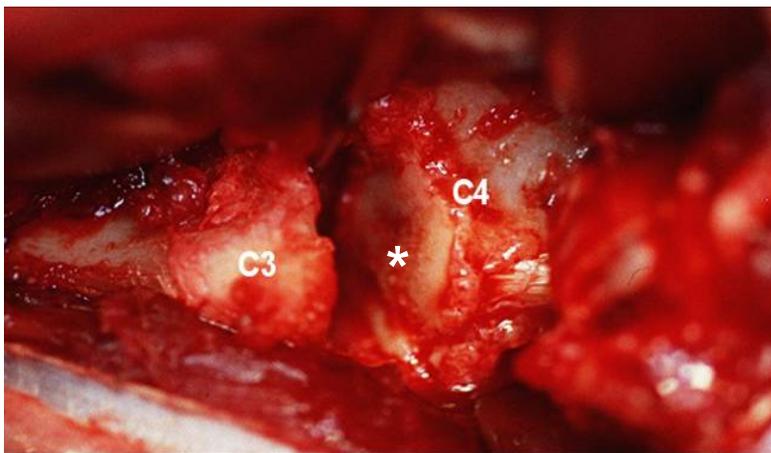


Abbildung 3:

Operations-Situs nach Diskektomie C3/4. * ausgeräumtes Bandscheibenfach.

Die Wunde wurde mit isotoner Kochsalzlösung (Isotone Kochsalzlösung Braun[®], B.Braun,

Melsungen, Deutschland) gespült, das Bandscheibenfach mit Hilfe eines Distraktors leicht aufgespannt und der vorbereitete Cage mit der konvexen Seite nach cranial implantiert (Abb. 4).

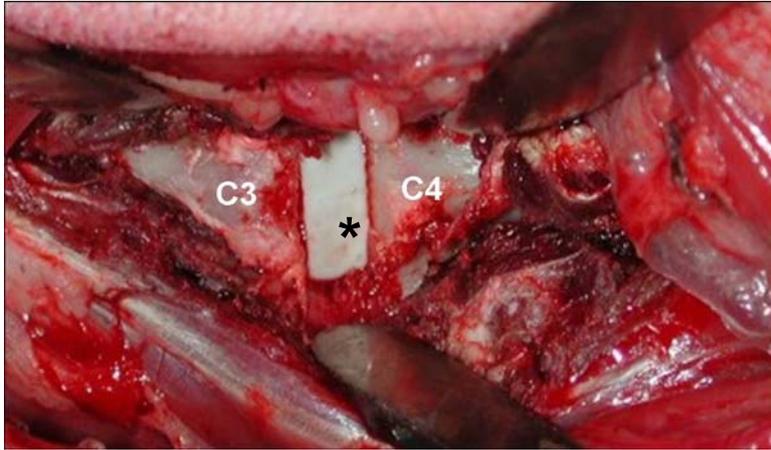


Abbildung 4:

Operations-Situs nach Implantation des Cages. * eingepasster Resorbon®-Cage.

Um die Implantatlage zu sichern, wurde ventral der Wirbelkörper C3 bis C4 eine anmodellierbare Dreilochdrittelrohrplatte (Synthes, Bochum, Deutschland) mit zwei 3,5 mm durchmessenden Spongiosaschrauben (Synthes, Bochum, Deutschland) fixiert (Abb. 5).

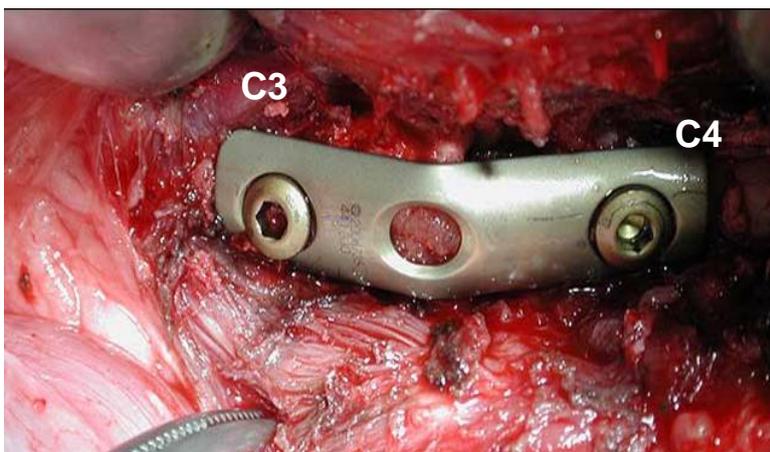


Abbildung 5:

Operations-Situs nach ventraler Verplattung.

Nach nochmaliger gründlicher Spülung mit isotoner Kochsalzlösung erfolgte der schichtweise

Wundverschluß.

Die Ausleitung aus der Narkose wurde nach Anlage eines Fentanylpflasters (Durogesic[®] SMAT 150µg, Janssen-Cilag, Neuss, Deutschland) sowie eines sterilen Verbandes durchgeführt. Die Tiere wurden bis zum vollständigen Erwachen ständig tiermedizinisch betreut und in ihrer Bewegung nicht eingeschränkt. Futter und Wasser standen in vollem Ausmaß zur Verfügung.

Postoperative Nachsorge

In der ersten postoperativen Woche wurde eine Analgesie durch tägliche i.m. Injektionen von 0,5 g Metronidazol-Natrium (Novalminsulfon[®], Lichtenstein, Fürstfeldbruck, Deutschland) sichergestellt. Außerdem erhielten die Tiere einen täglichen Verbandswechsel, welcher in der zweiten postoperativen Woche durch einen Sprühverband ersetzt wurde. Am 14. postoperativen Tag konnte das kutane Nahtmaterial entfernt werden. Die Tiere wurden nun nach nochmaliger tierärztlicher Untersuchung in die Freilandhaltung verlegt.

3.1.5 Tötung der Tiere, Präparation und Prozessierung der Wirbelsäulenpräparate

3.1.5.1 Anforderungen der Wirbelsäulenpräparation

Tötung

Nach Ablauf der geplanten Gruppenstandzeiten erhielten die Tiere eine Venenverweilkanüle. Über diese wurden 1,0 g Thiopental-Natrium zur Sedation und 0,1 mg Fentanylhydrogencitrat zur Analgesie appliziert und im Anschluss hochdosiert Kaliumchlorid i.v. (Fresenius Kabi Deutschland AG, Bad Homburg, Deutschland) verabreicht.

Präparation

Die Halswirbelsäule wurde nun mit Hilfe einer oszillierenden Säge (Aesculap Typ G-6100-05) zwischen os occipitale und ersten Brustwirbelkörper abgesetzt und entnommen.

Die entnommene Halswirbelsäule wurde von Bindegewebe und Muskulatur befreit. Um das Bewegungssegment C3/4 zu gewinnen, wurde der dritte Halswirbelkörper nahe der Deckplatte und der vierte nahe der Grundplatte mit einer oszillierenden Säge durchtrennt.

Das gewonnene Bewegungssegment C3/4 wurde in der Sagittalebene mit einer wassergekühlten Säge (Makrotrennschleifsystem, Exakt, Norderstedt, Deutschland) in fünf 4 mm starke Scheiben gesägt (Abb. 6). Für die histologische Fragestellung dieser Arbeit wurde die mittlere Scheibe verwandt (Abb. 7). Aus dieser wurden im Anschluss die Metallreste der ventralen Verplattung vorsichtig entfernt.

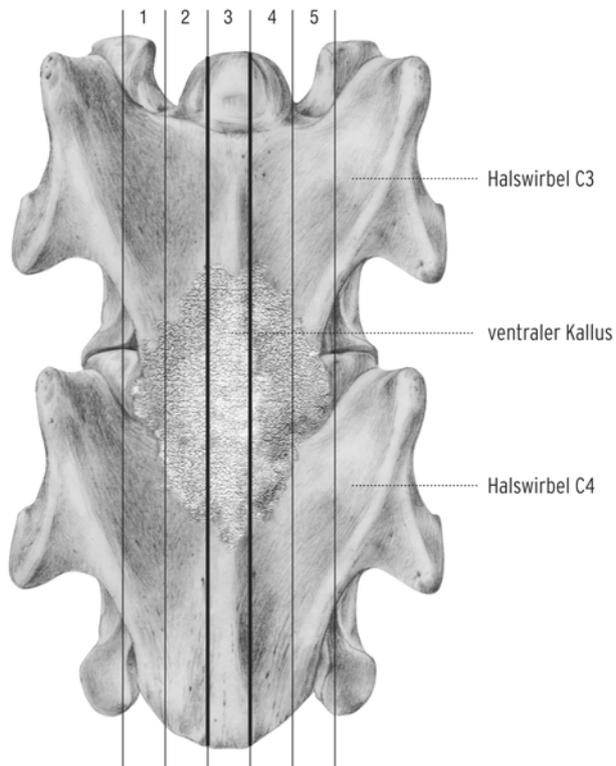


Abbildung 6:

Ventrale Ansicht des Bewegungssegmentes C3/4 der Schafwirbelsäule. Schematische Darstellung des Sägeplans. Die mediane Scheibe (3) wurde für dieses Projekt verwandt.

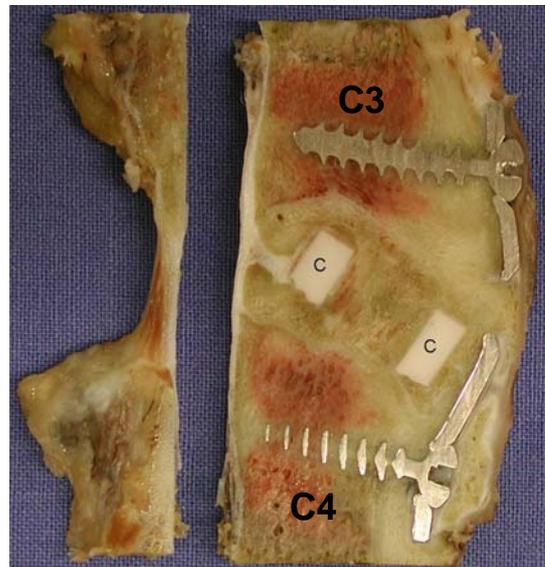


Abbildung 7:

Darstellung eines repräsentativen medianen Sägeschnittes. Im rechten Bildabschnitt sind die ventrale Verplattung und Schraubenreste sowie der Cage (C) zu sehen. Im linken Bildabschnitt sind die Dornfortsätze, dazwischen der Spinalkanal erkennbar.

Fixation und Einbettung

Zur Gewebekonservierung erfolgte eine Fixierung der Präparate für fünf Tage in einer isotonen Formaldehyd-Alkohol-Lösung (Zusammensetzung: 324 ml Formaldehyd 34%ig, 540 ml Ethanol 100%ig, 130 ml Barbitol-Natrium-Puffer 7,4 pH, 6 g Glukose). Die Präparate wurden anschließend in einer aufsteigenden Alkoholreihe entwässert und entfettet. Zum besseren Einwirken des Alkohols erfolgte die Lagerung währenddessen auf einem Schüttelgerät (HS 501 digital, IKA Labortechnik, Staufen, Deutschland).

Die Präparate wurden nun in einem Mehrkomponentenkunststoff auf Methylmethacrylatbasis (Technovit 9100 neu, Heraeus Kulzer GmbH, Wehrheim, Deutschland) eingebettet. Hierzu wurden diese für vier Stunden in 100%iges Xylol verbracht und im Anschluss einen Tag in einer Präinfiltrationslösung (Technovit 9100 neu, Heraeus Kulzer GmbH, Wehrheim, Deutschland) gelagert. Eine Infiltration mit flüssigem Kunststoff (Technovit 9100 neu, Heraeus Kulzer GmbH, Wehrheim, Deutschland) wurde für eine Woche vorgenommen. Diese Prozedur gewährleistet eine vollständige Durchtränkung mit Kunststoff. Nun wurden die Präparate in Einbettformen gelegt, welche sofort mit flüssigem Kunststoff befüllt und auf Eis gelagert wurden. Dies führte zu einer Aushärtung binnen 24 Stunden, sodass die Präparate entnommen werden konnten.

Herstellung des histologischen Präparates

Die überflüssigen Kunststoffkanten der eingebetteten Präparate wurden mit einer Tischschleifmaschine (Phoenix 3000, Jean Writz GmbH & Co KG, Düsseldorf, Deutschland) entfernt. Im Anschluss wurden in Sagittalebene 6 µm starke Schnitte mit Hilfe eines Hartschnittmikrotoms (Polycut S, Cambridge Instruments, Heidelberg, Deutschland) angefertigt. Diese wurden auf einen Glasobjektträger aufgezogen und zur optimalen Entfaltung mit einer Strecklösung (vier Teile 70%iges Ethanol, sechs Teile Butoxyethylacetat) beträufelt. Zur Trocknung der Objektträger erfolgte die Lagerung in einer Presse im Brutschrank für zwei Tage bei 60°C.

3.1.5.2 Histologische Färbungen der Proben

Vor den entsprechenden Färbevorgängen wurden die Schnitte zur vollständigen Entfernung noch vorhandenen Kunststoffes dreimal für je 30 Minuten in 2-Methoxymethylacetat (Merck 806061, Merck, Darmstadt, Deutschland) gebracht, anschließend in einer absteigenden Alkoholreihe rehydriert und in Aqua destillata gespült.

Die Färbungen erfolgten nach den von Romeis et al. publizierten Färbeprotokollen [61].

Nach erfolgter Färbung wurden die Präparate in 100%iges Xylol gebracht und im Anschluss mit Vitroclud®(R.Langensbrink, Emmending, Deutschland) und Deckgläsern eingedeckelt.

Trichomfärbung nach Masson und Goldner

- | | | |
|--|----|------|
| 1. Weigerts Eisenhämatoxylin | 3 | min. |
| 2. unter fließendem Wasser auswaschen | 10 | min. |
| 3. Säurefuchsin Ponceau | 5 | min. |
| 4. Spülen in 1% Essigsäure | | |
| 5. Phosphormolybdänsäure-Orange G | 30 | min. |
| 6. Spülen in 1% Essigsäure | | |
| 7. Lichtgrün | 10 | min. |
| 8. Spülen in 1% Essigsäure | | |
| 9. Entwässern in drei Portionen aufsteigenden Alkohols | | |

Zellkerne stellen sich bräunlich-schwarz dar, das Zytoplasma färbt sich ziegelrot, während Erythrozyten orange bis gelb erscheinen. Das Bindegewebe und saure Mukopolysaccharide werden blaßgrün, verkalktes Knochengewebe hellgrün und stark mineralisiertes Knochengewebe strahlend grün dargestellt. Osteoid färbt sich rot.

Kombinierte Safranin-Orange / Von Kossa Färbung

- | | |
|------------------------------|-----------|
| 1. 3% Silbernitratlösung | 5 min. |
| 2. Spülen in Aqua destillata | |
| 3. Natrium-Formaldehydlösung | 2 min. |
| 4. Wässern in Leitungswasser | 10 min. |
| 5. 5% Natriumthiosulfat | 5 min. |
| 6. Wässern in Leitungswasser | 10 min. |
| 7. Spülen in Aqua destillata | |
| 8. Safranin O | 8 min. |
| 9. Spülen in Aqua destillata | |
| 10. 2x 96% Alkohol | je 2 min. |
| 11. 2x 100% Alkohol | je 2 min. |

Alle mineralisierten, v.a. kalziumphosphathaltigen, Gewebe stellen sich schwarz dar. Eine Gegenfärbung mit Safranin-Orange bewirkt eine intensive Rotfärbung aller anderen Gewebe.

