

5. Diskussion

Die vorliegende Studie war Teil eines Gesamtprojektes, welches die intervertebrale Spondylodese mit Hilfe eines Bandscheibenersatzes aus Titan (Harms Cage) untersuchte. Zur Augmentierung wurde eine neuartige Form mineralisierten Kollagens verwendet und ergänzt durch verschiedene osteoinduktive Substanzen wie autologes Platelet rich Plasma (PRP), rekombinantes humanes Bone Morphogenic Protein – 2 (BMP-2) und zyklisches RGD-Peptid (cRGD).

5.1 Tiermodell

Zur Bewertung und Risikoabschätzung neuartiger Implantatmaterialien kann vor dem Einsatz am Menschen nicht auf Tierversuche verzichtet werden. Dabei ist es zweckdienlich, ein geeignetes Tiermodell zu finden, um ein hohes Maß der Übertragbarkeit der gewonnenen Ergebnisse auf die Verhältnisse beim Menschen zu gewährleisten. Die Operationsmethoden sollten ohne größeren Aufwand vom Menschen auf das Versuchstier übertragbar sein. Die biomechanischen Belastungen sollten in der untersuchten Region weitestgehend einander entsprechen. Die Vorgänge der Heilung sollten zwischen der untersuchten Spezies und dem Menschen vergleichbar sein. Die Ergebnisse sollten unter gleichen Versuchsbedingungen reproduzierbar sein. Langzeitfolgen sollten durch Tierversuche in kürzerer Zeit absehbar sein, um ein Risiko bei der humanen Anwendung abschätzen zu können (Wissing und Mitarbeiter 1990).

McAfee und Mitarbeiter (1988) gaben auch einige limitierende Faktoren zur Bewertung der Ergebnisse der Wirbelkörperfusion an Versuchstieren an, die berücksichtigt werden sollten. So bestehen qualitative und quantitative Unterschiede hinsichtlich der Krafteinwirkung auf die horizontal liegende Wirbelsäule bei Quadrupeden und die vertikal stehende Wirbelsäule der Menschen. Weiterhin stellt die experimentell erzeugte Instabilität der Wirbelsäule ein Idealbild dar, das sich hinsichtlich der Ätiologie pathologischer Prozesse unterscheidet (McAfee und Mitarbeiter 1988). Auch die Übertragbarkeit quantitativer Ergebnisse der Untersuchung zweidimensionaler, histologischer Präparate auf einen dreidimensionalen Körper bzw. Organ stellt eine Limitierung dar, da solche Ergebnisse von den verwendeten mikroskopischen Techniken und Bewertungskriterien abhängen (McAfee und Mitarbeiter 1988).

Schafe werden in der Wirbelsäulen-Forschung vielfach eingesetzt, da die biomechanischen Eigenschaften der ovinen Halswirbelsäule, im Besonderen das zervikale Bewegungssegment C3 / C4, große Ähnlichkeiten zum entsprechenden humanen Bewegungssegment aufweisen. Zudem weist die Anatomie der Schafshalswirbelsäule Dimensionen auf, die ein unkompliziertes Verwenden humaner Instrumentarien und Implantate zulassen (Kandziora und Mitarbeiter 2001 b; Wilke und Mitarbeiter 1997 a; Wilke und Mitarbeiter 1997 b). Eitel und Mitarbeiter (1981) kritisierten, dass die Struktur der Osteone des Schafes nur bedingt vergleichbar mit denen des Menschen war. Sie wiesen auf topografische Unterschiede in der Osteon- und Lamellenstruktur hin und gaben an, dass die Spezies Hund und Primat besser geeignet seien. Die Verwendung dieser Spezies wird auf Grund ethischer Bedenken und auf Grund der Einwände von Tierschutzorganisationen heftig kritisiert (Eitel und Mitarbeiter 1981). Alternativ wurden als Tiermodelle ausgewachsene Schweine oder 10 bis 16 Wochen alte Kälber verwendet (Li und Mitarbeiter 2002, Rapoff und Mitarbeiter 2003). Biomechanische Untersuchungen zeigten, dass die Wirbel von Kälbern auf Grund mangelnder Verknöcherung im Experiment wesentlich früher frakturierten (Rapoff und Mitarbeiter 2003). Das Gewicht ausgewachsener Schweine übersteigt das Gewicht des Menschen, zudem ist der operative Zugang und die Heilung des porcinen Halses nicht mit dem des Menschen vergleichbar (Allan und Mitarbeiter 1990).

Ein Vorteil in der Nutzung sogenannter landwirtschaftlicher Nutztiere liegt gemäß Brill (1992) in der Gewöhnung dieser Tiere an den Menschen, was den Umgang mit den Tieren in entscheidendem Maße erleichtert. Schafe eignen sich hier wiederum sehr gut, da sie weder Kooperation noch Ablehnung gegenüber dem Untersucher zeigen und somit die Untersuchungen und etwaige notwendige Behandlungen relativ unbeeinflusst durchgeführt werden können (Brill 1992). Vorteilhaft in der Nutzung dieser Spezies ist die Möglichkeit der Zusammenstellung möglichst homogener, vergleichbarer Gruppen. Landwirtschaftliche Nutztiere gewährleisten die Zusammensetzung einer großen Zahl genetisch verwandter Individuen gleichen Alters, Gewichts und gleicher Größe und bilden so eine standardisierte Versuchsgrundlage (Brill 1992).

Auf Grund der vorliegenden Literatur und der Erfahrungen der Arbeitsgruppe mit dem Schaf als Versuchstier kann auch unter den strengen ethischen Grundsätzen des Tierschutzes das Schaf als ein geeignetes Modell für die zervikale intervertebrale Spondylodese angesehen werden.

5.2 Operation und postoperativer Beobachtungszeitraum

Bei der hier angewandten Operationstechnik handelt es sich um eine etablierte Methode zur Versteifung von Wirbelkörpern der Halswirbelsäule durch ventrales, interkorporelles Einbringen eines Bandscheibenersatzpräparats in das Bandscheibenfach C3 / C4 (Aronson und Mitarbeiter 1968; Cloward 1988; Robinson und Mitarbeiter 1955).

Der Untersuchungszeitraum von 12 Wochen post operationem gilt als geeignet, um histologisch ein frühes Einheilungsverhalten und damit die Akzeptanz der eingebrachten Materialien durch den Organismus zu demonstrieren. Weiterhin gilt zu diesem Zeitpunkt die Spondylodese im Tiermodell Schaf als fortgeschritten, so dass mit ersten fusionierten Bewegungssegmenten zu rechnen ist (Cunningham und Mitarbeiter 1999; Sandhu und Mitarbeiter 1996 a).

Die Gruppengröße von 8 resp. 7 Tieren war ausreichend, um Aussagen über das Einheilungsverhalten zu treffen. Auf Grund der geringen Tierzahlen in den Versuchsgruppen haben die Ergebnisse aber nur beschreibenden Charakter und keine allgemeingültige Aussagekraft.

5.3 Gewinnung und Aufarbeitung der Proben

Die Sägeebene ist entscheidend für die histologische Auswertung. In dieser Studie wurde die Ebene sagittal zur Wirbelkörperachse gewählt. Das mittlere Präparat wurde für die histologische Aufarbeitung verwendet, um so einen repräsentativen Überblick über den zentralen Intervertebralraum zu gewährleisten und die Pore des Harms-Cages als Ort der Aufnahme des Core-Materials, sowie die angrenzenden Endplatten der Halswirbel drei und vier zu erfassen. So war es möglich, im zweidimensionalen histologischen Schnitt die Stadien der Fusionierung, des Ab- und Umbaus des Core-Materials sowie die Position des Implantats zu beurteilen.

Die Planung und Durchführung der Probengewinnung war in hohem Maße standardisiert. Auf Grund des verwendeten Titan-Implantats und dessen bekannten Durchmessers von acht Millimetern konnte sichergestellt werden, dass durch Betrachtung der Anschnittfläche und des Abstandes der Cage-Anteile zueinander das mittlere Präparat verwendet wurde. Dennoch ist zu berücksichtigen, dass es sich bei den Präparaten, um zweidimensionale Schnitte handelt. Es wurde jeweils ein selektives Bild der Spondylodese betrachtet, das keine Aussage über die Gesamtheit des Prozesses der Wirbelkörperfusion für das Tier

zuließ. So war nicht auszuschließen, dass nicht fusionierte Präparate in anderen Ebenen Fusionen zwischen den Wirbelkörpern aufwiesen.

5.4 Analysemethoden

Histomorphologie

Auf Grund der sehr geringen Dicke der histologischen Präparate (6 µm) wurde sichergestellt, dass nur wenige Überlagerungen von Gewebeschichten, die eine Auswertung erschweren würden, auftraten. Daraus resultierte eine hohe Genauigkeit in der histologischen Auswertung und anschließenden Messung. Nachteilig wirkte sich das Entfernen der Titan-Implantate aus. In einigen Fällen kam es zu präparationsbedingten Schäden, die sich in Brüchen des Präparats und Ablösung der angrenzenden Gewebeschicht äußerten. Präparationsbedingte Risse im histologischen Präparat konnten histomorphologisch identifiziert werden und mussten im Rahmen der histomorphometrischen Auswertung manuell nachgebessert werden.

Die histomorphologische Auswertung war rein deskriptiv und ließ keine Bewertung zu, wie sie durch einen validierten Score möglich wäre.

