

Aus dem Institut für Veterinär-Anatomie  
des Fachbereichs Veterinärmedizin  
der Freien Universität Berlin  
und dem  
Julius Wolff Institut  
Centrum für Muskuloskeletale Chirurgie  
der Charité – Universitätsmedizin Berlin  
Campus Virchow Klinikum

Lokaler Einsatz von modifiziertem Parathormon<sub>1-34</sub>  
in einer Fibrinmatrix zur Verbesserung  
der ventralen Spondylodese der Schafshalswirbelsäule  
- Histologische Evaluation

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

vorgelegt von  
Anne-Marie Pobloth  
Tierärztin aus Berlin

Berlin 2010

Journal-Nr.: 3463

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin  
der Freien Universität Berlin

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Leo Brunnberg  
Erster Gutachter: Univ.-Prof. Dr. Karl Dietrich Weyrauch  
Zweiter Gutachter: Univ.-Prof. Dr. Georg Duda  
Dritter Gutachter: Univ.-Prof. Dr. Anja Sterner-Kock

*Deskriptoren (nach CAB-Thesaurus):*  
spine, parathyrin, fibrin, histology, animal models, sheep

Tag der Promotion: 08.07.2011

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

ISBN: 978-3-86387-019-5  
**Zugl.: Berlin, Freie Univ., Diss., 2010**  
Dissertation, Freie Universität Berlin  
**D 188**

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

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

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

Alle Rechte vorbehalten | all rights reserved  
© Mensch und Buch Verlag 2011 Choriner Str. 85 - 10119 Berlin  
[verlag@menschundbuch.de](mailto:verlag@menschundbuch.de) – [www.menschundbuch.de](http://www.menschundbuch.de)

Für meine Eltern.

In Erinnerung an 48 Schafe.



# Inhaltsverzeichnis

|  |           |
|--|-----------|
| <b>Inhaltsverzeichnis .....</b>                                      | <b>1</b>  |
| <b>Abbildungsverzeichnis .....</b>                                   | <b>5</b>  |
| <b>Tabellenverzeichnis .....</b>                                     | <b>9</b>  |
| <b>Abkürzungsverzeichnis .....</b>                                   | <b>11</b> |
| <b>1 Einleitung.....</b>   | <b>1</b>  |
| <b>2 Stand der Wissenschaft .....</b>                                | <b>3</b>  |
| 2.1 Die Wirbelsäule des Schafes .....                                | 3         |
| 2.1.1 Makroskopischer Aufbau der Wirbelsäule .....                   | 3         |
| 2.1.2 Mikroskopischer Aufbau des Wirbelkörpers .....                 | 4         |
| 2.1.3 Makroskopischer Aufbau der Bandscheibe .....                   | 8         |
| 2.1.4 Mikroskopischer Aufbau der Bandscheibe .....                   | 8         |
| 2.1.5 Bildung von Knochengewebe (Ossifikation) .....                 | 9         |
| 2.2 Anteriore intervertebrale Spondylodese der Halswirbelsäule ..... | 10        |
| 2.2.1 Technik und Indikationen zur Spondylodese .....                | 10        |
| 2.2.2 Autologe Implantate – Beckenkamm und Spongiosa .....           | 11        |
| 2.2.3 Cages .....  | 13        |
| 2.3 Parathormon .....  | 16        |
| 2.4 Fibrin .....   | 25        |
| 2.5 Ziele und Hypothesen der Studie.....                             | 31        |
| <b>3 Material und Methoden .....</b>                                 | <b>32</b> |
| 3.1 Versuchstiere .....  | 32        |
| 3.1.1 Haltung und Fütterung .....                                    | 32        |
| 3.1.2 Gruppeneinteilung .....  | 33        |
| 3.2 Operatives Vorgehen und Materialeinsatz.....                     | 33        |
| 3.2.1 Narkose und Operationsvorbereitung.....                        | 33        |

## Inhaltsverzeichnis

---

|         |   |    |
|---------|---|----|
| 3.2.2   | Diskektomie .....   | 37 |
| 3.2.3   | Materialvorbereitung .....  | 40 |
| 3.2.4   | Cageaugmentierung .....   | 41 |
| 3.2.5   | Implantat und Einsetzen des Implantates .....                           | 41 |
| 3.2.6   | Augmentierung des restlichen Bandscheibenfaches .....                   | 43 |
| 3.2.7   | Operativer Wundverschluss .....   | 44 |
| 3.2.8   | Spongiosaentnahme .....   | 44 |
| 3.2.9   | Narkoseausleitung .....   | 47 |
| 3.2.10  | Postoperative Nachsorge .....   | 47 |
| 3.2.11  | Euthanasie und Probengewinnung .....                                    | 48 |
| 3.3     | Aufarbeitung der Wirbelsäulen für die histologische Auswertung .....    | 49 |
| 3.3.1   | Fixierung und Sägen der Präparate .....                                 | 49 |
| 3.3.2   | Aufarbeitung der Präparate für die Kunststoffhistologie .....           | 51 |
| 3.3.2.1 | Anfertigung der Kunststoffschnitte .....                                | 52 |
| 3.3.2.2 | Histologische Färbung der Gewebeschnitte der Kunststoffhistologie ..... | 53 |
| 3.3.3   | Aufarbeitung der Präparate für die Paraffinhistologie .....             | 54 |
| 3.3.3.1 | Anfertigung der Paraffinschnitte .....                                  | 55 |
| 3.3.3.2 | Immunhistochemische Färbungen .....                                     | 55 |
| 3.3.3.3 | Histochemische Färbungen .....  | 56 |
| 3.4     | Auswertung der Gewebeschnitte .....                                     | 57 |
| 3.4.1   | Definition der Region of Interest (ROI) .....                           | 57 |
| 3.4.2   | Deskriptive Analyse der histologischen Präparate .....                  | 58 |
| 3.4.3   | Histomorphometrische Auswertung der Präparate .....                     | 59 |
| 3.4.4   | Fusionscore .....   | 59 |
| 3.4.5   | Gefäßzählung .....  | 60 |
| 3.4.6   | Osteoklastenzählung .....   | 61 |
| 3.4.7   | Statistik .....   | 62 |

|          |   |            |
|----------|---|------------|
| <b>4</b> | <b>Ergebnisse</b> .....                                   | <b>64</b>  |
| 4.1      | Operationsbefunde .....                                   | 64         |
| 4.2      | Histologische Ergebnisse .....                            | 65         |
| 4.2.1    | Deskriptive Histologie .....                              | 65         |
| 4.2.2    | Ergebnisse der histomorphometrischen Analyse .....        | 82         |
| 4.2.3    | Fusionsscore .....  | 101        |
| 4.2.4    | Vaskularisierung .....                                    | 103        |
| 4.2.5    | Osteoklastendichte .....                                  | 110        |
| 4.3      | Zusammenfassung der Ergebnisse .....                      | 118        |
| <b>5</b> | <b>Diskussion</b> .....                                   | <b>121</b> |
| 5.1      | Tiermodell.....   | 123        |
| 5.2      | Diskussion von Material und Methoden .....                | 125        |
| 5.2.1    | Operationsmethode und Auswertungszeitpunkt.....           | 125        |
| 5.2.2    | Applikation des Fibrinmaterials.....                      | 126        |
| 5.2.3    | Gewinnung und Verabreichung der autologen Spongiosa ..... | 127        |
| 5.2.4    | Entnahme und Aufarbeitung der Proben .....                | 127        |
| 5.2.5    | Deskriptive Histologie .....                              | 128        |
| 5.2.6    | Histomorphometrie .....                                   | 129        |
| 5.2.7    | Fusionsscore .....  | 130        |
| 5.2.8    | Gefäßzählung .....  | 130        |
| 5.2.9    | Osteoklastenzählung .....                                 | 131        |
| 5.3      | Diskussion der Ergebnisse .....                           | 131        |
| 5.3.1    | Histomorphologie und Histomorphometrie .....              | 131        |
| 5.3.2    | Fusionsscore .....  | 148        |
| 5.3.3    | Gefäßzählung .....  | 149        |
| 5.3.4    | Osteoklastenzählung .....                                 | 151        |
| 5.3.5    | Vergleich mit weiteren Studien .....                      | 152        |
| 5.3.6    | Schlussfolgerung .....                                    | 155        |
| <b>6</b> | <b>Zusammenfassung</b> .....                              | <b>157</b> |

## Inhaltsverzeichnis

---

|           |                                       |            |
|-----------|---------------------------------------|------------|
| <b>7</b>  | <b>Summary.....</b>                   | <b>159</b> |
| <b>8</b>  | <b>Literatur .....</b>                | <b>161</b> |
| <b>9</b>  | <b>Anhang.....</b>                    | <b>194</b> |
|           | 9.1 Färbeprotokolle .....             | 194        |
| <b>10</b> | <b>Danksagung .....</b>               | <b>199</b> |
| <b>11</b> | <b>Selbständigkeitserklärung.....</b> | <b>201</b> |

# Abbildungsverzeichnis

|  |    |
|--|----|
| Abbildung 1: Aufbau des rhPTH(1-34) .....  | 17 |
| Abbildung 2: Narkose- und Überwachungseinheit .....  | 35 |
| Abbildung 3: Zur Operation vorbereitetes Schaf .....   | 36 |
| Abbildung 4: Operationsfeld nach steriler Abdeckung und Desinfektion .....                       | 36 |
| Abbildung 5: Operationssitus nach dem Hautschnitt .....  | 37 |
| Abbildung 6: Markierung des Bandscheibenfaches mittels Kirschner-Bohrdraht .....                 | 38 |
| Abbildung 7: Bildwandlernaufnahme zur Identifizierung des Bandscheibenfaches zwischen C3/C4..... | 38 |
| Abbildung 8: Durchtrennen des M.longus colli .....   | 39 |
| Abbildung 9: Eröffnetes Bandscheibenfach .....   | 39 |
| Abbildung 10: Material-Kit .....   | 40 |
| Abbildung 11: Mischung des Materials.....  | 40 |
| Abbildung 12: Cage mit Fibrinmatrix gefüllt.....   | 41 |
| Abbildung 13: Einsetzen des Cages .....  | 42 |
| Abbildung 14: In korrekter Lage eingebrachter Cage .....   | 42 |
| Abbildung 15: Bildwandernaufnahme nach Cageeinsatz.....  | 43 |
| Abbildung 16: Mit Fibrinpaste gefülltes Bandscheibenfach.....                                    | 44 |
| Abbildung 17: Freipräparierter Beckenkamm.....   | 45 |
| Abbildung 18 + 19: Eröffnung des Beckenkamms .....   | 45 |
| Abbildung 20 + 21: Entnahme der Spongiosa und Cageaugmentierung.....                             | 46 |
| Abbildung 22 + 23: Verschluss des Beckenkamms .....  | 46 |
| Abbildung 24: Wundverschluss .....   | 47 |
| Abbildung 25: Wirbelsegment C3/C4 nach Präparation.....  | 48 |
| Abbildung 26: Sägeschema mit Schnittbezeichnung .....  | 49 |
| Abbildung 27: Wirbelsäulensegment nach dem Sägen .....   | 50 |
| Abbildung 28: Einzelner Sägeschnitte.....  | 50 |
| Abbildung 29: Messbereich für die Histomorphometrie – Gesamt- ROI mit den fünf Teil-ROIs.....    | 58 |

## Abbildungsverzeichnis

---

|   |    |
|---|----|
| Abbildung 30: Beurteilung der Fusion im gelb umrandeten Bereich.....  | 60 |
| Abbildung 31: alpha-smooth muscle actin-Färbung.....  | 61 |
| Abbildung 32: TRAP-Färbung .....  | 62 |
| Abbildung 33: Wirbelsäulensegment C3/C4;.....   | 65 |
| Abbildung 34: Epithelähnliche Anordnung der Osteoblasten auf der Knochenmatrix Cage ROI<br>(kombinierte Färbung nach Von-Kossa/Safranin-Orange) (Gruppe 3, Schaf 30).....               | 73 |
| Abbildung 35: Osteoklasten auf der Knochenoberfläche Cage ROI (Masson- Goldner- Färbung)<br>(Gruppe 6, Schaf 33).....   | 74 |
| Abbildung 36: Schicht hyaliner Knorpel auf dem Knochen des dritten Halswirbels der dorsalen ROI;<br>(Movat-Pentachromfärbung) (Gruppe1, Schaf 54).....                                  | 74 |
| Abbildung 37: ventrale ROI, Knochenzubildung vom dritten Halswirbel (Movat- Pentachrom- Färbung)<br>(Gruppe 3, Schaf 103).....  | 75 |
| Abbildung 38: Kallus in der ventralen ROI (Movat-Pentachromfärbung) (Gruppe 1, Schaf 49) .....  | 75 |
| Abbildung 39: Darstellung der zunehmenden Mineralisation des hyalinen Korpels zum Knochen hin,<br>Kallus in ventraler ROI (Safranin Orange/von Kossa-Färbung) (Gruppe 6, Schaf 33)..... | 76 |
| Abbildung 40: Starke Zunahme der Gefäßanzahl zum Titancage hin (Masson-Goldner-Färbung)<br>(Gruppe 6, Schaf 41).....  | 76 |
| Abbildung 41: Osteoklasten bauen cagenahes Knochenstück ab (Masson-Goldner-Färbung)<br>(Gruppe 2, Schaf 102).....   | 77 |
| Abbildung 42: Cage ROI mit lockerem und straffem Bindegewebe (Movat-Pentachrom-Färbung)<br>(Gruppe 6, Schaf 28).....  | 77 |
| Abbildung 43: Cage ROI; Abbau von lytischem Knochen durch Osteoklasten (Masson-Goldner-<br>Färbung) (Gruppe 6, Schaf 118).....  | 78 |
| Abbildung 44: lokale milde Entzündungsreaktion ventrale ROI (Masson-Goldner-Färbung)<br>(Gruppe 5, Schaf 131).....  | 79 |
| Abbildung 45: starke Entzündungsreaktion; in direktem Kontakt zum entnommenen Titanimplantat<br>(Masson- Goldner- Färbung) ( Gruppe 1, Schaf 50).....                                   | 79 |
| Abbildung 46: Riesenzellen im Bindegewebe der ventralen ROI (Masson-Goldner-Färbung).....   | 79 |
| (Gruppe 2, Schaf 63).....   | 79 |
| Abbildung 47: Reste der Wachstumsfuge des dritten Schafshalswirbels (Movat- Pentachrom-<br>Färbung) (Gruppe 4, Schaf 27) .....  | 80 |
| Abbildung 48: Rest der Wachstumsfuge des dritten Schafshalswirbels (Movat- Pentachrom- Färbung)<br>(Gruppe 4, Schaf 27).....  | 80 |

## Abbildungsverzeichnis

---

|  |     |
|--|-----|
| Abbildung 49: ventrale ROI Knochenzubildungen vom dritten und vierten Halswirbel (Masson- Goldner- Färbung) (Gruppe 6, Schaf 38) .....   | 81  |
| Abbildung 50: Cage ROI mit knöcherner Überbrückung (Movat-Pentachrom-Färbung) (Gruppe 3, Schaf 103) .....  | 81  |
| Abbildung 51: Anteil der Knochenfläche an der Gesamt-ROI .....   | 83  |
| Abbildung 52: Anteil der Knorpel- und Bindegewebefläche an der Gesamt-ROI .....  | 85  |
| Abbildung 53: Anteil der Knochenfläche an der ventralen ROI .....  | 86  |
| Abbildung 54: Anteil der Knorpel- und Bindegewebefläche an der ventralen ROI .....   | 88  |
| Abbildung 55: Knochenfläche in der Cage ROI .....  | 89  |
| Abbildung 56: Knorpel- und Bindegewebefläche in der Cage ROI .....   | 91  |
| Abbildung 57: Anteil der Knochenfläche an der dorsalen ROI .....   | 92  |
| Abbildung 58: Anteil der Knorpel- und Bindegewebefläche an der dorsalen ROI .....  | 94  |
| Abbildung 59: Anteil der Knochenfläche an der kranialen ROI .....  | 95  |
| Abbildung 60: Anteil der Knorpel- und Bindegewebefläche an der kranialen ROI .....   | 97  |
| Abbildung 61: Anteil der Knochenfläche an der kaudalen ROI .....   | 98  |
| Abbildung 62: Anteil der Knorpel- und Bindegewebefläche an der kaudalen ROI .....  | 100 |
| Abbildung 63: Beispiel für ein mit F1 bewertetes Wirbelsäulensegment (kombinierte Safranin Orange/von Kossa-Färbung; Gruppe 1/Spongiosagruppe; Schaf 57) .....                   | 102 |
| Abbildung 64: Beispiel für ein mit F2 bewertetes Wirbelsäulensegment (kombinierte Safranin Orange/von Kossa-Färbung; Gruppe 6 (1,0 mg PTH <sub>1-34</sub> / ml); Schaf 31) ..... | 102 |
| Abbildung 65: Beispiel für ein mit F3 bewertetes Wirbelsäulensegment (kombinierte Safranin Orange/von Kossa-Färbung; Gruppe 1 /Spongiosagruppe; Schaf 50) .....                  | 102 |
| Abbildung 66: Darstellung der Gefäßdichte in der Gesamt-ROI .....  | 104 |
| Abbildung 67: Darstellung der Gefäßdichte in der ventralen ROI .....   | 105 |
| Abbildung 68: Darstellung der Gefäßdichte in der Cage ROI .....  | 106 |
| Abbildung 69: Darstellung der Gefäßdichte in der dorsalen ROI .....  | 107 |
| Abbildung 70: Darstellung der Gefäßdichte in der kranialen ROI .....   | 108 |
| Abbildung 71: Darstellung der Gefäßdichte in der kaudalen ROI .....  | 109 |
| Abbildung 72: Darstellung der Osteoklastendichte in der Gesamt-ROI .....   | 111 |
| Abbildung 73: Darstellung der Osteoklastendichte in der ventralen ROI .....  | 112 |
| Abbildung 74: Darstellung der Osteoklastendichte in der Cage ROI .....   | 113 |

## Abbildungsverzeichnis

---

|  |     |
|--|-----|
| Abbildung 75: Darstellung der Osteoklastendichte in der dorsalen ROI.....  | 114 |
| Abbildung 76: Darstellung der Osteoklastendichte in der kranialen ROI..... | 116 |
| Abbildung 77: Darstellung der Osteoklastendichte in der kaudalen ROI.....  | 117 |

# Tabellenverzeichnis

|  |     |
|--|-----|
| Tabelle 1: Gruppenplan .....   | 33  |
| Tabelle 2: Entwässerungsschema Kuststoffhistologie .....                                 | 51  |
| Tabelle 3: Entwässerungsschema des Automaten .....                                       | 55  |
| Tabelle 4: Kallusscore .....   | 66  |
| Tabelle 5: Darstellung der Knochengewebeverteilung in der Gesamt-ROI .....               | 84  |
| Tabelle 6: Darstellung der Knorpel- und Bindegewebeverteilung in der Gesamt-ROI.....     | 85  |
| Tabelle 7: Darstellung der Knochenfläche in der ventralen ROI .....                      | 87  |
| Tabelle 8: Darstellung der Knorpel- und Bindegewebeverteilung in der ventralen ROI ..... | 88  |
| Tabelle 9: Darstellung der Knochenfläche in der Cage ROI .....                           | 90  |
| Tabelle 10: Darstellung der Knorpel- und Bindegewebefläche in der Cage ROI.....          | 91  |
| Tabelle 11: Darstellung der Knochenfläche in der dorsalen ROI .....                      | 93  |
| Tabelle 12: Darstellung der Knorpel- und Bindegewebefläche in der dorsalen ROI .....     | 94  |
| Tabelle 13: Darstellung der Knochenfläche in der kranialen ROI .....                     | 96  |
| Tabelle 14: Darstellung der Knorpel- und Bindegewebefläche in der kranialen ROI.....     | 97  |
| Tabelle 15: Darstellung der Knochenfläche in der kaudale ROI .....                       | 99  |
| Tabelle 16: Darstellung der Knorpel- und Bindegewebefläche in der kaudalen ROI.....      | 100 |
| Tabelle 17: Darstellung des Fusionsscores .....  | 101 |
| Tabelle 18: Darstellung der Gefäßdichte in der Gesamt-ROI .....                          | 104 |
| Tabelle 19: Darstellung der Gefäßdichte in der ventralen ROI .....                       | 105 |
| Tabelle 20: Darstellung der Gefäßdichte in der Cage ROI .....                            | 106 |
| Tabelle 21: Darstellung der Gefäßdichte in der dorsalen ROI .....                        | 107 |
| Tabelle 22: Darstellung der Gefäßdichte in der kranialen und kaudalen ROI .....          | 109 |
| Tabelle 23: Darstellung der Osteoklastendichte in der Gesamt-ROI .....                   | 111 |
| Tabelle 24: Darstellung der Osteoklastendichte in der ventralen ROI .....                | 112 |
| Tabelle 25: Darstellung der Osteoklastendichte in der Cage ROI .....                     | 113 |
| Tabelle 26: Darstellung der Osteoklastendichte in der dorsalen ROI .....                 | 114 |
| Tabelle 27: Darstellung der Osteoklastendichte der kranialen ROI .....                   | 116 |

## Tabellenverzeichnis

---

|   |     |
|---|-----|
| Tabelle 28: Darstellung der Osteoklastendichte der kaudalen ROI .....         | 117 |
| Tabelle 29: Färbeprotokoll Movat-Pentachrom-Färbung .....                     | 194 |
| Tabelle 30: Färbeprotokoll kombinierte Safranin Orange/von Kossa-Färbung..... | 195 |
| Tabelle 31: Färbeprotokoll Toluidinblau-Färbung .....                         | 195 |
| Tabelle 32: Trichromfärbung nach Masson-Goldner.....                          | 196 |
| Tabelle 33: Färbeprotokoll $\alpha$ - SMA- Färbung.....                       | 196 |
| Tabelle 34: Färbeprotokoll TRAP-Färbung .....                                 | 198 |

## Abkürzungsverzeichnis

|                 |   |
|-----------------|---|
| A.              | Arterie                                     |
| Abb.            | Abbildung                                   |
| Ag              | Antigen                                     |
| $\alpha$ -SMA   | alpha-smooth muscle actin                   |
| AK              | Antikörper                                  |
| Aqua dest.      | Aqua destillata                             |
| BMP-2           | bone morphogenetic protein- 2               |
| bzw.            | beziehungsweise                             |
| c               | Leerfläche Cage                             |
| C               | Celsius                                     |
| C3/C4           | cervicaler Wirbel drei/ cervicaler Wirbel 4 |
| ca.             | circa                                       |
| cm              | Zentimeter                                  |
| cm <sup>2</sup> | Quadratcentimeter                           |
| d               | dorsal                                      |
| d.h.            | das heißt                                   |
| DNA             | desoxyribonucleinacid                       |
| Fa.             | Firma                                       |
| eBSR            | ehemaliger Bandscheibenraum                 |
| et al.          | et alii                                     |
| evtl.           | eventuell                                   |
| g               | Gramm                                       |
| ggf.            | gegebenenfalls                              |
| GmbH            | Gesellschaft mit beschränkter Haftung       |
| h               | Stunde                                      |
| IL-1            | Interleukin-1                               |
| i.v.            | intra venös                                 |
| L               | Liter                                       |
| l               | Liter                                       |
| L4/L5           | lumbaler Wirbel vier/lumbaler Wirbel fünf   |
| M               | Mol   |
| Mg              | Milligramm                                  |
| ml              | Milliliter                                  |

## Abkürzungsverzeichnis

---

|                     |  |
|---------------------|--|
| min                 | Minute   |
| min.                | mineralisiert                                      |
| mm                  | Millimeter   |
| n                   | Anzahl   |
| N                   | Nervus   |
| Na                  | Natrium  |
| NaCl                | Natriumchlorid                                     |
| OC                  | Osteoklasten                                       |
| OP                  | Operation  |
| PEEK                | Polyetheretherketon                                |
| pH                  | potentia Hydrogenii                                |
| Proc.               | Processus  |
| PTH                 | Parathormon  |
| PTH <sub>1-34</sub> | Parathormon <sub>1-34</sub>                        |
| rhBMP-2             | rekombinantes humanes bone morphogenetic protein-2 |
| rhPTH1-34           | rekombinantes humanes Parathormon <sub>1-34</sub>  |
| ROI                 | Region of Interest                                 |
| s.c.                | subcutan   |
| Std.                | Stunde   |
| Tab.                | Tabelle  |
| TGpPTH              | Transglutaminase-Plasmidsequenz-Parathormon        |
| TNF- $\alpha$       | Tumor Nekrose Faktor- $\alpha$                     |
| TRAP                | Tartrate Resistente Acid Phosphopase               |
| u.                  | und  |
| u.a.                | unter anderem                                      |
| v                   | ventral  |
| v.a.                | vor allem  |
| z.B.                | Zum Beispiel                                       |
| z.T.                | Zum Teil   |
| °                   | Grad   |
| %                   | Prozent  |

# 1 Einleitung

Akute und chronische Wirbelsäulenerkrankungen gehören zu den häufigsten Erkrankungen in den westlichen Industrienationen. Neben der körperlichen Belastung des Patienten stellen sie durch die anfallenden Behandlungskosten und Krankheitstage eine erhebliche Belastung für das Gesundheitssystem und die Volkswirtschaft dar. Die operative Versteifung eines Wirbelsäulensegmentes (Spondylodese) nach degenerativ, entzündlich oder traumatisch bedingten Bandscheibenerkrankungen sowie Instabilitäten der Halswirbelsäule anderer Genese ist eine der häufigsten Operationen an der Halswirbelsäule. Jahrzehnte lang stellte hierfür der autologe trikortikale Beckenkammspan das Implantat der Wahl dar (Sawin, 1998; Smith, 1958), birgt aber neben der hohen Entnahmemorbidität (Ahlmann, 2002; Arrington, 1996; Banwart, 1995; Silber, 2003; Younger, 1989) zahlreiche Nachteile wie Pseudarthrosenbildung, Sinterung und Wandern des Spans mit einer daraus resultierenden segmentalen Instabilität und kyphotischer Fehlstellung der Wirbelsäule, die zu rezidivierenden neurologischen Symptomen führen kann (Aronson, 1968; Gore, 1984; Jagannathan, 2008; Schnee, 1997; White, 1973). Nachdem durch die Entwicklung und Anwendung des intervertebralen Cages ein Implantat gefunden wurde, das dem Wirbelsäulensegment initial eine hohe biomechanische Stabilität verleiht (Profeta, 2000, Vavruch, 2002), beschäftigt sich die Forschung auf diesem Gebiet vor allem mit der Verbesserung des Heilungsergebnisses im Sinne einer schnelleren und vollständigen knöchernen Fusion der angrenzenden Wirbelkörperknochen durch osteoinduktive und osteokonduktive Materialien. Da autologer Knochen als Füllmaterial einen zusätzlichen operativen Eingriff erfordert, wird weiterhin nach einem Biomaterial gesucht, das neben der Gewebeverträglichkeit osteoinduktive und osteokonduktive Eigenschaften besitzt, in unbegrenzter Menge und gleichbleibender Qualität zur Verfügung steht und keinen zusätzlichen operativen Eingriff notwendig macht. In dieser Studie wurde daher modifiziertes Parathormon<sub>1-34</sub> (TGpIPTh<sub>1-34</sub>) zur Verbesserung des Heilungsergebnisses der Spondylodese der Schafshalswirbelsäule getestet. Das eingesetzte modifizierte Parathormon ist mit einer Kette aus 12 Aminosäuren am N-terminalen Ende des Peptidhormones durch eine spezielle Vernetzungstechnik kovalent in eine Fibrinmatrix gebunden (Schense, 2000; Schense, 1999).

TGpIPTh<sub>1-34</sub> konnte in mehreren tierexperimentellen Studien zur Knochenheilung und –regeneration seine osteoinduktiven Eigenschaften unter Beweis stellen. Es wird speziell nur auf „Nachfrage“ durch körpereigenes Plasmin freigesetzt (Arrighi, 2009; Fuerst, 2007;

Mark, 2007). Das Schaf ist als Modelltier für die menschliche Halswirbelsäule international anerkannt, da es neben dem Vorteil eines entsprechenden Größenverhältnisses in mehreren vergleichenden Studien insbesondere im Halswirbelsäulensegmente C3 / C4 starke Ähnlichkeiten in Anatomie und Biomechanik zur humanen Halswirbelsäule aufweist (Kandziora, 2001; Wilke, 1997; Wilke, 1997a).

Gegenstand dieser Arbeit war die Untersuchung der Auswirkung von lokal appliziertem modifiziertem Parathormon<sub>1-34</sub> (GTPPTH<sub>1-34</sub>), eingebunden in eine Fibrinmatrix, auf das Heilungsergebnis der ventralen, intervertebralen Spondylodese der Schafshalswirbelsäule mittels Titancage. Zur Analyse wurden 12 Wochen nach der Spondylodeseoperation histologische, immunhistologische und histomorphometrische Auswertungsmethoden herangezogen und mit den Ergebnissen des sogenannten „Goldstandards“, der autologen Spongiosa aus dem Beckenkamm, verglichen.

## 2 Stand der Wissenschaft

### 2.1 Die Wirbelsäule des Schafes

#### 2.1.1 Makroskopischer Aufbau der Wirbelsäule

Die Wirbelsäule gehört zum knöchernen Skelett und hat vor allem stützende und formgebende Funktion. Die Bandscheiben und die an den zahlreichen Knochenpunkte der Wirbelsäule ansetzenden Sehnen und Muskeln ermöglichen die Beweglichkeit der Wirbelsäule. Durch die Beherbergung des Rückenmarks besitzt die Wirbelsäule auch schützende Funktion (Nickel, 1992). Die Funktionseinheit der Wirbelsäule stellt das Wirbelsäulensegment dar, bestehend aus zwei angrenzenden Wirbeln, der dazwischenliegenden Bandscheibe und den dazugehörigen Band- und Gelenkstrukturen. Der einzelne Wirbel ist in seinem prinzipiellen Aufbau gleich, zeigt aber je nach Wirbelsäulenabschnitt Besonderheiten. Man unterscheidet zwischen Halswirbeln, Brustwirbeln, Lendenwirbeln, Kreuzwirbeln und Schwanzwirbeln. Je nach Spezies, Rasse und Individuum existiert eine unterschiedliche Anzahl an Wirbeln in den jeweiligen Wirbelsäulenabschnitten. Das Schaf besitzt 7 Halswirbel, 13 Brustwirbel, 6 Lendenwirbel, 4 Kreuzwirbel und zwischen 3 und 24 Schwanzwirbel. Jeder Wirbel besteht aus den Grundbausteinen Wirbelkörper, Wirbelbogen, Wirbelloch und Wirbelfortsätze. Der mehr oder weniger zylindrisch geformte Wirbelkörper besitzt ein konvexes kraniales Ende (Extremitas cranialis, Bodenplatte) und ein konkaves kaudales Ende (Extremitas kaudalis, Deckplatte). Ventral besitzt der Wirbelkörper eine Knochenleiste (Crista ventralis). Dorsal des Wirbelkörpers befindet sich der Wirbelbogen (Arcus vertebrae). Dieser besteht aus zwei vertikal gerichteten Füßchen (Pediculi arcus vertebrae), die nach medial in die beiden Platten (Laminae arcus vertebrae) übergehen und verschmelzen. In seiner Mitte befindet sich das Wirbelloch (Foramen vertebrale), durch welches das Rückenmark verläuft. Alle Wirbellöcher bilden somit den Wirbelkanal. Die Wirbelfortsätze dienen als Ursprung und Ansatz von Muskeln und Bändern. Der Dornfortsatz (Processus spinosus) befindet sich dorsal auf dem Wirbelbogen. Je nach Wirbelsäulenabschnitt ist seine Gestalt unterschiedlich. Die Querfortsätze (Processi transversi) befinden sich lateral an den Füßchen der Wirbelbögen. Die Gelenkfortsätze (Processus articulares kraniales und kaudales), die sich beiderseits des Dornfortsatzes am Wirbelbogen befinden, verbinden die Wirbelbögen der angrenzenden Wirbel miteinander. An Brust- und Lendenwirbelsäule kann man zusätzlich noch

Zitzenfortsätze (Processi mamillares), die sich zwischen Quer- und kranialem Gelenkfortsatz am Wirbelbogen befinden, ausmachen. Die ersten beiden Halswirbel weichen durch ihre Funktion als Kopfgelenke erheblich von der Gestalt des dritten bis siebten Halswirbels ab. Der erste Halswirbel besteht aus den beiden Querfortsätzen Proc. transversi oder auch Flügel Ala atlantis genannt. Diese sind nur durch einen dorsalen und ventralen Wirbelbogen verbunden, ein Wirbelkörper fehlt. Das kraniale Ende des Atlas bildet mit den Kondylen des Hinterhauptsbeines das erste Kopfgelenk, Articulatio atlantooccipitalis, und ist für die Nickbewegung des Kopfes verantwortlich. Der zweite Halswirbel ist der Längste der sieben Halswirbel und besitzt einen kammförmigen Processus spinosus. Der kranial am Wirbelkörper sitzende Zahn, Dens axis, der in das Foramen vertebrale des Atlas hineinragt, bildet die Achse des Articulatio atlantoaxialis. Dieses Gelenk lässt vor allem Rotationsbewegungen zu (Salomon, 2005). Die Wirbelkörper verkürzen sich allmählich vom dritten zum siebten Halswirbel und tragen deutliche Ventrallisten. Die Processi spinosi nehmen zum siebten Halswirbel an Länge zu. Der Canalis vertebralis verjüngt sich zur Mitte der Halswirbelsäule und wird dann wieder weiter. Der siebte Halswirbel vereint als Übergang zur Brustwirbelsäule Merkmale der Hals- und Brustwirbel (Nickel, 1992).

### 2.1.2 Mikroskopischer Aufbau des Wirbelkörpers

Der Wirbelkörper als Teil des Skelettsystems besteht aus Knochengewebe. Es handelt sich hierbei um eine spezialisierte Form des Bindegewebes, das durch seine spezielle Bauweise eine stützende und metabolische Funktion übernimmt (Clarke, 2008; Welsch, 2006). Die Zusammensetzung des Knochens unterliegt vielfältigen hormonalen, metabolischen und nutritiven Einflüssen. Knochen besteht grundsätzlich aus den Zellen des Knochens und der sogenannten Knochenmatrix. Zu den Zellen des Knochens gehören die Osteoprogenitorzellen, Osteoblasten, Osteozyten, Knochenoberflächenzellen und Osteoklasten. **Osteoprogenitorzellen** differenzieren sich aus mesenchymalen Stammzellen. Sie sind durch ein helles, abgeplattetes Zytoplasma mit ovalem bis länglichem Kern gekennzeichnet. Sie liegen meist im Endost oder Periost des Knochens und sind äußerst teilungsaktiv (Liebich, 2004). Aus Ihnen entwickeln sich die **Osteoblasten**. Aktive Osteoblasten sind annähernd kubische Zellen, basophil mit einem runden Kern und zahlreichen sekretionsaktiven Organellen wie dem rauen Endoplasmatischen Retikulum, dem Golgi-Apparat und den Lysosomen. Sie sind die knochenbildenden Zellen. Da neue Knochenmatrix im reifen Knochen stets auf schon vorhandener mineralisierter Matrix abgelagert wird, liegen Osteoblasten immer einer freien knöchernen Oberfläche an (Lüllemann-Rauch, 2003). Sie weisen an ihrer Oberfläche zahlreiche Fortsätze auf, über die sie mit Nachbarzellen in Kontakt treten. Zu Ihren Funktionen gehört die Bildung von

Kollagenfasern Typ I und nichtkollagenen Proteinen, wie zum Beispiel Osteonektin, Osteokalzin und Osteopontin, die Produktion von Glykosamino- und Proteoglykanen, die Beteiligung an der Mineralisation des Knochengewebes und die Modulation der Osteoklastenfunktion (Anderson, 2003; Liebich, 2004). Die initial von den Osteoblasten abgeschiedene Matrix ist noch nicht verkalkt und wird Osteoid genannt.

Pro Tag wird von den Osteoblasten ein etwa 1 µm breiter, unverkalkter Osteoidsaum gebildet, dessen Gesamtbreite durchschnittlich ca. 6 µm beträgt. Innerhalb von drei bis vier Tagen verkalken dann 70 % dieses Osteoids und nach 6 Wochen ist die Mineralisation vollständig abgeschlossen (Liebich, 2004). Neben dieser knochenbildenden Eigenschaft spielen die Osteoblasten auch eine Rolle beim Knochenabbau. Sie bauen den schmalen Osteoidsaum wieder ab, der stets an der Knochenoberfläche erhalten bleibt, um den Osteoklasten den Weg zur verkalkten Matrix frei zu geben. Als einzige Knochenzellen besitzen sie Rezeptoren für Parathormon, das die Knochenresorption einleitet. Nach dessen Bindung bilden die Osteoblasten osteoidabbauende Enzyme und osteoklastenstimulierende Zytokine. Osteoblasten können sich entweder zu Osteozyten weiterentwickeln oder gehen durch Apoptose zugrunde (Welsch, 2006).

Die Osteoblasten an der Knochenoberfläche werden häufig als ruhende Osteoblasten oder „**bone lining cells**“ bezeichnet. Sie sind durch Nexus untereinander, aber auch mit den Osteozyten verbunden. Sie haben Barriere-Funktion nach außen, sind an der Regulation des Mineralisationsprozesses und des Knochenstoffwechsels beteiligt und besitzen außerdem die Fähigkeit zur Proliferation (Dobnig, 1995; Liebich, 2004).

Die Entwicklung vom Osteoblasten zum **Osteozyten**, der reifen Knochenzelle, dauert etwa drei Tage. Osteozyten sind in Lakunen der vollständig verkalkten Knochengrundsubstanz (Ossein) eingelagert. An Ihrer Oberfläche befindet sich nur noch ein schmaler Saum unverkalkter Matrix. Sie besitzen zahlreiche Fortsätze, mit denen sie Kontakt zu anderen Osteozyten und Osteoblasten aufnehmen. Über diese Verbindungen läuft der Austausch von Elektrolyten und kleineren Molekülen von den Osteoblasten der Oberfläche bis in die Peripherie der Osteone (Burger, 2003; Jorgensen, 2003). Die Menge der Zellorganellen in den Osteozyten und die metabolische Aktivität nimmt mit zunehmender Entfernung von den Osteoblasten der Oberfläche ab. Sie sind wesentliche Bestandteile des Knochens und tragen entscheidend zu dessen Erhalt bei, denn degenerieren die Osteozyten geht auch die Matrix zugrunde (Liebich, 2004).

**Osteoklasten** sind die einzigen knochenabbauenden Zellen und für die Resorption der verkalkten Matrix verantwortlich (Clarke, 2008). Es handelt sich dabei um bis zu 150 µm große, vielkernige Riesenzellen. Sie gehen aus denselben Vorläuferzellen hervor wie die Blutmonozyten (Boyle, 2003; Lüllemann-Rauch, 2003; Udagawa, 1990) und entstehen durch Fusion von bis zu 100 einkernigen Vorläufern. Aktive Osteoklasten liegen typischerweise

unmittelbar am Knochen in den sogenannten Howship-Lakunen. Diese flachen Knochenhöhlungen sind durch die beginnende Knochenresorption entstanden. An den Stellen, an denen die Zellmembran der Knochenmatrix direkt anliegt, bildet sie zahlreiche fingerförmige Ausstülpungen zur Oberflächenvergrößerung aus, auch „ruffled border“ genannt. Sie führen aktive Bewegungen aus, sind reich an Protonenpumpen und lysosomalen Enzymen und außerdem verantwortlich für deren rezeptorvermittelte Sekretion und Wiederaufnahme (Liebich, 2004; Vaananen, 2000). Inaktiven Osteoklasten fehlt der Faltenaum. Der knochenmatrixferne Teil der Osteoklastenoberfläche wird „clear zone“ genannt und dient der Adhäsion an die extrazelluläre Matrix. Knochenmatrixfern befinden sich auch die zahlreichen Zellkerne der Zelle. Der Zelleib ist wiederum reich an Mitochondrien, Lysosomen und Vakuolen.

Die Knochenresorption erfolgt in zwei Phasen. In der ersten Phase werden durch eine adenosintriphosphataseabhängige Protonenpumpe in der „ruffled border“ Protonen in den Raum zwischen Osteoklast und Knochen entlassen, so dass dieser einen pH-Wert von 4,5 erreicht (Blair, 1989; Mattsson, 1994; Schlesinger, 1997). In diesem pH-Bereich können die von den Osteoklasten ebenfalls entlassenen hydrolytischen Enzyme und Prokollagenasen optimal arbeiten. Die interfibrilläre Grundsubstanz wird abgebaut, die Abbauprodukte durch die „ruffled border“ phagozytiert und das anorganischen Material in den zytoplasmatischen Vakuolen oder den sekundären Lysosomen des Zytoplasmas aufgelöst (Liebich, 2004), was der zweiten, intrazellulären Phase entspricht. Die so freigelegten Kollagenfibrillen des Knochens werden anschließend von mononukleären Zellen phagozytiert. Osteoklasten bauen pro Zeiteinheit bis zu dreimal mehr Knochenmatrix ab als von den Osteoblasten gebildet wird (Remedios, 1999).

Der andere Bestandteil des Knochens, die sogenannte **Knochenmatrix**, besteht aus einem organischen und anorganischen Anteil (Liebich, 2004). Die organische Matrix besteht fast ausschließlich aus Kollagenfasern Typ I (90 %). Der Rest wird von Glykosaminoglykanen, Proteoglykanen (1-2 %) und Lipiden (5-10 %) gebildet. Der anorganische Anteil besteht überwiegend aus Kalziumphosphat (85-90 %) neben geringen Mengen an Kalziumkarbonat (8-10 %), Magnesiumphosphat (1,5 %) und Kalziumfluorid (0,3 %). Die Mineralien liegen als Hydroxylapatit, in Gestalt von kleinen, länglichen, hexagonalen Kristallen vor. Sie lagern sich auf Grund ihrer Affinität zu den Kollagenmolekülen an deren Oberfläche und im Inneren der Fibrillen longitudinal an (Lüllemann-Rauch, 2003). Die Kollagenfibrillen dienen somit als Leitstruktur für die Kristalle. Die Mineralkristalle machen den Knochen druckfest, und die Zugfestigkeit wird durch die Kollagenfibrillen erlangt.

Je nach Strukturierung der Extrazellulärmatrix unterscheidet man zwischen Faser- und Lamellenknochen. Faserknochen kann als verknöchertes Bindegewebe angesehen werden, das auf mechanische Krafteinwirkung in Form von Druck und Zug verknöchert.

Faserknochen tritt damit im Verlauf jeder Knochenneubildung auf. In ihm sind die Kollagenfibrillen in Bündeln gelagert, die miteinander verflochten sind. Außerdem ist er sehr zellreich, wobei die Anordnung der Osteozyten keine Ordnung erkennen lässt. Die anorganischen Substanzen liegen in geringeren Mengen vor (Liebich, 2004). Beim Lamellenknochen sind die Kollagenfasern parallel oder konzentrisch gelagert. Auf Grund der makroskopischen Struktur lassen sich zwei Typen des Knochengewebes unterscheiden. Die äußere Schicht des Knochens wird Kompakta/Kortikalis (Substantia corticalis) genannt, die innere Schicht Spongiosa (Substantia spongiosa). In der Kortikalis befindet sich als äußerste Schicht die äußere Generallamelle. In dieser verlaufen die Lamellen zirkulär um den ganzen Knochen herum. Daran schließt sich eine Schicht, in der die Lamellen in Osteonen organisiert sind, an. Ein Osteon (Havers-System) besteht stets aus mehreren Untereinheiten. Zentral liegt der Zentralkanal (Havers-Kanal), der mesenchymales Bindegewebe, eine Kapillare und vegetative Nerven enthält. Darum angeordnet befindet sich eine unterschiedliche Anzahl an konzentrischen Knochenlamellen (Havers-Lamellen, Speziallamelle). Sie bestehen aus parallel angeordneten kollagenen Fasern und mineralisierter Knochenmatrix. Von einer Lamelle zur nächsten ändert sich stets die Verlaufsrichtung der Kollagenfasern. Die Lamellen sind untereinander durch Querverbindungen stabilisiert. Durch dieses Bauprinzip erhält der Knochen seine Zug- und Druckfestigkeit. Zwischen den konzentrisch angeordneten Lamellen liegen in regelmäßiger Anordnung die Osteozyten, die über ihre langen, in Knochenkanälchen verlaufenden Zytoplasmafortsätzen untereinander in Verbindung stehen. Quer durch die Osteone verlaufen die Volkmann-Gefäße, die die Havers'schen Kanäle verbinden und über die Kontakt zur äußeren (Periost) und inneren (Endost) Knochenhaut besteht. Durch dieses Netzwerk an Gefäßen und Osteozyten mit Fortsätzen wird der Knochen mit Nährstoffen versorgt. Der Lamellenknochen ist zudem Speicherort für das metabolisch aktive Kalzium. Durch Parathormon, das den Blutkalziumspiegel reguliert, werden Osteolysozyten und Osteoklasten aktiviert, die die oberflächlichen und nicht an Hydroxylapatit gebundenen Kalzium- und Phosphationen lösen. Die Anordnung und Ausrichtung der Lamellen erfolgt entsprechend der mechanischer Belastung des Knochens (Smit, 1997; Wolff, 1892). So unterliegt der Knochen permanenten Umbauvorgängen und unbelastete Osteone werden abgebaut. Diese alten Osteone liegen zwischen den jungen Osteonen als sogenannte Schaltlamellen. Zentral im Knochen schließt sich die Spongiosa (Substantia spongiosa) an. Sie besteht aus einem dreidimensionalen System fein verzweigter Knochen trabekel. Zwischen den Trabekeln bleiben Räume für hämatopoetisches Bindegewebe und Fettgewebe (Welsch, 2006). Die Anordnung der Trabekel erfolgt auf Druck- und Biegebeanspruchung. Die Knochenbälkchen (Trabekel) sind gefäßlos, so dass eine Ernährung über die Gefäße des Knochenmarks erfolgt. Das Endost bedeckt die

Spongiosatrabekel und die inneren Wände der Havers-Kanäle. Es besteht aus einer dünnen Schicht nicht-mineralisierter Kollagenfibrillen und einer Lage mesenchymaler Stammzellen, Osteoprogenitorzellen, Osteoblasten und Osteoklasten, die bei Bedarf aktiviert werden und sofort mit Umbauvorgängen beginnen können.

Die äußere Oberfläche des Knochens wird vom Periost bedeckt, das wiederum aus zwei Schichten besteht: dem äußeren Stratum fibrosum und dem inneren Stratum osteogenicum. Das Stratum fibrosum enthält straffes Bindegewebe und strahlt mit seinen Fasern (Sharpey-Fasern) in die Kortikalis ein. Das Stratum osteogenicum enthält, wie das Endost, mesenchymale Stammzellen, Osteoprogenitorzellen und Osteoblasten. Es ist für schnelle Umbau- und Reparaturvorgänge sowie das Dickenwachstum des Knochens verantwortlich (Lüllemann-Rauch, 2003).

### **2.1.3 Makroskopischer Aufbau der Bandscheibe**

Bandscheiben (Disci intervertebrales) sind mit Ausnahme des ersten und zweiten Halswirbels stets zwischen zwei Wirbeln lokalisiert und verbinden diese miteinander. Sie sind somit Teil des Wirbelsäulensegmentes, das aus jeweils zwei benachbarten Wirbel, der dazwischenliegenden Bandscheibe, den Wirbelbogengelenken, den Zwischenwirbellöchern, dem Wirbelkanal mit Rückenmark und den Bänder und Muskeln des entsprechenden Wirbelsäulenabschnittes besteht. Ihre Funktion besteht in einer Pufferwirkung der auf die Wirbelsäule einwirkenden Druck- und Zugkräfte (Salomon, 2005).

### **2.1.4 Mikroskopischer Aufbau der Bandscheibe**

Die Bandscheibe besteht aus drei verschiedenen Anteilen. Dem äußeren Faserring (Anulus fibrosus), dem gallertigen Kern (Nucleus pulposus) und den aus hyalinem Knorpel bestehenden Deckplatten auf der Oberfläche der angrenzenden Wirbelkörper. Alle drei Teile erfüllen durch ihren unterschiedlichen Aufbau verschiedene Funktionen im Rahmen des Wirbelsäulensegmentes. Der Anulus fibrosus nimmt Schubkräfte auf. Der äußere Teil des Anulus fibrosus besteht aus dicht gelagerten Lamellen straffen Bindegewebes, die hauptsächlich aus Typ-I-Kollagen und wenigen elastischen Fasern aufgebaut sind. In der Außenzone laufen die Kollagenfasern parallel in Lamellen. Die einander angrenzenden Lamellen sind über Fasern verbunden und haben stets einen anders orientierten Richtungssinn. Die Verankerung erfolgt in den angrenzenden Wirbelkörper. Weiter zentral zum Nucleus pulposus hin sind die Lamellen breiter und lockerer und im hyalinen Knorpel der Deckplatten verankert. Allmählich verschwinden die Lamellen und locker gelagerte Fasern (Typ-I –und Typ-II-Kollagen) bleiben, die proteoglykanreiche Matrix und die Anzahl

der Chondrozyten nehmen zu. Dieses faserknorpelige Gewebe geht dann in den Nucleus pulposus über. Dieser enthält locker angeordnetes Kollagen Typ II und viel Glykosaminoglykane, die Wasser binden. Dieser weiche Teil der Bandscheibe fungiert als Puffer und nimmt auftreffenden Druck auf und verteilt ihn gleichmäßig auf den Anulus fibrosus und die Deckplatten. Mit zunehmendem Alter nimmt der Wassergehalt des Nucleus pulposus ab und der Kollagenanteil zu, so dass die Spannkraft insgesamt abnimmt. Nach peripher geht der Anulus fibrosus dann in die hyaline Knorpeldeckplatte über. Die Chondrozyten ordnen sich zum Knochengewebe oft säulenartig an und die Knorpelmatrix verkalkt (Welsch, 2006).

Die Bandscheibe selber ist nicht durchblutet, ihre Ernährung und die Konvektion von Wasser erfolgt durch Diffusion von den Gefäßen des Knochenmarks, die unter der hyalinen Knorpeldeckplatte sitzen (Moore, 2000; Salomon, 2005).

### **2.1.5 Bildung von Knochengewebe (Ossifikation)**

Knochengewebe kann prinzipiell über zwei verschiedene Wege gebildet werden. Man unterscheidet zwischen der desmalen und der chondralen Ossifikation.

- **Desmale Ossifikation / direkte Knochenbildung**

Bei der desmalen Ossifikation konzentrieren sich mesenchymale Zellen an gefäßreichen Punkten (sog. Ossifikationspunkte). Die mesenchymale Zellen differenzieren sich hier kontinuierlich zu Osteoblasten, ordnen sich flächig an und sezernieren Osteoid, das im Anschluss verkalkt. Es entsteht ein Netzwerk aus feinen Knochenbälkchen, auch Trabekel genannt. Kollagen liegt darin ungeordnet verteilt vor. Zwischen den Knochen trabekeln befindet sich gefäßführendes Bindegewebe, das primäres Knochenmark genannt wird. Diese Form des Knochengewebes unterliegt ständigen Wachstums-, Umbau- und Abbauprozessen. So befinden sich Osteoblasten in Reihen auf dem Knochen angeordnet, so dass es hier zu einem Knochenzuwachs kommt. In Bereichen des Abbaus sind viele Osteoklasten sichtbar. Osteoblasten werden bei zunehmender Dicke der Knochenbälkchen eingemauert und werden nun Osteozyten genannt. Diese sind gleichmäßig verteilt, aber nicht einheitlich ausgerichtet. Später erfolgt der Umbau zu Lamellenknochen. Aus dem primären Knochenmark wird sekundäres, blutzellbildendes Knochenmark. Auf diese Weise entstehen zum Beispiel die Schädelknochen.

- **Chondrale Ossifikation / indirekte Knochenbildung**

Bei dieser Ossifikationsform wird der spätere Knochen zunächst knorpelig angelegt und dann durch Knochengewebe ersetzt. Der Prozess der indirekten Ossifikation wird dabei in die perichondrale und die enchondrale Ossifikation unterteilt. Bei der perichondralen Ossifikation wird um den knorpeligen Vorläufer eine Knochenmanschette durch direkte/desmale Ossifikation gebildet. Sie gibt dem abzubauenden Knorpelstück halt. Die Knorpelzellen werden größer („hypertroph“) und mitochondrienreicher, so dass der Blasenknorpel entsteht. Die hypertrophen Chondrozyten induzieren die Verkalkung der Knorpelmatrix in ihrer Umgebung und gehen dadurch anschließend zugrunde. Gefäße sprossen von der Knochenmanschette in den verkalkten Blasenknorpel ein, wodurch die enchondrale Ossifikation eingeleitet wird. Mit den Gefäßen werden knorpelabbauende Zellen in den Knorpel transportiert. Diese ordnen sich zu mehrkernigen Chondroklasten, die den Knorpel dann höhlenförmig abbauen. An die Stelle des Knorpels treten Gefäße und Mesenchymzellen. Bei einigen der Mesenchymzellen handelt es sich um Osteoprogenitorzellen, die sich zu Osteoblasten differenzieren, die die knorpelfreien Höhlen auskleiden und Osteoid synthetisieren. Somit erfolgt eine Auffüllung der Höhlen mit Geflechtknochen. Die Knochenbälkchen enthalten zunächst zum Teil noch Reste des verkalkten Knorpels. Auf diese Weise entstehen die meisten Knochen, so zum Beispiel die Extremitätenknochen und die Wirbel (Liebich, 2004; Lüllemann-Rauch, 2003; Welsch, 2006).

## **2.2 Anteriore intervertebrale Spondylodese der Halswirbelsäule**

### **2.2.1 Technik und Indikationen zur Spondylodese**

Die Spondylodese stellt die operative Versteifung eines Wirbelsäulensegmentes dar. Dabei kann zwischen einer ventralen, einer dorsalen und einer dorsoventral kombinierten Fusionsoperation unterschieden werden. Desweiteren kann zwischen implantathaltigen und implantatfreien Spondylodesen differenziert werden (Krämer, 2006). Indiziert ist eine solche Operation in der Humanmedizin bei nichtbandscheibenbedingten und bei bandscheibenbedingten Erkrankungen. Zu den nichtbandscheibenbedingten Erkrankungen zählen Instabilitäten der Wirbelsäule wie die symptomatischen und dabei therapieresistenten angeborenen oder erworbenen Spondylolisthesen (Wirbelkörpergleiten), instabile Frakturen und Tumoren. Durch die Instabilität werden das Rückenmark oder die Nervenwurzeln komprimiert und verursachen lokale oder ausstrahlende Schmerzsymptome. Zu den

bandscheibenbedingten Erkrankungen zählen degenerative, entzündliche und traumatische Bandscheibenerkrankungen, bei denen die konservativen Behandlungsmethoden ausgeschöpft sind. Seit den 50er Jahren ist die Technik des ventralen Halswirbelsäulenzugangs durch Smith und Robinson (Smith, 1958) und etwas später Cloward (Cloward, 1959) bekannt. Der ventrale Zugang zur Halswirbelsäule wird zur Dekompression in Bereich des Wirbelsäulensegmentes verwendet, zur Entfernung der Bandscheibe und der anschließenden Fusion der beiden Wirbelkörper. Das dorsale Operationsverfahren dient an der Halswirbelsäule dagegen hauptsächlich zur Dekompression des Spinalkanals und der Neuroforamina.

### **2.2.2 Autologe Implantate – Beckenkamm und Spongiosa**

Smith und Robinson entwickelten nicht nur den damals neuen ventralen operativen Zugang zur Halswirbelsäule, sondern verwendeten auch als erste den autologen trikortikalen Beckenkammspan zur interkorporellen Spondylodese (Smith, 1958), der danach jahrzehntelang den Goldstandard in der Wirbelfusion darstellte. Der Beckenkammspan hat nicht nur den Vorteil, als autologes Material keine Immunreaktionen hervorzurufen oder Krankheiten zu übertragen, sondern gibt dem Wirbelsäulensegment auch Stabilität und besitzt durch die darin befindlichen Wachstumsfaktoren und Osteoprogenitorzellen osteoinduktive Eigenschaften. Desweiteren besitzt er osteokonduktive Eigenschaften, da durch das bereits bestehende Knochengerüst neuer Knochen direkt darauf aufgebaut werden kann (Sawin, 1998).

Es existieren zahlreiche klinische Studien aus der Humanmedizin, die je nach Zeitraum der Verlaufsuntersuchung und Anzahl der operierten Segmente unterschiedliche radiologische Fusionsergebnisse lieferten. Brodke und Mitarbeiter untersuchten ihre Patienten durchschnittlich ein Jahr nach und konnten Fusionsraten von 97 % bei einem operierten Segment, 94 % bei zwei Segmenten und 83 % bei drei Segmenten feststellen (Brodke, 1992). In Langzeitstudien mit einem Nachuntersuchungszeitraum von drei bis sechs Jahren wurden dagegen insgesamt niedrigere Fusionsraten verzeichnet. So fusionierten die Wirbel von 88 - 89 % der Patienten mit Operation an einem Segment, 73 % der Wirbel nach einer Operationen an zwei Segmenten und 56 – 67 % bei einer Operation an mehr als zwei Segmenten (Bohlman, 1993). Die Autoren schlossen auf eine Abhängigkeit der Fusionsrate von der Anzahl an operierten Segmenten. Bei einem operierten Segment ergaben sich aus den zahlreichen klinischen Studien radiologische Fusionsraten zwischen 37 - 97 % (Barlocher, 2002; Brodke, 1992; Chou, 2008; Hacker, 2000; Thome, 2006).

Das klinische Ergebnis wurde ebenfalls in zahlreichen Studien bewertet. Ein gutes oder exzellentes Ergebnis wiesen dabei 68 - 73 % der Patienten auf (Riley, 1969; White, 1973).

Neben diesen guten Fusionsergebnissen kann dieses Verfahren aber auch zur Pseudarthrosenbildung führen. Pseudarthrosenraten von 3 - 28 % bei ein bis zwei operierten Segment sind beschrieben (Gore, 1984). Bei drei fusionierten Segmenten konnte Emery sogar eine Pseudarthrosenrate von über 43 % der 16 in die Studie eingeschlossenen Patienten verzeichnen, so dass scheinbar auch die Pseudarthrosenrate mit der Anzahl an fusionierten Segmenten steigt (Emery, 1997). Histologische Untersuchungen der Wirbelfusion mittels Beckenkammspan am Tiermodell lieferten sogar noch höhere Pseudarthrosenraten von 62 % bei multisegmentalen, anterioren Fusionen der Ziegenhalswirbelsäule nach zwölf Wochen (Zdeblick, 1993).

Andere Komplikationen, wie die Dislokation oder der Vorfall des Beckenkammspan, kamen bei ca. 1 - 5 % der Patienten vor (Aronson, 1968; Gore, 1984; Jagannathan, 2008; White, 1973). Der Winkel der segmentalen Kyphose verschlechterte sich in einer Studie von Jagannathan und Mitarbeitern bei allen Patienten (Jagannathan, 2008) und zum Kollaps des Spans kam es bei 2 % der operierten Patienten (Schnee, 1997).

Neben den Komplikationen, die den Span als Implantat direkt betreffen, birgt die Entnahme von autologem trikortikalen Beckenkammspan auch Komplikationen an der Entnahmestelle selbst. Diese können nach Meinung zahlreicher Autoren in Haupt- und Nebenkomplikationen unterteilt werden (Ahlmann, 2002; Arrington, 1996; Banwart, 1995; Keller, 1987; Summers, 1989; Younger, 1989). Als Hauptkomplikationen wurden solche eingeschätzt, die eine Verlängerung des Krankenhausaufenthalts zur Folge hatten, einer zusätzlichen Operation bedurften oder eine stärkere Behinderung für den Patienten durch z.B. starke Schmerzen darstellten. Die häufiger vorkommenden Nebenkomplikationen bedurften dagegen nur lokaler Behandlung, heilten ohne Therapie aus und verursachten keine permanente Behinderung. Bei bis zu 25 % der Patienten kamen Hauptkomplikationen vor (Ahlmann, 2002; Arrington, 1996; Banwart, 1995; Keller, 1987; Summers, 1989; Younger, 1989). Hierzu zählten das Pseudoaneurisma der Blutgefäße des Beckens, arteriovenöse Fisteln, massiver Blutverlust, sich in Rückenschmerzen äußernde Instabilität des Beckens, Beckenfrakturen, Verletzungen des Ureters, Hernien, Neuropathien, tiefe Hämatome sowie tiefe Wundinfektionen (Arrington, 1996; Goulet, 1997). Unter den bei ca. 9 – 39 % der Patienten vorkommenden Nebenkomplikationen wurde die Schädigung der kutanen Nerven (N.cutaneous femoris lateralis), chronische Schmerzen an der Entnahmestelle, lokale Wundkomplikationen wie oberflächliche Infektionen, Serom- und Hämatombildung, sowie unschöne Narbenbildung verstanden (Ahlmann, 2002; Arrington, 1996; Banwart, 1995; Keller, 1987; Summers, 1989; Younger, 1989). Andere Autoren folgten dieser Einteilung nicht, sondern listeten die Komplikationsraten einzeln auf. Als Hauptproblem stellten sich

immer wieder die chronischen Schmerzen bei 2 – 16 % (Sawin, 1998; Silber, 2003; Summers, 1989; Wright, 2007) und nervalen Störungen bei 1 – 83 % (Jagannathan, 2008; Keller, 1987; Sawin, 1998; Silber, 2003; Younger, 1989) der Patienten an der Entnahmestelle dar. Eine Studie verzeichnete einen Anstieg der Patienten mit chronischen Schmerzen von 17 % nach drei Monaten auf 38 % nach sechs Monaten. Nach zwei oder mehr Jahren post OP fiel der Prozentsatz der Patienten mit chronischen Schmerzen wieder auf 18 % (Gore, 1984).

Bei 0 – 6 % der Patienten kam es zu Wundinfektionen (Ahlmann, 2002; Gore, 1984; Goulet, 1997; Sawin, 1998; Schnee, 1997; White, 1973; Williams, 1968) und bei 8-17 % zur Hämatombildung an der Entnahmestelle (Gore, 1984; White, 1973; Williams, 1968). 14 % der Patienten wiesen unschöne Narbenbildung auf (Schnee, 1997).

Eine ähnliche Entnahmemorbidität zeigte sich auch für die Entnahme von autologer Spongiosa, die neben dem Einsatz an der Wirbelsäule auch zur Unterstützung schlecht heilender Frakturen verwendet wird. Meist wird ebenfalls der Beckenkamm als Entnahmeort gewählt, da hier die günstigsten anatomischen Verhältnisse vorliegen (Wippermann, 1997). Die in der Literatur beschriebenen Komplikationsraten liegen bei 3 – 68 % (Gerngross, 1982; Grob, 1986; Wippermann, 1997) und beinhalten ebenfalls vor allem chronische Schmerzen, Hämatombildung, Infektionen und Nervenschädigungen an der Entnahmestelle. Neben der hohen Entnahmemorbidität birgen der Beckenkammspan, sowie die autologe Spongiosa auch den Nachteil der limitierten Menge, die Nachoperationen oder die Versteifung mehrerer Segmente schwierig macht. Die Operationszeit ist im Vergleich zu anderen nicht autologen Materialien ebenso erhöhte wie der intraoperative Blutverlust und der Krankenhausaufenthalt sowie die damit verbundenen Kosten. Daher geht der Trend in den letzten Jahren zur Wahl von intervertebralen Cages in zahlreichen Designs und verschiedenen Füllmaterialien (Schnee, 1997; Weiner, 1998; Younger, 1989).

### **2.2.3 Cages**

In den letzten fünfzehn Jahren wurde immer häufiger der Cage zur intervertebralen Fusion verwendet. Der erste humane Cage wurde 1988 von Bagby (Bagby, 1988) entworfen, nach dem erstmals Pferde mit cervicaler Myelopathie (Wobbler-Syndrom) mit intervertebralen Cages behandelt wurden (DeBowes, 1984; Wagner, 1979) und um 1990 das erste Mal von Ray, Kuslich und Brantigan an der menschlichen Lendenwirbelsäule eingesetzt (Brantigan, 1993; Kuslich, 1998; Ray, 1997). Es handelt sich dabei um einen intervertebralen Abstandshalter, der nach Diskektomie dem Wirbelsäulensegment die korrekte Winkelung, Aufrichtung und Stabilität zurückgibt und so lange erhält, bis sekundär eine knöcherne Überbrückung der beiden Wirbel stattgefunden hat. Nach vollständig knöcherner Fusion

verliert er dann seine Funktion, da diese dann durch körpereigenen Knochen übernommen wird. So soll gerade in der kritischen Anfangsphase einer Wirbelfusion eine Fehlstellung des Wirbelsäulensegmentes verhindert werden.

Cages existieren in verschiedenen Designs, wie zylindrisch, ringförmig oder boxartig (Chou, 2008; Weiner, 1998) und in verschiedenen Materialien. Am häufigsten werden Titan, Carbonfasern oder PEEK (Polyetheretherketon) verwendet (Ha, 2008). Manche Cages werden auch zusätzlich mit anderen Materialien beschichtet, wie zum Beispiel Hydroxyapatit, um die Anlagerung von Osteoblasten und Knochengewebe zu erleichtern und eine bessere Integration des Implantates in den Knochen zu gewährleisten (Hacker, 2000). Außerdem besteht die Möglichkeit, den Cage mit Materialien zu füllen, wie zum Beispiel autologer Spongiosa (Chang, 2009; Liao, 2008), allogenen Knochen (Zdeblick, 1991), demineralisierter Knochenmatrix (Topuz, 2009; Zdeblick, 1991), Hydroxyapatittricalciumphosphat (Chang, 2009; Kim, 1998; Senter, 1989) oder Wachstumsfaktoren wie BMP-2 (Zdeblick, 1998) oder TGF-beta (Kandziora, 2002; Kandziora, 2003), um die Knochenbildung zu induzieren.