Safranin-Orange / Lichtgrün Färbung

- | | |
|------------------------------|---------|
| 1. Safranin O | 10 min. |
| 2. Spülen in Aqua destillata | |
| 3. Pikrinsäure | 15 min. |
| 4. Spülen in Aqua destillata | |
| 5. Spülen in 1% Essigsäure | |
| 6. Lichtgrün | 10 min. |
| 7. Spülen in 1% Essigsäure | |
| 8. 100% Alkohol | |

Der Safranin-Orange Farbstoff bindet an saure Mukopolysaccharide und färbt diese rot. Somit stellen sich die Knopelgrundsubstanz, Osteoid und Zellkerne rot dar. Durch die Gegenfärbung mit Lichtgrün sind Bindegewebe und Knochen grün gefärbt.

AstrablauFärbung

1. 3% Essigsäure 3 min.
2. Astrablau 30 min.
3. Spülen in 3% Essigsäure
4. Spülen in Aqua destillata
5. Kernechtrot 5 min.
6. Spülen in Aqua destillata
7. Entwässern in drei Portionen aufsteigenden Alkohols

Der Kupferphthalocyaninfarbstoff Astrablau färbt saure Mukopolysaccharide je nach deren Konzentration mehr oder weniger blau. Eine Gegenfärbung der anderen Gewebe erfolgt mit Kernechtrot.

3.2 Quantitative und histomorphologische Analyse der intervertebralen Fusion

3.2.1 Auswertung

Region of Interest

Es wurde ein zu untersuchendes Areal (region of interest, ROI) definiert. Hierfür wurde ein geometrisches Konstrukt errechnet, welches sich aus der Strecke zwischen Vorder- und Hinterkante der Grundplatte des dritten Halswirbelkörpers und der präoperativen Bandscheibenraumhöhe wie folgt ergibt [39]. An der Vorder- und Hinterkante der Grundplatte des dritten Halswirbelkörpers werden die Punkte A bzw. B definiert. Diese begrenzen die Strecke S. Eine Linie, die der dreifachen präoperativen Bandscheibenraumhöhe (aDSH) entspricht, wird vertikal jeweils durch Punkt A bzw. B gelegt, wobei ein Drittel der Linienstrecke cranial und zwei Drittel caudal reichen. Nun wird an das craniale Ende der an der Hinterkante gelegenen Linie und an das caudale Ende der an der Vorderkante gelegenen Linie die halbe Strecke S horizontal angelegt und das verbleibende freie Ende mit dem gegenüberliegenden freien Ende der Vorder- bzw. Hinterkantenlinie verbunden.

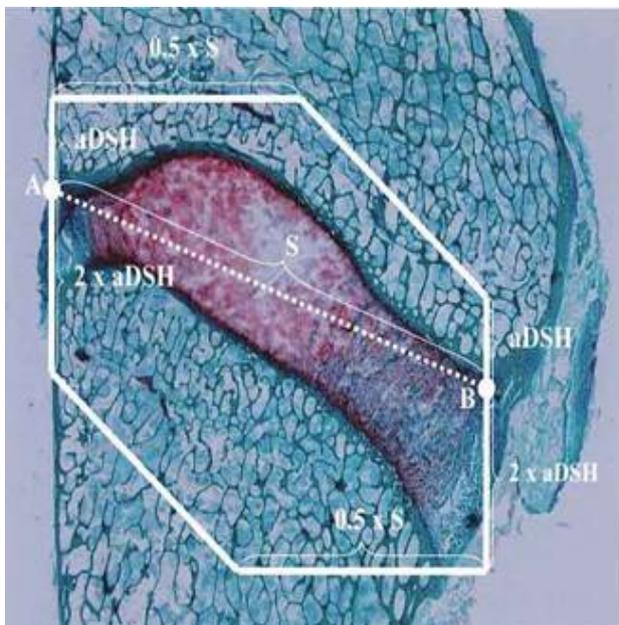


Abbildung 8:

Schematische Darstellung der „region of interest“, die sich aus der präoperativen Bandscheibenraumhöhe (aDSH) sowie der Strecke zwischen Vorder- und Hinterkante der Grundplatte des dritten Halswirbelkörpers (S) errechnet. Bewegungssegment C 3/4 am Schaf, Trichomfärbung nach Masson und Goldner.

Histomorphometrie

Zur quantitativen Analyse der relativen Gewebeanteile des Knochens, Knorpels und mineralisierten Knorpels an der ROI dient ein (Krummrey und Epari, Charité Campus Virchow Klinikum, Berlin, Deutschland) modifiziertes Bildanalyse-System (KS 400 Version 3.0, Carl Zeiss Vision GmbH, Eching, Deutschland). Mit diesem System werden Gewebeanteile aufgrund ihrer unterschiedlichen Anfärbbarkeit detektiert und ihr relativer Anteil an einer definierten Gesamtfläche der ROI errechnet. Um eine Vergleichbarkeit der einzelnen Präparate sicher zu stellen, musste eine Kalibrierung vorgenommen werden. Hierzu wurden die Schnitte mit einer Skalierung digitalisiert (Nikon Superhigh-Performance 3xZoom, Cool Pix 900, Japan) und die entstandenen Bilder in die Bildanalyse eingespeist. Es folgte die Kalibrierung sowie die Errechnung der ROI. Im Anschluss wurden die entsprechenden Gewebe markiert, detektiert und ihr relativer Flächenanteil errechnet. Hierbei lag das Interesse in der Messung von drei Parametern.

- Der prozentuale Anteil der Knochenfläche an der Gesamtfläche der ROI
- Der prozentuale Anteil der Knorpelfläche an der Gesamtfläche der ROI
- Der prozentuale Anteil der Fläche des mineralisierten Knorpels am zuvor gemessenen prozentualen Knorpelflächenanteil an der Gesamtfläche der ROI

Histomorphologie

Die histomorphologische Bewertung der einzelnen zu untersuchenden Parameter erfolgte mit Hilfe eines Mikroskops der Firma Leica (Leica DMRB, Leica, Solms, Deutschland).

Fusion

Nach Toth et al. [79] wurde von einer kompletten Fusion (F-1) zwischen den Halswirbelkörpern C3 und C4 ausgegangen, wenn mehr als 50% der Cagepore knöchern überbrückt waren, bei weniger als 50% wurde die Fusion als partiell (F-2) gewertet. Bei einer nicht vorhandenen knöchernen Überbrückung wurde von einer nicht stattgehabten Fusion (F-3) ausgegangen.

Gewebe des Fusionsspaltes

Um die Qualität des Gewebes im Fusionsspalt zu beschreiben, wurde ein Score von Emery et al. [24] verwendet. Hierbei wird zwischen Knochen, Knorpel und Bindegewebe unterschieden, wobei der jeweils relativ größte Anteil der Gewebe gewertet wird.

- G-0 leerer Spalt
- G-1 Bindegewebe
- G-2 Bindegewebe > Knorpel
- G-3 Knorpel > Bindegewebe
- G-4 Knorpel
- G-5 Knorpel > Knochen
- G-6 Knochen > Knorpel
- G-7 Knochen

Fremdkörperreaktion

Zur Beurteilung der Fremdkörperreaktion wurde, wie von Duranti et al. [22] beschrieben, zwischen keiner (R-0), einer schwachen (R-1), milden (R-2), mäßigen (R-3) und starken Fremdkörperreaktion (R-4) unterschieden. Sind wenige Entzündungszellen sichtbar, ist dies ein Indiz für eine schwache Fremdkörperreaktion. Die milde Reaktion zeichnet sich durch zusätzliche Anwesenheit von ein bis zwei Fremdkörperriesenzellen pro Gesichtsfeld aus (Abb. 9), während die mäßige Reaktion durch eine deutliche Anzahl von Entzündungszellen, Lymphozyten und Fremdkörperriesenzellen (Abb. 10) und die starke Fremdkörperreaktion zusätzlich durch das Auftreten fibrös abgekapselter Granulome gekennzeichnet ist.



Abbildung 9:

Darstellung einer milden Fremdkörperreaktion R-2. Auf dem Bild in der rechten oberen Ecke ist deutlich eine multinnukleäre Fremdkörperriesenzelle, im restlichen Bild sind Entzündungszellen (Plasmazellen, Lymphozyten und Granulozyten) zu erkennen (Tier 35, Vergrößerung 400x, Trichomfärbung nach Masson und Goldner)

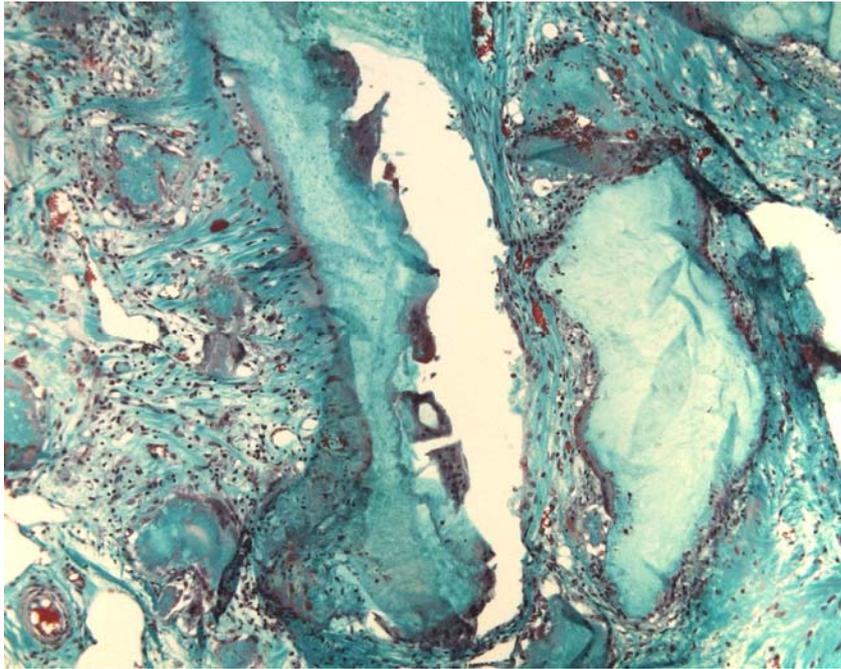


Abbildung 10:

Darstellung einer mäßigen Fremdkörperreaktion R-3. Die von Bindegewebe umhüllten Implantatfragmente sind von Fremdkörperriesenzellen gesäumt. Zusätzlich enthält das Bindegewebe deutlich Entzündungszellen. (Präparat 38, Vergrößerung 200x, Trichomfärbung nach Masson und Goldner)

Vaskularisation im Fusionsspalt

Bei der Bewertung der Gewebevaskularisation wurde analog zu Emery et al. [24] zwischen keinen sichtbaren Gefäßen (V-0), wenigen sichtbaren Gefäßen (V-1), einigen sichtbaren Gefäßen (V-2) und Hypervaskularisation (V-3) unterschieden.

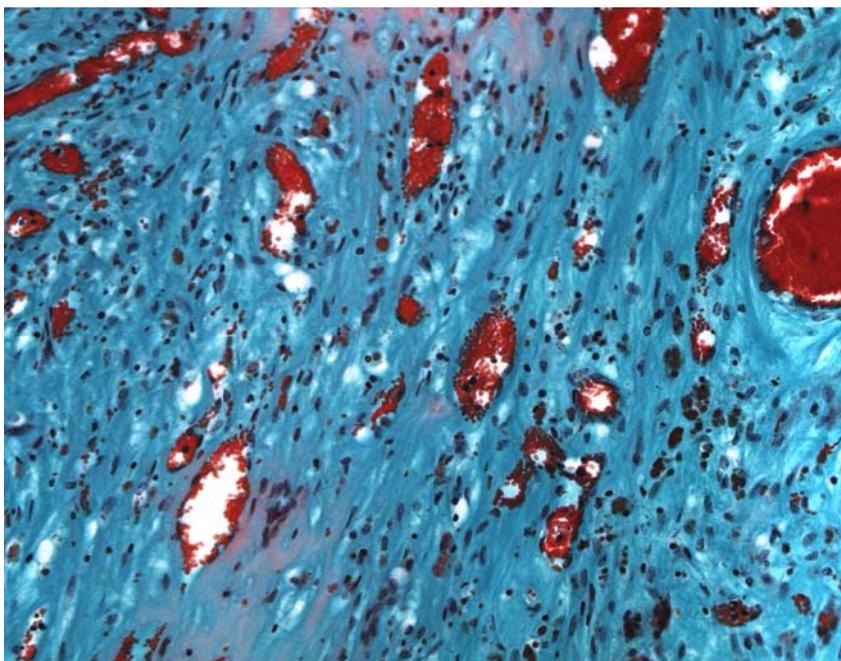


Abbildung 11:

Darstellung der Hypervaskularisation V-3. Zu erkennen sind Gefäße verschiedener Kaliber mit enthaltenen Erythrozyten (Präparat 34, Vergrößerung 200x, Trichomfärbung nach Masson und Goldner)

Osteolysen

In Anlehnung an Weiler et al. [84] und Hoffmann et al. [32] fand eine Bewertung der Schwere von Osteolysen statt. Hierbei erfolgte eine Unterteilung in nicht vorhandene (O-0), milde (O-1), mäßige (O-2) und stark ausgeprägte Osteolysen (O-3). Die Messung dieser Osteolysen fand longitudinal zur Sagittalebene statt, wobei milde Osteolysen weniger als 1mm, mäßige 1-3mm und starke Osteolysen mehr als 3mm maßen. Eine deutliche Anzahl von Osteoklasten ist dabei für die Bewertung der Osteolyse wichtig.