Histomorphometrie

Die computergestützte bildanalytische Untersuchung bot die Möglichkeit, anhand gefärbter histologischer Präparate Gewebeflächen zu quantifizieren. Die Arbeitsgruppe um Kandziora wandte dieses Verfahren erstmalig 2002 an (Kandziora und Mitarbeiter 2002 a; Kandziora und Mitarbeiter 2002 b; Kandziora und Mitarbeiter 2002 c; Kandziora und Mitarbeiter 2002 d). Vergleichbare Methoden wurden bisher von keiner anderen Arbeitsgruppe angewandt. Aus diesem Grunde sind die vorliegenden histomorphometrischen Ergebnisse auch nur mit den Ergebnissen dieser Arbeitsgruppe vergleichbar.

In die histomorphometrischen Auswertungen gingen je Tier ein Präparat gefärbt nach Safranin-Orange / von Kossa, Safranin-Orange / Lichtgrün und Astrablau ein. Die Auswertung von vier oder fünf Schnitten, die nicht aus der unmittelbaren Nachbarschaft voneinander stammten, hätten evtl. die Genauigkeit der Aussage erhöht. Dieses Verfahren wäre jedoch sehr zeitaufwändig, da vom gesamten Block Serienschnitte angefertigt werden müssten, um einen definierten Abstand zwischen den Präparaten zu gewährleisten. Die Auswertung wurde stattdessen von drei unabhängigen Untersuchern an demselben

Schnittpräparat durchgeführt. Dabei zeigte sich, dass die interindividuelle Varianz als gering eingestuft werden konnte, weshalb die Bildung von Mittelwerten aus diesen Ergebnissen nach den Grundsätzen der statistischen Auswertung möglich war.

Vorteile einer histomorphometrischen Analyse der Präparate lagen in der unabhängigen Bewertung (Farbton, Farbintensität) und der Nachvollziehbarkeit und Reproduzierbarkeit der leicht durchzuführenden Arbeitsschritte. Fehlerquellen lagen dort, wo der Untersucher eingriff und subjektive Entscheidungen traf. Die Definition der ROI anhand des Einzeichnens der Baseline oder die manuelle Nachbesserung von Artefakten, die durch die histologische Präparation auftraten, waren solche Fehlerquellen. Diese Einschränkungen, die eine automatisierte bildanalytische Methode mit sich bringt, waren bei der Bewertung der Ergebnisse zu berücksichtigen (Hunt und Mitarbeiter 1995). Ein weiterer Nachteil war der hohe Zeitaufwand. Das Einzeichnen der verschiedenen Parameter und die Feinjustierung waren sehr zeitintensiv.

Alternativ wäre der Einsatz eines Scores zur Beschreibung der Gewebequalität, -verteilung und -quantität denkbar. Diese Beschreibung erfolgt üblicherweise semiquantitativ über die Zuteilung einer bestimmten Punktzahl bei Eintreffen eines definierten Merkmals. Die Vergabe der Punktzahl ist gleichzeitig der größte Nachteil in der Verwendung eines Scores, da über die Punktvergabe eine Wertung erfolgt. Zur sinnvollen Interpretierung des Scores ist es nötig, vorab zu definieren, welches erwünschte und welches unerwünschte Merkmale sind. Im Gegensatz dazu enthält die histomorphometrische Auswertung keine Wertung, da das Ergebnis einen Zahlenwert darstellt, der durch den Untersucher interpretiert wird. So scheint dieses Verfahren im Zusammenspiel mit der deskriptiven Histomorphologie geeignet, die Abläufe während der Spondylodese objektiv zu beurteilen.

5.5 Der Harms Cage augmentiert mit mineralisiertem Kollagen

Ziel der vorliegenden Studie war die histologische Evaluation und der Vergleich der Spondylodese des Halswirbelsäulensegments drei / vier mittels eines mit mineralisiertem Kollagen augmentierten Harms-Cages per se und mit unterschiedlichen Beschichtungen aus (A) Thrombozytenkonzentrat, (B) Bone Morphogenetic Protein-2 und (C) zyklischem RGD Peptid, sowie mit den Präparaten einer unbehandelten Kontrollgruppe. Durch beschreibende histologische Untersuchungen und histomorphometrische Flächenberechnungen konnte der Einfluss des angewandten Implantats resp. der angewandten Implantat-Kombination auf die Knochenneubildung im Intervertebralraum bestimmt werden.

Die Zielsetzung in der Entwicklung intervertebraler Cages lag in der Aufrechterhaltung der Lordosierung und der Bandscheibenraumhöhe während der knöchernen Durchbauung des Bandscheibenraums (Weiner und Mitarbeiter 1998). Sandhu und Mitarbeiter (1996 b) wiesen in einem ovinen Wirbelsäulenfusionsmodell mittels Cage im Schraubendesign nach, dass die postoperativ erzielte Lordose besser aufrechterhalten wurde als bei Verwendung des trikortikalen Beckenkammspanns. Kandziora und Mitarbeiter (2002 a) bestätigten in einer vergleichenden Studie im Schafsmodell zwischen autologem Beckenkammspan, Syn-Cage (ein Titan Cage im Box Design) und Harms-Cage (als Vertreter eines zylindrischen Cages) diese Beobachtung. Postoperativ gelang die Distraktion des Bandscheibenfachs in allen Gruppen gleichsam, allerdings kam es in Folge des 12-wöchigen Beobachtungszeitraums in allen Gruppen zu signifikanten Sinterungserscheinungen, die in den mit Beckenkammspan versorgten Tieren auf Implantat-Kollaps und darauf folgende Resorption zurückzuführen waren, während der Syncage-C, wie auch der Harms-Cage in die Endplatten der Wirbelkörper einsank. Kandziora und Mitarbeiter (2002 a) stellten fest, dass dies unabhängig von der Auflagefläche des Implantats, die beim Syncage-C deutlich größer war als beim Harms-Cage, in vergleichbarem Umfang auftrat. In der vorliegenden Studie wurden diese Beobachtungen bestätigt. Bereits die makroskopische Betrachtung zeigte, dass der metallische Harms-Cage über das Niveau der Endplatten von C3 resp. C4 einsank.

Die Einheilung des verwendeten Harms-Cages vollzog sich ohne Komplikationen. Das Material wurde vom umliegenden Gewebe gut toleriert und bindegewebig, teils knöchern integriert. Osteoklastische Aktivitäten waren nicht auffällig. Nur im Bereich des gesinterten Implantats waren Fremdkörperreaktionen als Reaktion auf untergegangenes Knochengewebe durch Kompressionsdruck erkennbar. Das Ausmaß dieser Reaktionen war nicht von Relevanz, durchaus im Rahmen der Untersuchung zu erwarten und wurde in der Literatur beschrieben (Kandziora und Mitarbeiter 2002 a).

Die Verwendung kollagener Carrier zur Applikation von Wachstumsfaktoren wurde tierexperimentell untersucht (Boden und Mitarbeiter 1998; Boden und Mitarbeiter 2000; Fischgrund und Mitarbeiter 1997; Martin und Mitarbeiter 1999; Sorensen und Mitarbeiter 1990; Takaoka und Mitarbeiter 1991). Die Freisetzung der Wirksubstanzen schien jedoch sehr unsicher und einem derzeit nicht kontrollierbaren Prinzip zu folgen (Martin und Mitarbeiter 1999; Sorensen und Mitarbeiter 1990; Takaoka und Mitarbeiter 1991). Weiterhin wurde auf die Kompressionseigenschaften des Kollagenschwamms, mit teilweisem Kollaps des Materials, unter Druckbelastung hingewiesen (Takaoka und Mitarbeiter 1991). Gelinsky und Mitarbeiter (2004) entwickelten eine neuartige Methode zur Mineralisierung des kollagenen Schwamms mit dem Ziel der Etablierung eines biomimetischen

Knochenersatzmaterials. Der mineralisierte Kollagenschwamm wies im feuchten Milieu eine bessere Elastizität auf als vergleichbare native Kollagenschwämme, die jedoch für Last tragende Funktionen unzureichend waren (Gelinsky und Mitarbeiter 2004). Gelinsky und Mitarbeiter (2004) zeigten, dass das mineralisierte Kollagen in Zellkulturen gut biokompatibel ist. Die Verwendung dieses mineralisierten Kollagens gestaltete sich in der vorliegenden Studie wie von Gelinsky und Mitarbeiter (2004) beschrieben. Das Material behielt auch nach der Benetzung mit den verschiedenen Beschichtungen seine Form und kollabierte nicht. Histologisch war 12 Wochen nach der Implantation in den Präparaten, in denen Restgewebe des mineralisierten Kollagens identifiziert werden konnte, die poröse schwammartig, gitterförmig vernetzte Struktur der mineralisierten Kollagenfibrillen erkennbar.