Der Cage bietet gegenüber dem Beckenkammspan den Vorteil, dem Wirbelsäulensegment initial eine höhere mechanische Stabilität zu geben, die ehemalige Bandscheibenhöhe und die Lordose des Wirbelsäulensegmentes zuverlässig wieder herzustellen (Profeta, 2000; Sandhu, 1996; Vavruch, 2002). Es kommt seltener zum Implantatkollaps oder -verrutschen (Thome, 2006). Der zusätzliche Eingriff an der Hüfte und die zahlreichen damit verbundenen Komplikationen fallen weg, und er bietet durch die damit kürzere Operationszeit, den geringeren Blutverlust während der Operation, den kürzeren Krankenhausaufenthalt und die schnellere Rückkehr der Patienten zur Arbeit auch einen ökonomischen Vorteil (Boos, 2008; Frederic, 2006; Lin, 2003; Matge, 2002; Matge, 2000; Niu, 2005; Profeta, 2000).

Es existieren zahlreiche Studien über den Einsatz von Cages zur cervicalen, intervertebralen Fusion der Halswirbelsäule, auch in direktem Vergleich mit dem früher so häufig verwendeten autologen, trikortikalen Beckenkammspan als sogenannten „Goldstandard“ (Barlocher, 2002; Moreland, 2004; Siddiqui, 2003; Zevgaridis, 2002). Die zahlreichen in der Humanmedizin bisher eingesetzten cervicalen Cages und die verschiedenen Studiendesigns machen den Vergleich untereinander und eine Aussage über das Implantat mit dem besten Fusionsergebnis jedoch schwer (van Limbeek, 2000; Wigfield, 2001; Zevgaridis, 2002). Die Mehrheit der Studien, die sich mit dem direkten Vergleich des Beckenkammspan mit einem Cage widmeten, zeigten, dass der Cage gleichwertige oder bessere Fusions- und Heilungsergebnisse als der Beckenkammspan lieferte (Barlocher, 2002; Chou, 2008; Frederic, 2006; Hacker, 2000; Matge, 2002; Moreland, 2004; Ryu, 2006; Siddiqui, 2003; Thome, 2006; Zevgaridis, 2002). Der postoperativen Schmerzscore war beim Einsatz eines Cages im Vergleich mit dem Beckenkammspan mit Ausnahme einer Studie von Siddiqui und

Jackowski stets beim Cage niedriger (Thome, 2006). Weitere Studien beschäftigten sich mit dem Vergleich verschiedener Cages untereinander und konnten nachweisen, dass auch zwischen den verschiedenen Cagematerialien wie PEEK und Titan Unterschiede im Fusionsergebnis existieren. Der PEEK Cage wies dabei bessere Fusionsergebnisse auf als der Titan Cage (Cho, 2004; Chou, 2008). Allerdings testeten Kast und Mitarbeiter zwei verschiedene PEEK Cages und konnte zeigen, dass selbst bei gleichem Material aber unterschiedlichem Cagedesign Unterschiede im Einsinken des Cages und dem Erhalt der Lordose bestehen (Kast, 2009).

Die Fusionsrate beim Einsatz einer der zahlreichen Cages in der Literatur bewegt sich im Bereich von 74 – 100 %, auch in Abhängigkeit des jeweilig beschriebenen Untersuchungszeitraums (Barlocher, 2002; Bartels, 2006; Cauthen, 2003; Hacker, 2000; Hida, 2008; Hwang, 2005; Matge, 2000; Moreland, 2004; Thome, 2006; Topuz, 2009). Selbst bei multisegmentalen Fusionen der Halswirbelsäule lieferte der PEEK-Cage bessere Ergebnisse als der autologe, trikortikale Beckenkammspan (Cho, 2004). In einer Studie von Bucciero und Mitarbeitern lag die Fusionsrate bei einem PEEK-Cage zur vierfach Versteifung sogar bei 97,5 % (Bucciero, 2008).

Zur Verbesserung der Spondylodese der Halswirbelsäule wurde mit Erfolg auch die Füllung der Cageimplantate mit verschiedenen Materialien durchgeführt. Im direkten Vergleich des Beckenkammspanns und einem Cage gefüllt mit autologer Spongiosa zur cervicalen, intervertebralen Fusion kam es bei 100 % der Patienten der Cage-Gruppe zu einer Fusion. Dagegen fusionierten in der Beckenkamm-Gruppe nur 93 % (Hacker, 2000). Sogar bei multisegmentalen Fusionen wies der Cage gefüllt mit autologer Spongiosa eine Fusionsrate von 98 % nach sechs Monaten auf (Chang, 2009). Häufig erfolgte auch ein Füllung der Cages mit demineralisierter Knochenmatrix, autologen Knochenchips oder Hydroxyapatit bei der ebenfalls gute Heilungsergebnisse und Fusionsraten von 92 – 96 % zu verzeichnen waren (Chang, 2009; Ha, 2008; Topuz, 2009).

Nachteilig stellten sich bei der Verwendung des Cages die zum Teil hohen Einsinkraten des Cages (Cagesinterung) dar. Sie lag in den verschiedenen Studien bei 2 – 55 % der versteiften Segmente (Bartels, 2006; Chou, 2008; Gercek, 2003; Ha, 2008; Hida, 2008; Hwang, 2005; Lemcke, 2007; Lin, 2003; Niu, 2005; Schmieder, 2006; van Jonbergen, 2005; Zevgaridis, 2002). Allerdings bestanden von Studie zu Studie unterschiedliche Kriterien, ab wann ein Cage als gesintert galt und über welche Messverfahren dies errechnet wurde. Ein stärkeres Einsinken des Cages wurde bei multisegmentalen Fusionen beobachtet (Joung, 2007) und bei Fusionen zwischen dem sechsten und siebten Halswirbel (Bartels, 2006). Das Einsinken des Cages hatte jedoch weder Auswirkungen auf das Fusionsergebnis noch führte es zu klinischen Erscheinungen wie neurologische Ausfälle oder Schmerzen (Assietti, 2002; Bartels, 2006; Hwang, 2005; Lemcke, 2007; Lin, 2003; Matge, 2002; Matge, 2000; Moreland,

2004; Peolsson, 2004; Salame, 2002; Vavruch, 2002). Im direkten Vergleich eines Titan cages mit dem autologen, trikortikalen Beckenkammspan ergaben sich für beide Verfahren ähnliche Einsinkraten (Frederic, 2006; Thome, 2006). In einer Studie zeigte der Beckenkammspan im Vergleich mit einem Titangewinde cage sogar stärkeres Einsinken in die Wirbelkörper von 2,26 mm zu 0,74 mm beim Titan cage (Barlocher, 2002).

Wenige Studien zeigten beim Cageeinsatz im Vergleich zum autologen, trikortikalen Beckenkammspan jedoch eine höhere Pseudarthroserate von 38 % zu 13 % (Vavruch, 2002). Einige Verfasser kamen beim Einsatz eines Cages zu einem höheren Preis als bei der Verwendung des Beckenkammspans (Hida, 2008; Siddiqui, 2003) und nachteilig wurde in einer Studie auch vom Bruch eines Titan cages berichtet (Gercek, 2003).

## **2.3 Parathormon**

### **2.3.1 Allgemeine Struktur, Aufgabe und Wirkung von Parathormon**

Hauptaufgabe des Hormons Parathormon (PTH) ist die Regulation der Kalzium- und Phosphathomöostase im Blut. Parathormon besteht aus 84 Aminosäuren und wird von den Nebenschilddrüsen gebildet und sezerniert. Die Produktion und Freisetzung von Parathormon wird über die Kalziumkonzentration des Blutes reguliert. Ein sinkender Kalziumspiegel hat die Ausschüttung von Parathormon zur Folge. Das Parathormon induziert eine Erhöhung des Serumkalziumspiegels durch die Aktivierung der Kalziumfreisetzung aus dem Knochen infolge verstärktem Knochenabbaus, durch Steigerung der Kalziumrückresorption in den Nierentubulie und durch eine erhöhte Rückresorption von Kalzium aus dem Darm. Der erhöhte Blutkalziumspiegel induziert wiederum eine negative Rückkopplung auf die Parathormonausschüttung. Gegenspieler des Parathormons ist das Kalzitinin. Es wird ebenfalls in den Nebenschilddrüsen gebildet und als Folge erhöhter Kalziumkonzentrationen im Blut ausgeschüttet. Es bewirkt v.a. in der Niere und im Darm eine erhöhte Ausscheidung von Kalzium-, Phosphat- und Natriumionen.

PTH-Rezeptoren befinden sich auf Osteoblasten, so dass die Rolle des PTHs allgemein in der Stimulation der Osteoblasten liegt. Auf den Osteoklasten hingegen sind Kalzitininrezeptoren lokalisiert, so dass durch die Bindung von Kalzitinin die Osteoklasten gehemmt werden (Carter, 2006).

### 2.3.2 Osteogene humane Parathormone

Es existieren drei osteogene humane Parathormone, die sich entweder in klinischen Studien oder bereits auf dem Markt befinden. Das rekombinante, humane, 84 Aminosäuren lange Parathormon rhPTH<sub>1-84</sub>, das in dieser Form in dem humanen Präparates Peotact™ (NPS Pharmaceuticals, Bedminster, USA) vorliegt, befindet sich derzeit in einer Phase 3 Studie. Das am häufigsten verwendete PTH ist das 34 Aminosäuren lange, rekombinante, humane Parathormon rhPTH<sub>1-34</sub> Teriparatide, das zum Beispiel als humanes Präparat Forsteo® (Eli Lilly and Company Limited, Basingstoke Hampshire, Niederlande) als erstes im Jahr 2002 auf dem Markt zugelassen wurde. Es existieren noch zwei weitere, kleinere PTHs: Ostabolin (hPTH(1-31)NH<sub>2</sub>) und das zyklisches Ostabolin-C ((Leu<sup>27</sup>)cycloGlu<sup>22</sup>-Lys<sup>26</sup>hPTH(1-31)NH<sub>2</sub>) (Zelos Therapeutics, Inc., West Conshohocken, PA, USA).

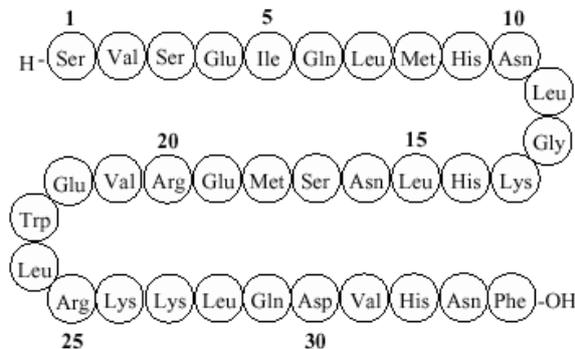


Abbildung 1: Aufbau des rhPTH(1-34)

### 2.3.3 Wirkungsweise des Parathormons auf den Knochenstoffwechsel und bisheriger Einsatz

Die Wirkung des Parathormons auf die Stimulation der Knochenbildung wurde erstmals 1931 von Péhu und Mitarbeitern beschrieben. Sie erkannten, dass durch eine Überproduktion von Parathormon in Folge eines Nebenschilddrüsenadenoms ein exzessives Knochenwachstum verursacht wurde (Péhu, 1931). Selye und Mitarbeiter sowie Pugsley und Kollegen machten erste Versuche an der Ratte mit täglichen PTH-Gaben und konnten initial eine Erhöhung der Osteoklasten im Knochen sowie eine Erhöhung des Blutkalziumspiegels feststellen. Anschließend verschwanden die Osteoklasten aus dem Knochengewebe ebenso wie die hohen Kalziumspiegel im Blut. Die Osteoblastenanzahl im Knochengewebe war dagegen stark erhöht, ebenso waren große Mengen neu gebildeten Knochens nachzuweisen (Pugsley, 1933; Selye, 1932, 1932 a). Allerdings wurde erst in den 70er Jahren von Reeve und Mitarbeitern das Parathormon zur Osteoporosetherapie postmenopausaler Frauen

verwendet (Reeve, 1976). Darauf folgte eine Reihe von Studien zur Behandlung der Osteoporose mit PTH. Tam und Mitarbeiter waren die ersten, die den unterschiedlichen Effekt von intermittierender und kontinuierlicher PTH-Injektion auf die Netto-Knochenappositionsrate erkannten (Tam, 1982). Der Wirkmechanismus des PTH auf den Knochen ist dabei allerdings noch nicht gänzlich geklärt. Häufig wird vom paradoxen Effekt des Parathormons auf den Knochen gesprochen. Kontinuierliche PTH-Gabe wiesen in tierexperimentellen und humanmedizinischen Studien einen katabolen Effekt auf den Knochenstoffwechsel auf, intermittierende Gabe dagegen einen anabolen Effekt (Qin, 2004). Dobnig und Mitarbeiter beschrieben in ihrer tierexperimentellen Studie an der Ratte, dass kontinuierliche PTH-Gabe zu Hyperkalzämie und Gewichtsverlusten bis zu 10 %, Abnormalitäten der Knochen, wie peritrabekulärer Knochenmarksfibrose und fokalen Knochenresorption führten (Dobnig, 1997). Die intermittierende Gabe von PTH 80 µg/kg oder höher durch Injektion unter die Haut der Ratte führt dagegen zur Erhöhung des spongiösen Knochenvolumens, der Osteoblastenzahl und zur Knochenneubildung (Dobnig, 1997). Die anabole Wirkung der intermittierenden PTH-Gaben erklärt man sich durch das Beeinflussen von drei Schritten der Knochenbildung. PTH stimuliert zum einen die Proliferation der Osteoblasten-Progenitorzellen (Jilka, 2007; Jilka, 1999; Kostenuik, 1999; Kousteni, 2008; Nakazawa, 2005; Nishida, 1994; Valenta, 2005), zum anderen fördert es die Differenzierung von Präosteoblasten und Osteoblasten (Osteoblastogenese) und die Inhibierung der Osteoblastenapoptose (Bellido, 2003; Jilka, 2007; Jilka, 1999; Kousteni, 2008; Qin, 2004). Schnoke und Mitarbeiter bemerkten den antiapoptotischen Effekt des Parathormons, und erkannten, dass PTH die Osteoblastenapoptose durch Steigerung der DNA-Reparatur verhindert (Schnoke, 2009). Auch Bellido und Mitarbeiter beschrieben in einem Mausmodell die verminderte Apoptose der Osteoblasten nach täglicher Gaben von 3 bis 300 ng/g/Tag PTH für 28 Tage und die dadurch dosisabhängig gesteigerte Knochendichte der Wirbelsäule und der Hinterbeinknochen (Bellido, 2003). Insgesamt kommt es durch diese drei Effekte des PTHs zu einer erhöhten Anzahl an Osteoblasten, was in zahlreichen histologischen Studien beobachtet werden konnte. Die erhöhte Anzahl an Knochenmatrix synthetisierenden Osteoblasten resultiert anschließend in der Steigerung des Knochenwachstums (Dobnig, 1997; Jilka, 2007; Lindsay, 2006). Jilka und Mitarbeiter beobachteten außerdem, dass ruhende Osteoblasten auf der Knochenoberfläche, die sogenannten „bone lining cells“, aktiviert werden (Jilka, 2007; Jilka, 1999). Sie erklären sich die beiden gegensätzlichen Effekte des Parathormons außerdem sehr anschaulich: Knochenbildung findet im adulten spongiösen Knochen nur an Stellen statt, die sich gerade im Umbau befinden. Alter Knochen wird dabei durch die sogenannte multizelluläre Grundeinheit („basic multicellular unit“), die aus Osteoklasten und Osteoblasten zusammengesetzt ist, durch neuen Knochen ersetzt. Der Knochenumbau beginnt mit dem Rückzug der Osteoblasten von der Knochenoberfläche.

Osteoklasten werden rekrutiert und höhlen die kalzifizierte Matrix aus. Die Aushöhlung wird in drei Phasen wieder mit Knochen ausgefüllt. In der Initiationsphase sammeln sich Osteoblasten aus lokalen mesenchymalen Stammzellen am Boden der Aushöhlung an und bilden Knochen. Wenn die Knochenbildung weiter fortschreitet, werden einige Osteoblasten als Osteozyten in die Knochenmatrix eingemauert, die meisten gehen jedoch apoptotisch zu Grunde. Ist die Aushöhlung komplett mit Knochengewebe aufgefüllt, bleiben in der Endphase einige Osteoblasten ruhend auf der Knochenoberfläche zurück. Bei intermittierende PTH-Gabe kommt es hauptsächlich zur Bildung von Knochenmasse durch bereits bestehende multizellulären Grundeinheiten, allerdings kommt es auch daneben zur Knochenneubildung, so dass mehr Osteoblasten arbeiten, als für die Füllung der durch die Osteoklasten geschaffenen Aushöhlungen benötigt wird. Dieser Effekt der Vermehrung der Knochenmasse wird auch Knochenanabolismus genannt (Jilka, 2007; Riggs, 2005). Bei kontinuierlicher Gabe von PTH, sowie beim primären oder sekundären Hyperparathyroidismus auf Grund eines Kalziumdefizits in der Nahrung wird ebenfalls ein verstärkter Knochenumbau beobachtet, allerdings ist innerhalb der multizellulären Grundeinheit das Gleichgewicht zugunsten der Osteoklasten verschoben, so dass es zu einer verstärkten Knochenresorption kommt (Jilka, 2007).

Bis heute wird Parathormon von allem in der Osteoporosetherapie eingesetzt (Cappuzzo, 2004). So ist das einzige in den USA und Europa seit 2002 zur Behandlung schwerer Osteoporose zugelassene Präparat ein rekombinantes humanes PTH(1-34) (Forsteo<sup>®</sup>, Eli Lilly and Company Limited, Basingstoke, Hampshire, Großbritannien). Im Tiermodell von Ratte und Maus und in klinischen Studien am Menschen wurde die anabole Wirkung des Parathormons auf den Knochen demonstriert (Hodsman, 2005). Tägliche Injektionen von PTH<sub>1-34</sub> oder PTH<sub>1-84</sub> unter die Haut haben eine Zunahme der Knochenmasse zur Folge und verringern somit die Häufigkeit von Frakturen bei postmenopausalen Frauen, älteren Männern und Frauen mit glukokortikoidinduzierter Osteoporose (Hodsman, 2005; Jilka, 2007; Lane, 1998). Aber auch Östrogenmangel-induzierter Knochenabbau von Frauen zwischen 21 - 45 Jahren kann durch intermittierende PTH-Gaben verhindert werden (Finkelstein, 1994). Es konnte gezeigt werden, dass sich unter systemischer, intermittierender Verabreichung von hPTH<sub>1-34</sub> an postmenopausale Frauen mit Osteoporose das Volumen des spongiösen Knochens vergrößert und die Verbindung der Trabekel verbessert wird, ebenso nimmt die Dicke der Kortikalis zu (Jiang, 2003). Durch einmal tägliche PTH-Gabe wird der Knochenumsatz mit einer Zunahme der Knochenbildung stimuliert. Die Knochenarchitektur und die biomechanischen Eigenschaften des Knochens werden verbessert, was sich klinisch in einem verminderten Risiko von Wirbel- und Nicht-Wirbelfrakturen äußert (Finkelstein, 1994; Lindsay, 1997; Neer, 2001; Tashjian, 2002). Auch

die zyklische PTH-Gaben im Rhythmus von drei Monaten kann eine Erhöhung der Knochendichte der Wirbelsäule zur Folge haben (Cosman, 2005).

Die Wirkung des Parathormons versucht man auch zur Verbesserung der Frakturheilung zu nutzen. In einem Tibiafraktur-Modell mit jungen und alten Ratte kommt es durch intermittierende PTH<sub>1-34</sub>-Gaben von 60 oder 200 µg/kg/Tag zu einem mechanisch stabileren Kallus und einem stärkeren Kallusvolumen als in der Kontrollgruppe. Ebenso war der Mineralstoffgehalt und die Knochendichte des Kallus und des kontralateralen Beines nach PTH-Gabe höher (Andreassen, 1999; Andreassen, 2001). Nozaka und Mitarbeiter konnten ebenfalls eine erhöhtes Kallusvolumen für ein Tibia-Osteotomiedefektmodell in normalen und ovariectomierten Ratten nach wöchentlicher Gabe von 100 µg/kg vermerken (Nozaka, 2008). In anderen tierexperimentellen Studien zur Frakturheilung konnte eine dosisabhängige Wirkung des PTHs bemerkt werden (Jahng, 2000; Kim, 1999). In einem Femurfrakturmodell der Ratte wirkte sich die intermittierende, subkutane Gabe von 80 µg PTH(1-34)/kg/Tag positiv auf die Frakturheilung aus durch größere Mengen neu gebildeten Knochens und einer größeren Kallusfläche und –stärke (Holzer, 1999). Tägliche Gaben von 10 µg/kg PTH<sub>1-34</sub> ebenfalls im Femurfrakturmodell der Ratte ergaben eine signifikante Erhöhung des Mineralstoffgehaltes des Knochens, eine höhere Knochendichte und eine höhere Versagenslast des Kallus. Niedrige Dosen des PTHs schienen dabei die Kallusbildung und mechanische Festigkeit durch die Stimulation der Proliferation und Differenzierung der Osteoprogenitorzellen, einer verstärkten Produktion von Knochenmatrixproteinen und der verstärkten Osteoklastogenese während der Phase des Kallusremodellings zu verbessern (Nakajima, 2002). Eine beschleunigte Frakturheilung durch einen schnelleren Umbau des Geflechtknochens in Lamellenknochen und einer stärkeren kortikale Knochenmanschette sowie einem stärkeren Kallus nach zwölf Wochen konnte durch die intermittierende PTH-Gabe von 30 µg/kg drei Wochen vor und nach der Osteotomie erzielt werden (Komatsubara, 2005). In einer späteren Studie ebenfalls zur Frakturheilung des Rattenfemurs konnten die bisher gemachten Beobachtungen bestätigt werden. Intermittierende PTH<sub>1-34</sub>-Gabe von 5 oder 30 µg/kg/Tag konnte eine Verbesserung der Frakturheilung durch einen erhöhten Mineralstoffgehalt, eine erhöhte Knochendichte und eine erhöhte biomechanische Festigkeit des Kallus erzielen. Die Autoren schließen daraus auf einen möglichen klinischen Einsatz von Parathormon zur Frakturheilung beim Menschen (Alkhiary, 2005). Eine spätere Studie zur Femurfrakturheilung der Maus und täglicher Gabe von 30 µg/kg PTH<sub>1-34</sub> ergab ein größeres Kallusvolumen bei gleicher Knochendichte in den behandelten Gruppen. Außerdem zeigte sich, dass PTH vor allem die Knorpelbildung anregte, was zum eine über die molekulare Analysen der Expression von extrazellulären Matrixgenen nachgewiesen wurde, zum anderen über ein größeres Knorpelvolumen im Kallus. Zudem hypertrophierten die Chondrozyten früher im Vergleich zu unbehandelten Kontrollgruppe (Kakar, 2007).

Manabe und Mitarbeiter konnten dann im Femurfrakturmodell am *Cynomolgus* Affen, der über das gleiche Haverssystem im intrakortikalen Knochen verfügt wie der Mensch, mit niedrigen (0,75 µg/kg) und hohen (7,5 µg/kg) Dosen von PTH<sub>1-34</sub> zweimal wöchentlich systemisch verabreicht, dosisabhängig den Frakturheilungsprozess beschleunigen. Die Beschleunigung zeigte sich in einer überlegenen Struktur des Knochengewebes, dabei war der Kallus kleiner, aber in einem höheren Maße mineralisiert und wies eine niedrigeren Osteoklastenzahl bei der Verwendung von hohen Dosen PTHs auf (Manabe, 2007).

Neben diesem systemischen Einsatz zur Frakturheilung gab es auch Versuche zum lokalen Einsatz von PTH. Fang und Mitarbeiter verwendeten als erste Plasmidgene, die für ein Fragment des hPTH<sub>1-34</sub> kodieren. Diese wurden lokal in einer Matrix in ein kritisches Osteotomiemodell des Rattenfemurs eingebracht. Die Fibroblasten im Osteotomiespalt interagierten mit dem Plasmidgen und synthetisierten hPTH<sub>1-34</sub>, was wiederum die komplette Heilung und Überbrückung des Frakturspalts mit Knochen zur Folge hatte (Fang, 1996). Ähnliche Ergebnisse konnten in einem kritischen Tibia-Defektmodell am Beagle erzielt werden, bei dem es durch die lokale Verabreichung eines Matrixschwammes mit Plasmidgenen für hPTH<sub>1-34</sub> ebenfalls zur kompletten Überbrückung des Osteotomiespaltes kam (Bonadio, 1999). In einer weiteren tierexperimentellen Studie am kritischen Defektmodell des Rattenfemurs wurde die gleichzeitig systemische Gabe von PTH<sub>1-34</sub> und lokale Verabreichung von PTH<sub>1-34</sub> mittels Plasmidgen untersucht. Knochendichte, Mineralstoffgehalt und die Fläche des Kallus waren erhöhte im Vergleich zur Kontrollgruppe (Chen, 2003). Chen und Mitarbeiter schlossen daraus, dass die kombinierte Therapie mit lokalem und systemisch verabreichtem PTH ein Konzept für die Behandlung von Frakturen mit erhöhtem Risiko für eine „non-union“ (Pseudarthrose) darstellt. Nakazawa und Mitarbeiter konnten in einem Femurfrakturmodell an der Ratte zeigen, dass niedrige, intermittierende Dosen von rhPTH<sub>1-34</sub>, systemisch verabreicht, nicht nur Auswirkungen auf die Entwicklung des harten Kallus haben, sondern auch auf die Entwicklung des frühen, weichen Frakturkallus. Die mesenchymalen Chondroprogenitorzellen waren in der frühen Phase der Chondrogenese (Tag 4-7) erhöht, und am Tag 14 nach der Fraktur wiesen die mit PTH behandelten Tiere eine signifikant größere Knorpelfläche im Vergleich mit der unbehandelten Kontrollgruppe auf. Der hyalinen Knorpel wurde im Zuge der enchondralen Ossifikation später in Knochen umgewandelt (Nakazawa, 2005).

Andere Studien beschäftigten sich mit der Verbesserung des Einwachsens von Knochenimplantaten. Skripitz und Mitarbeiter konnten nachweisen, dass unter intermittierender Gabe von 60 µg/kg PTH(1-34) der Knochenkontakt-Anteil von Edelstahl- und Knochenzementstäben in der Rattentibia größer war als in der Kontrollgruppe und der Implantat-Knochenkontakt von Edelstahlschrauben ebenfalls verbessert wurde (Skripitz,

2001; Skripitz, 2005). Die Autoren schlossen darauf, dass PTH möglicherweise auch das Einwachsen anderer orthopädischer Implantate im Menschen verbessern kann.

Systemisch wurde das PTH<sub>1-34</sub> bereits in tierexperimentellen Studien zur Wirbelfusion verwendet. Dabei erhoffte man sich eine Übertragung der anabolen Wirkung des PTHs wie bei der systemischen Verabreichung zur Osteoporosetherapie und zur Frakturheilung auch auf die Wirbelfusion. Lawrence und Mitarbeiter testeten als erstes systemisch verabreichtes rhPTH<sub>1-34</sub> zur posterolateralen Fusion des Proc. spinosus des vierten und fünften Rattenlendenwirbels. Dabei verwendeten sie zur Stabilisierung ein Gemisch aus autologem, kortikalen und spongiösen Knochen aus dem Beckenkamm und tägliche s.c. Injektionen von 20 µg/kg PTH<sub>1-34</sub>. Die Auswertung erfolgte dabei lediglich über manuelle Palpation und den Osteocalcinspiegel. Als Ergebnis konnte im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe das Fusionsergebnis von 37 % auf 52 % gesteigert werden (Lawrence, 2006).

Abe und Mitarbeiter verabreichten hPTH<sub>1-34</sub> 40 µg/kg als s.c. Injektion ebenfalls im Rattenmodell zur Versteifung des Proc. transversus des vierten und fünften Lendenwirbels mittels eines Gemisches aus autologem, kortikalen und spongiösen Knochens aus dem Beckenkamm. Die Knochenresorption des autologen Knochentransplantates war früh erhöht, das Remodelling des kortikalen Knochens und die Formation des Kortikalismantels ebenfalls. Ein größeres und dichteres Trabekelvolumen konnte zu einem früheren Zeitpunkt nachgewiesen werden. So war die Heilungszeit des autologen Knochenmaterials insgesamt im Vergleich mit der unbehandelten Kontrollgruppe verkürzt. Die Fusionsmasse stellt sich als strukturell überlegen dar, war dadurch fester und die Fusionsrate insgesamt höher (14 % Kontrollgruppe zu 57 % in der PTH-Gruppe) (Abe, 2007). O'Loughlin und Mitarbeiter verwendeten PTH<sub>1-34</sub> dagegen im Kaninchenmodell zur posterolateralen Fusion des fünften und sechsten Lendenwirbels ebenfalls durch ein Gemisch aus autologem, kortikalen und spongiösem Knochens aus dem Beckenkamm. Die Verabreichung erfolgte systemisch über tägliche s.c. Injektionen von 10 µg/kg PTH<sub>1-34</sub>. Eine höhere Fusionsrate von 81 % zu 30 % in der Kontrollgruppe konnte nach sechs Wochen sowohl bei der manuellen Biegung festgestellt werden, als auch im radiologischen Fusionsscore, der in der PTH-Gruppe signifikant höher war. Die histologisch ermittelte Knochen- und Knorpelfläche war ebenfalls in der PTH-Gruppe signifikant größer, ebenso wie das größere Knochenvolumen gemessen im CT. Die Anzahl der aktiven Osteoblasten und die Osteoklastenzahl waren höher als in der Kontrollgruppe (O'Loughlin, 2009). Lehmann und Mitarbeiter verwendeten das gleiche Kaninchenmodell sowie die gleiche Menge an systemisch verabreichten PTH. Sie konnten nach acht Wochen eine erhöhte Fusionsrate und eine histologisch weiter fortgeschrittenes Gewebe im Fusionsspalt vermerken (Lehman, 2010).

### 2.3.4 Einsatz von modifiziertem Parathormon TGpPTH<sub>1-34</sub>

Bei dem in dieser tierexperimentellen Studie verwendeten Parathormon handelt es sich um ein aktives Fragment des humanen Parathormons (1-34). Dieses wird modifiziert durch die Bindung eines 12 Aminosäuren langen Transglutaminase (TG)- (Faktor XIIIa) Substrats an das N-terminale Ende des Parathormons (1-34). Durch eine neue Vernetzungstechnik wird das Protein während des Koagulationsprozesses von Fibrinogen und Thrombin zu Fibrin durch die Transglutaminase/Faktor XIIIa in die entstehende Fibrinmatrix eingebunden (Schense, 2000; Schense, 1999). Auch für die Bindung anderer Proteine wie bone morphogenetic protein-2 (BMP-2) wurde diese Technik bereits erfolgreich angewendet (Schmoekel, 2005). Die Fibrinmatrix dient dabei als Träger für das Hormon und gleichzeitig auch als Matrix zum Einwachsen neuer Zellen nach Applikation des Fibrinkonstruktes ins Gewebe. Das in die Fibrinmatrix gebundene Parathormon ist als Vorläufer wenig aktiv (Arrighi, 2009). Durch den zusätzlichen Einbau einer Plasminsubstratsequenz (pl) in das Parathormon (1-34) kann dann durch endogenes Plasmin das Parathormon an dieser Stelle aus der Fibrinmatrix herausgelöst werden. Das Parathormon wird dadurch aktiviert und entfaltet so nur lokal seine anabole Wirkung auf den Knochenstoffwechsel.

Die kontrollierte Einbindung und anschließend lokale, proteolytische Freisetzung von osteoinduktiven Proteinen in Fibrin als Matrixsystem hat entscheidende Vorteile. Durch die kovalente Einbindung der Proteine wird ihre Verweildauer am Ort der gewünschten Knochenneubildung deutlich verlängert. Weiterhin wird durch die kontrollierte Freisetzung eine lokale Wirkung erreicht und systemische Effekte minimiert. Dadurch kann die Konzentration der Proteine signifikant verringert werden, wodurch potentiell mögliche Nebenwirkungen deutlich reduziert werden.

In *in vitro*-Vorversuchen wurde die Transglutaminasesequenz als effektives Substrat für den Faktor XIIIa getestet, ebenso wie die Freisetzung und effektive Zurückhaltung des TGpPTH<sub>1-34</sub> in der Fibrinmatrix. Die Bioaktivität des aktiven PTH-Fragments und die Aktivität des TGpPTH<sub>1-34</sub> eingebunden in die Fibrinmatrix vor und nach Plasminaufschluss sowie die PTH-Rezeptorbindung und -aktivität wurden ebenfalls *in vitro* vorher getestet (Arrighi, 2009). Im Anschluss erfolgten die ersten *in vivo* Versuche im Tier. In einem Tierversuch wurden zylindrische Bohr-Defekte (8 mm Durchmesser, 13 mm Tiefe) in die proximale und distale Epiphyse und Metaphyse des linken und rechten Femurs und Humerus von weiblichen Schafen (n=20, Alter 2-5 Jahre, Gewicht 51-80 kg) gesetzt. Pro Schaf entstanden so acht Bohr-Defekte, die entweder leer gelassen wurden, in die Fibrinmatrix ohne TGpPTH<sub>1-34</sub> eingebracht wurde oder vier verschiedene Konzentration von TGpPTH<sub>1-34</sub> (0,05, 0,1, 0,4, oder 1,0 mg/ml) via Fibrinmatrix erhielten. Nach fünf und acht Wochen ergab sich in der radiologischen Auswertung im  $\mu$ CT und in der Histologie ein höherer Prozentsatz von neu

gebildetem Knochen durch TGpPTH<sub>1-34</sub> in der Fibrinmatrix im Vergleich zur Fibrinmatrix ohne TGpPTH<sub>1-34</sub> oder in der Leerdefekt-Gruppe. Innerhalb der Parathormongruppen war eine Dosisabhängigkeit im Knochenwachstum zu beobachten. Neuer Knochen wuchs dabei aus der Peripherie in den Defekt ein, es kam aber auch zu einer zentralen Knochenformation. Das verwendete Material zeigte somit sowohl osteokonduktive als auch osteoinduktive Eigenschaften. Die Fibrinträgermatrix war nach acht Wochen komplett resorbierte. In der qualitativen Histologie waren in der Gruppe mit 0,1 mg/ml TGpPTH<sub>1-34</sub> eine große Anzahl von Osteoprogenitorzellen, Osteoidsäume, aktive Osteoblasten und eine gute Vaskularisierung des Defektes sichtbar. Kein Tier wies eine Entzündungsreaktion durch das Material auf (Arrighi, 2009).

Das modifizierte PTH wurde außerdem in einem Tibia-Osteotomiemodell am Schaf getestet. Es wurden einen cm große segmentale Defekte in der Diaphyse gesetzt und mittels dynamischer Kompressionsplatte mit elf Schrauben fixiert. In die Defekte wurde die gleiche Fibrinmatrix mit unterschiedlichen Konzentrationen an TGpPTH<sub>1-34</sub> (0,4, 1, 2, 5, 10 mg/ml) und einer definierten Menge an Hydroxyapatittrikalziumphosphat-Granulat eingebracht. Als Kontrollgruppen fungierte eine Gruppe, die das Fibrin- und Hydroxyapatittrikalziumphosphatmaterial ohne TGpPTH<sub>1-34</sub> erhielt, sowie eine Gruppe, bei der der Defekt mit autologem Knochen gefüllt wurde (Mark, 2007). Jede Gruppe umfasste sechs Tiere. Radiologisch zeigte sich vier Wochen nach der Operation in den PTH-Gruppen bereits eine Kallusbildung im Vergleich zu den Kontrollgruppen. Nach 12 Wochen konnte eine komplette Überbrückung des Osteotomiespalt in der Spongiosagruppe nachgewiesen werden, gefolgt von den Gruppe mit 0,4 mg/ml und 1,0 mg/ml TGpPTH<sub>1-34</sub>. In der semiquantitativen Auswertung des Vorkommens von Osteoblasten, Osteoprogenitorzellen und Osteoklasten zeigten sich in den Gruppen mit den niedrigen Konzentrationen des PTHs (0,4 mg/ml und 1,0 mg/ml TGpPTH<sub>1-34</sub>) mehr Osteoblasten und Osteoprogenitorzellen im Vergleich zur Materialkontrollgruppe. In allen PTH-Gruppen waren weniger Osteoklasten nachweisbar. Die meisten Osteoblasten und Osteoprogenitorzellen, sowie die wenigsten Osteoklasten waren allerdings in der Gruppe darstellbar, die mittels autologem Knochenmaterials versorgt wurden. Da die hohen Konzentrationen an TGpPTH<sub>1-34</sub> ein schlechteres Heilungsergebnis lieferten, wurden in dieser Arbeit nur die beiden niedrigen Konzentrationen von 0,4 und 1,0 mg/ml TGpPTH<sub>1-34</sub> verwendet, um den Effekt von Parathormon auf die Verbesserung der Wirbelfusion zu untersuchen. Zusätzliche wurden eine mittlere Konzentration von 0,7 mg/ml TGpPTH<sub>1-34</sub> und eine niedrigere Konzentration von 0,2 mg/ml TGpPTH<sub>1-34</sub> zur Spondylodese der Schafshalswirbelsäule getestet.

Neben diesem experimentellen Einsatz des Parathormons wurde es außerdem in veterinärmedizinischen Fällen und in einer klinischen Phase-I-Studie zur Behandlung von distalen Radiusfrakturen erfolgreich eingesetzt. Bei einem sechs Monate alten

Warmblutfohlen mit subchondraler Knochenzyste in der Phalanx proximalis der linken Vordergliedmaße wurde nach Kürettierung der Zyste das TGpPTH<sub>1-34</sub> in der Fibrinmatrix eingefüllt. Die Zyste heilte schnell und ohne Komplikationen ab, was bei konservativer Behandlung oder alleiniger Kürettierung nicht der Fall ist (Fuerst, 2007).

## 2.4 Fibrin

Fibrin entsteht als Endprodukt der Koagulationkaskade des Blutes aus den Vorstufen Fibrinogen und Thrombin. Nach der ersten experimentellen Anwendung von Fibrin als Gewebekleber in den 40er Jahren ist es heute in der Medizin weltweit als solcher zugelassen und frei verkäuflich (Schmoekel, 2005; Sierra, 1993).

Dabei wird der Kleber stets frisch hergestellt und enthält die zuvor getrennten Komponenten Fibrinogen, Fibronectin, Faktor III und als antifibrinolytischen Wirkstoff Aprotinin, welcher das Auflösen des unreifen Koagels verhindert. Als zweite Komponente enthält es weiterhin Thrombin und Ca<sup>2+</sup>-Ionen (Le Guehenec, 2004; Sierra, 1993). Bei der in dieser Studie verwendeten Fibrinmatrix handelt es sich um FS VH S/D (Fibrin sealant vapour-heat treated solvent/detergent treated) von Baxter<sup>®</sup> (Baxter<sup>®</sup> Deutschland GmbH, Unterschleißheim, Deutschland). FS VH S/D stellt eine verbesserte Variante der kommerziell erhältlichen Fibrinmatrix Tisseel<sup>®</sup>/Tissucol<sup>®</sup> dar, welche bereits klinisch verwendet wird. Der Unterschied zu Tisseel<sup>®</sup>/Tissucol<sup>®</sup> besteht in einem zusätzlichen Virus-Inaktivierungs-Schritt, um die Sicherheit des Produktes zu erhöhen. Durch Mischung der Komponenten Fibrinogen, Faktor III, Aprotinin und Thrombin (vier internationale Einheiten) über den Rapid fill<sup>™</sup> connector entsteht dann der praktisch zu applizierende Gewebekleber, der nach 1 - 1,5 Minuten Wartezeit appliziert werden kann. Thrombin wird durch Faktor Xa in Anwesenheit von Faktor V aktiviert. Fibrinogen reagiert dann auf das aktivierte Thrombin mit einer Konformationsänderung des Moleküls, so dass Fibrinmonomere entstehen, die sich dann durch Wasserstoffbrückenbindungen und elektrostatische Wechselwirkungen in instabile, lösliche Fibrinstränge anordnen. Die Fibrinstränge verlängern sich und vergrößern so ihren Durchmesser, so dass ein instabiles Fibrinkoagel entsteht. Thrombin aktiviert den Faktor XIII im Beisein von Ca<sup>2+</sup>-Ionen. Faktor XIII wandelt dann die lockeren Bindungen zwischen den Fibrinfasern durch Transaminierung in kovalente Bindungen um, so dass ein stabiles, unlösliches Koagel entsteht (Radosevich, 1997; Sierra, 1993).

Fibrin bietet den Vorteil, biokompatibel zu sein und keine umfangreichen Entzündungsreaktionen, Fremdkörperreaktionen, Gewebenekrosen oder Fibrosen zu induzieren. Es gibt Zellen als ein Grundgerüst die Möglichkeit zum Einwachsen und wird vom

Körper vollständig resorbiert (Banerjee, 1960; Francis, 1993; Le Guehenec, 2004; Radosevich, 1997; Schense, 1999; Schmoekel, 2005; Sierra, 1993).

Nach dem Einbringen des Fibrinklebers in das Gewebe bindet dieser über kovalente Bindungen, Wasserstoffbrückenbindungen, elektrostatische Wechselwirkungen oder durch mechanische Verbindungen an seine Umgebung (Radosevich, 1997). Fibrin erfüllt somit die Funktionen einer haemostatischen Barriere sowie der Verbindung zum umgebenden Gewebe und dient weiterhin als Gerüst für einwandernde Fibroblasten (Dunn, 1999; Schlag G, 1986; Sierra, 1993). Die Eigenschaft des Fibrins, als natürliches Grundgerüst für die Befestigung und das Wachstum von Zellen zu dienen, machte man sich auch in Zellkulturmodellen zunutze (Koolwijk, 1996).

Auf natürliche Weise wird das Fibrinkoagel durch proteolytische Enzyme aus dem fibrinolytischen System wie Plasmin aufgelöst. Hohe Konzentrationen des Enzyms kommen als Antwort auf eine Entzündung im Gewebe vor (Le Guehenec, 2004). Plasminogen ist die inaktive Vorstufe des fibrinolytisch wirkenden Enzyms Plasmin. Plasminogen kommt im menschlichen Blut in Konzentrationen von 0,2 mg/ml vor. Die Aktivierung zu Plasmin erfolgt durch Spaltung des Plasminogens durch einen von vielen enzymatischen Aktivatoren. Endogene Aktivatoren sind Urokinase, tissue Plasminogen Activator (tPA), Faktor XII, Kininogene und Präkallikrein. Auch Plasmin selbst kann als Plasminogenaktivator wirken und eine autokatalytische Kettenreaktion verursachen. Plasmin kann auch gleich das Fibrinogen abbauen, so dass kein Fibrin mehr daraus entstehen kann. Exogene Aktivatoren für Plasminogen stellen Streptokinase und rekombinanter Gewebeplasminogenaktivator dar. Makrophagen, Fibroblasten und lokale neutrophile Granulozyten können auch proteolytische Enzyme bilden, die das Fibrinkoagel auflösen (Murphy, 1999; Sierra, 1993). Fibrin rekrutiert Zellen aus dem beschädigten Gewebe nach einem Trauma. Es emigrieren als erstes neutrophile Granulozyten, deren Anzahl sich in den ersten 48 Stunden nach dem Trauma noch erhöhen. Einige lösen durch proteolytische Enzyme das Fibrin auf, manche phagozytieren auch. Fibrindegredationsprodukte, entstanden durch proteolytische Spaltung des Fibrinkoagels, stimulieren dann die Migration von Monozyten, die sich anschließend in Makrophagen umwandeln und das degradierte Fibrin durch Phagozytose abbauen (Radosevich, 1997). Die Makrophagen regulieren zahlreiche Prozesse, wie die Koagulation und Fibrinolyse, die Elimination von Zellen, Gewebedebris und Bakterien sowie die Fibroblastenaktivität durch fibroblastäre Wachstumsfaktoren. Ihre Hauptaufgabe ist die Phagozytose von Fibrin und die Freisetzung von Wachstumsfaktoren, die die Fibroblasten und die endotheliale Zellproliferation stimulieren. Makrophagen sind demnach auch für die Angiogenese und Neovaskularisierung in der Wunde und die Stimulation der Kollagensynthese verantwortlich. Ohne die Makrophagen kommt es zu einer verzögerten Wundheilung, andererseits kann die verlängerte Aktivierung von Makrophagen zum Beispiel

durch Endotoxine oder Bakterien auch zu einer verstärkten Kollagensynthese und Fibrose des Gewebes führen (Schlag G, 1986). Fibrin, Makrophagen, Fibroblasten, Kollagen und Gefäße stellen dann das Granulationsgewebe dar (Dunn, 1999; Schlag G, 1986; Sierra, 1993).

In *in vitro* und *in vivo* Studien zeigte Fibrin auch alleine eine verstärkende Wirkung auf die Angiogenese (Dejana, 1987; Dejana, 1985; Dvorak, 1987; Olander, 1985; Takei, 1995).

Angewendet wurde Fibrin bereits auf zahlreichen Gebieten der Chirurgie, wo man sich vor allem seine Eigenschaften als Gewebekleber zu Nutze machte. In der kardiovaskulären Chirurgie zur Adhäsion von Gefäß- und Herzklappenprothesen oder zum Verschluss von erworbenen Ventrikel-Septum-Defekten (Haverich, 1981; Jonas, 1986; Seguin, 1992). In der Neurochirurgie wurde Fibrinkleber zur Verbindung von peripheren Nervensträngen nach deren Durchtrennung verwendet oder zum Verschluss von Verletzungen der Dura mater (Sierra, 1993). Sogar Nahtmaterial wurde mit Fibrin beschichtet (Haverich, 1981; Jonas, 1986; Wolner, 1982) oder der Fibrinkleber wurde über Nähte, Gefäß- und gastrointestinale Anastomosen aufgetragen (Baker, 1987). Nach Resektion von Organen oder Organteilen wie Lunge (Mouritzen, 1993), Milz (Kram, 1984; Scheele, 1984) Leber (Rodriguez Fuchs, 1987) und Niere (Msezane, 2008; Rouach, 2009; Seo, 2008; van Dijk, 2007) diente Fibrin zur Hämostase und zum verbesserten Verschluss.

Fibrinkleber wurde auch als Träger für Medikamenten und Antibiotika entdeckt (Greco, 1991; Miyamoto, 2004; Ney, 1990; Tredwell, 2006; Zilch, 1986). In einigen Studien konnte sogar gezeigt werden, dass Fibrin schon alleine einen bakteriziden Effekt aufweist (Dulchavsky, 1991; Jabs, 1992). Stanek und Mitarbeiter konnten nachweisen, dass sich Bakterien in einem Fibrinkoagel signifikant langsamer vermehren als in einem entsprechenden Blutkoagel (Stanek, 1978).

Auch zur Verbesserung der Frakturheilung fand Fibrin Anwendung. So wurde der Fibrinkleber zur Stabilisierung von osteochondralen Frakturen des Radiuskopfes und der Femurkondyle im Vergleich zu einer Stabilisierung durch Pins experimentell im Hund getestet. Dabei schien Fibrin die Knochenreparatur zu stimulieren und damit die Frakturheilung zu beschleunigen (Meyers, 1984).

Bösch und Mitarbeiter untersuchten die Knochenneubildung in kortikalen Defekten der Kaninchentibia nach Füllung mit heterologem und homologem Fibrinkleber. Homologes Fibrin beschleunigte die Einsprossung von Blutgefäßen und Bindegewebszellen und induzierte eine frühere Knochenneubildung und verstärkte die Umbauvorgänge an den Defekträndern. Heterologes Fibrin hemmte dagegen, vermutlich durch immunologische Prozesse, die Knochenneubildung im empfindlichen Kaninchenorganismus (Bosch, 1977). Immunologische Reaktionen im Kaninchen auf heterologes Fibrin konnten Banerjee und Mitarbeiter schon sehr früh beobachten (Banerjee, 1960).

Häufig wurde Fibrin dann auch mit Knochenersatzstoffmaterialien wie Hydroxyapatittrikalziumphosphat-Granulat oder Knochenchips gemischt und das Heilungsergebnis untersucht. Durch die Kombination dieses sonst nur schwer einzubringenden Materials mit Fibrin können Knochendefekt lückenlos ausgefüllt werden. Ein späteres Wiederherausfallen des Materials wird dadurch ebenfalls verhindert (Lack, 1987).

Ono und Mitarbeiter testeten Apatit-Wollastonit enthaltende Granula und Fibrin in einem experimentellen Tibia-Bohrdefektmodell an der Ratte. Die Auswertung erfolgte nach acht Wochen histologisch und histomorphometrisch für den Nachweis neu gebildeten Knochens und der Formation von Blutgefäßen. In der Gruppe, die Fibrin alleine in den Bohr-Defekt erhielt, zeigten sich eine stärkere frühe Vaskularisation und eine beschleunigter Reparaturprozess durch das Fibrin. Das Gemisch aus Fibrin und Granula war den Granula alleine verabreicht durch eine beschleunigte Knochenneubildung überlegen und wurde zur Verwendung als Knochendefektfüllung empfohlen (Ono, 1988). In einer Studie von Le Guehennec, in der ein Bohr-Defekt im medialen Kondylus des Kaninchens mit Fibrin und Hydroxyapatittrikalziumphosphat-Granulat gefüllt wurde, kam es zu Knochenbildung im Fibrin in geringem Abstand zu den Granula. Fibrin diente dabei als Matrix für die einwandernden Fibroblasten, die wiederum Kollagenfasern bildeten und als Scaffold für osteogene Zellen dienten (Le Guehennec, 2005). Bösch und Mitarbeiter untersuchten die Einheilung von heterologer Spongiosa am Kaninchendarmbein und deren Beeinflussung durch Fibrinkleber. Die ohne Fibrinkleber eingebrachte heterologe Spongiosa wurde vom Kaninchenorganismus mit Bindegewebe eingekapselt und anschließend abgebaut. Der Defekt wurde nur durch Bindegewebe verschlossen. Die zusätzliche Verwendung des Fibrinklebers erwies sich als überlegen, da die heterologe Spongiosa knöchern mit dem darunter liegenden Kaninchenknochen verbunden, im Anschluss abgebaut und durch lamellären Knochen ersetzt wurde (Bosch, 1980). Diese Ergebnisse konnten in einer klinischen Studien am Menschen bestätigt werden (Arbes, 1981).

In einem Mausmodell von Abiraman und Mitarbeitern konnten die osteoinduktiven Eigenschaften von Kalziumphosphatkalziumsilikat Granulat und bioaktivem Glasgranulat umhüllt mit Fibrinkleber nachgewiesen werden. Nach Implantation in einen Muskel der Maus wurde an dieser Stelle nach 28 Tagen Knochen gebildet (Abiraman, 2002).

Von Isogai und Mitarbeitern wurde der Fibrinkleber als Matrix für kultivierte, bovine Periostzellen verwendet. Sie verpflanzten das Material unter die Haut des Rückens von athymischen Nackmäusen. Zwölf Wochen nach Implantation konnte an dieser Stelle histologisch neu gebildeter Knochen nachgewiesen werden. Die Mischung aus Fibrin und Periostzellen induzierte demnach ektopische Knochenbildung in der Maus. Die Autoren empfehlen Fibrinkleber daher auch als Vehikel für Knochenzellen (Isogai, 2000).

Perka und Mitarbeiter gingen einen Schritt weiter und verpflanzten die Mischung aus Fibrin und Periostzellen in metaphysäre Defekte der Ulna von Kaninchen und konnten einen positiven Effekt auf die Knochenheilung feststellen (Perka, 2000). Allerdings zeigte sich bei Isogai und Mitarbeitern sowie bei Perka und Mitarbeitern keine Knochenbildung in der Gruppe, in der Fibrin alleine eingebracht wurde.

In einer experimentellen Studie von Pflüger soll Fibrin sogar die Knochenbildung um poröse Stahlimplantate im Kaninchendarmbein verbessern. Nach drei Wochen schien das Einwachsen von Knochen verbessert im Vergleich zu dem Implantat ohne Fibrin (Pflüger, 1979).

Auch an der Wirbelsäule fand der Fibrinkleber bereits Verwendung. Dabei wurde kontrovers über die Wirkung von Fibrin berichtet. Ono und Mitarbeiter setzten Fibrin gemischt mit feinen Knochenchips zur posterolateralen Fusion, zur anterioren Fusion und zur Füllung eines Knochendefektes beim Menschen ein. Nach sechs Wochen erfolgte die Auswertung mittels CT und lateralen Röntgenaufnahmen in Flexion und Extension zur Beurteilung des Verrutschens des Materials und der Stabilität des fusionierten Segmentes. Eine gute knöcherne Fusion ohne Verrutschen des Materials konnte im Nachuntersuchungszeitraum verzeichnet werden. Die Autoren konnten Fibrinkleber zur Verwendung und Fixierung von kleinen Knochensplittern, die ansonsten wandern und in das Rückenmark drücken könnten, ebenso wie zur Wirbelfusion empfehlen (Ono, 1988). Negativ bewertete dagegen Jarzem die Wirkung des Fibrinklebers zur Wirbelfusion. In einem Hundemodell zur beidseitigen posterolateralen Fusion des fünften und sechsten Lendenwirbels mittels allogenen Knochentransplantats wurde jeweils einseitig Fibrinkleber zugegeben. Nach sechs Monaten Standzeit ergab die computertomographische Auswertung ein signifikant niedrigeres Knochenvolumen auf der Seite, die zusätzlich Fibrinkleber erhielt. Somit schien Fibrin die Bildung von Fusionsmasse zu verzögern (Jarzem, 1996).

Auch Turgut und Mitarbeiter testeten die Auswirkung von Fibrinkleber (Tisseel®) zur Fixierung von allogenen kortiko-spongiösem Knochentransplantat zur anterioren, zervikalen, intervertebralen Spondylodese der Katzenhalswirbelsäule (C5-C6). Nach radiographischer, computertomographischer und histologischer Auswertung sechs Monate post OP zeigte sich, dass die Tiere mit Fibrinkleber im Vergleich zu den Kontrolltieren, die nur das Knochentransplantat erhielten, ein kleineres Volumen an Fusionsmasse, eine reduzierte Vaskularisierung des Gewebes und eine verminderte Knochenneubildung hatten. Die Autoren schlossen daraus, dass Fibrinkleber nicht für die Fixierung von Knochenfragmenten in der anterioren, cervicalen Wirbelfusion geeignet ist (Turgut, 1999).

Zárate-Kalfópulos und Mitarbeiter vermischten Fibrinkleber mit einem autologen Knochentransplantat zur Stabilisierung der posterolateralen Arthrodesen am fünften und sechsten Lendenwirbel des Kaninchens. Dabei wurde stets eine Seite mit Fibrinkleber und

autologem Knochentransplantat und die andere Seite nur mit autologem Knochentransplantat versorgt. Nach radiologischer, lichtmikroskopischer und manuellen Auswertung der Arthrodeese acht Wochen post OP hatte die Seite, bei der der autologe Knochen mit Fibrin vermischt wurde, eine signifikant niedrigere Fusionsrate als die Seite, bei der nur autologer Knochen eingesetzt wurde. Die Autoren konnten den Fibrinkleber zur Verstärkung der Arthrodeese nicht empfehlen (Zarate-Kalfopulos, 2007).

Um Fibrin als Matrix zur kovalente Bindung von verschiedenen Proteinen zu nutzen, wurde die Methode von Schense (Schense, 1999), wie bereits im Abschnitt 2.4.4 näher erläutert, angewandt. Zusätzlich zu der in dieser Arbeit und den dazu gehörenden Vorarbeiten beschriebenen Einbindung von Parathormon in die Fibrinmatrix existieren bereits Studien über die kovalente Bindung anderer bioaktiver Peptide in die Fibrinmatrix. Schense und Mitarbeiter vernetzten über den gleichen Mechanismus wie das Parathormon die neuroaktiven Proteine Laminin und N-Cadherin alleine und in Kombination in Konzentrationen von bis zu 8,2 Mol Peptid auf ein Mol Fibrinogen. Das Axonwachstum nach durchtrenntem Rückenmark konnte dadurch *in vitro* und *in vivo* im Rattenmodell verbessert werden (Schense, 2000). Durch das gleiche Verfahren wurde BMP-2 in die Fibrinmatrix gebunden und zur Verbesserung der interkarpalen Fusion im Hund, in einem kritischen Defektmodell in der Ratte und dem Kaninchen sowie in atrophen non-unions in Hunden und Katzen verwendet (Schmoekel, 2004; Schmoekel, 2005; Schmoekel, 2005; Schmoekel, 2004). In Studien von Sakiyama-Elbert und Mitarbeitern wurden Heparin-bindende Wachstumsfaktoren auf die gleiche Weise in die Fibrinmatrix gebunden, um so nur durch zelluläre Nachfrage freigesetzt zu werden. *In vitro* erfolgte die Anwendung zur Unterstützung der Nervenregeneration. Das Wachstum von Nervenfortsätzen im Zellkulturmodell aus embryonalen Hühnernervenzellganglien konnte zu 100 % im Vergleich zu normalem Fibrin gesteigert werden (Sakiyama-Elbert, 2000; Sakiyama, 1999).

Nebenwirkungen durch den Einsatz von Fibrin wurden insgesamt dabei nur sehr selten beschrieben (Albrektsson, 1982; Dunn, 1999). In jeweils einer Studie von Milde und Mitarbeitern und Berguer und Mitarbeitern wurde eine anaphylaktischen Reaktion nach intraoperativer Fibringabe beim Menschen beschrieben (Berguer, 1991; Milde, 1989). Rasodevich und Mitarbeiter berichteten über eine Antikörperentwicklung beim Menschen nach Gabe von Fibrinkleber, der bovines Thrombin enthielt (Radosevich, 1997).

## 2.5 Ziele und Hypothesen der Studie

Jahrzehnte lang war der autologe trikortikale Beckenkammspan zur ventralen intervertebralen Spondylodese der Halswirbelsäule das Implantat der Wahl. Durch die hohe Entnahmemorbidität, der Gefahr des Implantatversagens oder –verrutschens und daraus resultierenden kyphotischen Fehlstellungen der Halswirbelsäule wurde in den letzten Jahren immer häufiger der intervertebrale Cage als Abstandshalter verwendet. Dieser gibt vor allem initial eine hohe biomechanische Stabilität. Da autologe Knochenmaterialien stets einen zusätzlichen operativen Eingriff erfordern und nur limitiert verfügbar sind, ist man auf der Suche nach einem Material, das sowohl osteoinduktive als auch osteokonduktive Eigenschaften verbindet und dabei günstig und in unbegrenzter Menge und gleichbleibender Qualität verfügbar ist. Nach den vielversprechenden Ergebnissen aus dem systemischen Einsatz des Parathormons zur Osteoporosetherapie des Menschen und der experimentellen Knochenbruchheilung und Wirbelfusion soll nun der anabole Effekt des Parathormons auf den Knochenstoffwechsel auch in einem experimentellen Modell zur Wirbelfusion lokal angewendet werden. Durch die oben beschriebene neue Technologie kann das modifizierte Parathormon (1-34) in Fibrin als Carrier-System gebunden werden, so dass es nur am Ort der gewünschten Knochenneubildung wirkt. Eventuelle systemische Nebenwirkungen sollen somit vermieden werden.

Die Beurteilung des Heilungsergebnisses erfolgt dabei anhand von histomorphometrischen, immunhistochemischen und histomorphologischen Untersuchungen. Folgende Hypothesen sollen dabei überprüft werden:

- 1) Der lokale Einsatz von TgP<sub>1-34</sub> in einer Fibrinmatrix induziert durch seine osteoinduktiven und osteokonduktiven Eigenschaften Knochenneubildung an der Schafshalswirbelsäule.
- 2) Die Wirkung des lokal eingesetzten Parathormons zur Wirbelfusion des Schafes ist konzentrationsabhängig.
- 3) Durch den lokalen Einsatz des modifizierten Parathormons kommt es nach zwölf Wochen Standzeit zu einer kompletten knöchernen Fusion des dritten und vierten Schafshalswirbels.
- 4) Im Vergleich zu der Gruppe, die autologe Spongiosa aus dem Beckenkamm erhalten hat, liefert Parathormon bessere oder vergleichbare Ergebnisse.
- 5) Das Fibrinmaterial bovinen Ursprungs mit kovalent gebundenem PTH<sub>1-34</sub> verursacht lokale Entzündungsreaktionen im ovinen Organismus.

## **3 Material und Methoden**

### **3.1 Versuchstiere**

Nach Genehmigung der Versuchstiere durch das Landesamt für Arbeitsschutz, Gesundheitsschutz und technische Sicherheit Berlin (Genehmigungsnummer G0331/06) wurden für diesen Versuch 48 Merino-Mix Schafe verwendet. Da in der Nähe von Berlin kein Zuchtbetrieb von Schafen für Versuchszwecke existierte, konnte nur auf Tiere aus einer kommerziellen Schäferei zurückgegriffen werden. Dabei handelte es sich ausschließlich um Schafe der Rassen Merino x Schwarzköpfiges Fleischschaf. Die Tiere waren alle weiblich und über zwei Jahre alt. Zur Altersbestimmung wurden die Zähne verwendet, wobei alle drei Schneidezähne des Unterkiefers beidseitig gewechselt haben mussten. Das Körpergewicht betrug zwischen 65 und 85 kg.

#### **3.1.1 Haltung und Fütterung**

Die Tiere wurden in einem bei 20 °C klimatisierten Schafstall der Tierexperimentellen Einrichtung der Charité-Campus Virchow Klinikum, Augustenburger Platz 1, 13353 Berlin, gehalten. Die Ausläuffläche betrug 38 m<sup>2</sup>. Auf dieser Fläche wurden maximal 25 Schafe gehalten.

Die Einstallung erfolgte in Gruppen zu acht Tieren, jeweils mindestens eine Woche vor der Operation des ersten Tieres. Dadurch wurde den Tieren genug Zeit zur Eingewöhnung in die neue Umgebung gegeben.

Die Tiere wurden am Vortag der Operation zum letzten Mal um 14 Uhr mit Heu gefüttert, was einer Nahrungskarenz von ca. 12 bis 16 Stunden entsprach. Wasser stand ihnen während dieser Zeit weiterhin ad libitum zur Verfügung. Eine vollständige Nüchternheit der Schafe konnte so nicht gewährleistet werden und war in Anbetracht der ständigen Füllung des Wiederkäuermagens mit Futter auch nicht erwünscht. Es sollte lediglich einer zu starken Füllung und damit der Gefahr einer Pansentympanie während der Operation vorgebeugt werden.

### 3.1.2 Gruppeneinteilung

Die Tiere wurden in 6 Gruppen zu acht Schafen eingeteilt. Dabei wurden vier Versuchsgruppen mit vier verschiedenen Konzentrationen des modifizierten Parathormons<sub>1-34</sub> gebunden in einer Fibrinmatrix, operiert. Eine weitere Gruppe wurde als Materialkontrolle verwendet, in der nur die Fibrinmatrix allein Anwendung fand. Als Positivkontrolle diente eine Gruppe, bei der autologe Spongiosa aus dem Beckenkamm entnommen und in den Cage gefüllt wurde (Tab. 1).

| Gruppe                        | Cage                   | PTH <sub>1-34</sub> -<br>Konzentration | Fibrinmatrix | Autologe<br>Spongiosa | Anzahl<br>Tiere |
|-------------------------------|------------------------|--|--------------|-----------------------|-----------------|
| 1<br>(Positiv-<br>Kontrolle)  | SynCage-C <sup>®</sup> |  |              | X                     | 8               |
| 2<br>(Material-<br>Kontrolle) | SynCage-C <sup>®</sup> |  | X            |                       | 8               |
| 3                             | SynCage-C <sup>®</sup> | 0,2 mg/ml                              | X            |                       | 8               |
| 4                             | SynCage-C <sup>®</sup> | 0,4 mg/ml                              | X            |                       | 8               |
| 5                             | SynCage-C <sup>®</sup> | 0,7 mg/ml                              | X            |                       | 8               |
| 6                             | SynCage-C <sup>®</sup> | 1,0 mg/ml                              | X            |                       | 8               |

Tabelle 1: Gruppenplan

## 3.2 Operatives Vorgehen und Materialeinsatz

### 3.2.1 Narkose und Operationsvorbereitung

Die Schafe wurden zur Narkoseeinleitung durch zwei Personen fixiert. Über eine Venenverweilkanüle (Größe 1.3 x 45 mm, 18 GA, BD Venflon<sup>™</sup> Pro, Becton Dickinson Therapy, Helsingborg, Schweden) in der V. cephalica der linken Vordergliedmaße wurde je nach Körpergewicht und Wirkung 0,5 bis 1,5 mg Thiopental- Natrium (Trapanal<sup>®</sup> Altana Pharma GmbH, Konstanz, Deutschland) verabreicht. Mittels eines Kaltlicht- Laryngoskops (Laryngoskopgriff Mc. Intosh, Freiburger Model, Sonderlaryngoskopspatel Modell Foregger 30 cm für Tiere, RGQ, Tuttlingen, Deutschland) und einem 9 mm starken Tubus (Hi-

Contour™, 9,0 mm Breite, 33 mm Länge, Mallinckrodt Medical, Athlone, Ireland) wurden die Schafe intubiert. Die korrekte, tracheale Lage des Tubus wurde durch Druck auf den Brustkorb überprüft. Im Anschluss wurde der Cuff mit ca. 16-18 ml Luft geblockt und mittels Klebeband (Leukoplast®, 1,25 cm Breite, BSN medical GmbH & Co. KG, Hamburg, Germany) im linken Maulwinkel fixiert. Zwischen Tubus und Beatmungsschläuche wurde ein Klimatisierungsfilter geschlossen (Pall Ultipor 25, Pall GmbH, Dreieich, Deutschland). Die Narkose wurde per Inhalation aufrechterhalten (Inhalationsnarkosegerät Sulla 800V, Drägerwerk AG, Lübeck, Deutschland bzw. Inhalationsnarkosegerät (Ventilator 711, Siemens, Berlin, Deutschland) angeschlossen. Die kontrollierte Beatmung der Tiere erfolgte mit einem Gemisch aus Sauerstoff (ca. 50 % medizinischer Sauerstoff, O<sub>2</sub> Linde® Gas Therapeutics GmbH & Co. KG, Unterschleißheim, Deutschland) und Narkosegas (ca. 50 % medizinisches Lachgas N<sub>2</sub>O, O<sub>2</sub> Linde® Gas Therapeutics GmbH & Co. KG, Unterschleißheim, Deutschland sowie 1,5 - 2 % Isofluran, Forene®, Abbott GmbH & Co. KG, Wiesbaden, Deutschland) mit einem Atemzugvolumen von 10 - 15 ml/kg Körpergewicht und 12 - 20 Atemzügen pro Minute (Verhältnis In- und Expiration 1:2). Zur Narkoseüberwachung wurden Kohlenstoffdioxid, Sauerstoff, Lachgas und Isofluran ständig in der In- und Expirationsluft gemessen (Monitor Caphomac, Datex Instrumentarium Corp., Helsinki, Finnland bzw. Monitor NGM 1000, Stephan, Gackebach, Deutschland). Die Herzaktivität wurde über die bipolare Extremitätenableitung nach Einthoven I überwacht. Der Blutdruck wurde unblutig über eine Blutdruckmanschette an der linken Hintergliedmaße gemessen (Arteria digitalis plantaris communis IV). Mit Hilfe einer Infrarotsonde wurde zusätzlich die Sauerstoffsättigung des Blutes am linken Ohr gemessen. Um während der Narkose anfallendes Pansengas abzuleiten, wurde eine Magensonde (Willy Rüscher AG, Deutschland, Durchmesser 14 mm) bis in den Pansen gelegt. Zur kontrazeptiven Behandlung der Tiere wurden jedem Tier 2 ml Estrumate® (Cloprostenol-Natriumsalz, Essex Tierarzneimittel, München, Deutschland) s.c. in die seitlichen Brustwand verabreicht. Die Kornea und Augenschleimhäute wurden durch die Applikation von Bepanthen® Augen- und Nasensalbe (Dexpanthenol, Bayer HealthCare, Leverkusen, Deutschland) vor dem Austrocknen geschützt.