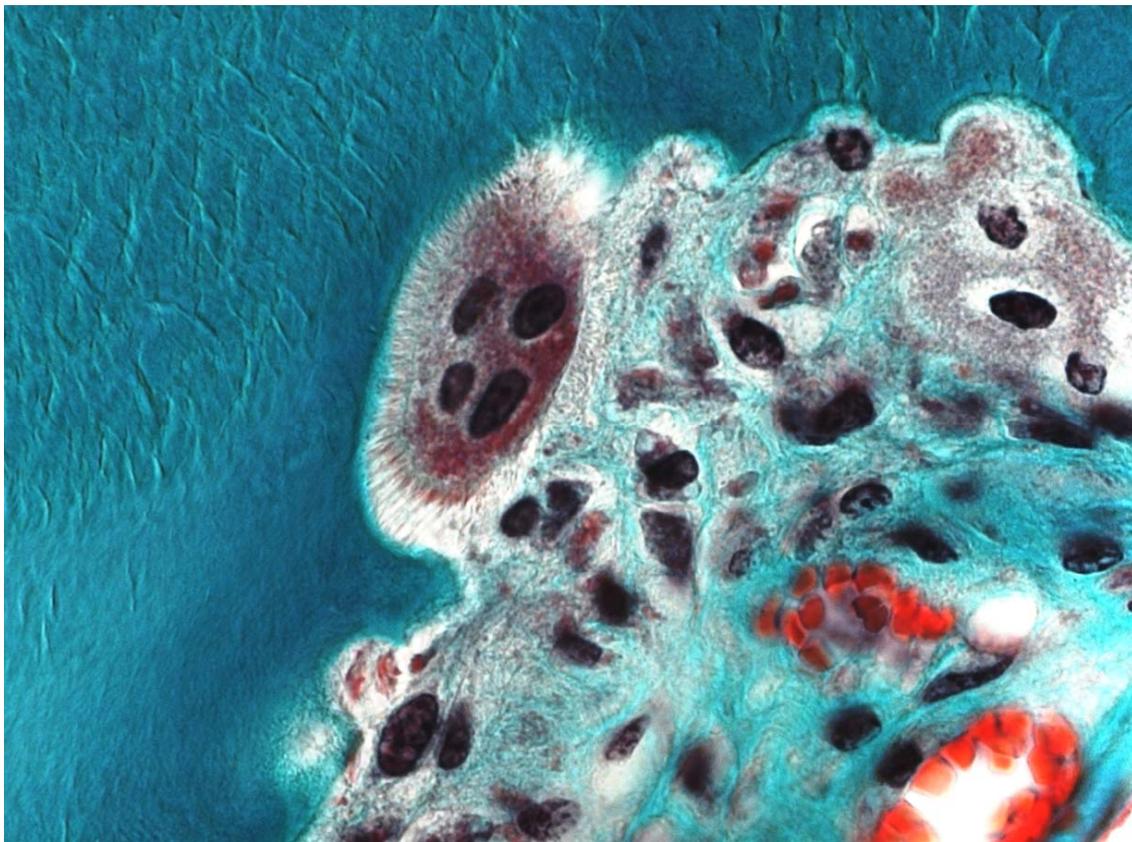


Abbildung 12:

Darstellung eines einzelnen Osteoklasten innerhalb seiner Howshipschen Lakune (Präparat 5, Vergrößerung 1000x, Trichomfärbung nach Masson und Goldner)

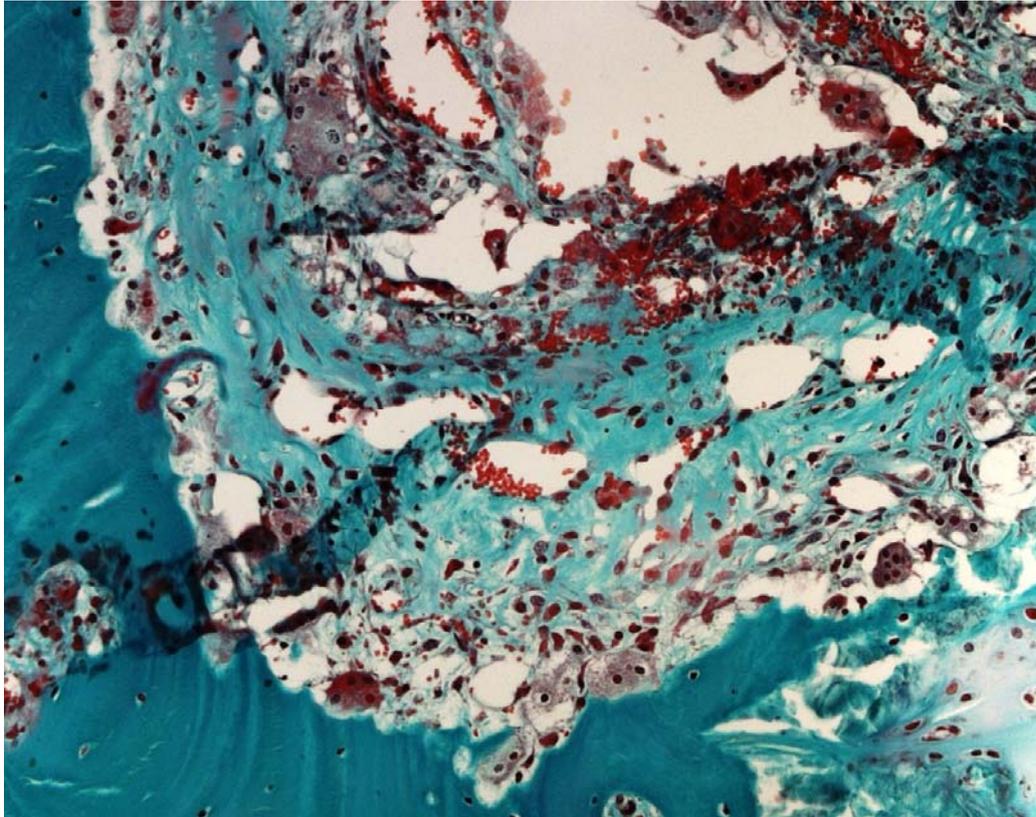


Abbildung 13:

Darstellung der erhöhten osteoklastischen Aktivität innerhalb einer osteolytischen Zone. Zusätzlich zu erkennen ist eine mäßige Fremdkörperreaktion (Präparat 22, Vergrößerung 200x, Trichomfärbung nach Masson und Goldner)

Implantatgeometrie

Bei der Einteilung der Implantatgeometrie wurde unterschieden zwischen unveränderter (I-0), noch weitestgehend erkennbarer (I-1) und völlig destrukturierter Geometrie (I-2). Hierbei wurden der ventrale und der dorsale Anteil des Implantates einzeln betrachtet.

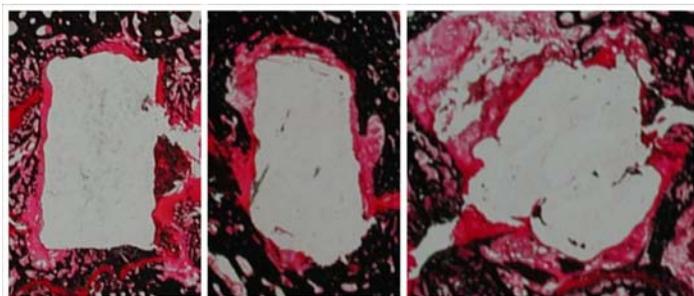


Abbildung 14:

Dargestellt ist die Einteilung der Implantatgeometrie, links I-0, mittig I-1 und rechts I-2. Kombinierte von Kossa / Safranin-Orange Färbung der Präparate 1, 27 und 26.

Ventraler Kallus

Die Anwesenheit sowie die Gewebequalität von ventralem Kallus wurden morphologisch beschrieben. Hierbei wurde zwischen Knochen, Knorpel und Bindegewebe unterschieden.

3.2.2 Statistik

Die statistische Analyse erfolgte mit SPSS (statistical package for social sciences) für Windows 12.0 (SPSS Deutschland GmbH, München, Deutschland). Aufgrund der kleinen Gruppengröße wurde eine Nichtnormalverteilung angenommen und dies durch die Darstellung im Histogramm überprüft. Zur Analyse der Daten wurde der U-Test nach Mann-Whitney, ein Zwei-Stichproben-Test für unabhängige Stichproben, verwandt. Eine Korrektur des Signifikanzniveaus erfolgte im Anschluss nach Bonferroni-Holm. Die Ergebnisse wurden von einem Biomathematiker (Institut für Biometrie und klinische Epidemiologie, CCM Charité Hochschulmedizin Berlin, Charitéplatz 1, 10098 Berlin) überprüft.

4 Ergebnisse

4.1 Histomorphometrie

4.1.1 Prozentualer Anteil der Knochenfläche an der Gesamtfläche der ROI

Der Anteil der Knochenfläche an der ROI ist in den Gruppen I, II und IV, deren Mediane zwischen 34,4% und 37,5% rangieren, signifikant höher als in Gruppe V, hier liegt der Median der Knochenfläche um 22,9%. Aufgrund der größeren Streubreite der Werte ist kein signifikanter Unterschied der Gruppen II und V nachweisbar. Die mediane Knochenfläche wurde hier mit 31,4% gemessen. (Abb. 15)

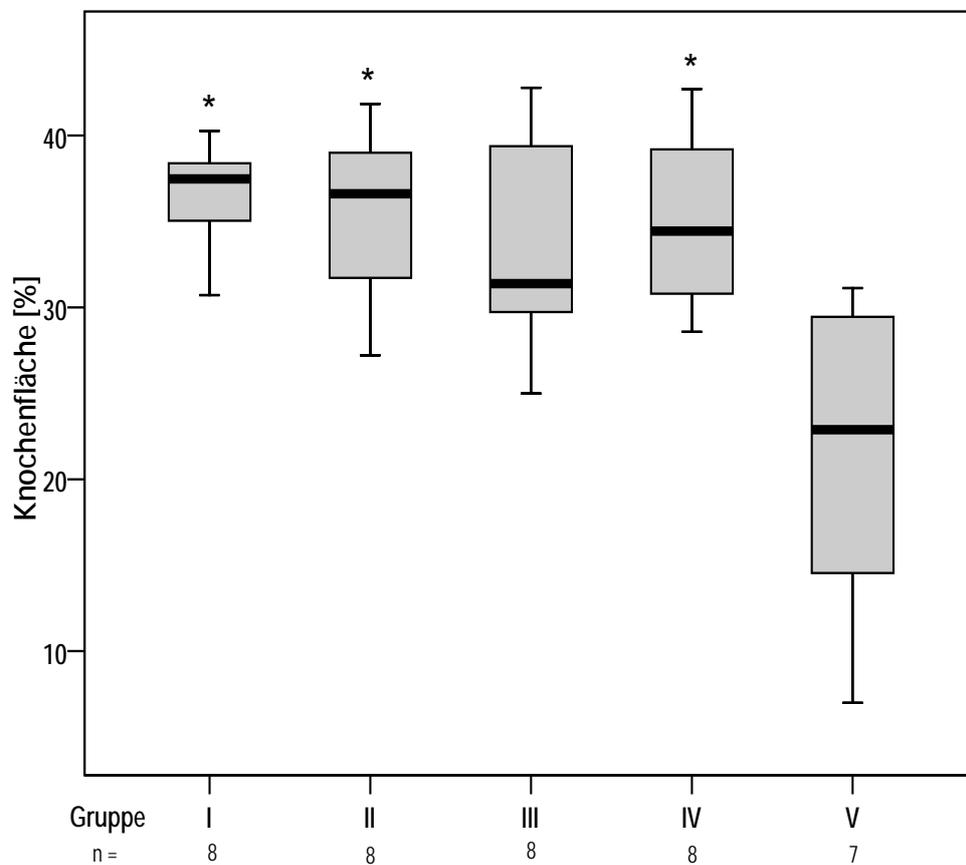


Abbildung 15:

Darstellung des prozentualen Anteils der Knochenfläche der ROI. * signifikant gegenüber Gruppe V (I vs. V $p=0,001$; II vs. V $p=0,004$; IV vs. V $p=0,006$)

4.1.2 Prozentualer Anteil der Knorpelfläche an der Gesamtfläche der ROI

Der Anteil der Knorpelfläche an der ROI ist in den Gruppen I und IV signifikant höher als in Gruppe II bzw. in den Gruppen I, III und IV signifikant höher als in Gruppe V. Dabei rangieren die gemessenen medianen Anteile der Knorpelfläche der Gruppen I, II und IV zwischen 1,9% und 2,6%. Zwischen den beiden Gruppen mit der niedrigsten Knorpelfläche konnten keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden. Der Median der Knorpelfläche liegt hier, Gruppe II, bei 0,6%, die gemessene Knorpelfläche der Gruppe V beträgt 0,2%. (Abb. 16)

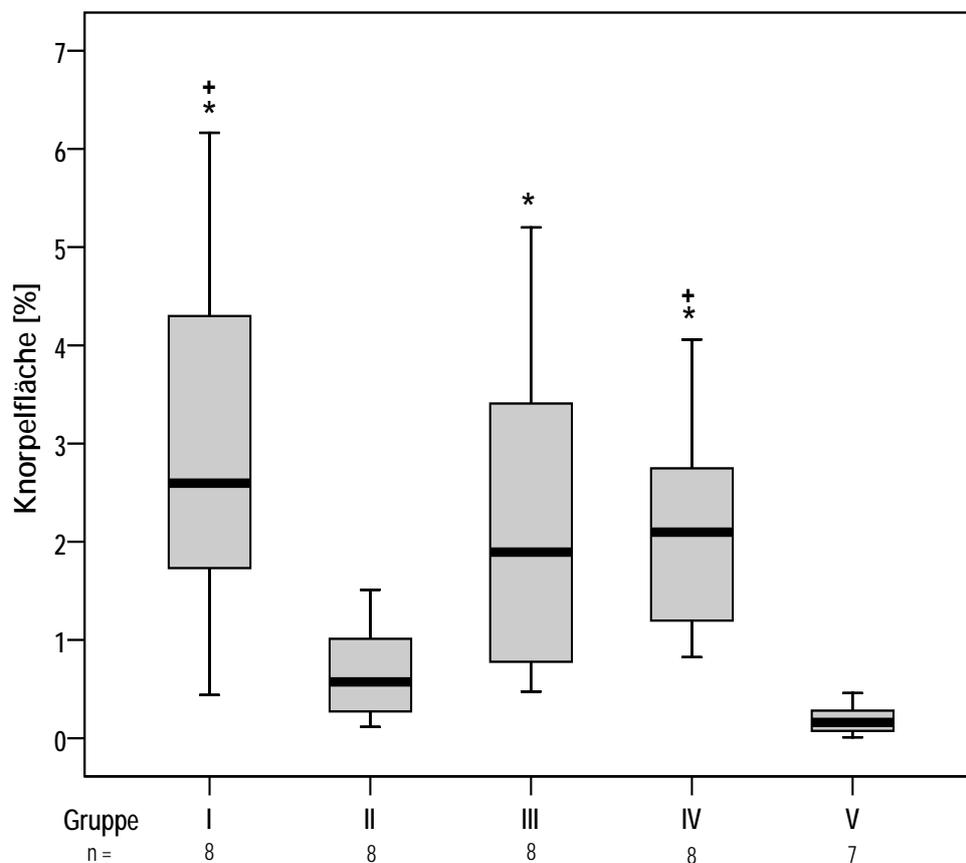


Abbildung 16:

Darstellung des prozentualen Anteils der Knorpelfläche an der Fläche der ROI. * signifikant gegenüber Gruppe V (I vs. V $p=0,001$, III vs. V $p<0,001$; IV vs. $p<0,001$), + signifikant gegenüber Gruppe II (I vs. II $p=0,002$; IV vs. II $p=0,005$)

4.1.3 Prozentualer Anteil der mineralisierten Knorpelfläche an der Gesamtknorpelfläche

Der Anteil mineralisierter Knorpelfläche an der Gesamtknorpelfläche ist in den Gruppen II und III signifikant höher als in Gruppe I und signifikant höher als in Gruppe V. Zwischen den Gruppen II (wachstumsfaktoraugmentiert) und III konnte dabei kein signifikanter Unterschied nachgewiesen werden. Der Median der Gruppe II liegt mit 39,8% höher als nach neun Monaten ohne Wachstumsfaktoren (Gruppe III), hier liegt der Anteil mineralisierten Knorpels bei 32,5%. Der Abfall des Anteils mineralisierten Knorpels nach einem Jahr stellt sich mit 8,1% deutlich dar, ist jedoch aufgrund der größeren Streuung der Werte nicht signifikant. Die Gruppen mit dem niedrigsten Anteil mineralisierten Knorpels, Gruppe I, IV und V zeigen untereinander keine signifikanten Unterschiede, ihre Mediane rangieren zwischen 4,4% und 11,3%. (Abb. 17)