Auf die Möglichkeit der immunologischen Reaktionen und die Gefahr der Übertragbarkeit von Krankheiten durch die Verwendung von vom Rind stammendem Kollagen wurde im Besonderen verwiesen (Takaoka und Mitarbeiter 1991). Die immunologische Sicherheit boviner Kollagenimplantate wurde in zahlreichen Studien untersucht. Es zeigte sich, dass nach intradermaler Applikation beim Menschen mit sichtbaren Immunreaktionen in 2 bis 4 % der Fälle binnen der ersten 4 Wochen zu rechnen war (Cooperman und Mitarbeiter 1984; DeLustro und Mitarbeiter 1990; Ellingsworth und Mitarbeiter 1986). DeLustro und Mitarbeiter (1990) zeigten anhand blutchemischer Untersuchungen mittels ELISA, dass nur in 7,5 % der mit bovinem Kollagen Typ I behandelten Menschen Antikörper gegen das Fremdeiweiß gebildet wurden. Ellingsworth und Mitarbeiter (1986) beschrieben in einer Studie, dass es in 3 % der mit Kollagen bovinen Ursprungs behandelten Probanden zu lokalen Entzündungsreaktionen kam. Die histologische Auswertung von Biopaten aus diesen Regionen war charakterisiert durch das Auftreten von Fremdkörpergranulomen mit mononukleären und polynukleären Zellinfiltraten (Ellingsworth und Mitarbeiter 1986). Granulome konnten in der vorliegenden Studie nicht festgestellt werden. Jedoch zeigte das kollagene Restgewebe Infiltrate von Makrophagen, Plasmazellen und zum Teil auch eosinophilen Granulozyten. Fremdkörperriesenzellen konnten vereinzelt nachgewiesen werden. Als Zeichen immunologischer Kompetenz des bovinen Kollagens wurde das Auftreten der eosinophilen Granulozyten und das vermehrte Vorhandensein von freien Erythrozyten gewertet. Es können durch Plasmazellen vermittelte Gefäßschäden auftreten, die in der Umgebung des Kollagenimplantats aufgefunden wurden (Junqueira und Mitarbeiter 1996). Freie Erythrozyten traten auch in Zusammenhang mit der Gefäßneubildung auf, da einsprossende Kapillaren noch undicht waren. Das in der Literatur beschriebene frühe Auftreten von immunologischen Reaktionen, gekennzeichnet durch Entzündungsreaktionen der Implantationsstelle, ließ sich in der vorliegenden Studie nicht evaluieren. Auf Grund des Zellbildes nach 12 Wochen war von einer guten Akzeptanz des

Materials auszugehen. Zwar konnten Immunreaktionen anhand spezifischer Zellen erkannt werden, sie schienen aber in der Spondylodese der Halswirbelsäule im Schafsmodell von untergeordneter Rolle zu sein und keinen Einfluss auf das Heilungsgeschehen zu nehmen. In einer Studie am Kaninchen setzten Katthagen und Mitarbeiter (1984) Defekte an den distalen Femurkondylen und füllten diese mit einem Kollagen – Hydroxylapatit – Gemisch. Die histologische Untersuchung nach 2, 3, 4, 6, 8 und 12 Wochen ließ weder Fremdkörperreaktionen noch allergische Reaktionen erkennen. Cooperman und Mitarbeiter (1984) begründeten die geringe Immunogenität des Typ I Kollagens bovinen Ursprungs damit, dass die Hauptimmunogene, das Amino- und das Carboxylende, die 80 % der Antigenität des Proteins ausmachten, mittels Pepsin abgespalten wurden und nur das helikale Mittelstück mit einer Restimmunogenität von 20 % verwendet wurde.

Nizard (1981) beschrieb in seinen Experimenten an Defektbohrungen des Femurs und Auffüllung des Defekts mittels industriell und manuell gefertigter Kollagen – Hydroxylapatit – Gemische die Knochenneubildung und Organisation des Gewebes im Kaninchen. Er beobachtete, dass die Knochenneubildung vom randständigen Knochengewebe ausging und mit zunehmender, zentral wandernder Gefäßversorgung langsam zentralwärts vordrang. Anfänglich fand er eingewanderte Makrophagen, Fibroblasten und Angioblasten in einem lockeren Bindegewebe. Mit Abklingen der Organisationsphase und Resorption des Apatitmaterials verringerte sich die Zahl der Makrophagen. Nizard (1981) konnte keine Fremdkörperriesenzellen nachweisen. Dieser Befund deckt sich weitestgehend mit den Beobachtungen in den hier untersuchten Präparaten, in denen Restgewebe des mineralisierten Kollagens nachweisbar war. Im Unterschied zu Nizards Beobachtungen, die keine Osteoklasten nachweisen konnte, die an der Resorption der mineralisierten Komponente beteiligt waren, wurden diese in den in der vorliegenden Studie untersuchten Präparaten regelmäßig angetroffen. In einer Arbeit von Wenisch und Mitarbeitern (2003) wurde gezeigt, dass Osteoklasten an der Resorption von Kalzium-Phosphat-Keramik beteiligt waren. Das Auftreten von Osteoklasten in den Präparaten war offensichtlich eine Folge der Mineralisierung des Kollagens und nicht des Kollagens selbst.

Die histologischen Ergebnisse des mit Spongiosa augmentierten Harms-Cage (Kandziora und Mitarbeiter 2002 a) waren mit denen der vorliegenden Studie vergleichbar. Kandziora und Mitarbeiter (2002 a) konnten beim Schaf Knochenneuformationen und Knorpelnester bevorzugt innerhalb des Cages sehen. Der Knochen wuchs zum Teil bis direkt an die Cages, partiell wurde der Cage auch bindegewebig umhüllt. Nach 12 Wochen konnte in keinem der Präparate eine Fusion festgestellt werden (Kandziora und Mitarbeiter 2002 a). Zur histomorphometrischen Untersuchung verwendeten Kandziora und Mitarbeiter (2002 a) das

Analyseprogramm, das auch dieser Studie zur Verfügung stand. Der Vergleich der histomorphometrischen Ergebnisse machte deutlich, dass der mit Spongiosa gefüllte Harms-Cage dem mit mineralisiertem Kollagen augmentierten bezüglich des prozentualen Anteils der Knochenfläche an der ROI überlegen war. Auch der Anteil des Knorpels war in der von Kandziora und Mitarbeitern (2002 a) durchgeführten Studie höher, während der Anteil des mineralisierten Knorpels an der Gesamtknorpelfläche in der mit mineralisiertem Kollagen augmentierten Gruppe höher war. Die reine mineralisierte Kollagenmatrix besaß kein bzw. nur ein unzureichendes osteoinduktives Potential. Osteoinduktive Eigenschaften waren jedoch notwendig, um das Spongiosatransplantat zu ersetzen (Gelinsky und Mitarbeiter 2004; Spiro und Mitarbeiter 2001; Tay und Mitarbeiter 1998; Yamanouchi und Mitarbeiter 2001). Aus diesem Grund war das mineralisierte Kollagen nicht in der Lage, die Entnahme der Beckenkammspongiosa zur Augmentierung des Harms-Cages im vorliegenden Modell zu ersetzen.

5.6 Einfluss der „osteinduktiven“ Materialien

Die Applikation von osteoinduktiven Substanzen soll in der Wirbelsäulen Chirurgie die Spondylodese stimulieren, die Fusion beschleunigen, die Pseudarthrose- und Komplikationsrate senken, die Ausheilung der Patienten forcieren und auf lange Sicht die Kosten der Behandlung reduzieren (Boden 2000; Boden und Mitarbeiter 1999; Sandhu und Mitarbeiter 1996 a).

5.6.1 Das autologe Thrombozytenkonzentrat - PRP

In zahlreichen Studien wurde der Effekt exogen applizierter osteoinduktiver Proteine oder Wachstumsfaktoren zur Steigerung der Knochenregeneration und -heilung untersucht (Boden und Mitarbeiter 1995 a; Boden und Mitarbeiter 1995 b; Cook und Mitarbeiter 1996; Grauer und Mitarbeiter 2001). Thrombozyten stellen via Degranulation Wachstumsfaktoren (PDGF, TGF- β , IGF-1 bFGF und VEGF) bereit und sind damit Teil der Wundheilungskaskade. Der Vorteil in der Verwendung von Thrombozyten liegt in der Möglichkeit der Separierung und Konzentrierung mittels Dichtegradienten (Cook und Mitarbeiter 1996). Einige Studien belegten, dass Thrombozytenkonzentrate die Knochenneubildung in Verbindung mit autogenen Implantaten förderten (Anitua 1999; Kassolis und Mitarbeiter 2000; Marx und Mitarbeiter 1998).

Eingesetzt zur spinalen Fusion herrschen in der Literatur kontroverse Meinungen bezüglich der Verwendung des Thrombozytenkonzentrats. So fanden Lowery und Mitarbeiter (1999) in

einer klinischen Studie zur Fusion von Lendenwirbeln unter Einsatz des autologen PRP eine gesteigerte Knochenneubildung und höhere Fusionsraten. Andere Autoren sprachen dem autologen Thrombozytenkonzentrat einen positiven Einfluss auf die Fusionierung von Wirbelkörpern ab (Li und Mitarbeiter 2004) oder machten diese von der Konzentration der Thrombozyten abhängig (Weibrich und Mitarbeiter 2004). Hee und Mitarbeiter (2003) beobachteten eine signifikant schnellere Knochenheilung bei Patienten, behandelt mit autologem PRP, zeigten aber auch, dass die Fusionsraten nicht höher waren, als bei nicht mit PRP behandelten Patienten. Diese Ergebnisse bestätigten auch Schönmayr und Mitarbeiter (2001 b). Sie zeigten in einem zervikalen Fusionsmodell, dass die Ergebnisse mittels Titan-Cage augmentiert mit Hydroxylapatit und PRP vergleichbar gute Fusionsraten, wie nach Verwendung autologer Spongiosa, aufwiesen (Schönmayr und Mitarbeiter 2001 b). Bei der Verwendung eines PEEK-Cages mit gleicher Augmentierung zeigten sie, dass die Fusionsraten bei 100 % lagen (Schönmayr und Mitarbeiter 2001 a).