Das Operationsfeld an der linken Halsseite wurde geschoren (Favorita II, Aesculap AG & Co. KG, Tuttlingen, Deutschland), rasiert und mittels Sauger von Schmutz befreit. Die Klauen wurden zur Infektionsprophylaxe geschnitten (Klauenschere Felco GmbH, Freiberg, Deutschland), desinfiziert (OTC- Blauspray, WDT, Garbsen, Deutschland oder Nekrotan®-Lösung, Serumwerk Bernburg AG, Bernburg, Deutschland), abgedeckt und am OP-Tisch fixiert (Mullbinde, Temedia GmbH, Schönbach, Deutschland).

Jedes Tier erhielt zur antibiotischen Prophylaxe 3 g Ampicillin-Natrium und Sulbactam-Natrium als Bolus i.v. (Unacid®, Pfizer Pharma GmbH, Karlsruhe, Deutschland). Zur

Kreislaufstabilisierung und zum Ausgleich des Flüssigkeitshaushalts wurde jedes Tier zusätzlich mit 1000 ml einer kristalloiden Infusionlösung (Jonosteril<sup>®</sup>, Fresenius Kabi, Bad Homburg v.d.H., Deutschland) während der gesamten Narkose infundiert.



Abbildung 2: Narkose- und Überwachungseinheit

Die Tiere wurden mit Kissen und Nackenstütze auf dem OP-Tisch gelagert und mittels Gurten fixiert. Im Anschluss erfolgte die Reinigung des Operationsfeldes mittels Jodlösung Braunoderm<sup>®</sup> (Polividon-Iod, B.Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland), die sterile Abdeckung des Tieres mit Operationstüchern (Chirurgisches Basispaket, Steri- Drape<sup>™</sup>, Firma 3M Health Care, Neuss, Germany) welche mittels Mersilene<sup>®</sup>- Faden (FSL 30 mm, 3/8 Nadel, Ethicon GmbH, Norderstedt, Deutschland) an der Haut befestigt wurden (Abb. 2-4).



Abbildung 3: Zur Operation vorbereitetes Schaf



Abbildung 4: Operationsfeld nach steriler Abdeckung und Desinfektion

### 3.2.2 Diskektomie

Zur Analgesie erhielt das Tier 2 ml Fentanyl®- Janssen 0,5 mg (Janssen–Cilag GmbH, Neuss, Deutschland) im Bolus i.v. Weitere Gaben erfolgten alle 30 Minuten bzw. nach Anstieg der Herzfrequenz und zur Vertiefung der Narkose. Der ventrale Zugang zur Halswirbelsäule erfolgte durch einen 12-15 cm langen Hautschnitt entlang des Vorderrandes des M. sternocleidomastoideus (21er Klinge, FEATHER SAFETY RAZOR Co., LTD, Osaka, Japan) (Abb. 5).



Abbildung 5: Operationssitus nach dem Hautschnitt

Die Blutstillung erfolgte durch einen Elektrokauter. Die Haut wurde mittels zweier scharfer Wundhaken nach Volkmann aus dem Operationsfeld gehalten. Der M. sternocleidomastoideus wurde freipräpariert und anschließend mit Wundhaken nach Langenbeck nach dorsolateral retrahiert. Es folgte die stumpfe Präparation bis auf die autochthone Wirbelsäulenmuskulatur unter Schonung von Trachea, Oesophagus, Truncus Vagosympathicus, Vena jugularis und Arteria carotis.

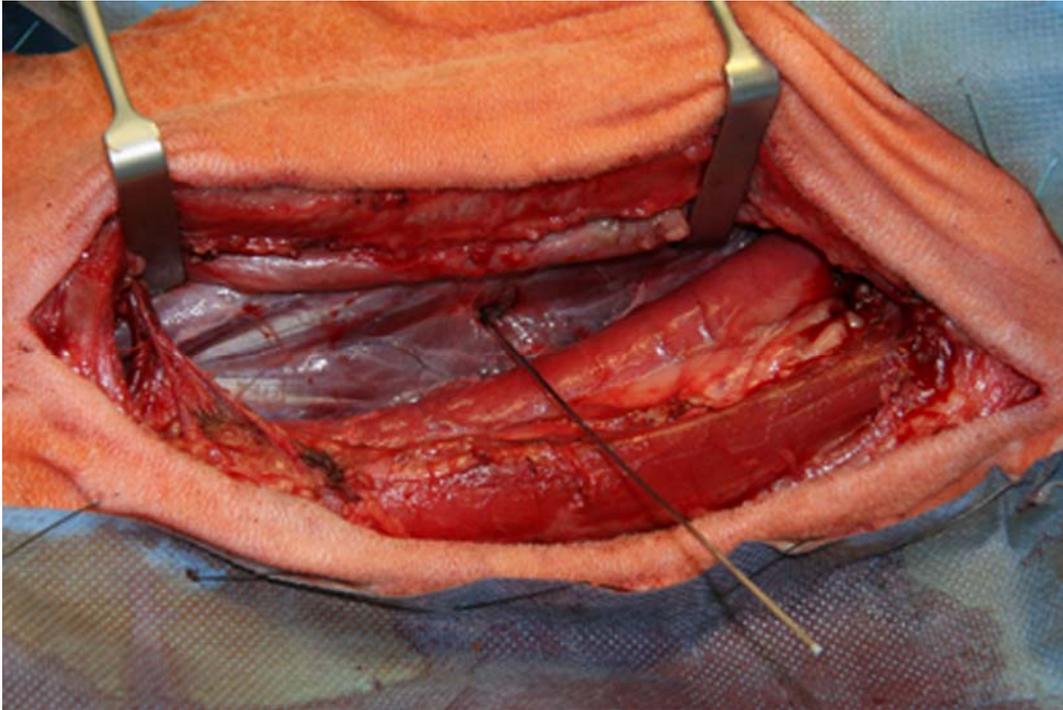


Abbildung 6: Markierung des Bandscheibenfaches mittels Kirschner-Bohrdraht

Das Bandscheibenfach zwischen dem dritten und vierten Halswirbels wurde mit Hilfe eines Kirschner-Bohrdrahtes markiert und anschließend die korrekte Lage durch einen Bildwandler (SIREMOBIL Iso-C 3D, Siemens AG, Erlangen, Deutschland) kontrolliert (Abb. 6 und 7).



Abbildung 7: Bildwandleraufnahme zur Identifizierung des Bandscheibenfaches zwischen C3 und C4

Der ventral vor dem Bandscheibenfach befindliche M. longus colli wurde mittels eines Elektrokautermessers in seiner Längsachse gespalten und das vordere Längsband (Ligamentum longitudinale ventrale) dargestellt (Abb. 8).



Abbildung 8: Durchtrennen des M.longus colli

Dieses wurde ebenfalls durchtrennt und die Bandscheibe inzidiert (Klinge 11, FEATHER SAFETY RAZOR Co., LTD, Osaka, Japan). Mittels Hohlmeißelzange nach Luer, scharfem Löffel und Kürette nach Buck wurde die Bandscheibe komplett entfernt (Abb. 9).

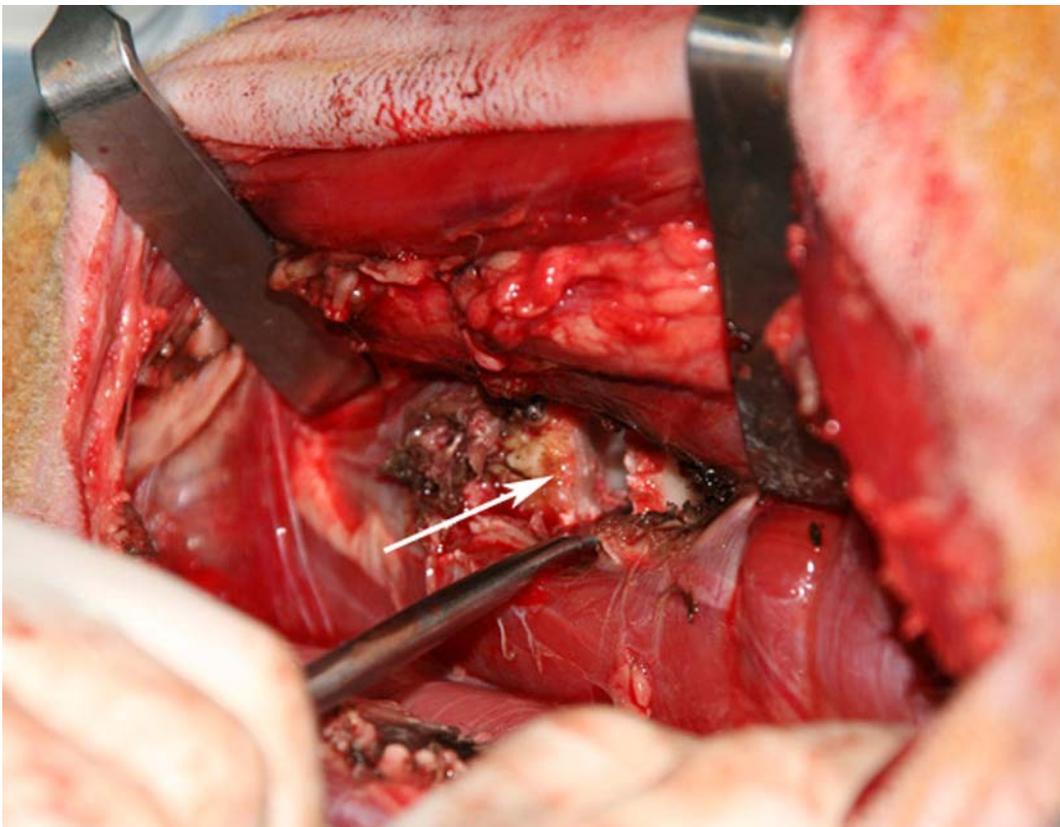


Abbildung 9: Eröffnetes Bandscheibenfach (Pfeil)

Das Bandscheibenfach wurde mit steriler 0,9 % Natriumchloridlösung (Plastipur<sup>®</sup>, Fresenius SE, Bad Homburg, Deutschland) und Operationssauger (Operationssauger TWISTA P1050, MEDAP Josef Gesson GmbH, Feldkirch, Deutschland, Vacufix<sup>®</sup>, Verbindungsschlauch, B.Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland, OP-Sauger- Aufsatz fein, TYCO Healthcare, Tullamore, Irland) gespült.

### 3.2.3 Materialvorbereitung

Das Fibrin der Firma Baxter<sup>®</sup> (Baxter<sup>®</sup> Deutschland GmbH, Unterschleißheim, Deutschland) lag in seinen Komponenten Fibrinogen und Thrombin zunächst getrennt bei -15°C in gefrorenem Zustand vor.



Abbildung 10: Material-Kit

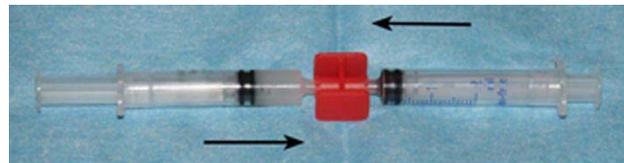


Abbildung 11: Mischung des Materials

Fibrinogen und Thrombin befanden sich in jeweils einer zwei und fünf ml Spritze, die jeweils mit 0,5 ml und 1,5 ml Fibrinogen bzw. Thrombin gefüllt waren (Abb. 10). Das modifizierte Parathormon<sub>1-34</sub> befand sich in der Fibrinogen-Komponente. Dabei waren je nach Versuchsgruppe 0,2, 0,4, 0,7 und 1,0 mg PTH<sub>1-34</sub> pro Milliliter Fibrin enthalten. Am Tag der Operation wurden die Spritzen in einem Brutschrank vorsichtig aufgetaut und bis auf 37°C erwärmt, da das Material bei dieser Temperatur optimal koaguliert. Danach konnten Fibrinogen und Thrombin bei Raumtemperatur bis zur Anmischung gelagert werden. Die Mischung und Verwendung des Fibrins erfolgte dann in zwei Schritten, da der Cage und das restliche Bandscheibenfach separat gefüllt wurden (Abb. 11).

### 3.2.4 Cageaugmentierung

Zur Füllung des SynCage-C<sup>®</sup> (SynCage-C, gewölbt, Größe 7,0, blau, Synthes Mathys Medical Ltd., Bettlach, Switzerland) wurde der Inhalt der beiden zwei ml Spritzen mit Hilfe eines Konnektors vermischt. Die Flüssigkeiten wurden dabei standardisiert fünfmal von einer Spritze in die andere bewegt (Abb.11). Nach 60-90 Sekunden war das bei diesem Verfahren entstandene Fibrin vollständig koaguliert und hatte eine pastöse Konsistenz erreicht. 0,5 ml des so angemischten Fibrins wurden in den SynCage-C<sup>®</sup> gefüllt (Abb.12).



Abbildung 12: Cage mit Fibrinmatrix gefüllt

### 3.2.5 Implantat und Einsetzen des Implantates

Durch ein Raspatorium wurde das Bandscheibenfach aufgespannt und der mit Fibrin augmentierte SynCage-C<sup>®</sup> mittels des SynCage-C<sup>®</sup>-Implantatgreifers und eines Hammers in das Bandscheibenfach mittig und ca. 3 mm hinter der Vorderkante der Wirbelkörperendplatte platziert (Abb. 13 u.14). Bei dem verwendeten Cage handelte es sich um einen kommerziell erhältlichen Titan Cage (SynCage-C, gewölbt, Größe 7,0, blau, Synthes Mathys Medical Ltd., Bettlach, Switzerland), der zur intervertebralen Stabilisierung von Wirbelkörpern zugelassen ist. In diesem Versuch wurde stets eine Höhe von sieben Millimetern verwendet, da dieser optimal an die Höhe des Bandscheibenfaches angepasst war und von der Arbeitsgruppe bereits erfolgreich im Schaf getestet wurde. Es handelt sich dabei um eine Cage vom Boxdesign, dessen nach kranial zeigende Seite konvex gewölbt war. Ober- und Unterseite des Cages waren zur besseren Verankerung im Bandscheibenfach mit mehreren Spikes besetzt.

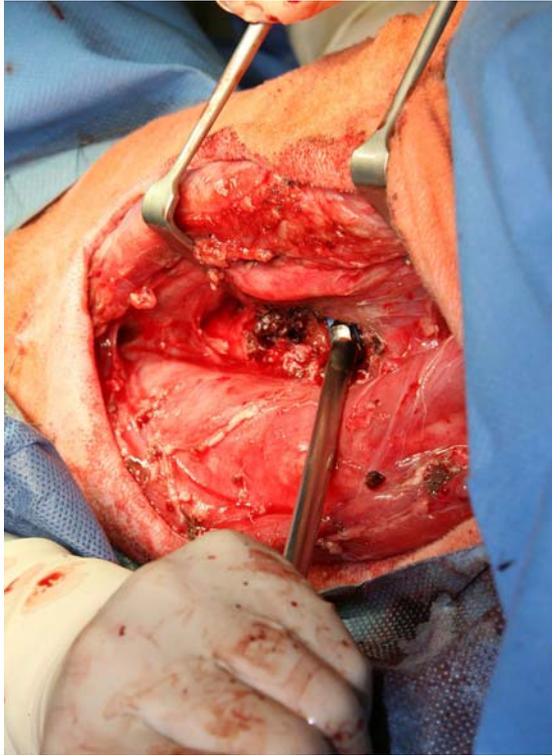


Abbildung 13: Einsetzen des Cages

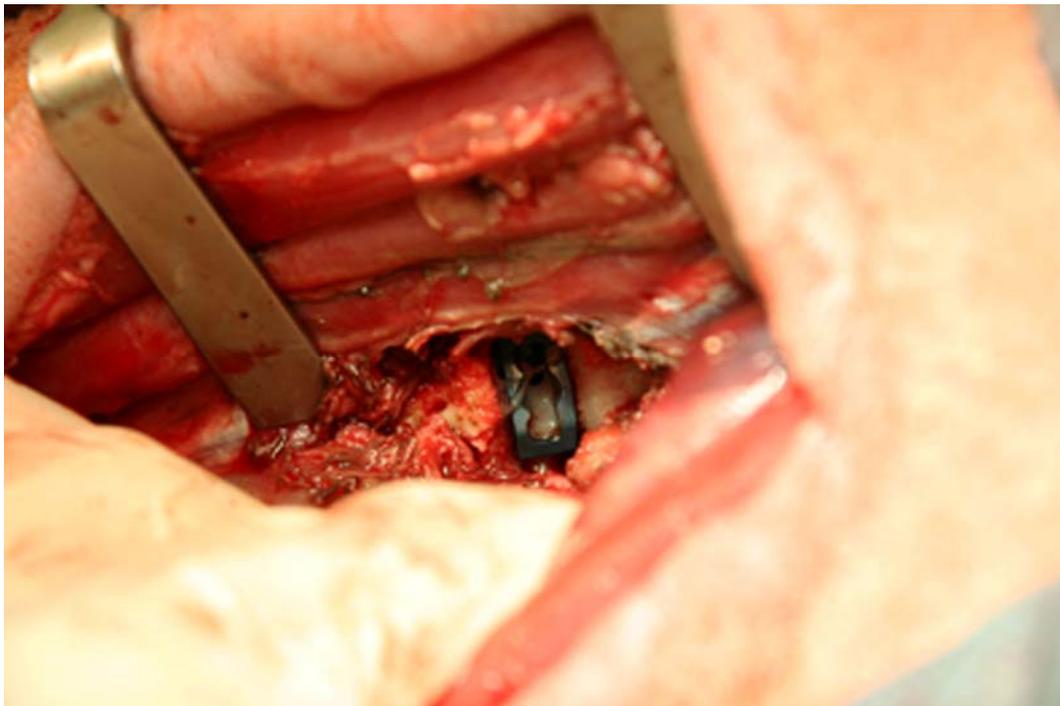


Abbildung 14: In korrekter Lage eingebrachter Cage

Als Orientierungshilfe für die richtige, mittige Position des Cages im Bandscheibenfach wurde die Crista ventralis des dritten und vierten Wirbelkörpers verwendet. Durch die Verwendung des Bildwandlers (Abb. 15) konnte die richtige Position des SynCage-C<sup>®</sup> im Bandscheibenfach kontrolliert werden. Deck- und Bodenplatte des dritten und vierten Halswirbels sollten dabei mit den Wänden des SynCage-C<sup>®</sup> direkten Abschluss finden.

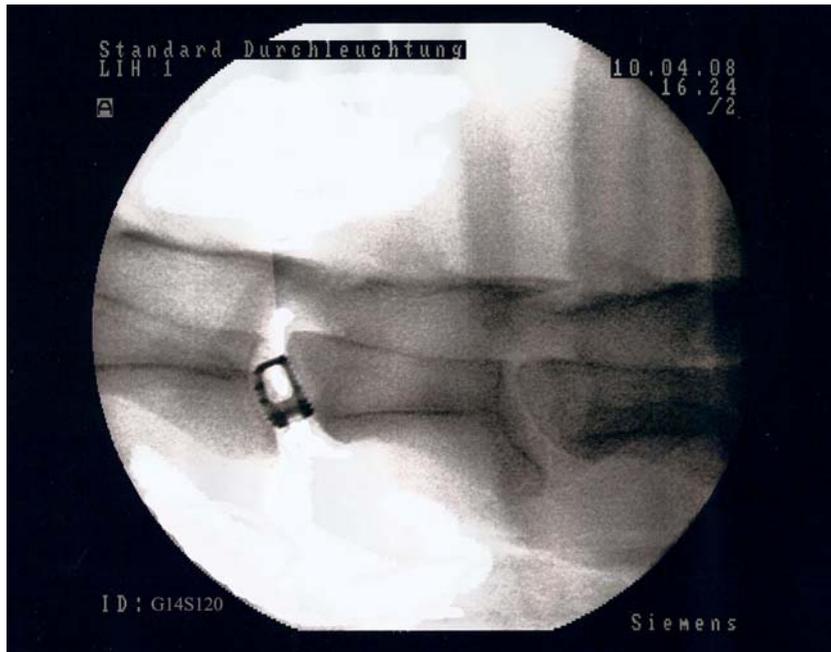


Abbildung 15: Bildwanderaufnahme nach Cageeinsatz

Durch die Zähne des Cages an seiner Oberfläche wurden in Deck- und Bodenplatte beim Einsetzen des Cages Furchen aufgerissen, so dass es zu kleinen Blutungen kam. Die für die Spondylodese wichtige Vaskularisierung des Bandscheibenraumes wurde so aus den angrenzenden Wirbelkörpern gewährleistet.

### **3.2.6 Augmentierung des restlichen Bandscheibenfaches**

Zur Augmentierung des restlichen Bandscheibenfaches erfolgte die Mischung von Fibrinogen und Thrombin in den fünf ml Spritzen in gleicher Weise wie in Kapitel 3.2.4 beschrieben. Fibrin wurde dabei ventral sowie lateral im Bandscheibenfach um den SynCage-C<sup>®</sup> platziert (Abb.16).

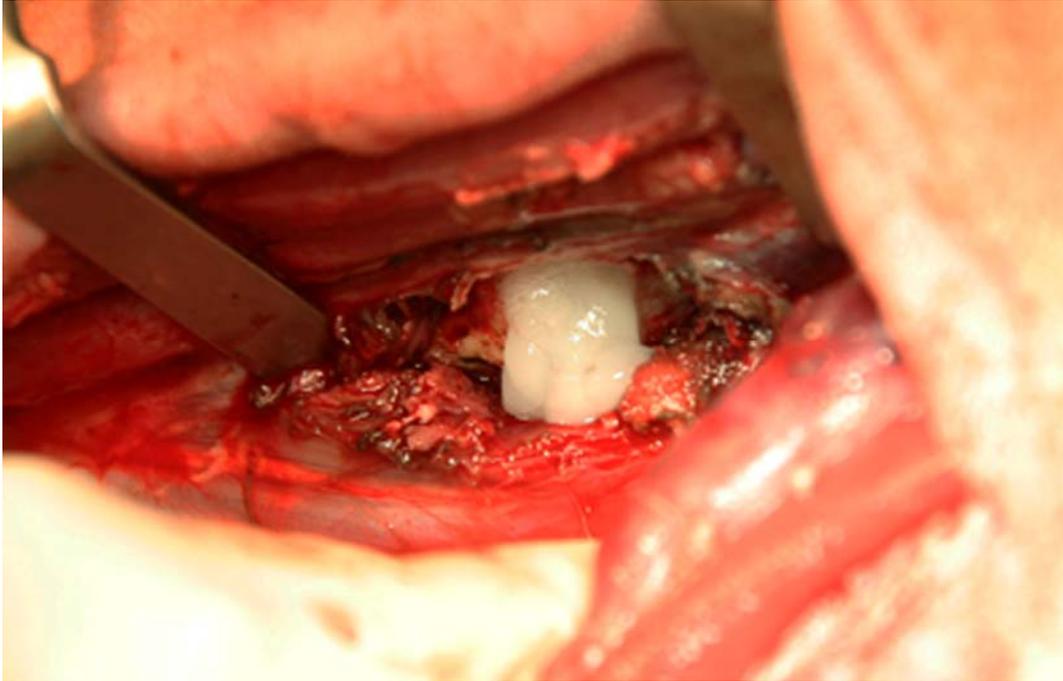


Abbildung 16: Mit Fibrinpaste gefülltes Bandscheibenfach

### 3.2.7 Operativer Wundverschluss

Die ventrale, autochthone Wirbelsäulenmuskulatur wurde mittels VICRYL Plus 1 Faden (Sultansche Diagonalnaht; Polyglactin, Johnson & Johnson Intl., St- Stevens- Wolwe, Belgium) verschlossen. Die Wundhöhle wurde mittels steriler 0,9 % Natriumchlorid Lösung gespült. Es erfolgte ein schichtweiser Wundverschluss. Der M. sternocleidomastoideus wurde nach Rückverlagerung an seine alte Position mit dem M. sternohyoideus und dessen Faszie vernäht (Kirschnernaht; VICRYL Plus 2-0, Polyglactin, Johnson & Johnson Intl., St- Stevens- Wolwe, Belgium). Anschließend erfolgte der Verschluss von Unterhaut (Kirschnernaht; VICRYL Plus 3-0, Polyglactin, Johnson & Johnson Intl., St- Stevens- Wolwe, Belgium) und Haut (U-Hefte; Prolene 3-0, Ethicon GmbH, Norderstedt, Deutschland). Die Haut wurde gereinigt, desinfiziert und als letzte Schicht ein Plasterspary aufgetragen.

### 3.2.8 Spongiosaentnahme

In Versuchsgruppe 1 wurde als Positivkontrolle autologe Spongiosa aus dem Beckenkamm entnommen und der Cage sowie das Bandscheibenfach mit einer äquivalenten Menge im Vergleich zum Fibrin gefüllt. Hierzu wurde nach der Diskektomie am Beckenkamm des linken Hüfthöckers ein zusätzlicher Eingriff vorgenommen. Über einen 5 cm langen Hautschnitt wurde die Crista iliaca frei präpariert (Abb.17).



Abbildung 17: Freipräparierter Beckenkamm

Die lateral ansetzende Muskulatur wurde mit einem Kauter auf einer Länge von 1,5 cm vom Knochen abgelöst um stärkere Blutungen zu vermeiden. Der Beckenkamm wurde mittels Hammer und Meißel kortikal gefenstert (Länge 2 cm x Breite 1 cm) (Abb.18 u. 19).

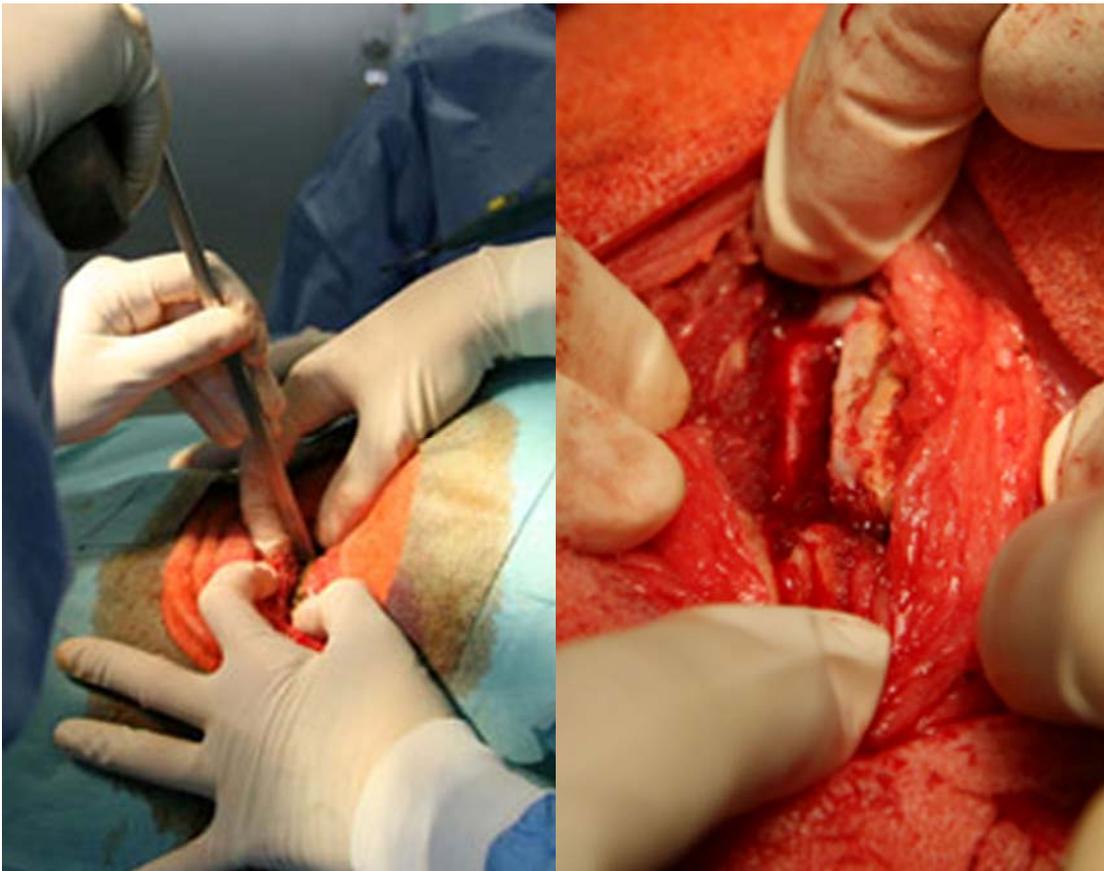


Abbildung 18 + 19: Eröffnung des Beckenkamms

Mit einem scharfen Löffel wurde eine äquivalente Menge an Spongiosa im Vergleich zum sonst eingebrachten Fibrin gewonnen und bis zur Implantation in das Bandscheibenfach mit steriler 0,9 % Natriumchlorid Lösung feucht gehalten (Abb.20).

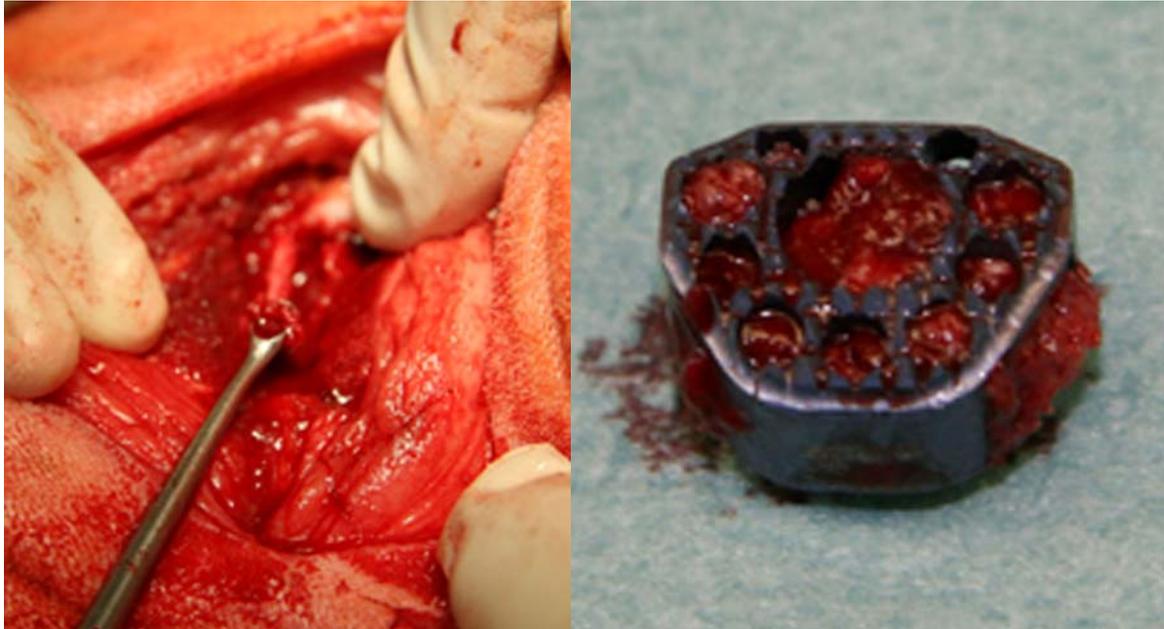


Abbildung 20 + 21: Entnahme der Spongiosa und Cageaugmentierung

Zum Wundverschluss wurde die gelöste Kortikalis zurückverlagert und mittels Nähten in der Ausgangsposition fixiert (Einzelhefte; VICRYL Plus 1, Polyglactin, Johnson & Johnson Intl., St- Stevens- Wolwe, Belgium) (Abb.22 u. 23).

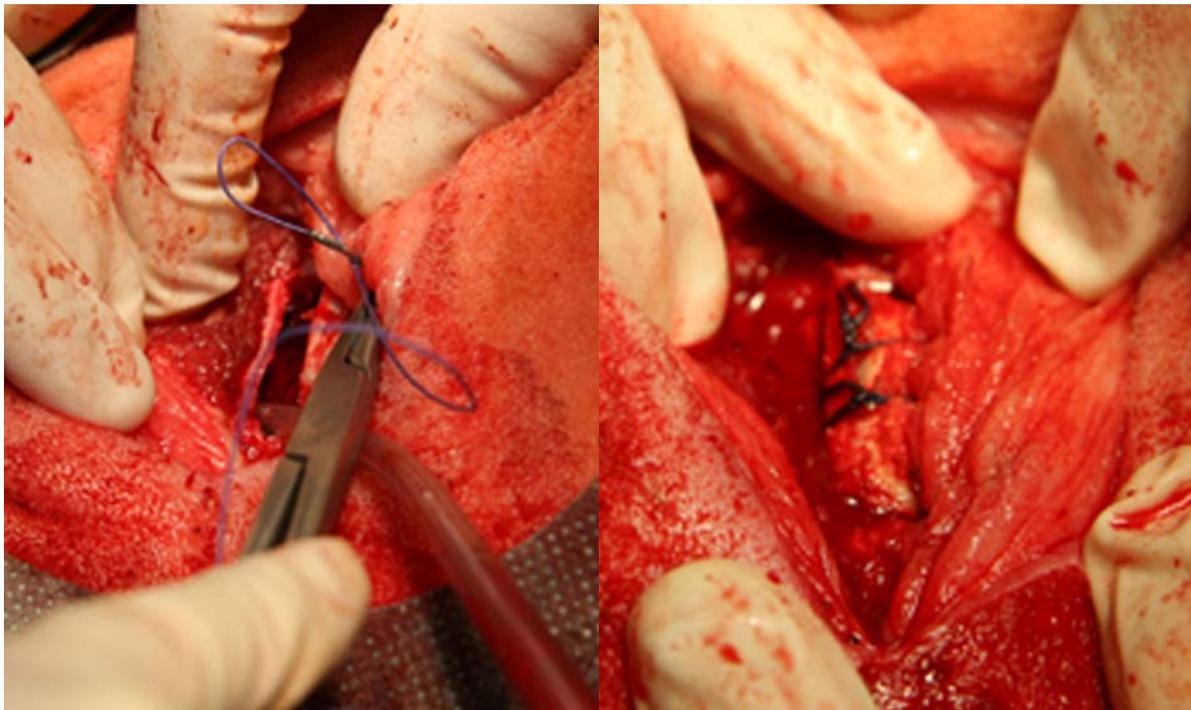


Abbildung 22 + 23: Verschluss des Beckenkamms

Es folgte ein schichtweiser Wundverschluss von Bindegewebe, Unterhaut und Haut wie bereits unter 3.2.7 beschrieben. Anschließend wurde die Haut gereinigt und desinfiziert sowie ein Pflasterspray aufgetragen (Abb. 24).



Abbildung 24: Wundverschluss

### **3.2.9 Narkoseausleitung**

Zur Narkoseausleitung wurde das Tier ausschließlich mit reinem Sauerstoff beatmet. Um die während der Narkose gebildeten Pansengase besser ablassen zu können, wurde das Tier in Brust- Bauchlage verbracht und durch leichten Druck auf den Pansen sämtlich Pansengase über die Magensonde abgelassen. Anschließend wurde die Sonde und der venöse Zugang entfernt. Die postoperative Analgesie erfolgte mittels Fentanyl- Pflaster (Durogesic® SMAT, 75 µg/ h, Janssen- Cilag GmbH, Neuss, Deutschland). Im Stall wurde der Tubus bei stabiler Atmung entfernt.

### **3.2.10 Postoperative Nachsorge**

In den folgenden sieben Tagen wurde täglich das Allgemeinbefinden des Tieres überprüft und die Wundnaht auf Serombildung oder Schwellungen kontrolliert. 10 Tage nach der Operation wurden die Fäden mit Hilfe eines Fadenziehmessers entfernt. In den darauf folgenden Tagen erfolgte der Transport auf die LGF- Versuchsstation Nutztierwissenschaft, Lentzeallee 75 in 14195 Berlin. Dort wurden die Tiere im Winter in einem Tiefstreustall gehalten und im Sommer auf der Weide. Ein Rücktransport in die Tierexperimentelle Einrichtung des Virchow-Klinikums erfolgte nach 8 Wochen zur Anfertigung eines Kontrollröntgenbildes. Die Schafe wurden dazu in Kurznarkose gelegt. Über einen venösen Zugang wurden den Tieren nach Körpergewicht und Wirkung 0,5 – 1,5 mg Thiopental-



### 3.3 Aufarbeitung der Wirbelsäulen für die histologische Auswertung

#### 3.3.1 Fixierung und Sägen der Präparate

Um die sofort nach der Entnahme einsetzende Autolyse aufzuhalten, wurden die Wirbelkörper für einen Tag in isotoner Formaldehyd- Alkohol- Lösung (Zusammensetzung: 324 ml 34 %iges Formol, 540 ml 100 %iges Ethanol, 130 ml 0,1 molarer Barbitol- Natrium- Puffer, pH von 7,4 und 6g Glukose) fixiert. Damit die Fixierlösung die Präparat besser durchdringen konnte, wurden die Wirbelkörper am nächsten Tag mit einer wassergekühlten Säge (Makrotrennschleifsystem, Exakt, Norderstedt, Deutschland) in 4 mm breite Scheiben gesägt. Die Sägeschnitte verliefen sagittal von kranial nach kaudal. Dabei wurde der erste Sägeschnitt orientiert an der Crista ventralis des dritten Halswirbels direkt in der Mitte angesetzt. Danach erfolgten die Schnitte in 4 mm Abstand zu diesem jeweils nach rechts oder links lateral (Abb. 26-28).

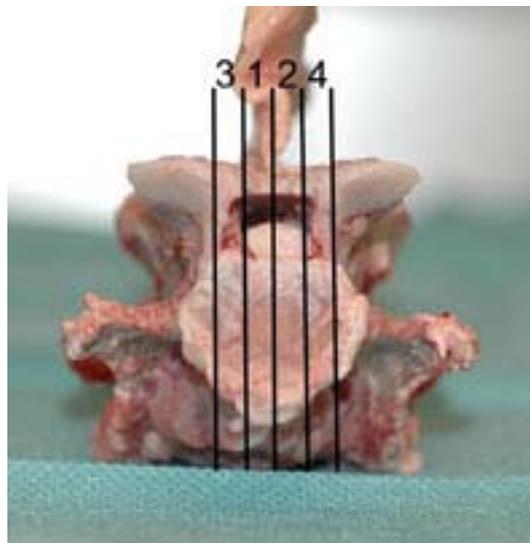


Abbildung 26: Sägemaßstab mit Schnittbezeichnung

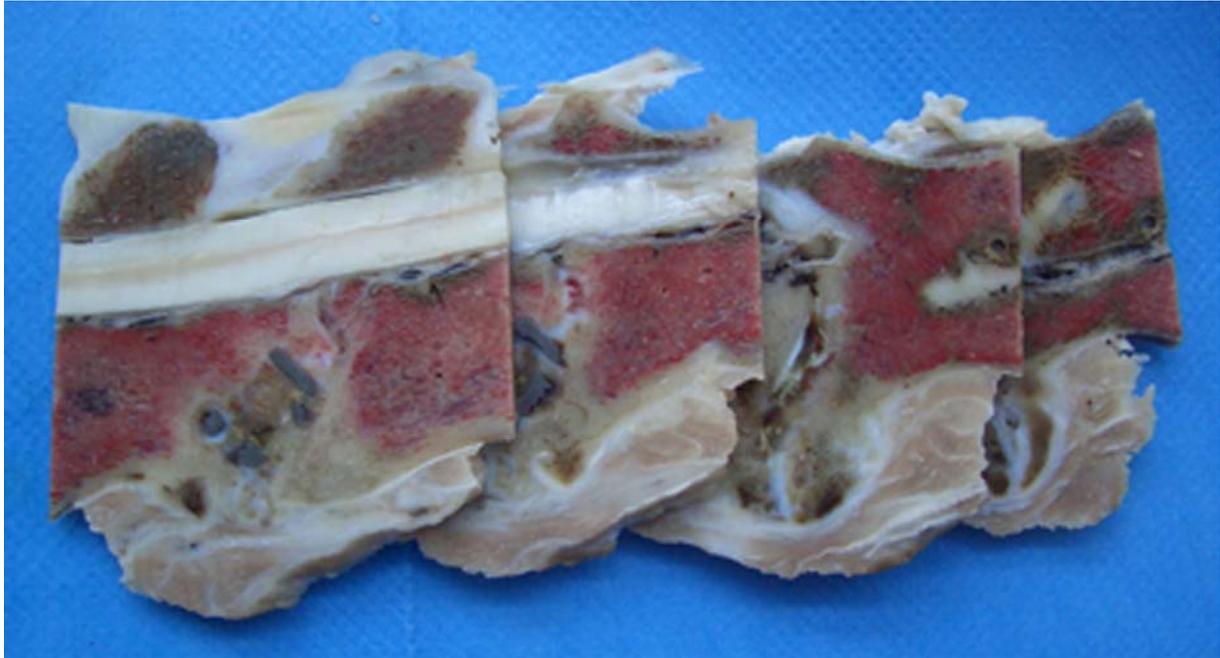


Abbildung 27: Wirbelsäulensegment nach dem Sägen in 4 mm dicke Scheiben

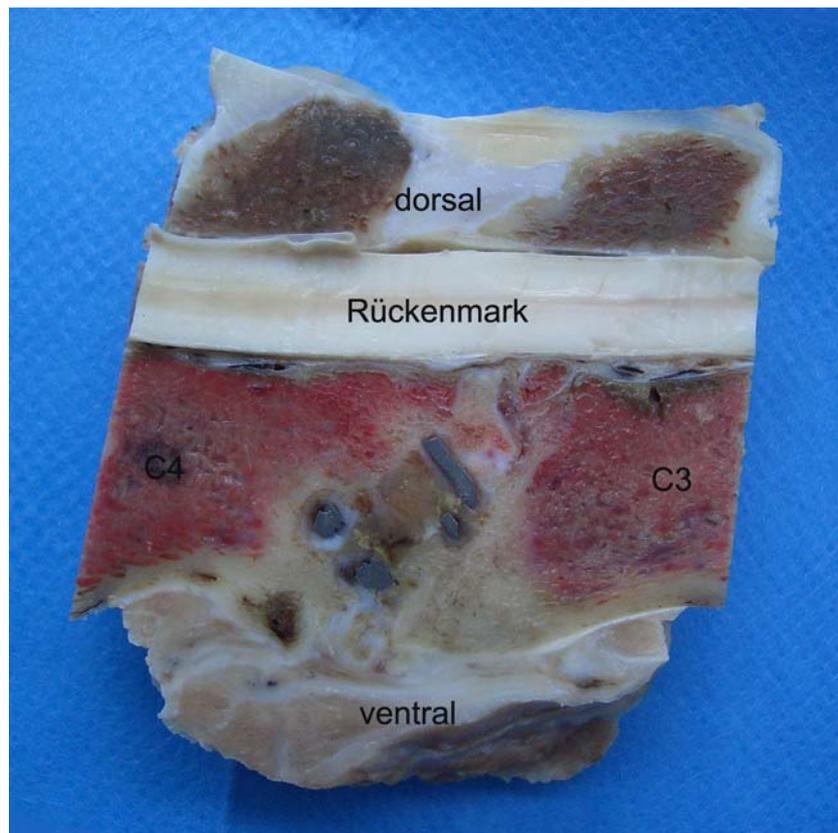


Abbildung 28: Einzelner Sägeschnitt (Dicke 4mm)

Die so gewonnenen Schnitte wurden für weitere sieben Tage in der Fixierlösung belassen. Die Lagerung erfolgte zur optimalen Benetzung der Präparate auf einem Schüttler (HS 501 digital, IKA Labortechnik, Staufen, Deutschland). Am siebten Tag wurden die Reste des

Titan- Implantates vorsichtig entnommen und die Präparate anschließend 30 Minuten unter laufendem Leitungswasser gewässert.

Die Schnitte wurden alternierend in die beiden Aufbereitungsverfahren zur Kunststoff- oder Paraffinhistologie gegeben. Verwendung fanden stets die beiden Schnitte, bei denen der Cage genau in der Mitte angeschnitten wurde. In den meisten Fällen handelte es sich dabei um Schnitt 1 für die Plastikhistologie und Schnitt 2 für die Paraffinhistologie (Abb. 26).

### 3.3.2 Aufarbeitung der Präparate für die Kunststoffhistologie

Die Sägeschnitte, die später in Kunststoff eingebettet werden sollten, wurden in aufsteigender Alkoholreihe entwässert. Dabei wurden die Ethanol- Verdünnungen durch Herstellung der Entsprechenden Verhältnisse aus Ethanol (Ethanol 100 Vol.-%, denaturiert mit Ethylmethylketon, Herbeta- Arzneimittel, Berlin, Deutschland) und destilliertem Wasser hergestellt. Einmal pro Woche erfolgte der Wechsel des Alkohols nach folgender Prozedur (Tab. 2).

| Konzentration Ethanol in % | Zeit    | Lagerungstemperatur |
|----------------------------|---------|---------------------|
| 70 % Ethanol               | 1 Woche | Raumtemperatur      |
| 80 % Ethanol               | 1 Woche | Raumtemperatur      |
| 80 % Ethanol               | 1 Woche | Raumtemperatur      |
| 96 % Ethanol               | 1 Woche | Raumtemperatur      |
| 96 % Ethanol               | 1 Woche | Raumtemperatur      |
| 100 % Ethanol              | 1 Woche | Raumtemperatur      |
| 100 % Ethanol              | 1 Woche | Raumtemperatur      |
| 100 % Ethanol              | 1 Woche | Raumtemperatur      |

Tabelle 2: Entwässerungsschema Kuststoffhistologie

Nach acht Wochen erfolgte dann die Vorbereitung der Präparate auf die Kunststoffeinbettung. Dazu wurden die Proben vier Stunden lang in 100 %igem Xylol (Mallinckrodt Baker BV., Deventer, Holland) bei Raumtemperatur entfettet.

Anschließend wurden die Proben vier Tage in eine Präinfiltrationslösung bei Raumtemperatur auf dem Schüttler belassen. Zur Herstellung eines Liters dieser Lösung wurden 1000 ml Technovit Basislösung (Technovit® 9100 NEU, Kaltpolymerisierender Kunststoff, Heraeus Kulzer GmbH, Wehrheim, Deutschland) mittels einer Aluminiumoxid-Ionenaustauschersäule (Aluminiumoxid 90 aktiv neutral, Merck KGaA, Darmstadt, Germany) entstabilisiert. Auf dem Rührer wurde die Basislösung mit 5 g des pulverförmigen Härter 1 (Technovit®, Dibenzylperoxide, Heraeus Kulzer GmbH, Wehrheim, Deutschland) bis zur Herstellung einer homogenen Flüssigkeit gemischt (ca. eine Stunde).

Nach vier Tagen erfolgte der Wechsel der Präparate in die Infiltrationslösung für sieben Tage bei 7°C. Zur Herstellung von einem Liter Infiltrationslösung wurden 800 ml der entstabilisierten Basislösung (Technovit® 9100 NEU, Kaltpolymerisierender Kunststoff, Heraeus Kulzer GmbH, Wehrheim, Deutschland) mit 80 g PMMA- Pulver (Technovit® 9100 NEU, Kaltpolymerisierender Kunststoff, Heraeus Kulzer GmbH, Wehrheim, Deutschland) in ca. drei Stunden auf dem Rührer vermischt. Anschließend kamen noch 4 g des pulverförmigen Härter 1 (Technovit®, Dibenzylperoxide, Firma Heraeus Kulzer GmbH, Wehrheim, Deutschland) dazu. Nachdem die Flüssigkeit homogen erschien, wurde mit entstabilisierter Basislösung auf 1000 ml aufgefüllt.

Zur Einbettung der Proben wurden zwei verschiedene Lösungen angesetzt. Ein Liter der so genannten Stammlösung A bestand aus 160 g PMMA- Pulver und 4 g Härter vermischt mit 800 ml Basislösung, aufgefüllt auf 1000 ml mittels Basislösung. Die zweite Komponente war die so genannte Stammlösung B. 50 ml dieser Lösung wurden durch Mischung von 30 ml entstabilisierte Basislösung mit 4 ml flüssigem Härter 2 (N,N, 3,5- Tetramethylanilin, Heraeus Kulzer GmbH, Wehrheim, Deutschland) und 2 ml flüssigem Regler (1-Decanthiol, Heraeus Kulzer GmbH, Wehrheim, Deutschland) gewonnen und mit entstabilisierter Basislösung auf 50 ml aufgefüllt sowie vermischt. Stammlösung A und B wurden anschließend im Verhältnis 9:1 gemischt und für jedes Präparat ca. 200 - 250 ml verwendet. Die Präparate wurden einzeln mit der später zu schneidenden Seite nach unten auf Gläser unter möglichst geringem Luftkontakt verteilt. Um einer zu starken Wärmebildung vorzubeugen und eine optimale Polymerisierung des Kunststoffs zu gewährleisten, erfolgte die Lagerung der Gläser über Nacht auf Eis. Ab dem zweiten Tag wurden die Proben bis zum vollständigen Erhärten im Kühlschrank bei ca. 7°C aufbewahrt. Der Aushärtungsprozess war nach ca. 72 Stunden abgeschlossen. Eine Nachhärtung erfolgte für einen weiteren Tag unter dem Abzug.

### **3.3.2.1 Anfertigung der Kunststoffschritte**

Zunächst wurden die Kunststoffblöcke mit Hilfe der Tischschleifmaschine (Phoenix 3000, Jean Wirtz GmbH & Co KG, Düsseldorf, Deutschland) und grobem Schleifpapier Größe 80 (BUEHLER GmbH, Düsseldorf, Deutschland) bis auf das Präparat zurechtgeschliffen. Die Blöcke mussten vor dem Einspannen in das Mikrotom mit einem zweiten Kunststoff (Technovit® 3040, Kaltpolymerisierender Kunststoff, Heraeus Kulzer GmbH, Wehrheim, Deutschland) erhöht und erneut zurechtgeschliffen werden. Danach wurden mittels Hartschnittmikrotom (Police S, Cambridge Instruments, Heidelberg) und Hartmetallmesser, Messerwinkel 40° (Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Germany) 6 µm starke Serienschritte angefertigt. Als Schneideflüssigkeit wurde eine Alkohol- Triton X 5 %- Lösung (Triton X-100, SIGMA ALDRICH CHEMIE GmbH, Steinheim, Deutschland) verwendet. Die Schritte wurden auf Objektträger aufgezogen und mittels 70 % Alkohol (Ethanol 100 Vol.-%,

denaturiert mit Ethylmethylketon, Herbeta- Arzneimittel, Berlin, Deutschland) und einer Streckflüssigkeit (sechs Teile 70 % Alkohol, vier Teile Bytoxyethylacetat) entfaltet und geglättet. Die Abdeckung erfolgte mit einer Kunststoffolie (Kisol-Folie, Kettenbach, Eschenburg/Eibershause, Deutschland). Danach wurden die Gewebeschnitte zunächst einzeln mittels Handwalze auf den Objektträger gepresst. Anschließend erfolgte die Lagerung der Objektträger in einer Objektträgerpresse bis zur Trocknung (48 Stunden Brutschrank, 60°C) um die Haftung zu erhöhen.

### **3.3.2.2 Histologische Färbung der Gewebeschnitte der Kunststoffhistologie**

An den für die Kunststoffhistologie aufbereiteten Präparaten wurden jeweils eine Movat-Pentachrom-, Safranin Orange/von Kossa-, eine Toluidinblau-Färbung sowie eine Trichromfärbung nach Masson-Goldner angefertigt.

- **Movat-Pentachrom-Färbung**

Die Färbung wurde sowohl für die deskriptive Histologie als auch für den histomorphometrischen Knorpelnachweis verwendet.

Diese sehr aufwendige Färbung ermöglicht in farbenfroher Weise die Unterscheidung zahlreicher Komponenten von Bindegewebe und Knochen. Mineralisiertes Knochengewebe stellt sich leuchtend gelb dar. Nicht mineralisierter Knorpel färbt sich grün an und mineralisierter Knorpel gelb. Bindegewebe ist in dieser Färbung, grün und blau angefärbt. Zellkerne stellen sich blauschwarz dar, das Zytoplasma ist rötlich gefärbt. (Färbeprotokoll siehe Anhang Tab. 29)

- **Kombinierte Safranin Orange/von Kossa-Färbung**

Die kombinierte Safranin Orange/von Kossa-Färbung wurde für die histomorphometrische Bestimmung des mineralisierten und nicht mineralisierten Gewebes verwendet.

In dieser Färbung stellt sich mineralisiertes Knorpel- und Knochengewebe schwarz dar. Bindegewebe, hyaliner Knorpel, nicht mineralisierter Knochen soweit Muskulatur werden in unterschiedlich intensiven Rottönen gefärbt. (Färbeprotokoll siehe Anhang Tab. 30)

- **Toluidinblau-Färbung**

Diese Färbung wurde für die deskriptive Histologie zur Charakterisierung des Knochengewebes verwendet.

In der Toluidinblaufärbung werden verschiedenen Zell- und Faserkomponenten in unterschiedlichen Blau- und Violetttönen gefärbt. Knochen erscheint rosa bis lila und unreifes mineralisiertes Gewebe bzw. neugebildeter Knochen etwas dunkler. Diese Färbetechnik eignet sich daher gut, um Aussagen über Knochenumbauvorgänge zu machen. Mukosagewebe und Zellen zeigen eine unterschiedliche Blaufärbung. Fibroblastenzytosplasma färbt sich hellblau, Epithelzellen, Fibroblastenkerne, Fettgewebe, Drüsen und Nervenzellen dunkelblau. Mineralisierter Knochen und Knorpel stellt sich rosa bis blassblau dar. Knorpel, Bindegewebe und Muskulatur stellt sich in unterschiedlich dunklen Blautönen dar. (Färbeprotokoll siehe Anhang Tab. 31)

- **Trichromfärbung nach Masson-Goldner**

Diese Färbung wurde für die deskriptive Histologie zur Charakterisierung der Vorgänge im Bindegewebe und Knochen verwendet.

In der Trichromfärbung nach Masson und Goldner färben sich die Zellkerne bräunlich bis schwarz an. Das Zytoplasma ist ziegelrot gefärbt. Erythrozyten stellen sich orange dar. Bindegewebe und saure Mukosubstanzen sind blass grün gefärbt. Leuchtend grün ist dagegen das mineralisierte Knochengewebe gefärbt. Unverkalktes Osteoid stellt sich rot dar. (Färbeprotokoll siehe Anhang Tab. 32)

### **3.3.3 Aufarbeitung der Präparate für die Paraffinhistologie**

Um bestimmte Antigene über immunhistologische Färbungen sichtbar zu machen, musste der Knochen entkalkt werden. Hierzu wurde Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA-Entkalkungslösung (Herbeta-Arzneimittel, Berlin, Deutschland) verwendet. Es handelt sich dabei um einen sechszähligen Chelator (Komplexbildner), der mit seinen freien Bindungsstellen Kalziumionen aus dem Knochen fängt. Schafsknochen dieser Stärke benötigten acht Wochen bei 37 °C im Brutschrank und einem wöchentlichen Wechsel der Lösung bis zur vollständigen Entkalkung. Es folgte die Wässerung der Präparate für 20 min. unter fließendem Leitungswasser und der anschließenden Entwässerung mittels Automaten (Leica TP 1020, Leica Mikrosystems, Nussloch GmbH, Deutschland) nach folgendem Schema (Tab. 3).

| Medium        | Stunden |
|---------------|---------|
| 70 % Alkohol  | 8       |
| 80 % Alkohol  | 2 x 4   |
| 96% Alkohol   | 8       |
| 96 % Alkohol  | 10      |
| 100 % Alkohol | 3 x 10  |
| Xylol         | 1       |
| Xylol         | 1,5     |
| Paraffin      | 2,5     |
| Paraffin      | 2       |

Tabelle 3: Entwässerungsschema des Automaten

Die Präparate wurden mit der zu schneidenden Seite nach unten in flüssiges Paraffin (Paraplast Plus Tissue Embedding Medium, Tyco Healthcare, Mansfield, USA / Paraffinbad Leica EG 1120, Leica Mikrosystems, Nussloch GmbH, Deutschland) eingebettet. Die Aushärtung erfolgte auf einer Kühlplatte (Leica EG 1130, Leica Mikrosystems, Nussloch GmbH, Deutschland).

### 3.3.3.1 Anfertigung der Paraffinschnitte

Zum Einspannen und Schneiden der Paraffinblöcke am Rotationsmikrotom (RM 2055, Leica Mikrosystems, Nussloch GmbH, Deutschland) wurden diese zunächst zurechtgeschnitten. Unter Eiskühlung wurden 4 µm starke Serienschnitte abgenommen. Das Aufziehen der Gewebeschnitte auf Objektträger erfolgte über ein kaltes und ein warmes (45 °C) Wasserbad (Leica HI 1210, Leica Mikrosystems, Nussloch GmbH, Deutschland). Im Anschluss wurden die Gewebeschnitte im Brutschrank bei 37 °C für 48 Std. getrocknet.

### 3.3.3.2 Immunhistochemische Färbungen

- **Prinzip der immunhistochemischen Färbung**

Bei immunhistochemischen Färbungen werden bestimmte Antigene in Gewebestrukturen identifiziert. Dabei macht man sich die Bildung von Antigen-Antikörperkomplexen zu Nutze, die anschließend durch eine Farbreaktion sichtbar gemacht werden können.

Hierzu werden unkonjugierte Primärantikörper (Primär-Ak) auf die Gewebeschnitte gegeben. Diese Antikörper richten sich gegen das gesuchte Antigen (Ag) und markieren es im ersten

Schritt. Diese Antigen-Antikörperkomplexe werden im zweiten Schritt durch die Zugabe biotinylierter Sekundärantikörper (Sekundär-Ak), die gegen den Primär-Ak gerichtet sind, detektiert. Der Sekundärantikörper ist in der speziell hier angewendeten Färbung mit dem Enzym Alkalische Phosphatase schon direkt gekoppelt. Um den optimalen pH-Wert zur Katalysierung der Enzymreaktion zu erhalten, wird ein Chromogenpuffer hinzugegeben. Im Anschluss wird das Substrat Neufuchsin (Dako CemMate, Dako A/S, Dänemark) für die Farbreaktion hinzugefügt. Neufuchsin wird durch die während der enzymatischen Reaktion zum roten Chromogen reduziert. Diese Farbreaktion macht damit das Antigen im Gewebe sichtbar. Die gesuchte Gewebestruktur kann daraufhin quantitativ oder qualitativ bestimmt werden.

Im Anschluss erfolgt zur besseren Identifizierung der umliegenden Gewebestrukturen eine Gegenfärbung. Unerwünschte Hintergrundfärbungen werden während der Färbung durch die Inkubation in 1 % igem Normalserum minimiert.

Grundsätzlich muss der Sekundär-Ak immer gegen die Immunglobuline der Tierspezies gerichtet sein, aus der auch der Primär-Ak stammt. Das Normalserum stammt wiederum stets aus der Tierspezies, aus der der Sekundär-Ak stammt.

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

Diese immunhistochemische Färbung wurde zur Darstellung der Gefäße verwendet. Die detektierten Gefäße stellten sich in dieser Färbung rot dar.

In einem Vorversuch wurde die optimale Konzentration des zu verwendenden Primärantikörpers evaluiert. In diesem speziellen Fall betrug die Konzentration 1:100. Der Primärantikörper wurde dabei mit einem Puffer (Dako Cytomation Antibody Diluent, Dako Cytomation, Via Real, USA) verdünnt.

Positivkontrolle: Duodenum Paraffin-Gewebeschnitt vom Schaf

Negativkontrolle: Präparat, das nicht mit Primärantikörper inkubiert wurde  
(Färbeprotokoll siehe Anhang Tab. 33)

### 3.3.3.3 Histochemische Färbungen

- **TRAP-Färbung**

Zur Darstellung der Osteoklasten wurden die Paraffinschnitte mittels der TRAP-Färbung gefärbt. Bei TRAP (Tartrate Resistent Acid Phosphatase, Tartratresistente saure Phosphatase) handelt es sich um ein Enzym, das von ausgereiften und aktiven Osteoklasten gebildet wird. In der Färbung wird das Enzym indirekt nachgewiesen. TRAP spaltet von einer phosphorylierten Naphtholverbindung Phosphat ab. Freies Naphthol kann daraufhin an ein Diazoniumsalz binden und mit ihm einen roten Farbstoff bilden. Die aktiven Osteoklasten waren nach der Färbung rot angefärbt. (Färbeprotokoll siehe Anhang Tab. 34)

## 3.4 Auswertung der Gewebeschnitte

### 3.4.1 Definition der Region of Interest (ROI)

Um alle Präparate in ihrem Heilungsergebnis vergleichen zu können wurde die sogenannte Region of Interest (ROI) wie nachfolgend festgelegt.

Zur histomorphometrischen Auswertung der Präparate wurden die gefärbten Gewebeschnitte mittels Mikroskop (Axioskop 40, Carl Zeiss MicroImaging GmbH, Göttingen, Deutschland) und dem Computerprogramm AxioVision (Carl Zeiss MicroImaging GmbH, Göttingen, Deutschland) digitalisiert. Im Computerprogramm Adobe Photoshop7 (Adobe Systems GmbH, München, Deutschland) erfolgte die vertikale Ausrichtung der Präparate, so dass der dritte Halswirbel stets nach oben zeigte. Die Festlegung der ROIs sowie die qualitative und quantitative Messung von Gewebearten erfolgte mit Hilfe der computergestützten Auswertungssoftware KS Run (KS Run 400 Version 3.0, Carl Zeiss Vision, GmbH Eching, Deutschland). Zunächst wurde die Bandscheibenraumbreite durch Messung vom dorsalen zum ventralen Rand des Wirbels festgelegt. Das Computerprogramm KS Run (KS Run 400 Version 3.0, Carl Zeiss Vision, GmbH Eching, Deutschland) bestimmte im Anschluss ein Quadrat, das die variable Bandscheibenraumbreite als horizontale Seite und stets 3,5 cm als vertikale Seite besaß. Das Quadrat wurde manuell auf dem Gewebeschnitt mit zentral gelegenem ehemaligem Bandscheibenraum platziert. Innerhalb dieser ROI wurden dann die eigentlichen fünf Teil-ROIs festgelegt. Zur Festlegung der Cage ROI wurde in Anlehnung an die Maße des Cages ein standardisiertes Quadrat von zwölf Millimeter Breite und sieben Millimeter Höhe vom Auswertenden auf dem Bereich des entnommenen Cages platziert. Anschließend wurde die ventrale ROI manuell vom ventralen Cagerand bis zum ventralen Rand des Wirbels als Fläche eingezeichnet. Die dorsale ROI wurde als Fläche vom dorsalen Cagerand bis zum dorsalen Ende des Wirbelkörpers festgelegt. Die kaudale ROI wurde als an diese drei Flächen angrenzenden Bereich mit einer Höhe von fünf mm in den vierten Wirbelkörper reichend festgelegt. Die kraniale ROI wurde in gleicher Weise für die angrenzende Fläche im dritten Halswirbel festgelegt. Die fünf Flächen zusammen ergaben die Fläche der Gesamt-ROI (Abb. 29).

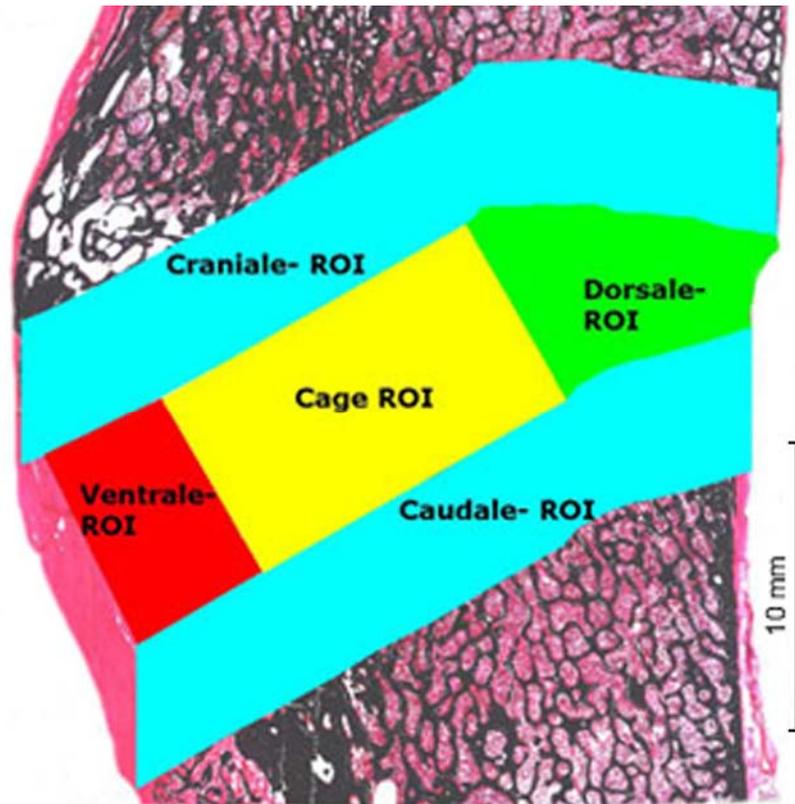


Abbildung 29: Messbereich für die Histomorphometrie – Gesamt- ROI mit den fünf Teil-ROIs

(Schaf 22, Gruppe 4)

Die Cage ROI stellte damit als einzige der beschriebenen ROIs eine für alle Präparate gleich große Fläche dar. Alle anderen Flächen wurden individuell für jede Wirbelsäule festgelegt. Für die Vergleichbarkeit der Schafe untereinander konnten damit in der statistischen Auswertung die absoluten Flächen für die Cage ROI betrachtet werden. Bei allen anderen ROIs wurden zum Vergleich die prozentualen Werte herangezogen.

