

Aus dem
Forschungslabor des Centrums für Muskuloskeletale Chirurgie
Charité – Universitätsmedizin Berlin
Campus Virchow Klinikum
der Humboldt- und Freien Universität Berlin

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

Histologische Evaluation eines bioaktiven Implantats zur Spondylodese der Halswirbelsäule

- eine experimentelle Studie am Schaf -

Inaugural – Dissertation
zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Veterinärmedizin
an der Freien Universität Berlin
vorgelegt von

Christian Koch
Tierarzt aus Berlin

Berlin 2005

Journal-Nr 2901

Gedruckt mit Genehmigung
des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Freien Universität Berlin

Dekan: Univ.-Prof. Dr. med. vet. L. Brunnberg
Erster Gutachter: Univ.-Prof. Dr. med. vet. J. Plendl
Zweiter Gutachter: PD Dr. med. F. Kandziora
Dritter Gutachter: Univ.-Prof. Dr. med. vet. L. Brunnberg

Deskriptoren: animal model, bone morphogenetic protein, cervical spine, cyclic RGD-peptide, growth factor, Harms-Cage, histology, interbody fusion, platelet rich plasma, sheep, spinal fusion, spondylodesis

Tag der Promotion: 27. Mai 2005

Meiner Mutter

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis.....	I
Abbildungsverzeichnis.....	III
Abkürzungsverzeichnis.....	VI
1. Einleitung und Ziel des Versuchsvorhabens.....	1
2. Stand des Wissens	4
2.1 Die Wirbelsäule des Schafes.....	4
2.1.1 Anatomie des Wirbelkörpers.....	5
2.1.2 Mikroskopische Anatomie und Histologie des Wirbelkörpers.....	8
2.1.3 Anatomie der Bandscheibe.....	11
2.1.4 Mikroskopische Anatomie und Histologie der Bandscheibe	12
2.2 Frakturheilung	13
2.4.1 Autologa	16
2.4.2 Cage-Implantate	17
2.5 Einsatz von Wachstumsfaktoren in der Spondylodese.....	18
2.5.1 Bone morphogenetic proteins	19
2.5.2 Autologes Thrombozytenkonzentrat.....	20
2.6 Knochenersatzmaterialien	21
2.6.1 Mineralisiertes Kollagen	22
2.7 Integration des Implantats.....	23
2.7.1 Zyklisches RGD.....	24
2.8 Beurteilung der Wirbelkörperfusion	26
2.8.1 Histologische Untersuchung	26
2.8.2 Histomorphometrische Untersuchung	26
2.9 Tiermodell Schaf	27
3. Material und Methoden.....	29
3.1 Untersuchte Tiere.....	29
3.2 Gruppenplan.....	29
3.3.1 Der Harms-Cage	30
3.3.2 Implantat-Augmentierung.....	31
3.4 Operation.....	32
3.4.1 Operationsvorbereitung.....	32
3.4.2 Operativer Eingriff	33
3.5 Entnahme und Aufbereitung der Proben	37

Inhaltsverzeichnis

3.5.1	Euthanasie und Probengewinnung	37
3.5.2	Präparation der Halswirbelsäule	37
3.5.3	Sägen des Halswirbelsäulensegments drei / vier	38
3.5.5	Anfertigen der histologischen Präparate	41
3.5.6	Histologische Färbungen	41
3.5.7	Eindecken der Schnitte	42
3.6	Histologische Auswertung.....	42
3.6.1	Semiquantitative Auswertung	42
3.6.2	Quantitative Auswertung	47
4.	Ergebnisse	56
4.1	Operationsbefunde.....	56
4.2	Histomorphologische Ergebnisse.....	56
4.3	Histomorphometrische Ergebnisse.....	94
4.4	Zusammenfassung der histologischen und histomorphometrischen Ergebnisse	101
5.	Diskussion	103
5.1	Tiermodell.....	103
5.3	Gewinnung und Aufarbeitung der Proben	105
5.4	Analysemethoden.....	106
5.5	Der Harms Cage augmentiert mit mineralisiertem Kollagen.....	107
5.6	Einfluss der „osteoinduktiven“ Materialien	111
5.6.1	Das autologe Thrombozytenkonzentrat - PRP	111
5.6.2	Das rekombinante humane Bone Morphogenetic Protein – rh BMP-2.....	114
5.6.3	Das zyklische RGD-Peptid.....	117
5.8	Schlussfolgerung.....	125
5.8.1	Analysemethode.....	125
5.8.2	Klinische Relevanz	126
6.	Zusammenfassung	128
7.	Summary.....	131
8.	Literaturverzeichnis.....	133
Anhang	157	
Danksagung.....	166	
Lebenslauf.....	168	
Eidesstattliche Versicherung.....	2	