Histomorphologisch zeigte sich in der vorliegenden Studie, dass das autologe Thrombozytenkonzentrat in der Lage war, die Knochenneubildung und den Knochenumbau zu beschleunigen. Das neugebildete Knochengewebe zeichnete sich durch eine fortgeschrittenere Reife gegenüber der nicht augmentierten Gruppe aus. Dieser Befund bestätigte die histologischen Ergebnisse von Marx und Mitarbeiter (1998). Auch sie zeigten bei Patienten mit Unterkieferkontinuitätsverlust infolge Tumorresektion, dass bei Auffüllung des Defekts mit autologer Spongiosa und PRP, im Vergleich zu einem nur mit autologer Spongiosa aufgefülltem Defekt, der neugebildete Knochen nach 6 Monaten reifer und dichter war (Marx und Mitarbeiter 1998). In der vorliegenden Studie war das PRP jedoch nicht in der Lage, die Knochenbildung in Richtung Fusion zu forcieren. Damit deckten sich die hier vorgestellten histomorphologischen Ergebnisse mit den radiologischen Beobachtungen von Hee (Hee und Mitarbeiter 2003). Diese Studie zeigte, dass die Anwendung autologer Wachstumsfaktoren zur transforaminalen Lendenwirbelkörperfusion die Zeit, in der eine Fusion erreicht werden konnte, verkürzte, jedoch wurde die Zahl erfolgreicher Fusionen nicht gesteigert. Sasano und Mitarbeiter (1993) wiesen nach, dass Knochen- und Knorpelbildung nebeneinander vorkommen können. Der Knorpel stellte jedoch keine Vorstufe für den späteren Knochen dar, sondern formte sich direkt auf der Kollagenschiene (Sasano und Mitarbeiter 1993). Zwar war der exakte Stimulus, welcher die Richtung für die Differenzierung mesenchymaler Stammzellen zu Chondro- oder Osteoblasten vorgab, noch nicht bekannt, doch wurde hierfür unter anderem die Sauerstoffzufuhr verantwortlich gemacht (Willenegger und Mitarbeiter 1971). Es wurde vermutet, dass die Kollagenmatrix eine ausreichende Sauerstoffsättigung auf ihrer Oberfläche aufweist und damit die direkte Knochenbildung ermöglicht wird. Außerdem habe die Geometrie des Carriers Einfluss auf

die Gefäßentwicklung und somit auf die Sauerstoffzufuhr, wodurch es zonal auch zu spezifischen Ossifikationsmustern käme (Kuboki und Mitarbeiter 1995).

Die histomorphometrischen Ergebnisse ließen keinen statistisch signifikanten Unterschied zwischen den Präparaten der Gruppe eins und den Präparaten der Gruppe zwei erkennen. Auch der Vergleich der mit PRP behandelten Präparate ergab keinen statistisch signifikanten Unterschied zu den Präparaten der unbehandelten Kontrollgruppe bezüglich des prozentualen Anteils der Knochenfläche an der ROI. Tendenziell sind die Präparate der mit Thrombozytenkonzentrat behandelten Gruppe weniger mineralisiert, bezogen auf den prozentualen Knochenanteil bzw. den Anteil des mineralisierten Knorpels am Gesamtknorpel, als die Präparate der unbehandelten Kontrollgruppe. Die Ursachen hierfür können mannigfaltig sein. Die Firma Curasan (Kleinstheim, Deutschland) gab in einer Information zur Verwendung eines Knochenersatzpräparats und dessen zertifizierte Anwendung mit PRP an, dass dieses zuvor mit Blut (ggf. aus dem Defekt) versetzt werden solle, um so eine vorzeitige Aktivierung der Thrombozyten durch Kalziumionen des Knochenersatzstoffes zu verhindern. Durch diese Aktivierung ginge ein Großteil der Wachstumsfaktoren verloren (Curasan 2000). Aber auch bei der Degradation von Kalziumphosphat, wie es zur Mineralisierung des in der vorliegenden Studie verwandten Kollagenschwammes verwandt wurde, werden Kalziumionen freigesetzt, die einen wie durch Curasan beschriebenen Effekt ausüben können (Schnürer und Mitarbeiter 2003). Zudem war zu bedenken, dass Thrombozyten nicht in der Lage waren, über längere Zeit Wachstumsfaktoren freizusetzen. Vielmehr glich die Freisetzung der Ausschüttung eines Speichers, der nicht wieder aufgefüllt werden kann. So ist erklärbar, dass die autologen Wachstumsfaktoren möglicherweise nur einen initialen Booster-Effekt hatten (Lowery und Mitarbeiter 1999). Durch Thrombozyten freigesetzte Wachstumsfaktoren hatten eine Halbwertszeit im Minutenbereich. Somit konnten sie auch nur lokal stimulierende Wirkungen ausüben, deren Effekte nur die ersten Wochen beeinflussten (Lowery und Mitarbeiter 1999; Noda 1998; Weibrich und Mitarbeiter 2004).

Das mineralisierte Kollagen wurde in der mit autologem PRP behandelten Gruppe vollständig resorbiert. Osteoklasten wurden in den Gruppen nachgewiesen, die Restgewebe der mineralisierten Kollagenmatrix aufwiesen. Weibrich und Mitarbeiter (2002 a) gaben an, dass in Thrombozyten die Wachstumsfaktoren PDGF, TGF- β , IGF-I enthalten sind. Verschiedene Studien wiesen nach, dass PDGF die Aktivität der Osteoklasten verstärkte (Antoniades und Mitarbeiter 1983; Tashjian und Mitarbeiter 1982). Osteoklasten wiederum synthetisierten eine Säure, um Hydroxylapatit und Kollagen Typ I zu spalten (Blair 1998). Dabei wurden auch Kalziumionen freigesetzt, die ihrerseits aktivierend auf die Thrombozyten

und regulierend auf die Osteoklastenaktivität wirkten (Blair 1998). Über diese Kaskade erfolgte eine Aktivierung der Osteoklasten, die letztlich zu der beobachteten forcierten Resorption des mineralisierten Kollagens führte. In der vorliegenden Studie kam es nicht zum Ersatz durch knöchernes Gewebe. An die Stelle des mineralisierten Kollagens traten Knorpel bzw. Bindegewebe. Weibrich und Mitarbeiter (2004) nannten als mögliche Ursache für geringe knochenbildende Potenz zu geringe Thrombozytenkonzentrationen im PRP. Sie gaben für humanes PRP Thrombozytenzahlen von $1 \times 10^6 / \mu\text{l}$ an. Geringere Konzentrationen zeigten keinen und höhere Konzentrationen einen paradoxen Effekt auf die Knochenregeneration (Weibrich und Mitarbeiter 2004). Um den Einfluss des PRP zur Spondylodese im Tiermodell Schaf zu evaluieren, wären Daten zur Konzentration der Wachstumsfaktoren im Schaf notwendig. Diese liegen derzeit nicht vor. Bisher waren nur Daten zu menschlichen Thrombozytenkonzentraten zu finden (Weibrich und Mitarbeiter 2002 b; Weibrich und Mitarbeiter 2002 c). Eine unveröffentlichte Studie von Bartmeyer und Mitarbeitern (persönliche Mitteilung 2004) untersuchte die Expression der Ribonukleinsäure (RNA) für die Wachstumsfaktoren PDGF, TGF- β und IGF-I im Thrombozytenkonzentrat des Schafes. Es wurde gezeigt, dass die RNA für PDGF exprimiert wurde, nicht aber die RNA für TGF- β und IGF-I, so dass für einen erfolgreichen Einsatz des PRP's zur Frakturheilung weitere osteogene Faktoren notwendig sein könnten (Bartmeyer und Mitarbeiter 2004, unpublished).

Für das PRP in der vorliegenden Studie wurden zwei Effekte beschrieben, zum einen die forcierte Reifung des Knochens im ehemaligen Bandscheibenraum und zum anderen die forcierte Resorption des mineralisierten Kollagens. Die Ergebnisse waren vergleichbar mit den Präparaten der unbeschichteten Gruppe und boten keinen entscheidenden Vorteil. Aus diesem Grund kann die gleichzeitige Applikation von mineralisiertem Kollagen und PRP zur intervertebralen Spondylodese im Tiermodell Schaf nicht überzeugen.

5.6.2 Das rekombinante humane Bone Morphogenetic Protein – rh BMP-2

BMP-2 wurde experimentell in der Wirbelsäulenchirurgie mit zum Teil großem Erfolg eingesetzt. Es gab auch Versuche, bei denen der Wachstumsfaktor mittels kollagenem Carrier appliziert wurde (Boden 2000; Boden und Mitarbeiter 2000), was allerdings mehrere Probleme mit sich brachte (Aspenberg und Mitarbeiter 1996; Hoshi und Mitarbeiter 1997; Kon und Mitarbeiter 1997; Martin und Mitarbeiter 1999; Mimatsu und Mitarbeiter 1997; Sorensen und Mitarbeiter 1990; Takaoka und Mitarbeiter 1991). So war die Freisetzungskinetik des Wachstumsfaktors unkontrollierbar (Martin und Mitarbeiter 1999; Sorensen und Mitarbeiter 1990; Takaoka und Mitarbeiter 1991). Das Auftreten der im

Vergleich zu den anderen Gruppen starken ventralen Kallus-Formationen könnte demnach bedingt sein durch die Freisetzung des Wachstumsfaktors aus dem kollagenen Gerüst und die damit verbundene Stimulation der Knochenneubildung im ventralen Bereich der Wirbelkörper. Da Schafe den Hals mehr oder weniger parallel gestreckt zum Boden halten, folgte die Freisetzung der Schwerkraft. Zudem war die Serum-Halbwertszeit des BMP-2 relativ kurz. In einem Kollagen-Schwamm mit rekombinantem humanen BMP-2 (rhBMP-2) konnte eine anhaltende Freisetzung von BMP mit einer Halbwertszeit von 3-5 Tagen nachgewiesen werden (Winn und Mitarbeiter 1999).