### 3.4.2 Deskriptive Analyse der histologischen Präparate

Für die Beschreibung der Spondylodese wurden 192 Gewebeschnitte von 48 Schafen verwendet. Die Gewebeschnitte, die zur deskriptiven Auswertung herangezogen wurden, waren in der kombinierten Safranin Orange/von Kossa-Färbung, der Movat-Pentachrom- und Toluidinblau-Färbung sowie in der Trichromfärbung nach Masson und Goldner angefärbt. Die deskriptive Auswertung erfolgte bei allen Präparaten in gleicher Weise. Die Gewebezusammensetzung und -verteilung im Cage sowie im ventralen und dorsalen Bereich der ehemaligen Bandscheibe und das Einheilungsverhalten des Implantates wurden beurteilt. Zusätzlich wurde auf Entzündungsreaktionen und Osteolysen geachtet. Zur Beschreibung der Stärke der Kallusbildung wurden die Präparate in eine starke, mittelstarke und geringe Kallusbildung eingeteilt. Ein starke Kallusbildung lag vor, wenn von Deck- und /

oder Bodenplatte, sowie von der Kortikalis und dem Periost des dritten und vierten Halswirbels, so viel Geflechtknochen gebildet wurde, dass es zu einer vollständigen oder nahezu vollständigen Überbrückung des ehemaligen Bandscheibenraumes kam. Bei einer mittelstarken Kallusbildung wurde weniger Geflechtknochen gebildet, so dass zwischen dem dritten und vierten Halswirbel in der ventralen ROI noch ein größerer bindegewebiger Spalt existierte. Als gering wurde die Stärke der Kallusbildung eingeschätzt wenn ein großer bindegewebiger Spalt vorhanden war und nur kleine Geflechtknochenzubildungen von Deck- und Bodenplatte und der Kortikalis ausgingen.

### 3.4.3 Histomorphometrische Auswertung der Präparate

Die histomorphometrische Auswertung der Präparate erfolgte wie unter 3.4.1 beschrieben in den verschiedenen ROIs mit Hilfe der computergestützten Auswertungssoftware KS Run (KS Run 400 Version 3.0, Carl Zeiss Vision, GmbH Eching, Deutschland). Das Computerprogramm war in der Lage, gleiche Farbpixel zu messen und als Flächen auszugeben (mm<sup>2</sup>). Eine manuelle Korrektur und Zuordnung zu den einzelnen Gewebearten konnte im Anschluss erfolgen. Zur Messung der Knochen- und Bindegewebefläche wurde die kombinierte Safranin Orange/von Kossa-Färbung verwendet. In einem weiteren Schritt konnte zusätzlich noch zwischen mineralisierter (schwarz gefärbt) und nicht-mineralisierter Knochenfläche (rot gefärbt) unterschieden werden. In der Movat-Pentachromfärbung wurde die Knorpelfläche (grün bis gelb gefärbt) bestimmt.

### 3.4.4 Fusionsscore

Für die Beurteilung der Wirbelfusion wurde ausschließlich der Bereich im Inneren des Cages in der kombinierten Safranin Orange/von Kossa-Färbung herangezogen. Die Einteilung der Wirbelfusion erfolgte in drei Kategorien. Eine **komplette** oder **solide Fusion (F1)** lag vor, wenn der dritte und vierte Halswirbel im Inneren des Cages zu mehr als 50 % knöchern überbrückt war. Eine **partielle Fusion (F2)** lag vor, wenn weniger als 50 % des Inneren des Cages knöchern überbrückt waren. **Keine Fusion (F3)** lag vor, wenn keine knöchernen Überbrückung zwischen dem dritten und vierten Halswirbel stattfand (Abb.30).



Abbildung 30: Beurteilung der Fusion im gelb umrandeten Bereich

### 3.4.5 Gefäßzählung

Zur Bestimmung der Gefäßzahl in den  $\alpha$ -SMA gefärbten Paraffin-Gewebeschnitten wurden die gleichen ROIs gewählt, die bei der histomorphometrischen Bestimmung der Gewebeverteilung (Abschnitt 3.4.1) Anwendung fanden. Hierzu wurden die Cage ROI, die ventrale ROI, die dorsale ROI, kraniale und kaudale ROI auf dem Objektträger manuell abgemessen und zur besseren Orientierung unter dem Mikroskop aufgezeichnet. Innerhalb dieser definierten Flächen konnten am Mikroskop (Axioskop 40, Carl Zeiss MicroImaging GmbH, Göttingen, Deutschland) mit Hilfe der zwanzigfachen Vergrößerung die Gefäße ausgezählt werden. Dabei wurde vorher festgelegt, dass als Gefäße alle Strukturen gezählt wurden, die  $\alpha$ -SMA positiv gefärbt waren, Endothelzellen aufwiesen und ein Lumen besaßen. Innerhalb der Gewebeschnitte wurden die Gefäße in den fünf verschiedenen ROIs gezählt. Hierzu wurde in Anlehnung an die standardisierte Auszählung von Blutausstrichen der Gewebeschnitt mäanderförmig durchgemustert und in jedem Gesichtsfeld die Gefäße gezählt.

Im Anschluss konnte die Gefäßdichte errechnet werden, in dem die ausgezählte Gefäßzahl in der entsprechenden ROI durch die in der kombinierten Safranin Orange/von Kossa-Färbung bestimmten faserigen sowie lockeren Bindegewebeoberfläche und der hämoretikulären Bindegewebsfläche im Knochengewebe dividiert wurde.

Um Auszählfehler zu minimieren, wurden die Gefäße von einer weiteren unabhängigen Person gezählt und der Mittelwert für die Auswertung verwendet.

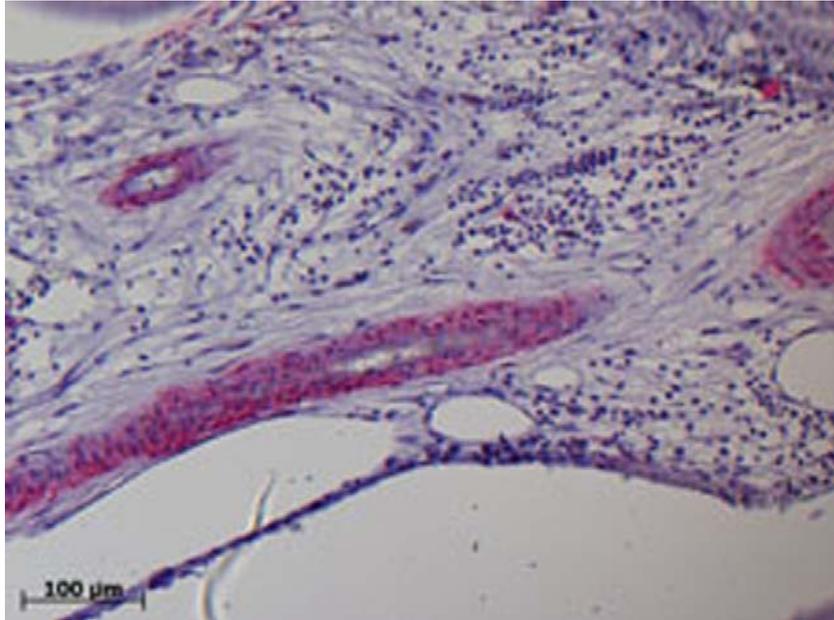


Abbildung 31: alpha-smooth muscle actin-Färbung, rot = positiv angefärbte Gefäße

### 3.4.6 Osteoklastenzählung

Für die Osteoklastenzählung wurde die TRAP-Färbung am Paraffingewebeschnitt verwendet. Bei der Osteoklastenzählung wurden die gleichen ROIs wie bei der histomorphometrischen Bestimmung der Gewebeverteilung (Abschnitt 3.4.1) im Präparat verwendet. Mit Hilfe eines Mikroskops und vierzigfacher Vergrößerung konnten Osteoklasten innerhalb der definierten ROIs ausgezählt werden. Als Osteoklasten wurden alle Zellen gezählt, die sich durch das Enzym saure Phosphatase im Gewebeschnitt rosa darstellten, mindestens zwei Zellkerne besaßen und Kontakt zum Knochengewebe hatten.

Die Osteoklasten wurden innerhalb der fünf ROIs gezählt und im Anschluss konnte durch die Division der Osteoklasten durch die in der kombinierten Safranin Orange/von Kossa-Färbung histomorphometrisch bestimmten, mineralisierten Knochenfläche die Osteoklastendichte bestimmt werden.

Um individuelle Zählfehler zu reduzieren, wurden die Osteoklasten ebenfalls von einer weiteren, unabhängigen Person gezählt. In die Auswertung ging dann der Mittelwert ein.

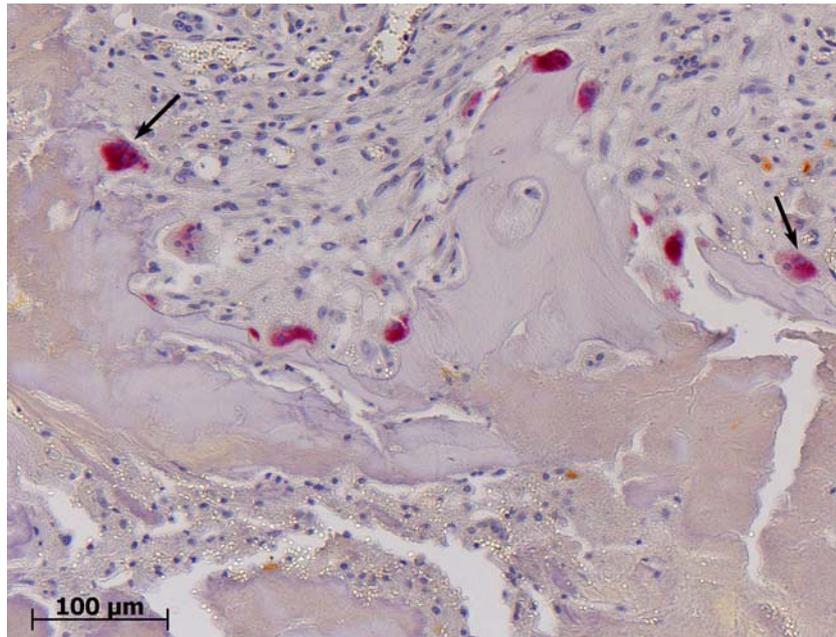


Abbildung 32: TRAP-Färbung, Pfeile=positiv rot gefärbte Osteoklasten

### 3.4.7 Statistik

Da bei der geringen Gruppengröße von acht Schafen nicht von einer Normalverteilung der Ergebnisse ausgegangen werden kann, wurden für die statistische Auswertung nur nicht parametrische Tests verwendet. Sämtliche Gruppen wurden ausschließlich gegen den sogenannten Goldstandard, die Spongiosagruppe, getestet. Dafür konnte der U-Test nach Mann-Whitney, ein nichtparametrischer Zwei-Stichproben-Test für unabhängige Stichproben, verwendet werden. Ein signifikanter Unterschied der untersuchten Gruppen liegt bei dem festgelegten Signifikanzniveau ( $\alpha$ ) von 5 % vor. Die Irrtumswahrscheinlichkeit ( $p$ ) liegt somit bei 0,05.

Da es sich in dieser Arbeit um eine rein beschreibende Darstellung handelt und lediglich ein Vergleich mit der Spongiosagruppe angestellt wird, kann auf eine Bonferroni-Holm-Korrektur verzichtet werden, die bei multiplem Testen ansonsten vorgenommen werden müsste. Die statistische Auswertung erfolgte mit dem Computerprogramm SPSS® Version 18 (SPSS GmbH Software, München, Germany).

Für die Darstellung der Ergebnisse des Fusionsscores und des Kallusscores wurde eine Häufigkeitstabelle verwendet und mittels Chi-Quadrat-Test nach Pearson getestet. Die Ergebnisse der Histomorphometrie, der Gefäß- und Osteoklastenzählung wurden mittels Boxplots dargestellt. Durch die Boxplotdarstellung wird der Median (50-Prozentquartil), das 25- und 75-Prozentquartil, der Minimum- und Maximumwert, sowie Ausreißer (•) und Extremwerte (\*) veranschaulicht. Der Körper des Boxplots enthält den Median und wird vom 25- und 75-Prozentquartil begrenzt. Er vereint 50 % der Werte in sich. An den Körper

schließen sich die T-förmigen Whisker. Sie umfassen jeweils die Werte unterhalb des 25-Prozentquartils bzw. oberhalb des 75-Prozentquartils. Die maximale Länge beträgt die 1,5-fache Länge der Box. Liegen Werte außerhalb dieses Bereiches werden sie als Ausreißer bzw. Extremwerte bezeichnet. Bei Ausreißern liegen die Messwerte zwischen 1,5 und 3 Boxlängen vom oberen oder unteren Rand der Box entfernt. Bei Extremwerten liegen die Messwerte über 3 Boxlängen vom oberen oder unteren Rand der Box entfernt.

Die eckigen Klammern über den Boxplots stellen die signifikanten Unterschiede zwischen der Spongiosagruppe (Gruppe 1) und der Kontrollgruppe und den Parathormongruppen dar.

Die Ergebnisse der histomorphometrischen Auswertung werden mit Ausnahme der Cage ROI in relativen Zahlen (%) dargestellt, weil die Absolutwerte auf eine ROI-Fläche bezogen wurden. Da die Cage ROI stets 84 mm<sup>2</sup> groß war konnten hier die absoluten Zahlen (in mm<sup>2</sup>) ausgewertet werden.

## 4 Ergebnisse

### 4.1 Operationsbefunde

Die meisten Schafe tolerierten den operativen Eingriff an der Halswirbelsäule ohne größere Komplikationen. Ein Tier der Gruppe 4 (Schaf 26) zeigte am Tag nach der Operation eine leichte Lahmheit der rechten Vordergliedmaße, die wahrscheinlich auf die Lagerung während der Operation und Quetschung des N. radialis zurückzuführen war. Dieses Tier verstarb in der dritten Nacht post OP. Die Sektion ergab eine Peritonitis mit freier Flüssigkeit in der Bauchhöhle, sowie eine hochgradige, hämorrhagische Enteritis, die wahrscheinlich die Todesursache darstellte. Ein Tier der Gruppe 5 (Schaf 119) zeigte nach der Operation keinerlei Auffälligkeiten, verstarb allerdings plötzlich zehn Tagen post OP beim Transport in das Versuchsgut. Die Sektion ergaben eine interstitielle Pneumonie, eine hochgradige katarrhalische Enteritis und eine Herzmuskelentzündung und -degeneration, die wahrscheinlich auch die Todesursache darstellte. Während der Operation eines Schafes der Gruppe 5 (Schaf 120) wurde die Dura mater verletzt, so dass es zu einem Liquorverlust und einem Hämatom am Rückenmarkskanal kam. Das Tier war nach der Operation sehr matt und konnte nicht selbständig aufstehen. Tiefenschmerz war an allen vier Gliedmaßen noch vorhanden. Trotz Intensivtherapie zeigte das Tier nach 10 Tagen keine Besserung des Allgemeinbefindens und musste vorzeitig euthanasiert werden. Ein Tier der Gruppe 4 (Schaf 19) und ein Tier der Gruppe 2 (Schaf 52) zeigten lagerungsbedingt nach der Operation eine Lahmheit der rechten Vordergliedmaße, die allerdings durch einen Stützverband, sowie die Behandlung mittels eines Vitamin-B-Komplexes (Polybion N-Ampullen, Merck Pharma GmbH, Darmstadt, Deutschland) und eines Schmerzmittels (Finadyne<sup>®</sup>, RP, Flunixin-Meglumin, Essex Pharma GmbH, München, Deutschland) wenige Tage später komplett ausheilte. Ausfälle, die direkt auf das verwendete Material zurückzuführen waren, kamen nicht vor. Die vorzeitig verstorbenen Tiere konnten durch nachoperierte Tiere ersetzt werden, so dass insgesamt 48 Tiere nach einer Standzeit von zwölf Wochen in die Auswertung eingingen.

## 4.2 Histologische Ergebnisse

### 4.2.1 Deskriptive Histologie

Bei dieser Auswertungsmethode wurden die Gewebeschnitte in der kombinierten Safranin Orange/von Kossa-Färbung, der Movat-Pentachrom-, Toluidinblau- und in der Trichromfärbung nach Masson und Goldner betrachtet. Die Schnitte verliefen longitudinal durch die Anteile des dritten und vierten Halswirbels, welche an den dazwischenliegenden Fusionspalt angrenzten (Abb. 33). Insgesamt gingen sechs Gruppen mit jeweils acht Tieren in die Auswertung ein. Im Zentrum der Betrachtung lag der Fusionsbereich zwischen den beiden Wirbelkörpern, der deutlich durch die Leerräume, die durch die Entnahme des Titanimplantats entstanden sind, gekennzeichnet war. Die Betrachtung des ehemaligen Bandscheibenraumes wurde in Anlehnung an die Einteilung der ROI bei der histomorphometrischen Auswertung vorgenommen, bei der eine Cage ROI, eine ventrale ROI, eine dorsale ROI, eine kraniale und eine kaudale ROI unterschieden wurden (Abb. 29). In den verschiedenen ROIs wurde die dominierende Gewebequalität beurteilt und ob eine vollständige knöcherne oder knorpelige Fusion des dritten und vierten Halswirbels stattfand. Ebenfalls wurden evtl. Entzündungsreaktionen und Knochenabbau, sowie das Einheilungsverhalten des Cages untersucht.

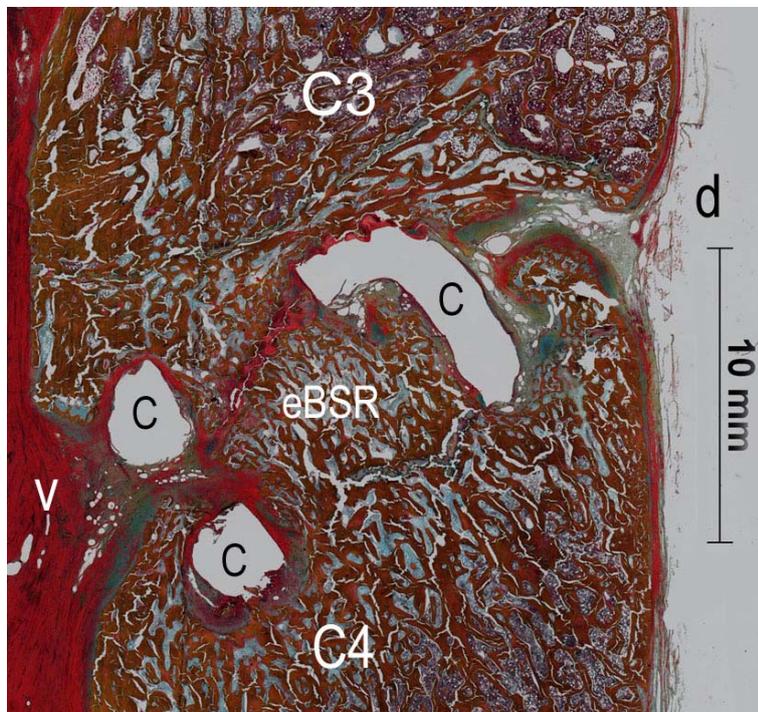


Abbildung 33:  
Wirbelsäulensegment C3/C4;  
C3= dritter Halswirbel; C4= vierter  
Halswirbel; d=dorsal; v=ventral;  
c=Leerfläche vom entnommenen  
Cage; eBSR=ehemaliger  
Bandscheibenraum

• **Ventrale ROI (Kallus)**

Die ventrale ROI beschrieb die Fläche des Bandscheibenfaches, die sich ventral des Cages befand. Anders als bei der histomorphometrischen Auswertung wurde bei der deskriptiven Histologie dieser ROI auch der Kallus, der von der Kortikalis und dem Periost der angrenzenden Wirbelkörper gebildet wurde, mit einbezogen.

Alle acht Schafe der Spongiosagruppe wiesen in der ventralen ROI hauptsächlich Geflechtknochen auf. Bei zwei Tieren waren der dritte und vierte Halswirbel ventral sogar komplett knöchern fusioniert. Im Vergleich zu den anderen Gruppen wies die PTH-Gruppe 3 (0,2 mg PTH<sub>1-34</sub> / ml Fibrin) ein vergleichbares Ergebnis auf. In der ventralen ROI befand sich hier bei fünf Tieren hauptsächlich Geflechtknochen und bei zwei Tieren waren der dritte und vierte Halswirbel ebenfalls komplett knöchern fusioniert. In keiner der anderen Gruppen kam es ventral zu einer knöchernen Fusion. Als Hauptgewebeanteil kam Geflechtknochen in Gruppe 4 (0,4 mg PTH<sub>1-34</sub> / ml Fibrin) bei fünf Tieren und bei zwei weiteren Tieren in gleichem Maße wie Bindegewebe vor. In Gruppe 5 (0,7 mg PTH<sub>1-34</sub> / ml Fibrin) dominierte bei ebenfalls fünf Tieren und in Gruppe 6 (1,0 mg PTH<sub>1-34</sub> / ml Fibrin) bei sieben Tieren der Geflechtknochen als Hauptgewebeanteil. In der Fibringruppe zeigte sich bei fünf Tieren in der ventralen ROI hauptsächlich Geflechtknochen.

| Kallus-Score | Gruppe 1<br>(Spongiosa-<br>gruppe) | Gruppe 2<br>(Fibrin-<br>gruppe) | Gruppe 3<br>(0,2 mg) | Gruppe 4<br>(0,4 mg) | Gruppe 5<br>(0,7 mg) | Gruppe 6<br>(1,0 mg) |
|--------------|------------------------------------|---------------------------------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|
| <b>A</b>     | 5                                  | 1                               | 1                    | 0                    | 0                    | 1                    |
|              | 62,5%                              | 12,5%                           | 12,5%                | 0%                   | 0%                   | 12,5%                |
| <b>B</b>     | 3                                  | 4                               | 4                    | 7                    | 7                    | 4                    |
|              | 37,5%                              | 50,0%                           | 50,0%                | 87,5%                | 87,5%                | 50,0%                |
| <b>C</b>     | 0                                  | 3                               | 3                    | 1                    | 1                    | 3                    |
|              | 0%                                 | 37,5%                           | 37,5%                | 12,5%                | 0%                   | 37,5%                |

Tabelle 4: Kallusscore, Zeile eins in absoluten Zahlen (Anzahl der Tier mit entsprechendem Score), Zeile zwei in relativen Zahlen (prozentualer Anteil der Tiere mit entsprechendem Score)(A= starke Kallusbildung – vollständige bis nahezu vollständige Überbrückung des ehemaligen Bandscheibenraumes mit Geflechtknochen ausgehend von Deck- und / oder Bodenplatte, sowie Kortikalis und Periost des dritten und vierten Halswirbels; B= mittelstarke Kallusbildung – insgesamt weniger Geflechtknochenbildung, dadurch zwischen drittem und viertem Halswirbel größerer bindegewebiger Spalt; C= geringe Kallusbildung – nur kleine Geflechtknochenzubildungen, großer bindegewebiger Spalt zwischen drittem und viertem Halswirbel)

Die Kallusbildung in den Präparaten der Spongiosagruppe war signifikant stärker als in den Präparaten der anderen Gruppen (Wert 20,887;  $p=0,018$ ). Die Fibringruppe, die niedrigste PTH-Konzentration Gruppe 3 (0,2 mg PTH<sub>1-34</sub> / ml Fibrin) und die höchste PTH-Konzentration Gruppe 6 (1,0 mg PTH<sub>1-34</sub> / ml Fibrin) zeigten eine einander ähnliche Kallusbildung. Die beiden mittleren PTH-Konzentrationen Gruppe 4 (0,4 mg PTH<sub>1-34</sub> / ml Fibrin) und 5 (0,7 mg PTH<sub>1-34</sub> / ml Fibrin) wiesen eine gleichstarke Kallusausprägung auf (Tab. 4).

Die Kortikalis und das Periost des dritten und vierten Halswirbels waren in unterschiedlichem Maße an der knöchernen Kallusbildung beteiligt. Auffällig war, dass mit höherer PTH-Konzentration die Kortikalis und das Periost stärker an der Kallusbildung beteiligt waren. In Gruppe 6 (1,0 mg PTH<sub>1-34</sub> / ml Fibrin) waren die Kortikalis und das Periost demnach am stärksten an der Geflechtknochenbildung beteiligt. Zwei Tiere zeigten eine starke, drei Tiere eine mittlere und zwei Tiere eine geringe Geflechtknochenzubildung von der Kortikalis. Die Geflechtknochenzubildung von Kortikalis und Periost war bei den niedrigeren PTH-Konzentrationen etwas geringer. In der Fibringruppe war die Kallusbildung von der Kortikalis am geringsten. Die Spongiosagruppe lag mit der Stärke der Geflechtknochenbildung zwischen der PTH-Gruppe 4 (0,4 mg PTH<sub>1-34</sub> / ml Fibrin) und 3 (0,2 mg PTH<sub>1-34</sub> / ml Fibrin). Auf dem Geflechtknochen in dieser ROI bildete sich bei fast allen Tieren der sechs Gruppen hyaliner Knorpel. Dabei ergaben sich in der Verteilung und Menge des Knorpels zwischen den Gruppen kaum Unterschiede. Am häufigsten war dieser auf den beiden aufeinander zuwachsenden Geflechtknochen von der Deck- und Bodenplatte des dritten und vierten Halswirbels lokalisiert (Abb. 37 u. 38). Bei einigen Tieren war hyaliner Knorpel auch inselartig in den Geflechtknochen eingemauert. Die Chondrozyten wurden zum Knochen hin stets großblasiger (hypertroph) und lagen dichter aneinander. Direkt an der Knochenoberfläche mineralisierte die Knorpelmatrix bereits, was sich in einer Gelbfärbung in der Movat-Pentachrom-Färbung äußerte. Auffällig war, dass die PTH-Gruppe 4 (0,4 mg PTH<sub>1-34</sub> / ml Fibrin) am meisten hyalinen Knorpel aufwies. Sieben Tiere zeigten hier hyalinen Knorpel in Form eines Saumes auf der Oberfläche des Geflechtknochens, welcher vom dritten und vierten Halswirbel ausging. Bei einem weiteren Tier war nur auf der Oberfläche des Geflechtknochens des dritten Halswirbels hyaliner Knorpel nachweisbar. Die Knochenzubildungen des dritten und vierten Halswirbels wurden bei zwei Tieren über hyalinen Knorpel in Mineralisation sogar verbunden. Bei einem Tier der Spongiosagruppe, bei zwei Tieren der Fibringruppe, bei einem Tier der PTH-Gruppe 3 (0,2 mg PTH<sub>1-34</sub> / ml Fibrin) und bei zwei Tieren der PTH-Gruppe 5 (0,7 mg PTH<sub>1-34</sub> / ml Fibrin) war zentral zwischen den beiden Knochenstücken auch Faserknorpel nachweisbar (Abb. 49). Dieser Faserknorpel verband die beiden Knochenzubildungen des dritten und vierten Halswirbels sogar bei jeweils einem Tier der Fibringruppe und der PTH-Gruppe 5.

Entzündungsreaktionen waren in dieser ROI in allen Gruppen selten. Im Bindegewebe eines Tieres der Gruppe 5 (0,7 mg PTH<sub>1-34</sub> / ml Fibrin) und eines der Gruppe 6 (1,0 mg PTH<sub>1-34</sub> / ml Fibrin) war die Anzahl der Entzündungszellen erhöht. Dominierend waren dabei Lymphozyten, Makrophagen und Granulozyten, weniger häufig kamen sehr große Zellen von bis zu 100 µm (Riesenzellen) vor, die ca. drei bis sechs Zellkerne enthielten. Eine erhöhte Anzahl an Gefäßen im Vergleich zum restlichen Bindegewebe des Präparates war ebenfalls auffällig. Ein Tier der Fibringruppe wies eine leichtere Entzündungsreaktion ohne das Vorkommen von Riesenzellen auf (Abb. 44, 45 u. 46).

Bei einem Tier der Fibrinkontrollgruppe erschien die Oberfläche des knöchernen Kallus, der vom dritten Halswirbel ausging, ausgehöhlt. Auf der knöchernen Oberfläche dieser Kaverne befanden sich zahlreiche Osteoklasten, im angrenzenden Bindegewebe war ein erhöhtes Vorkommen von Entzündungszellen wie Lymphozyten und Granulozyten, sowie eine Hypervaskularisierung nachweisbar. In Gruppe 3 (0,2 mg PTH<sub>1-34</sub> / ml Fibrin) und Gruppe 4 (0,4 mg PTH<sub>1-34</sub> / ml Fibrin) kamen bei jeweils einem Tier auf der Oberfläche des knöchernen Kallus, der vom dritten Halswirbel gebildet wurde, eine erhöhte Anzahl an Osteoklasten vor. Der Knochen erschien dabei in Auflösung. Im angrenzenden Bindegewebe war ebenfalls eine Entzündungsreaktion sichtbar in Form eines erhöhten Vorkommens an Entzündungszellen und wie Granulozyten, Lymphozyten und Riesenzellen, sowie einer Hypervaskularisierung. Auffällig war, dass sich dieses Bild in den beiden höheren Konzentrationen von PTH<sub>1-34</sub> (0,7 und 1,0 mg PTH<sub>1-34</sub>/ml Fibrin) etwas häufiger zeigte. So war bei jeweils drei Tieren lokal begrenzt auf der knöchernen Kallusoberfläche ein erhöhtes Vorkommen von Osteoklasten und im angrenzenden Bindegewebe eine Entzündungsreaktion zu verzeichnen. In Gruppe 5 (0,7 mg PTH<sub>1-34</sub> / ml Fibrin) war ein solches Bild bei jeweils einem Tier im knöchernen Kallus des dritten oder vierten Halswirbels sichtbar. In Gruppe 6 (1,0 mg PTH<sub>1-34</sub> / ml Fibrin) zeigte sich eine solche Reaktion bei zwei Tieren im knöchernen Kallus der vom dritten Halswirbel und bei einem weiteren Tier im knöchernen Kallus der vom vierten Halswirbel ausging. Bei einem Tier der Fibrinkontrollgruppe und bei jeweils einem Tier der Gruppe 5 und 6 waren kleine Bereiche, die in der Masson- Goldner- Färbung rot und blau angefärbt waren, auffällig. Sie wurden zum Teil von Osteoklasten aufgelöst und in deren Umgebung im Bindegewebe war eine Entzündungsreaktion mit Hypervaskularisierung und verstärktem Vorkommen von Entzündungszellen zu verzeichnen.

- **Cage ROI**

Die Cage ROI lag zentral und wurde somit von den anderen ROIs umgeben. Diese ROI umfasste die innere Fläche des entnommenen Titanimplantates.

In der Spongiosagruppe, sowie in Gruppe 5 (0,7 mg PTH<sub>1-34</sub>/ml Fibrin) befand sich in dieser ROI bei jeweils sieben Tieren hauptsächlich Geflechtknochen, bei jeweils drei der Tieren hatte sogar eine vollständig knöcherne Überbrückung des Wirbelsäulensegmentes stattgefunden. Bei einem weiteren Tier der Spongiosagruppe waren die beiden aufeinander zugewachsenen Geflechtknochenstücke der Deck- und Bodenplatte bereits über hyalinen Knorpel verbunden. Auch hier wurden die Chondrozyten zum Knochen hin deutlich größer und ordneten sich dichter an. Die Matrix kalzifizierte knochennah bereits. In Gruppe 3 (0,2 mg PTH<sub>1-34</sub> / ml Fibrin) wiesen dagegen acht Tiere hauptsächlich Geflechtknochen im Inneren des entnommenen Titanimplantates auf. Bei drei Tieren waren der dritte und vierte Wirbel komplett knöchern fusioniert und bei einem weiteren Präparat waren die Geflechtknochenstücke bereits über hyalinen Knorpel in Mineralisation verbunden. In Gruppe 4 (0,4 mg PTH<sub>1-34</sub> / ml Fibrin) und Gruppe 6 (1,0 mg PTH<sub>1-34</sub> / ml Fibrin) war dagegen nur bei vier Tieren Geflechtknochen als hauptsächlich Gewebeanteil nachweisbar. In Gruppe 4 kam es bei einem Tier zu einer kompletten knöchernen Fusion des dritten und vierten Halswirbels und bei zwei weiteren Tieren dieser Gruppe zu einer Verbindung über hyalinen Knorpel (Abb. 50). In Gruppe 6 waren bei einem Tier die beiden Knochenstücke schon über hyalinen Knorpel in Mineralisation verbunden. In der Fibringruppe kam bei sieben Tieren hauptsächlich Geflechtknochen in dieser ROI vor. Hyaliner Knorpel war in der Cage ROI in Gruppe 4 (0,4 mg PTH<sub>1-34</sub>/ml Fibrin) verglichen mit den anderen Gruppen am häufigsten nachweisbar. Der hyaline Knorpel war stets auf knöcherner Unterlage lokalisiert und befand sich entweder auf der Geflechtknochenoberfläche der vom dritten oder vierten Halswirbel ausging oder war inselartig in den Geflechtknochen eingeschlossen (Abb. 39 u. 42). Knochennah hypertrophierten die Chondrozyten stets, ihre Matrix mineralisierte. Zwischen den anderen Gruppen war kein Unterschied in der Menge und Verteilung des hyalinen Knorpels auffällig.

Das entnommene Titanimplantat war in der Spongiosagruppe am häufigsten direkt von Geflechtknochen umgeben. Ein Tier zeigte hier eine vollständige Integration des Titanimplantates in Geflechtknochen. Bei den anderen sieben Tieren war das Implantat hauptsächlich direkt von Geflechtknochen umgeben und nur an wenigen Stellen war ein schmaler Saum aus lockerem und straffem Bindegewebe um das Implantat nachweisbar. Die Parathormon-Gruppen zeigten insgesamt weniger Geflechtknochen in direktem Kontakt mit dem Titan. Untereinander waren kaum Unterschiede in den PTH-Gruppen feststellbar. In Gruppe 4 (0,4 mg PTH<sub>1-34</sub>/ml Fibrin) war innerhalb der PTH-Gruppen am meisten Geflechtknochen in direktem Kontakt mit dem Titan nachweisbar. In allen Gruppen kam hyaliner Knorpel, der auf der angrenzenden Knochenoberfläche kalzifizierte, auch in direktem Kontakt mit dem Titan vor, allerdings konnten auch hier kein Unterschied in Menge und Verteilung zwischen den Gruppen festgestellt werden. Auffällig war, dass in der

Fibringruppe am wenigsten Geflechtknochen oder hyaliner Knorpel in Mineralisation in direktem Kontakt zum Titanimplantat vorkam.

Entzündungsreaktionen waren in dieser ROI in allen Gruppen nachweisbar. Diese waren vor allem im Bindegewebe in direkter Umgebung zum Titanimplantat lokalisiert (Abb. 42). Sie äußerten sich in einem gehäuften Vorkommen von Entzündungszellen, wie Lymphozyten, Granulozyten und teilweise auch Riesenzellen, deren Anzahl mit der Nähe zum Titanimplantat noch zunahm. Die Anzahl der Gefäße war hier dann ebenfalls erhöht im Vergleich zum restlichen Bindegewebe. Dies war bei vier Tieren der Spongiosagruppe darstellbar, bei einem weiteren Tier dieser Gruppe zeigte sich eine mildere Reaktion ohne das Erscheinen von Riesenzellen. In den PTH-Gruppen und der Fibringruppe war diese lokal begrenzte Entzündungsreaktion bei jeweils sechs bis acht Tieren zu beobachten. Weiter zentral im Bindegewebe der Cage ROI waren bei zwei Tieren der Fibringruppe und der PTH-Gruppe 3 (0,2 mg PTH<sub>1-34</sub> / ml Fibrin) sowie bei einem Tier der PTH-Gruppe 5 (0,7 mg PTH<sub>1-34</sub> / ml Fibrin) lokal begrenzte Entzündungsreaktionen in Form eines erhöhten Vorkommens von Entzündungszellen, hauptsächlich Lymphozyten, Granulozyten und vereinzelt Riesenzellen, sowie eine Hypervaskularisierung auffällig. In der PTH-Gruppe 6 (1,0 mg PTH<sub>1-34</sub> / ml Fibrin) war bei zwei Tieren eine derartige Entzündungsreaktion ohne das Vorkommen von Riesenzellen zu verzeichnen. Im Bindegewebe der Cage ROI der Spongiosagruppe und der PTH-Gruppe 4 (0,4 mg PTH<sub>1-34</sub> / ml Fibrin) war dagegen keine Entzündungsreaktion bemerkbar.

Ein erhöhtes Vorkommen von Osteoklasten kam ähnlich wie bei den Entzündungsreaktionen im Bindegewebe, im Inneren der Cage ROI in der Fibringruppe und in den PTH-Gruppen 3 (0,2 mg PTH<sub>1-34</sub> / ml Fibrin), 5 (0,7 mg PTH<sub>1-34</sub> / ml Fibrin) und 6 (1,0 mg PTH<sub>1-34</sub> / ml Fibrin) vor. In der Fibringruppe war bei einem Tier die Anzahl der Osteoklasten auf der Geflechtknochenoberfläche mehrerer kleiner Knocheninseln erhöht. Im angrenzenden Bindegewebe war ebenfalls eine Entzündungsreaktion mit einer erhöhten Anzahl an Leukozyten, Granulozyten und Riesenzellen, sowie einer Hypervaskularisierung im Vergleich zum restlichen Bindegewebe sichtbar. Bei einem weiteren Tiere dieser Gruppe schien der Knochen vor allem in Richtung der beiden Wirbelkörper um das Titanimplantat zurückgewichen, an der Geflechtknochenoberfläche waren zahlreiche Osteoklasten nachweisbar. Eine verstärkte Entzündungsreaktion war im direkt angrenzenden Bindegewebe nicht zu verzeichnen. In den PTH-Gruppen 3 (0,2 mg PTH<sub>1-34</sub> / ml Fibrin) und 5 (0,7 mg PTH<sub>1-34</sub> / ml Fibrin) waren in kleinen Bereichen auf der Oberfläche des Geflechtknochens bei jeweils zwei Tieren ein erhöhtes Vorkommen von Osteoklasten zu verzeichnen. Im angrenzenden Bindegewebe war die Anzahl der Lymphozyten und Granulozyten sowie der Gefäße im Vergleich zum restlichen Bindegewebe ebenfalls erhöht. Bei zwei Tieren aus der PTH-Gruppe 6 (1,0 mg PTH<sub>1-34</sub> / ml Fibrin), bei denen in der Cage

ROI nur wenige Inseln aus Geflechtknochen nachweisbar waren, befanden sich auf der Oberfläche vermehrt Osteoklasten. Eine Entzündungsreaktion war direkt im angrenzenden Bindegewebe nicht ersichtlich. Bei einem weiteren Tier dieser Gruppe erschien der Geflechtknochen in nächster Nähe zum Titan ebenfalls zurückgewichen und die Osteoklasten auf der Geflechtknochenoberfläche waren zahlreich, ebenso wie die Entzündungszellen und Gefäße im angrenzenden Bindegewebe. Amorphes, in der Masson-Goldner-Färbung rot und blau gefärbtes Gewebe, das zum Teil von Osteoklasten besetzt war und im umgebenden Bindegewebe eine Entzündungsreaktion aufwies, kam bei fünf Tieren der Gruppe 3 vor, bei vier Tieren der Gruppe 6 und bei jeweils einem Tier der Fibringruppe, der Gruppe 4 und 5 (Abb. 40, 41 u. 43).

- **Dorsale ROI**

Die dorsale ROI beschrieb den Bandscheibenraum, der sich vom Cage bis zum Rückenmark erstreckte. Insgesamt kam es in dieser ROI nur bei sehr wenigen Tieren zu einer Fusion des dritten und vierten Halswirbels. In Gruppe 4 (0,4 mg PTH<sub>1-34</sub> / ml Fibrin) fusionierten zwei Tiere und in Gruppe 3 (0,2 mg PTH<sub>1-34</sub> / ml Fibrin) ein Tier vollständig knöchern im rückenmarksnahen Bereich der dorsalen ROI. Bei drei Tieren in Gruppe 6 (1,0 mg PTH<sub>1-34</sub> / ml Fibrin) waren der dritte und vierte Halswirbel über hyalinen Knorpel, der sich bereits in Mineralisation befand, verbunden. In der Spongiosagruppe war bei zwei Tieren jeweils einmal rückenmarksnah bzw. cagenah der Knochen des dritten und vierten Halswirbels ebenfalls über hyalinen Knorpel in Verknöcherung verbunden. Alle anderen Tiere wiesen zwischen dem dritten und vierten Halswirbel einen bindegewebigen Spalt auf. Zwischen den Gruppen ergaben sich bezüglich der hier vorliegenden Gewebequalität kaum Unterschiede. In der Spongiosagruppe, der Fibringruppe und der PTH-Gruppe 3 (0,2 mg PTH<sub>1-34</sub> / ml Fibrin) war dieser Spalt hauptsächlich mit lockerem und straffem Bindegewebe gefüllt. In Gruppe 4 (0,4 mg PTH<sub>1-34</sub> / ml Fibrin) und 5 (0,7 mg PTH<sub>1-34</sub> / ml Fibrin) dominierte hier Faserknorpel zwischen dem Knochengewebe vom dritten und vierten Halswirbel. In Gruppe 6 (1,0 mg PTH<sub>1-34</sub> / ml Fibrin) war hier wie schon erwähnt hauptsächlich hyaliner Knorpel nachweisbar (Abb. 36). Fast alle Tiere zeigten zentral geringe Menge an Faserknorpel.

Entzündungsreaktionen waren in allen Gruppen sehr selten, nur jeweils ein Tier der Fibringruppe und der PTH-Gruppe 5 (0,7 mg PTH<sub>1-34</sub> / ml Fibrin) zeigten eine milde, lokal begrenzte Entzündungsreaktion in Form eines erhöhten Vorkommens von Entzündungszellen und Gefäßen im Bindegewebe der dorsalen ROI.

Auffällig war, dass bei einigen Tieren der Geflechtknochen der Deck- bzw. Bodenplatte des dritten und vierten Halswirbels in seiner Oberfläche zurückgewichen erschien. In diesen Resorptionshöhlen befand sich statt Knochengewebe meist lockeres und straffes

Bindegewebe, sowie hyaliner Knorpel in Mineralisation direkt auf der Knochenoberfläche. Wenige dieser Tiere zeigten auf der Knochenoberfläche vermehrt Osteoklasten oder Entzündungsreaktionen im angrenzenden Bindegewebe. Insgesamt zeigte sich dieses Bild in den PTH-Gruppen mit ansteigender PTH-Konzentration häufiger. Eine solche Kaverne im dritten Halswirbel in der dorsalen ROI war bei einem Tier der Spongiosagruppe, bei zwei Tieren der Fibringruppe, bei jeweils drei Tieren der Gruppe 3 (0,2 mg PTH<sub>1-34</sub> / ml Fibrin) und Gruppe 4 (0,4 mg PTH<sub>1-34</sub> / ml Fibrin), bei sechs Tieren der Gruppe 5 (0,7 mg PTH<sub>1-34</sub> / ml Fibrin) und bei fünf Tieren der Gruppe 6 (1,0 mg PTH<sub>1-34</sub> / ml Fibrin) bemerkbar. Bei einem Tier der Fibringruppe, der Gruppe 3, der Gruppe 5 und der Gruppe 6 waren zahlreiche Osteoklasten auf der Knochenoberfläche sichtbar und im angrenzenden Bindegewebe war eine milde Entzündungsreaktion auffällig. In der Grundplatte des vierten Halswirbels war eine solche Einhöhlung bei einem Tier der Gruppe 5 und bei drei Tieren der Gruppe 6 feststellbar. Eins der beiden Tiere der Gruppe 5 zeigte auf der Knochenoberfläche eine erhöhte Anzahl an Osteoklasten im Vergleich zum restlichen Knochengewebe und im angrenzenden Bindegewebe waren die Entzündungszellen und Gefäße ebenfalls erhöht. In der dorsalen ROI kamen nach der Cage ROI am meisten in der Masson- Goldner- Färbung kleine, schollenartig, amorphe, rot und blau gefärbte Bereiche vor, zum Teil umgeben von Osteoklasten und einer Entzündungsreaktion. Insgesamt kamen diese Bereiche bei drei Tieren der Gruppe 4, zwei Tieren der Gruppe 6 und jeweils einem Tier der Fibringruppe und der Gruppe 5 vor.

- **Kraniale und kaudale ROI**

Die kraniale und kaudale ROI beschrieben jeweils das der ventralen ROI, der Cage ROI und der dorsalen ROI angrenzende Gewebe des dritten bzw. vierten Halswirbels.

In der kranialen und kaudalen ROI haben im Vergleich zum nativen Wirbelsäulensegment kaum Veränderungen stattgefunden.

Im dritten und vierten Halswirbel befand sich bei zahlreichen Tieren in etwa 2 mm Abstand zur ehemaligen Deck- bzw. Bodenplatte des dritten und vierten Halswirbels eine schmale Schicht aus hyalinem Knorpel. Die Chondrozyten waren dicht gelagert und säulenartig angeordnet und schienen Reste der Wachstumsfuge des Wirbelkörpers zu sein (Abb. 47 u. 48).

Bei einem Tier der Gruppe 4 (0,4 mg PTH<sub>1-34</sub> / ml Fibrin) erschien im dritten Wirbelkörper das Knochengewebe, das sich in direktem Kontakt zum Titanimplantat befand, zurückgewichen. Dieser Bereich war stattdessen mit lockerem Bindegewebe gefüllt. Auf den Knochenrändern befand sich hyaliner Knorpel, der bereits mineralisierte.

Bei einem Tier der Gruppe 5 (0,7 mg PTH<sub>1-34</sub> / ml Fibrin) erschien das Knochengewebe um das Titanimplantat in der kranialen und kaudalen ROI ebenfalls zurückgewichen. Zahlreiche Osteoklasten waren auf der Knochenoberfläche sichtbar und das angrenzende Bindegewebe zeigte verstärkt Entzündungszellen und eine Hypervaskularisierung.

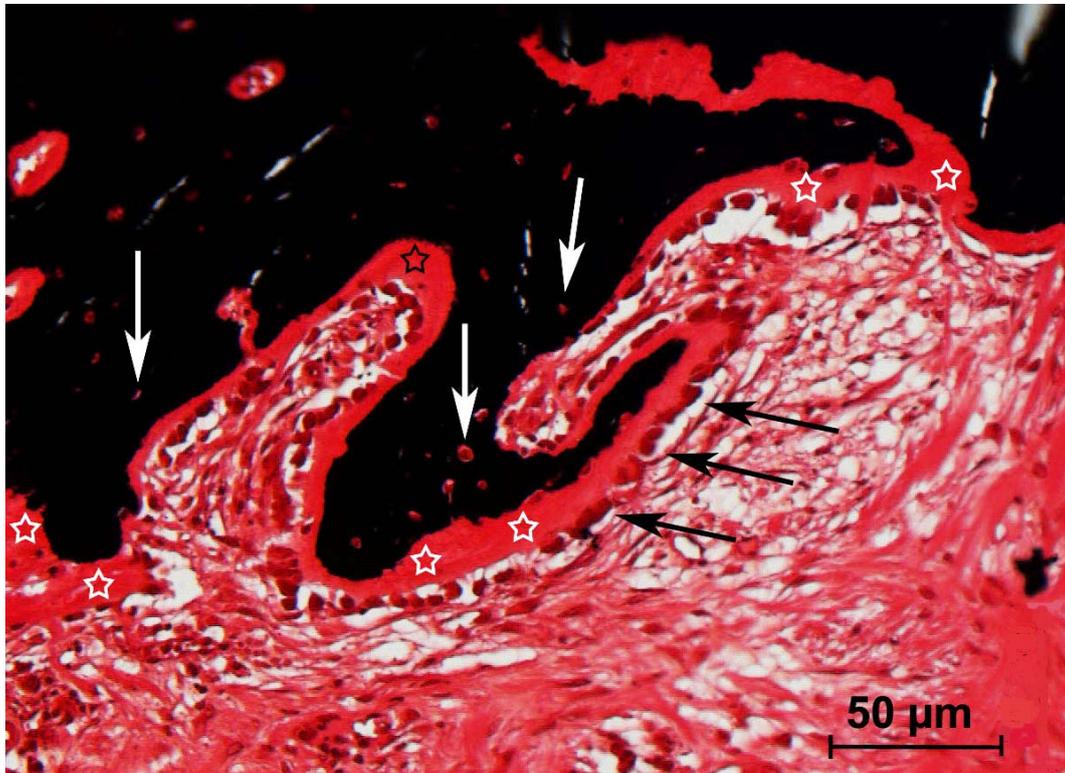


Abbildung 34: Epithelähnliche Anordnung der Osteoblasten auf der Knochenmatrix Cage ROI (schwarze Pfeile), Osteoidsaum (Sternchen), Osteozyt (weiße Pfeile), desmale Knochenbildung, (kombinierte Färbung nach Von-Kossa/Safranin-Orange) (Gruppe 3, Schaf 30)

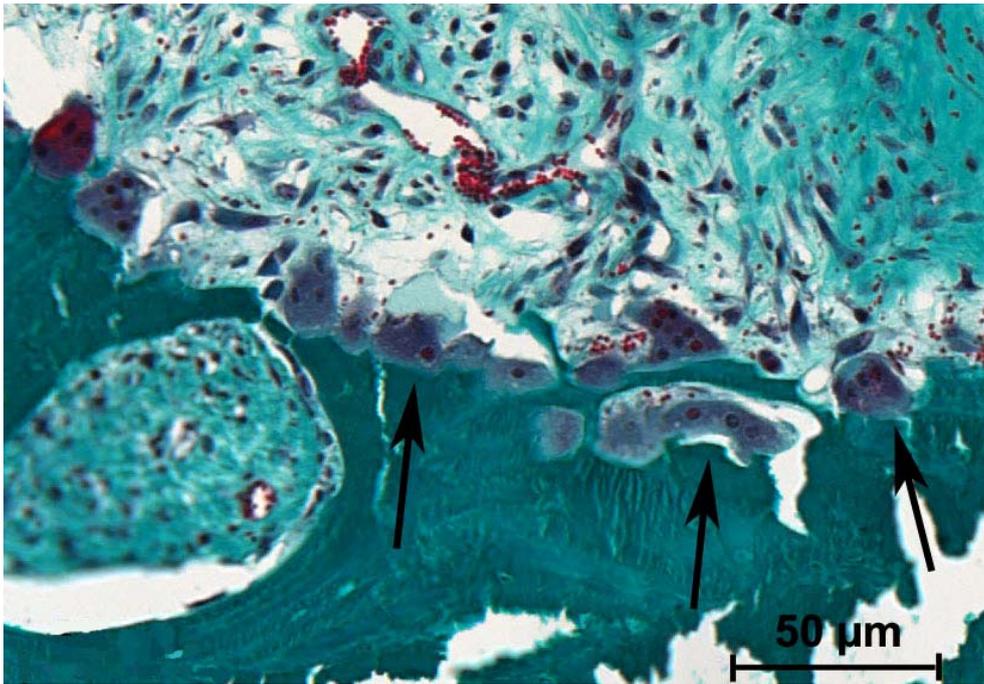


Abbildung 35: Osteoklasten auf der Knochenoberfläche Cage ROI (schwarze Pfeile) (Masson-Goldner-Färbung) (Gruppe 6, Schaf 33)



Abbildung 36: Schicht hyaliner Knorpel auf dem Knochen des dritten Halswirbels der dorsalen ROI; zum Knochen hin Gelbfärbung (Sternchen) durch zunehmende Mineralisation der Knorpelmatrix, Chondrozyten zum Knochen hin zum Teil hypertroph und in Säulen angeordnet (Pfeile weiß); neben dieser enchondralen Ossifikation auch direkt am Knochen durch Osteoblastensaum (Pfeile schwarz) direkte Knochenneubildung; rote Linie (Dreiecke) im Knochen stellt das gerade von den Osteoblasten gebildete Osteoid dar (Movat-Pentachromfärbung) (Gruppe1, Schaf 54)

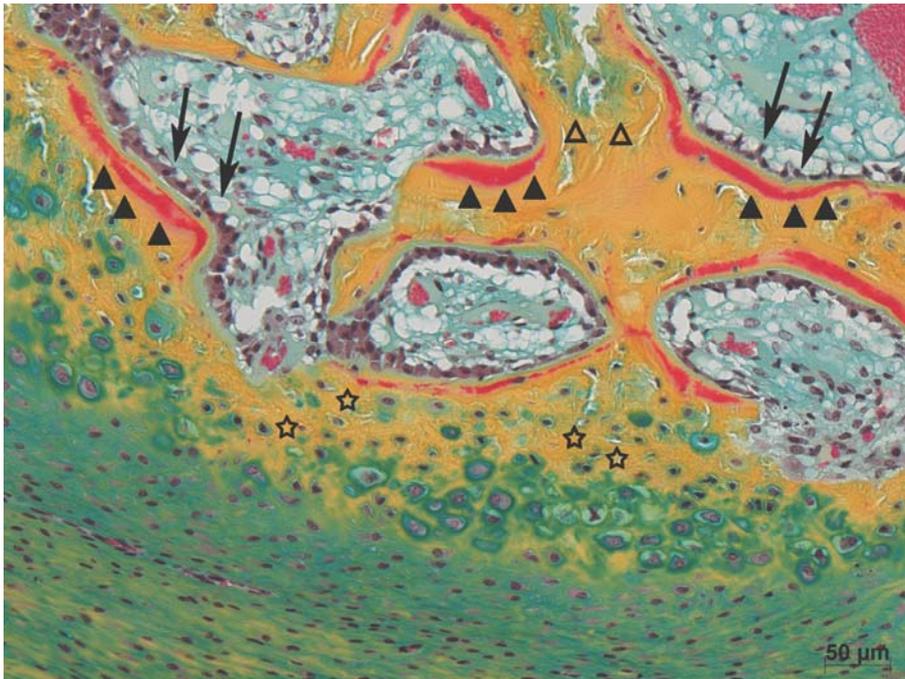


Abbildung 37: ventrale ROI, Knochenzubildung vom dritten Halswirbel; chondrale und desmale Knochenbildung laufen nebeneinander ab; Osteoblastensaum auf Knochen trabekeln des Kallus (Pfeile); von diesen gebildetes Osteoid als rote Linie (schwarze Dreiecke); mineralisierte Knochenmatrix am Übergang zum Knochen (Sterne); Reste des Knorpels weiter zentral verblieben (weiße Dreiecke) (Movat- Pentachrom- Färbung) (Gruppe 3, Schaf 103)

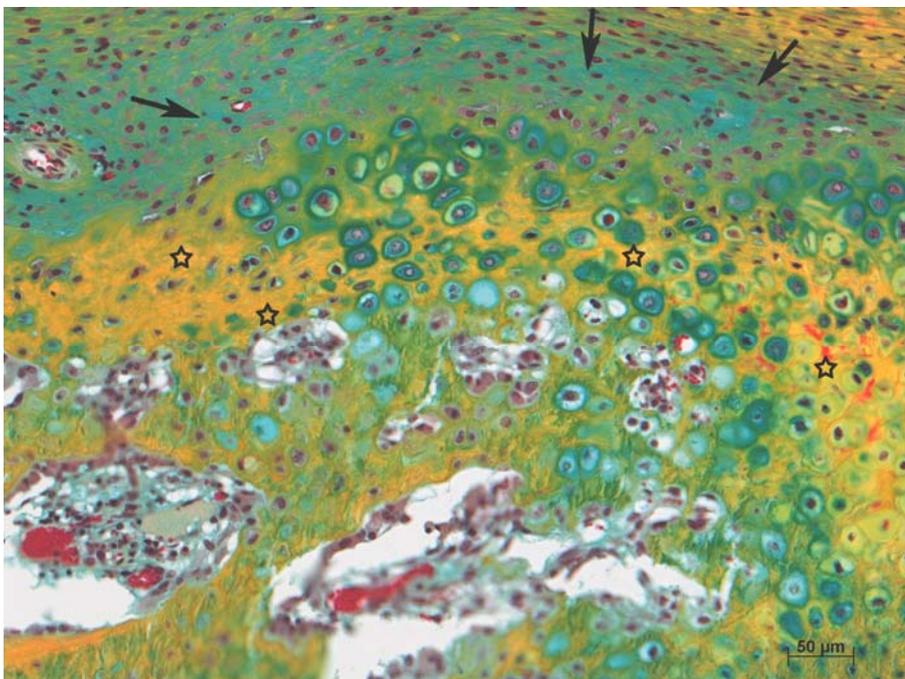


Abbildung 38: Kallus in der ventralen ROI: Übergang von Bindegewebe über hyalinen Knorpel zum Knochen, zunehmende Mineralisation der Knorpelmatrix durch Gelbfärbung (Sternchen), hypertorphe Chondrozyten, Schicht mit zahlreichen Osteoprogenitorzellen als Zeichen der aktiven Knochenneubildung (Pfeile) (Movat-Pentachromfärbung) (Gruppe1, Schaf 49)

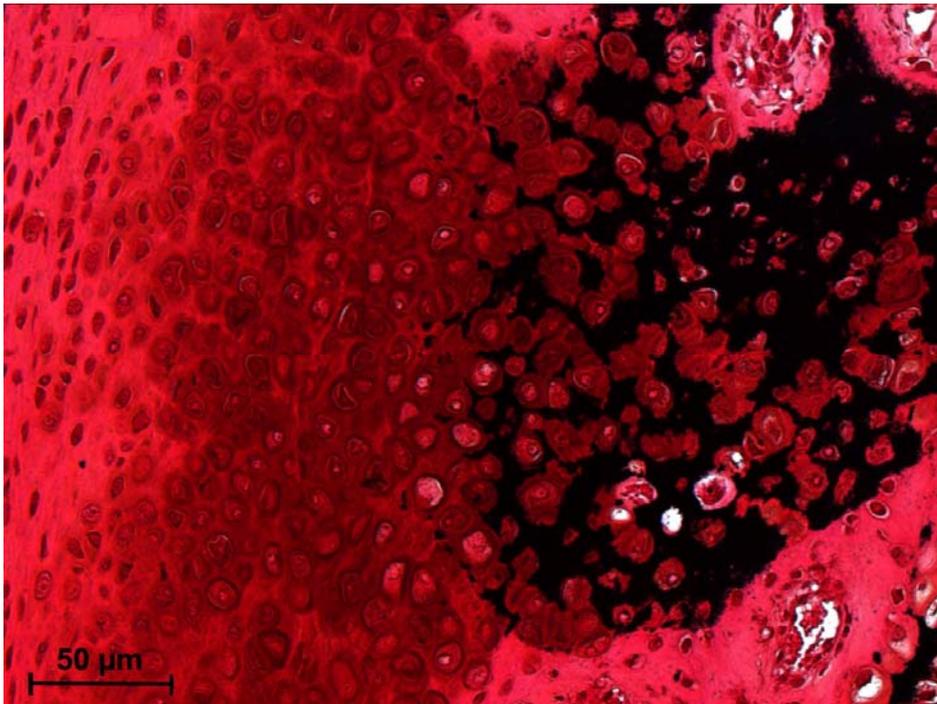


Abbildung 39: Darstellung der zunehmenden Mineralisation des hyalinen Korpels zum Knochen hin, Chondrozyten von mineralisierter Matrix (schwarz) umgeben, Kallus in ventraler ROI (kombinierte Safranin Orange/von Kossa-Färbung) (Gruppe 6, Schaf 33)

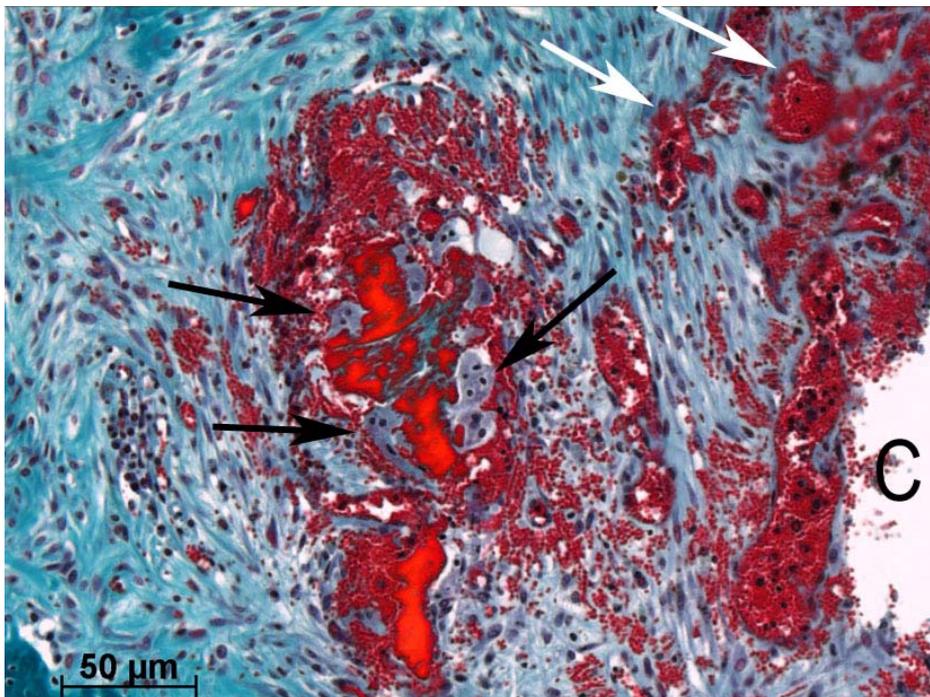


Abbildung 40: Starke Zunahme der Gefäßanzahl zum Titancage (C) hin (weiße Pfeile), Entzündungszellen und Riesenzellen (schwarze Pfeile) bauen kleine Knochenfragmente ab, lytischer Knochen erscheint hell rot (Masson-Goldner-Färbung) (Gruppe 6, Schaf 41)

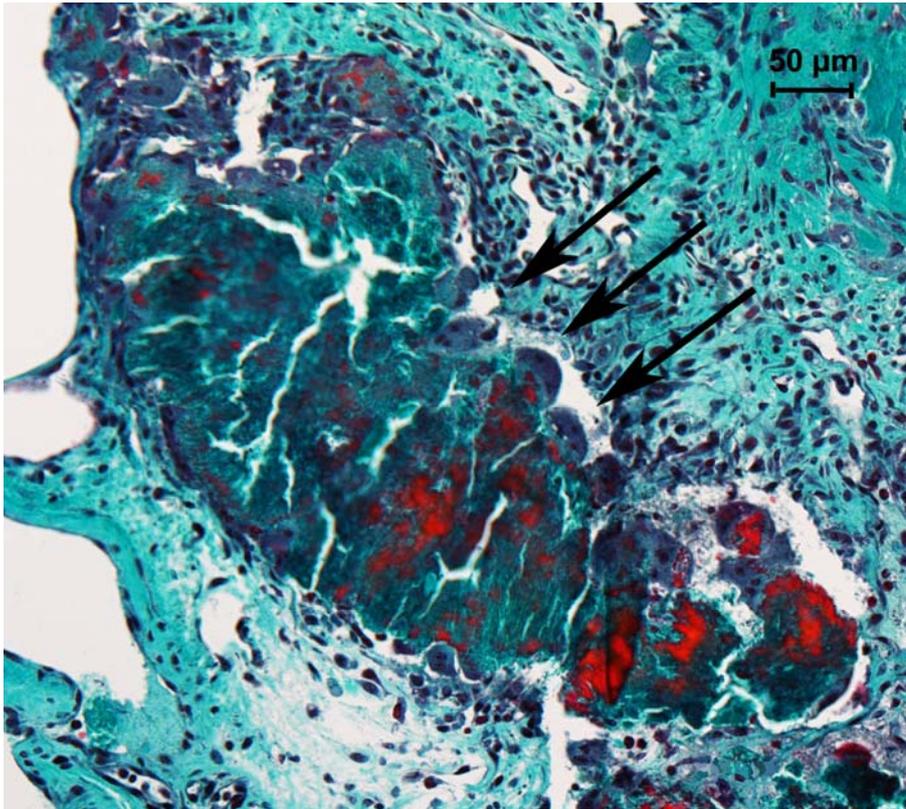


Abbildung 41: Osteoklasten bauen cagenahes Knochenstück ab (schwarze Pfeile) (Masson-Goldner-Färbung) (Gruppe 2, Schaf 102)