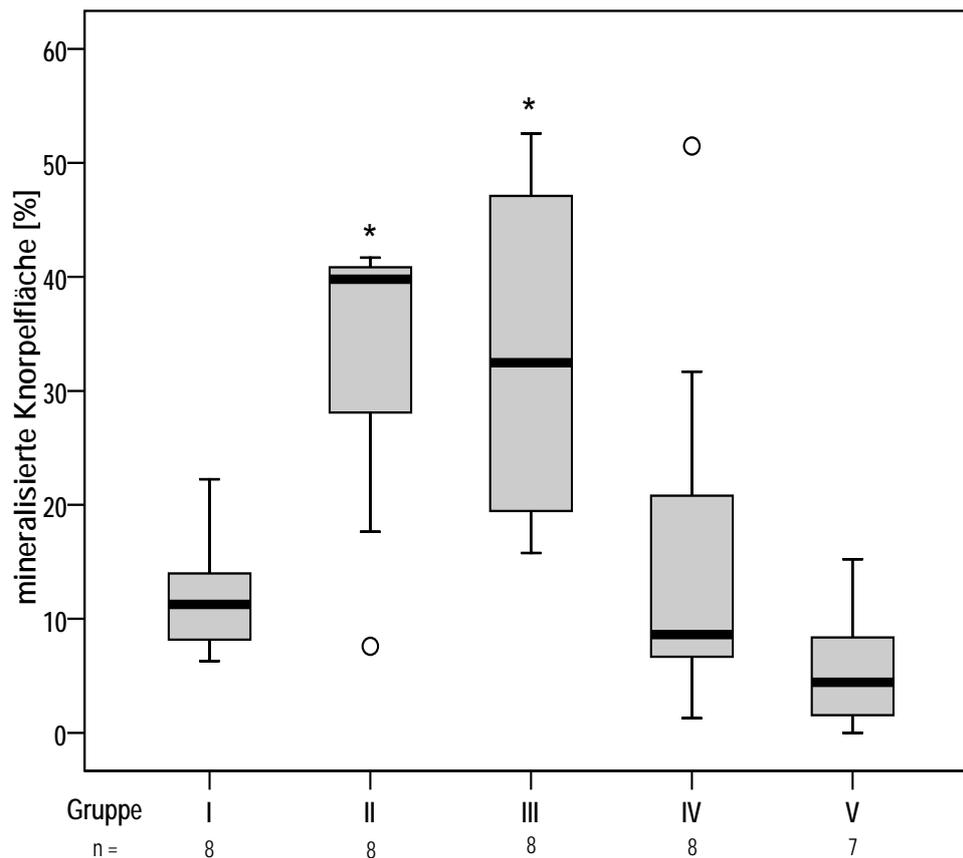


Abbildung 17:

Darstellung des prozentualen Anteils der mineralisierten Knorpelfläche an der Gesamtknorpelfläche. * signifikant sowohl gegenüber Gruppe I (I vs. II $p=0,007$; I vs. II $p=0,001$) als auch Gruppe V (V vs. III $p=0,001$; V vs. II $p<0,001$). ○ Ausreißer.

4.2 Histomorphologie des Fusionsspaltes

4.2.1 Intervertebrale Fusion

Punktwerte		Gruppe I 12 Wochen	Gruppe II 12 Wochen mit Beschichtung	Gruppe III 9 Monate	Gruppe IV 12 Monate	Gruppe V 24 Monate
1	F-1	2	1	3	2	1
2	F-2	3	3	1	3	2
3	F-3	3	4	4	3	4
	Punkte	17	19	17	17	19

Tabelle 1:

Aufstellung der nachgewiesenen Fusionen, F-1 komplette Fusion, F-2 partielle Fusion, F-3 keine Fusion, und ihrer Wichtung.

In der Frühphase der Spondylodese (Gruppe I) konnten in fünf von acht Fällen Fusionen nachgewiesen werden, in zwei dieser Fälle handelte es sich um komplette Fusionen. Nach neun Monaten konnten in drei von acht Fällen komplette Fusionen nachgewiesen werden, fusioniert waren in dieser Gruppe insgesamt vier von acht Präparaten. Bezüglich kompletter Fusionen sinkt deren Anzahl ab diesem Zeitpunkt ab, sodass nach zwei Jahren lediglich noch in einem von sieben Präparaten eine komplette Fusion nachweisbar ist, insgesamt sind nach zwei Jahren in drei von sieben Fällen Fusionen nachweisbar.

Die Beschichtung der Implantate mit Wachstumsfaktoren (Gruppe II) zeigte in der Frühphase der Spondylodese keine Erhöhung der Fusionsraten. Insgesamt lassen sich hier in vier von sieben Fällen Fusionen nachweisen, in einem dieser Präparate zeigte sich eine komplette Fusion (Tabelle 1).

4.2.2 Gewebetypisierung im Fusionsspalt

Punktwerte		Gruppe I 12 Wochen	Gruppe II 12 Wochen mit Beschichtung	Gruppe III 9 Monate	Gruppe IV 12 Monate	Gruppe V 24 Monate
8	G-0	1	---	---	---	---
7	G-1	---	3	1	---	4
6	G-2	1	2	---	---	---
5	G-3	1	---	1	2	---
4	G-4	---	1	2	1	---
3	G-5	3	1	1	3	2
2	G-6	2	1	2	2	---
1	G-7	---	----	1	---	1
	Punkte	32	42	28	27	35

Tabelle 2:

Aufstellung der Ergebnisse der Gewebequalität des Fusionsspalt und ihre Wichtung. G-0 Deditus bzw. leerer Fusionsspalt, G-1 indgewebe, G-2 mehr Bindegewebe als Knorpel, G-3 mehr Knorpel als Bindegewebe, G-4 Knorpel, G-5 mehr Knorpel als Knochen, G-6 mehr Knochen als Knorpel, G-7 Knochen.

Die Gewebequalität des Fusionsspalt nimmt bis zum ersten postoperativen Jahr stetig zu und fällt zum Untersuchungszeitpunkt zwei Jahre postoperativ auf Werte der frühen Fusionsphase. In dieser, Gruppe I zeigt die Augmentation mit Wachstumsfaktoren im Vergleich, Gruppe II, keine Vorteile. Beim vorherrschenden Gewebe des Fusionsspalt handelt es sich hier vornehmlich um Bindegewebe (Tabelle 2).

4.2.3 Fremdkörperreaktion im Fusionsspalt

Punktwerte		Gruppe I 12 Wochen	Gruppe II 12 Wochen mit Beschichtung	Gruppe III 9 Monate	Gruppe IV 12 Monate	Gruppe V 24 Monate
1	R-0	4	---	4	1	---
2	R-1	3	1	1	---	1
3	R-2	---	1	3	4	3
4	R-3	1	6	---	3	3
5	R-4	---	---	---	---	---
	Punkte	14	29	15	25	23

Tabelle 3:

Aufstellung der Ergebnisse der Fremdkörperreaktion und ihre Wichtung. R-0 keine Fremdkörperreaktion, R-1 schwache Fremdkörperreaktion, R-2 milde Fremdkörperreaktion, R-3 mäßige Fremdkörperreaktion, R-4 starke Fremdkörperreaktion.

Die Schwere der Fremdkörperreaktion nimmt im zeitlichen Verlauf zu, sodass nach einem Jahr sieben von acht Präparaten milde und mäßige Reaktionen aufweisen. Eine Beobachtung in der Frühphase der Fusion war eine deutlich stärker ausgeprägte Fremdkörperreaktion in der Wachstumsfaktoraugmentierten Gruppe (II) im Vergleich zur Gruppe ohne Augmentation (Gruppe I) (Tabelle 3).

4.2.4 Vaskularisation im Fusionspalt

Punktwerte		Gruppe I 12 Wochen	Gruppe II 12 Wochen mit Beschichtung	Gruppe III 9 Monate	Gruppe IV 12 Monate	Gruppe V 24 Monate
1	V-0	1	---	1	1	---
2	V-1	3	---	3	3	1
3	V-2	---	---	3	3	5
4	V-3	4	8	1	1	1
	Punkte	21	24	20	20	21

Tabelle 4:

Aufstellung der Ergebnisse der Vaskularisation im Fusionspalt und ihre Wichtung. V-0 keine Gefäße nachweisbar, V-1 vereinzelte Gefäße, V-2 deutliche Gefäße, V-3 Hypervaskularisation.

Eine Zunahme der im Präparat vorhandenen Gefäße konnte ebenfalls beobachtet werden. Auch hier ist die Zunahme nicht nur im zeitlichen Verlauf zu beobachten, in der Gruppe mit Wachstumsfaktoraugmentation liegt, im Vergleich zu allen nicht augmentierten Gruppen, eine deutliche Hypervaskularisation vor (Tabelle 4).

4.2.5 Osteolysen der angrenzenden Wirbelkörper

Punktwerte		Gruppe I 12 Wochen	Gruppe II 12 Wochen mit Beschichtung	Gruppe III 9 Monate	Gruppe IV 12 Monate	Gruppe V 24 Monate
1	O-0	6	5	6	3	3
2	O-1	1	1	---	---	---
3	O-2	1	1	1	5	---
4	O-3	---	1	1	---	4
	Punkte	12	14	13	18	19

Tabelle 5:

Aufstellung der Ergebnisse der Osteolysen im Fusionspalt und ihre Wichtung. O-0 keine Osteolysen nachweisbar, O-1 milde Osteolysen bis 1mm, O-2 mäßige Osteolysen 1-3 mm, O-3 starke Osteolysen größer als 3mm.

Die Stärke der beobachteten Osteolysen nahm im zeitlichen Verlauf zu, wobei ein deutlicher Sprung in der Ausprägung der implantatnah gemessenen Osteolysen nach einem Jahr zu

verzeichnen war. Die Augmentation mit Wachstumsfaktoren zeigt hier einen leichten Trend zu lytischem Geschehen (Tabelle 5).

4.2.6 Analyse der Implantatgeometrie im Verlauf

Punktwerte		Gruppe I 12 Wochen	Gruppe II 12 Wochen mit Beschichtung	Gruppe III 9 Monate	Gruppe IV 12 Monate	Gruppe V 24 Monate
1	I-0	11	7	2	2	---
2	I-1	4	9	7	6	---
3	I-2	1	---	7	8	14
	Punkte	25	25	37	38	42

Tabelle 6:

Aufstellung der Ergebnisse der Implantatgeometrie des ventralen und dorsalen Cageanteil (zusammen n=16, bzw. n=14 in Gruppe V) und ihre Wichtung. I-0 Geometrie erhalten, I-1 Geometrie weitestgehend erhalten, I-2 ursprüngliche Geometrie nicht mehr erkennbar.

Die Cagegeometrie nimmt im Zuge der Implantatdegradation im Zeitverlauf deutlich ab, wobei die geringsten Unterschiede die Gruppen III und IV im Vergleich miteinander aufweisen (Tabelle 6).

4.2.7 Analyse der ventralen Kallusstärke im Verlauf

	Gruppe I 12 Wochen	Gruppe II 12 Wochen mit Beschichtung	Gruppe III 9 Monate	Gruppe IV 12 Monate	Gruppe V 24 Monate
Kallusdicke	3,5 mm	4,25 mm	4,25 mm	4,5 mm	5 mm

Tabelle 7:

Übersicht der gemessenen ventralen Kallusstärken.

Die Stärke des ventralen Kallus zeigt eine deutliche Zunahme und erreicht ihre größte Stärke ein Jahr postoperativ und bleibt dann konstant. Die wachstumsfaktoraugmentierte Gruppe (II) weist hierbei eine Kallusstärke auf wie sie ohne Wachstumsfaktoren erst nach neun Monaten erreicht wird (Tabelle 7).

4.2.8 Sonstiges

Ein Tier der Gruppe V (Nr. 37) musste nach 17 Monaten wegen progredienter Tetraplegie,

aufgrund eines Implantatprolapses vorzeitig getötet werden. Bei diesem Tier lag der Anteil der Knochenfläche an der Gesamtfläche der ROI bei 30,79%, der Knorpelanteil an der Gesamtfläche der ROI bei 0,05% und der Anteil mineralisierten Knorpels an der Gesamtknorpelfläche bei 23,48%. Das Präparat des Tieres 37 zeigte eine komplette Fusion (F-1) und als Gewebe des Fusionsspaltes ausschließlich Knochen (G-7). Fremdkörperreaktionen (R-0), Gefäße (V-0) oder Osteolysen (O-0) waren im Fusionsgebiet nicht erkennbar. Die Geometrie des ventralen Implantatanteiles war noch weitgehend erkennbar (I-1), am dorsalen Implantatteil war diese zerstört (I-2). Der ventrale Kallus stellte sich mit einer Dicke von 5 mm als reifer lamellärer Knochen dar.

In Gruppe V wiesen vier Tiere ein in den Spinalkanal prolabierte(n) Anteil des Implantates auf. Bei Tier Nr. 37 fand sich ein 9 mm messender Prolaps, Tier Nr. 36 zeigte ein 5 mm messenden Prolaps, Tier Nr. 32 zeigte einen 8 mm messenden Prolaps und Tier Nr. 31 zeigte einen 3 mm messenden Prolaps. In derselben Gruppe fanden sich in zwei Fällen große, mit Implantatfragmenten, Detritus und Bindegewebe gefüllte ossäre Defektzonen im Bereich des ehemaligen Implantatlagers

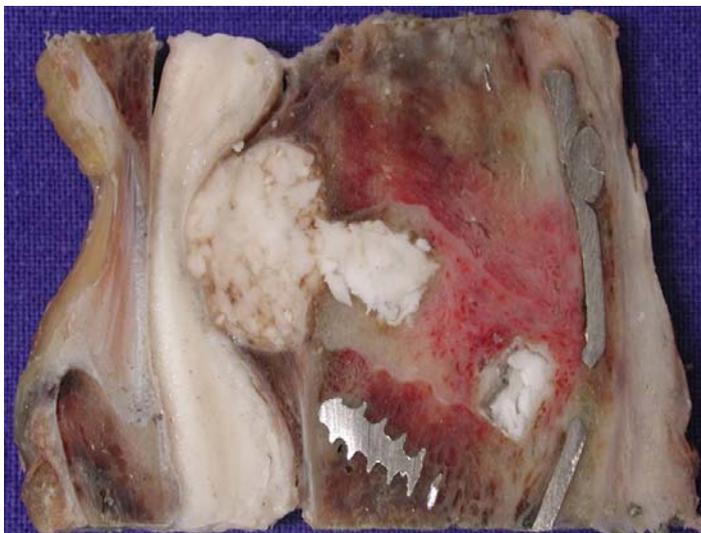


Abbildung 18:

Darstellung eines 9 mm messenden Implantatprolapses in den Spinalkanal mit Myelonkompression. Sägepräparat des Tieres 37.