Ein weiteres in der Literatur beschriebenes Problem war die Fähigkeit des BMP-2 in ektopen Weichteilgeweben, auch in Abwesenheit von Knochenmarkselementen, Verknöcherungen hervorzurufen (Kon und Mitarbeiter 1997). Durch BMP-2 induzierte Verknöcherungen im Bandapparat der Wirbelsäule führten zu neurologisch wirksamen Myelonkompressionen (Hoshi und Mitarbeiter 1997; Mimatsu und Mitarbeiter 1997). In der vorliegenden Studie wurden auch nach 12 Wochen keine Verknöcherungen im umliegenden Weichteilgewebe festgestellt.

Histologisch zeigten Sandhu und Mitarbeiter (2002) in einem lumbalen Fusionsmodell am Schaf die Effektivität der Verwendung von humanem rekombinanten BMP-2. In einem 6 monatigen Beobachtungszeitraum wurde gezeigt, dass die Wirbel der Gruppe, fusioniert mittels eines Titan-Cages, augmentiert mit einem kollagenen Carrier, auf den das BMP-2 appliziert wurde, trabekulär-knöchernen Überbrückung zwischen den Wirbelkörpern aufwiesen. Es wurden keine Reste des kollagenen Carriers gefunden. In der Vergleichsgruppe, deren Implantat mit autologer Spongiosa gefüllt wurde, zeigten sich im Cage Bindegewebe, Faserknorpel und knöchernen Inseln. Als Zeichen der Resorption des autologen Transplantats fand sich eine erhöhte Anzahl von Resorptionslakunen mit aktiven Osteoklasten (Sandhu und Mitarbeiter 2002). Die Cagepore war in der vorliegenden Studie nicht gänzlich mit trabekulärem Knochen ausgefüllt, jedoch wurde in der vorliegenden Studie bereits nach 12 Wochen eine fortgeschrittene Knochenneubildung und -reifung festgestellt werden. In dieser Gruppe gab es drei Präparate mit einer knöchernen Fusion der Halswirbelkörper drei und vier. Wie in der Studie von Sandhu und Mitarbeitern (2002) fand sich auch in der vorliegenden Studie kein Anzeichen von kollagenem Restgewebe. Nach Winn und Mitarbeitern (1999) ging der Kollagenabbau konform mit der Freisetzung des BMP-2. In einem Studienzeitraum von 14 Tagen wurde eine Zersetzung der Kollagenmatrix und die Knochenneubildung mit Knochenmarksanteilen beobachtet (Horisaka und Mitarbeiter 1994). In einer Studie von Gordh und Mitarbeitern (1999), in der die Verwendung von

rhBMP-2 und einem Kollagencarrier beschrieben war, wurde der Carrier nach vier Wochen vollständig resorbiert (Gordh und Mitarbeiter 1999).

BMP-2 war in der Lage die Umwandlung von kollagener Knochenmatrix zu Knochengewebe zu beschleunigen. Nach Infiltration des Implantats mit mesenchymalen Stammzellen differenzierten sich diese unter Einfluss von BMP-2 zu Chondroblasten und Osteoblasten, die wiederum hypertrophierten und mineralisierte Matrix synthetisierten, während die Knorpelmatrix resorbiert und durch Knochen ersetzt wurde (Aspenberg und Mitarbeiter 1996; Carlson 2000; Urist und Mitarbeiter 1983; Wang und Mitarbeiter 1988). Nach 12 Wochen zeigte sich in der vorliegenden Studie, dass im Bereich des ehemaligen Intervertebralraums sehr dichter und reifer Knochen gebildet wurde, wobei die Anteile knorpeligen und bindegewebigen Gewebes eher gering waren. Kandziora und Mitarbeiter (2002 d) verwandten im gleichen Fusionsmodell am Schaf den Harms-Cage augmentiert mit einem reinen Kollagenschwamm in Kombination mit BMP-2. Histologisch zeigten sich hier Knochenareale und Knorpelnester im ehemaligen Intervertebralraum. Sie gingen nicht näher auf die Qualität des Knochens ein. Kandziora und Mitarbeiter (2002 d) wandten für den Bereich der Pore den Fusionsscore nach Lund an. Sie konnten bei 8 Tieren drei Fusionen nach C und fünf nach B klassifizieren, während in der vorliegenden Studie die Ergebnisse je eine Stufe höher eingeschätzt werden konnten. Es wurden im Bereich der Pore drei Präparate als D und fünf Präparate als C fusioniert eingestuft.

Histomorphometrisch wies die mit BMP-2 behandelte Gruppe signifikant mehr Knochenfläche in der ROI auf, als die Gruppe, die ausschließlich mit mineralisiertem Kollagen augmentiert wurde. Verglichen mit histomorphometrischen Ergebnissen von Kandziora und Mitarbeitern (2002 a) bezüglich des mit autologer Spongiosa beschickten Harms-Cages zeigte sich, dass das mit mineralisiertem Kollagen und BMP-2 beschichtete Implantat tendenziell überlegen war und mehr Knochengewebe in der ROI erkennen ließ. In einer weiteren Studie verwandten Kandziora und Mitarbeiter (2002 d) den Harms-Cage augmentiert mit einem reinen Kollagenschwamm und beschichteten ihn mit BMP-2. Die histomorphometrischen Ergebnisse dieser Präparate lagen bezüglich des prozentualen Knochenanteils der ROI deutlich unter denen des Harms-Cages augmentiert mit mineralisiertem Kollagen und beschichtet mit BMP-2.

Mittels BMP-2 konnte in Kombination mit dem mineralisierten Kollagen eine forcierte Fusion erreicht werden. Nach 12 Wochen zeigte sich in den zusätzlich mit BMP-2 behandelten Präparaten signifikant mehr Knochengewebe in der ROI als in den Präparaten, die nur mit dem kollagenen Carrier augmentiert worden waren. Die Kombination von BMP-2 mit einer

mineralisierten Komponente ist als wesentlicher Vorteil zu sehen. Sie sollte bei weiteren Bemühungen um den klinischen Einsatz des hochpotenten Wachstumsfaktors berücksichtigt werden.

BMP-2 konnte in der vorliegenden Studie sein osteoinduktives Verhalten erneut unter Beweis stellen, jedoch war die Applikation auf kollagenen „Carrier“ nicht als sicher einzustufen. Die prominente ventrale Kallusbildung war als Zeichen der unkontrollierbaren Freisetzung des Wachstumsfaktors zu werten. Aus diesem Grund sollte die Anwendung des BMP-2 mit Applikation auf einem Kollagenschwamm in der experimentellen Forschung beschränkt bleiben, bis eine Möglichkeit zur kontrollierten Freisetzung geschaffen wird.

5.6.3 Das zyklische RGD-Peptid

Die Verwendung des zyklischen RGD-Peptides zur Unterstützung der Spondylodese wurde bisher nicht beschrieben. Verschiedene Autoren untersuchten den Effekt der Peptid-Sequenz Arg-Gly-Asp auf die Adhäsion von Osteoblasten und osteoblastenähnlichen Zellen in der Zellkultur (Huang und Mitarbeiter 2003; Kantlehner und Mitarbeiter 1999; Kantlehner und Mitarbeiter 2000). Studien zu in vivo Versuchen existierten bisher kaum. Erste Studien beschäftigten sich mit der Integration dentaler Implantate (Schliephake und Mitarbeiter 2002) oder von Femurnägeln im Rattenmodell (Ferris und Mitarbeiter 1999), die zuvor mit diesem Peptid beschichtet worden waren.

Schliephake und Mitarbeiter (2002) setzten in die Mandibula von Hunden Titankörper mit unterschiedlicher Oberfläche ein, um die Integration des Materials histologisch zu untersuchen. Eine Gruppe erhielt den Titankörper unbeschichtet, in einer zweiten wurde der Körper mit Kollagen und in einer dritten Gruppe zusätzlich zu dem Kollagen mit dem RGD-Peptid beschichtet. Nach 12 Wochen konnten sie signifikant mehr Knochen im Kontaktbereich zum Implantat in der mit RGD behandelten Gruppe feststellen, während die reine Kollagenbeschichtung keinen Einfluss auf das Einheilungsverhalten zeigte. Der gebildete Knochen zeigte in der RGD-Gruppe ein fortgeschrittenes Remodelling und dichtere Knochen trabekel (Schliephake und Mitarbeiter 2002). Auch Ferris und Mitarbeiter (1999) zeigten anhand eines RGD-beschichteten Femurnagels, dass das Peptid in der Lage war, die neugebildete Menge an Knochen nach 4 Wochen gegenüber einer unbeschichteten Kontrollgruppe zu steigern (Ferris und Mitarbeiter 1999).