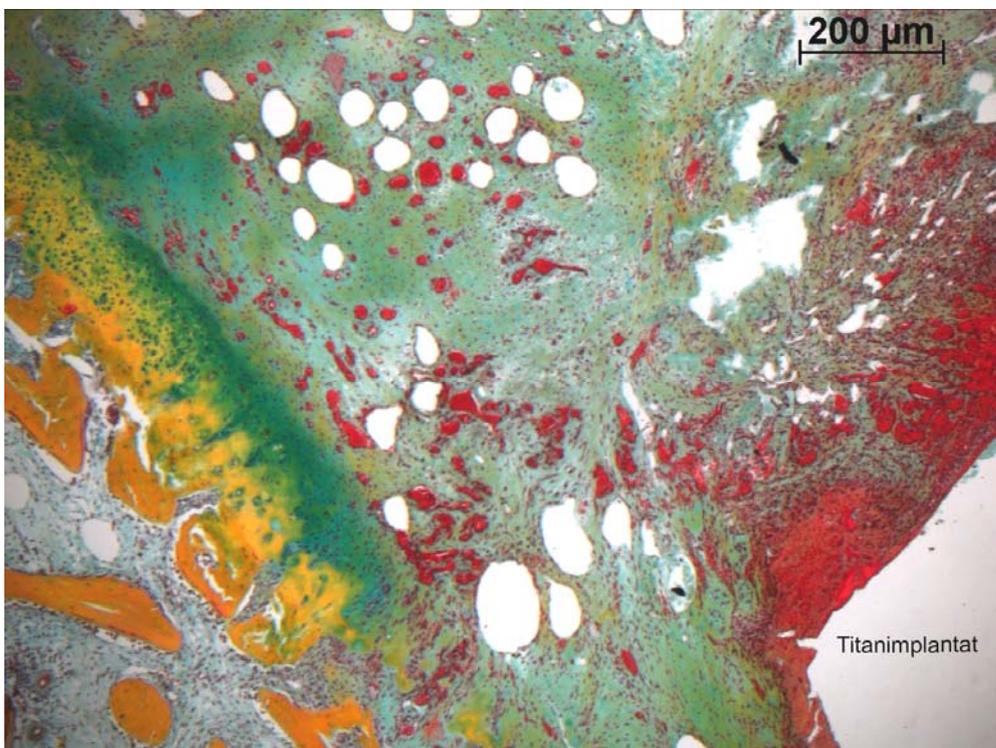


Abbildung 42: Cage ROI mit lockerem und straffem Bindegewebe; zunehmende Vaskularisierung in Richtung Titanimplantat; hyaline Knorpelkappe auf dem Knochen vom vierten Halswirbel; keine Fusion (Movat-Pentachrom-Färbung) (Gruppe 6, Schaf 28)

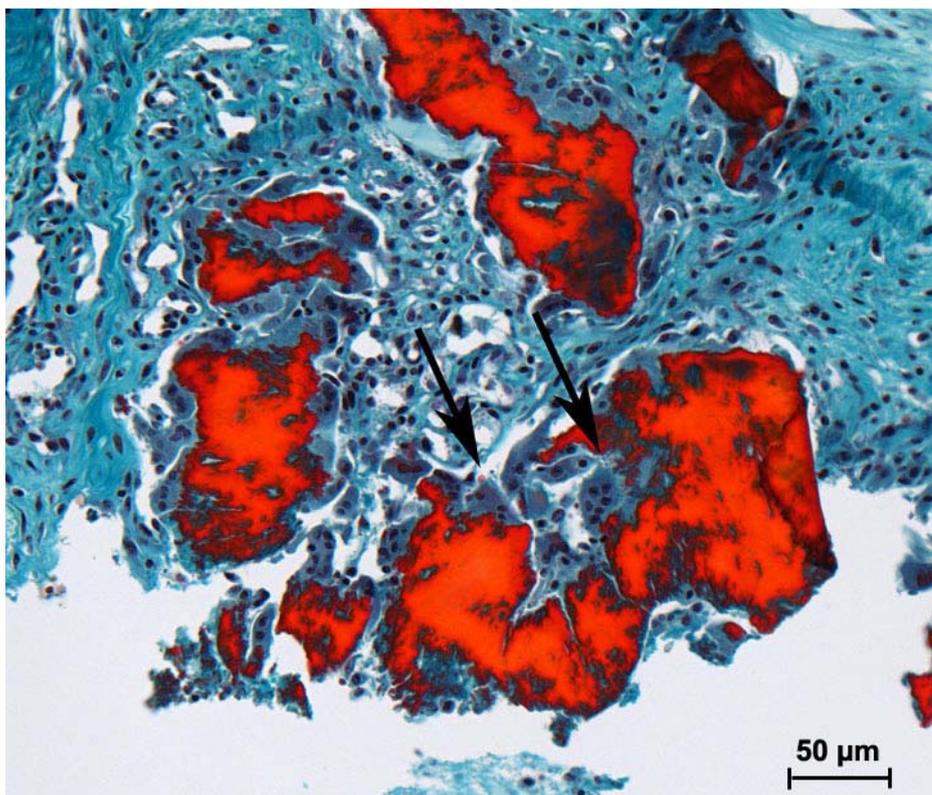


Abbildung 43: Cage ROI; Abbau von lytischem Knochen (rot) durch Osteoklasten (Pfeile) (Masson-Goldner-Färbung) (Gruppe 6, Schaf 118)

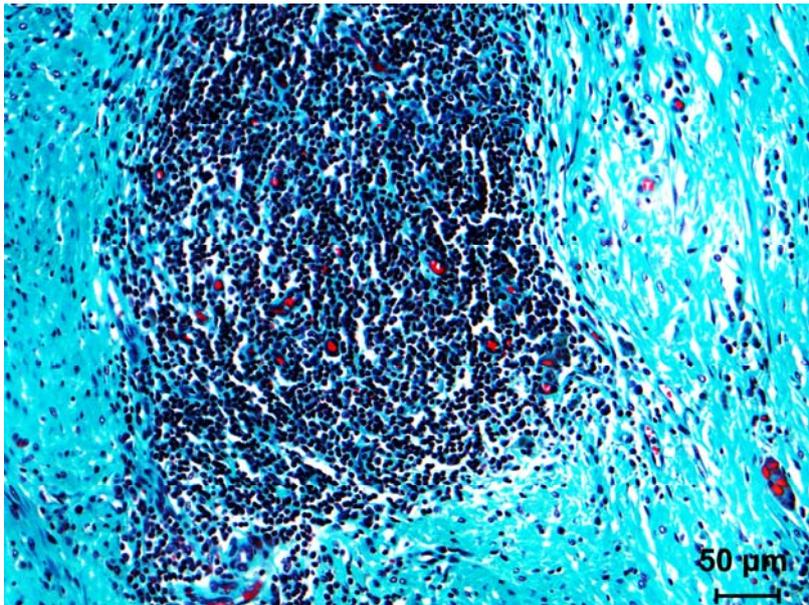


Abbildung 44: lokale milde Entzündungsreaktion; zahlreiche Makrophagen, Leukozyten und Granulozyten im Haufen gelagert im Bindegewebe der ventralen ROI (Masson-Goldner-Färbung) (Gruppe 5, Schaf 131)

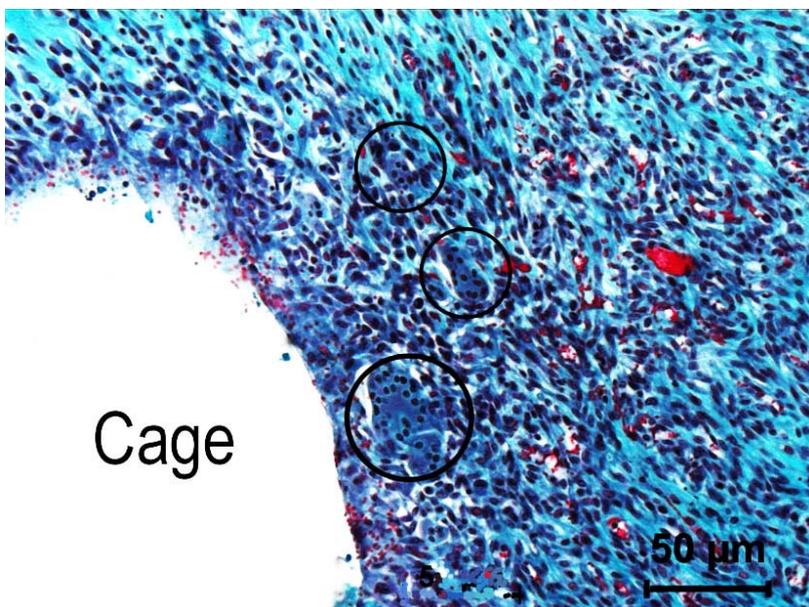


Abbildung 45: starke Entzündungsreaktion; Entzündungszellen und mehrkernige Riesenzellen (Kreise) in direktem Kontakt zum entnommenen Titanimplantat (Masson-Goldner-Färbung) (Gruppe 1, Schaf 50)

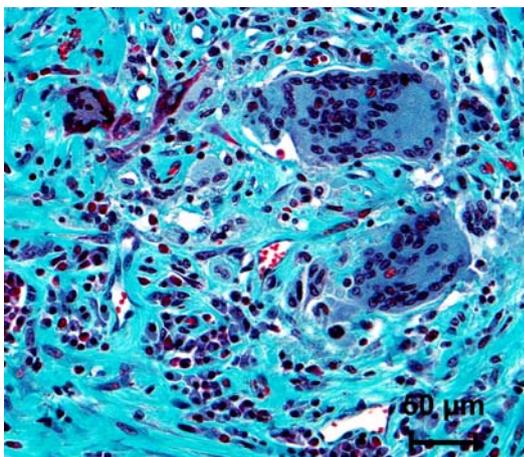


Abbildung 46: Riesenzellen im Bindegewebe der ventralen ROI (Masson-Goldner-Färbung) (Gruppe 2, Schaf 63)

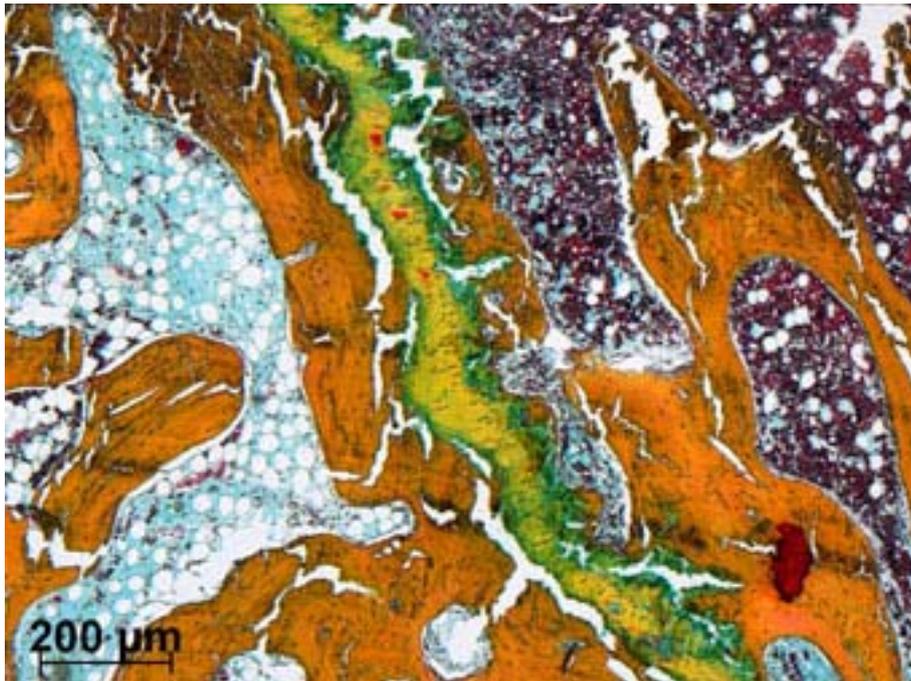


Abbildung 47: Reste der Wachstumsfuge des dritten Schafshalswirbels, rechts in Richtung Wirbelkörper scheint das Knochenmark deutlich zellreicher (Movat- Pentachrom- Färbung) (Gruppe 4, Schaf 27)

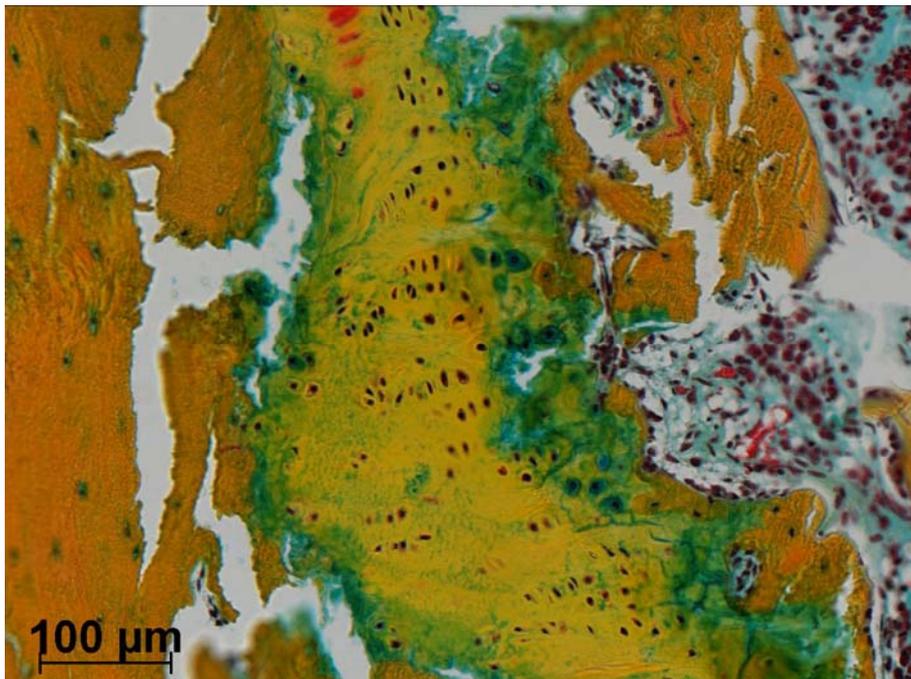


Abbildung 48: Rest der Wachstumsfuge des dritten Schafshalswirbels, säulenförmige Anordnung der Chondroblasten (Movat- Pentachrom- Färbung) (Gruppe 4, Schaf 27)

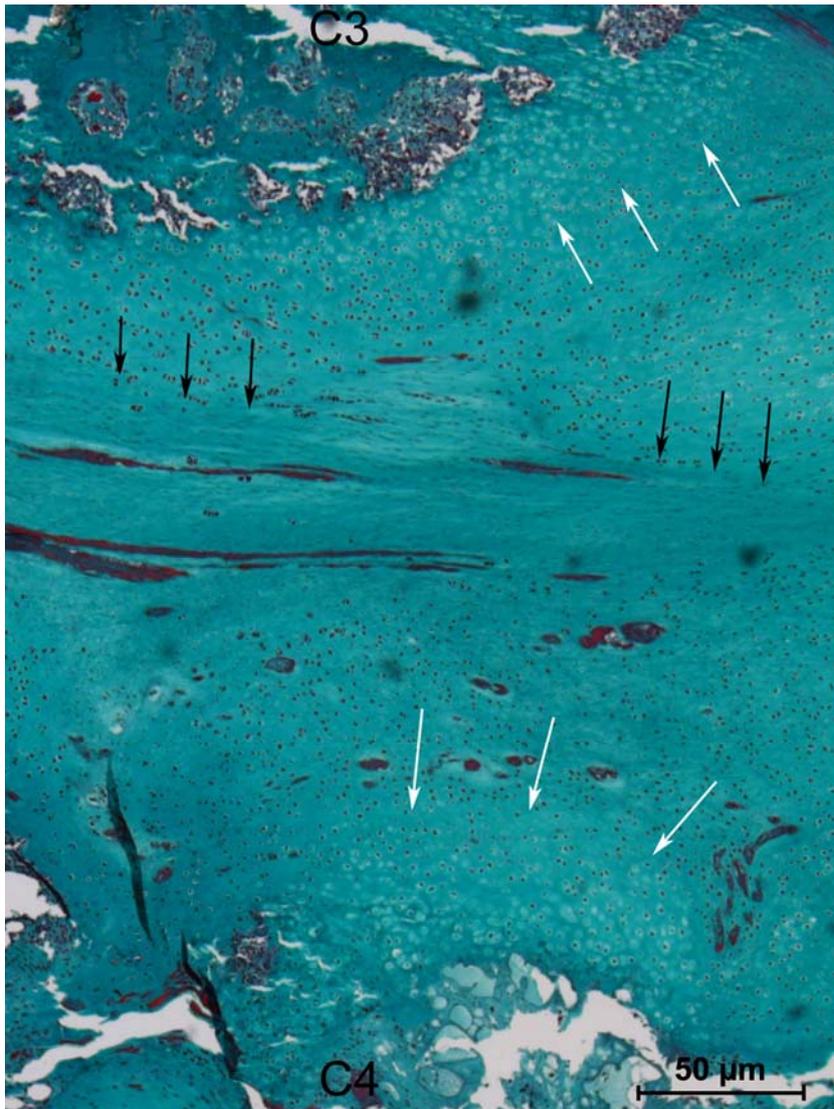


Abbildung 49: ventrale ROI Knochenzubildungen vom dritten (C3) und vierten (C4) Halswirbel; darauf hyaliner Knorpel als Kappe (weisse Pfeile); zentral ein schmaler Streifen Faserkorpel (schwarze Pfeile) (Masson- Goldner-Färbung) (Gruppe 6, Schaf 38)

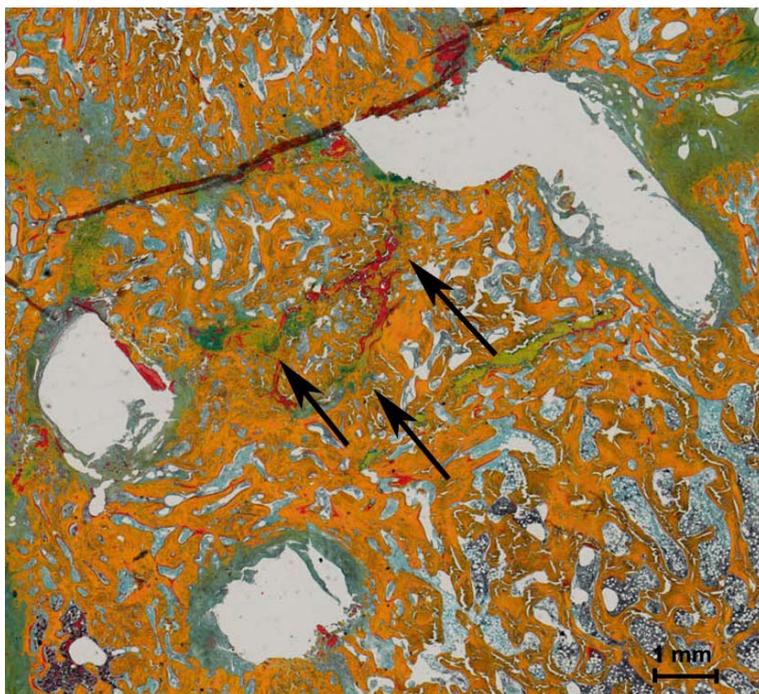


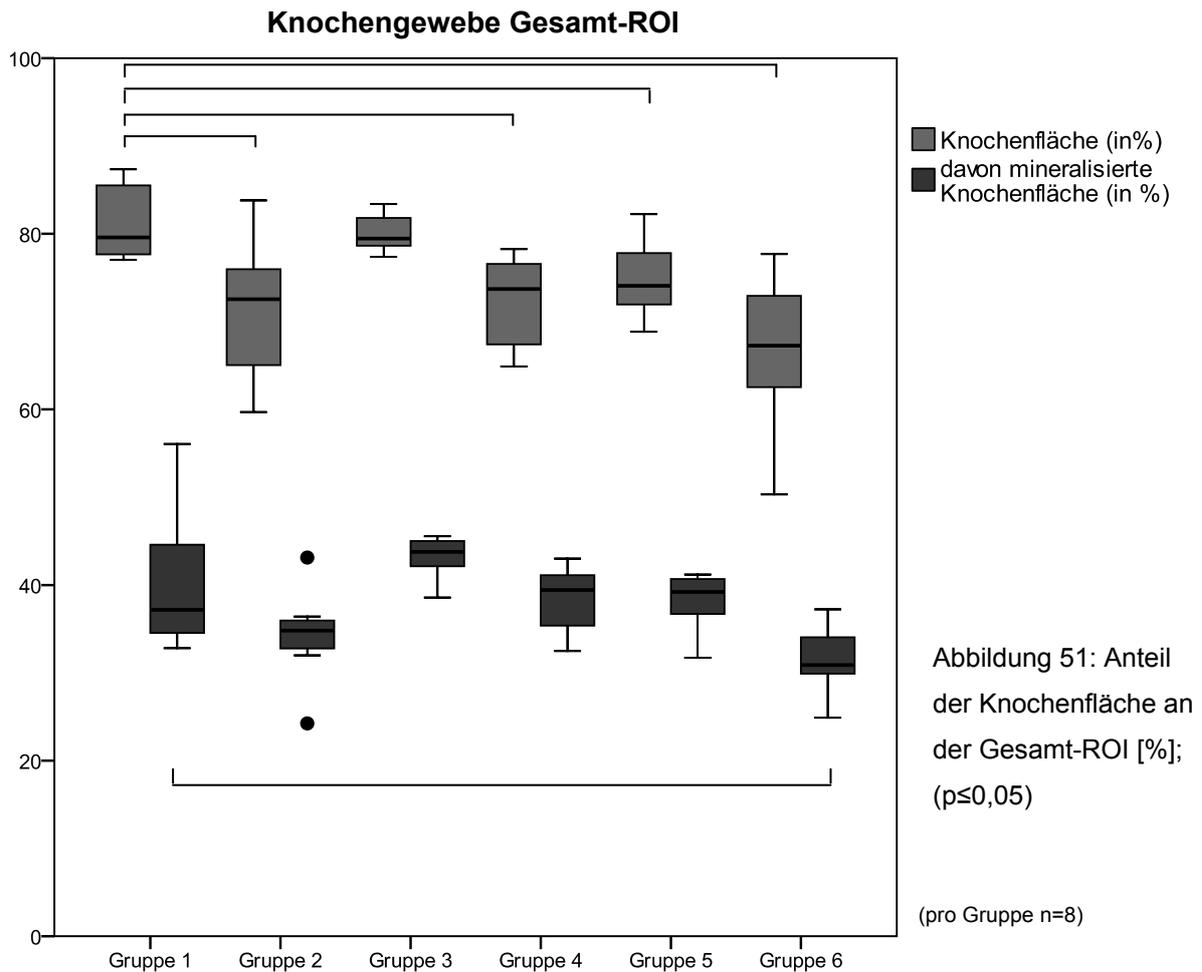
Abbildung 50: Cage ROI mit knöcherner Überbrückung; nur zentral liegen schmale Knorpelstreifen (Pfeile) vor (Movat-Pentachrom-Färbung) (Gruppe 3, Schaf 103)

#### **4.2.2 Ergebnisse der histomorphometrischen Analyse**

In die bildanalytische Auswertung gingen insgesamt 96 Schnitte ein, die nach Safranin Orange/von Kossa und Movat-Pentachrom gefärbt wurden. Die Darstellung der verschiedenen Gewebeanteile erfolgte in der Gesamt-ROI und anschließend gesondert für die ventrale, Cage, dorsale, kraniale und kaudale ROI im Einzelnen. Dabei wurden die Knochenanteile und die davon mineralisierten Knochenanteile, sowie die Knorpel- und Bindegewebeanteile gesondert graphisch und tabellarisch dargestellt.

- **Gewebeverteilung in der Gesamt-ROI**

Die Gewebeanteile an Knochen, davon mineralisierter Knochen, sowie an Knorpel- und Bindegewebe werden in relativen Zahlen [%] zur Gesamtfläche der Gesamt-ROI dargestellt. In der Spongiosagruppe (Gruppe 1) war der Anteil an Knochengewebe an der Gesamtfläche dieser ROI am größten und lag bei 79,85 % im Median (Abb. 51). Die Gruppe 3 zeigte ein ähnliches Ergebnis mit 79,47 % Knochengewebe. Signifikant niedrigere Knochenanteile als in Gruppe 1 ergaben sich in Gruppe 4 ( $p=0,005$ ), 5 ( $p=0,015$ ), 6 ( $p=0,001$ ) und der Fibringruppe (Gruppe 2,  $p=0,003$ ). Den geringsten Knochenanteil zeigte Gruppe 6 mit 67,26 % (Tab. 5).



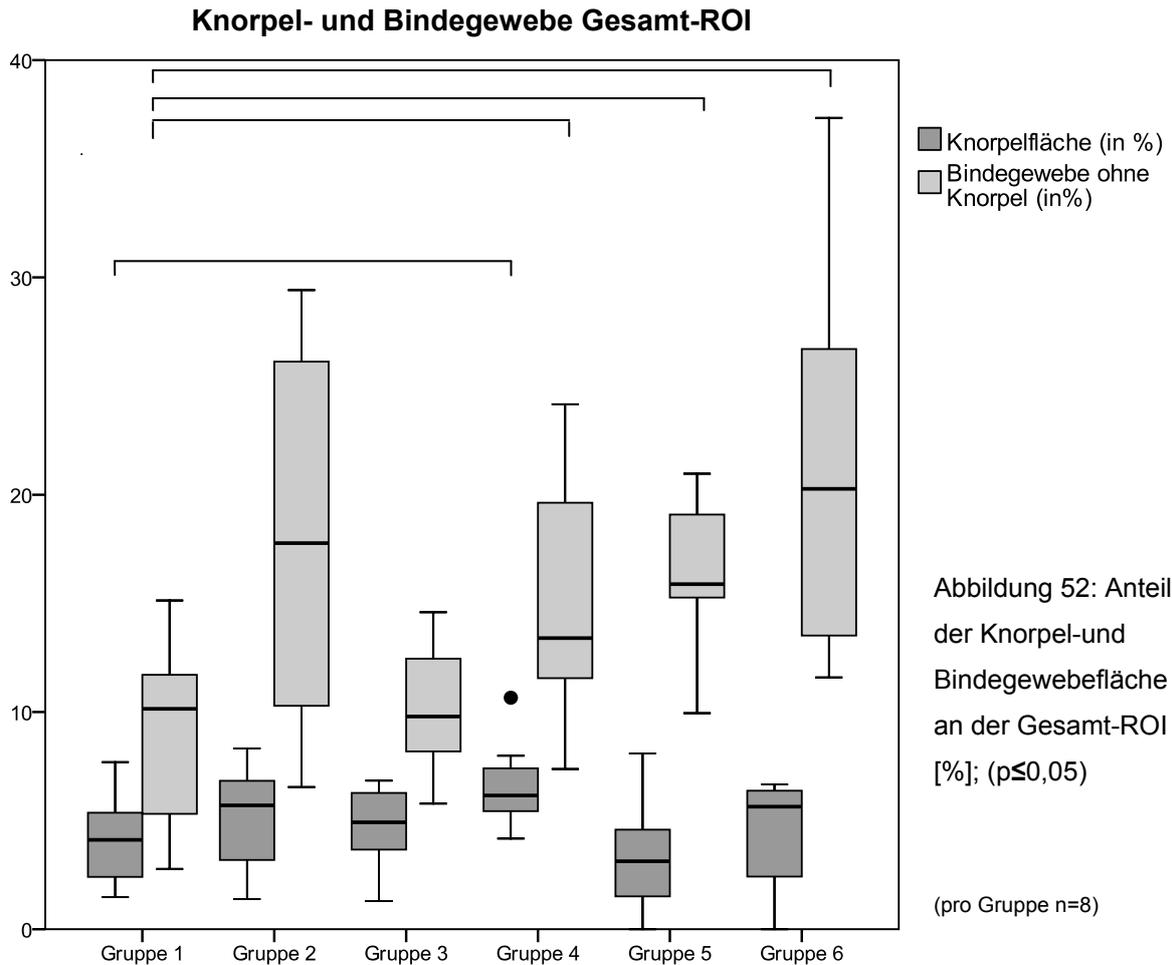
Den größten Anteil an mineralisierter Knochenfläche wies Gruppe 3 mit 43,77 % im Median auf. Mit steigender Parathormonkonzentration ging der Anteil an mineralisierter Knochenfläche leicht zurück. So wies die Gruppe 6 zur Spongiosagruppe einen signifikant niedrigeren Anteil an mineralisierter Knochenfläche (Median 30,89; p=0,007) auf. Die Fibringruppe lag mit 34,82 % im Median nur knapp über dem Ergebnis der Gruppe 6.

| Parameter       | Knochenfläche<br>[%] |               | p-Wert | Min. Knochenfläche<br>[%] |               | p-Wert |
|-----------------|----------------------|---------------|--------|---------------------------|---------------|--------|
|                 | Median               | Min - Max     |        | Median                    | Min - Max     |        |
| <b>Gruppe 1</b> | 79,58                | 77,02 - 87,35 |        | 37,18                     | 32,81 - 56,07 |        |
| <b>Gruppe 2</b> | 72,56                | 59,70 - 83,81 | 0,003  | 34,82                     | 24,24 - 43,13 | 0,195  |
| <b>Gruppe 3</b> | 79,47                | 77,38 - 83,39 | 0,878  | 43,77                     | 38,58 - 45,55 | 0,161  |
| <b>Gruppe 4</b> | 73,72                | 64,91 - 78,21 | 0,005  | 39,43                     | 32,48 - 43,00 | 0,959  |
| <b>Gruppe 5</b> | 74,08                | 68,85 - 82,24 | 0,015  | 39,21                     | 31,72 - 41,20 | 1,000  |
| <b>Gruppe 6</b> | 67,26                | 50,31 - 77,7  | 0,001  | 30,89                     | 24,88 - 37,23 | 0,007  |

Tabelle 5: Darstellung der Knochengewebeverteilung in der Gesamt-ROI in relativen [%] Zahlen; p-Wert bezieht sich auf U-Test nach Mann-Whitney mit Gruppe 1 ( $p \leq 0,05$ )

Die prozentuale Verteilung des Knorpelgewebes war in allen Gruppen sehr ähnlich (Abb. 52). Sie lag bei der Spongiosagruppe bei 4,11 %, signifikant höher war der Knorpelanteil in Gruppe 4 mit 6,15 % ( $p=0,038$ ).

Die niedrigsten Bindegewebeanteile wiesen die Spongiosagruppe und die PTH-Gruppe 3 mit 10,14 und 9,79 % auf. Der Bindegewebeanteil war in der Fibringruppe und den höheren PTH-Konzentrationen größer. Signifikant war dieser Unterschied in Gruppe 4 ( $p=0,028$ ), 5 ( $p=0,003$ ) und 6 ( $p=0,002$ ). Mit Anstieg der PTH-Konzentration stieg auch der Anteil der Bindegewebebefläche. Gruppe 6 hatte mit 20,27 % den größten Bindegewebeanteil in der Gesamt-ROI.

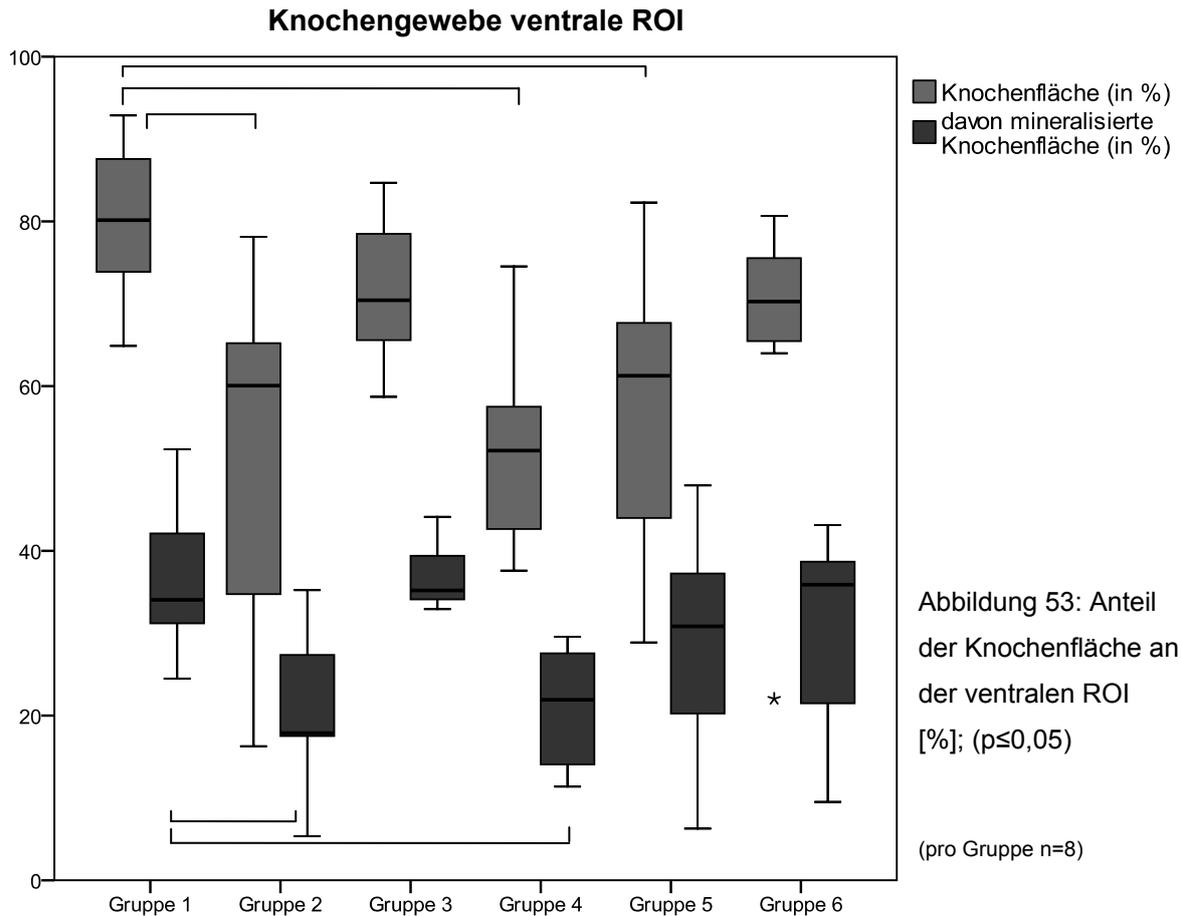


| Parameter       | Knorpelfläche [%] |              | p-Wert | Bindegewebebefläche [%] |               | p-Wert |
|-----------------|-------------------|--------------|--------|-------------------------|---------------|--------|
|                 | Median            | Min - Max    |        | Median                  | Min - Max     |        |
| <b>Gruppe 1</b> | 4,11              | 1,48 - 7,69  |        | 10,14                   | 2,78 - 15,14  |        |
| <b>Gruppe 2</b> | 5,70              | 1,39 - 8,32  | 0,382  | 17,77                   | 6,54 - 29,41  | 0,065  |
| <b>Gruppe 3</b> | 4,92              | 1,30 - 6,84  | 0,645  | 9,79                    | 5,78 - 14,59  | 0,798  |
| <b>Gruppe 4</b> | 6,15              | 4,17 - 10,66 | 0,038  | 13,40                   | 7,38 - 24,16  | 0,028  |
| <b>Gruppe 5</b> | 3,13              | 0,00 - 8,09  | 0,442  | 15,88                   | 9,94 - 20,97  | 0,003  |
| <b>Gruppe 6</b> | 5,64              | 0,00 - 6,66  | 0,505  | 20,27                   | 11,59 - 37,34 | 0,002  |

Tabelle 6: Darstellung der Knorpel- und Bindegewebeverteilung in der Gesamt-ROI in relativen Zahlen [%]; p-Wert bezieht sich auf U-Test nach Mann-Whitney mit Gruppe 1 ( $p \leq 0,05$ )

• **Gewebeverteilung ventrale ROI**

In der ventralen ROI zeigte die Gruppe 1 den größten Knochengewebeanteil mit 80,16 % (Abb. 53). Ähnlich hohe Knochenanteile wiesen Gruppe 3 und 6 mit 70,43 % und 70,27 % auf. Signifikant niedrigere Knochenanteile ergaben sich für die PTH-Gruppen 4 (52,17 %;  $p=0,001$ ) und 5 (61,26 %;  $p=0,005$ ) sowie für die Fibringruppe (60,07 %;  $p=0,002$ ).



Der mineralisierte Knochenanteil war ebenfalls bei der Spongiosagruppe (34,06 %), der Gruppe 3 (35,21 %) und Gruppe 6 (35,90 %) am größten. Niedriger waren die Knochenanteile der Fibringruppe (17,87 %), Gruppe 4 (21,92 %) und 5 (30,83 %). Signifikant war dieser Unterschied allerdings nur für die Fibringruppe ( $p=0,007$ ) und die Gruppe 4 ( $p=0,001$ ).

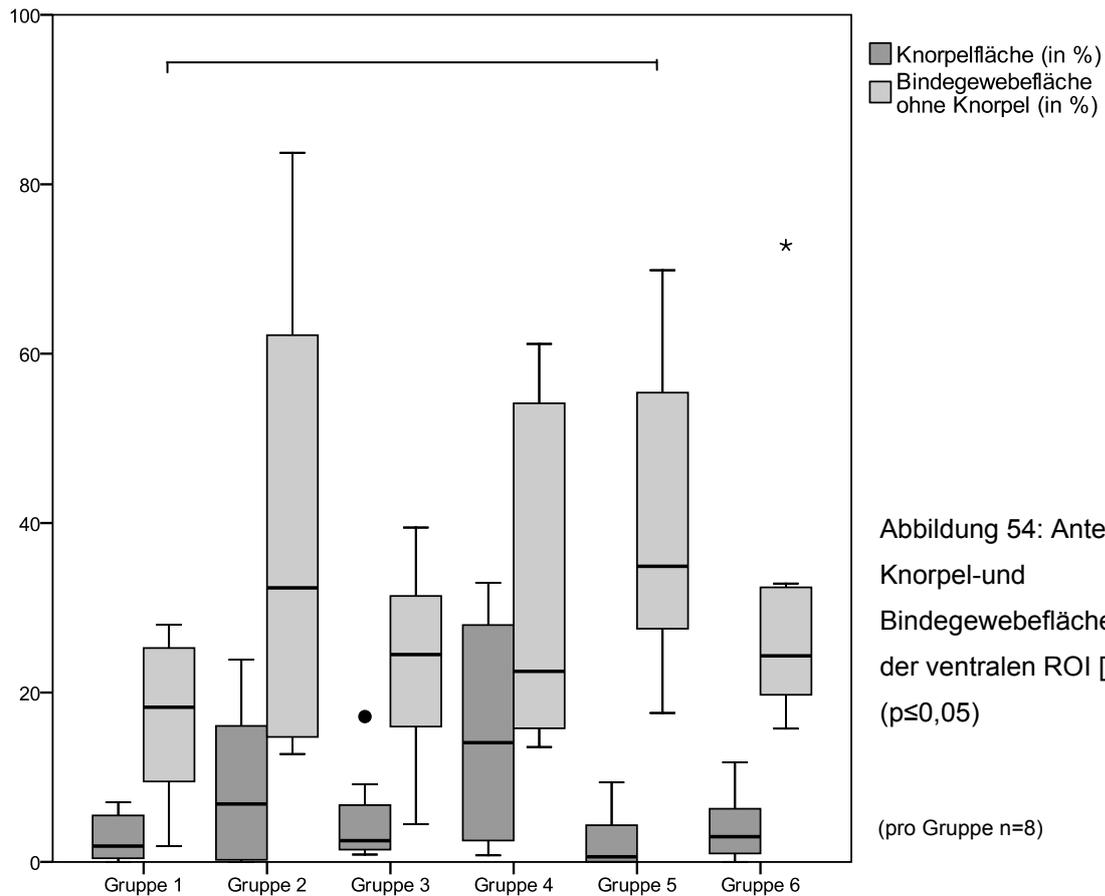
| Parameter       | Knochenfläche [%] |               | p-Wert | Min. Knochenfläche [%] |               | p-Wert |
|-----------------|-------------------|---------------|--------|------------------------|---------------|--------|
|                 | Median            | Min - Max     |        | Median                 | Min - Max     |        |
| <b>Gruppe 1</b> | 80,16             | 64,89 - 92,87 |        | 34,06                  | 24,50 - 52,33 |        |
| <b>Gruppe 2</b> | 60,07             | 16,28 - 78,13 | 0,002  | 17,87                  | 5,38 - 35,24  | 0,007  |
| <b>Gruppe 3</b> | 70,43             | 58,72 - 84,70 | 0,065  | 35,21                  | 32,94 - 44,13 | 0,442  |
| <b>Gruppe 4</b> | 52,17             | 37,59 - 74,54 | 0,001  | 21,92                  | 11,38 - 29,59 | 0,001  |
| <b>Gruppe 5</b> | 61,26             | 28,87 - 82,29 | 0,005  | 30,83                  | 6,28 - 47,95  | 0,442  |
| <b>Gruppe 6</b> | 70,27             | 22,03 - 80,66 | 0,065  | 35,90                  | 9,52 - 43,14  | 0,721  |

Tabelle 7: Darstellung der Knochenfläche in der ventralen ROI in relativen Zahlen [%]; p-Wert bezieht sich auf U-Test nach Mann-Whitney mit Gruppe 1 ( $p \leq 0,05$ )

Bei den Knorpelanteilen der ventralen ROI ergaben sich keine statistisch signifikanten Unterschiede, am größten war der Anteil bei Gruppe 4 mit 14,09 % (Abb. 54).

Den niedrigsten Bindegewebeanteil wies die Spongiosagruppe mit 18,27 % auf. Bei allen anderen Gruppen wurden größere Bindegewebeanteile ermittelt, wobei sich lediglich zur Gruppe 5 ( $p=0,007$ ) ein signifikanter Unterschied ergab. Gruppe 5 hatte mit 34,90 % den größten Bindegewebeanteil der ventralen ROI.

**Knorpel- und Bindegewebe ventrale ROI**

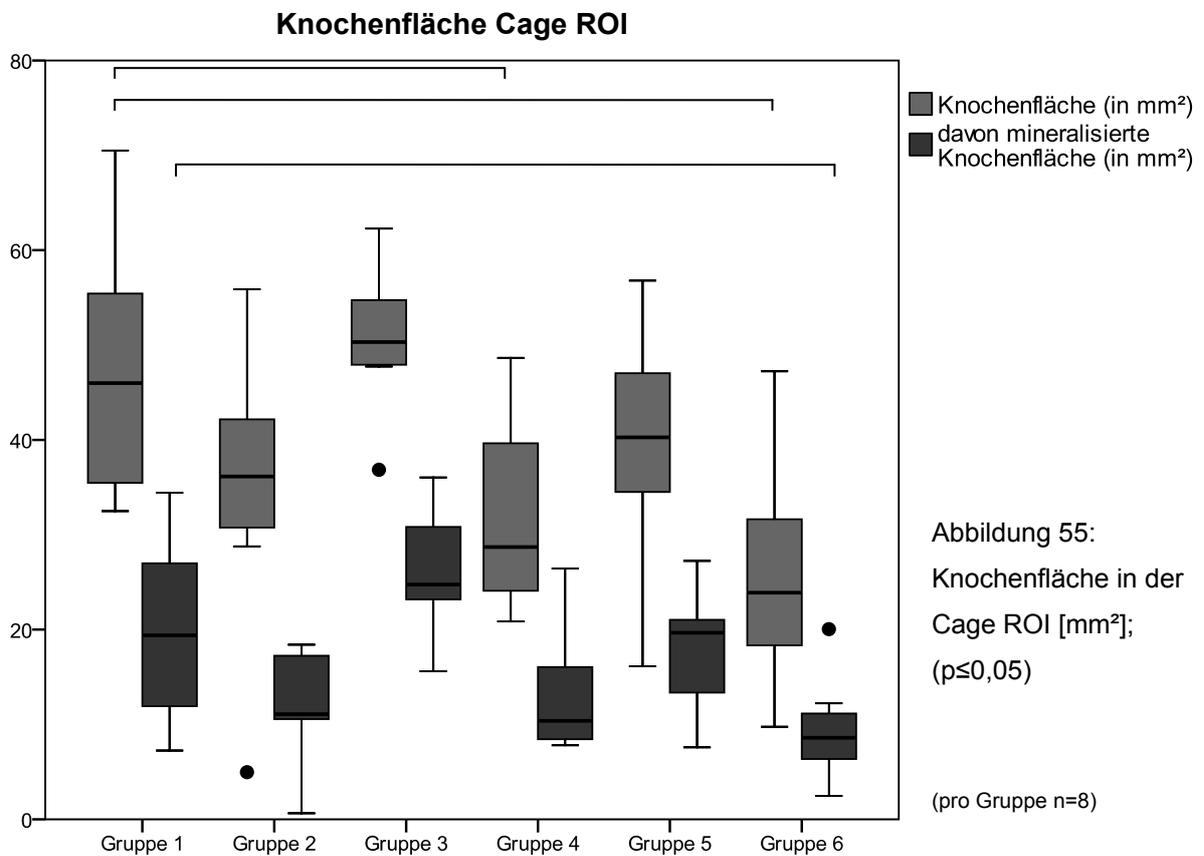


| Parameter       | Knorpelfläche [%] |              | p-Wert | Bindegewebebefläche [%] |               | p-Wert |
|-----------------|-------------------|--------------|--------|-------------------------|---------------|--------|
|                 | Median            | Min - Max    |        | Median                  | Min - Max     |        |
| <b>Gruppe 1</b> | 1,90              | 0,00 - 7,06  |        | 18,27                   | 1,88 - 28,00  |        |
| <b>Gruppe 2</b> | 6,84              | 0,00 - 23,89 | 0,290  | 32,37                   | 12,74 - 83,72 | 0,130  |
| <b>Gruppe 3</b> | 2,51              | 0,88 - 17,16 | 0,442  | 24,48                   | 4,48 - 39,47  | 0,195  |
| <b>Gruppe 4</b> | 14,09             | 0,78 - 32,95 | 0,105  | 22,50                   | 13,58 - 61,15 | 0,328  |
| <b>Gruppe 5</b> | 0,61              | 0,00 - 9,40  | 0,504  | 34,90                   | 17,59 - 69,85 | 0,007  |
| <b>Gruppe 6</b> | 2,98              | 0,00 - 11,77 | 0,668  | 24,33                   | 15,75 - 72,78 | 0,130  |

Tabelle 8: Darstellung der Knorpel- und Bindegewebeverteilung in der ventralen ROI in relativen Zahlen [%]; p-Wert bezieht sich auf U-Test nach Mann-Whitney mit Gruppe 1 ( $p \leq 0,05$ )

• **Cage ROI**

Die Darstellung der Gewebeverteilung der Cage ROI erfolgte in absoluten Zahlen [mm<sup>2</sup>], da sie stets die Gesamtfläche von 84 mm<sup>2</sup> besaß. Die größte Knochenfläche wies Gruppe 3 (50,32 mm<sup>2</sup>) auf (Abb.55). Zur Spongiosagruppe bestand kein statistisch signifikanter Unterschied (45,99 mm<sup>2</sup>). Die Fibringruppe sowie die PTH-Gruppen 4, 5 und 6 hatten geringere Knochenflächen, jedoch war dieser Unterschied nur bei Gruppe 4 ( $p=0,021$ ) und 6 ( $p=0,003$ ) statistisch signifikant.



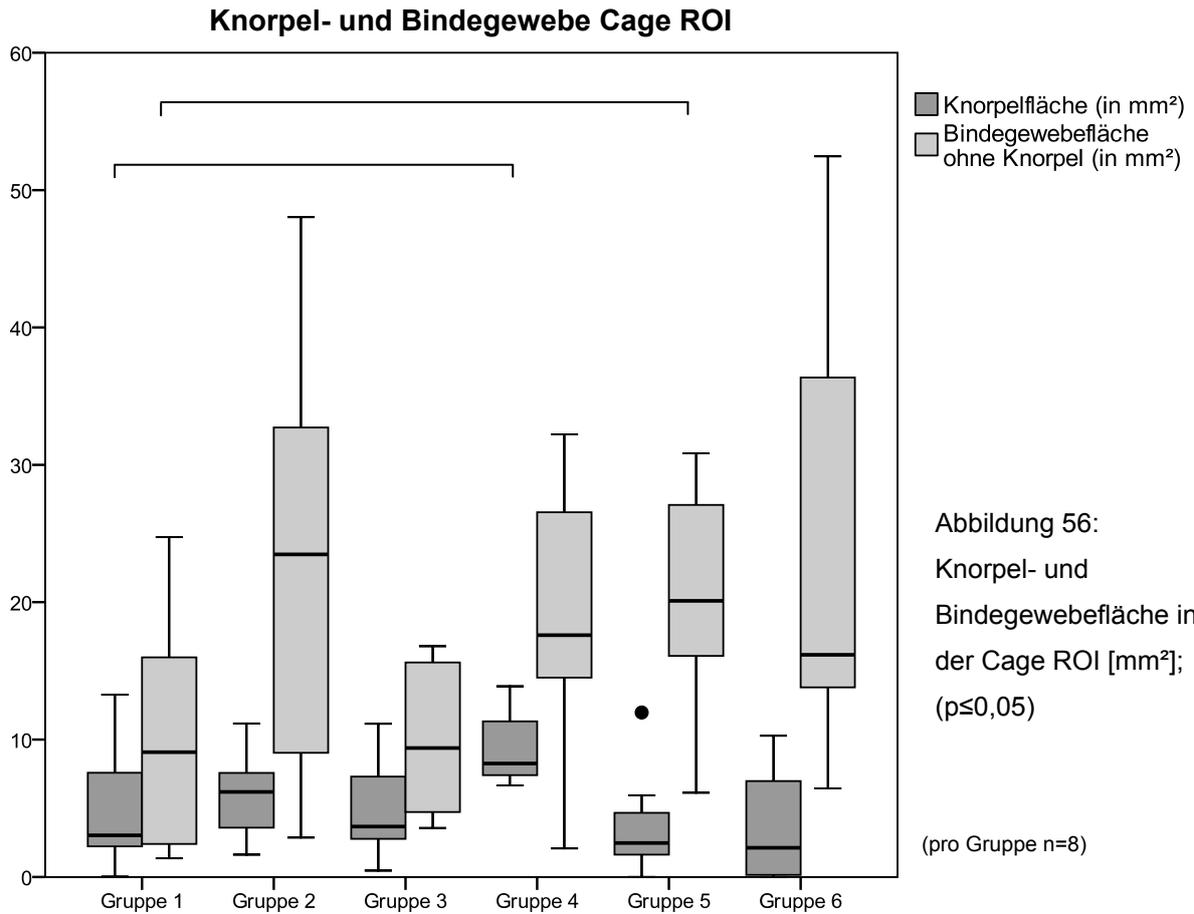
Die mineralisierte Knochenfläche war auch bei Gruppe 3 am größten (24,76 mm<sup>2</sup>), gefolgt von Gruppe 5 und der Spongiosagruppe. Die PTH-Gruppen 4 und 6, sowie die Fibringruppe hatten niedrigere mineralisierte Knochenflächen, wobei der Unterschied nur zur Gruppe 6 ( $p=0,015$ ) signifikant war.

| Parameter       | Knochenfläche<br>[mm <sup>2</sup> ] |               | p-Wert | Min.Knochenfläche<br>[mm <sup>2</sup> ] |               | p-Wert |
|-----------------|-------------------------------------|---------------|--------|---|---------------|--------|
|                 | Median                              | Min - Max     |        | Median                                  | Min - Max     |        |
| <b>Gruppe 1</b> | 45,99                               | 32,50 - 70,50 |        | 19,40                                   | 7,25 - 34,43  |        |
| <b>Gruppe 2</b> | 36,14                               | 4,97 - 55,88  | 0,195  | 11,09                                   | 0,64 - 18,41  | 0,105  |
| <b>Gruppe 3</b> | 50,32                               | 36,85 - 62,28 | 0,574  | 24,76                                   | 15,62 - 36,05 | 0,234  |
| <b>Gruppe 4</b> | 28,72                               | 20,86 - 48,65 | 0,021  | 10,38                                   | 7,81 - 26,45  | 0,161  |
| <b>Gruppe 5</b> | 40,26                               | 16,13 - 56,79 | 0,382  | 19,67                                   | 7,59 - 27,25  | 0,721  |
| <b>Gruppe 6</b> | 23,89                               | 9,76 - 47,23  | 0,003  | 8,60                                    | 2,47 - 20,05  | 0,015  |

Tabelle 9: Darstellung der Knochenfläche in der Cage ROI in absoluten Zahlen [mm<sup>2</sup>]; p-Wert bezieht sich auf U-Test nach Mann-Whitney mit Gruppe 1 ( $p \leq 0,05$ )

Die Knorpelfläche der Gruppe 4 war mit 8,26 mm<sup>2</sup> statistisch signifikant größer als die der Spongiosagruppe (Abb. 56). Die anderen Gruppen zeigten weniger Knorpelfläche, ein statistisch signifikanter Unterschied zur Spongiosagruppe war jedoch bei keiner dieser Gruppen festzustellen.

Am wenigsten Bindegewebe konnte in der Spongiosagruppe gemessen werden mit 9,08 mm<sup>2</sup>. Ein vergleichbares Ergebnis erzielte die PTH-Gruppe 3 mit 9,39 mm<sup>2</sup>. In der Fibringruppe, sowie der PTH-Gruppen 4, 5 und 6 waren stets größere Bindegewebebeflächen messbar. Dieser Unterschied war in Gruppe 5 ( $p=0,038$ ) auch statistisch signifikant.

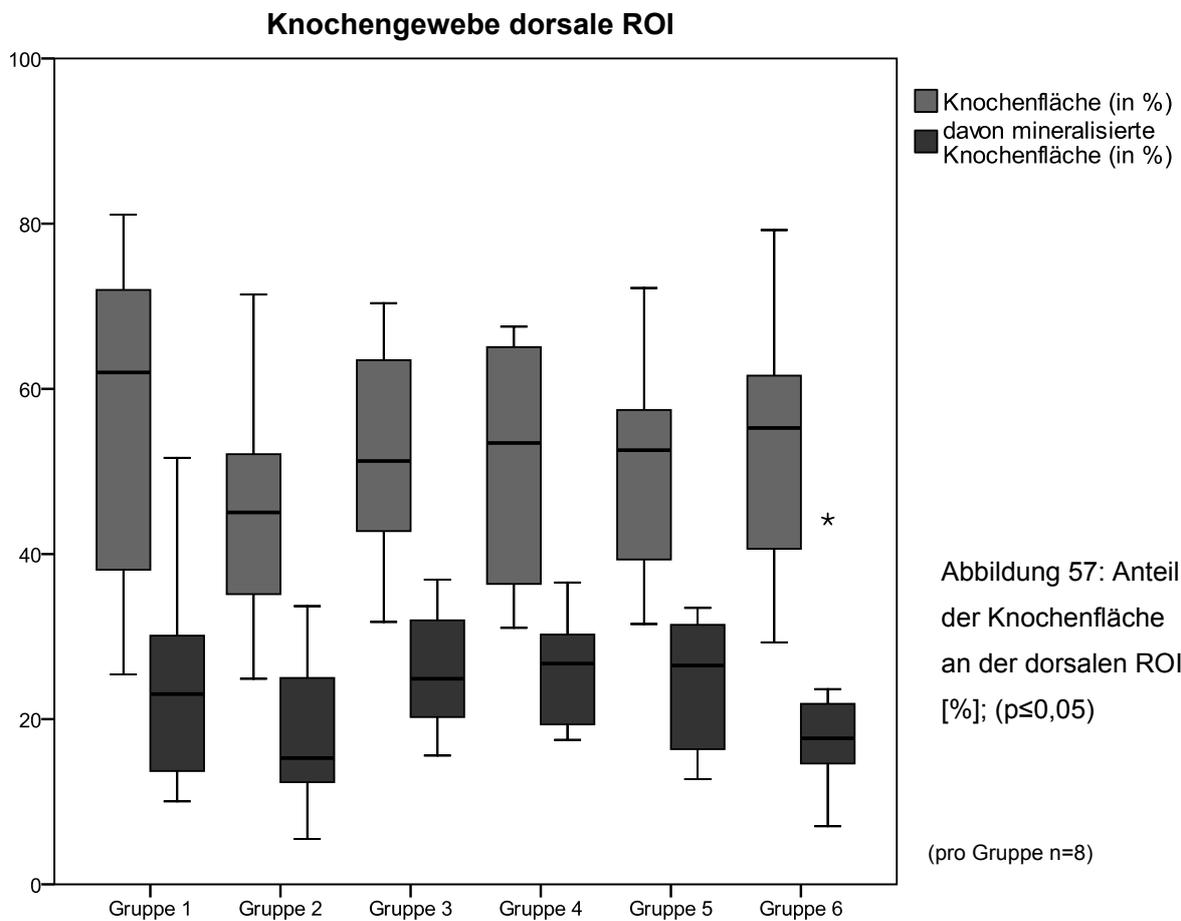


| Parameter       | Knorpelfläche [mm <sup>2</sup> ] |              | p-Wert | Bindegewebebefläche [mm <sup>2</sup> ] |              | p-Wert |
|-----------------|----------------------------------|--------------|--------|--|--------------|--------|
|                 | Median                           | Min - Max    |        | Median                                 | Min - Max    |        |
| <b>Gruppe 1</b> | 3,03                             | 0,02 - 13,27 |        | 9,08                                   | 1,36 - 24,74 |        |
| <b>Gruppe 2</b> | 6,19                             | 1,62 - 11,17 | 0,505  | 23,48                                  | 2,87 - 48,03 | 0,083  |
| <b>Gruppe 3</b> | 3,67                             | 0,46 - 11,15 | 0,789  | 9,39                                   | 3,56 - 16,80 | 0,798  |
| <b>Gruppe 4</b> | 8,26                             | 6,67 - 13,88 | 0,050  | 17,61                                  | 2,08 - 32,22 | 0,083  |
| <b>Gruppe 5</b> | 2,47                             | 0,00 - 11,97 | 0,524  | 20,10                                  | 6,13 - 30,83 | 0,038  |
| <b>Gruppe 6</b> | 2,13                             | 0,00 - 10,28 | 0,367  | 16,17                                  | 6,45 - 52,46 | 0,083  |

Tabelle 10: Darstellung der Knorpel- und Bindegewebebefläche in der Cage ROI in absoluten Zahlen [mm<sup>2</sup>]; p-Wert bezieht sich auf U-Test nach Mann-Whitney mit Gruppe 1 (p≤0,05)

• **Dorsale ROI**

Weder im Knochenanteil noch im mineralisierten Knochenanteil konnte in der dorsalen ROI im Vergleich mit der Spongiosagruppe ein statistisch signifikanter Unterschied festgestellt werden (Abb. 57). Der Knochenanteil war in der Spongiosagruppe mit 62,00 % am größten und am niedrigsten in der Fibringruppe mit 45,05 %. Innerhalb der Parathormongruppen konnte ein leichter Anstieg der Knochenanteile mit höherer Parathormonkonzentration festgestellt werden.



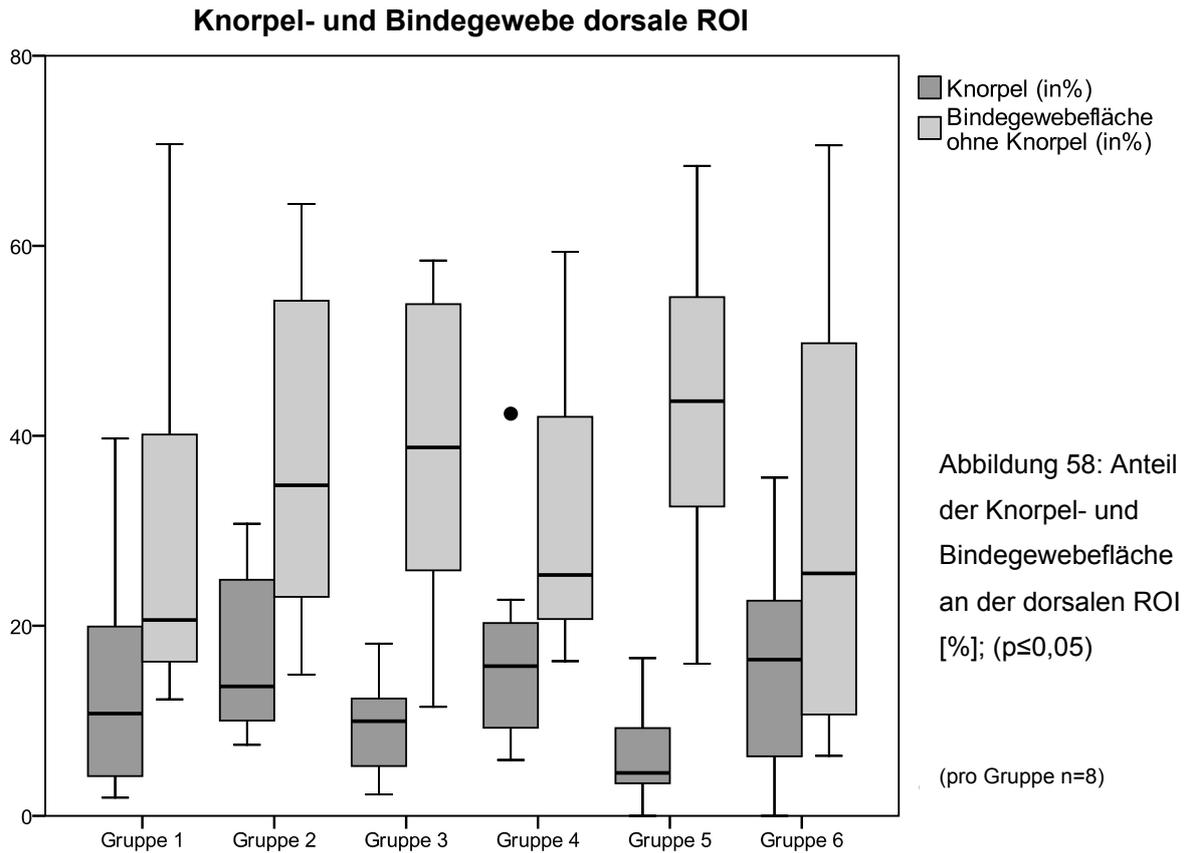
Beim mineralisierten Knochenanteil bestand im Vergleich zur Spongiosagruppe kein statistisch signifikanter Unterschied. Den geringsten mineralisierten Knochenanteil wies die Fibringruppe mit 15,28 % auf. Den größte mineralisierte Knochenanteil wies Gruppe 4 mit 26,74 % der dorsalen ROI auf.

| Parameter       | Knochenfläche<br>[%] |               | p-Wert | Min.Knochenfläche<br>[%] |               | p-Wert |
|-----------------|----------------------|---------------|--------|--------------------------|---------------|--------|
|                 | Median               | Min - Max     |        | Median                   | Min - Max     |        |
| <b>Gruppe 1</b> | 62,00                | 25,43 - 81,08 |        | 23,05                    | 10,05 - 51,65 |        |
| <b>Gruppe 2</b> | 45,05                | 24,90 - 71,42 | 0,279  | 15,28                    | 5,49 - 33,69  | 0,574  |
| <b>Gruppe 3</b> | 51,26                | 31,77 - 70,37 | 0,645  | 24,89                    | 15,60 - 36,90 | 0,721  |
| <b>Gruppe 4</b> | 53,44                | 31,05 - 67,53 | 0,721  | 26,74                    | 17,50 - 36,56 | 0,442  |
| <b>Gruppe 5</b> | 52,57                | 31,53 - 72,21 | 0,505  | 26,51                    | 12,73 - 33,49 | 0,645  |
| <b>Gruppe 6</b> | 55,25                | 29,31 - 79,23 | 0,645  | 17,69                    | 7,05 - 44,18  | 0,505  |

Tabelle 11: Darstellung der Knochenfläche in der dorsalen ROI in relativen Zahlen [%]; p-Wert bezieht sich auf U-Test nach Mann-Whitney mit Gruppe 1 ( $p \leq 0,05$ )

Auch bei der prozentualen Verteilung der Knorpel- und Bindegewebefläche an der dorsalen ROI gab es im Vergleich mit der Spongiosagruppe keine signifikanten Unterschiede (Abb. 58). Der Knorpelanteil war in Gruppe 3 am geringsten (13,61 %) und in Gruppe 6 (16,44 %) am größten.

Der Anteil des Bindegewebes war in der Spongiosagruppe am kleinsten (20,62 %), in Gruppe 5 am größten (43,64 %).