Abbildung 19:

Darstellung eines 8 mm messenden Implantatprolapses in den Spinalkanal (linkes Bild, Sägepräparat des Tieres 32). Ebenfalls dargestellt sind zwei Präparate mit massivem ossären Defekt. (kombinierte von Kossa / Safranin-Orange Färbung der Präparate 32 (mitte) und 38 (rechts))

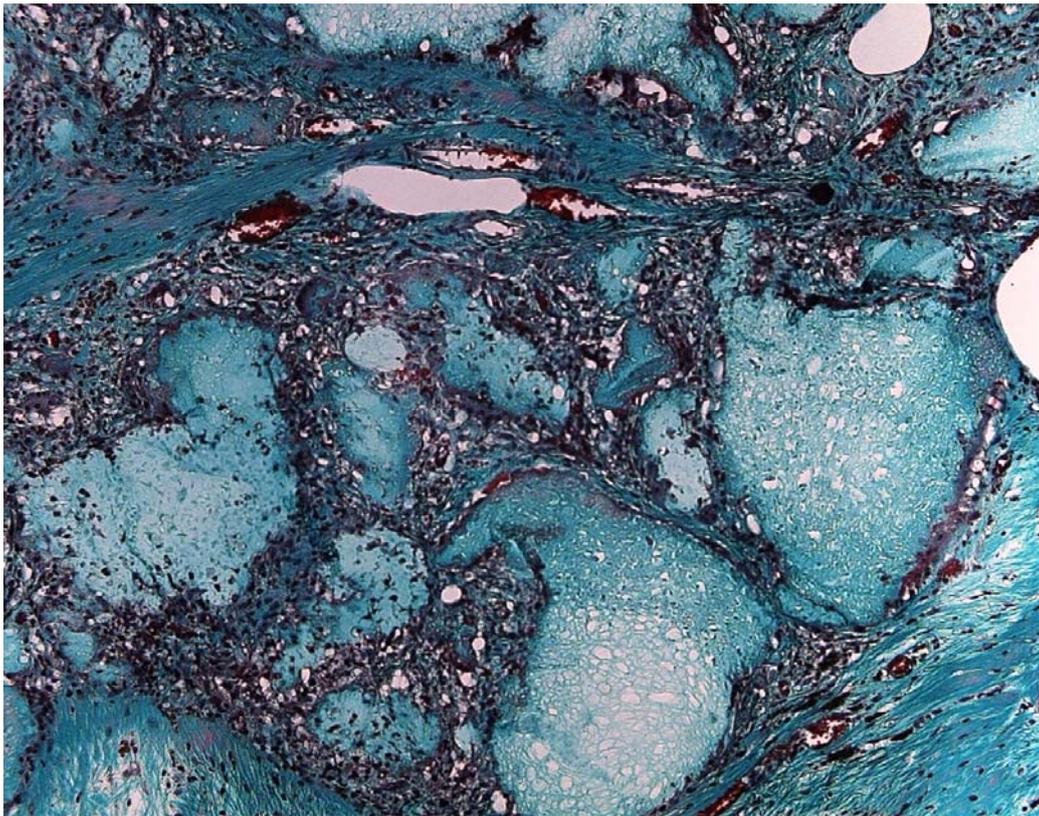


Abbildung 20:

Darstellung des von Bindegewebe und Entzündungszellen gesäumten Implantatdedritus (Präparat 38, Vergrößerung 200x, Trichomfärbung nach Masson und Goldner)

5 Diskussion

Die Resultate der vorliegenden tierexperimentellen Arbeit beschreiben und quantifizieren auf histologischer Ebene die Integration eines biodegradierbaren Implantates für die zervikale Spondylodese der Schafswirbelsäule. Es konnte gezeigt werden, dass sich im Tiermodell der Schafshalswirbelsäule die Biodegradibilität resorbierbarer Cages und die zelluläre Knochen-Implantat-Interaktion sowohl in der Frühphase (12 Wochen) unter verschiedenen Bedingungen (mit und ohne Wachstumsfaktorenbeschichtung) als auch im Langzeitversuch (2 Jahre) zuverlässig untersuchen lassen. Die Ergebnisse der detaillierten histomorphometrischen Untersuchungen und semiquantitativen Analysen zeigen unter Berücksichtigung verschiedener Knochen-/Kallusparameter sowie Implantat-induzierter Reaktionsmuster ein sehr heterogenes Bild. Die Resultate sind in erster Linie durch eine im Vergleich zu den 2-Jahresergebnissen signifikant erhöhte Knochenfläche, mineralisierte und nicht-mineralisierte Knorpelfläche in den Untersuchungen bis 1 Jahr postoperativ gekennzeichnet. Ferner zeigen die Parameter Gewebequalität, Fremdkörperreaktion, Grund-/Deckplatten-nahe Osteolysen und Vaskularisation im Fusionsspalt zu den verschiedenen Zeitpunkten eine ganz unterschiedliche Ausprägung mit ebenfalls zunehmender Intensität am Ende des Untersuchungszeitraumes. Dass die Dynamik dieser Veränderung sowie die dadurch bedingte geringe Fusionsrate zu 2 Jahren postoperativ im engen kausal-pathogenetischen Zusammenhang mit der Degradationskinetik des Implantates steht, wird durch den zeitgleich ablaufenden, progredienten Verlust der Implantatgeometrie verdeutlicht. Eine Beschichtung des Implantates konnte dabei in der Frühphase der Fusion weder eine Reduktion noch Akzentuierung der knöchernen Fusionsrate und Implantat-induzierten, negativen Veränderungen im umliegenden Knochen bewirken.

Tiermodell der Schafshalswirbelsäule

Mehrere Voruntersuchungen konnten zeigen, dass die Schafswirbelsäule hinsichtlich der Anatomie und Biomechanik ein valides Modell zur Bearbeitung klinisch relevanter Fragestellungen ist [37, 87, 88]. Insbesondere im Bewegungssegment C3/4 zeigte sich die ausgeprägteste Übereinstimmung mit der humanen Situation. So ist dieses Segment in der Konfiguration der Bandscheibenfächer, der Ausmaße der Wirbelkörper und der Stellung der Gelenkfacetten der menschlichen Halswirbelsäule am ähnlichsten [37, 87, 88]. Zahlreiche wirbelsäulenchirurgische Studien haben aus diesem Grund bereits auf das Schafswirbelsäulenmodell zurückgegriffen [25, 34, 41, 72]

So konnten Kandziora et al. in einer in vitro Studie radiographische und biomechanische Übereinstimmungen zwischen oviner und humaner Halswirbelsäulen feststellen. Im Vergleich zu humanen HWS-Präparaten zeigten sich trotz unterschiedlichen Werten für Flexion, Extension und axialer Rotation keine Unterschiede in den intervertebralen Winkeln, den Grund-/Deckplattenparametern und ähnliche Werte in der Knochenmineralisation (BMD) [37].

Trotz dieser anatomischen und biomechanischen Ähnlichkeiten, bestehen McAfee et al. zufolge Unterschiede hinsichtlich der statischen Krafteinwirkung an der Wirbelsäule von Zwei- und Vierbeinern [50]. Ebenfalls anzumerken ist, dass in Hinsicht auf eine nachfolgend durchzuführende Spondylodese, eine künstlich, d.h. experimentell geschaffene Instabilität im Modell andere biomechanische und histologische Reaktionsmuster zeigt als degenerativ, tumorös oder posttraumatisch-induzierte Instabilitäten.

Ferner besitzt das Schaf eine zum Menschen differente Knochenstruktur. Hinsichtlich dieser Problematik wären andere Tiere, wie zum Beispiel Hunde oder Primaten, besser geeignet. Dies ist jedoch mit ethischen Bedenken behaftet [23]. In diesem Zusammenhang und unter dem Aspekt, dass alternative Großtiermodelle, aufgrund geringeren Knochenmineralisierung und Neigung zu Frakturen nicht geeignet sind [60], wurde für biomechanische und histomorphologische Untersuchungen der ventralen zervikalen Spondylodese das Tiermodell der Schafswirbelsäule verwendet. Die Größe der Versuchsgruppen wurde mit acht Tieren pro Gruppe so gewählt, dass trotz eines Ausfalls ein Vergleich der Gruppen untereinander möglich bleibt.

Ventrale interkorporelle Fusion, intervertebrale Cages und Biodegradierbarkeit

Obwohl die ventrale Diskektomie, Dekompression und interkorporelle Fusion mittels trikortikalem Beckenkammspan nach wie vor die am häufigsten verwendete Methode darstellt, gewinnen intervertebrale Cages als Implantate zunehmend an Bedeutung. Dabei kommen zur ventralen zervikalen Spondylodese verschiedenste Materialien als Implantate zum Einsatz [16, 31, 42, 47, 48, 59, 86]. Sie alle haben jedoch unterschiedliche Vor- und Nachteile. So kommt es in Abhängigkeit von Material und Cagedesign zu Implantatversagen, Pseudarthrosenbildung und bei metallischen Implantaten zur Erzeugung von Artefakten bei radiologischen Untersuchungen [16, 31, 42, 86]. Ferner führen Metallcages zu Problemen im Langzeitverlauf, wie Cagemigration, Lockerung, Anschlussdegeneration aufgrund der hohen Steifigkeit, „stress shielding“ Phänomenen innerhalb des Cages und damit reduzierter

interkorporeller knöcherner Fusion [73]. Insbesondere aber in Hinsicht auf die Artefaktbildung metallischer Cages in CT- und MRT-Untersuchungen mit verminderter Beurteilbarkeit der Fusion oder aber eines Lokalrezidives nach Tumorresektionen, wurden biodegradierbare Materialien entwickelt. Inwieweit diese jedoch diese Nachteile auch auf lange Sicht umgehen können, bleibt unklar [86]. Obgleich eine reduzierte Artefaktbildung in radiographischen Untersuchungen, ein reduziertes „stress shielding“, geringere Probleme bei einer späteren Revision und möglicherweise notwendigen Implantatentfernung erwartet werden, sind auch Komplikationen durch die Degradation dieser Implantate und den damit verbundenen Biokompatibilitätsproblemen (Osteolysen, Fremdkörperreaktionen, Entzündungen, Verlust der Cagegeometrie etc) berichtet worden [11-13, 17, 28, 56, 58, 82, 84, 85].

Ziel dieser Arbeit, die Teil eines Gesamtprojektes ist, war es, ein neues, biodegradierbares Implantat für die ventrale Spondylodese am Bewegungssegment C3/4 histologisch zu evaluieren. Diese Evaluation erfolgte nach drei, neun, 12 und 24 Monaten. Zusätzlich erfolgte ein Vergleich der Optimierung der knöchernen Durchbauung und Gewebequalität durch Wachstumsfaktoren zu einem frühen Zeitpunkt (12 Wochen) der Fusion.

Zur histomorphometrischen Analyse wurde das bereits etablierte KS 400 Bildanalyzesystem [39], welches anhand der unterschiedlichen Anfärbbarkeit von Geweben deren prozentualen Anteil an einer definierten ROI [39] errechnet, verwendet. Beim Vorliegen von Rissartefakten wurden diese manuell markiert und von der ROI ausgeschlossen.

Bislang liegen verschiedene Arbeiten zur Beurteilung der Fusionsqualität vor. So unterscheiden Zdeblick et al. [91] in ihren Fusionsscores zwischen der Gewebequalität an den Oberflächen und im Inneren eines BAK-Cages. Dieser Implantattyp ist jedoch im Gegensatz zu dem in der vorliegenden Arbeit verwendeten Implantat, in einem Schraubendesign gehalten. Bei solchen Implantaten verläuft die Pore horizontal zu den angrenzenden Deck- und Grundplatten. Der Nachweis von durch die Pore verlaufenden, die angrenzende Deck- und Grundplatte verbindenden Knochenbrücken, ist demzufolge hier nicht möglich. Da in diesem Bewertungsmodus der Nachweis einer durchgehenden, die Deck- und Grundplatte verbindenden Knochenbrücke nicht geführt werden kann, wurde zur Bewertung der Fusion in der vorliegenden Arbeit auf ein von Toth et al. [79] publizierte Fusionsscore zurückgegriffen. Hier fanden gleichfalls Implantate im Schraubendesign ihre Anwendung, deren Poren jedoch vertikal zur angrenzende Deck- und Grundplatte verliefen. Auch beim Resorbon[®]-Implantat verläuft diese vertikal und eine genauere Analyse der die Pore

durchlaufenden Knochenbrücke ist damit möglich. Eine Unterscheidung zwischen kompletter, partieller und nicht stattgehabter Fusion scheint sinnvoll, um der Zweidimensionalität der histologischen Untersuchungsmethode gerecht zu werden. Toth et al. [79] beobachteten bei implantierten PLDLLA-Cages im Verlauf ansteigende Fusionsraten mit 100% nach 12 Monaten und zu früheren Beobachtungszeiträumen lediglich eine milde Fremdkörperreaktion zu der nach 12 Monaten noch Anzeichen einer akuten Entzündung kommen, die jedoch weder Einfluss auf die Fusionsraten zu haben scheint, noch zu Osteolysen führt, da Toth et al. solche nicht nachweisen konnten. In dieser Arbeit konnte jedoch, gestützt durch den konstant bleibenden Anteil der Knochenfläche, keine Steigerung der Fusionsrate beobachtet werden. Diese fielen, wie auch die Knochenfläche nach zwei Jahren deutlich ab. Gleichzeitig stiegen die beobachteten Fremdkörperreaktionen und Osteolysen, sodass in dieser Arbeit ein Zusammenhang zwischen schlechten Fusionsraten und starker Inflammation zu beobachten war. Resorbon[®] scheint während seiner Degradation eine schlechtere Biokompatibilität als das von Toth et al. eingesetzte PLDLLA Implantat zu haben und somit zu schlechteren Ergebnissen bezüglich der knöchernen Fusion zu führen.

Die Gewebequalität innerhalb einer zu fusionierenden Zone wurde bereits von Emrey et al. [24] mit der Fragestellung nach dem Einfluss der Bestrahlung auf die Fusionsrate beschrieben. Die Qualität nimmt von Bindegewebe über Knorpel bis hin zum knöchernen Gewebe zu und wird im Score zur Fusionsevaluation höher bewertet. Das Modell stellt ebenfalls eine Fusionsbewertung dar, die besser auf die nicht mineralisierten Gewebe innerhalb einer Fusionszone eingeht. Um die Beschreibung der Fusion nach einer ventralen zervikalen Spondylodese zu ergänzen, kam auch Emreys, ursprünglich am Hund etablierte Modell, mit welchem er nachwies das eine postoperative Bestrahlung nach erst zehn Tagen zu gleichen Geweben im Operationsgebiet führt wie ohne Bestrahlung, zur Anwendung. Bei ausbleibender Fusion ist dabei Knorpel als vorherrschendes Gewebe im Fusionspalt als hochwertiger angesehen als Bindegewebe, da dieser in entsprechender Umgebung eher mineralisiert.