In der vorliegenden Studie zeigte sich in den Präparaten, die mit cRGD behandelt worden waren, ein ähnliches Bild des Knochengewebes in der Cagepore. Histologisch konnte

lamellär-trabekulärer Knochen, der massiver war als in der nicht beschichteten Gruppe eins, nachgewiesen werden. In einem einzelnen Präparat wurde kollagenes Restgewebe in der zentralen Cagepore festgestellt. Die Organisation des Gewebes verhielt sich ähnlich wie in der unbeschichteten Gruppe, versorgt mit Harms-Cage und mineralisiertem Kollagen. Demnach hat das cRGD keinen Einfluss auf die erhöhte Resorption des Augmentats. Zyklisches RGD-Peptid ist ein natürliches Zellerkennungsmotiv und vermittelt über Interaktion mit den Integrinen zelluläre Adhäsion und Aktivierung von Zellen (Blancher und Mitarbeiter 1996; Duong und Mitarbeiter 2000; Robey 1996). Während Osteoblasten, die für die Bildung knöcherner Matrix verantwortlich sind, über diese cRGD-spezifischen Integrine verfügen, fehlen sie den Osteoklasten (Ferris und Mitarbeiter 1999; Horton 1995; Horton und Mitarbeiter 1995). Osteoklasten resorbierten das mineralisierte Kollagen. Der maßgebliche Stimulus ging dabei in den Gruppen eins und vier allein von der Hydroxylapatit-Komponente aus und zeigte keinen deutlichen Unterschied zwischen diesen beiden Gruppen (Wenisch und Mitarbeiter 2003).

Die Präparate der mit cRGD behandelten Gruppe wiesen signifikant mehr Knochen in der ROI auf als die Präparate der Gruppe, die den Harms-Cage ausschließlich mit mineralisiertem Kollagen augmentiert erhielt. Schneider und Mitarbeiter (2001) konnten zeigen, dass die RGD Sequenz nach Bindung an den $\alpha_2\beta_3$ - Rezeptoren der Osteoblasten die Mineralisierung induzierte und regulierte. Auch der prozentuale Anteil des Knorpelgewebes war in dieser Gruppe signifikant erhöht. Das ließ den Schluss zu, dass cRGD in der Lage war, die Knochenneubildung in Richtung Fusion zu forcieren. Im Vergleich mit dem bereits eingesetzten Harms-Cage mit Spongiosafüllung (Standard-Implantat) schnitt das cRGD-beschichtete Implantat besser ab und schien daher dem Standard-Implantat überlegen zu sein (Kandziora und Mitarbeiter 2002 a). Der prozentuale Anteil von Knorpelgewebe in der ROI unterscheidet sich zwischen der Literaturangabe für den Harms-Cage mit Spongiosa Füllung nur tendenziell, während ein deutlicher Unterschied für den Anteil des mineralisierten Knorpels am Gesamtknorpel festzustellen war (Kandziora und Mitarbeiter 2002 a).

Das zyklische RGD-Peptid in Kombination mit mineralisiertem Kollagen scheint zum 12-Wochen Zeitpunkt eine Alternative zum Einsatz der autologen Spongiosa darzustellen. Es war in der Lage die osteokonduktiven Eigenschaften des mineralisierten Kollagens durch sein osteoinduktives Potential zu unterstützen. Es konnten nach 12 Wochen keine nachteiligen Wirkungen der Beschichtung festgestellt werden. Vor dem klinischen Einsatz ist jedoch eine längerfristige Studie zu evtl. später auftretenden Problemen ratsam.

5.7 Vergleich der Gruppen untereinander und mit der Kontrollgruppe

In der Betrachtung des Harms-Cage per se fiel auf, dass er in allen Gruppen gleichmäßig und in ähnlicher Weise sinterte. Im dorsalen Bereich war die Sinterung stärker als im ventralen Bereich. Friedersdorff (in Vorbereitung, 2005) bestätigte diese Feststellung in seiner radiologischen Verlaufskontrolle und zeigte, dass die Sinterung zum 12-Wochen-Zeitpunkt ein Plateau erreichte. Die Sinterung in der vorliegenden Weise beeinträchtigte nicht die Entlastung der Foramina intervertebralia, die durch die Lordosierung erhalten werden konnte (Weiner und Mitarbeiter 1998). In einer früheren Studie wurde gezeigt, dass das Sinterungsverhalten des Harms-Cages vergleichbar war mit Cages im Schraubendesign, die eine wesentlich größere Auflagefläche hatten (Kandziora und Mitarbeiter 2002 a). Trotz Einsinkens des Implantats in die Wirbelkörper waren Titanimplantate nach Kandziora und Mitarbeitern (2002 a) eher in der Lage, die gewünschte Lordosierung post operationem aufrechtzuerhalten als der Beckenkammspan. Das Beckenkammspan-Implantat war nach 12 Wochen kollabiert und das versteifte Wirbelsegment stärker rekyphotisiert als die Segmente, die mit einem Titan-Cage versorgt worden waren (Kandziora und Mitarbeiter 2002 a).

Die vier behandelten Gruppen wiesen, bedingt durch die Operationstechnik, nach der die Endplatten angefrischt werden mussten, um eine Spondylodese zu erreichen, im histologischen Bild keine Endplattenstrukturen auf (Aronson und Mitarbeiter 1968; Cloward 1988; Robinson und Mitarbeiter 1955). Diese wurden in der unbehandelten Kontrollgruppe in jedem Präparat und vollständig ausgebildet gefunden. Dies bedingte auch, dass in der unbehandelten Kontrollgruppe alle Präparate Bandscheiben aufwiesen, die in den behandelten Gruppen operativ vollständig entfernt wurden (Aronson und Mitarbeiter 1968; Cloward 1988; Robinson und Mitarbeiter 1955). In den behandelten Gruppen konnte histologisch kein Restgewebe nachgewiesen werden.

Die veränderten statischen Bedingungen der Wirbelkörper bewirkten die Anpassung des spongiösen Knochens. Das Knochengewebe war etwas kompakter als das feine Maschenwerk in der unbehandelten Kontrollgruppe (Braun und Mitarbeiter 1996; Brighton 1984; Willenegger und Mitarbeiter 1971). Durch zum Teil jahrelang anhaltendes Remodelling wird der Knochen seinen Belastungen angepasst (Braun und Mitarbeiter 1996; Brighton 1984; Willenegger und Mitarbeiter 1971).

Wie in den vorangegangenen Kapiteln diskutiert, hatte die Beschichtung des mineralisierten Kollagens einen Einfluss auf das zugebildete Gewebe im Intervertebralraum. BMP-2 und PRP waren in der Lage die Knochenreifung zu stimulieren und zu forcieren. In beiden Gruppen konnte gezeigt werden, dass die Resorption des Corematerials nach 12 Wochen vollständig abgeschlossen und Restgewebe histologisch nicht nachweisbar war. BMP-2

beschleunigte die Synthese des Knochengewebes aus kollagener Matrix durch Stimulation der Osteoblasten und Chondroblasten, so dass die Vorgänge, die bei der Frakturheilung ablaufen, in kürzerer Zeit erreicht wurden (Aspenberg und Mitarbeiter 1996; Carlson 2000; Urist und Mitarbeiter 1983; Wang und Mitarbeiter 1988). In den mit PRP behandelten Präparaten konnte der vollständige Abbau auf den additiven Stimulus der mineralisierten Komponente und das freigesetzte PDGF zurückgeführt werden (Antoniades und Mitarbeiter 1983; Blair 1998; Tashjian und Mitarbeiter 1982). In den Präparaten der Gruppe eins sowie in den Präparaten, die mit cRGD beschichtet wurden, fehlten zusätzliche Einflüsse. In diesen Gruppen kam es vereinzelt zu hyperämisierten Arealen. Da dies ausschließlich in Verbindung mit dem kollagenen Carrier-System in Erscheinung trat, kamen zwei Ursachen dafür in Frage:

Zum einen wurde initial der Defekt infolge der Zerreißung nutritiver Blutgefäße mit einem Frakturhämatom aufgefüllt (Braun und Mitarbeiter 1996; Brighton 1984). Dies ermöglichte die Anflutung mesenchymaler Zellen, die entsprechend den Umgebungsbedingungen zu den entsprechenden Bindegewebstypen differenzierten und über eine ein bis fünf Tage andauernde Entzündungsphase zur Revaskularisierung führten (Brighton 1984; Remedios 1999; Simmons 1985; Street und Mitarbeiter 2000). Das ausgetretene Blut gerann und verspannte die Frakturrenden durch Fibrinfäden, die den einsprossenden Kapillaren als Leitschiene dienten und die Revaskularisierung vorantrieben. Die Revaskularisierung gilt als primäres Ziel der Frakturheilung, da sie diese erst initiiert und in der Folge unterstützt (Cruess und Mitarbeiter 1975). Mit den Gefäßen gelangten Makrophagen in das Frakturgebiet, welche die Gewebstrümmer und das Core-Material abbauten (Bucher und Mitarbeiter 1997).

Zum anderen wurden bei der Verwendung bovinen Kollagens Typ I am Menschen allergische Reaktionen beschrieben, die Entzündungsreaktionen und so Hyperämie verursachten (Ellingsworth und Mitarbeiter 1986; Junqueira und Mitarbeiter 1996; Takaoka und Mitarbeiter 1991). So ist zu vermuten, dass infolge immunologischer Reaktionen des Organismus in den Präparaten, die Restkollagen aufwiesen, die Frakturheilung beeinträchtigt wurde. Da auf Grund des vorgefundenen Zellbildes nicht von einer relevanten Immunreaktion zum 12-Wochen-Zeitpunkt auszugehen war, ist zu mutmaßen, dass diese initial auftrat und mit der Implantation in Zusammenhang stand. Dies war die Ursache für die starke Vaskularisierung der Präparate der Gruppen eins und vier.