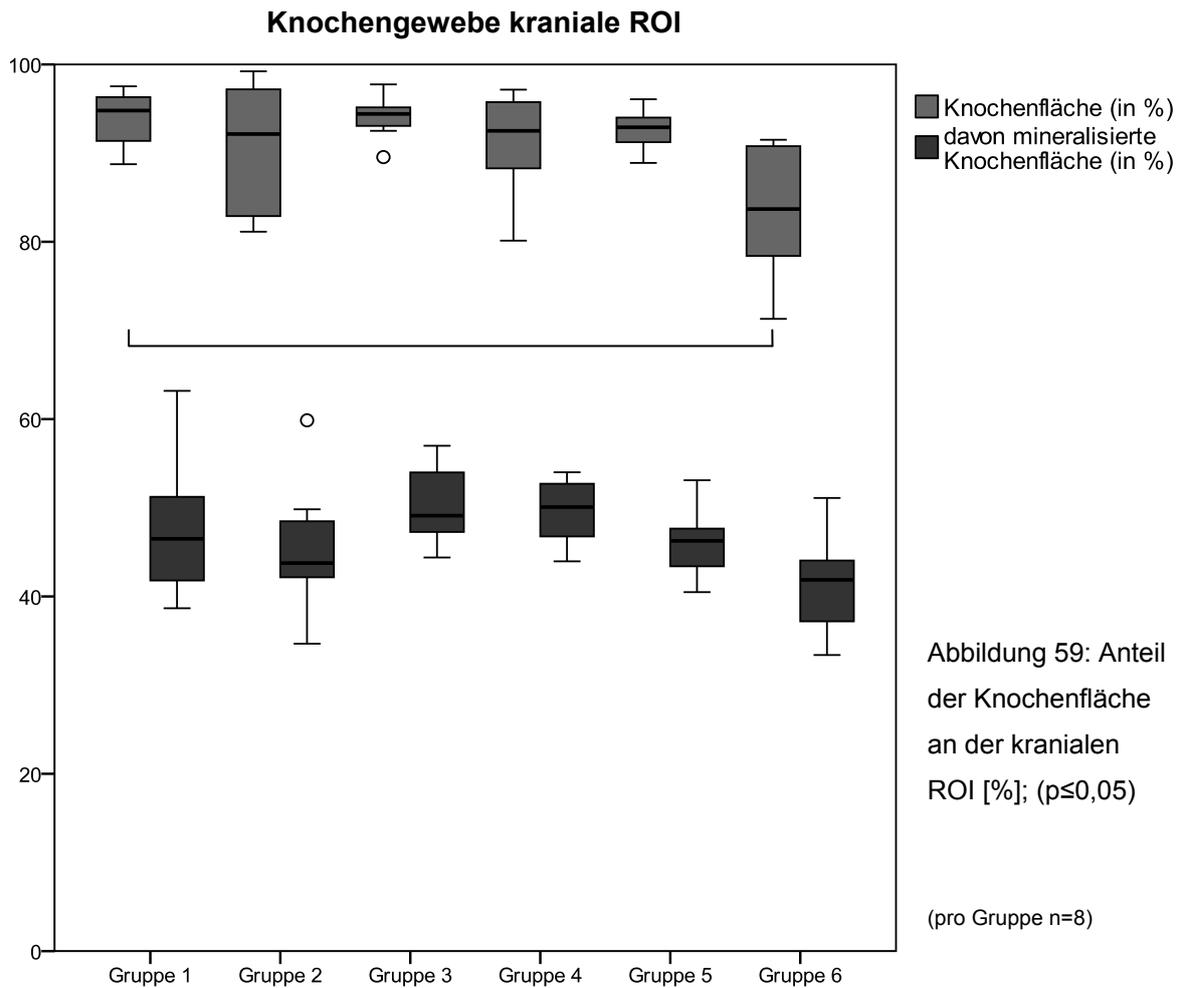


| Parameter       | Knorpelfläche [%] |              | p-Wert | Bindegewebe Fläche [%] |               | p-Wert |
|-----------------|-------------------|--------------|--------|------------------------|---------------|--------|
|                 | Median            | Min - Max    |        | Median                 | Min - Max     |        |
| <b>Gruppe 1</b> | 10,76             | 1,92 - 39,71 |        | 20,62                  | 12,26 - 70,72 |        |
| <b>Gruppe 2</b> | 13,61             | 7,48 - 30,75 | 0,442  | 34,80                  | 14,87 - 64,40 | 0,382  |
| <b>Gruppe 3</b> | 9,96              | 2,25 - 18,12 | 0,574  | 38,77                  | 11,48 - 58,44 | 0,279  |
| <b>Gruppe 4</b> | 15,76             | 5,88 - 42,33 | 0,382  | 25,35                  | 16,28 - 59,37 | 0,442  |
| <b>Gruppe 5</b> | 4,52              | 0,00 - 16,59 | 0,195  | 43,64                  | 16,01 - 68,41 | 0,161  |
| <b>Gruppe 6</b> | 16,44             | 0,00 - 35,60 | 0,645  | 25,51                  | 6,31 - 70,57  | 0,878  |

Tabelle 12: Darstellung der Knorpel- und Bindegewebe Fläche in der dorsalen ROI in relativen Zahlen [%]; p-Wert bezieht sich auf U-Test nach Mann-Whitney mit Gruppe 1 ( $p \leq 0,05$ )

• **Kraniale ROI**

Der größte Knochenanteil der kranialen ROI lag bei der Spongiosagruppe (94,79 %) und der Gruppe 3 (94,42 %) vor (Abb. 59). Die Fibringruppe und die Gruppe 4 und 5 lagen mit 92,15 %, 92,59 % und 92,90 % nur knapp darunter. Die Gruppe 6 wies einen signifikant geringeren Knochenanteil auf als die Spongiosagruppe (83,69 %;  $p=0,005$ ).

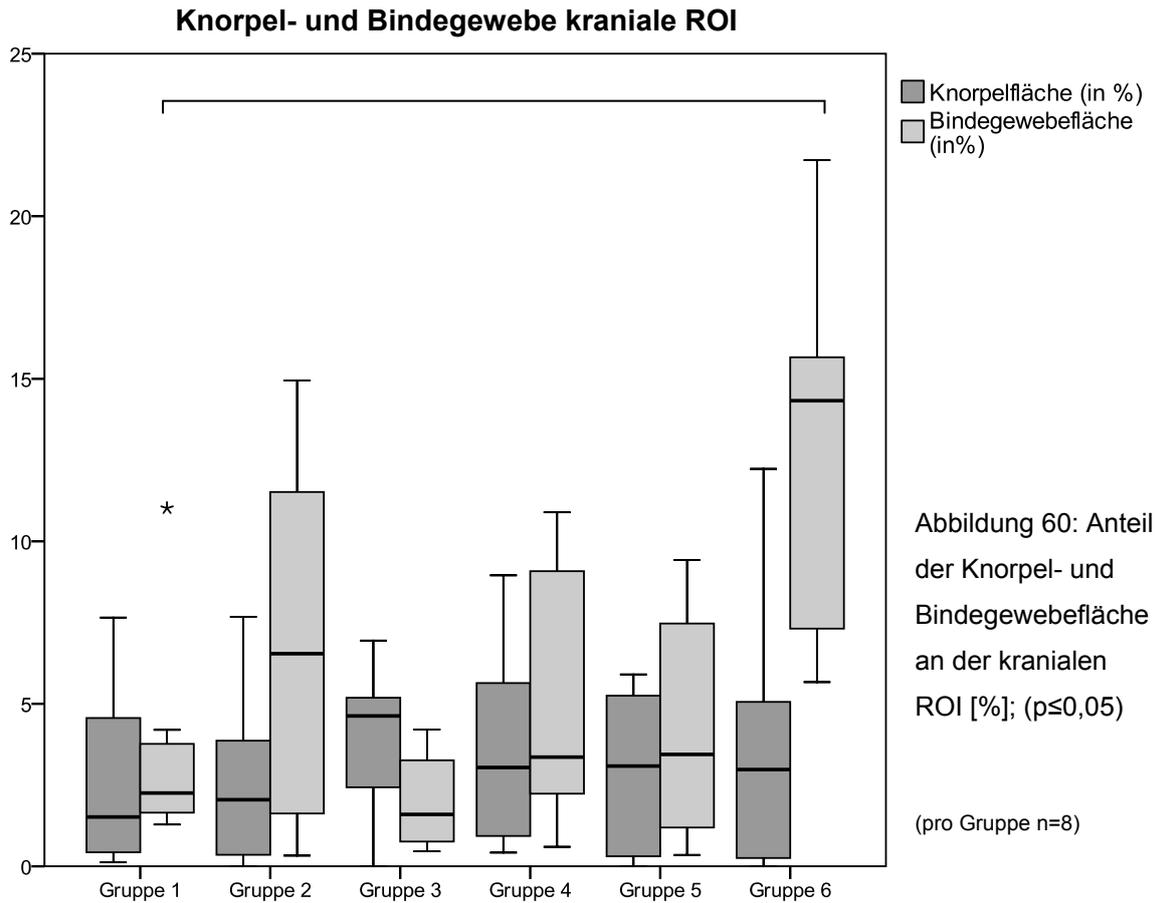


Zwischen dem mineralisierten Knochenanteil der Spongiosagruppe und den Versuchsgruppen bestand kein signifikanter Unterschied. Die größte mineralisierte Knochenfläche lag bei 49,10 % in Gruppe 3 und in Gruppe 4 bei 50,07 %. Mit höherer Parathormonkonzentration sank die mineralisierte Knochenfläche leicht ab. Die Gruppe 6 zeigte die kleinste mineralisierte Knochenfläche mit 41,87 %.

| Parameter       | Knochenfläche [%] |               | p-Wert | Min. Knochenfläche [%] |               | p-Wert |
|-----------------|-------------------|---------------|--------|------------------------|---------------|--------|
|                 | Median            | Min-Max       |        | Median                 | Min-Max       |        |
| <b>Gruppe 1</b> | 94,79             | 88,74 - 97,52 |        | 46,49                  | 38,66 - 63,18 |        |
| <b>Gruppe 2</b> | 92,15             | 81,13 - 99,22 | 0,721  | 43,75                  | 34,67 - 59,85 | 0,798  |
| <b>Gruppe 3</b> | 94,42             | 89,54 - 97,74 | 0,959  | 49,10                  | 44,39 - 56,98 | 0,382  |
| <b>Gruppe 4</b> | 92,50             | 80,11 - 97,15 | 0,505  | 50,07                  | 43,96 - 53,99 | 0,279  |
| <b>Gruppe 5</b> | 92,90             | 88,88 - 96,07 | 0,328  | 46,27                  | 40,48 - 53,10 | 1,000  |
| <b>Gruppe 6</b> | 83,69             | 71,31 - 91,50 | 0,005  | 41,87                  | 33,39 - 51,11 | 0,234  |

Tabelle 13: Darstellung der Knochenfläche in der kranialen ROI in relativen Zahlen [%]; p-Wert bezieht sich auf U-Test nach Mann-Whitney mit Gruppe 1 ( $p \leq 0,05$ )

Im Bezug auf die Knorpelanteile existierten keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen (Abb. 60). Den größten Knorpelanteil der kranialen ROI besaß Gruppe 3 mit 4,63 %. Den kleinsten Knorpelanteil mit 1,52 % hatte die Spongiosakontrollgruppe. Am wenigsten Bindegewebe kam in Gruppe 3 (1,59 %) und der Spongiosagruppe (2,25 %) vor. Gruppe 6 wies im Vergleich mit der Spongiosagruppe statistisch signifikant mehr Bindegewebeanteil auf (14,33 %;  $p=0,001$ ).

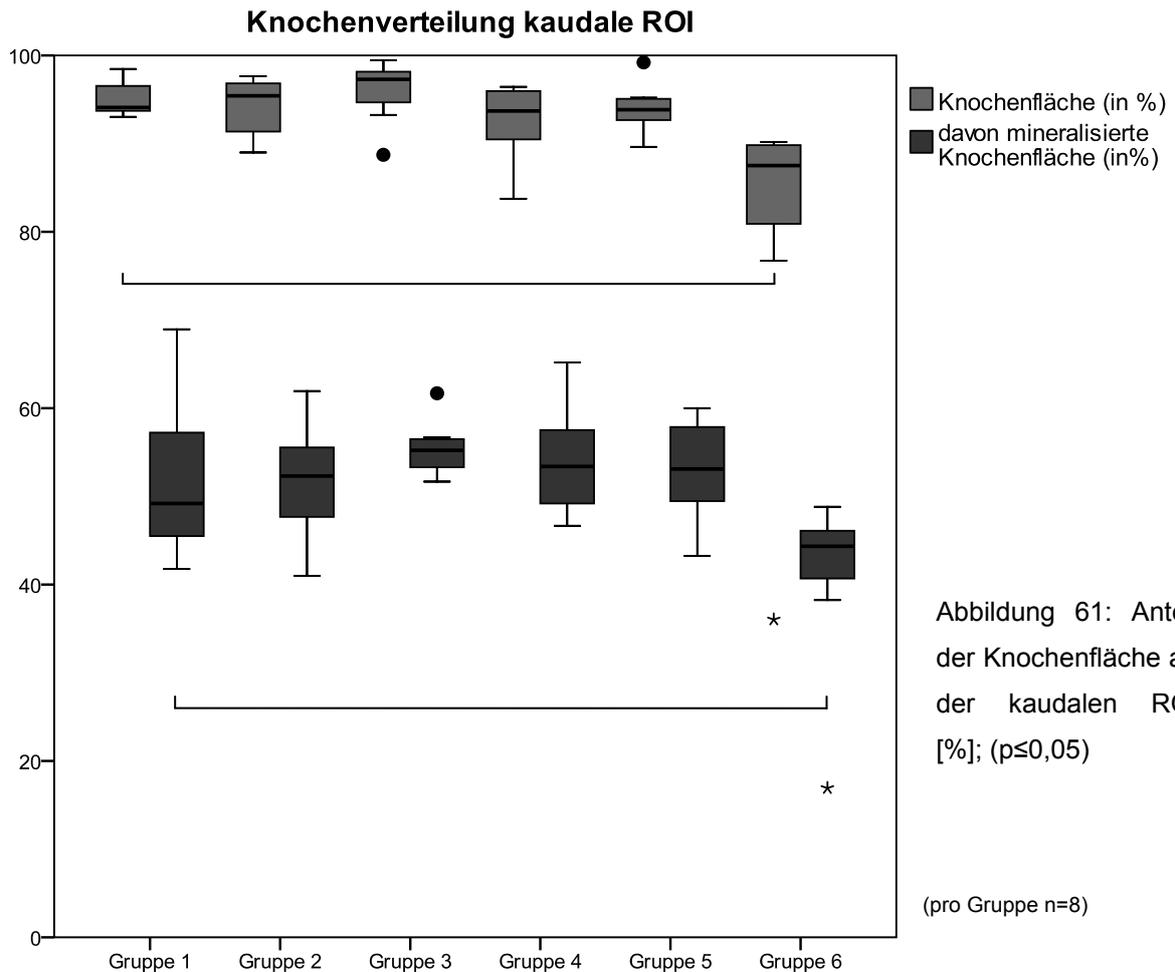


| Parameter       | Knorpelfläche [%] |              | p-Wert | Bindegewebebefläche [%] |              | p-Wert |
|-----------------|-------------------|--------------|--------|-------------------------|--------------|--------|
|                 | Median            | Min-Max      |        | Median                  | Min-Max      |        |
| <b>Gruppe 1</b> | 1,52              | 0,12 - 7,65  |        | 2,25                    | 1,28 - 11,02 |        |
| <b>Gruppe 2</b> | 2,05              | 0,00 - 7,68  | 1,000  | 6,54                    | 0,33 - 14,95 | 0,574  |
| <b>Gruppe 3</b> | 4,63              | 0,00 - 6,95  | 0,442  | 1,59                    | 0,46 - 4,21  | 0,328  |
| <b>Gruppe 4</b> | 3,04              | 0,42 - 8,95  | 0,505  | 3,36                    | 0,60 - 10,89 | 0,442  |
| <b>Gruppe 5</b> | 3,08              | 0,00 - 5,90  | 0,878  | 3,44                    | 0,35 - 9,42  | 0,878  |
| <b>Gruppe 6</b> | 2,97              | 0,00 - 12,23 | 0,959  | 14,33                   | 5,67 - 21,72 | 0,001  |

Tabelle 14: Darstellung der Knorpel- und Bindegewebebefläche in der kranialen ROI in relativen Zahlen [%]; p-Wert bezieht sich auf U-Test nach Mann-Whitney mit Gruppe 1 ( $p \leq 0,05$ )

• **Kaudale ROI**

Der Knochenanteil der kaudalen ROI war in der Gruppe 3 mit 97,28 % im Median am größten (Abb. 61). Alle anderen Gruppen wiesen geringere Knochenanteile auf. In den vier PTH-Gruppen nahmen die Knochenanteile mit zunehmender PTH-Konzentration ab. Der Knochenanteil der Gruppe 6 war signifikant ( $p=0,000$ ) geringer als der der Spongiosagruppe.



Beim mineralisierten Knochenanteil zeigte sich ein ähnliches Bild. Die Gruppe 3 hatte den größten Anteil mineralisierten Knochens mit 55,22 % im Median. Mit höherer PTH-Konzentration wurde der Anteil an mineralisiertem Knochen weniger. Eine signifikant niedrigerer mineralisierter Knochenanteil in Gruppe 6 wurde im Vergleich zur Spongiosagruppe ( $p=0,038$ ) festgestellt.

| Parameter       | Knochenfläche<br>[%] |               | p-Wert | Min. Knochenfläche<br>[%] |               | p-Wert |
|-----------------|----------------------|---------------|--------|---------------------------|---------------|--------|
|                 | Median               | Min-Max       |        | Median                    | Min-Max       |        |
| <b>Gruppe 1</b> | 94,11                | 93,05 - 98,46 |        | 49,20                     | 41,78 - 68,95 |        |
| <b>Gruppe 2</b> | 95,43                | 89,00 - 97,65 | 0,798  | 52,32                     | 41,00 - 61,94 | 0,878  |
| <b>Gruppe 3</b> | 97,28                | 88,73 - 99,46 | 0,328  | 55,22                     | 51,68 - 61,70 | 0,279  |
| <b>Gruppe 4</b> | 93,70                | 83,75 - 96,45 | 0,328  | 53,40                     | 46,66 - 65,20 | 0,382  |
| <b>Gruppe 5</b> | 93,85                | 89,64 - 99,21 | 0,382  | 53,11                     | 43,26 - 60,01 | 0,442  |
| <b>Gruppe 6</b> | 87,52                | 36,05 - 90,19 | 0,000  | 44,35                     | 16,93 - 48,82 | 0,038  |

Tabelle 15: Darstellung der Knochenfläche in der kaudale ROI in relativen Zahlen [%]; p-Wert bezieht sich auf U-Test nach Mann-Whitney mit Gruppe 1 ( $p \leq 0,05$ )

In der kaudalen ROI war in allen Gruppen nur wenig Knorpel messbar (Abb. 62). Den größten Anteil Knorpel an der kaudalen ROI besaß die Spongiosagruppe mit 1,52 % im Median. Alle anderen Gruppen hatten etwas weniger Knorpel, allerdings war dieser Unterschied statistisch nicht signifikant.

Insgesamt war auch in dieser ROI nur sehr wenig Bindegewebe bei allen Tieren nachzuweisen. Am wenigsten Bindegewebe kam in der Spongiosagruppe (1,87 %) und in der Gruppe 3 (1,28 %) vor. Die anderen Gruppen wiesen größere Bindegewebeanteile auf. Statistisch signifikant größere Bindegewebeanteile wiesen Gruppe 4 ( $p=0,015$ ) und 6 ( $p=0,000$ ) im Vergleich zur Spongiosagruppe auf.

**Knorpel- und Bindegewebe kaudale ROI**

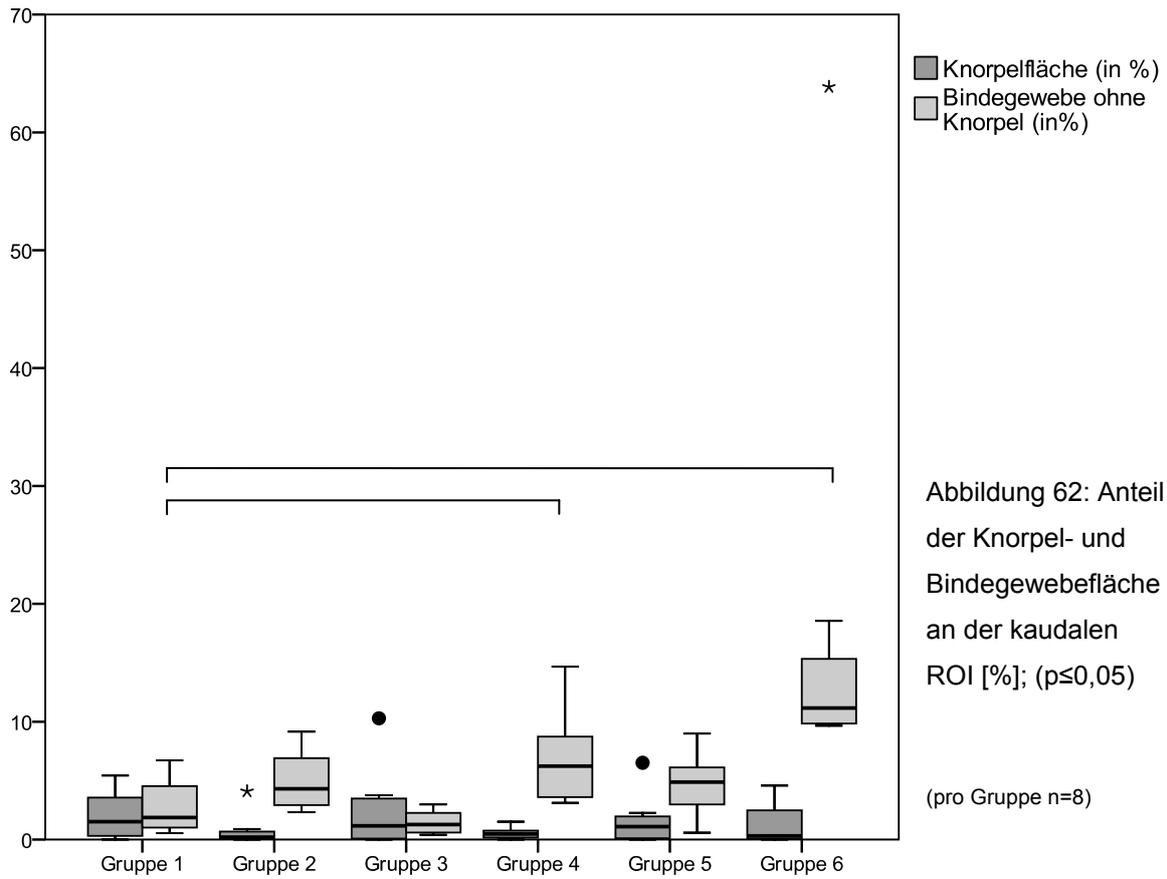


Abbildung 62: Anteil der Knorpel- und Bindegewebefläche an der kaudalen ROI [%]; (p≤0,05)

(pro Gruppe n=8)

| Parameter       | Knorpelfläche [%] |              | p-Wert | Bindegewebefläche [%] |              | p-Wert |
|-----------------|-------------------|--------------|--------|-----------------------|--------------|--------|
|                 | Median            | Min - Max    |        | Median                | Min - Max    |        |
| <b>Gruppe 1</b> | 1,52              | 0,00 - 5,43  |        | 1,87                  | 0,55 - 6,71  |        |
| <b>Gruppe 2</b> | 0,21              | 0,00 - 4,09  | 0,194  | 4,30                  | 2,34 - 9,15  | 0,065  |
| <b>Gruppe 3</b> | 1,16              | 0,00 - 10,29 | 0,720  | 1,28                  | 0,41 - 2,98  | 0,195  |
| <b>Gruppe 4</b> | 0,48              | 0,00 - 1,52  | 0,167  | 6,24                  | 3,11 - 14,66 | 0,015  |
| <b>Gruppe 5</b> | 1,10              | 0,00 - 6,52  | 0,720  | 4,88                  | 0,59 - 8,99  | 0,195  |
| <b>Gruppe 6</b> | 0,31              | 0,00 - 4,58  | 0,398  | 11,16                 | 9,65 - 63,85 | 0,000  |

Tabelle 16: Darstellung der Knorpel- und Bindegewebefläche in der kaudalen ROI in relativen Zahlen [%]; p-Wert bezieht sich auf U-Test nach Mann-Whitney mit Gruppe 1 (p≤0,05)

### 4.2.3 Fusionsscore

In die Beurteilung der Wirbelfusion anhand eines Fusionsscores gingen die Schnitte aller 48 Tiere in der kombinierten Safranin Orange/von Kossa-Färbung ein.

| F-Score | Gruppe 1<br>(Spongiosa-<br>gruppe) | Gruppe 2<br>(Fibrin-<br>gruppe) | Gruppe 3<br>(0,2 mg) | Gruppe 4<br>(0,4 mg) | Gruppe 5<br>(0,7 mg) | Gruppe 6<br>(1,0 mg) |
|---------|------------------------------------|---------------------------------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|
| F1      | 3                                  | 0                               | 3                    | 1                    | 3                    | 0                    |
|         | 37,5 %                             | 00,0 %                          | 37,5%                | 12,5 %               | 37,5 %               | 0,00 %               |
| F2      | 1                                  | 2                               | 4                    | 2                    | 3                    | 3                    |
|         | 12,5 %                             | 25,0 %                          | 50,0 %               | 25,0 %               | 37,5 %               | 37,5 %               |
| F3      | 4                                  | 6                               | 1                    | 5                    | 2                    | 5                    |
|         | 50 %                               | 75,0 %                          | 12,5 %               | 62,5 %               | 25,0 %               | 62,5 %               |

Tabelle 17: Darstellung des Fusionsscores in absoluten und relativen Zahlen [%] (n=8) [F1=Cage war zu mehr als 50 % knöchern überbrückt (komplette Fusion)/F2=weniger als 50 % des Cages waren knöchern überbrückt (partielle Fusion)/F3=keine knöcherne Überbrückung (keine Fusion)]

Bei der statistischen Auswertung mittels Chi- Quadrat- Test nach Pearson konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen ermittelt werden (Wert 13,913; p= 0,182).

Mit 37,5 % wurde der F1-Scorewert am häufigsten in der Spongiosagruppe, der PTH-Gruppe 3 (0,2 mg PTH<sub>1-34</sub> / ml) und 5 (0,7 mg PTH<sub>1-34</sub> / ml) vergeben. Bei diesen Schafen waren dritter und vierter Halswirbel im Inneren des entnommenen Titanimplantates zu mehr als 50 % knöchern überbrückt. In der Spongiosagruppe erhielt nur ein Tier den F2-Scorewert. Die Hälfte der Tiere dieser Gruppe wurde sogar mit dem F3-Scorewert für eine nicht stattgefundene Fusion bewertet. Am häufigsten wurde der F2-Scorewert mit 50 % der Tiere in der Gruppe 3 vergeben. Die Fibringruppe wies mit 75 % insgesamt die höchste Anzahl an nicht fusionierten Wirbelsäulen auf, gefolgt von der PTH-Gruppe 6 (1,0 mg PTH<sub>1-34</sub> / ml) und 4 (0,4 mg PTH<sub>1-34</sub> / ml) mit jeweils 62,5 %.

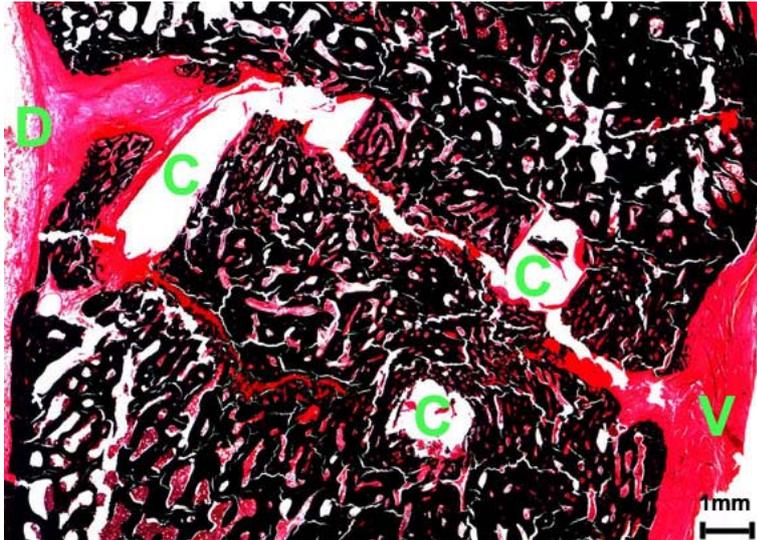


Abbildung 63: Beispiel für ein mit F1 bewertetes Wirbelsäulensegment  
D= dorsal; V= ventral;  
C= entnommener Cage  
(kombinierte Safranin Orange/von Kossa-Färbung;  
Gruppe 1/Spongiosagruppe;  
Schaf 57)

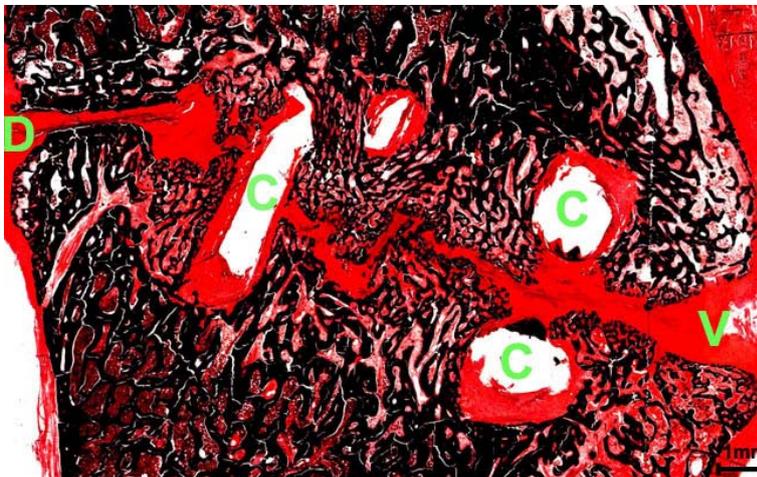


Abbildung 64: Beispiel für ein mit F2 bewertetes Wirbelsäulensegment  
D= dorsal; V= ventral;  
C= entnommener Cage  
(kombinierte Safranin Orange/von Kossa-Färbung;  
Gruppe 6 (1,0 mg PTH<sub>1-34</sub> / ml);  
Schaf 31)

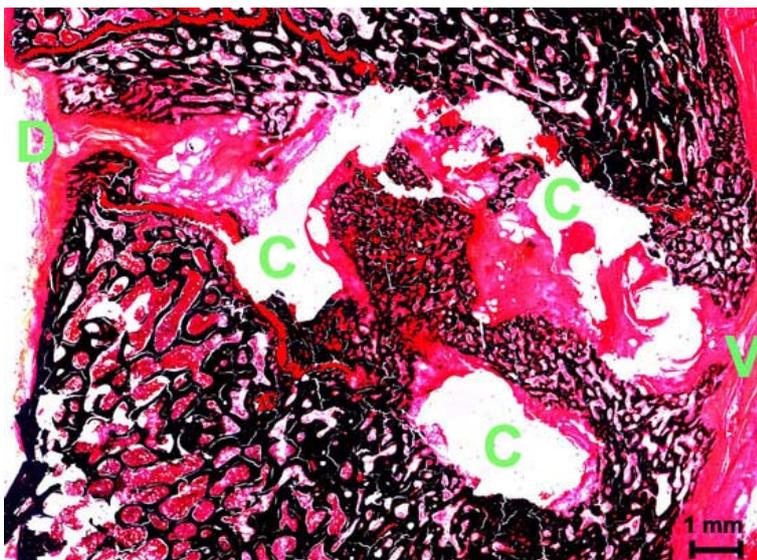


Abbildung 65: Beispiel für ein mit F3 bewertetes Wirbelsäulensegment  
D= dorsal; V= ventral;  
C= entnommener Cage  
(kombinierte Safranin Orange/von Kossa-Färbung;  
Gruppe 1 /Spongiosagruppe;  
Schaf 50)

#### **4.2.4 Vaskularisierung**

Zur Gefäßzählung wurde von jedem der 48 Schafe ein Paraffinschnitt mit der immunhistochemischen  $\alpha$ -SMA-Färbung verwendet. Die Auszählung der Gefäße erfolgte in den fünf verschiedenen Teil-ROIs wie bei der histomorphometrischen Analyse beschrieben. Insgesamt ergaben sich in keiner der ROIs statistisch signifikante Unterschiede im Vergleich der Gefäßdichte der Spongiosagruppe mit der der Fibringruppe und den vier PTH-Gruppen, mit Ausnahme von Gruppe 6 in der dorsalen ROI. Hier war die Gefäßdichte der höchsten PTH-Konzentration signifikant geringer als die der Spongiosagruppe.

• **Gesamt ROI**

Die Gefäßdichte reichte in dieser ROI von 1,19 Gefäße pro mm<sup>2</sup> Bindegewebe der Gruppe 6 bis hin zu 1,98 Gefäße pro mm<sup>2</sup> Bindegewebe der Gruppe 3.

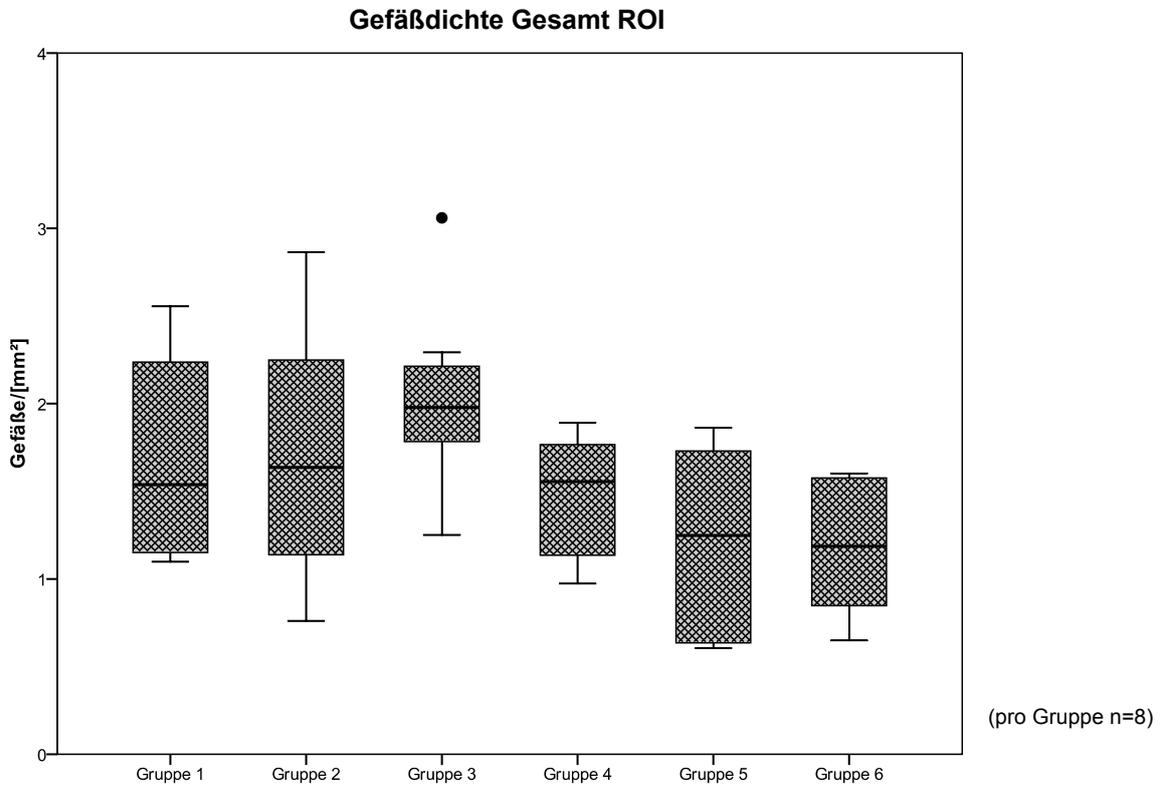


Abbildung 66: Darstellung der Gefäßdichte in der Gesamt-ROI [n/mm<sup>2</sup>]; p≤0,05

| Parameter       | Gefäßdichte [n/mm <sup>2</sup> ] |             | p-Wert |
|-----------------|----------------------------------|-------------|--------|
|                 | Median                           | Min - Max   |        |
| <b>Gruppe 1</b> | 1,54                             | 1,10 - 2,56 |        |
| <b>Gruppe 2</b> | 1,64                             | 0,76 - 2,86 | 0,959  |
| <b>Gruppe 3</b> | 1,98                             | 1,25 - 3,06 | 0,297  |
| <b>Gruppe 4</b> | 1,56                             | 0,97 - 1,89 | 0,574  |
| <b>Gruppe 5</b> | 1,25                             | 0,61 - 1,86 | 0,195  |
| <b>Gruppe 6</b> | 1,19                             | 0,65 - 1,60 | 0,083  |

Tabelle 18: Darstellung der Gefäßdichte in der Gesamt-ROI; p-Wert bezieht sich auf U-Test nach Mann-Whitney mit Gruppe 1 (p≤0,05)

• **Ventrale ROI**

Die niedrigste Gefäßdichte wies Gruppe 6 (1,0 mg PTH<sub>1-34</sub> / ml Fibrin) mit 1,62 Gefäßen pro mm<sup>2</sup> Bindegewebe auf. Die höchste Gefäßdichte besaß die Gruppe 4 (0,4 mg PTH<sub>1-34</sub> / ml Fibrin) mit 3,59 Gefäßen pro mm<sup>2</sup> Bindegewebe.

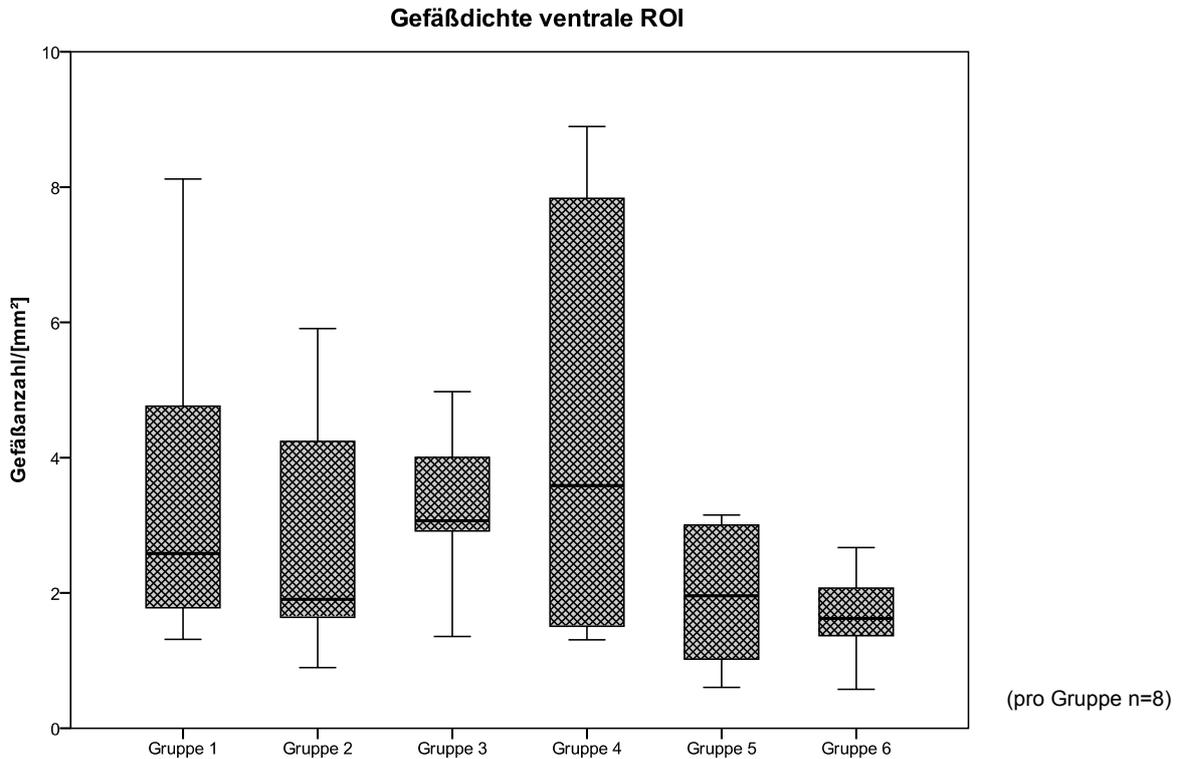


Abbildung 67: Darstellung der Gefäßdichte in der ventralen ROI [n/mm<sup>2</sup>]; p≤0,05

| Parameter       | Gefäßdichte [n/mm <sup>2</sup> ] |             | p-Wert |
|-----------------|----------------------------------|-------------|--------|
|                 | Median                           | Min - Max   |        |
| <b>Gruppe 1</b> | 2,58                             | 1,31 - 8,12 |        |
| <b>Gruppe 2</b> | 1,91                             | 0,90 - 5,91 | 0,505  |
| <b>Gruppe 3</b> | 3,07                             | 1,36 - 4,98 | 0,297  |
| <b>Gruppe 4</b> | 3,59                             | 1,31 - 8,90 | 0,645  |
| <b>Gruppe 5</b> | 1,96                             | 0,60 - 3,15 | 0,382  |
| <b>Gruppe 6</b> | 1,62                             | 0,58 - 2,67 | 0,065  |

Tabelle 19: Darstellung der Gefäßdichte in der ventralen ROI; p-Wert bezieht sich auf U-Test nach Mann-Whitney mit Gruppe 1 (p≤0,05)

• **Cage ROI**

Am stärksten vaskularisiert war die Fibringruppe (Gruppe 2) mit im Median 2,17 Gefäßen pro mm<sup>2</sup> Bindegewebe. Von den PTH-Gruppen wies die niedrigste Konzentration (Gruppe 3) die höchste Gefäßdichte von 2,02 Gefäßen pro mm<sup>2</sup> Bindegewebe auf.

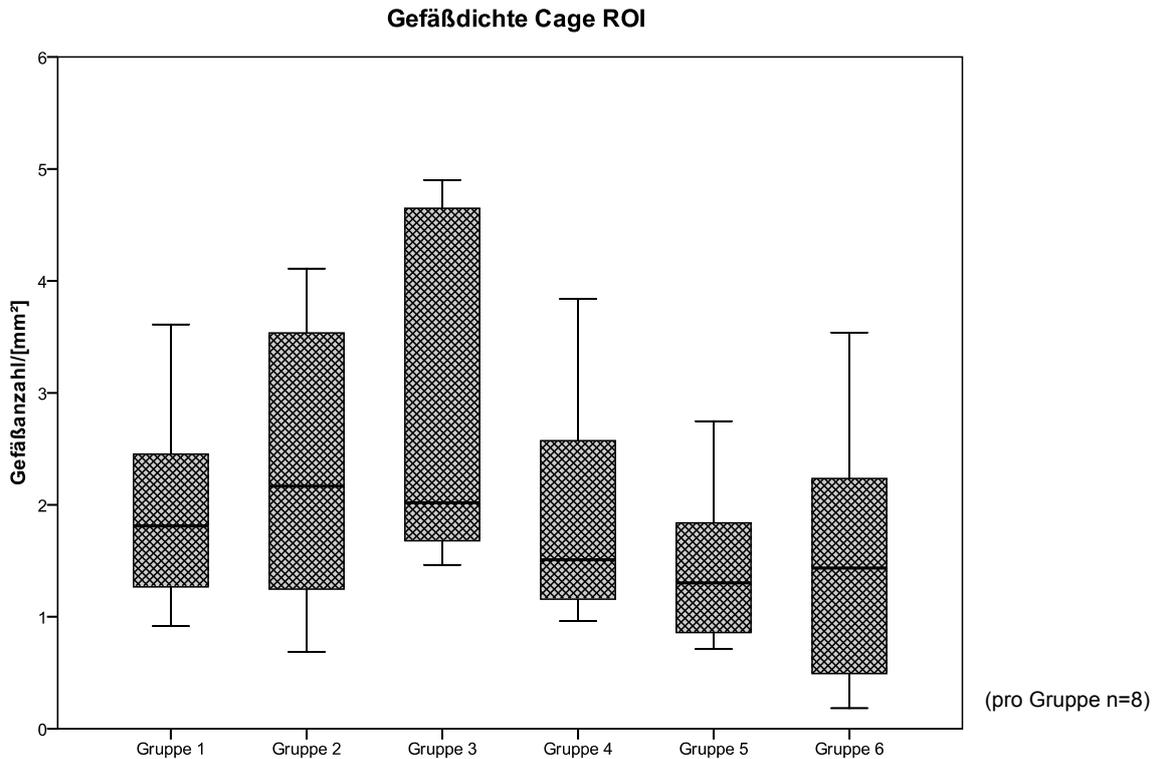


Abbildung 68: Darstellung der Gefäßdichte in der Cage ROI [n/mm<sup>2</sup>]; p≤0,05

| Parameter       | Gefäßdichte [n/mm <sup>2</sup> ] |             | p-Wert |
|-----------------|----------------------------------|-------------|--------|
|                 | Median                           | Min - Max   |        |
| <b>Gruppe 1</b> | 1,81                             | 0,92 - 3,61 |        |
| <b>Gruppe 2</b> | 2,17                             | 0,69 - 4,11 | 0,645  |
| <b>Gruppe 3</b> | 2,02                             | 1,46 - 4,90 | 0,234  |
| <b>Gruppe 4</b> | 1,51                             | 0,96 - 3,84 | 0,878  |
| <b>Gruppe 5</b> | 1,30                             | 0,71 - 2,75 | 0,195  |
| <b>Gruppe 6</b> | 1,44                             | 0,18 - 3,54 | 0,382  |

Tabelle 20: Darstellung der Gefäßdichte in der Cage ROI; p-Wert bezieht sich auf U-Test nach Mann-Whitney mit Gruppe 1 (p≤0,05)

• **Dorsale ROI**

In der dorsalen ROI ergab sich eine signifikant niedrigere Vaskularisierung des Bindegewebes der Gruppen 4 ( $p=0,05$ ) und 6 ( $p=0,021$ ) im Vergleich mit der Spongiosagruppe. Am stärksten vaskularisiert war das Bindegewebe der Gruppe 3 mit 2,32 Gefäßen pro  $\text{mm}^2$  Bindegewebe.

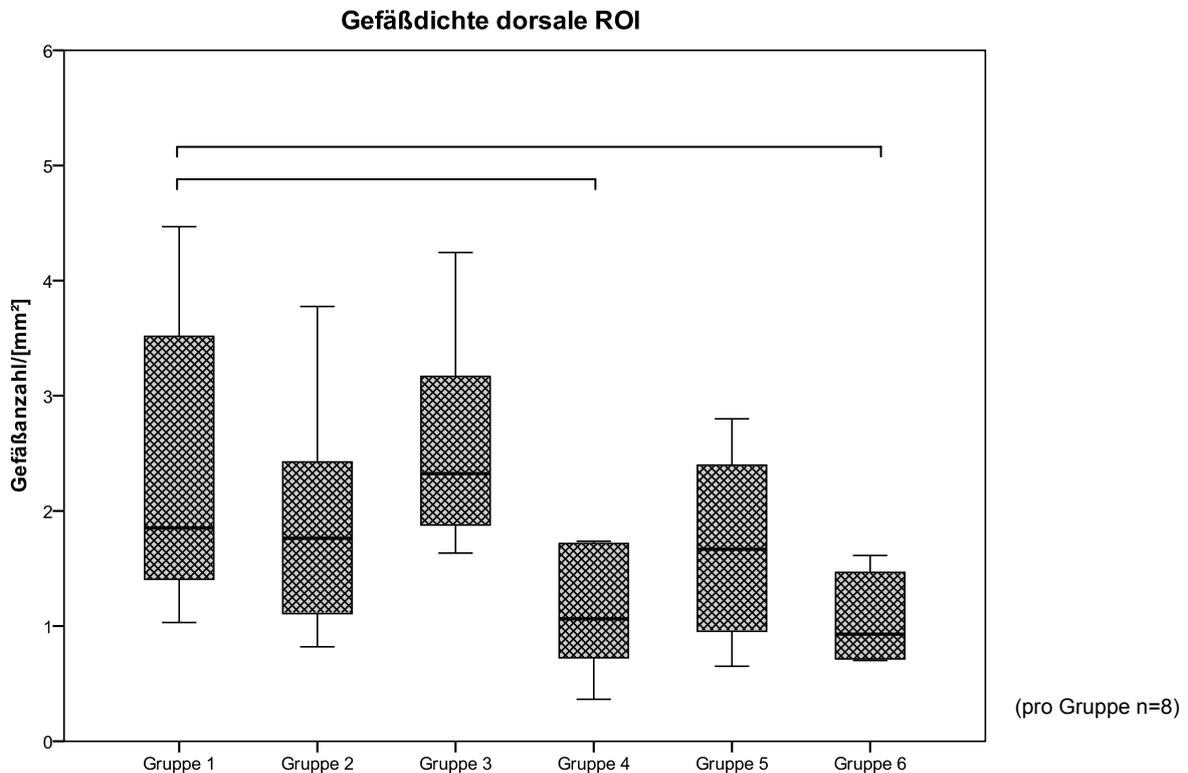


Abbildung 69: Darstellung der Gefäßdichte in der dorsalen ROI [ $\text{n/mm}^2$ ];  $p \leq 0,05$

| Parameter       | Gefäßdichte [ $\text{n/mm}^2$ ] |             | p-Wert |
|-----------------|---------------------------------|-------------|--------|
|                 | Median                          | Min - Max   |        |
| <b>Gruppe 1</b> | 1,85                            | 1,03 - 4,47 |        |
| <b>Gruppe 2</b> | 1,76                            | 0,82 - 3,77 | 0,574  |
| <b>Gruppe 3</b> | 2,32                            | 1,63 - 4,24 | 0,505  |
| <b>Gruppe 4</b> | 1,06                            | 0,36 - 1,74 | 0,050  |
| <b>Gruppe 5</b> | 1,67                            | 0,65 - 2,80 | 0,382  |
| <b>Gruppe 6</b> | 0,93                            | 0,70 - 1,61 | 0,021  |

Tabelle 21: Darstellung der Gefäßdichte in der dorsalen ROI; p-Wert bezieht sich auf U-Test nach Mann-Whitney mit Gruppe 1 ( $p \leq 0,05$ )

• **Kraniale und kaudale ROI**

Zur Spongiosagruppe ergaben sich bei der Fibringruppe und den vier Parathormongruppen in der kranialen und kaudalen ROI keine signifikanten Unterschiede. Die höchste Gefäßdichte ergab sich in Gruppe 3 mit 1,07 Gefäßen pro mm<sup>2</sup> Bindegewebe in der kranialen ROI und 1,19 Gefäßen pro mm<sup>2</sup> Bindegewebe in der kaudalen ROI. Die niedrigste Gefäßdichte wiesen in der kranialen ROI die Gruppe 5 und 6 auf, in der kaudalen ROI Gruppe 2 und 6.

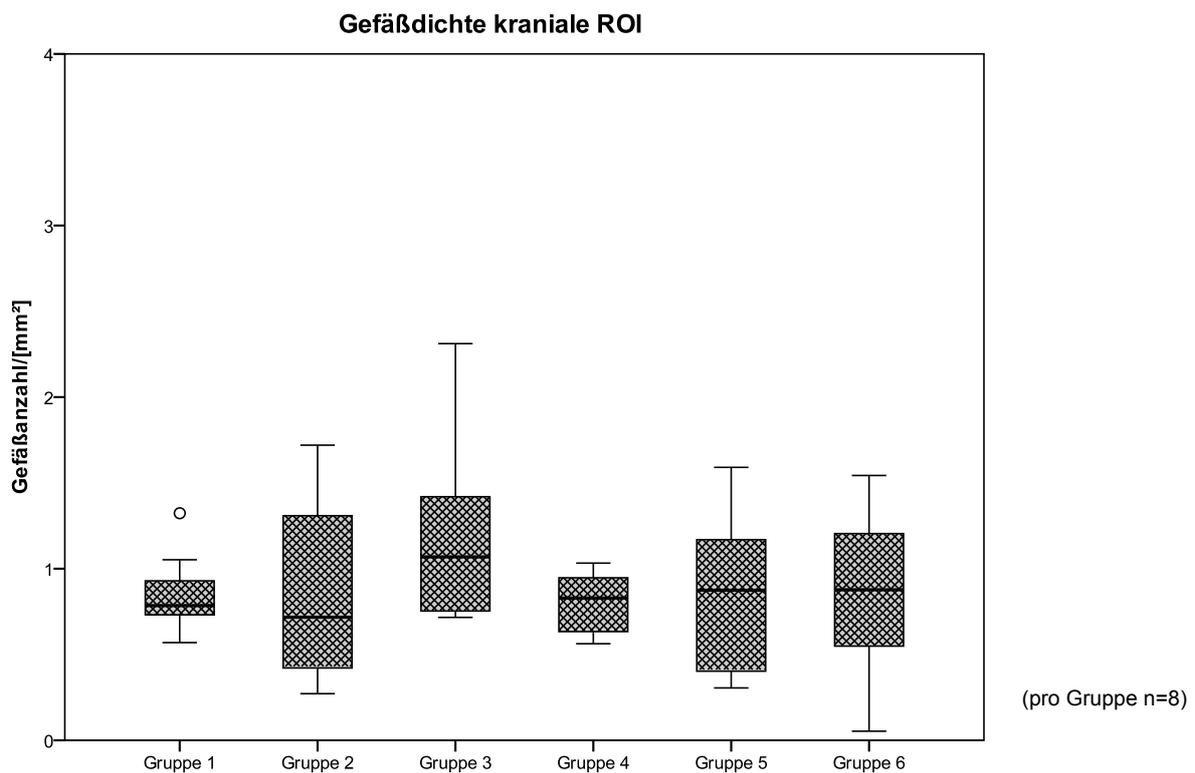


Abbildung 70: Darstellung der Gefäßdichte in der kranialen ROI [n/mm<sup>2</sup>]; p≤0,05

| Parameter       | Gefäßdichte kraniale ROI [n/mm <sup>2</sup> ] |             | p-Wert | Gefäßdichte kaudale ROI [n/mm <sup>2</sup> ] |             | p-Wert |
|-----------------|---|-------------|--------|--|-------------|--------|
|                 | Median  | Min - Max   |        | Median                                       | Min - Max   |        |
| <b>Gruppe 1</b> | 0,79  | 0,57 - 1,32 |        | 1,19   | 0,77 - 2,43 |        |
| <b>Gruppe 2</b> | 0,72  | 0,27 - 1,72 | 0,878  | 1,13   | 0,67 - 2,82 | 0,798  |
| <b>Gruppe 3</b> | 1,07  | 0,72 - 2,31 | 0,161  | 1,19   | 0,62 - 2,44 | 0,645  |
| <b>Gruppe 4</b> | 0,83  | 0,56 - 1,03 | 0,789  | 0,98   | 0,61 - 2,09 | 0,382  |
| <b>Gruppe 5</b> | 0,88  | 0,31 - 1,59 | 0,959  | 0,56   | 0,20 - 2,08 | 0,083  |
| <b>Gruppe 6</b> | 0,88  | 0,05 - 1,54 | 0,959  | 1,17   | 0,85 - 1,59 | 0,798  |

Tabelle 22: Darstellung der Gefäßdichte in der kranialen und kaudalen ROI; p-Wert bezieht sich auf U-Test nach Mann-Whitney mit Gruppe 1 ( $p \leq 0,05$ )

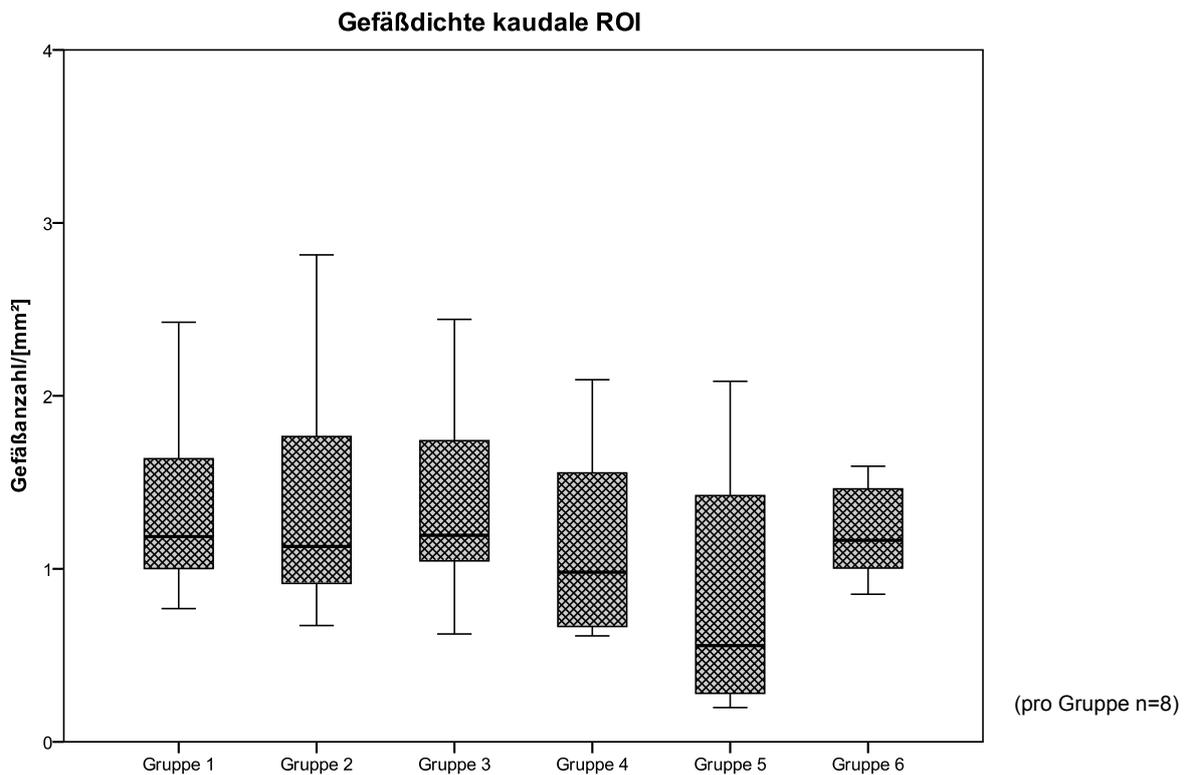


Abbildung 71: Darstellung der Gefäßdichte in der kaudalen ROI [n/mm<sup>2</sup>];  $p \leq 0,05$

#### 4.2.5 Osteoklastendichte

Zur Osteoklastenzählung wurde von jedem der 48 Schafe ein Paraffinschnitt mit der immunhistochemischen TRAP-Färbung verwendet. Die Auszählung der Osteoklasten erfolgte in den fünf verschiedenen Teil-ROIs wie bei der histomorphometrischen Analyse beschrieben.

- **Gesamt-ROI**

Im Vergleich der Osteoklastendichte der Spongiosagruppe (Gruppe 1) mit der Fibrinkontrollgruppe (Gruppe 2) und den PTH-Gruppen ergab sich für die Gruppe 3 mit der niedrigsten Konzentration und der Gruppe 6 mit der höchsten Konzentration eine statistisch signifikant niedrigere Osteoklastendichte ( $p=0,05$ ;  $p=0,028$ ). In der Gesamt-ROI kamen auf einen  $\text{mm}^2$  mineralisierter Knochenfläche am meisten Osteoklasten in der Fibringruppe (Gruppe 2) und in der Gruppe 5 (0,7 mg  $\text{PTH}_{1-34}$  / ml Fibrin) mit 3,83 und 3,68 Osteoklasten. Am niedrigsten war die Osteoklastendichte in der Gruppe 6 mit 0,78 Osteoklasten pro  $\text{mm}^2$  mineralisierter Knochenfläche. Die Werte der Spongiosagruppe und der Fibringruppe streuten stärker als die Werte in den anderen Gruppen.

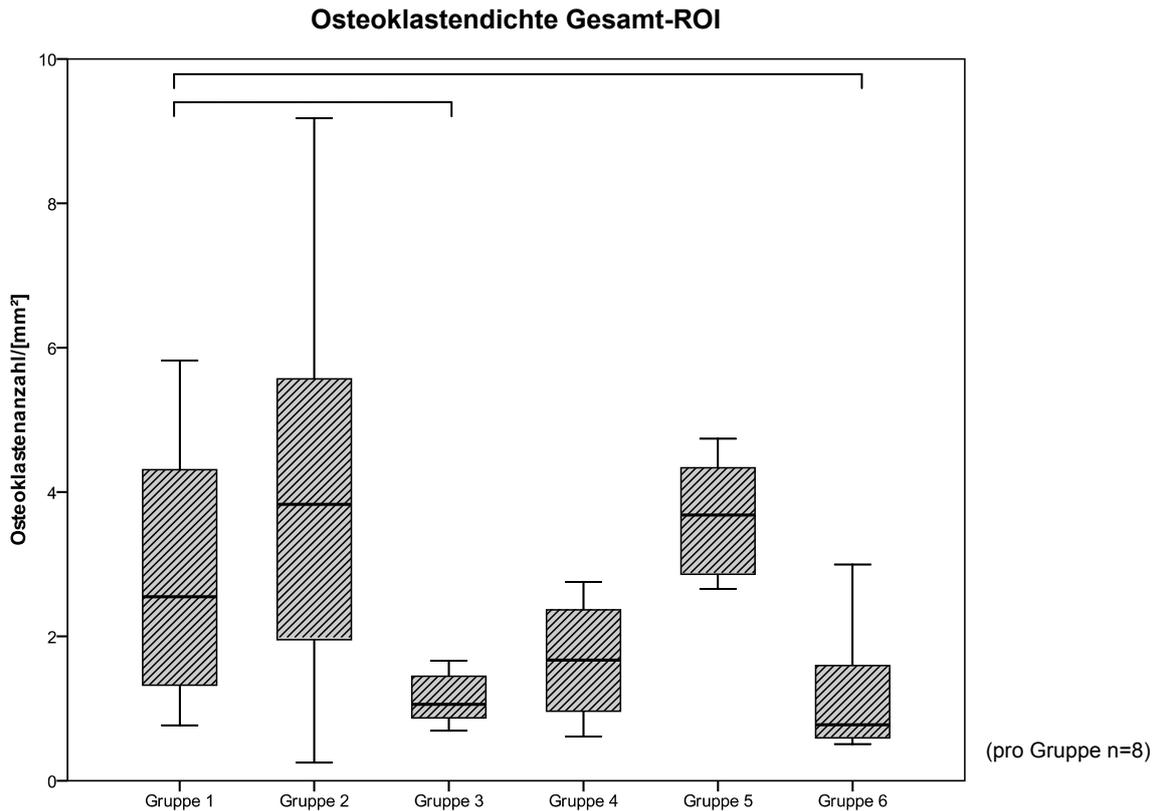


Abbildung 72: Darstellung der Osteoklastendichte in der Gesamt-ROI [n/mm<sup>2</sup>]; p≤0,05

| Parameter       | Osteoklastendichte<br>[n/mm <sup>2</sup> ] |             | p-Wert |
|-----------------|--|-------------|--------|
|                 | Median                                     | Min - Max   |        |
| <b>Gruppe 1</b> | 2,54                                       | 0,77 - 5,82 |        |
| <b>Gruppe 2</b> | 3,83                                       | 0,25 - 9,18 | 0,442  |
| <b>Gruppe 3</b> | 1,06                                       | 0,69 - 1,66 | 0,050  |
| <b>Gruppe 4</b> | 1,67                                       | 0,61 - 2,75 | 0,195  |
| <b>Gruppe 5</b> | 3,68                                       | 2,66 - 4,74 | 0,328  |
| <b>Gruppe 6</b> | 0,78                                       | 0,51 - 3,00 | 0,028  |

Tabelle 23: Darstellung der Osteoklastendichte in der Gesamt-ROI; p-Wert bezieht sich auf U-Test nach Mann-Whitney mit Gruppe 1; (p≤0,05)

- **Ventrale ROI**

Auch in dieser ROI war die Osteoklastendichte der Gruppe 3 (p=0,001) und 6 (p=0,010) signifikant niedriger als die der Spongiosagruppe. Die höchste Osteoklastendichte lag in der Gruppe 4 vor mit im Median 6,60 Osteoklasten pro mm<sup>2</sup> mineralisiertem Knochen. Die

niedrigste Osteoklastendichte lag mit 1,39 Gefäßen pro mm<sup>2</sup> min. Knochens in Gruppe 6 vor. In den PTH-Gruppen konnte eine Zunahme der Osteoklastendichte bis zur PTH-Konzentration (0,4 mg PTH<sub>1-34</sub> / ml Fibrin) vermerkt werden. Mit höherer PTH-Konzentration wurden geringere Osteoklastendichten verzeichnet.

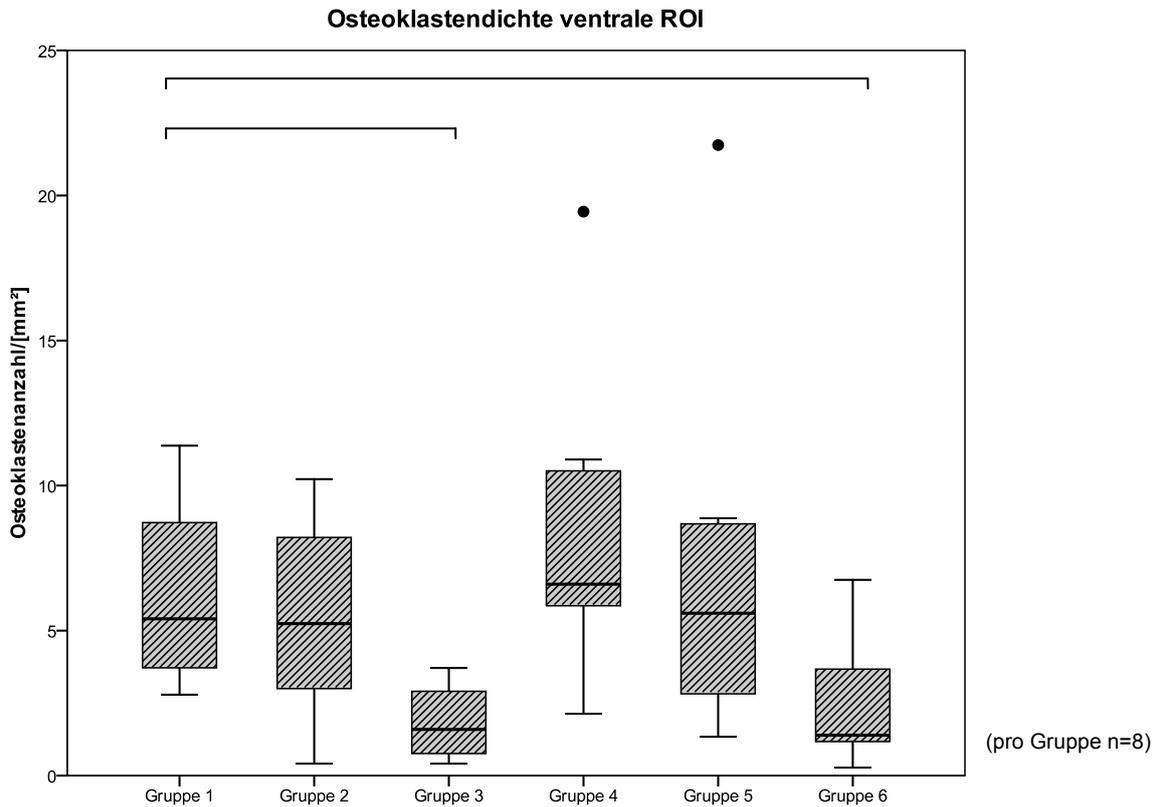


Abbildung 73: Darstellung der Osteoklastendichte in der ventralen ROI [n/mm<sup>2</sup>]; p≤0,05

| Parameter       | Osteoklastendichte<br>[n/mm <sup>2</sup> ] |              | p-Wert |
|-----------------|--|--------------|--------|
|                 | Median                                     | Min - Max    |        |
| <b>Gruppe 1</b> | 5,40                                       | 2,80 - 11,37 |        |
| <b>Gruppe 2</b> | 5,24                                       | 0,41 - 10,23 | 0,789  |
| <b>Gruppe 3</b> | 1,59                                       | 0,41 - 3,71  | 0,001  |
| <b>Gruppe 4</b> | 6,60                                       | 2,14 - 19,44 | 0,382  |
| <b>Gruppe 5</b> | 5,60                                       | 1,33 - 21,74 | 0,721  |
| <b>Gruppe 6</b> | 1,39                                       | 0,27 - 6,75  | 0,010  |

Tabelle 24: Darstellung der Osteoklastendichte in der ventralen ROI; p-Wert bezieht sich auf U-Test nach Mann-Whitney mit Gruppe 1 [n/mm<sup>2</sup>]; (p≤0,05)

• **Cage ROI**

In der Cage ROI kam es zu keinerlei signifikanten Unterschieden zwischen den Parathormongruppen und der Fibringruppe im Vergleich mit der Spongiosagruppe in der Osteoklastendichte. Auffällig war, dass die Gruppe 3 mit der niedrigsten Parathormonkonzentration die geringste Osteoklastendichte (2,01 OC /mm<sup>2</sup> min. Knochenfläche) aufwies und die Werte dieser Gruppe kaum streuten.