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1 Aufbau des Wirbelknochens mit venöser Gefäßversorgung	5
Abb. 2 Halswirbelsäule des Schafes	7
Abb. 3 Osteoblastensaum an innerer Generallamelle	10
Abb. 4 Osteoklast in Howship-Lakune.....	11
Abb. 5 Längsschnitt durch den 3. und 4, Halswirbel des Schafes.....	12
Abb. 6 Durch RGD vermittelte Adhäsion von Osteoblasten	25
Abb. 7 Harms-Cage	30
Abb. 8 Operations-Situs, nach Hautschnitt.....	34
Abb. 9 Operations-Situs, prävertebrale Muskulatur	34
Abb. 10 Operations-Situs, Bestimmung des Bandscheibenfachs C3 / C4.....	35
Abb. 11 Operations-Situs, nach Diskektomie.....	35
Abb. 12 Operations-Situs, nach Implantation	36
Abb. 13 Sägeschema.....	38
Abb. 14 Schnittbild des mittleren Säge-Präparats.....	39
Abb. 15 Darstellung der Cage-Sinterung.....	43
Abb. 16 Schematische Darstellung zur Ermittlung der mittleren Bandscheibenraumhöhe....	49
Abb. 17 Schematische Darstellung der „Region of Interest“	50
Abb. 18 Quantitative Histomorphometrie.....	52
Abb. 19 Quantitative Histomorphometrie.....	53
Abb. 20 Dorsale Kortikalis eines Wirbelkörpers (C3).....	58
Abb. 21 Osteon aus dorsaler Kortikalis	58
Abb. 22 Spongiosa eines Wirbelkörpers	59
Abb. 23 Endplatte C3.....	59
Abb. 24 Präparat aus Kontrollgruppe	60
Abb. 25 Wachstumsfuge.....	60
Abb. 26 Anulus fibrosus	61
Abb. 27 Anulus fibrosus	61
Abb. 28 Nucleus pulposus	62
Abb. 29 Notochordale Zellen	62
Abb. 30 Grafische Darstellung der Beurteilung der Gewebe im Intervertebralraum	66
Abb. 31 Spongiosa des Bandscheibenfachs.....	67
Abb. 32 Enchondrale Ossifikation im Bandscheibenfach.....	67
Abb. 33 Desmale Ossifikation im Bandscheibenfach.....	68