Die beschriebene osteoinduktive Potenz der Gruppen drei und vier spiegelte sich auch im Erreichen der Fusion der Wirbelsegmente C3 / C4 wider. BMP-2 und cRGD stellten ihre

osteokonduktiven Eigenschaften unter Beweis (Aspenberg und Mitarbeiter 1996; Carlson 2000; Huang und Mitarbeiter 2003; Kantlehner und Mitarbeiter 1999; Kantlehner und Mitarbeiter 2000; Urist und Mitarbeiter 1983; Wang und Mitarbeiter 1988). Kandziora fand nach 12 Wochen in acht mittels Harms-Cage (augmentiert mit Kollagenschwamm und BMP-2 Applikation) fusionierten Wirbelkörpern beim Schafmodell in der zentralen Pore nur ein Präparat mit einer vollständigen Fusion (Kandziora und Mitarbeiter 2002 d). In der vorliegenden Studie wurden in der zusätzlich mit BMP-2 behandelten Gruppe drei vollständige Fusionen festgestellt. Einziger Unterschied in den Versuchsanordnungen bestand in der Verwendung eines mineralisierten kollagenen Carriers in unserer Studie, im Vergleich zum reinen Kollagenschwamm (Kandziora und Mitarbeiter 2002 d). In der gleichen Studie setzten Kandziora und Mitarbeiter (2002 d) acht Schafen den Harms-Cage ohne Augmentierung ein und konnten keine vollständige Fusion nach 12 Wochen feststellen, während in der vorliegenden Untersuchung nur mit mineralisiertem Kollagen eine vollständige Fusion festgestellt werden konnte. Die Gruppe vier verhielt sich diesbezüglich wie die erste Gruppe und verzeichnete zwei vollständige Fusionen, während die mit autologem Thrombozytenkonzentrat behandelte Gruppe keine Fusion aufwies und damit der Gruppe, die allein den Harms-Cage erhielt, vergleichbar war (Kandziora und Mitarbeiter 2002 d). Schlussfolgernd bleibt festzustellen, dass der mineralisierten Komponente des Kollagens ein auf das Fusionsgeschehen positiver Effekt zuzuschreiben war. Nach Nizard (1981) handelte es sich dabei um einen osteoinduktiven Effekt, den das Hydroxylapatit in der Knochenbildung ausübte.

Die Struktur der Wirbelkörper-Kortikalis während der Spondylodese wurde bisher nicht beschrieben. Von gut untersuchten Röhrenknochenfrakturen weiß man, dass die Entzündungsphase, die im Anschluss an die Fraktur auftritt, in die Bildungsphase des periostal-fibrösen Kallus, der auch als Granulationsgewebe bezeichnet wird, übergeht (Bourque und Mitarbeiter 1992; Braun und Mitarbeiter 1996). Diese Phase ist gekennzeichnet durch die Expansion der Kambiumschicht und fibroblastenähnliche Mesenchymzellen, die den Frakturspalt mit fibrösem Kallusgewebe überbrücken. Nach Braun und Mitarbeitern (1996) dauert die Granulationsphase beim Menschen drei Wochen. Über Mineralisierung der kollagenen Fibrillen des Bindegewebes wird Geflechtknochen gebildet, der die strukturelle Stärke und Steifigkeit aufweist, welche die Bewegung im Frakturspalt auf ein Maß reduziert, das für die Bildung von Lamellenknochen notwendig ist (Brighton 1984; Chao und Mitarbeiter 1989). Der Geflechtknochen wird sukzessive durch Lamellenknochen ersetzt (Bucher und Mitarbeiter 1997). Der zuerst entstehende Geflechtknochen agiert als Platzhalter- oder Notknochen, der zügig produziert wird und daher in seinem Aussehen wenig strukturiert ist (Noble und Mitarbeiter 2000). Die

Verbindung zwischen kortikalem Knochen und Geflechtknochen ist zu diesem Zeitpunkt das schwächste Glied in der Kette der Kraftübertragung (Bucher und Mitarbeiter 1997). Der Geflechtknochen wird von sekundären Osteonen, die aus der Kortikalis stammend in den Frakturspalt einwachsen und die eine enchondrale Ossifikation bewirken, als Leitgerüst benötigt. Diese Vorgänge führen über eine vorübergehende paradoxe Auflockerung der Kortikalis zur endgültigen Heilung. Diese Auflockerung ist histologisch nachweisbar und wird verursacht durch die Tätigkeit von Osteoklasten, welche sich in den Geflechtknochen vorarbeiten (Marsh und Mitarbeiter 1999). Chao und Mitarbeiter (1989) beschrieben eine ähnliche paradoxe Auflockerung auch im Kallus bei der endgültigen Vereinigung der Frakturenenden. Die vollständige Frakturheilung kann bis zu mehrere Jahre in Anspruch nehmen und schließt die vollständige Resorption überflüssiger oder schlecht platzierter Trabekel und die knöcherne Verstärkung der Hauptkraftlinien mit ein (Cruess und Mitarbeiter 1975). Betrachtet man das histologische Bild der untersuchten Präparate, war auffallend, dass die Spondylodese im Schafmodell zum 12-Wochen-Zeitpunkt an dem Punkt des Umbaus des Geflechtknochens zu lamellären Knochen und der Auffaserung der Kortikalis angelangt war. Während in der Gruppe, behandelt nur mit Harms-Cage und mineralisiertem Kollagen, die Kortikalis noch weitgehend geschlossen war, zeigte sich sowohl in den mit PRP sowie in den mit BMP-2, als auch in den mit cRGD behandelten Präparaten ein fortgeschritteneres Bild der Knochenheilung. Hier fanden wir die aufgefaserte Kortikalis und den aufgefaserten ventralen Kallus mit enchondralen Verknöcherungsherden. In der mit BMP-2 behandelten Gruppe war ein Zeichen der Auffaserung der ventralen Kortikalis die Besiedlung der Zwischenräume mit Knochenmarkselementen bis in den Kallus. Das histologische Bild war vergleichbar mit dem der sekundären Frakturheilung des Röhrenknochens. Die unbehandelte Kontrollgruppe verfügte im Vergleich dazu über eine geschlossene, sehr schmale Wirbelkörper-Kortikalis (Frick und Mitarbeiter 1992).

Im histomorphometrischen Vergleich der Zubildung von Knochengewebe waren die Präparate der Gruppen, die mit dem humanen rekombinaten Wachstumsfaktor BMP-2 und dem zyklischen RGD-Peptid behandelt worden waren, den Präparaten der Gruppe eins und den Präparaten der Gruppe zwei statistisch signifikant überlegen. In den Präparaten der Gruppen drei und vier wurde auf Grund der osteoinduktiven Eigenschaften des BMP-2 respektive des cRGD (Aspenberg und Mitarbeiter 1996; Carlson 2000; Huang und Mitarbeiter 2003; Kandziora und Mitarbeiter 2002 d; Kantlehner und Mitarbeiter 1999; Kantlehner und Mitarbeiter 2000; Urist und Mitarbeiter 1983; Wang und Mitarbeiter 1988) signifikant mehr Knochengewebe in der „Region of Interest“ gebildet als in den Gruppen eins und zwei. Im Vergleich mit der unbehandelten Kontrollgruppe (nativ) zeigte sich, dass es in den Präparaten der behandelten Gruppen eins, drei und vier signifikant mehr Knochen in der

ROI gab. Die Präparate der Gruppe, die mit autologem PRP behandelt worden waren, wiesen einen nur tendenziell höheren prozentualen Knochenanteil an der ROI auf als die Präparate der unbehandelten Kontrollgruppe. Die von Marx und Mitarbeitern (1988) beschriebene osteoinduktive Potenz des PRP in der Kiefer- und Gesichtschirurgie muss demnach für die Wirbelsäule neu bewertet werden. Das Ausbleiben eines signifikanten Effekts beim Einsatz des Thrombozytenkonzentrats kann in der Anwendung begründet liegen.

Curasan (2000) gab für die Verwendung von PRP mit Knochenersatzmaterialien die Mischung des Ersatzmaterials mit Defektblut an. Das soll eine vorzeitige Aktivierung des PRP durch freie Kalziumionen vermeiden. Andere Autoren kombinierten das PRP mit autologer Spongiosa (Anitua 2001; Bilk 2001; Carlson 2000; Lowery und Mitarbeiter 1999; Marx und Mitarbeiter 1998), während das Thrombozytenkonzentrat in unserer Studie als Beschichtung Verwendung fand.