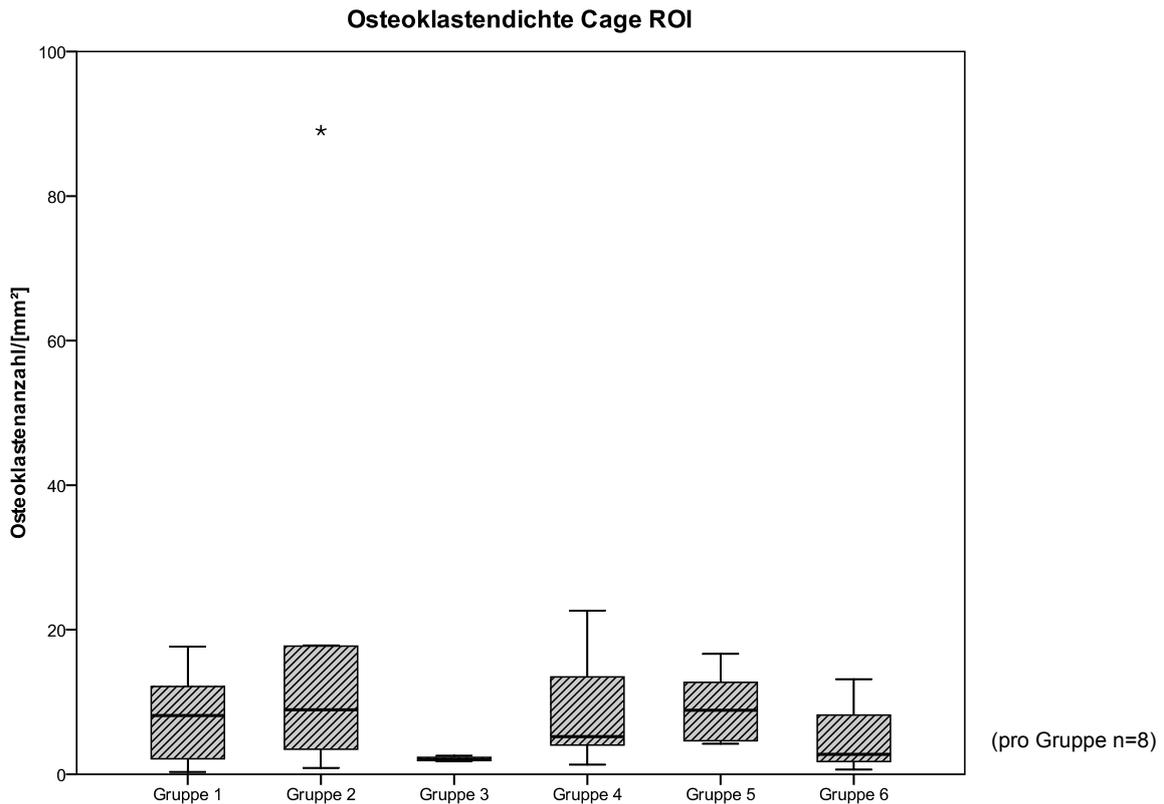


Abbildung 74: Darstellung der Osteoklastendichte in der Cage ROI [n/mm<sup>2</sup>]; p≤0,05

| Parameter       | Osteoklastendichte<br>[n/mm <sup>2</sup> ] |              | p-Wert |
|-----------------|--|--------------|--------|
|                 | Median                                     | Min - Max    |        |
| <b>Gruppe 1</b> | 8,12                                       | 0,32 - 17,66 |        |
| <b>Gruppe 2</b> | 8,93                                       | 0,88 - 89,06 | 0,505  |
| <b>Gruppe 3</b> | 2,01                                       | 1,79 - 2,56  | 0,083  |
| <b>Gruppe 4</b> | 5,21                                       | 1,31 - 22,66 | 0,721  |
| <b>Gruppe 5</b> | 8,85                                       | 4,22 - 16,64 | 0,721  |
| <b>Gruppe 6</b> | 2,75                                       | 0,64 - 13,16 | 0,574  |

Tabelle 25: Darstellung der Osteoklastendichte in der Cage ROI [n/mm<sup>2</sup>]; p-Wert bezieht sich auf U-Test nach Mann-Whitney mit Gruppe 1; p≤0,05

• **Dorsale ROI**

Die Osteoklastendichte der Gruppe 6 mit der höchsten Parathormonkonzentration war mit 0,41 Osteoklasten/mm<sup>2</sup> signifikant niedriger (p=0,005) als die der Spongiosagruppe. Die höchste Osteoklastendichte in der dorsalen ROI wies die Fibringruppe mit im Median 6,48 Osteoklasten pro mm<sup>2</sup> mineralisiertem Knochengewebe auf.

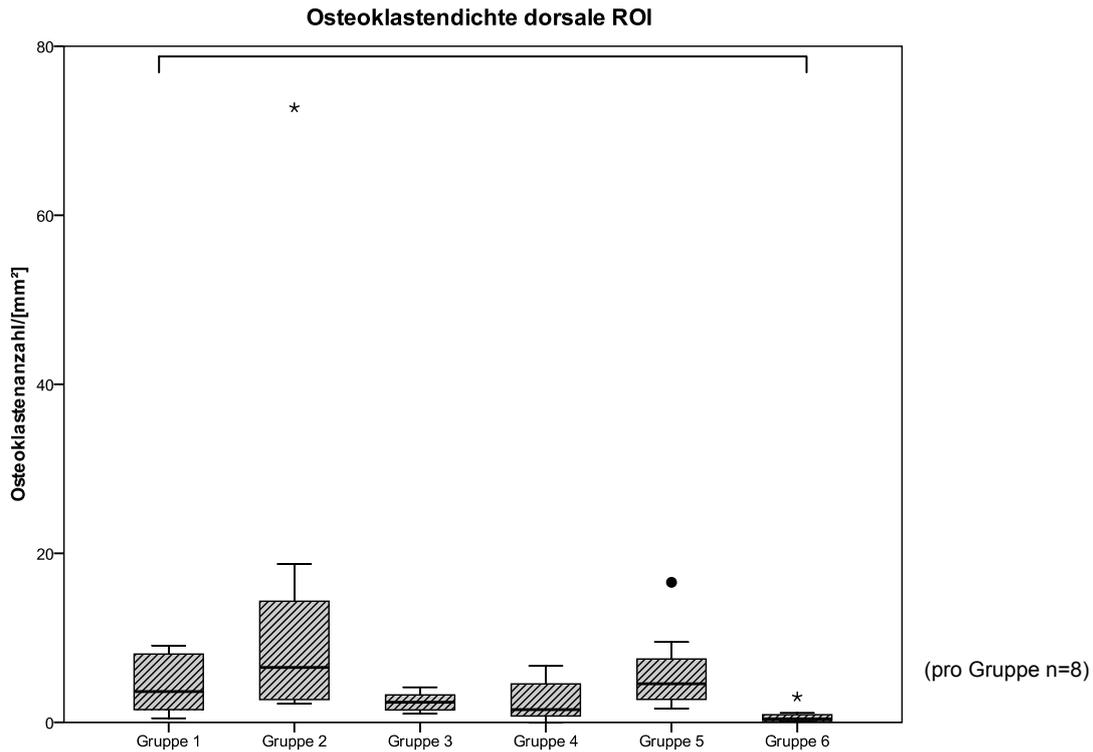


Abbildung 75: Darstellung der Osteoklastendichte in der dorsalen ROI [n/mm<sup>2</sup>]; p≤0,05

| Parameter       | Osteoklastendichte<br>[n/mm <sup>2</sup> ] |              | p-Wert |
|-----------------|--|--------------|--------|
|                 | Median                                     | Min - Max    |        |
| <b>Gruppe 1</b> | 3,64                                       | 0,49 - 9,08  |        |
| <b>Gruppe 2</b> | 6,48                                       | 2,20 - 72,73 | 0,161  |
| <b>Gruppe 3</b> | 2,38                                       | 1,02 - 4,14  | 0,442  |
| <b>Gruppe 4</b> | 1,51                                       | 0,00 - 6,67  | 0,234  |
| <b>Gruppe 5</b> | 4,56                                       | 1,65 - 16,57 | 0,442  |
| <b>Gruppe 6</b> | 0,41                                       | 0,11 - 3,02  | 0,005  |

Tabelle 26: Darstellung der Osteoklastendichte in der dorsalen ROI [n/mm<sup>2</sup>]; p-Wert bezieht sich auf U-Test nach Mann-Whitney mit Gruppe 1 p≤0,05

- **Kraniale und kaudale ROI**

Eine statistisch signifikant höhere Osteoklastendichte als die Spongiosagruppe wies die Gruppe 5 in der kranialen ROI auf. Die höchste Osteoklastendichte wies die Fibringruppe mit 3,5 OC/mm<sup>2</sup> min. Knochenfläche auf. Die niedrigste Osteoklastendichte wies Gruppe 6 mit 0,65 OC/mm<sup>2</sup> auf. Die Gruppe 5 hatte von den Parathormongruppen mit 2,58 OC/mm<sup>2</sup> die höchste Osteoklastendichte. Die Parathormongruppen 3, 4 und 6 zeigten niedrigere Werte von im Median 0,82, 0,68 und 0,65 Osteoklasten pro mm<sup>2</sup> mineralisierter Knochenfläche. Die Osteoklastendichte der Spongiosagruppe lag mit 1,36 Osteoklasten pro mm<sup>2</sup> mineralisierte Knochenfläche knapp über den niedrigen Werten der Parathormongruppen 3, 4 und 6.

Insgesamt war die Osteoklastendichte in der kaudalen ROI bei allen Gruppen etwas geringer als in der kranialen ROI. Die höchste Osteoklastendichte wies Gruppe 5 mit im Median 2,53 OC/mm<sup>2</sup> auf und war damit sogar höher als die der Fibringruppe (1,98 OC/mm<sup>2</sup>). Die niedrigste Osteoklastendichte besaß die Gruppe 6 mit 0,21 OC/mm<sup>2</sup>.

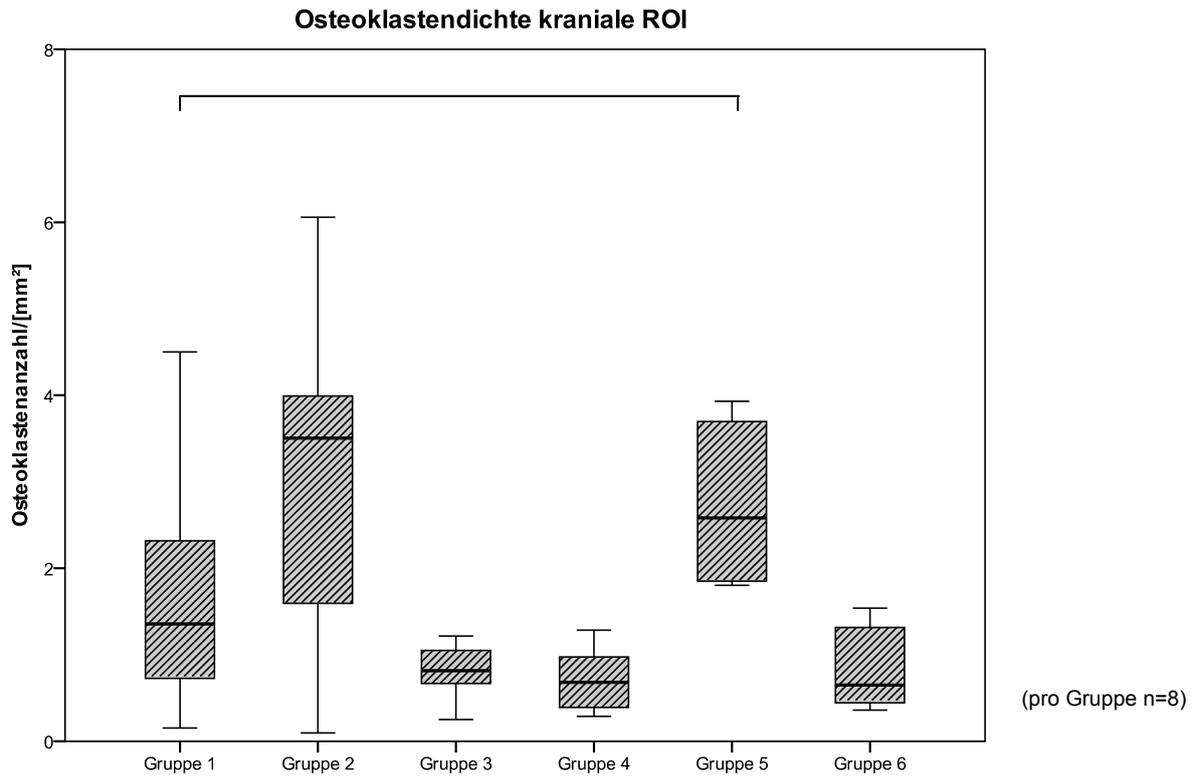


Abbildung 76: Darstellung der Osteoklastendichte in der kranialen ROI [n/mm<sup>2</sup>]; p≤0,05

| Parameter       | Osteoklastendichte<br>[n/mm <sup>2</sup> ] |             | p-<br>Wert |
|-----------------|--|-------------|------------|
|                 | Median                                     | Min - Max   |            |
| <b>Gruppe 1</b> | 1,36                                       | 0,15 - 4,50 |            |
| <b>Gruppe 2</b> | 3,50                                       | 0,10 - 6,06 | 0,234      |
| <b>Gruppe 3</b> | 0,82                                       | 0,25 - 1,22 | 0,161      |
| <b>Gruppe 4</b> | 0,68                                       | 0,29 - 1,28 | 0,105      |
| <b>Gruppe 5</b> | 2,58                                       | 1,80 - 3,93 | 0,050      |
| <b>Gruppe 6</b> | 0,65                                       | 0,36 - 1,54 | 0,279      |

Tabelle 27: Darstellung der Osteoklastendichte der kranialen ROI; p-Wert bezieht sich auf U-Test nach Mann-Whitney mit Gruppe 1 (p≤0,05)

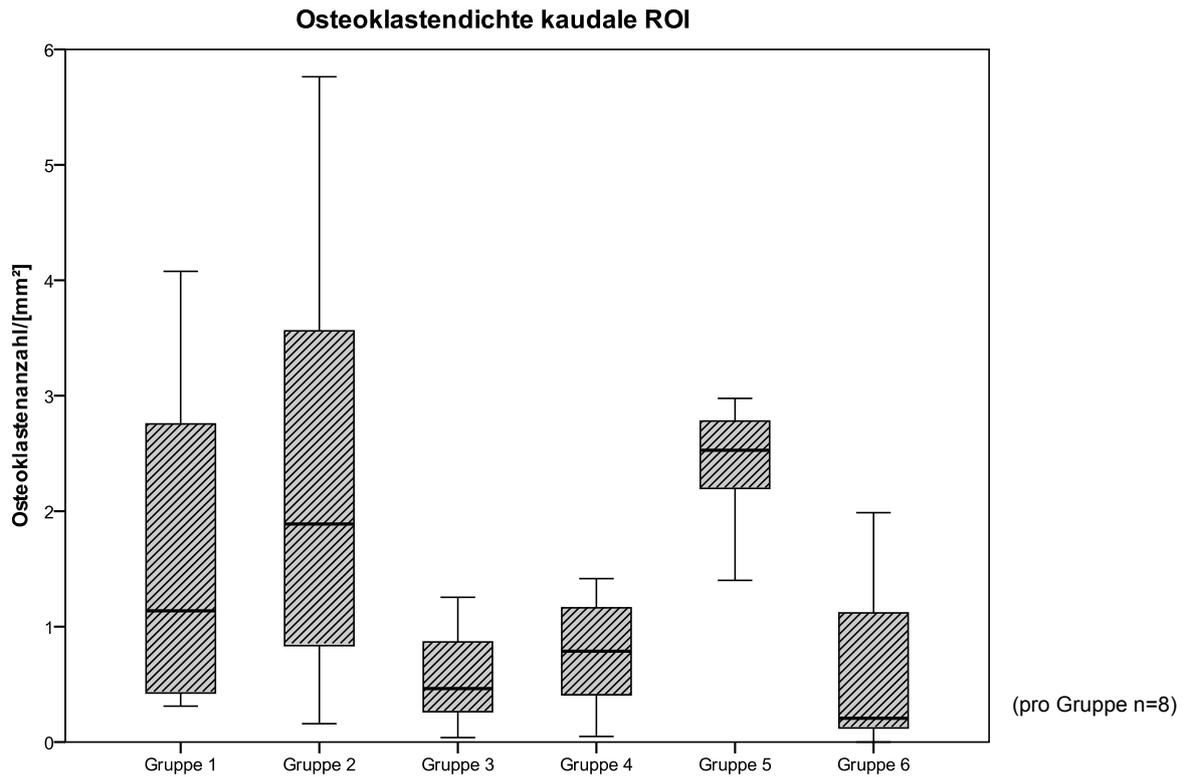


Abbildung 77: Darstellung der Osteoklastendichte in der kaudalen ROI [n/mm<sup>2</sup>]; p≤0,05

| Parameter       | Osteoklastendichte<br>[n/mm <sup>2</sup> ] |             | p-<br>Wert |
|-----------------|--|-------------|------------|
|                 | Median                                     | Min - Max   |            |
| <b>Gruppe 1</b> | 1,14                                       | 0,31 - 4,08 |            |
| <b>Gruppe 2</b> | 1,89                                       | 0,16 - 5,76 | 0,574      |
| <b>Gruppe 3</b> | 0,46                                       | 0,04 - 1,25 | 0,130      |
| <b>Gruppe 4</b> | 0,79                                       | 0,05 - 1,42 | 0,328      |
| <b>Gruppe 5</b> | 2,53                                       | 1,40 - 2,98 | 0,130      |
| <b>Gruppe 6</b> | 0,21                                       | 0,00 - 1,99 | 0,065      |

Tabelle 28: Darstellung der Osteoklastendichte der kaudalen ROI; p-Wert bezieht sich auf U-Test nach Mann-Whitney mit Gruppe 1 (p≤0,05)

## 4.3 Zusammenfassung der Ergebnisse

- **Deskriptive Histologie**

Die Spongiosagruppe, die als Positivkontrolle diente, wies sowohl in der ventralen als auch in der Cage ROI am meisten Knochengewebe auf. Auch die Kallusbildung war in dieser Gruppe am stärksten. Zwei Tiere waren ventral und drei Tiere in der Cage ROI komplett knöchern fusioniert.

Von den Parathormongruppen wies als einzige Gruppe 3 ventral drei komplett knöchern fusionierte Tiere auf. Kein Tier einer anderen Gruppe war ventral fusioniert. Die stärkste Kallusbildung von den Parathormongruppen lag dagegen in Gruppe 4 und 5 vor, bei denen es durch den Kallus allerdings nicht zu einer kompletten Überbrückung des Segmentes kam. Die stärkste Beteiligung der Kortikalis an der Kallusbildung war in Gruppe 6 mit der höchsten Parathormonkonzentration zu verzeichnen.

Ein mit der Spongiosagruppe vergleichbares Ergebnis in der Cage ROI war in der PTH-Gruppe 3 und 5 nachzuweisen. Drei Schafe fusionierten hier jeweils komplett knöchern und die Gruppe 3 wies wie die Spongiosagruppe ein Tier auf, bei dem die beiden Halswirbel über hyalinen Knorpel bereits verbunden waren. Auch in Gruppe 4 gab es ein Tier mit einer kompletten Fusion der beiden Wirbelkörper in der Cage ROI.

Die Spongiosagruppe zeigte am häufigsten eine direkt knöcherne Integration des Titanimplantates. Von den anderen Gruppen wies die PTH-Gruppe 4 am häufigsten Knochengewebe in direktem Kontakt um das entnommene Titanimplantat auf. Der Knochen-Implantat-Kontakt war in der Fibringruppe am geringsten.

Die Spongiosagruppe wies eine signifikant stärkere Kallusbildung im Vergleich mit den anderen Gruppen auf.

Sehr selten kamen Entzündungsreaktionen in der Spongiosagruppe und in der PTH-Gruppe 4 vor. Die anderen PTH-Gruppen und die Fibringruppe zeigten diese insgesamt häufiger.

Eine erhöhte Anzahl an Osteoklasten und die Aushöhlung des Kallus kamen insgesamt in der ventralen, der Cage und der dorsalen ROI bei den höheren Konzentrationen häufiger vor.

Am meisten hyaliner Knorpel kam in der ventralen und in der Cage ROI in Gruppe 4 vor, bei zwei Tieren wurden dritter und vierter Halswirbel sogar darüber verbunden.

In der dorsalen ROI fusionierten nur wenige Tiere, am häufigsten mit zwei Tieren in Gruppe 4 im rückenmarksnahen Bereich, gefolgt von der Gruppe 3 mit einem Tier. Die Spongiosagruppe und die Gruppe 6 wiesen zwei bzw. drei Tiere auf, die über hyalinen Knorpel in der dorsalen ROI bereits fusioniert waren.

- **Histomorphometrie**

In der Gesamt-ROI wiesen die Spongiosagruppe und die Parathormongruppe mit der niedrigsten Konzentration (Gruppe 3 mit 0,2 mg PTH<sub>1-34</sub> / ml Fibrin) die größten Knochenanteile auf. Signifikant niedriger war der Knochenanteil dagegen in der Fibringruppe sowie bei allen Gruppen mit höheren Parathormonkonzentrationen. Den kleinsten Anteil an Knochengewebe zeigte Gruppe 6 mit der höchsten PTH-Konzentration (1,0 mg PTH<sub>1-34</sub> / ml Fibrin). Diese Gruppe wies als einzige auch einen niedrigeren Anteil an mineralisiertem Knochen in dieser ROI auf. Beim Knorpelgewebe war die prozentuale Verteilung bei allen Gruppen sehr ähnlich, lediglich Gruppe 4 wies einen statistisch signifikant höheren Anteil als die Spongiosagruppe auf. Die Spongiosagruppe und sowie Gruppe 3 wiesen den geringsten Anteil an Bindegewebe auf. Die Fibringruppe und die Gruppen mit den höheren Parathormonkonzentrationen zeigten dagegen alle höhere Bindegewebeanteile.

Bei gesonderter Betrachtung der fünf verschiedenen Teil-ROIs spiegelte sich diese Gewebeverteilung allerdings nur zum Teil wieder. In der ventralen ROI hatten nur die Fibringruppe sowie die PTH-Gruppen 4 und 5 einen geringeren Knochenanteil als die Spongiosagruppe. Gruppe 6 zeigte ebenso wie Gruppe 3 im Knochenanteil dieser ROI keinen Unterschied zur Spongiosagruppe. Die Fibringruppe sowie die PTH-Gruppe 4 wiesen dazu auch einen geringeren mineralisierten Knochenanteil auf. Lediglich Gruppe 5 hatte einen niedrigeren Bindegewebeanteil als die Spongiosagruppe. In der Cage ROI wiesen nur Gruppe 4 und 6 einen niedrigeren Knochenanteil als die Spongiosagruppe auf. Gruppe 6 hatte ebenso einen niedrigeren mineralisierten Knochenanteil. Gruppe 4 zeigte als einzige einen höheren Knorpelanteil als die Spongiosagruppe. Der Bindegewebeanteil war in allen Gruppen mit Ausnahme der Gruppe 3 größer als der der Spongiosagruppe. In der dorsalen ROI konnten keine Unterschiede in der Gewebeverteilung der Gruppen festgestellt werden. Gruppe 6 wies sowohl in der kranialen als auch der kaudalen ROI einen geringeren Knochenanteil auf. In der kaudalen ROI war in dieser Gruppe auch der mineralisierte Knochenanteil geringer. Der Bindegewebeanteil war dementsprechend in der Gruppe 6 in der kranialen und kaudalen ROI auch höher als in der Spongiosagruppe. Alle anderen Gruppen zeigten mit Ausnahme der Gruppe 4, die in der kaudalen ROI einen höheren Bindegewebeanteil als die Spongiosagruppe aufwies, keine Unterschiede in der Gewebeverteilung in kranialer und kaudaler ROI.

- **Fusionsscore**

An je 3 Tiere der Spongiosagruppe, sowie der Parathormongruppen 3 (0,2 mg PTH<sub>1-34</sub> / ml Fibrin) und 5 (0,7 mg PTH<sub>1-34</sub> / ml Fibrin) wurde der F1-Scorewert vergeben, der einer kompletten Fusion entsprach. Die Parathormongruppe 3 verzeichnete daneben von allen Gruppen auch die meiste Anzahl an partiell fusionierten Halswirbeln. Die Fibrinkontrollgruppe wies dagegen die meisten nicht fusionierten Halswirbel auf. Es konnten keinerlei statistisch signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen ermittelt werden.

- **Vaskularisierung**

Bei der Betrachtung der Vaskularisierung der Gesamt-ROI sowie der ROIs im einzelnen ergaben sich mit Ausnahme der dorsalen ROI keine statistisch signifikanten Unterschiede im Vergleich der Spongiosagruppe mit den anderen Versuchsgruppen.

In der dorsalen ROI war die Gefäßdichte in der Gruppe mit der höchsten Parathormonkonzentration (Gruppe 6) signifikant niedriger als die der Spongiosagruppe. Auffällig war, dass die Gruppe 3 (0,2 mg PTH<sub>1-34</sub> / ml Fibrin) in fast allen ROIs stets die höchste Gefäßdichte pro mm<sup>2</sup> Bindegewebe aufwies.

- **Osteoklastendichte**

Statistisch signifikant niedriger als die Osteoklastendichte der Spongiosagruppe in der Gesamt-ROI und der ventralen ROI waren die Osteoklastendichten der Gruppe 3 und 6. In der Cage ROI konnten keine signifikanten Unterschiede im Vergleich mit der Spongiosagruppe ausgemacht werden. Gruppe 3 zeigte aber auch hier die geringste Osteoklastendichte. In der dorsalen und kaudalen ROI wies Gruppe 6 eine signifikant niedrigere Osteoklastendichte auf. In der kranialen ROI war die Osteoklastendichte der Gruppe 5 in Vergleich mit der Spongiosagruppe signifikant höher.

## 5 Diskussion

Die operative Versteifung eines Halswirbelsäulensegmentes (Spondylodese) stellt in der Humanmedizin eines der häufigsten chirurgischen Verfahren zur Versorgung degenerativ, entzündlich oder traumatisch bedingter Bandscheibenerkrankungen dar. Seit Jahrzehnten wurde dabei zur intervertebralen Stabilisierung des entsprechenden Bewegungssegmentes der autologe, trikortikale Beckenkammspan verwendet (Bohlman, 1993; Brodke, 1992; Sawin, 1998; Smith, 1958). Durch die mit diesem Verfahren assoziierten Komplikationen wie Pseudarthrosen (Emery, 1997; Gore, 1984), Implantatkollaps (Schnee, 1997) oder Verrutschen des Spans (Aronson, 1968; Gore, 1984; Jagannathan, 2008; White, 1973) und den weitaus häufigeren Komplikationen an der Entnahmestelle am Becken (Ahlmann, 2002; Arrington, 1996; Banwart, 1995; Keller, 1987; Summers, 1989; Younger, 1989) ging der Trend zum intervertebralen Abstandshalter in Form eines Cages (Frederic, 2006; Hacker, 2000; Hwang, 2005; Hwang, 2004; Lind, 2007; Matge, 2000; Payer, 2003; Schroder, 2007; Thome, 2006; van Jonbergen, 2005; Vavruch, 2002).

Diese Implantate geben dem Bewegungssegment initial eine höhere mechanische Stabilität. Ebenso wird die ehemalige Bandscheibenraumhöhe und die Lordose des Wirbelsäulensegmentes zuverlässig wiederhergestellt (Profeta, 2000; Sandhu, 1996; Vavruch, 2002). Die verschiedenen Designs und das verwendete Material standen lange Zeit im Mittelpunkt der Forschung und wurden sowohl tierexperimentell (Kandziora, 2001a; Kandziora, 2002b) als auch klinisch (Cho, 2004; Chou, 2008; Haid, 2004; Kast, 2009) getestet. Da es aber auch beim Cage zu Pseudarthrosenbildung und Einsinken kommen kann (Kast, 2009; Vavruch, 2002), wurden die Cages zunehmend mit Materialien wie autologer oder allogener Spongiosa sowie Wachstumsfaktoren wie BMP-2 (Boden, 1998; Boden, 2000; Chang, 2009; Liao, 2008; Sandhu, 2002; Takahashi, 1999; Topuz, 2009) gefüllt, um das Wirbelsäulensegment schneller knöchern zu versteifen. Um jedoch den zusätzlichen Eingriff zur Gewinnung von autologem Knochen und die zum Teil erheblichen Kosten für kommerziell erhältliche Wachstumsfaktoren zu umgehen, ist man weiterhin auf der Suche nach einem preiswerten Biomaterial, das keinen zusätzlichen Eingriff am Patienten erfordert, in unbegrenzten Mengen bei gleichbleibend guter Qualität zur Verfügung steht, leicht in der Anwendung ist und dabei osteoinduktiv und osteokonduktiv wirkt.

Parathormon wird seit langem systemisch zur Osteoporosetherapie (Reeve, 1976; Tam, 1982) eingesetzt und verursacht bei intermittierender Gabe einen anabolen Knochenstoffwechsel (Qin, 2004; Tam, 1982). Diese Wirkung wurde auch in der experimentellen Frakturheilung (Alkhiary, 2005; Andreassen, 1999; Andreassen, 2001;

Andreassen, 2004; Holzer, 1999; Kakar, 2007; Komatsubara, 2005; Manabe, 2007; Nakajima, 2002; Nozaka, 2008) und der Spondylodese der Lendenwirbelsäule (Abe, 2007; Lawrence, 2006; Lehman, 2010; O'Loughlin, 2009) untersucht. Danach wurde begonnen PTH experimentell lokal in Form von Plasmidgenen zu verwenden, um die Frakturheilung zu verbessern (Bonadio, 1999; Chen, 2003; Fang, 1996). Das in dieser Arbeit verwendete PTH<sub>1-34</sub> war kovalent in eine Fibrinmatrix gebunden und stellte seine positive Wirkung auf die Knochenbildung bereits in mehreren experimentellen Studien unter Beweis, indem es sowohl osteoinduktiv als osteokonduktiv wirkte (Arrighi, 2009; Fuerst, 2007; Mark, 2007).

Vor diesem Hintergrund sollten die Auswirkungen von lokal appliziertem, kovalent in einer Fibrinmatrix gebundenem modifiziertem Parathormon<sub>1-34</sub> (GTpIPTH<sub>1-34</sub>) auf den Fusionsprozess des dritten und vierten Schafshalswirbels histologisch untersucht werden. Zur Stabilisierung des Segmentes wurde nach Discektomie stets ein Titancage (SynCage-C<sup>®</sup>) als intervertebraler Abstandshalter verwendet. Vier verschiedene Konzentrationen (0,2, 0,4, 0,7 und 1,0 mg PTH<sub>1-34</sub>/ml Fibrin) des modifizierten Parathormons sowie die Fibrinmatrix alleine wurden in fünf Gruppen zu jeweils acht Schafen untersucht und mit dem sogenannten Goldstandard, der lokal applizierten autologen Spongiosa aus dem Beckenkamm, verglichen.

Ausgewertet wurde histomorphometrisch die Gewebequalität im Fusionsspalt, das Fusionsergebnis wurde mittels Score bewertet und in der deskriptiven Histologie wurde das Gewebe auf zellulärer und Matrix- Ebene analysiert. Zur Beschreibung resorptiver Ereignisse und von Entzündungsreaktionen wurde die Bestimmung der Ostoklasten- und Gefäßdichte herangezogen. Ziel war es, die Eignung des verwendeten Materials zur Verbesserung der ventralen, intervertebralen Spondylodese der Schafshalswirbelsäule zu beurteilen. Insbesondere sollte ein Vergleich zur Verwendung von autologer Spongiosa aus dem Beckenkamm gezogen werden, um den sogenannten Goldstandard durch ein neuartiges Material ersetzen und damit zukünftig dem Patienten den zusätzlichen Eingriff am Becken ersparen zu können.

Die Eingangs aufgestellte Hypothese, dass lokal appliziertes TGpIPTH<sub>1-34</sub> in einer Fibrinmatrix durch seine osteoinduktiven und osteokonduktiven Eigenschaften Knochenneubildung an der Schafshalswirbelsäule induziert, konnte in dieser Studie bestätigt werden.

Die Wirkung des lokal eingesetzten TGpIPTH<sub>1-34</sub> auf die Wirbelfusion des dritten und vierten Schafshalswirbels war dabei tatsächlich konzentrationsabhängig, wie als zweite Hypothese formuliert. Die niedrigste Konzentration von 0,2 mg PTH<sub>1-34</sub>/ml Fibrin zeigte ein dem Goldstandard vergleichbares Heilungsergebnis in der histomorphometrischen Auswertung der Knochenfläche der gesamten ROI. Alle höheren Konzentrationen von 0,4 bis 1,0 mg

PTH<sub>1-34</sub>/ml Fibrin sowie die Fibrinkontrollgruppe wiesen dagegen geringere Knochenflächen auf.

Auch die dritte Hypothese konnte bestätigt werden. Beim lokalen Einsatz von PTH<sub>1-34</sub> zur Wirbelfusion wurde nach zwölfwöchiger Heilungszeit eine komplette Fusion des dritten und vierten Schafshalswirbels erzielt. Sowohl die Spongiosagruppe als auch die PTH-Gruppe 3 und 5 wiesen drei komplett fusionierte Wirbelsäulen auf.

Die vierte Hypothese, dass Parathormon im Vergleich zur autologen Spongiosa aus dem Beckenkamm ein vergleichbares oder besseres Fusionsergebnis nach zwölf Wochen aufweist, konnte nur teilweise bestätigt werden. Die Gruppe 3 mit der niedrigsten Konzentration PTH<sub>1-34</sub> lieferte histomorphometrisch und histomorphologisch ein der Spongiosagruppe vergleichbares Heilungsergebnis, zum Teil wiesen die Tiere dieser Gruppe sogar größere Knochenflächen auf, jedoch war der Unterschied zur Spongiosagruppe nicht signifikant. Die höheren Konzentrationen blieben mit Ausnahme der Betrachtung von Einzelparametern hinter dem Fusionsergebnis der Spongiosagruppe zurück.

Die fünfte Hypothese, dass das Fibrinmaterial bovinen Ursprungs mit kovalent gebundenem PTH<sub>1-34</sub> lokale Entzündungsreaktionen im ovinen Organismus verursacht, musste entgegen den bisherigen Studien zum verwendeten Material (Arrighi, 2009; Mark, 2007) bestätigt werden. Insgesamt kam es durch das Fibrin-PTH-Gemisch zu mehr Entzündungsreaktionen im Vergleich zur Spongiosagruppe, jedoch waren diese meist mild und lokal begrenzt und schließen eine weitere Verwendung des Materials zur Fusion an der Halswirbelsäule nicht aus.

## 5.1. Tiermodell

Die operative Versteifung eines Wirbelsäulensegmentes (Spondylodese) ist ein in der Humanmedizin häufig angewendetes Verfahren zur operativen Behandlung von Instabilitäten der Halswirbelsäule. Zur Untersuchung des klinischen Heilungsergebnisses stehen zu Lebzeiten des Patienten als nicht invasive Methoden nur radiologische und magnetresonanztomographische Untersuchungen zur Verfügung. Während der Operation und im späteren Verlauf als Biopsien gewonnene Gewebeproben können histologisch untersucht werden, allerdings liefern sie meist kein umfassendes Bild der zellulären Prozesse. Post mortem lassen sich größere histologische Proben der Operationsbereiche anfertigen. Die dazu erforderliche Einwilligung des Patienten macht diese Proben rar und durch die unterschiedlichen Untersuchungszeitpunkte ist die Gruppengröße meist klein, so dass die Ergebnisse häufig nicht repräsentativ und eine statistische Auswertung kaum möglich ist (Togawa, 2001). Ebenso fehlt es meist an einer entsprechenden Kontrollgruppe (Roach, 1989). Um eine aussagekräftige, detaillierte Analyse des Heilungsergebnisses auf

zellulärer Ebene auch im Hinblick auf frühe Untersuchungszeitpunkte zu erhalten, ist die histologische Untersuchung im Tiermodell unerlässlich. Aus den Ergebnissen der tierexperimentellen Studie sollen Rückschlüsse auf eine vergleichbare Situation beim Menschen möglich sein. Die Wahl des richtigen Versuchstieres ist daher besonders wichtig. Aus ethischen und tierschützerischen Gründen sollte ein möglichst niedrig entwickeltes Tier verwendet werden (Roach, 1989; Schimandle, 1994). Um eine vergleichbare Situation zu den Bedingungen im Menschen herzustellen, sollte das Tier jedoch über ähnliche anatomische und biomechanische Verhältnisse verfügen (Wissing, 1990). Dem Menschen entsprechende Größenverhältnisse sind dabei für die Verwendung der gleichen Implantate und Instrumentarien, äquivalenten Mengen an Biomaterialien sowie die für die Wahl des gleichen operativen Zuganges von Vorteil (Wissing, 1990). Das Versuchstier sollte möglichst kostengünstig und unkompliziert in Anschaffung und Haltung sein und jederzeit in entsprechendem Alter, Gewicht und Geschlecht zur Verfügung stehen (Roach, 1989; Schimandle, 1994). Zur experimentellen Untersuchung am Knochen sollte die Fähigkeit des Knochens zur Regeneration analog der des Menschen sein (Wissing, 1990). Zur ventralen Spondylodese wird als Kleintiermodell vor allem das Kaninchen verwendet (Cottrell, 2006; Dodds, 2009; Taguchi, 1984; Tho, 1996). Daneben findet der Hund häufig Anwendung (Cook, 1994; Emery, 1994; McAfee, 1988; Wang, 1984). Bei den Großtieren wird vor dem Schaf (Drespe, 2005; Kandziora, 2003; Kettler, 2007; Sandhu, 2002; Slivka, 2006; Zdeblick, 1998) noch die Ziege (Cahill, 2003; Toth, 1995; Zdeblick, 1993; Zdeblick, 1992) zur Spondylodeseherforschung herangezogen. Aus ethischen Gründen findet der Primat eher selten Verwendung (Hecht, 1999). Zur interkorporellen Spondylodese sollten die Endplatten der Wirbelkörper parallel sein, was nur im Großtier zu finden ist (Drespe, 2005). In dieser tierexperimentellen Studie wurde das Schaf als Versuchstier gewählt, da in mehreren Studien die anatomischen und biomechanischen Eigenschaften des ovinen Halswirbelsäulensegmentes C3/C4 große Ähnlichkeit mit dem des Menschen aufwiesen (Cain, 1995; Kandziora, 2001; Wilke, 1997; Wilke, 1997a). Von Vorteil ist auch die dem Menschen entsprechende Größe der Halswirbelsäule. Die jahrelange Erfahrung der Arbeitsgruppe mit dem Schaf zur intervertebralen Spondylodese zeigte, dass das Schaf den operativen Eingriff sehr gut toleriert und Infektionen äußerst selten sind (Kandziora, 2001a; Kandziora, 2002; Kandziora, 2003; Kandziora, 2002b; Kandziora, 2001; Kandziora, 2002a; Kandziora, 2002c). Durch die Verwendung eines gezüchteten, landwirtschaftlichen Nutztieres kann eine hohe Homogenität der Versuchsgruppe erzeugt werden. Die in diesem Versuch verwendeten Schafe stammten aus der gleichen Zucht. Es handelte sich dabei stets um weibliche Merino-Mix Schafe, mit gleichem Gewicht und einem Alter von über zwei Jahren, um ein ausgewachsenes Skelettsystem zu gewährleisten. Die Tiere wurden randomisiert in die sechs Versuchsgruppen eingeteilt. Um die äußeren Einflüsse auf das

Heilungsergebnis möglichst gering zu halten, wurden alle Tiere unter den gleichen Bedingungen gehalten, hatten eine identische Standzeit, erhielten die gleiche medizinische Versorgung und wurden operativ stets vom gleichen Operateur mit dem gleichen Instrumentarium versorgt. Das Schaf eignet sich trotz der höheren Kosten und dem größeren logistischen Aufwand für Erwerb, Unterbringung und Verpflegung im Vergleich zum Kleintier gut als Versuchstier, da es als Herdentiere in Kleingruppen gehalten werden kann und auch im Versuchsverlauf sein ruhiges Verhalten dem Menschen gegenüber nicht verändert. Durch Haltung von ausschließlich weiblichen Schafen können Unruhen in der Herde zusätzlich vermieden werden.

Als limitierender Faktor dieser Studie ist die qualitativ und quantitativ andere Krafteinwirkung auf die horizontal gelagerte Halswirbelsäule des Schafes als Quadrupeden im Vergleich mit der vertikal gelagerten Halswirbelsäule des Menschen als Bipeden zu nennen (McAfee, 1988; Smit, 2002; Wilke, 2008). Insbesondere herrscht beim Quadrupeden im Vergleich zum Menschen eine höhere axiale Kompression der Wirbelsäule, was in einer höheren Knochendichte der Wirbelkörper resultiert (Smit, 2002). Kritisch ist außerdem die Übertragung von Ergebnissen der Versteifung eines zuvor gesunden Wirbelsäulensegments des Schafes auf die Gegebenheiten nach Operation eines unter Umständen schon jahrelang pathologisch veränderten humanen Wirbelsäulensegmentes zu sehen. Desweiteren wird von einer zweidimensionalen Analyseverfahren in Form der histologischen Auswertung von Gewebeschnitten auf ein dreidimensionales Wirbelsäulensegment geschlossen (McAfee, 1988). Zu bedenken ist weiterhin, dass die Knochenstruktur des Schafes wenig Ähnlichkeit mit der des Menschen hat, da hauptsächlich Primärosteone vorliegen (Eitel, 1981; Eitel, 1981a; Eitel, 1981b). Hund und Primaten verfügen dagegen über gleichartige Sekundärstrukturen wie der Mensch und eignen sich daher am besten als Versuchstiere zum Vergleich des knöchernen Regenerationsprozesses (Eitel, 1981; Eitel, 1981a; Eitel, 1981b). Die Verwendung von Primaten im Tierversuch ist in Deutschland nicht erlaubt und auf die Verwendung von Hunden wurde hier ebenfalls verzichtet, da diese Tiere post OP nur schwer ruhig gehalten werden können.

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

### **5.2.1 Operationsmethode und Auswertungszeitpunkt**

Als Operationsmethode wurde in dieser Studie die ventrale interkorporelle Spondylodese mittels eines Titancages (SynCage-C<sup>®</sup>) nach Discectomie des Bandscheibenfaches zwischen dem dritten und vierten Schafshalswirbel gewählt (Cloward, 1959; Smith, 1958). Der Cage im Boxdesign ist kommerziell erhältlich und findet in der Humanmedizin häufig als

„stand alone“-Implantat Anwendung. In einer früheren Studien der gleichen Arbeitsgruppen wurde dieses Implantat bereits *in vivo* und *in vitro* getestet und gab dem Bewegungssegment in der *in vitro* biomechanischen Testung eine höhere Stabilität in allen Bewegungsrichtungen im Vergleich zum intakten Wirbelsäulensegment, der Stabilisierung mittels Beckenkammspan und dem Harmscage als zylinderdesign Cage (Kandziora, 2001a). *In vivo* zeigte der Harmscage noch eine größere Steifigkeit als der SynCage-C<sup>®</sup>, allerdings entschieden wir uns trotzdem für die Verwendung des Boxdesign Cages, da er bei der radiologischen Verlaufsuntersuchung die durchschnittliche Bandscheibenraumhöhe etwas besser halten konnte (Kandziora, 2002b), damit weniger in Deck- und Bodenplatte einsinkt und einfacher im Bandscheibenfach positioniert werden konnte. Bei der histologischen Evaluation des Cages in Box- bzw. Zylinderdesign ergaben sich zudem keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Cages (Dresbach, 2007). Durch die aus dem SynCage-C<sup>®</sup> herausragenden Spikes wurden die Deck- und Bodenplatte aufgerissen, so dass Blutungen für ein optimales Implantatlager entstehen und eine Dislokation des Cages verhindert wird. Auf ein Anfräsen der Deck- und Bodenplatte konnte damit verzichtet werden und das Risiko des Einsinterns des Implantates wurde damit zusätzlich verringert. Ebenso entfällt beim SynCage-C<sup>®</sup> ein lästiges Zuschneiden des Implantates, da dieser gleich in der entsprechenden Höhe von sieben Millimeter geliefert wird. Durch seinen hohlen Körper ist eine Applikation der Fibrinmatrix mit dem darin kovalent gebundenem Parathormon<sub>1-34</sub> (GTpIP<sub>TH1-34</sub>) einfach und erlaubt im Verlauf des Einheilungsprozesses eine komplette knöcherne Fusion der beiden Wirbelkörper. Die Gewebequalität zwischen Deck- und Bodenplatte des dritten und vierten Halswirbels wurde nach einer Standzeit von zwölf Wochen histologisch untersucht. Zu diesem Untersuchungszeitpunkt ist die Spondylodese fortgeschritten, jedoch noch nicht vollständig (Cunningham, 1999; Dresbach, 2007; Kandziora, 2002b). Eine knöcherne Fusion des Wirbelsäulensegmentes ist sowohl mit autologen Materialien als auch mit Cages und Wachstumsfaktoren zu diesem Zeitpunkt bereits möglich (Cunningham, 2002; Kandziora, 2002; Kandziora, 2002b; Kandziora, 2002a) und erlaubt damit den Vergleich zwischen dem Goldstandard, der in dieser Studie durch den SynCage-C<sup>®</sup> gefüllt mit autologer Spongiosa repräsentiert wurde, und der zu testenden Fibrinmatrix mit kovalent gebundenem Parathormon<sub>1-34</sub> zur Induktion von Knochenwachstum.

### 5.2.2 Applikation des Fibrinmaterials

Die Herstellung der Fibrinmatrix mit darin kovalent gebundenem PTH erfolgte standardisiert wie in Kapitel 3.2.4 beschrieben. Die bei -15 °C einzeln gelagerten Spritzen mit Fibrinogen und Thrombin wurden in einem Inkubator stets auf +37 °C erwärmt um die optimale Temperatur für den anschließenden Koagulationsprozess zu schaffen. Vor Anmischung erfolgte eine visuelle Überprüfung der vorständig aufgetauten Flüssigkeiten. Durch die

getrennte Materialfüllung der Cages vor dessen Einsatz und der anschließenden Materialfüllung des Bandscheibenfaches konnte gewährleistet werden, dass immer die gleiche Menge in gleichmäßiger Verteilung pro Tier appliziert wurde. Das Material erwies sich nach dem Koagulationsprozess als äußerst homogen. Durch seine pastöse Konsistenz war es leicht zu handhaben und einzubringen.

### **5.2.3 Gewinnung und Verabreichung der autologen Spongiosa**

Die Spongiosa wurde bei den acht Tieren der Positivkontrollgruppe stets auf die gleiche Art gewonnen. Als Entnahmestelle diente der linke Beckenkamm. Unter Zuhilfenahme eines scharfen Löffels wurde eine vergleichbare Menge zu den 3,5 ml der Fibrinmatrix, die bei den anderen Gruppen in das Bandscheibenfach eingefüllt wurden, gesammelt. Durch die vorherige Präparation des Zugangs an der Halswirbelsäule sowie Diskektomie konnte die Spongiosa ca. zehn Minuten nach ihrer Entnahme appliziert werden. Bis dahin wurde sie in steriler Kochsalzlösung feucht gehalten. Es erfolgte wie bei den Fibringruppen eine separate Füllung des Cages vor dessen Einsatz. Nach Platzierung des Cages wurde dann der restliche Bandscheibenraum mit Spongiosa gefüllt. Die Tiere tolerierten den zusätzlichen Eingriff am Becken meist ohne Probleme. Ein Tier der Spongiosagruppe lahmt am ersten Tag post OP geringgradig. Die Lahmheit wurde mit einem Schmerzmittel behandelt, so dass das Tier bereits am zweiten Tag post OP lahmfrei war.

### **5.2.4 Entnahme und Aufarbeitung der Proben**

Die Entnahme des fusionierten Wirbelsäulensegmentes verlief stets problemlos. Ein Zerreißen des Gewebes zwischen den Wirbelkörpern war nicht möglich, da es initial durch die autochthone Wirbelsäulenmuskulatur gehalten wurde. Diese wurde im Anschluss vorsichtig bis auf die Band- und Knochenstrukturen abpräpariert. Als kritischer Punkt in der Aufarbeitung der histologischen Proben erwies sich die Entnahme des zersägten Titancages. Nach siebentägiger Fixierung der 4 mm Sägeschnitte wurden erstmalig vorsichtig versucht, die Reste des Titancages zu entfernen. War das noch nicht leicht möglich, wurden die Gewebeschnitte weiter in der Fixierlösung belassen und täglich erneut versucht, das Implantat zu entfernen. Trotzdem kam es an einigen Stellen zu einem geringen Verlust an Gewebe in direktem Kontakt zum Cage, da dieser in seinem Gerüst ca. 0,5 mm große Löcher zur Durchbauung mit Knochengewebe aufwies, die die Entnahme zusätzlich erschwerten. Da der Cage selber und die Auswertung der direkt angrenzenden Gewebefläche nicht den Schwerpunkt der histologischen Auswertung darstellten, verzichteten wir auf die Herstellung von Schliffpräparaten.

In der histomorphometrischen Auswertung wurden die Leerflächen, entstanden durch den entnommenen Cage und evtl. Gewebeverlust bei der Entnahme des Cages, durch die computergestützte Bildanalyse aus der Flächenberechnung herausgerechnet. Eine entsprechende Ungenauigkeit nahmen wir bei der deskriptiven histologischen Auswertung als unbedeutend in Kauf. Das Fixierungs- und Aufbereitungsschema erwies sich als optimal für Proben dieser Größe, da sich alle Präparate am Ende problemlos am Mikrotom schneiden ließen. Es musste in keinem Fall ein Ausweichpräparat aus einer weiter außen liegenden Ebene verwendet werden. Kleinere Artefakte im Sinne von Reißlinien beim Schneiden ließen sich jedoch nicht vermeiden. Diese wurden bei der Auswertung mit Hilfe der computergestützten Bildanalyse manuell korrigiert.

Bei der Beurteilung diese Arbeit war dennoch zu berücksichtigen, dass für die Auswertung der Wirbelfusion nur ein zweidimensionales Bild herangezogen wurde. Durch ausschließliche Beurteilung der beiden mittleren Sägeschnitten ist nicht auszuschließen, dass ein mittig gut fusioniertes Präparat in einem weiter außen liegenden Sägeschnitt ein ganz anderes Bild zeigte und umgekehrt. Im Rahmen dieser tierexperimentellen Studie als Gesamtprojekt wurde allerdings auch eine computertomographische Auswertung des kompletten Bandscheibenraumes angefertigt, so dass makroskopisch sichtbare Abweichungen in diesem Hinblick bemerkt werden. Die Anfärbung der histologischen Schnitte zeigte bei allen Färbungen mit Ausnahme der Movat-Pentachromfärbung bei Einhaltung des gleichen Färbeprotokolls stets ein homogenes Färbeergebnis. Bei der Movat-Pentachromfärbung kam es zu unterschiedlichen Farbtintensitäten selbst bei einem Färbedurchgang, so dass die computergestützte bildanalytische Auswertung nur mit manueller Korrektur der Knorpelanteile unter mikroskopischer Kontrolle möglich war. Eine Ausweichung auf eine andere Färbemethode zur farblichen Unterscheidung von hyalinem Knorpel und Bindegewebe war nicht möglich, da die Färbung mit Safranin-Orange / Lichtgrün und Masson-Goldner zu einem schlechteren Färbeergebnis führte. Der hyaline Anteil des Knorpels wurde nicht sicher und zum Teil sehr ungleichmäßig grün angefärbt, so dass er sich noch schlechter vom rötlich angefärbten restlichen Bindegewebe differenzieren ließ.

### **5.2.5 Deskriptive Histologie**

Bei der deskriptiven histologischen Auswertung wurde von jedem Tier ein Präparat in der kombinierten Safranin Orange/von Kossa-Färbung, Movat-Pentachromfärbung, Masson-Goldner-Färbung und Toluidinblau-Färbung ausgewertet. Beurteilt wurden Kriterien wie die Gewebezusammensetzung und -verteilung in den einzelnen ROIs, die für die Beurteilung einer Spondylodese wichtig waren. Daneben fanden eine Beurteilung des Einheilungsverhaltens des Cages sowie evtl. Gewebereaktionen auf das verwendete Material wie Entzündungsreaktionen und Osteolysen statt. Die Auswertung erfolgte rein

subjektiv und ließ außer bei der Kallusbildung der ventralen ROI keine Validierung mittels Score zu, da hierzu die unterschiedlichen Kriterien gleichwertig in ihrer Bedeutung für den Erfolg der Spondylodese sein müssten, ansonsten käme es zu einer Verfälschung der Ergebnisse in eine falsch positive oder falsch negative Richtung. Zusätzlich zu den objektiv messbaren Ergebnissen aus der Histomorphometrie, dem Fusionscore und den Gefäß- und Osteoklastenzählungen gibt die deskriptive Histologie wichtige, ergänzende Informationen über das Fusionsergebnis. Während bei der histomorphometrischen Auswertung nur Zahlen ausgewertet werden, lassen sich bei der deskriptiven Histologie auch komplexe Prozesse beschreiben. So lässt sich der vorliegende Ossifikationstyp bestimmen, eine Aussage über die Knochenqualität machen und etwaige Entzündungsreaktionen und Bereiche mit Osteolysen näher darstellen.

### **5.2.6 Histomorphometrie**

Die computergestützte histomorphometrische Auswertung bietet den Vorteil der automatisierten und standardisierten Auswertung von Gewebeflächen. Über Farbverteilungen werden die Flächen vom Computerprogramm gemessen. Manuell kann durch die auswertende Person noch eine Korrektur durchgeführt werden. Von Vorteil ist hierbei die einfache Auswertung auch durch Personen ohne spezielle Vorkenntnisse. Individuelle Unterschiede bei der automatisierten oder halb automatisierten Messung können im Vergleich mit manuellen Messmethoden reduziert werden (Flygare, 1997; Wright, 1992). Histomorphometrisch wurden jeweils zwei Gewebeschnitte pro Tier ausgewertet. Zur Messung der Knochenfläche, der mineralisierten Knochenfläche und der Bindegewebefläche wurde von jedem Tier ein Gewebeschnitt in der kombinierten Safranin-Orange/von Kossa-Färbung ausgewertet. Dabei wurden die schwarz pigmentierten Bereiche vom Computerprogramm als mineralisierter Knochen erkannt. Rot angefärbtes Gewebe wurde als Bindegewebe gemessen. Eine manuelle Korrektur fand bei der Unterscheidung von Osteoid und Markgewebe, das in einer Messung zur Gesamtknochenfläche gerechnet wurde und ebenso wie das Bindegewebe in verschiedenen Rottönen angefärbt wurde, statt. In der Movat-Pentachromfärbung wurden die hyalinen Knorpelgewebeflächen gemessen. In dieser farbenfrohen Gewebefärbung stellt sich das Bindegewebe in verschiedenen Gelb- und Grüntönen dar (Movat, 1955). Durch die Kontrolle des entsprechenden Gewebeschnittes unter dem Mikroskop und anschließender manueller Korrektur der gemessenen Gewebefläche wurde ausschließlich hyaliner Knorpel in die Messung einbezogen. Eine stichprobenartige Überprüfung der Messergebnisse durch eine zweite Person ergaben in dieser Studie nur geringe Abweichungen in den Gewebeflächen, weswegen auf einen zweiten Untersucher verzichtet wurde.

### **5.2.7 Fusionsscore**

Zur Beurteilung des Wirbelfusionssergebnisses jedes einzelnen Tieres wurde ein Score verwendet, der eine Einteilung in drei verschiedene Kategorien zuließ und den Grad der knöchernen Überbrückung innerhalb der Cagepore bewertete. In die Bewertung des Heilungsergebnisses ging dabei lediglich die knöcherne Überbrückung der Cage ROI ein. Bei der Beurteilung des Ergebnisses des Fusionsscores ist daher zu berücksichtigen, dass lediglich ein Teilbereich des Intervertebralraumes beurteilt wird, in den das Material appliziert wurde. Die ventrale ROI, in die ebenfalls Fibrinmaterial appliziert wurde, findet hierbei zum Beispiel keinerlei Berücksichtigung. Die Aussage, die durch den Fusionsscore über das Heilungsergebnis eines Segmentes gemacht wurde, war daher im Vergleich zur Histomorphometrie als weniger gewichtig zu betrachten. Desweiteren ist zu sehen, dass die drei Kategorien sehr unterschiedlich gefasst sind. Bei der Festlegung, dass die Kategorie F1 nur bei Präparaten vergeben wird, bei denen eine knöcherne Überbrückung der Deck- und Bodenplatte zu über 50 % innerhalb der Cage ROI besteht, signalisiert durch den hohen Anteil an knöcherner Überbrückung des Fusionsspalt ein sehr gutes Heilungsergebnis. Die Kategorie F2 ist dagegen sehr breit gefasst, da sie alle Präparate beinhaltet, die überhaupt eine Überbrückung zeigen bis hin zu einer Überbrückung von 50 % der Cage ROI. Es ist daher davon auszugehen, dass bei einer Studie, die ein eher mäßiges Fusionsergebnis aufweist, kaum Unterschiede im Vergleich der Gruppen auftreten werden, weil alle Tier in den F2 Score fallen. Eine differenziertere Betrachtung der knöchernen Überbrückung ist bei der histomorphometrischen und deskriptiven Auswertung zu erwarten. Positiv an dieser Auswertungsmethode sind jedoch der geringe zeitliche Aufwand und der relativ schnelle Überblick über das Heilungsergebnis der einzelnen Gruppen.

### **5.2.8 Gefäßzählung**

Die selektive Anfärbung des  $\alpha$ -smooth muscle actins durch die angewandte immunhistochemische Färbung ist im Julius Wolff Institut ein etabliertes Verfahren zum Nachweis von Gefäßen in Knochengewebe von Schafen. Das Färbeprotokoll hat sich in zahlreichen Versuchen bewährt (Lienau, 2005). Die Gefäße wurden innerhalb der für die histomorphometrische Auswertung festgelegten ROIs gezählt. Eine Digitalisierung der Präparate und damit computergestützte Auswertung war auf Grund ihrer Größe nicht möglich, daher erfolgte die Gefäßzählung durch meanderförmiges Durchmustern der Gewebeschnitte. Myofibroblasten werden durch diese Färbung ebenfalls rot angefärbt, konnten aber durch das fehlende Lumen von Gefäßen unterschieden werden. Neu gebildete Kapillaren, die noch keine Muskelschicht besitzen, werden bei dieser Färbung nicht erfasst. Durch die zum Teil hohe Anzahl von Gefäßen schon in der  $\alpha$ -SMA-Färbung wurde auf eine

Darstellung der Kapillaren, wie sie durch die selektive Färbung des Von Willebrandt Faktors möglich ist, verzichtet. Die Färbung konnte an den Wirbelsäulenpräparaten leicht durchgeführt werden und zeigte bei Kontrollen am gleichen Präparat keine Unterschiede in der Anzahl der angefärbten Gefäße. Bei der Farbintensität der rot angefärbten Gefäße gab es je nach Abstopzeit des Präparates leichte Unterschiede. Als kritische Punkte dieser Messmethode war die manuelle Einzeichnung der fünf verschiedenen ROIs zu sehen, sowie der Bezug der Gefäßanzahl auf eine Bindegewebsfläche, die aus einem angrenzenden Plastikschnitt gewonnen wurde, und damit zu einer gewissen Messungenauigkeit führte.

### **5.2.9 Osteoklastenzählung**

Die Anzahl der Osteoklasten wurde über die Möglichkeit der Anfärbung der lysosomenständigen Tartrat-resistenten alkalischen Phosphatase bestimmt. Über diesen biochemischen Marker können die Osteoklasten optisch quantifiziert werden (Bonucci, 2001; Filgueira, 2004; Hayman, 2008; Marques, 2009; Minkin, 1982; van de Wijngaert, 1986; Walsh, 2003). Sie stellten sich in dieser Färbung rosa dar. Es wurden alle Zellen, die rosa angefärbt waren, mindestens zwei Kerne besaßen und Kontakt zum Knochen hatten, als Osteoklasten gezählt (Schell, 2006). Die Zählung erfolgte wie bei der Gefäßzählung am Paraffinschnitt, da sich am Plastikschnitt deutlich schlechtere Färbeergebnisse erzielen ließen. Auch hier konnte aufgrund der Größe keine Digitalisierung der Präparate vorgenommen werden, so dass erneut auf die manuelle Zählung mittels 40facher Vergrößerung unter dem Lichtmikroskop mit Handzählgerät zurückgegriffen werden musste. Als mögliche Quellen einer ungenauen Messung waren die manuell eingezeichneten ROIs und der Bezug der Osteoklasten von einem Paraffinschnitt auf eine Knochenfläche, die bei der Auswertung eines direkt angrenzenden Plastikschnittes gemessen wurde, zu sehen. Diese Messungenauigkeit wurde jedoch auf Grund des großen zeitlichen Aufwands für eine zusätzliche Messung der Knochenfläche vom gleichen Paraffinschnitt in Kauf genommen.

## **5.3 Diskussion der Ergebnisse**

### **5.3.1 Histomorphologie und Histomorphometrie**

Nach zwölf Wochen Heilungszeit konnte in der Goldstandardgruppe, bei der autologe Spongiosa aus dem Beckenkamm in den Titancage appliziert worden war, insgesamt eine weit fortgeschrittene knöcherne Fusion des dritten und vierten Halswirbels verzeichnet werden. Von den vier verschiedenen Konzentrationen des modifizierten PTH<sub>1-34</sub> in einer

Fibrinmatrix zeigten nicht alle den erhofften Effekt. Nur die niedrigste Konzentration mit 0,2 mg TgPlPTH<sub>1-34</sub> /ml Fibrin lieferte insgesamt ein ähnlich gutes Heilungsergebnis.

Studien zur Wirbelfusion im Tier und am humanen Patienten sind zahlreich, die histologischen Abläufe jedoch noch nicht bis ins Detail geklärt. Gründe hierfür sind die zum Teil weniger detaillierten histologischen Analysen des Fusionsergebnisses in anderen tierexperimentellen Studien und zum anderen die unterschiedlichen Fusionstechniken und verwendeten Materialien. Einen wichtigen Faktor für die erfolgreiche Fusion mit überbrückender Knochenbildung stellt das Fusionsbett dar (Boden, 1995). Die lokale Blutversorgung aus der knöchernen Unterlage spielt dabei eine große Rolle, denn darüber erfolgt die Versorgung mit Nährstoffen, Entzündungszellen und Osteoprogenitorzellen (Hurley, 1959). Durch das initiale Aufreißen der Deck- und Bodenplatte durch Fräsen oder wie in der vorliegenden Arbeit durch die Zacken des Cages nach Diskektomie soll eine Blutversorgung im Sinne eines Frakturhämatoms gesichert werden. Osteoinduktive Proteine, Zellen der Immunabwehr und mesenchymale Stammzellen, die sich in knochenbildende Zellen differenzieren, gelangen so in den Fusionspalt (Sandhu, 1997). Ebenso kann das Periost und die umgebende Muskulatur diese wichtigen Aufgaben übernehmen (Sandhu, 1997). Zellen, die an der Heilung beteiligt sind, kommen aus dem Knochenmark, dem Periost, den Gefäßen und dem umgebenden Gewebe (Boden, 1995). Die Rekrutierung von primitiven, undifferenzierten, pluripotenten Zellen und deren Stimulation zur Differenzierung in eine knochenbildende Zelllinie wird Osteoinduktion genannt. Undifferenzierte pluripotente Stammzellen entwickeln sich zu Proosteoblasten, zu Ostoblasten und später zum Osteozyten. Über diesen Prozess entsteht zum Beispiel die Mehrheit des neu gebildeten Knochens während der Frakturheilung (Albrektsson, 2001).

Einen weiteren wichtigen Vorgang bei der Bildung von neuem Knochen zur Überbrückung des ehemaligen Bandscheibenraumes stellt die Osteokonduktion dar. Damit ist der Vorgang des Einwachsens von Knochen, Gefäßen, perivaskulärem Gewebe und Osteoprogenitorzellen auf einer geeigneten Oberfläche gemeint (Goldberg, 1987). Von diesen beiden Vorgängen ist direkt die Osseointegration, das heißt die Fixierung eines Implantates durch den direkten Kontakt von Implantat und Knochen ohne dazwischenliegendes Bindegewebe, abhängig. (Albrektsson, 2001). Autologer spongiöser Knochen ist in dieser Hinsicht das erfolgreichste Transplantat zur Wirbelfusion, da er alle drei Phänomene vereint (Boden, 1995c). Durch die im Transplantat enthaltenen Zellen, von denen lediglich Präosteoblasten, Osteoblasten, Präosteoklasten und Osteoklasten die Transplantation überleben, kann direkt neuer Knochen gebildet werden (Boden, 1995; Prolo, 1985). Diese Zellen wirken ganz zu Anfang und befestigen den autologen Knochen in seinem neuen Bett. Für das Anwachsen der Spongiosa ist die Gefäßeinsprossung essentiell,

die das Überleben der darin enthaltenen Zellen sichert (Ray, 1972a). Die Spongiosa wirkt außerdem osteoinduktiv, indem sie mesenchymale Zellen rekrutiert und Osteoprogenitorzellen zur weiteren Differenzierung stimuliert (Albrektsson, 2001; Boden, 1995c; Prolo, 1985; Urist, 1965, 2002). Diese Vorgänge regulieren die in der Spongiosa enthaltenen Wachstumsfaktoren wie BMPs (Goldberg, 1987). Autologe Spongiosa wirkt osteokonduktiv indem seine Struktur den einwachsende Gefäßen und Zellen als Gerüst dient (Goldberg, 1987; Prolo, 1985).