Zur Evaluation von Fremdkörperreaktionen bei der Degradation von resorbierbaren Materialien an der Wirbelsäule wurde auf ein von Duranti et al. [22] publiziertes Modell zurückgegriffen. Hierbei wurde die Gewebereaktion auf resorbierbare kollagene Implantate zur subkutanen Augmentation bewertet. Zwar handelt es sich im Original nicht um eine Anwendung an der knöchernen Wirbelsäule, jedoch sind die Prinzipien der Reaktion auf Fremdkörper sowohl im Knochen als auch in Weichgeweben ähnlich. Da jedoch am Knochen

die Reaktion auf Fremdkörper eine Osteolyse zur Folge haben kann, wurde zur Ergänzung ein radiologisches Punktesystem zur Beurteilung von Osteolysen am Knochen, als Reaktion auf Fremdmaterialien, herangezogen [32, 84]. Bei dem von Weiler und Hoffmann publizierten Score kamen, wie in dieser Arbeit, resorbierbare Implantate zur Anwendung. In Anlehnung an diesen klinisch-radiologischen Score wurden osteolytische Areale in den Präparaten in ihrer sagittalen Ausdehnung vermessen. Dieses hat den Vorteil dass kleine Osteolysen detektiert werden können, die im konventionellen Röntgenbild durch Überlagerungen nicht sichtbar wären. Weiler et al. konnten in ihrer Arbeit über den Einsatz von resorbierbaren PGA Schrauben zur Refixation osteochondraler Fragmente im Schafknie nach 4 Wochen bereits schwere Osteolysen nachweisen. Nach drei und sechs Monaten waren schwere, konfluierende Osteolysen das überwiegende sich zeigende Bild. In zwei von 12 Fällen zeigte sich eine schwere Inflammation teilweise mit Fisteln ohne Nachweis von Bakterien. In den übrigen Präparaten konnten nur moderate Fremdkörperreaktionen nachgewiesen werden. Im Vergleich zu dem von Weiler et al. eingesetzten Implantaten scheint Resorbon[®] trotz seiner erheblichen Fremdkörperreaktion und im Verlauf zunehmender Osteolysen eine deutlich bessere Biokompatibilität aufzuweisen, jedoch ist hier nicht klar, wann der „Peak“ der Degradation erreicht ist und inwiefern die nach zwei Jahren sichtbare Ausprägung der Osteolysen das Maximum darstellt. Weiler et al. zeigten das die Osteolysen bei PGA als schnell degradierbares Material nach 12 Monaten deutlich regredient und nach 24 Monaten praktisch nicht mehr nachweisbar waren.

Die Bewertung der Vaskularisation des implantatumgebenden Gewebes nach Emrey et al. [24] sollte über die nutritive Situation und Oxygenierung des Gewebes während der Degradation bzw. dessen Reaktion auf resorbierbare Materialien Aufschluss geben. Eine Entzündungsreaktion geht mit einer Hypervaskularisation des betroffenen Gewebes einher. Eine Entzündungsreaktion, insbesondere auf Fremdkörper, ist aber immer auch mit einer Akkumulation von leukozytären mononukleären Zellen (Phagozyten) und einer verstärkten Ausschüttung/ Exozytose lysosomaler Enzyme vergesellschaftet. Diese wirken als Proteasen zum Teil autodestruktiv, bewirken eine weitere Chemotaxis gleichartiger Zellen, führen zu einer Perpetuierung der Fremdkörperreaktionen und Verstärkung der lytischen Veränderungen benachbarter Gewebe. Auf der anderen Seite weiß man, dass eine ausbleibende oder behinderte Vaskularisation von Frakturen über eine verminderte nutritive Perfusion, Oxygenierung und venöse Drainage zu Pseudarthrosen führen kann [46]. Somit ist die Beurteilung der Vaskularisation der Fusionszone von pathogenetischer Bedeutung für die Interpretation des Ablaufes der Spondylodese.

Mit Hilfe eines etablierten Bildanalyseverfahrens [39] wurden die prozentualen Anteile einer Knochen- und Knorpelfläche innerhalb einer definierten ROI-Fläche gemessen. Ebenfalls gemessen wurden in diesem Zuge die prozentualen Anteile der mineralisierten Knorpelfläche an der vorher gemessenen Gesamtknorpelfläche. In dieser histomorphometrischen Analyse zeigte sich kein signifikanter Unterschied bezüglich der Knochenfläche zum Zeitpunkt von drei (Gruppe I und II), neun (Gruppe III) und 12 Monaten (Gruppe IV). Nach 24 Monaten (Gruppe V) sah man jedoch einen signifikanten Abfall dieses Parameters. Einige der Präparate weisen innerhalb der ROI kaum noch Knochen auf, nur Implantatreste, Detritus und Bindegewebe. Dies ist eine Folge der stattgehabten Implantatquellung, die, wie von Goferich et al. [29] beschrieben, infolge der Polymerdegradation auftritt.

Der signifikant niedrigere Anteil an Knorpel in der Gruppe II im Vergleich zur Gruppe I kann zu dem Schluss verleiten, dass die Augmentation der Implantate mit Wachstumsfaktoren zu einer frühen enchondralen Ossifikation in vivo führt. Diese Annahme wird durch den signifikant höheren Anteil mineralisierten Knorpels an der Gesamtknorpelfläche unterstützt. Vergleicht man den Anteil mineralisierten Knorpels über die Zeit (Gruppe I, III, IV und V), so fällt auf, dass dieser sein Maximum ohne Wachstumsfaktorbeschichtung erst nach neun Monaten erreicht, um dann wieder abzufallen. So ist es denkbar, dass es in der Tat durch Wachstumsfaktoren zu einer frühen enchondralen Ossifikation kommt, ohne sich jedoch auf den Anteil der Knochenfläche im Fusionsspalt auszuwirken. Allerdings nimmt die Dicke des ventralen Kallus über die Zeit zu. So erreicht auch hier der Kallus der Gruppe II bereits nach drei Monaten eine Dicke, wie dies ohne Wachstumsfaktoren erst nach neun Monaten der Fall ist. Warum allerdings eine Zunahme der mineralisierten Knochen-/ Knorpelfläche nur außerhalb des Fusionspaltes zu beobachten ist bleibt unklar. Möglicherweise hat dieses Phänomen seine Ursachen in der negativen Interaktion mit dem Cagematerial bzw. dessen Degradationsprodukten. Deren Konzentration ist im Fusionsspalt sicherlich höher als im ventralen Kallusbereich und könnte für die Zunahme der enchondralen Ossifikation in Form von Knochenfläche in Cagefernen Arealen verantwortlich sein. Wie Schmidmaier et al beschrieben haben ist die Beschichtung mit PDLLA selbst bereits für eine bessere und schnellere Frakturheilung verantwortlich [69]. In Beobachtungen an Rattentibia konnten diese Autoren unter Verwendung einer gleichen Beschichtung und Wachstumsfaktoren eine signifikant schnellere Frakturheilung mit früheren knöchernen Formationen nachweisen [68].

Auch Wildemann et al. zeigten *in vitro* eine frühere Differenzierung osteoblastärer ortsständiger Zellen und damit eine vermehrte und schnellere Kallusbildung sowie eine schnellere Differenzierung des Knorpels. Diese Tatsachen scheinen auch hier für den höheren Anteil mineralisierten Knorpels in Gruppe II verantwortlich zu sein auch wenn dies der einzige beschleunigende Effekt war der hier beobachtet werden konnte.

In der histomorphologischen Auswertung zeigte sich außerdem, dass die Gruppen II und V im Vergleich zu den anderen Gruppen schlechtere Ergebnisse bezüglich der Fusionen aufwiesen. Auch im Parameter der Gewebequalität schnitt die wachstumsfaktoraugmentierte Gruppe (II) mit einem Überwiegen von Bindegewebe in der Fusionszone schlechter ab als die nicht augmentierte Gruppe zum Zeitpunkt von drei Monaten (I). Nach einer initial mittelmäßigen Gewebequalität in Gruppe I verbessert sich diese nach neun (Gruppe III) und 12 Monaten (Gruppe IV), um dann nach zwei Jahren (Gruppe V) wieder abzunehmen. Das niedrige Niveau der Gruppe II wird jedoch nicht erreicht. In keiner der Gruppen konnte eine starke Fremdkörperreaktion beobachtet werden. Es fällt jedoch eine deutliche Häufung mäßiger Fremdkörperreaktion mit dem vermehrten Auftreten von Entzündungszellen und Fremdkörperriesenzellen innerhalb der wachstumsfaktoraugmentierten Gruppe (II) auf. Vergleicht man den Verlauf der Fremdkörperreaktion in den Gruppen I, III, IV und V, so nimmt diese, erwartungsgemäß, mit einsetzender Implantatdegradation zu und erreicht nach einem Jahr ein stabiles Niveau. Dieses wird über den restlichen Zeitraum gehalten, da die Materialdegradation auch nach zwei Jahren noch nicht abgeschlossen ist. Eine mit der steigenden Inflammation einhergehende Hypervaskularisation konnte nicht beobachtet werden. Diese zeigte sich jedoch in der Hälfte der Präparate der Gruppe I sowie in allen Präparaten der Gruppe II. Es scheint somit eher in der Frühphase der Fusion und eher durch Wachstumsfaktoren stimuliert zu einer Hypervaskularisation zu kommen. Es existieren verschiedene Arbeiten die einerseits nachweisen konnten, dass durch Hypoxie in Osteoblasten die Expression von vascular endothelial growth factor (VEGF) erhöht wird [77]. Andererseits sind verschiedene Cytokine und Wachstumsfaktoren, unter anderem IGF und TGF β -1, für die Expression von VEGF in Osteoblasten und osteoblast-like-cells verantwortlich [62]. TGF β -1 ist ein potenter Förderer der Angiogenese. In einer durch Inflammation gekennzeichneten Umgebung, in welcher verschiedenste Cytokine frei werden, ist TGF β -1 in der Lage die Expression von VEGF zu steigern [62]. VEGF wiederum ist essentiell für das Wachstum von Gefäßen [62]. In der Frühphase der Fusion ist ein gewisses Maß an Hypervaskularisation genügend durch die vorherrschende Hypoxie erklärt. Im Zuge des operativen Zuganges werden bestehende Gefäße zerstört, diese müssen neu gebildet werden.

Die so viel stärkere Hypervaskularisation der Gruppe mit Wachstumsfaktoraugmentation stützt dabei die Ergebnisse von Saadeh et al. Bei gleichem Untersuchungszeitraum sind die Gefäßeinsprossungen durch den Einsatz von IGF-1 und TGFβ-1 deutlich ausgeprägter.

Die osteolytische Aktivität nahm erwartungsgemäß mit zunehmender Degradation, ähnlich der Fremdkörperreaktion, zu. In der wachstumsfaktoraugmentierten Gruppe war hierbei eine ähnliche Aktivität wie nach neun Monaten ohne Augmentation (Gruppe III) zu verzeichnen.

Eine aseptische Inflammation ist durch die Degradation des Implantates bedingt und keine Seltenheit [11, 17, 58, 82]. Diese Inflammation wird Mikrokrystallen, die aus dem Implantatmaterial freigesetzt werden, zugeschrieben [13]. Durch diese Inflammation werden Cytokine freigesetzt die wiederum Stimulatoren der Osteoklasten darstellen. Es kommt konsekutiv zu einer erhöhten Aktivität der knochenabbauenden Faktoren, die Folge sind Osteolysen. Hierbei scheint die Trägersubstanz PDLA, welche für die Augmentation mit Wachstumsfaktoren verwendet wurde und schnell degradierbar ist, eine stärkere Inflammation und somit eine größere Inzidenz von Osteolysen in der Frühphase der Fusion zu verursachen. Als weiteren Grund für die Zunahme der osteolytischen Aktivität im Verlauf der Untersuchung könnte eine durch die Implantatdegradation bedingte Instabilität sein. Auch die Implantatgeometrie verschlechtert sich mit fortschreitender Degradation des Implantates. Das Zusammenspiel von Stabilitätsverlust durch Geometrieverlust und Inflammation durch Degradation ist für die Bildung einer Pseudarthrose durchaus vorstellbar.

Die positive und beschleunigende Wirkung der Augmentation von Implantaten mit Wachstumsfaktoren über eine PDLA-Trägermatrix für die Knochenheilung und Wirbelkörperfusion wurde in anderen Arbeiten beschrieben [38, 66, 67]. Dieser Effekt konnte in der vorliegenden Arbeit nicht bestätigt werden. Zwar scheint diese Wachstumsfaktoraugmentation eine frühe enchondrale Ossifikation des Knorpels zu initiieren und eine raschere Entwicklung des ventralen Kallus zu fördern, jedoch konnte im Vergleich zur nicht augmentierten Gruppe nach drei Monaten kein höherer knöcherner Flächenanteil gemessen werden. Auch hatte der Zusatz von Wachstumsfaktoren keine positive Wirkung auf die Fusion bzw. die Qualität des nicht knöchernen Gewebes im Fusionsspalt.

Möglicherweise ist der fehlende Unterschied in der knöchernen Fusion auch auf eine in beiden Gruppen gleichermaßen vorliegende partielle Instabilität zurückzuführen. Trotz des

Einsatzes eine ventralen Plattenspondylodese findet sich in beiden Gruppen ein hoher Anteil bindegewebiger Matrix in dem zu erwartenden Fusionspalt. Lobo et al. [46] haben in Studien über Schrägfrakturen beschrieben, dass es durch die wirkenden Scherkräfte innerhalb solcher Frakturen immer wieder zu Zerreißen der eingesprossenen Gefäße kommt. Daraus resultieren schlechte nutritive und vaskuläre Bedingungen für die Frakturheilung und schließlich die Bildung einer bindegewebigen Pseudarthrose. Dies wird durch die höhere Instabilität einer solchen Fraktur verursacht. Dies führt zu der Überlegung, dass es sich bei den beobachteten Phänomenen der Gruppen I und II um eine Instabilitätsarthrose handeln könnte, wie sie von Lobo et al. [46] beschrieben wurde.

Das Material Resorbon[®] ist als Implantat in der Frühphase der Wirbelkörperfusion sehr viel versprechend. In anderen Arbeiten werden mit Polylaktiden und deren Kopolymeren Fusionsraten zwischen 0 und 25% erreicht [17, 79, 81, 89], bei Resorbon[®] findet man zum selben Zeitpunkt in fünf von acht Fällen Fusionen, davon 2 komplette. Die Degradation von Polymeren geht immer mit einer leichten Inflammation einher [11, 17, 58, 82]. Entsprechende Untersuchungen zeigen, dass nach drei Monaten diese Inflammation am deutlichsten ausgeprägt ist und durch die Anwesenheit von Fremdkörperriesenzellen angezeigt wird, [79, 81, 89]. Ferner zeigen sich auch Fremdkörpergranulome als Ausdruck stärker ausgeprägter Fremdkörperreaktionen [17]. Resorbon[®] hingegen zeigt nach drei Monaten höchstens eine schwach ausgeprägte Form der Fremdkörperreaktion, was für eine gute Biokompatibilität in dieser Phase spricht. Auch zeigen sich in dieser Phase praktisch keine Osteolysen, welche als Zeichen der Fremdkörperreaktion zu werten wären [32, 84].