Bezüglich des Parameters „prozentualer Anteil der Knorpelfläche an der Gesamtfläche“ stellte sich heraus, dass es zwischen den Gruppen eins bis drei und zwei bis vier zu keinen signifikanten Unterschieden kam, während die Präparate der Gruppe eins signifikant weniger Knorpelfläche aufwiesen als die mit cRGD beschichtete Gruppe vier. Genes und Mitarbeiter (2004) wiesen nach, dass auch Chondroblasten über RGD-sequenzabhängige Rezeptoren verfügen. Demnach ist eine RGD-vermittelte Knochen- und Knorpelzubildung in Abhängigkeit von der Umgebung denkbar. So wurde Knorpel bei limitierter Blutzufuhr bevorzugt gebildet (Palmer und Mitarbeiter 1992; Willenegger und Mitarbeiter 1971). Im Vergleich zu den Daten von Kandziora und Mitarbeitern (2002 a) bezüglich des prozentualen Anteils der Knorpelfläche an der ROI des Spongiosa augmentierten Harms-Cages war auffällig, dass die Werte der vorliegenden Studie für die Gruppen zwei bis vier innerhalb der angegebenen Parameter lagen. Hiernach zeigte sich, dass die Gruppe mit mineralisiertem Kollagen augmentierter Harms-Cages signifikant weniger Knorpel aufwies als die Gruppe vier. Demnach zeigte sich im direkten histomorphometrischen Vergleich der Gruppe eins mit der Gruppe vier, dass die Präparate der Gruppe mit zyklischem RGD Peptid sowohl signifikant mehr Knochen als auch signifikant mehr Knorpel in der Fläche der ROI aufwiesen.

Es war mit dem zur Verfügung stehenden histomorphometrischen System sehr schwierig, diesen Sachverhalt zu erklären. Ein Ansatz ist der Bezug zur Histomorphologie. Hier wurde deutlich, dass die Gruppe eins deutliche Bindegewebszubildungen im ehemaligen Intervertebralraum aufwies. Jedoch konnte diese histologische Beobachtung nicht quantifiziert und so auch nicht in Relation zu den histomorphometrischen Daten gesetzt

werden. Es bleibt daher zu vermuten, dass die signifikant größeren Flächenanteile von Knochen und Knorpel an der ROI der Gruppe 4 durch mehr Bindegewebefläche in der Gruppe eins ausgeglichen wurden.

Die vier behandelten Gruppen wiesen im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe (nativ) signifikant weniger Knorpel in der ROI auf. Während das Knorpelgewebe in den behandelten Gruppen als Stufe der enchondralen Ossifikation zu werten war, stellte das Knorpelgewebe der unbehandelten Kontrollgruppe die Bandscheibe dar (Junqueira und Mitarbeiter 1996; Wheeler und Mitarbeiter 1987). Aus diesem Grund ist die Knorpelqualität zwischen den Gruppen nicht vergleichbar. Der Knorpel in den behandelten Gruppen war als Teil der Frakturheilung zu verstehen (Braun und Mitarbeiter 1996). Demnach war verständlich, dass der prozentuale Anteil des mineralisierten Knorpels an der Gesamtknorpelfläche signifikant höher war in den Gruppen eins bis vier, in Bezug auf die unbehandelte Kontrollgruppe. Das lag an der Funktion des Knorpels in den behandelten Gruppen. Hier dient der Knorpel als Vorstufe und Leitschiene für die Ossifikation (Braun und Mitarbeiter 1996).

5.8 Schlussfolgerung

5.8.1 Analysemethode

Die histomorphologische und histomorphometrische Untersuchung in der vorliegenden Studie boten Vor- und Nachteile und erst die Kombination führte zu einem Gesamtbild der Prozesse, die während der Spondylodese abgelaufen waren.

Zur Gesamtbeurteilung der Spondylodese schien die alleinige Verwendung der einen oder anderen Methodik wenig Erfolg versprechend. Vielfach zeigte sich zwar, dass die histomorphologischen Ergebnisse mit den histomorphometrischen konform gingen, jedoch schien die alleinige Flächenberechnung nicht ausreichend um ein gesamthistologisches Bild zu erhalten. In der vorliegenden Arbeit war man zudem nur in der Lage, die Gewebe Knochen, Knorpel und mineralisierten Knorpel zu differenzieren, während Bindegewebe, welches in nicht unerheblichem Maße auf die Frakturheilung Einfluss nahm, unerfasst blieb. Dies wurde im histomorphometrischen Vergleich der Gruppen eins und vier deutlich. Das mit zyklischem RGD-Peptid beschichtete Implantat war dem nur mit mineralisiertem Kollagen augmentierten Harms-Cage sowohl im prozentualen Anteil der Knochenfläche in der ROI, als auch im prozentualen Anteil der Knorpelfläche in der ROI statistisch signifikant überlegen. Histomorphologisch zeigte sich, dass in der Gruppe eins mehr Bindegewebe erkennbar war. Nachteil war hier, dass das Bindegewebe nicht quantifiziert werden konnte und der Anteil des Bindegewebes einem subjektiven Eindruck des Auswertenden entsprach.

Ein weiterer kritisch anzumerkender Punkt war, dass auf zellulärer Ebene ablaufende Prozesse histomorphometrisch nicht erfasst wurden. Dies konnte nur über die histomorphologische Untersuchung ergänzt werden. Gerade die Testung von Fremdmaterialien, die zu immunologischen Reaktionen führen können und deren Einsatz am Menschen geplant ist, macht eine feingewebliche Untersuchung zwingend erforderlich. Der Verzicht auf die Histomorphologie zu Gunsten einer alleinigen histomorphometrischen Beurteilung der Spondylodese wäre aus diesem Grund, wie so oft in der Literatur gefunden, äußerst kritisch zu bewerten.

5.8.2 Klinische Relevanz

Die Ergebnisse der vorliegenden Studie zeigten, dass der Harms-Cage augmentiert mit mineralisiertem Kollagen mit und ohne Beschichtung mit osteoinduktiven Substanzen geeignet war, das Beckenkammspanimplantat, das noch heute als „Golden Standard“ bezeichnet wird, zu ersetzen (Cloward 1971; Dennis und Mitarbeiter 1989; Emery und Mitarbeiter 1994 a; Robinson und Mitarbeiter 1955; Robinson und Mitarbeiter 1962). Die Ergebnisse zeigten morphologisch wie auch morphometrisch keine relevanten Unterschiede im Vergleich des Beckenkammspanimplantats zu den Implantaten der vorliegenden Studie (Pflugmacher und Mitarbeiter 2004). Tendenziell war sogar das Harms-Cage Implantat, augmentiert mit mineralisiertem Kollagen, dem Beckenkammspanimplantat zum 12-Wochen-Zeitpunkt gleichwertig.

Der Harms-Cage befand sich bereits im klinischen Einsatz zur Spondylodese am Menschen. Zu diesem Zweck wurde er mit Spongiosa aus dem Beckenkamm augmentiert (Eysel und Mitarbeiter 2000; Harms 2000; Lowery und Mitarbeiter 1996; Togawa und Mitarbeiter 2003). Die Gruppen, die zusätzlich mit BMP-2 resp. cRGD kombiniert wurden, zeigten, dass die Addition osteoinduktiver Substanzen zu durchaus vergleichbaren Ergebnissen zu denen des Beckenkammspanes führten (Kandziora und Mitarbeiter 2002 a; Kandziora und Mitarbeiter 2002 d). Bei Anwendung des mit mineralisiertem Kollagen augmentierten Harms-Cages und Kombination mit BMP-2 oder cRGD-Peptid könnte die Entnahme autologer Spongiosa und damit die Setzung eines Zweitdefekts entfallen. Für die Anwendung des mineralisierten Kollagens allein oder in Kombination mit dem autologen Thrombozytenkonzentrat kann auf die Spongiosaentnahme weiterhin nicht verzichtet werden. Während die histomorphologischen Ergebnisse für die Gruppe eins im Vergleich zu dem mit Spongiosa augmentierten Cage ein gleichwertiges Abschneiden zeigten, waren die histomorphometrischen Ergebnisse unterlegen (Kandziora und Mitarbeiter 2002 a). Da die histomorphologischen Ergebnisse der Präparate der mit PRP behandelten Gruppe keinen Unterschied zu den Präparaten der Gruppe zeigten, die allein mit mineralisiertem Kollagen augmentiert wurde, ist hier nicht von einem relevanten Effekt für die Spondylodese auszugehen.

Während die Präparate der mit PRP behandelten Gruppe histologisch keinen Unterschied zu den Präparaten der Gruppe eins erkennen ließen, zeigten die Präparate der Gruppen, die zusätzlich mit BMP-2 und cRGD behandelt wurden, eine deutlich forcierte Spondylodese nach 12-Wochen.

Auch wenn BMP-2 in der vorliegenden Studie erneut seine knochenbildende Potenz unter Beweis zu stellen vermochte, ist zu bedenken, dass in der hier angewandten Applikation für diesen Wachstumsfaktor kein sicheres Carrier-System gewählt wurde. So ist die Kombination auch mit einem mineralisierten Kollagenschwamm als unsicher einzustufen, da die Freisetzung unvorhersehbar und unkontrollierbar war. Die ventrale Kallusformation wurde als Zeichen der unkontrollierten Freisetzung des BMP-2 gewertet. Auch wenn in der vorliegenden Studie keine ektope Verknöcherung festgestellt wurde, wurde in der Literatur auf diese Nebenwirkung ausdrücklich hingewiesen (Hoshi und Mitarbeiter 1997; Mimatsu und Mitarbeiter 1997).

Demnach scheint das cRGD aussichtsreich in der zukünftigen Forschung zur Spondylodese. Das cRGD stellt für die Zukunft einen Wirkstoff dar, der die Osseointegration beschleunigt und der in der Lage ist, die Knochenneubildung zu forcieren. So ist davon auszugehen, dass cRGD in Zukunft stärker experimentell erforscht werden wird, um die Gesamtheit seiner Potenz in Knochenheilung und Implantat-Integration zu erfahren.