Abb. 34 Bandscheibenfach.....	68
Abb. 35 Übergangszone zwischen Knorpelgewebe und neugebildetem Knochen im Bandscheibenfach.....	69
Abb. 36 Intervertebralraum	69
Abb. 37 Neugebildetes Knochengewebe aus dem Bereich der Cage-Pore.....	70
Abb. 38 Gewebe im Intervertebralraum.....	70
Abb. 39 Grafische Darstellung der Beurteilung der Stärke der Vaskularisierung.....	72
Abb. 40 Intervertebralraum stark vaskularisiert.....	73
Abb. 41 Präparat als physiologisch vaskularisiert eingestuft	73
Abb. 42 Präparat als gering vaskularisiert eingestuft	74
Abb. 43 Grafische Darstellung der Beurteilung der Fusion.....	76
Abb. 44 Grafische Darstellung der Beurteilung der Fusion.....	77
Abb. 45 Intervertebralraum, vollständige Fusion im Bereich der Cage-Pore	78
Abb. 46 Intervertebralraum im Bereich der Cage-Pore.....	78
Abb. 47 Intervertebralraum im Bereich der Cage-Pore.....	79
Abb. 48 Intervertebralraum im Bereich der Cage-Pore.....	79
Abb. 49 Intervertebralraum im Bereich der Cage-Pore.....	80
Abb. 50 Intervertebralraum im Bereich der Cage-Pore.....	80
Abb. 51 Grafische Darstellung der Beurteilung des Abbaus des mineralisierten Kollagens .	83
Abb. 52 Intervertebralraum im Bereich der Cage-Pore.....	84
Abb. 53 Intervertebralraum im Bereich der Cage-Pore.....	84
Abb. 54 Intervertebralraum im Bereich der Cage-Pore.....	85
Abb. 55 Intervertebralraum im Bereich der Cage-Pore.....	85
Abb. 56 Intervertebralraum im Bereich der Cage-Pore.....	86
Abb. 57 Intervertebralraum im Bereich der Cage-Pore.....	86
Abb. 58 Fremdkörperreaktion am Cage	87
Abb. 59 Grafische Darstellung der Beurteilung der ventralen Kallusformation	90
Abb. 60 Ventrales Kallusgewebe	91
Abb. 61 Ventrales Kallusgewebe	91
Abb. 62 Vergrößerter Ausschnitt aus Abb. 61	92
Abb. 63 Ventrales Kallusgewebe	92
Abb. 64 Zone der Verknöcherung des Kallus im Detail	93
Abb. 65 Ventraler Kallus	93
Abb. 66 Grafische Darstellung der Knochenfläche an der ROI [%]	94
Abb. 67 Grafische Darstellung der Knorpelfläche an der ROI [%]	96
Abb. 68 Grafische Darstellung des Anteils der mineralisierten Knorpelfläche an der ROI [%]	98

Abb. 69 Grafische Darstellung des Anteils des mineralisierten Knorpels am Gesamtknorpel [%] 99

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	-	Abbildung
BAK	-	Bagby and Kuslich
bFGF	-	Basic Fibroblast Growth Factor
BMP	-	Bone Morphogenetic Protein
BMP-2	-	Bone Morphogenetic Protein–2
bzgl.	-	bezüglich
bzw.	-	beziehungsweise
C1 - C7	-	Halswirbel eins bis Halswirbel sieben
CaCl ₂	-	Kalziumchlorid
cm	-	Zentimeter
cm ²	-	Quadratcentimeter
cRGD	-	zyklisches Arginin-Glycin-Aspartam
DBSRH	-	durchschnittliche präoperative Bandscheibenraumhöhe
EGF	-	Epidermal Growth Factor
EKG	-	Elektro-Kardiogramm
evtl.	-	eventuell
FGF	-	Fibroblast Growth Factor
g	-	Gramm
ggf.	-	gegebenenfalls
GPS™	-	Gravitational Platelet Separation
HBSRH	-	hintere Bandscheibenraumhöhe
HC	-	Harms Cage
IE	-	Internationale Einheit
IGF	-	Insulinlike Growth Factor
IGF-1	-	Insulinlike Growth Factor–1
IVR	-	Intervertebralraum
kg	-	Kilogramm
Koll.	-	Kollagen
m	-	Zahl der Hypothesen
MBSRH	-	mittlere Bandscheibenraumhöhe
min.	-	mineralisiert(es)
min ⁻¹	-	je Minute
ml	-	Milliliter

Abkürzungsverzeichnis

mm	-	Millimeter
m.K.	-	mineralisiertes Kollagen
TGF	-	Transforming Growth Factor
TGF- β	-	Transforming Growth Factor- β
OPLL	-	ossification of the posterior longitudinal ligament
PDGF	-	Platelet Derived Growth Factor
PEEK	-	Poly – Ethyl – Ether – Keton
PRP	-	Platelet Rich Plasma
resp.	-	respektive
rh	-	rekombinant human
RGD	-	Arginin-Glycin-Aspartam (siehe Anhang Tabelle 10)
RNA	-	Ribonukleinsäure
ROI	-	Region of Interest
u. a.	-	unter anderem
U-Test	-	Mann-Whitney-Wilcoxon Paar-Test
VBSRH	-	vordere Bandscheibenraumhöhe
VEGF	-	Vascular Endothelial Growth Factor
z.B.	-	zum Beispiel
z.T.	-	zum Teil
μ g	-	Mikrogramm
μ l	-	Mikroliter
μ m	-	Mikrometer
®	-	eingetragenes Warenzeichen
Ø	-	Durchschnitt
°C	-	Grad Celsius