Im Langzeitversuch, d. h. jenseits der 3 Monatsgrenze, kann das Material Resorbon[®] die aus den Ergebnissen nach drei Monaten resultierenden Erwartungen nur unzureichend erfüllen. So zeigen Polylaktide und ihre Kopolymere nach 12 Monaten Fusionsraten von 75 bis 88% sowie stabile milde Fremdkörperreaktionen [79, 81, 89]. Demgegenüber weist Resorbon[®] nach 12 Monaten mit fünf von acht fusionierten Fällen keine verbesserte Fusionsrate auf. Es zeigt sich vielmehr eine Verschlechterung der Biokompatibilität. So lassen sich in den Präparaten nach einem Jahr hauptsächlich milde bis mäßige Fremdkörperreaktionen sowie mäßige Osteolysen nachweisen. Da verstärkt frei werdende Degradationsprodukte eine Reaktion im angrenzenden Gewebe auslösen [11, 17, 58, 82] und sich dies in den Präparaten nach 12 Monaten in Form der beschriebenen mäßigen Fremdkörperreaktionen sowie mäßigen Osteolysen deutlich zeigt, ist davon auszugehen, dass die Implantatdegradation zwischen dem neunten und zwölften Monat nach Implantation des Resorbonmaterials massiv einsetzt. Ein

weiteres Indiz hierfür ist die abnehmende Implantatgeometrie zu diesem Zeitpunkt.

Im Zuge der Polymerdegradation nehmen Implantate, abhängig von der Anzahl und Wertigkeit ihrer hydrophilen Gruppen, Wasser auf. Dieser Prozeß führt zur Quellung des Materials. Um so stärker diese Eigenschaft ausgeprägt ist, um so schneller degradiert in der Regel das entsprechende Polymer [29]. Dieser Zusammenhang konnte jedoch beim Resorbon[®] nicht beobachtet werden, da die Degradation erst zwischen dem neunten und zwölften Monat nach der Implantation einsetzt. Danach verliert sich langsam die Implantatgeometrie. Die Quellung des Materials ist massiv und beginnt erst deutlich später.

So quillt das Implantat zwischen dem ersten und zweiten postoperativen Jahr erheblich auf, diese Volumenzunahme kann sowohl zur Beeinträchtigung des umgebenden Gewebes führen als auch direkte mechanische Wirkung auf das Spinalmark ausüben.

Das histologische Bild nach zwei Jahren Beobachtungszeit ist geprägt von Implantatdedritus und Bindegewebe, Fremdkörperreaktion und erhöhter osteoklastischer Aktivität im angrenzenden Knochen. Trotz einer sehr milden Reaktion auf das Material in der Frühphase der Fusion lässt sich Resorbon[®] hier nicht mit anderen resorbierbaren Implantaten vergleichen [79, 81, 89]. Auch ist zu befürchten, dass durch die aseptische Inflammation bereits stabile Segmente wieder teilweise instabil werden, auch dies könnte möglicherweise zu einer Affektion von Spinalmark und abgehenden Nervenwurzeln führen.

6 Schlussfolgerung

In der Frühphase der Nachbeobachtung der Spondylodese konnten vielversprechende Ergebnisse hinsichtlich Stabilität, induzierte Entzündungs- und Fremdkörperreaktionen evaluiert werden. Das Material Resorbon[®] verursachte in diesem Zeitraum nur leichte Fremdkörperreaktionen und keine Osteolysen als Ausdruck einer temporär guten Biokompatibilität und offensichtlich hohen Primärstabilität. Dagegen verschlechterten sich die Ergebnisse im Bezug auf Biokompatibilität (Gewebequalität, Fremdkörperreaktion, Osteolysen) im weiteren Beobachtungszeitraum im Vergleich zu Arbeiten mit anderen degradierbaren Materialien an der Wirbelsäule [79, 81, 89].

Aufgrund der vorliegenden Ergebnisse kann geschlussfolgert werden, dass die für den klinischen Einsatz relevanten Materialeigenschaften wie Degradationskinetik-/ dynamik, Induktion inflammatorischer/ immunologischer Reaktionen und allgemeine Biokompatibilität noch weiterer Verbesserungen bedürfen. Daher kann auf Grundlage der vorliegenden Ergebnisse Resorbon[®] in der verwendeten Form als Implantat für die ventrale Spondylodese

an der Schafshalswirbelsäule nur mit Zurückhaltung empfohlen werden. Ferner kann auch die Kombination/ der Zusatz von Wachstumsfaktoren nicht den, in anderen Studien erzielten Erfolg [36, 38, 67] bei der Osteoneogenese und Frakturheilung für die Lokalisation Wirbelsäule und die Indikation der intervertebralen Spondylodese bestätigen. Auch hier erscheint eine Optimierung der Interaktion von biodegradierbaren Material, synthetischen species-spezifischen osteotropen Wachstumsfaktoren, zugehörige Trägermatrix, umliegenden biochemischen und zellulären Bedingungen sowie den biomechanischen Rahmen- und Stabilitätsbedingungen in weiteren Studien erforderlich und sinnvoll. Die Ergebnisse dieser Arbeit verdeutlichen einmal mehr und nachdrücklich die Notwendigkeit von Langzeituntersuchungen biodegradierbarer Implantate vor ihrer klinischen Anwendung in zur humanen Situation relevanten und dem operativen Management vergleichbaren tierexperimentellen Studien.

7 Anhang

Färbeprotokoll der durchgeführten Färbungen

Trichomfärbung nach Masson und Goldner:

10. Weigerts Eisenhämatoxylin	3	min.
11. unter fließendem Wasser auswaschen	10	min.
12. Säurefuchsin Ponceau	5	min.
13. Spülen in 1% Essigsäure		
14. Phosphormolybdänsäure-Orange G	30	min.
15. Spülen in 1% Essigsäure		
16. Lichtgrün	10	min.
17. Spülen in 1% Essigsäure		
18. Entwässern in drei Portionen aufsteigenden Alkohols		

Kombinierte Safranin-Orange / Von Kossa Färbung:

12. 3% Silbernitratlösung	5	min.
13. Spülen in Aqua destillata		
14. Natrium-Formaldehydlösung	2	min.
15. Wässern in Leitungswasser	10	min.
16. 5% Natriumthiosulfat	5	min.
17. Wässern in Leitungswasser	10	min.
18. Spülen in Aqua destillata		
19. Safranin O	8	min.
20. Spülen in Aqua destillata		
21. 2x 96% Alkohol	je 2	min.
22. 2x 100% Alkohol	je 2	min.

Safranin-Orange / Lichtgrün Färbung:

- | | |
|-------------------------------|---------|
| 9. Safranin O | 10 min. |
| 10. Spülen in Aqua destillata | |
| 11. Pikrinsäure | 15 min. |
| 12. Spülen in Aqua destillata | |
| 13. Spülen in 1% Essigsäure | |
| 14. Lichtgrün | 10 min. |
| 15. Spülen in 1% Essigsäure | |
| 16. 100% Alkohol | |

Astrablau Färbung:

- | | |
|---|---------|
| 8. 3% Essigsäure | 3 min. |
| 9. Astrablau | 30 min. |
| 10. Spülen in 3% Essigsäure | |
| 11. Spülen in Aqua destillata | |
| 12. Kernechtrot | 5 min. |
| 13. Spülen in Aqua destillata | |
| 14. Entwässern in drei Portionen aufsteigenden Alkohols | |

Übersicht der Ergebnisse der Histomorphologie

Punktwerte		Gruppe I 12 Wochen	Gruppe II 12 Wochen mit Beschichtung	Gruppe III 9 Monate	Gruppe IV 12 Monate	Gruppe V 24 Monate
1	F-1	2	1	3	2	1
2	F-2	3	3	1	3	2
3	F-3	3	4	4	3	4
	Punkte	17	19	17	17	19
8	G-0	1	---	---	---	---
7	G-1	---	3	1	---	4
6	G-2	1	2	---	---	---
5	G-3	1	---	1	2	---
4	G-4	---	1	2	1	---
3	G-5	3	1	1	3	2
2	G-6	2	1	2	2	---
1	G-7	---	---	1	---	1
	Punkte	32	42	28	27	35
1	R-0	4	---	4	1	---
2	R-1	3	1	1	---	1
3	R-2	---	1	3	4	3
4	R-3	1	6	---	3	3
5	R-4	---	---	---	---	---
	Punkte	14	29	15	25	23
1	V-0	1	---	1	1	---
2	V-1	3	---	3	3	1
3	V-2	---	---	3	3	5
4	V-3	4	8	1	1	1
	Punkte	21	24	20	20	21
1	O-0	6	5	6	3	3
2	O-1	1	1	---	---	---
3	O-2	1	1	1	5	---
4	O-3	---	1	1	---	4
	Punkte	12	14	13	18	19
1	I-0	11	7	2	2	---
2	I-1	4	9	7	6	---
3	I-2	1	---	7	8	14
	Punkte	25	25	37	38	42
	Kallusdicke	3,5 mm	4,25 mm	4,25 mm	4,5 mm	5 mm
	Bandscheibenraumhöhe	5,67 mm	6,665 mm	5,67 mm	5,85 mm	5,67 mm

Tabelle 8:

Übersicht über die histomorphologische Ergebnisse. Auf der linken Seite die bei den entsprechenden Variablenausprägungen erreichbaren Punkte gefolgt von der Aufteilung in den einzelnen Gruppen. In den Spalten „Punkte“ wurde die pro Gruppe erreichte Punktezahl aufgeführt.

8 Referenzen

1. (2003) Gesundheitswesen Diagnosedaten der Patienten und Patientinnen in Krankenhäusern. In: statistisches Bundesamt
2. Aebi M, J.S. Thalgott, J.K. Webb (1997) AO ASIF Principles in Spine Surgery. Springer, Berlin
3. Anderson PA, Henley MB, Grady MS, Montesano PX, Winn HR (1991) Posterior cervical arthrodesis with AO reconstruction plates and bone graft. *Spine* 16:S72-79
4. Arrington ED, Smith WJ, Chambers HG, Bucknell AL, Davino NA (1996) Complications of iliac crest bone graft harvesting. *Clin Orthop Relat Res*:300-309
5. Banwart JC, Asher MA, Hassanein RS (1995) Iliac crest bone graft harvest donor site morbidity. A statistical evaluation. *Spine* 20:1055-1060
6. Bassett CA, Creighton DK, Stinchfield FE (1961) Contributions of endosteum, cortex, and soft tissues to osteogenesis. *Surg Gynecol Obstet* 112:145-152
7. Bassett CA, Ruedi TP (1966) Transformation of fibrous tissue to bone in vivo. *Nature* 209:988-989
8. Beirne JC, Barry HJ, Brady FA, Morris VB (1996) Donor site morbidity of the anterior iliac crest following cancellous bone harvest. *Int J Oral Maxillofac Surg* 25:268-271
9. Bishop RC, Moore KA, Hadley MN (1996) Anterior cervical interbody fusion using autogeneic and allogeneic bone graft substrate: a prospective comparative analysis. *J Neurosurg* 85:206-210
10. Blauth M, Tschern H (1998) *Wirbelsäule*. Springer, Berlin
11. Bostman O, Hirvensalo E, Makinen J, Rokkanen P (1990) Foreign-body reactions to fracture fixation implants of biodegradable synthetic polymers. *J Bone Joint Surg Br* 72:592-596
12. Bostman O, Pihlajamaki H (2000) Clinical biocompatibility of biodegradable orthopaedic implants for internal fixation: a review. *Biomaterials* 21:2615-2621
13. Bostman OM, Pihlajamaki HK (2000) Adverse tissue reactions to bioabsorbable fixation devices. *Clin Orthop Relat Res*:216-227
14. Bostrom MP, Asnis P (1998) Transforming growth factor beta in fracture repair. *Clin Orthop Relat Res*:S124-131
15. Boustred AM, Fernandes D, van Zyl AE (1997) Minimally invasive iliac cancellous bone graft harvesting. *Plast Reconstr Surg* 99:1760-1764
16. Brodke DS, Dick JC, Kunz DN, McCabe R, Zdeblick TA (1997) Posterior lumbar interbody fusion. A biomechanical comparison, including a new threaded cage. *Spine* 22:26-31
17. Cahill DW, Martin GJ, Jr., Hajjar MV, Sonstein W, Graham LB, Engelman RW (2003) Suitability of bioresorbable cages for anterior cervical fusion. *J Neurosurg* 98:195-201
18. Canady JW, Zeitler DP, Thompson SA, Nicholas CD (1993) Suitability of the iliac crest as a site for harvest of autogenous bone grafts. *Cleft Palate Craniofac J* 30:579-581
19. Capen DA, Garland DE, Waters RL (1985) Surgical stabilization of the cervical spine. A comparative analysis of anterior and posterior spine fusions. *Clin Orthop Relat Res*:229-237

20. Carter DR, Beaupre GS, Giori NJ, Helms JA (1998) Mechanobiology of skeletal regeneration. *Clin Orthop Relat Res*:S41-55
21. Cloward RB (1958) The anterior approach for removal of ruptured cervical disks. *J Neurosurg* 15:602-617
22. Duranti F, Salti G, Bovani B, Calandra M, Rosati ML (1998) Injectable hyaluronic acid gel for soft tissue augmentation. A clinical and histological study. *Dermatol Surg* 24:1317-1325
23. Eitel F, Seiler H, Schweiberer L (1981) [Morphologic examination of animal-experiment results: comparison with regeneration of the human bone-structure. I. Research methods (author's transl)]. *Unfallheilkunde* 84:250-254
24. Emery SE, Brazinski MS, Koka A, Bensusan JS, Stevenson S (1994) The biological and biomechanical effects of irradiation on anterior spinal bone grafts in a canine model. *J Bone Joint Surg Am* 76:540-548
25. Epari DR, Kandziora F, Duda GN (2005) Stress shielding in box and cylinder cervical interbody fusion cage designs. *Spine* 30:908-914
26. Epari DR, Schell H, Bail HJ, Duda GN (2006) Instability prolongs the chondral phase during bone healing in sheep. *Bone* 38:864-870
27. Floyd T, Ohnmeiss D (2000) A meta-analysis of autograft versus allograft in anterior cervical fusion. *Eur Spine J* 9:398-403
28. Gerlach KL (2000) [Resorbable polymers as osteosynthesis material]. *Mund Kiefer Gesichtschir* 4 Suppl 1:S91-102
29. Gopferich A (1996) Mechanisms of polymer degradation and erosion. *Biomaterials* 17:103-114
30. Goulet JA, Senunas LE, DeSilva GL, Greenfield ML (1997) Autogenous iliac crest bone graft. Complications and functional assessment. *Clin Orthop Relat Res*:76-81
31. Hacker RJ, Cauthen JC, Gilbert TJ, Griffith SL (2000) A prospective randomized multicenter clinical evaluation of an anterior cervical fusion cage. *Spine* 25:2646-2654; discussion 2655
32. Hoffmann R, Weller A, Helling HJ, Krettek C, Rehm KE (1997) [Local foreign body reactions to biodegradable implants. A classification]. *Unfallchirurg* 100:658-666
33. Hofmeister M, Buhren V (1999) [Therapeutic concept for injuries of the lower cervical spine]. *Orthopade* 28:401-413
34. Kandziora F, Bail H, Schmidmaier G et al. (2002) Bone morphogenetic protein-2 application by a poly(D,L-lactide)-coated interbody cage: in vivo results of a new carrier for growth factors. *J Neurosurg* 97:40-48
35. Kandziora F, Pflugmacher R, Schafer J et al. (2001) Biomechanical comparison of cervical spine interbody fusion cages. *Spine* 26:1850-1857
36. Kandziora F, Pflugmacher R, Scholz M et al. (2002) Comparison of BMP-2 and combined IGF-I/TGF- β 1 application in a sheep cervical spine fusion model. *Eur Spine J* 11:482-493
37. Kandziora F, Pflugmacher R, Scholz M et al. (2001) Comparison between sheep and human cervical spines: an anatomic, radiographic, bone mineral density, and biomechanical study. *Spine* 26:1028-1037
38. Kandziora F, Schmidmaier G, Schollmeier G et al. (2002) IGF-I and TGF- β 1 application by a poly-(D,L-lactide)-coated cage promotes intervertebral bone matrix formation in the sheep cervical spine. *Spine* 27:1710-1723

39. Kandziora F, Schollmeier G, Scholz M et al. (2002) Influence of cage design on interbody fusion in a sheep cervical spine model. *J Neurosurg* 96:321-332
40. Kandziora F, Scholz M, Pflugmacher R et al. (2002) [Experimental fusion of the sheep cervical spine. Part II: Effect of growth factors and carrier systems on interbody fusion]. *Chirurg* 73:1025-1038
41. Korinath MC, Hero T, Pandorf T, Zell D (2005) [Application of a stand-alone interbody fusion cage based on a novel porous TiO₂/glass ceramic--2: Biomechanical evaluation after implantation in the sheep cervical spine]. *Biomed Tech (Berl)* 50:111-118
42. Kuslich SD, Danielson G, Dowdle JD et al. (2000) Four-year follow-up results of lumbar spine arthrodesis using the Bagby and Kuslich lumbar fusion cage. *Spine* 25:2656-2662
43. Li H, Zou X, Laursen M, Egund N, Lind M, Bunger C (2002) The influence of intervertebral disc tissue on anterior spinal interbody fusion: an experimental study on pigs. *Eur Spine J* 11:476-481
44. Lienau J, Schell H, Epari DR et al. (2006) CYR61 (CCN1) protein expression during fracture healing in an ovine tibial model and its relation to the mechanical fixation stability. *J Orthop Res* 24:254-262
45. Linkhart TA, Mohan S, Baylink DJ (1996) Growth factors for bone growth and repair: IGF, TGF beta and BMP. *Bone* 19:1S-12S
46. Lobo EG, Beaupre GS, Carter DR (2001) Mechanobiology of initial pseudarthrosis formation with oblique fractures. *J Orthop Res* 19:1067-1072
47. Majd ME, Vadhva M, Holt RT (1999) Anterior cervical reconstruction using titanium cages with anterior plating. *Spine* 24:1604-1610
48. Matge G, Leclercq TA (2000) Rationale for interbody fusion with threaded titanium cages at cervical and lumbar levels. Results on 357 cases. *Acta Neurochir (Wien)* 142:425-433; discussion 434
49. McAfee PC, Farey ID, Sutterlin CE, Gurr KR, Warden KE, Cunningham BW (1991) The effect of spinal implant rigidity on vertebral bone density. A canine model. *Spine* 16:S190-197
50. McAfee PC, Regan JJ, Farey ID, Gurr KR, Warden KE (1988) The biomechanical and histomorphometric properties of anterior lumbar fusions: a canine model. *J Spinal Disord* 1:101-110
51. Meinel L, Zoidis E, Zapf J et al. (2003) Localized insulin-like growth factor I delivery to enhance new bone formation. *Bone* 33:660-672
52. Miyamoto S, Takaoka K, Yonenobu K, Ono K (1992) Ossification of the ligamentum flavum induced by bone morphogenetic protein. An experimental study in mice. *J Bone Joint Surg Br* 74:279-283
53. Muller EJ, Russe OJ, Muhr G (2004) [Osteomyelitis of the spine]. *Orthopade* 33:305-315
54. Panjabi MM, Goel VK, Takata K (1982) Physiologic strains in the lumbar spinal ligaments. An in vitro biomechanical study 1981 Volvo Award in Biomechanics. *Spine* 7:192-203
55. Parthiban JK, Singhanian BK, Ramani PS (2002) A radiological evaluation of allografts (ethylene oxide sterilized cadaver bone) and autografts in anterior cervical fusion. *Neurol India* 50:17-22
56. Pflugmacher R, Eindorf T, Scholz M et al. (2004) [Biodegradable cage.

- Osteointegration in spondylodesis of the sheep cervical spine]. *Chirurg* 75:1003-1012
57. Phillips AM (2005) Overview of the fracture healing cascade. *Injury* 36 Suppl 3:S5-7
 58. Pistner H, Reuther J, Mühling J, Gutwald R (1997) Vollständige Biodegradation von amrophen Polylactid-Osteosynthesematerialien in Hart- und Weichgewebe im Langzeitversuch. In: 61st Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Unfallchirurgie. Springer-Verlag, Berlin, pp 756-766
 59. Profeta G, de Falco R, Ianniciello G, Profeta L, Cigliano A, Raja AI (2000) Preliminary experience with anterior cervical microdiscectomy and interbody titanium cage fusion (Novus CT-Ti) in patients with cervical disc disease. *Surg Neurol* 53:417-426
 60. Rapoff AJ, Ghanayem AJ, Zdeblick TA (1997) Biomechanical comparison of posterior lumbar interbody fusion cages. *Spine* 22:2375-2379
 61. Romeis B, Böck P (1989) *Mikroskopische Technik*. Urban & Fischer Bei Elsevier
 62. Saadeh PB, Mehrara BJ, Steinbrech DS et al. (1999) Transforming growth factor-beta1 modulates the expression of vascular endothelial growth factor by osteoblasts. *Am J Physiol* 277:C628-637
 63. Sasso RC, LeHuec JC, Shaffrey C (2005) Iliac crest bone graft donor site pain after anterior lumbar interbody fusion: a prospective patient satisfaction outcome assessment. *J Spinal Disord Tech* 18 Suppl:S77-81
 64. Schell H, Epari DR, Kassi JP, Bragulla H, Bail HJ, Duda GN (2005) The course of bone healing is influenced by the initial shear fixation stability. *J Orthop Res* 23:1022-1028
 65. Schilephake H (2002) Bone growth factors in maxillofacial skeletal reconstruction. *Int J Oral Maxillofac Surg* 31:469-484
 66. Schmidmaier G, Wildemann B, Bail H et al. (2000) [Local liberation of IGF-I and TGF-beta 1 from a biodegradable poly(D,L-lactide) coating of implants accelerates fracture healing]. *Chirurg* 71:1016-1022
 67. Schmidmaier G, Wildemann B, Lubberstedt M, Haas NP, Raschke M (2003) IGF-I and TGF-beta 1 incorporated in a poly(D,L-lactide) implant coating stimulates osteoblast differentiation and collagen-1 production but reduces osteoblast proliferation in cell culture. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 65:157-162
 68. Schmidmaier G, Wildemann B, Ostapowicz D et al. (2004) Long-term effects of local growth factor (IGF-I and TGF-beta 1) treatment on fracture healing. A safety study for using growth factors. *J Orthop Res* 22:514-519
 69. Schmidmaier G, Wildemann B, Stemberger A, Haas NP, Raschke M (2001) Biodegradable poly(D,L-lactide) coating of implants for continuous release of growth factors. *J Biomed Mater Res* 58:449-455
 70. Schwarz-Eywill M, Friedberg R, Stosslein F, Unger L, Nusslein H (2005) [Rheumatoid arthritis at the cervical spine -- an underestimated problem]. *Dtsch Med Wochenschr* 130:1866-1870
 71. Silber JS, Anderson DG, Daffner SD et al. (2003) Donor site morbidity after anterior iliac crest bone harvest for single-level anterior cervical discectomy and fusion. *Spine* 28:134-139
 72. Slivka MA, Spenciner DB, Seim HB, 3rd, Welch WC, Serhan HA, Turner AS (2006) High rate of fusion in sheep cervical spines following anterior interbody surgery with absorbable and nonabsorbable implant devices. *Spine* 31:2772-2777
 73. Smit TH, Muller R, van Dijk M, Wuisman PI (2003) Changes in bone architecture

- during spinal fusion: three years follow-up and the role of cage stiffness. *Spine* 28:1802-1808; discussion 1809
74. Smith GW, Robinson RA (1958) The treatment of certain cervical-spine disorders by anterior removal of the intervertebral disc and interbody fusion. *J Bone Joint Surg Am* 40-A:607-624
 75. Solheim E (1998) Growth factors in bone. *Int Orthop* 22:410-416
 76. Srouji S, Rachmiel A, Blumenfeld I, Livne E (2005) Mandibular defect repair by TGF-beta and IGF-1 released from a biodegradable osteoconductive hydrogel. *J Craniomaxillofac Surg* 33:79-84
 77. Steinbrech DS, Mehrara BJ, Saadeh PB et al. (2000) VEGF expression in an osteoblast-like cell line is regulated by a hypoxia response mechanism. *Am J Physiol Cell Physiol* 278:C853-860
 78. Suchomel P, Barsa P, Buchvald P, Svobodnik A, Vanickova E (2004) Autologous versus allogenic bone grafts in instrumented anterior cervical discectomy and fusion: a prospective study with respect to bone union pattern. *Eur Spine J* 13:510-515
 79. Toth JM, Estes BT, Wang M et al. (2002) Evaluation of 70/30 poly (L-lactide-co-D,L-lactide) for use as a resorbable interbody fusion cage. *J Neurosurg* 97:423-432
 80. Urist MR (1965) Bone: formation by autoinduction. *Science* 150:893-899
 81. van Dijk M, Smit TH, Burger EH, Wuisman PI (2002) Bioabsorbable poly-L-lactic acid cages for lumbar interbody fusion: three-year follow-up radiographic, histologic, and histomorphometric analysis in goats. *Spine* 27:2706-2714
 82. van Dijkhuizen-Radersma R, Roosma JR, Kaim P et al. (2003) Biodegradable poly(ether-ester) multiblock copolymers for controlled release applications. *J Biomed Mater Res A* 67:1294-1304
 83. Weigel B, Nerlich, M. (2004) *Praxisbuch Unfallchirurgie*. Springer, Berlin
 84. Weiler A, Helling HJ, Kirch U, Zirbes TK, Rehm KE (1996) Foreign-body reaction and the course of osteolysis after polyglycolide implants for fracture fixation: experimental study in sheep. *J Bone Joint Surg Br* 78:369-376
 85. Weiler A, Hoffmann RF, Stahelin AC, Helling HJ, Sudkamp NP (2000) Biodegradable implants in sports medicine: the biological base. *Arthroscopy* 16:305-321
 86. Weiner BK, Fraser RD (1998) Spine update lumbar interbody cages. *Spine* 23:634-640
 87. Wilke HJ, Kettler A, Claes LE (1997) Are sheep spines a valid biomechanical model for human spines? *Spine* 22:2365-2374
 88. Wilke HJ, Kettler A, Wenger KH, Claes LE (1997) Anatomy of the sheep spine and its comparison to the human spine. *Anat Rec* 247:542-555
 89. Wuisman PI, van Dijk M, Smit TH (2002) Resorbable cages for spinal fusion: an experimental goat model. *J Neurosurg* 97:433-439
 90. Yonenobu K (2000) Cervical radiculopathy and myelopathy: when and what can surgery contribute to treatment? *Eur Spine J* 9:1-7
 91. Zdeblick TA, Ghanayem AJ, Rapoff AJ et al. (1998) Cervical interbody fusion cages. An animal model with and without bone morphogenetic protein. *Spine* 23:758-765; discussion 766

9 Danksagung

In diesem Rahmen möchte ich mich bei allen Menschen, die mich in dieser Zeit unterstützt und gefördert haben, bedanken.

Meinem Doktorvater, Herrn Professor Duda, gilt mein Dank für die Übernahme der Betreuung meiner Arbeit. Durch die hervorragende Infrastruktur des Biomedizinischen Forschungszentrums war mir eine zügige Durchführung aller Versuche möglich. Die hier tätigen Mitarbeiter waren stets eine große Hilfe.

Ein großer Dank gilt Herrn Professor Haas, dem Begründer des Centrums für Muskuloskeletale Chirurgie in ihrer heutigen Form. Er war mir regelmäßiger Ansporn.

Weiterhin danke ich Frau PD Dr. Wildemann und der Arbeitsgruppe um Herrn PD Dr. Schmidmaier für die Beschichtung der verwendeten Implantate, sowie Frau Wegener aus dem Institut für Biometrie und klinische Epidemiologie für ihre Unterstützung der statistischen Auswertung.

Ich möchte besonders den Mitgliedern der Sektion Tumorchirurgie unter der Leitung von Herrn Dr. Melcher und PD Dr. Schaser danken, sie standen mir immer und vor allem in schwierigen Zeiten mit Rat und Tat zur Seite.

Nicht zu vergessen danke ich meiner Familie für ihre Geduld und Unterstützung.

Lebenslauf

„Mein Lebenslauf wird aus Datenschutzgründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht mit veröffentlicht.“

Mitwirkung an folgenden Projekten und Publikationen

Eindorf T., Koch C., Schulz A., Scholz M., Haas N.P., Kandziora F., Pflugmacher R.
Experimentelle Spondylodese der Schafshalswirbelsäule mit einem Bioresorbierbaren
Implantat (Histologie)
(69. Jahrestagung der DGU, Poster)

Khodadadyan-Klostermann C., Schulz A., Schleicher P., Pflugmacher R.
Pedikelsubtraktionsosteotomie für die Behandlung von posttraumatischen kyphotischen
Fehlstellungen der thorako-lumbalen Wirbelsäule - eine prospektive Untersuchung
(70. Jahrestagung der DGU, Sitzungsthema: Minimalinvasiv-Wirbelsäule,
Evaluation neuerer Verfahren)

Untersuchung von Prognose- und Therapierelevanz der Expression ausgewählter Stammzell-
und Hypoxie- assoziierter Gene in humanen Weichteilsarkomen (WTS) in vivo
(Gefördert durch die Deutsche Krebshilfe Dr. Mildred Scheel Stiftung
Antragsteller: PD Dr. K. Schaser, PD Dr. H. Taubert)

Pflugmacher R, Schulz A, Schroeder RJ, Schaser KD, Klostermann CK, Melcher I.
A prospective two-year follow-up of thoracic and lumbar osteolytic vertebral fractures caused
by multiple myeloma treated with balloon kyphoplasty
Z Orthop Ihre Grenzgeb. 2007 Jan-Feb;145(1):39-47.

Schaser KD, Melcher I, Mittlmeier T, Schulz A, Seemann JH, Haas NP, Disch AC.
Surgical management of vertebral column metastatic disease.
Unfallchirurg. 2007 Feb;110(2):137-162.

Eidesstattliche Erklärung

„Ich, Antje Schulz, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertationsschrift mit dem Thema: Osteointegration eines biodegradierbaren Implantates zur Spondylodese: eine histologische und histomorphometrische Analyse im Tiermodell, selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.“

Berlin, den

Unterschrift