Die Vorgänge zum Einwachsen von Knochentransplantaten wurden vornehmlich aus Studien zur experimentellen Frakturheilung gewonnen, sind aber in ähnlicher Weise auch für die Wirbelfusion vorstellbar. In der ersten Woche befindet sich koaguliertes Blut (Hämatom) im Implantatbett (Burchardt, 1983). In der Entzündungsphase sprossen Gefäße ein, die Osteoprogenitorzellen und Osteoklasten mit sich führen. BMPs bewirken das Einwachsen mesenchymaler Zellen in das Transplantatgewebe. Es wird Granulationsgewebe gebildet (Goldberg, 1987). In der zweiten Woche dominiert faseriges Bindegewebe das Granulationsgewebe, die Anzahl an Entzündungszellen nimmt ab, die Aktivität der Osteoklasten nimmt dagegen zu. Die Osteozyten im transplantierten Material sterben ab. Die verstärkte Osteoklastentätigkeit geht in Knochenbildung über. Osteoblasten bilden einen Saum auf den Enden der absterbenden Knochentrabekel und scheiden Osteoid ab. Im Inneren kommt es zur Nekrose von Knochen, der nach und nach durch Osteoklasten abgebaut wird. Die Knochendichte nimmt zu. Gleichzeitig wandern hämatopoetische Knochenmarkszellen ein. Anschließend erfolgt ein Remodelling des Knochens je nach Belastung. Im letzten Stadium entsteht eine mechanisch stabile Struktur (Burchardt, 1983; Goldberg, 1987).

Zwischen dem Einwachsen von autologem spongiösem und kortikalem Knochen existieren zahlreiche Unterschiede. Generell besitzt der spongiöse Knochen eine größere Oberfläche und wirkt dadurch besser osteokonduktiv als kortikaler Knochen. Spongiöser Knochen enthält im Gegensatz zum kortikalen Knochen auch Knochenmark und ist somit stärker mit osteogenen Zellen gefüllt, so dass er ein größeres Potential für Knochenbildung aus dem Knochentransplantat selbst besitzt. Die Zellen in der Kortikalis überleben generell kürzer, da sie in der kompakten Knochenmatrix schlechter per Diffusion mit Nährstoffen versorgt werden können (Boden, 1995c; Goldberg, 1987).

In Abhängigkeit von der Spezies ist die transplantierte autologe Spongiosa innerhalb von zwei Tagen von Gefäßen umgeben und nach vierzehn Tagen vollständig revaskularisiert (Enneking, 1975; Prolo, 1985; Ray, 1972a). Kortikaler Knochen ist dagegen resistenter gegen das Einwachsen von Gefäßen und wird erst in doppelt so langer Zeit revaskularisiert (Boden, 1995c; Burchardt, 1983). Nach der Vaskularisation erfolgt im spongiösen Knochen eine starke osteogene Phase in der der spongiöser Knochen appositionell durch neuen

Knochen verstärkt wird und im Inneren werden geschwächte Trabekel durch Osteoid verstärkt und später remodelliert.

Beim kortikalen Knochen ist die initiale osteogene Phase kurz und wird von einer resorptiven Phase gefolgt. So wird der kortikale Knochen erst in seinen mechanischen Eigenschaften geschwächt und dann neu aufgebaut. Nach 60 Tagen folgt dann im Kaninchenmodell eine zweite osteogene Phase (Albrektsson, 1980b).

Spongioses Knochentransplantat wird schneller vollständig resorbiert und durch neu gebildeten Knochen ersetzt, während kortikaler Knochen immer ein Mix aus vitalem und nekrotischem Knochen bleiben kann (Boden, 1995c; Enneking, 1975; Goldberg, 1987). Drei Monate nach Ersatz der Ulnadiaphyse durch spongiösen Knochen im Hund war dieser fast vollständig durch neuen Knochen ersetzt, nach einem Jahr jedoch erst komplett (Goldberg, 1987). Auch in einer Studie zur Wirbelfusion am Menschen mittels eines Cages und autologer Spongiosa konnte bei der histologischen Untersuchung von Biopsien sogar nach 8-27 Monaten noch Knochennekrosen und Umbauvorgänge des Transplantates neben neu gebildetem Knochen nachgewiesen werden (Togawa, 2001).

In der vorliegenden Arbeit war in der Spongiosa augmentierte Gruppe kein nekrotischer Knochen nachweisbar. Demnach heilte die Spongiosa optimal ein und war zum zwölf Wochenzeitpunkt bereits fast vollständig durch neuen Knochen ersetzt worden. In der Arbeit von Dresbach dagegen, die den SynCage-C<sup>®</sup> gefüllt mit autologer Spongiosa ebenfalls zur Wirbelfusion im Segment C3/C4 der Schafshalswirbelsäule testete, waren bei 50 % der Präparate große Bereiche im Inneren des Cages mit nekrotischem Knochenmaterial gefüllt, das sich in der kombinierten Safranin Orange/von Kossa-Färbung als rot gefärbte amorphe, zum Teil schollenartige Massen darstellte (Dresbach, 2007). Als Ursache für die weit weniger eingheilte autologe Spongiosa im vermeintlich gleichen Versuchsaufbau kamen die Unterschiede in der Operationsmethode in Frage, die evtl. zur Instabilität des Segmentes und dem insgesamt schlechteren Heilungsergebnis führten. Bei Dresbach wurden Deck- und Bodenplatten des dritten und vierten Halswirbels nach Bearbeitung mit einem scharfen Löffel zusätzlich noch mit einer Hochgeschwindigkeitsfräse bis zur Entstehung petechialer Blutungen angeraut, so dass ein Teil der Kortikalis entfernt wurde. Außerdem erfolgte die Applikation der Spongiosa ausschließlich in den Cage und nicht, wie in der vorliegenden Arbeit, auch um diesen herum im Bandscheibenfach. Durch die höhere Instabilität des Segmentes kam es möglicherweise zu einem Zerreißen der einsprossenden Gefäße und damit zu einer schlechteren Vaskularisierung der Spongiosa. Die enthaltenen Zellen überlebten möglicherweise nicht so lange und durch die schlechter Ernährung des autologen Knochens starb dieser ab. Bei schlechter Vaskularisierung gelangen auch weniger knochenbildende Zellen in den Fusionspalt, so dass die Spongiosa langsamer durch neuen Knochen ersetzt wird. Dadurch kam es möglicherweise zur schlechteren Einheilung der

Spongiosa und dem insgesamt schlechteren Fusions- und Heilungsergebnis. Desbach, konnte Knochennasen von den Endplatten ausgehend in den ehemaligen Bandscheibenraum reichend beobachten, jedoch nur bei einem von acht Tieren eine komplette knöcherne Überbrückung (Dresbach, 2007).

Um ein vergleichbares oder besseres Fusionsergebnis zu erzielen, sollte das für die Wirbelfusion verwendete Material ähnliche Eigenschaften wie die Spongiosa besitzen. Fibrin ist das Endprodukt der Koagulationsskaskade und kommt somit endogen auch im Hämatom zum Beispiel nach Frakturen vor. Das verwendete Fibrin war bovines Ursprungs, wie der in der Medizin so häufig verwendete Gewebekleber. Es ist biokompatibel, wird vom Körper komplett resorbiert und verursacht keine umfangreichen Entzündungsreaktionen, Fremdkörperreaktionen, Gewebenekrose oder Fibrosen (Banerjee, 1960; Francis, 1993; Le Guehennec, 2004; Radosevich, 1997; Schense, 1999; Schmoekel, 2005; Sierra, 1993).

Die Fibrinmatrix wirkte in der vorliegenden Arbeit osteokonduktiv, indem sie einwandernden Zellen und Gefäßen als Grundgerüst diente (Dunn, 1999; Schlag G, 1986; Sierra, 1993). In *in vitro* und *in vivo* Studien zeigte Fibrin auch alleine eine verstärkende Wirkung auf die Angiogenese (Dejana, 1987; Dejana, 1985; Dvorak, 1987; Olander, 1985; Takei, 1995). Das Fibrinkoagel wird durch proteolytische Enzyme aus dem fibrinolytischen System wie Plasmin aufgelöst. Hohe Konzentrationen des Enzyms kommen als Antwort auf eine Entzündung im Gewebe vor (Le Guehennec, 2004). Ebenso können Makrophagen, Fibroblasten und lokale neutrophile Granulozyten proteolytische Enzyme bilden, die das Fibrinkoagel auflösen (Murphy, 1999; Sierra, 1993). Fibrin rekrutiert diese Zellen aus dem beschädigten Gewebe nach einem Trauma (Radosevich, 1997). Über diesen Weg wurde auch das kovalent in die Fibrinmatrix gebundene PTH<sub>1-34</sub> auf „Nachfrage“ freigesetzt. PTH<sub>1-34</sub> wirkte bei systemischer, intermittierender Gabe zur Osteoporosetherapie, experimenteller Frakturheilung sowie posterolateraler Wirbelfusion an der Lendenwirbelsäule osteoinduktiv. Dabei stimuliert PTH zum einen ruhende Osteoblasten auf der Knochenoberfläche, die sogenannten „bone lining cells“, so dass diese aktiviert werden (Jilka, 2007; Jilka, 1999). Zum anderen erhöht es die Anzahl an Osteoblasten durch die Proliferation der Osteoblasten-Progenitorzellen (Jilka, 2007; Jilka, 1999; Kostenuik, 1999; Kousteni, 2008; Nakazawa, 2005; Nishida, 1994; Valenta, 2005), die Förderung der Differenzierung von Präosteoblasten und Osteoblasten (Osteoblastogenese) und die Inhibierung der Osteoblastenapoptose durch Steigerung der DNA-Reparatur (Bellido, 2003; Jilka, 2007; Jilka, 1999; Kousteni, 2008; Qin, 2004; Schnoke, 2009). Aus der erhöhten Anzahl an Knochenmatrix synthetisierenden Osteoblasten resultiert die Steigerung des Knochenwachstums (Dobnig, 1997; Jilka, 2007; Lindsay, 2006).

Um die Vorgänge der Wirbelfusion in der vorliegenden Studie detailliert zu beschreiben, erfolgte die Einteilung des ehemaligen Bandscheibenraumes wie bereits in Abschnitt 3.4.1 erwähnt in die fünf verschiedenen Bereiche (ROIs).

In der **Gesamt-ROI** zeigte die Gruppe 3 mit der niedrigsten PTH-Konzentration einen genauso großen Anteil an Knochengewebe wie die Goldstandard-Spongiosagruppe. So stellte sich die Wirkung des TGpPTH<sub>1-34</sub> tatsächlich konzentrationsabhängig dar, denn alle Gruppen mit höheren Konzentrationen an PTH<sub>1-34</sub> wiesen schlechtere Heilungsergebnisse mit statistisch signifikant niedrigeren und breiter gestreuten Knochenanteilen auf. Die Knochenanteile nahmen im Median mit steigender PTH-Konzentration ab. Auch die Fibringruppe wies einen im Vergleich mit der Spongiosagruppe niedrigeren Knochenanteil auf. Im Bereich der mineralisierten Knochenfläche ergaben sich dagegen zwischen den Gruppen kaum Unterschiede. Die Gruppe 6, bei der die höchste Konzentration an Parathormon eingesetzt wurde, zeigte einen signifikant niedrigeren mineralisierten Knochenanteil als die Spongiosagruppe.

Der Bindegewebeanteil verhielt sich dem Knochenanteil entgegengesetzt. Die Spongiosagruppe und die Gruppe 3 zeigten einen niedrigen Bindegewebeanteil. Die PTH-Gruppen 4, 5 und 6 wiesen ebenso wie die Fibringruppe einen höheren Bindegewebeanteil als die Spongiosagruppe auf. Je höher die verwendete Parathormon-Konzentration, desto höher war auch die messbare Bindegewebefläche. Ein hoher Bindegewebeanteil wurde als negativ im Sinne der Wirbelfusion gewertet, wonach nur die PTH-Gruppe mit der niedrigen Konzentration (Gruppe 3) ein ähnlich gutes Heilungsergebnis wie die Spongiosagruppe aufwies. Alle anderen Gruppen zeigten durch ihren höheren Bindegewebeanteil eine weit weniger fortgeschrittene Fusion.

Beim Knorpelanteil ergab sich im Vergleich mit der Spongiosagruppe kaum ein Unterschied. Lediglich Gruppe 4 zeigte einen signifikant höheren Knorpelanteil als die Spongiosagruppe. Knorpel wurde als positiv für die Wirbelfusion gewertet, da wie in der histomorphologischen Auswertung ersichtlich über diesen enchondral neuer Knochen gebildet wird. So wies Gruppe 4 einen niedrigeren Knochenanteil als die Spongiosagruppe auf, zeigt aber durch den hohen Knorpelanteil ein besseres Fusionsergebnis als die Versuchsgruppen mit den noch höheren PTH-Konzentrationen sowie die Fibringruppe.

Bei der histomorphologischen Betrachtung der **Cage ROI** in Einzelnen war die Wirbelfusion in der Gruppe 3 am weitesten fortgeschritten. Knochengewebe dominierte bei allen acht Schafen diese ROI. Wie in der Goldstandard-Spongiosagruppe konnte eine knöcherne Überbrückung des dritten und vierten Halswirbels bei drei Schafen verzeichnet werden. Als Vorstufe zu einer kompletten Fusion der beiden Wirbel konnte in beiden Gruppen ein Schaf gewertet werden, dass bereits über einen Streifen aus hyalinem Knorpel eine Verbindung zwischen dem dritten und vierten Halswirbel zeigte. Ein insgesamt etwas weniger weit

fortgeschrittenes Heilungsergebnis zeigte Gruppe 5 mit ebenfalls drei fusionierten Wirbelkörpern. Gruppe 4 und Gruppe 6 wiesen ein schlechtes Heilungsergebnis auf, nur jeweils die Hälfte der Tiere zeigte hauptsächlich Knochengewebe in dieser ROI. Jeweils ein Tier zeigte eine knöchernen Überbrückung der beiden Wirbelkörper. Gruppe 4 wies deutlich mehr hyalinen Knorpel auf und bei zwei Tieren war der ehemalige Bandscheibenraum sogar durch diesen überbrückt. Die Fibringruppe wies das schlechteste Fusionsergebnis auf, da keins der Tiere eine knöchernen Überbrückung des dritten und vierten Halswirbels zeigte. Die Geflechtknochenbildung lief bei der Spongiosagruppe sowie den anderen Versuchsgruppen stets von Deck- und Bodenplatte in Richtung Zentrum des Cages ab. Auf dem Geflechtknochen war hyaliner Knorpel in Form eines Saumes oder kleinerer Inseln sichtbar. So wurde der Geflechtknochen in allen Gruppen vor allem enchondral über die Vorstufe aus hyalinem Knorpel gebildet. Bei einigen Tieren waren noch Nester und Inseln aus mineralisiertem Knorpel eingemauert in den neu gebildeten Knochen weiter zentral zu erkennen. Weiter im Inneren des neu gebildeten Geflechtknochens waren Osteoblastensäume auf den Knochen trabekeln sichtbar, die gleichzeitig desmal neuen Knochen bildeten.

Histomorphometrisch bestand beim Vergleich der Knochenfläche zwischen der PTH-Gruppe mit der niedrigsten Konzentration und der Goldstandard-Spongiosagruppe kein Unterschied. Statistisch signifikant niedrigere Knochenflächen in der Cage ROI wiesen Gruppe 4 und 6 auf. Gruppe 5 wies zwar keine statistisch signifikant niedrigere Knochenfläche zur Spongiosagruppe auf, jedoch zeigte sie wie die höheren PTH-Gruppen (4 und 6) und die Fibringruppe eine höhere Bindegewebefläche als die Spongiosagruppe in dieser ROI. Nur Gruppe 6 zeigte auch eine niedrigere mineralisierte Knochenfläche. Wie schon bei der Betrachtung der Gesamt-ROI wies Gruppe 4 die größte Fläche an Knorpelgewebe in dieser ROI auf.

Am weitesten **knöchern integriert** war der **Titancage** in der Spongiosagruppe. Bei sieben von acht Tieren war das Titanimplantat hauptsächlich direkt von Knochengewebe umgeben und nur an wenigen Stellen war ein schmaler Bindegewebesaum auszumachen. Ein Tier zeigte sogar eine komplette knöchernen Integration des Implantates, soweit das zu beurteilen war, da es durch die Entnahme des Implantates zu Gewebeerlust kommen konnte. Die PTH-Gruppen wiesen dagegen insgesamt weniger Geflechtknochen in direktem Kontakt zum Titanimplantat auf, meist zeigte sich ein schmaler Bindegewebesaum um das Titanimplantat. Es wurden keine großen Unterschiede zwischen den verschiedenen PTH-Konzentrationen festgestellt. Die Präparate der Gruppe 4 wiesen am meisten Knochengewebe in direktem Kontakt mit dem Titan auf, die Fibringruppe zeigte dagegen die geringste knöchernen Integration des Titanimplantates. Da Gruppe 3 trotz geringerer knöchernen Integration des Titanimplantates in der histomorphometrischen Gewebemessung ebenso große

Knochenanteile wie die Spongiosagruppe aufwies, schien dieser schmale Bindegewebesaum bei der histomorphometrischen Messung nicht ins Gewicht zu fallen. In allen Gruppen kam vereinzelt auch hyaliner Knorpel in direktem Kontakt vor, jedoch ohne erkennbare Unterschiede in Menge und Verteilung zwischen den Gruppen. Auch hier lief die knöcherne Integration zum Teil über enchondrale Ossifikation ab. Titan besitzt eine hohe Biokompatibilität und wird daher sehr häufig als Implantatmaterial verwendet, neben den orthopädischen Implantaten für die Wirbelsäule, zur Frakturversorgung und der Hüftendoprothetik, vor allem für Zahnimplantate im Kiefer (Albrektsson, 1981; Rodrigues, 2009; Sadri, 2008; Sumner, 1995). Eine möglichst direkte knöcherne Integration des Titans, wie sie in dieser Studie bei einem Tier der Spongiosagruppe vorkam, ist zur festen Verankerung bei allen Titanimplantaten erwünscht (Branemark, 1969; Schroeder, 1976). Da diese wie in dieser Studie nicht immer der Fall ist, beschäftigen sich viele Forscher mit der Verbesserung der knöchernen Integration des Titans (Albrektsson, 1981; Depprich, 2008; Guizzardi, 2004; Willie, 2010; Willie, 2010a). Neben der guten knöchernen Integration des Titancages der Spongiosagruppe dieser Studie war bei Dresbach, die ebenfalls den SynCage-C<sup>®</sup> augmentiert mit Spongiosa im Segment C3/C4 nach zwölf wöchiger Heilungszeit im Schaf testete, in allen Präparaten stets ein Bindegewebesaum direkt um den Cage nachweisbar (Dresbach, 2007). Die schlechtere Integration des Cages war wahrscheinlich durch die höhere Instabilität des Segmentes zu erklären, die ein direktes Anlagern von Osteoblasten erschwerte. Insgesamt sinterten in der beschriebenen Studie sechs von acht Cages und es kam bei drei von acht Tieren zu einem Verrutschen des Cages im Bandscheibenfach. In der vorliegenden Arbeit war ein Einsinken der Cages außer in Gruppe 6 nicht auffällig, kein Implantat war im Bandscheibenfach disloziert. Eine denkbare Erklärung für die Instabilität und das insgesamt schlechtere Heilungsergebnis der Spongiosagruppe von Dresbach stellte sicherlich der bereits früher erwähnte Unterschied bei der Vorbereitung des Implantatlagers und der Applikation der autologen Spongiosa dar.

Der Bindegewebesaum um das Implantat, der bei zahlreichen Tieren vorkam, war als negativ für die Integration des Implantates zu werten und sein Vorkommen wahrscheinlich schon Teil einer lokalen Entzündungsreaktion. In diesem Bindegewebesaum, war bei allen Gruppen ein erhöhtes Vorkommen von Gefäßen und Entzündungszellen, dabei hauptsächlich Lymphozyten, Granulozyten und mehrkernige Riesenzellen, sichtbar. Auffällig war, dass eine solche Reaktion sowohl bei der Spongiosagruppe bei vier Tieren zu verzeichnen war, in den Fibrin- und PTH-Gruppen aber bei sechs bis acht Tieren vorkam. Ein Zusammenhang zwischen stärkeren oder häufigeren Entzündungsreaktionen mit steigender PTH-Konzentration konnte dagegen nicht hergestellt werden. Da es keinen Unterschied in Verteilung und Häufigkeit zwischen der Fibrin-Gruppe und den PTH-Gruppen gab, war die Annahme, dass es sich um eine Reaktion auf das Parathormon handelte,

unwahrscheinlich. Da diese Entzündungsreaktionen auch innerhalb der Präparate der Spongiosagruppe vorkamen, war das Fibrin als alleinige Ursache ebenfalls unwahrscheinlich. Vielmehr ist anzunehmen, dass es sich um eine Reaktion auf das Titanmaterial handelte, da auch andere Autoren über eine zunehmende Anzahl an Gefäßen und Entzündungszellen in direkter Umgebung von Titancages berichteten. Neben Dresbach beschrieb auch Koch, der im gleichen Tiermodell den Harmscage aus Titan mit einer Füllung aus mineralisiertem Kollagen alleine oder in Kombination mit autologem Thrombozytenkonzentrat, BMP-2 oder RGD-Peptid (Aminosäuresequenz Arginin-Glycin-Aspartam) anwendete, sowohl einen Bindegewebesaum um das Titan als auch eine zunehmende Anzahl an Entzündungszellen und Gefäßen in der Nähe des Titans (Dresbach, 2007; Kandziora, 2002b; Kandziora, 2002c; Koch, 2005). Ebenso schilderte Wagner, der die Wachstumsfaktoren TGF- $\beta_1$  (transforming growth factor-beta 1) und IGF-I (insulin like growth factor I) mittels Poly (D,L-laktid)- beschichteten Harmscages im Vergleich mit dem nur beschichteten und unbeschichteten Harmscage im gleichen Versuchsaufbau applizierte und anschließend detailliert histologisch auswertete, eine Entzündungsreaktion im Bindegewebe um den Titancage. Allerdings beschrieb er diese Phänomen bei insgesamt etwas weniger Tieren (Wagner, 2005). Aus Studien zur Implantatlockerung weiß man, dass sich auch beim Titan auf Reibung und Abnutzung kleine Partikel lösen und eine Entzündungsreaktion auslösen (Jacobs, 1994; Murphy, 1999; Murray, 1990; Shanbhag, 1994). Makrophagen aus dem umliegenden Gewebe phagozytieren die Partikel und setzen Zytokine frei, vor allem Prostaglandin E<sub>2</sub>, Interleukin-1 (IL-1), IL-6 und TNF- $\alpha$  (Tumor-Nekrose-Faktor- $\alpha$ ), die dann die Differenzierung, Rekrutierung und Aktivierung von Osteoklasten stimulieren, so dass es zur Osteolyse um das Implantat kommt (Beidelschies, 2008; Bi, 2001; Greenfield, 2002; Haynes, 1993; Minkin, 1999; Murray, 1990). Dies konnte auch für Titanimplantate an der Wirbelsäule nachgewiesen werden (Mody, 1994; Wang, 1999). Dabei spielte vor allem der TNF- $\alpha$  (Tumor-Nekrose-Faktor- $\alpha$ ) eine Rolle, der in erhöhtem Maße bei aseptischer Entzündung um Titanimplantate der Wirbelsäule vorkommt und der die Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten und Makrophagen stimuliert, die Osteoklastenzahl und deren Aktivität erhöht, genauso sowie die zelluläre Apoptose (Cunningham, 2002; Hallab, 2003). Desweiteren korrodiert jedes Metall, das sich in einem biologischen System befindet und setzt Ionen frei. Bei Titanionen wurde zum einen nachgewiesen, dass sie selbst die Differenzierung von Makrophagen zu Osteoklasten anregten, wodurch es zur Knochenresorption und Implantatlockerung kam, so dass man auch von aseptischer Implantatlockerung sprach (Beidelschies, 2008; Cadosch, 2009; Cadosch, 2010). Zum anderen aktivieren sie das Immunsystem, indem sie Komplexe mit Proteinen eingehen und eine allergische Entzündungsreaktion hervorrufen können (Hallab, 2001; Lalor, 1991). Im Vergleich mit anderen Materialien verursachte Titan jedoch nur eine geringe aseptische

Entzündungsreaktion und Implantatlockerung (Gonzales, 1996). In dieser Studie konnten unter dem Lichtmikroskop keine Materialpartikel histologisch nachgewiesen werden, eine elektronenmikroskopische Untersuchung der Präparate wäre sensitiver, wurde jedoch im Rahmen dieser Studie nicht angefertigt, da das zu testende Parathormon im Vordergrund stand. Insgesamt sind die Entzündungsreaktionen um das Titan beschränkt, selten waren Osteoklasten in erhöhter Anzahl nachweisbar, wonach man von einer Osteolyse sprechen könnte. Aus anderen Studien weiß man, dass die Abnutzungspartikel vom Titan in Pseudarthrosen vermehrt auftreten. In stabilen Wirbelfusionen sind die Konzentrationen vom Titan geringer, so dass die Titanteilchen sicherlich durch die erhöhte Beweglichkeit des Segmentes entstehen und sekundär das Heilungsergebnis verschlechtern, aber keine primäre Ursache darstellen (Wang, 1999).

Im Bindegewebe der Cage ROI fern vom Implantat konnte in der Spongiosagruppe und der PTH-Gruppe 4 keine Entzündungsreaktion verzeichnet werden. Lokal begrenzte Entzündungsreaktionen im Bindegewebe kamen am Häufigsten in der Fibringruppe und der PTH-Gruppe 3 vor, gefolgt von Gruppe 5. In Gruppe 6 lief lokal begrenzt nur eine leichte Entzündungsreaktion ohne das Vorkommen von Riesenzellen ab. Es mussten demnach, anders als in den bisherigen Studien zum Fibrinmaterial bovinen Ursprungs mit kovalent gebundenem PTH<sub>1-34</sub>, lokale Entzündungsreaktionen im ovinen Organismus vermerkt werden (Arrighi, 2009; Mark, 2007). Insgesamt kam es durch das Fibrin-PTH-Gemisch zu mehr Entzündungsreaktionen im Vergleich zur Spongiosagruppe. Auf eine Abhängigkeit von der verwendeten PTH-Konzentration kann nicht geschlossen werden, da die PTH-Gruppen ebenso häufig kleine Bereiche mit einem erhöhten Vorkommen von Entzündungszellen und verstärkter Angiogenese aufwiesen wie die Fibringruppe. Die lokalen Entzündungsreaktionen schienen das Fusionsergebnis aber nicht negativ zu beeinflussen, da sie ebenso häufig in der eher schlecht fusionierten Fibringruppe wie in der Gruppe 3, mit einem ähnlich guten Fusionsergebnis wie die Spongiosagruppe, vorkamen. Da die Entzündungsreaktionen zudem meist mild und lokal begrenzt waren schließen sie eine Verwendung des Materials zur Fusion an der Halswirbelsäule nicht aus.

Bereiche mit erhöhtem Osteoklastenvorkommen gab es bei jeweils zwei Tieren der Fibringruppe, der PTH-Gruppe 3, 5 und 6. Osteolysen waren bei zwei Tieren der Fibringruppe und bei zwei Tieren der PTH-Gruppe 6 zu sehen. Dabei befand sich entweder der Knochen um das Titanimplantat in Auflösung oder die ohnehin schon nur kleinen Knocheninseln in dieser ROI wurden durch die Osteoklasten abgebaut. Denkbar ist, dass diese Tiere von Anfang an weniger Knochenbildung zeigten, das Segment länger instabil war und es dadurch zu Drucknekrosen des Knochens kam, die dann auch mit einer Entzündungsreaktion im Bindegewebe einhergingen. Ein Tier der Fibringruppe, der PTH-Gruppe 4 und 5, sowie fünf Tiere der PTH-Gruppe 3 und vier Tiere der Gruppe 6 zeigten in

der Cage ROI lokal begrenzte Bereiche mit schollenartigem, degeneriertem Knochen in der Masson- Goldner- Färbung leuchtend rot bis blau gefärbt, dabei allerdings nur zum Teil mit erhöhtem Osteoklastenaufkommen und lokaler Entzündung assoziiert. Dass auch Gruppe 3, trotz insgesamt ähnlich gutem Fusionsergebnis wie die Spongiosagruppe, diese lokal begrenzten Bereiche mit schollenartig, degeneriertem Knochen aufwies, war verwunderlich. Eine lokale Entzündungsreaktion an dieser Stelle war nicht immer vorhanden. So ist vorstellbar, dass es trotz fortgeschrittener Fusion im ehemaligen Bandschreibenraum immer wieder kleine Bereiche im Knochen zum Beispiel durch Druckbelastung zu Grunde gehen. Dieser Meinung war auch Koch, der ebenfalls einen Titancage (Harmscage) mit unterschiedlichen Beschichtungen und Füllungen im gleichen Modell wie die vorliegende Arbeit testet und ebenfalls schollenartig, amorphe Bereiche im Knochengewebe bemerkte (Koch, 2005).

Der **ventrale** Bereich des Bandscheibenfaches wurde im Versuch ebenso wie die Cage ROI mit PTH<sub>1-34</sub> in der Fibrinmatrix gefüllt. Zu Knochenzubildungen in Form von Geflechtknochen kam es hier in unterschiedlichem Maße von der Deck- und Bodenplatte des dritten und vierten Halswirbels sowie von der Kortikalis des Wirbelkörpers und des Periosts. Die Spongiosagruppe zeigte insgesamt das am weitesten fortgeschrittene Heilungsergebnis in dieser ROI, bei allen acht Tieren war der dominierende Gewebeanteil Geflechtknochen. Eine gerichtet Knochenbildung, bei der es zu einer kompletten knöchernen Fusion der beiden Wirbelkörper kam, wiesen zwei Tieren dieser Gruppe auf. Ein vergleichbares Heilungsergebnis lieferte in dieser ROI nur die niedrigste verwendete PTH-Konzentration (0,2 mg PTH<sub>1-34</sub>/ml Fibrin). Fünf der acht Tiere wiesen als dominierenden Gewebeanteil Geflechtknochen auf und zwei Tiere waren ventral komplett knöchern fusioniert. Alle anderen Tiere dieser und der anderen Gruppe besaßen stets noch einen mehr oder weniger breiten bindegewebigen Streifen zwischen den Knochenästen, die vom dritten und vierten Halswirbel gebildet wurden. Allen war gemeinsam, dass die Knochenbildung auch hier über hyalinen Knorpel erfolgte. Dieser lag der neu gebildeten Geflechtknochenzubildung als Kappe oberflächlich auf. Vom ehemaligen Bandscheibenraum hin zum Geflechtknochen wurden die Chondrozyten dabei zunehmend großblasiger, ordneten sich säulenförmig an und die Knorpelmatrix verkalkte. Am meisten hyaliner Knorpel war wie in der histomorphometrischen Messung in Gruppe 4 zu verzeichnen. Gleichzeitig fand im neu gebildeten Knochen auf der Oberfläche der Knochentrabekel desmale Knochenbildung direkt über die zahlreichen Osteoblasten statt. Faserknorpel konnte nur vereinzelt bei jeweils einem Tier der Spongiosa-, der Fibrin- und den PTH-Gruppen 3 und 5 meist zentral gelegen als dünner Streifen zwischen den aufeinander zuwachsenden Knochenästen vom dritten und vierten Halswirbel nachgewiesen werden. Je höher die eingesetzte PTH-Konzentration, desto stärker war die weiter vom Fusionsspalt entfernte Kortikalis des Wirbelkörpers und das

Periost an einer Geflechtknochenbildung beteiligt. Diese war nicht immer gerichtet zu einer Überbrückung des ehemaligen Bandscheibenraumes, sondern häufig als knöcherne Zubildung nach ventral im Körper. Am stärksten war die Geflechtknochenbildung von Periost und Kortikalis in Gruppe 6. Dabei war fraglich, ob zur Stimulierung der Knochenhaut des Wirbelkörpers höhere Konzentrationen des PTHs notwendig waren als im ehemaligen Bandscheibenraum. Die Knochenbildung lief dort vor allem desmal ab durch direkte Abscheidung von Osteoid durch die Osteoblasten. Zum zwölf Wochen Zeitpunkt konnte nur äußerst selten hyaliner Knorpel in Form von kleinen Knorpelinsen im Geflechtknochen nachgewiesen werden. Bei Betrachtung der Kallusbildung und Einteilung in eine geringe, starke und mittelstarke Kallusbildung von Deck- und Bodenplatte des dritten und vierten Halswirbels sowie der Kortikalis mit Periost, war diese insgesamt am stärksten in der Spongiosagruppe. Fünf von acht Tieren dieser Gruppe zeigten eine starke Kallusbildung, die restlichen drei eine mittelstarke. Alle anderen Gruppen lagen darunter. Entzündungsreaktionen im Bindegewebe waren in dieser ROI selten, lediglich in den höheren Konzentration (PTH-Gruppe 5 und 6) war jeweils ein Tier mit einer leichten Entzündungsreaktion ohne das Vorkommen von Riesenzellen vorzufinden. Mit zunehmender Konzentration an PTH nahm auch die Anzahl an Osteoklasten auf der Oberfläche des Kallus zu. Diese befanden sich meist in Aushöhlungen des Knochens und im angrenzenden Bindegewebe war eine milde Entzündungsreaktion mit Hypervaskularisierung und erhöhtem Vorkommen von Entzündungszellen zu verzeichnen. Da PTH bei gleichbleibender, hoher Konzentration beim systemischen Einsatz einen katabolen Effekt auf den Knochenstoffwechsel hat, könne es sich hierbei um die Aktivierung der Osteoklasten durch das PTH handeln. Bei der Auszählung der Osteoklasten in dieser ROI konnte diese Annahme jedoch nicht bestätigt werden. Auffällig war, dass jeweils ein Tier der Fibrinkontrollgruppe sowie der PTH-Gruppe 5 und 6 kleine, schollenartige, in der Masson-Goldner-Färbung leuchtend rot bis blau wie Geflechtknochen angefärbte Bereiche aufwies. Dabei schien es sich um degenerierten Knochen zu handeln, der sich zum Teil durch Osteoklasten in Auflösung befand. Im umliegenden Bindegewebe konnte meist eine mehr oder weniger starke Entzündungsreaktion verzeichnet werden.

In der **ventralen ROI** war auffällig, dass die Gruppe 6 ein ähnlich hohen Knochenanteile aufwies wie die Spongiosagruppe und die Gruppe 3. Alle anderen Gruppen wiesen statistisch signifikant niedrigere Knochenflächen auf als die Spongiosagruppe. Dieses Ergebnis der Gruppe 6 stand im Widerspruch zu den sonst so gering gemessenen Knochenflächen in der Gesamt-ROI und der Cage ROI. Eine mögliche Erklärung war, dass die hohe Konzentration an PTH keine rasche Knochenneubildung und Stabilisierung des Cages induzierte. Der Cage war länger einer starken Druckbelastung ausgesetzt und sank daher stärker als bei den anderen Gruppen in Deck- und Bodenplatte des dritten und vierten

Halswirbels ein. Demnach handelte es sich bei dem gemessenen Knochen nicht um neu gebildeten Knochen, sondern um alten Knochen des Wirbelkörpers vom dritten und vierten Halswirbel, der nun lediglich durch das Einsinken des Cages in diese ROI mit einbezogen wurde. Untermuert wird diese Annahme durch die signifikant höheren Bindegewebeflächen in der kranialen und kaudalen ROI der Gruppe 6 im Vergleich zur Spongiosagruppe. Ein Tier der Gruppe 6 zeigte wie schon bei der Cage ROI beschrieben eine Resorption des Knochens um das Implantat, das sicherlich ein Einsinken in Deck- und Bodenplatte zur Folge hatte. Das Sintern des SynCage-C<sup>®</sup> in der Halswirbelsäule des Menschen ist seit längerem aus humanmedizinischen Studien bekannt, machte dort aber bislang keine klinischen Symptome (Thome, 2006; van Jonbergen, 2005). Ebenso war aus einer früheren tierexperimentellen Studie im Schaf mit Operation des gleichen Segmentes und Verwendung des SynCage-C<sup>®</sup> augmentiert mit autologer Spongiosa das Sintern des Cages bekannt (Dresbach, 2007; Kandziora, 2002b). Radiologische Verlaufsuntersuchungen zur Bestätigung des Einsinkens in dieser Studie wurden im Rahmen des Gesamtprojektes angefertigt, befinden sich derzeit aber noch in der Auswertung. Dass dieses Phänomen der falsch hohen Knochenflächenmessung nicht in der Cage ROI auftrat, ließe sich durch ein schnelleres Absterben des zentral gelegenen Knochens sowie seinen Ersatz durch Bindegewebe erklären.

In die rückenmarksnahe **dorsale ROI** wurde im Versuch kein Material direkt appliziert, so dass sie für die Beurteilung des Heilungsergebnisses einen untergeordneten Stellenwert einnahm. Bei Platzierung von Material in diese Gegend besteht stets die Gefahr des Vorfalles von Material in den Rückenmarkskanal bzw. der überschießenden Knochenbildung und Kompression des Myelons. Bei den meisten Tieren aller Gruppen kam es in diesem Bereich nicht zur Fusion des dritten und vierten Halswirbels. Zwischen dem Knochen der Deck- und Bodenplatte lag zentral bei fast allen Tieren ein dünnes Band aus Faserknorpel vor. Ansonsten war der Spalt mit lockerem und straffem Bindegewebe gefüllt. Auf dem Knochen der Deck- und Bodenplatte kam, anders als in der Cage ROI und der ventralen ROI, seltener hyaliner Knorpel vor. Dennoch existierten drei Tiere aus Gruppe 3, die über hyalinen Knorpel, der bereits mineralisierte, verbunden waren. Insgesamt kam es nur sehr selten zu Entzündungsreaktionen in dieser ROI, lediglich ein Tier der Fibringruppe und der Gruppe 5 zeigten eine milde Entzündungsreaktion im Bindegewebe. Auffällig war, dass die Knochenoberfläche vor allem im dritten Halswirbel bei zahlreichen Tieren ausgehöhlt erschien. Ein derartiger Befund kam bei einem Tier der Spongiosagruppe, bei drei Tieren der Gruppe 3 vor und stieg mit höherer PTH-Konzentration auf bis zu 5 Tieren in der Gruppe 6 an. Diese Aushöhlung des Knochens wurde als ein verstärkter, lokaler Knochenabbau gewertet. Im angrenzenden Bindegewebe war auch eine milde Entzündungsreaktion zu verzeichnen. Auffällig war, dass die Bereiche mit lytischem, zum Teil im Abbau befindlichem

Knochen auch hier vorkamen. Ein Tier der Fibringruppe sowie der Gruppe 5, drei Tiere der Gruppe 4 und zwei Tiere der Gruppe 6 wiesen solche Bereiche auf. Dabei handelte es sich wahrscheinlich um degenerierten Knochen, der durch Osteoklasten unter einer lokalen Entzündungsreaktion abgebaut wurde. Am Material konnte es in dieser ROI nicht liegen, vielmehr handelte es sich dabei wahrscheinlich um Knochenabbau durch die zum Teil hohe Belastung des Knochens im noch nicht vollständig versteiften Wirbelsäulensegmentes (Drucknekrose). Da diese Bereiche auch in der Fibringruppe vorkamen und bei Betrachtung aller Bereiche nicht kontinuierlich mit steigender PTH-Konzentration häufiger wurden, ist es unwahrscheinlich, dass es sich um eine Anregung der Osteoklasten durch das lokal applizierte PTH handelte. Diese Annahme wurde durch die gleichbleibende Osteoklastendichte mit zunehmender PTH-Konzentration bestätigt. Möglicherweise handelte es sich dabei aber auch um ein durch das operative Einbringen des Titancages hervorgerufenen Ereignis. Dieser wurde mittels Implantatgreifer und Hammer unter Kraftaufwand in das diskektomierte Bandscheibenfach eingebracht. Durch den kurzzeitig hohen Druck auf den dorsalen Bereich der Deckplatte des dritten Halswirbels könnte ebenfalls ein Untergang des Knochens ausgelöst worden sein.

Zwischen den Gruppen bestand bezüglich sämtlicher histomorphometrisch gemessener Gewebequalitäten kein statistisch signifikanter Unterschied. Die relativ hohen prozentualen Anteile an Bindegewebe in dieser ROI verdeutlichten noch einmal, dass eine komplette knöcherne Überbrückung nicht stattgefunden hat. Auch Studien anderer Autoren zeigten ein ähnlich unfusioniertes Bild in der dorsalen ROI (Slivka, 2006; Zdeblick, 1992). In dieser Studie kam es nicht zum Vorfall von Material oder Einwachsen von Knochen in den Rückenmarkskanal wie in einigen anderen Studien am Schafsmodell beschrieben (Eindorf, 2005; Schulz, 2008; Thomas, 1975).

Da die **kraniale und kaudale ROI** den Bereich von Deck- bzw. Bodenplatte bis zu fünf Millimeter in Richtung Wirbelkörpermitte darstellte, war in diesen ROIs fast ausschließlich Knochengewebe zu erwarten. Die Gruppen unterschieden sich innerhalb der Größe des Knochenanteils kaum, stets lag sie über 90 %, mit Ausnahme von Gruppe 6, die in beiden ROIs im Vergleich zur Spongiosagruppe statistisch signifikant niedrigere Knochenanteile aufwies. In der kaudalen ROI war in Gruppe 6 der mineralisierte Knochenanteil ebenfalls niedriger als der der Spongiosagruppe. Beim Bindegewebeanteil wies Gruppe 6 dann auch in beiden ROIs einen statistisch signifikant höheren Anteil als die Spongiosagruppe auf. In der kaudalen ROI war die Bindegewebefläche der Gruppe 4 im Vergleich zur Spongiosagruppe ebenfalls statistisch signifikant höher. Erhöhte Anteile an Bindegewebe in den beiden ROIs deuteten auf Osteolysen und Entzündungsreaktionen sowie ein Einsinken des Cages hin. Resorbiertes Knochengewebe wurde dabei durch Bindegewebe ersetzt. So konnte bei jeweils einem Tier der beiden mittleren Konzentrationen von PTH (0,4 mg PTH<sub>1-34</sub>

/ ml Fibrin und 0,7 mg PTH<sub>1-34</sub> / ml Fibrin) beobachtet werden, dass der Knochen um das Implantat in kranialer und kaudaler ROI zurückgewichen war und durch Bindegewebe ersetzt wurde. In Gruppe 4 schien der Knochen bereits wieder enchondral nachgebildet zu werden, wohingegen bei dem anderen Tier der Gruppe 5 vermehrt Osteoklasten auf der Knochenoberfläche zu finden waren ebenso eine Entzündungsreaktion im angrenzenden Bindegewebe.

Bei zahlreichen Tieren war die Wachstumfuge des dritten und vierten Halswirbels noch nachweisbar. Diese befand sich in etwa zwei Millimeter Abstand zur Deck- und Bodenplatte der Wirbel. Sie bestand aus einer schmalen Schicht säulenförmig angeordnetem hyalinen Knorpels, der zum Teil mineralisiert war. Bei manchen Tieren durchzog sie gleichmäßig den dritten und vierten Halswirbel komplett. Bei anderen Tieren waren dagegen nur noch Reste sichtbar. Schon Koch und Mitarbeiter konnten feststellen, dass mit über zwei Jahren die Wirbelkörper selbst noch über Wachstumfugen verfügen (Koch, 2005; Koch, 2008). Für weitere Untersuchungen und Studien am Schaf ist das Eingangsalter der Schafe in den Versuch neu zu überdenken, um wachstumsbedingte Veränderungen auszuschließen. Da in den präoperativ angefertigten Röntgenaufnahmen der Halswirbelsäule die Wachstumfugen nicht mehr sichtbar waren, bietet sich diese Methode zur Selektion der Schafe vor dem Versuchseintritt nicht an. Denkbar wäre eine histologische Untersuchung der Wirbelkörper zum Verschwinden der Wachstumfuge bei älteren Schafen.

Einige Autoren haben versucht, analog zur Frakturheilung verschiedene Abschnitte für die Wirbelfusion festzulegen. Häufig bezogen sie sich dabei jedoch auf die Fusion der Lendenwirbelsäule und die Fusion mittels autologem kortikalem oder spongiösem Knochen. Boden und Mitarbeiter stellten sich die histologischen Vorgänge bei der Wirbelfusion ähnlich denen der Frakturheilung vor, bei der neuer Knochen entweder enchondral oder desmal gebildet wird. Bei der chondralen Ossifikation proliferieren die Chondrozyten und produzieren Matrix, so dass ein Knorpelgewebe ähnlich das der Wachstumfuge entsteht. Die Chondrozyten werden hypertroph, die Matrix mineralisiert und Blutgefäße sprossen ein, so dass der Knorpel zu Knochen umgebaut wird (Boden, 1995). In einer Studie von Boden und Mitarbeitern zur lumbalen (L5-L6) intertransversalen Wirbelfusion am Kaninchenmodell mittels autologem Knochen aus dem Beckenkamm beschrieben sie als dominierenden Mechanismus der Knochenheilung die desmale Ossifikation von der Oberfläche der zuvor dekortizierten Proc. transversi. Zentral im autologen Knochen war enchondrale Ossifikation nachweisbar. Generell teilte Boden die Vorgänge bei der intertransversalen Wirbelfusion in drei Phasen ein: die frühe Entzündungsphase (Wochen 1 bis 3), bei der es zur Bildung eines Hämatoms kam und zur Einwanderung von Entzündungszellen. Überwiegend wurde der Knochen in dieser Phase desmal gebildet, weniger enchondral. In der mittleren

Reparationsphase (Wochen 4 und 5) kam es zum Remodelling des Geflechtknochens, zu einer verstärkten Vaskularisation und Resorption des nekrotischen Gewebes sowie einer verstärkten Differenzierung von osteoblastischen und chondroblastischen Zellen. Der Knochen wuchs zunehmend nach zentral im Fusionspalt, wo dann auch enchondral verstärkt Knochen gebildet wurde um die beiden Processi zu verbinden. Der kortikale Knochen des transplantierten Materials wurde zunehmend abgebaut. In der späten Remodellingphase (Wochen 6 bis 10) war wenig bis kein Knorpel sichtbar. Der neu gebildete Knochen wurde remodelt, sekundäre Spongiosabildung und das Knochenmarksvolumen nahmen zu (Boden, 1995b; Boden, 1995d). Ein Vergleich zur vorliegenden Arbeit war jedoch schwer, da es sich zum einen um ein Kleintiermodell handelte und der Knochen des Kaninchens im Vergleich zum Schaf schneller heilt, und zum anderen der Proc. transversus der Lendenwirbelsäule fusioniert wurde, bei dem sich das Operationsverfahren stark von der ventralen, intervertebralen Fusion der Halswirbelsäule unterscheidet. Dennoch bemerkten auch Boden und Mitarbeiter wie in der vorliegenden Arbeit sowohl enchondrale als auch desmale Knochenbildung. Eine zeitliche Abfolge konnte im Vergleich zu Bodens Arbeiten jedoch in der vorliegenden Studie nicht gemacht werden, da nur ein Untersuchungszeitpunkt nach zwölf Wochen ausgewertet wurde. Zu diesem Zeitpunkt war vor allem bei den Tieren, die noch keine vollständige Überbrückung der beiden Wirbelkörper zeigten sichtbar, dass die Überbrückung des Fusionspalt von den Ränder ausgehend nach zentral im ehemaligen Bandscheibenraum verlief. Die Knochenbildung lief dabei sowohl enchondral über die Vorstufe aus hyalinem Knorpel, der auf den Knochenzubildungen des dritten und vierten Halswirbels als Kappe oder saumartig angeordnet war, sowie desmal im Inneren des trabekulären Netzwerkes der Knochenzubildung ab. Die Osteoblasten waren dabei als Saum auf der Oberfläche der Knochentrabekel angeordnet und schieden direkt Osteoid ab.

Auch Singh und Kirkaldy-Willis beschrieben die histologischen Vorgänge bei der anterioren Wirbelfusion detaillierter. Allerdings verwendeten sie das Meerschweinchen und den autologen Beckenkammspan als Implantat, sowie die Lendenwirbelsäule zur ventralen Fusion. Sie teilten die histologischen Veränderungen in frühe, die bis zu zwölf Wochen nach der Operation abliefen und späte Veränderungen, die sich im Zeitraum zwischen zwölf und 60 Wochen post OP abspielten. Zu den frühen Veränderungen zählte die Resorption des Spans durch die Aktivität der Osteoklasten und dessen Ersatz durch straffes Bindegewebe. Kleine Knochentrabekel vom spongiösen Knochen der angrenzenden Wirbelkörper wuchsen in den Spalt. Ein Band aus Knorpel zog von dorsal nach ventral durch den ehemaligen Bandscheibenraum, selten wurde dieses Band durch Knochentrabekel von den Endplatten überbrückt. Enchondrale Ossifikation fand von Korpelinseln aus statt. Zu den späten Veränderungen zählte die komplette knöcherne Überbrückung der beiden Wirbel (Singh, 1972). Da in dieser Studie der autologe Beckenkammspan als Implantat verwendet wurde,

konnten kaum Parallelen zur vorliegenden Arbeit gezogen werden, da die Einheilung und der Umbau von kortikalem Knochen generell anders verläuft als von spongiösem Knochen. Dennoch beobachteten auch Singh und Mitarbeiter Knochen trabekel, die begannen, den Fusionspalt zu überbrücken und Inseln aus hyalinem Knorpel über den enchondral Knochen entstand. Auch Eindorf, die den autologen trikortikalen Beckenkammspan zur ventralen, intervertebralen Fusion des dritten und vierten Schafshalswirbels im gleichen Modell wie in dieser Arbeit verwendete, beobachtete enchondrale und desmale Ossifikation zeitgleich nach zwölf Wochen Einheilungszeit (Eindorf, 2005). Cahill und Mitarbeiter verwendeten einen bioresorbierbaren Cage gefüllt mit autologer Spongiosa aus dem Beckenkamm zur ventralen Fusion von zwei Segmenten der Ziegenhalswirbelsäule. Sie konnten ebenso kalzifizierende Knorpelnester verzeichnen, sowie Osteoblasten auf den Knochen trabekeln, die direkt Osteoid abschieden (Cahill, 2003). Hecht und Mitarbeiter konnten diese Beobachtung dann sogar bei der Verwendung von autologer Spongiosa aus dem Beckenkamm in einem allogenen Knochenzylinder im Primatenversuch zur anterioren, intervertebralen Wirbelsäulenfusion zwischen dem siebten Lendenwirbel und dem Kreuzbein machen (Hecht, 1999).

Koch testete zur ventralen, intervertebrale Spondylodes des dritten und vierten Schafshalswirbels einen Titancage (Harmscage) gefüllt mit verschiedenen Materialien. Eine Gruppe erhielt mineralisiertes Kollagen, eine andere mineralisiertes Kollagen und autologes Thrombozytenkonzentrat, eine dritte mineralisiertes Kollagen und BMP-2 und die vierte Gruppe mineralisiertes Kollagen und zyklisches RGD-Peptid (Aminosäuresequenz Arginin-Glycin-Aspartam). Auch er bemerkte in allen Gruppen eine vor allem enchondrale Knochenbildung über die Vorstufe aus hyalinem Säulenknorpel. In den Gruppen mit mineralisiertem Kollagen und zusätzlich autologem Thrombozytenkonzentrat oder BMP-2 war zudem zeitgleich in geringerem Umfang desmale Ossifikation nachzuweisen (Koch, 2005).

Wagner testete die Wirksamkeit von TGF- $\beta_1$  (transforming growth factor-beta<sub>1</sub>) und IGF-I (insulin like growth factor I) appliziert mittels Poly (D,L-Laktid)- beschichteten Harmscages im Vergleich mit dem Harmscage als solchem und dem beschichteten den Harmscage im gleichen intervertebralen Fusionsmodell der Schafshalswirbelsäule und fertigte eine detaillierte histomorphologische und histomorphometrische Auswertung an. Er konnte mittels polychromer Sequenzmarkierung das Fortschreiten der enchondralen Ossifikation von den Endplatten der Wirbelkörper Richtung ehemaligem Bandscheibenraum nachweisen. Auch er verzeichnete direkte Geflechtknochenbildung, sowie die Mineralisation von Knorpel (Wagner, 2005).

Dagegen bewerteten nur wenige Autoren das Vorkommen von Knorpel bei der Wirbelfusion als negativ. Hurley beschrieb eine Facettengelenksfusion im Hund und konnte in den noch

nicht fusionierten Wirbelsäulen eine Schichtung aus neu gebildetem Knorpel, hyalinem Knorpel, Faserknorpel und zentral eine Schicht aus dichtem fibrillärem Bindegewebe entdecken (Hurley, 1959). Auch Holmes und Mitarbeiter bewerteten bei der Facettengelenksfusion mittels Hydroxyapatite einer Koralle im Hund das Vorkommen einer Kappe aus Knorpel auf dem Facettengelenksknochen als negativ, weil es dadurch zu einer regelrechten Abkapselung des Materials kam und eine solide Fusion ausblieb (Holmes, 1984). Generell ist die gewünschte Gewebequalität im ehemaligen Bandscheibenraum ausschließlich Knochen, dennoch kann ein Vorkommen von hyalinem Knorpel mit Anzeichen einer Mineralisation als positiv im Sinne der Fusion gewertet werden, da man davon ausgehen kann, da dieser zu einem späteren Betrachtungszeitpunkt in Knochengewebe umgewandelt ist.

### 5.3.2 Fusionsscore

Zahlreiche Studien verwenden Scores zur Beurteilung des Fusionsergebnisses auf histologischer Ebene. Die in dieser Arbeit vorgenommene Einteilung erfolgte in Anlehnung an Toth und Mitarbeiter. Sie nahmen in einer Studie zur unisegmentalen, interkorporellen Spondylodese des Bewegungssegmentes L4/L5 mittels biodegradierbarem Cage mit Spongiosa oder rhBMP-2 Kollagenschwamm augmentiert, ebenfalls die Einteilung in drei Kategorien vor. Sie definierten sie als komplette, partielle oder fehlende Fusion des Wirbelsäulensegmentes. Dabei wurden allerdings mehr Schnitte sowie die Mikroradiographie zur Beurteilung herangezogen (Toth, 2002). Die Einteilung des Fusionsergebnisses in drei Kategorien stellt eine stark vereinfachte Bewertung des Heilungsergebnisses dar und bewertete in dieser Arbeit nur die Fläche im Inneren des Cages. Zdeblick und Mitarbeiter sowie Cunningham und Mitarbeiter beurteilten eine Fusion wie in der vorliegenden Arbeit als eine kontinuierliche Knochenbrücke, die die beiden Wirbelkörper miteinander verbindet (Cunningham, 1998; Zdeblick, 1993; Zdeblick, 1992). Andere bewerteten dagegen nicht die Brückenbildung innerhalb des Cages, sondern ausschließlich die darin enthaltene Gewebequalität und vergaben dafür Punkte (Emery, 1994; Zdeblick, 1998). Sandhu und Mitarbeiter bewerteten ihre Präparate zur lumbalen, anterioren, intervertebralen, unisegmentalen Wirbelfusion am Schaf mittels autologer Spongiosa oder rhBMP-2 Kollagenschwamm augmentiertem Titancage ebenfalls in drei Kategorien: als komplette Fusion, Teilfusion oder Pseudarthrose und bezogen dabei die anterioren und posterioren Anteile des Bandscheibenraumes zusätzlich zur Cagepore mit ein (Sandhu, 2002). Der Score sollte eine sinnvolle Ergänzung der anderen weitaus aufwendigeren Auswertungsmethoden darstellen und vor allem klinische Relevanz haben. Durch die gewählte Einteilung in die drei Kategorien wurde ausschließlich das Maß der knöchernen

Brückenbildung im Inneren des Cages beurteilt, so dass schnell eine Aussage über Gelingen oder Versagen der Spondylodese getroffen werden konnte.

Bei der statistischen Auswertung konnten keine signifikanten Unterschiede nachgewiesen werden. Am häufigsten wurde in dieser Arbeit der F1 Score, der für eine solide knöcherne Fusion der beiden Wirbelkörper steht, in Gruppe 1, 3 und 5 bei je drei Tieren vergeben. Dieses gute Heilungsergebnis der Parathormongruppe (Gruppe 3) mit der niedrigsten Konzentration und der Spongiosagruppe (Gruppe 1) bestätigte die Ergebnisse aus der histomorphometrischen Auswertung der Cage ROI, bei der die Spongiosagruppe die größte Knochenfläche aufwies und es keinen signifikanten Unterschied zur Gruppe 3 und 5 gab. Bei Betrachtung aller Ergebnisse zeigte Gruppe 3 insgesamt beim Fusionscore das beste Fusionsergebnis mit vier Tieren mit partiell fusionierten Wirbelsegmenten und am wenigsten fehlgeschlagenen Fusionen (F3= ein Tier). Selbst die Spongiosagruppe, die in dieser Studie als Positivkontrollgruppe diente, zeigte ein schlechteres Fusionsergebnis: bei einem Tier konnte nur eine partielle Fusion verzeichnet werden und bei vier Tieren hatte keine Fusion stattgefunden. Das schlechteste Fusionsergebnis wies die Fibringruppe (Gruppe 2) und die Parathormongruppe mit der höchsten Konzentration (Gruppe 6) auf. Gruppe 2 hatte die meisten nicht fusionierten Segmente zu verzeichnen, gefolgt von Gruppe 6. Beide Gruppen wiesen kein Schaf mit einer kompletten Fusion auf. So spiegelten sich die Ergebnisse aus der Histomorphometrie und Histomorphologie auch in der Scoreauswertung wieder. Die Einteilung mittels Score stellte somit eine geeignete Methode dar, um das Heilungsergebnis schnell zu bewerten. Als zusätzliche Information wurde hier nicht nur das Vorkommen von Knochen in einem bestimmten Bereich bewertet, sondern vor allem die gerichtete Knochenbildung, die zu einer Überbrückung des ehemaligen Bandscheibenraumes führte. Jedoch ist anzumerken, dass die Einteilung in drei Kategorien relativ grob war und in keinem Fall die detaillierte histomorphologische und histomorphometrische Auswertung ersetzen kann.

### **5.3.3 Gefäßzählung**

Boden und Sumner beschrieben als wichtigen Faktor zur Wirbelfusion das Fusionsbett, aus dem Gefäße und Zellen rekrutiert werden können (Boden, 1995). Aus anderen Studien ist bekannt, dass die Blutversorgung zur Wirbelfusion nicht aus dem umliegenden Weichteilgewebe kommt, sondern aus dem Knochen (Boden, 2002; Toribatake, 1998). So ist der Fusionsprozess direkt von der Durchblutung der Deck- und Bodenplatte abhängig, da über das Blut Entzündungszellen um eine Infektion zu verhindern und Osteoprogenitorzellen zum Knochenwachstum, sowie endokrine Stimuli, Sauerstoff und Nährstoffe herantransportiert werden können (Boden, 1998). Die Vaskularisierung ist dabei ebenso wichtig für die Bildung von neuem Knochen wie auch für die Versorgung der autologen

Spongiosa (Gruppe 1). In Studien zur Transplantation von autologem Knochengewebe zeigte sich, dass autologe Spongiosa in Abhängigkeit von der Spezies innerhalb von zwei Tagen von Gefäßen umgeben ist und nach vierzehn Tagen vollständig revaskularisiert ist (Albrektsson, 1980, 1980a, 1980b; Enneking, 1975; Prolo, 1985). Beim kortikaler Knochen dauert es dagegen etwa doppelt so lang (Albrektsson, 1980, 1980a, 1980b; Boden, 1995c; Burchardt, 1983; Enneking, 1975; Zdeblick, 1992).

Beim operativen Vorgehen in diesem Projekt wurde der Wichtigkeit des Fusionsbettes Rechnung getragen, indem sämtlicher Knorpel von Deck- und Bodenplatte entfernt wurde, da dieser die Knochenneubildung hemmen kann (Toth, 1995). Der kortikale Knochen wurde durch das Einbringen des Titancages und die daran befindlichen Spikes förmlich aufgerissen, so dass feine Blutungen aus dem Knochen zu sehen waren. Es entstand ein Hämatom, darauf folgend vermutlich eine Entzündung, und die Angiogenese aus dem Inneren des Knochens wurde induziert (Slappey, 1998). Osteoinduktive Proteine, Zellen der Immunabwehr und mesenchymale Stammzellen, die sich in knochenbildende Zellen differenzieren, gelangten so in den Fusionspalt (Sandhu, 1997). Der dorsale, dem Rückenmarkskanal angrenzende Bereich des Bandscheibenraumes wurde dabei ausgespart, um ein zu starkes Knochenwachstum mit Kompression des Rückenmarks zu vermeiden. Das erklärt vielleicht die deutlich geringere Fusionsrate in der dorsalen ROI dieser Studie. Es wurde bewusst auf die Bearbeitung der Deck- und Bodenplatte mit einer Fräse verzichtet, da es dabei zum Verlust der Kortikalis kommen kann und die Gefahr besteht, dass der Cage stärker in die Deck- und Bodenplatte einsinkt. Ebenso besteht die Gefahr der thermischen Schädigung des Knochens (Boden, 1998; Boden, 1995).

Dass es messbare Veränderungen bei der Gefäßanzahl der Endplatten geben kann, zeigte Moore in einer Studie zur Heilung von Inzisionen der Bandscheibe, bei der sich die Gefäßanzahl nach Trauma im Vergleich zum unoperierten Segment signifikant erhöhte (Moore, 1992). Ebenso ist bekannt, dass Fibrin als dreidimensionale Matrix wie in einem Hämatom nicht nur das Einwachsen von Fibroblasten und Entzündungszellen fördert, so dass sich Granulationsgewebe aus Bindegewebefasern und Zellen entwickelt, sondern auch die Angiogenese. In einem Meerschweinchenmodell induzierte Fibrin schon alleine die Angiogenese (Dvorak, 1987). Zdeblick und Mitarbeiter konnten sogar in einem Ziegenmodell zur cervicalen, anterioren, multilevel Wirbelfusion feststellen, dass bei einer höheren Gefäßdichte die Fusionsrate ebenfalls erhöht war (Zdeblick, 1992).

Vor diesem Hintergrund wurden die Gefäße in den fünf ROIs ausgezählt und die Gefäßdichte pro mm<sup>2</sup> Bindegewebefläche berechnet. Bei der Gefäßzählung konnten im Vergleich des ehemaligen Bandscheibenraumes (dorsale ROI, Cage ROI, ventrale ROI) sowie der angrenzenden Deckplatte (kraniale ROI) und Bodenplatte (kaudale ROI) des dritten und vierten Halswirbels mit Ausnahme der dorsalen ROI, in der Gruppe 6 mit der

höchsten Parathormonkonzentration eine signifikant niedrigere Gefäßdichte aufwies, keinerlei signifikante Unterschiede im Vergleich der Fibrin und PTH-Gruppen mit der Spongiosagruppe festgestellt werden. Bei der histomorphometrischen Messung der Gewebeflächen wies die Spongiosagruppe und die Gruppe 3 die niedrigste Bindegewebefläche innerhalb der fünf Teil-ROIs zusammen auf, so dass es sich bei diesen Gruppen um eine hohe Anzahl von Gefäßen im Bereich des hämatopoetischen Bindegewebes handeln musste. Eine Hypervaskularisierung als Begleiterscheinung einer lokalen Entzündungsreaktion war daher unwahrscheinlich. Das Knochengewebe der Fibrin und PTH- Gruppen war demnach ebenso gut vaskularisiert, wie das der Spongiosagruppe. Insgesamt schienen die Gruppen mit besserem Fusionsergebnis auch eine höhere Gefäßdichte aufzuweisen.

### 5.3.4 Osteoklastenzählung

In dieser Studie wurde modifiziertes Parathormon TGpPTH<sub>1-34</sub> kovalent in eine Fibrinmatrix gebunden und lokal zur Verbesserung der Wirbelfusion verwendet. Durch körpereigenes Plasmin wird es aus der Fibrinmatrix auf „Nachfrage“ herausgelöst und in die aktive Form, das PTH<sub>1-34</sub>, überführt. Von kontinuierlich, systemisch verabreichtem PTH weiß man, dass es einen katabolen Effekt auf den Knochenstoffwechsel hat, intermittierend gegeben dagegen einen anabolen Effekt (Qin, 2004). In einem Vorversuch wurde das gleiche Material wie in dieser Studie in einem Tibia-Osteotomiemodell am Schaf getestet. Die Konzentrationen des modifizierten Parathormons TGpPTH<sub>1-34</sub> lagen dabei bei 0,4, 1, 2, 5, und 10 mg/ml Fibrinmatrix. Bei der semiquantitativen Auswertung der Osteoklastenzahl wiesen die PTH-Gruppen weniger Osteoklasten auf als die Fibrinmatrixgruppe. Am geringsten war jedoch die Osteoklastenzahl bei der Gruppe mit autologer Spongiosa (Mark, 2007). In einer anderen Studie wurde die Osteoklastenzahl beim systemischen Einsatz von Parathormon bestimmt, um die anabole Wirkung auf den Knochenstoffwechsel zu beurteilen. Marques konnte dabei in einem experimentellen Periodontitismodell der Ratte bei intermittierender Gabe von PTH<sub>1-34</sub> eine niedrigere Anzahl an Osteoklasten nachweisen und einen reduzierten Verlust von alveolärem Knochen im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe (Marques, 2009). Die Anzahl der Osteoklasten wurde in dieser Studie quantitativ bestimmt, um einen katabolen Effekt des lokal freigesetzten PTH<sub>1-34</sub> auf den Knochenstoffwechsel oder eine Lyse des Knochens auf Grund einer Entzündungsreaktion zu evaluieren.

Bei der Betrachtung der Osteoklastendichte der Gesamt-ROI zeigte sich eine signifikant niedrigere Osteoklastendichte der Gruppe 6 mit der höchsten und Gruppe 3 mit der niedrigsten PTH- Konzentration im Vergleich mit der Spongiosagruppe. Auch in der ventralen ROI wiesen diese beiden Gruppen statistisch signifikant niedrigere Osteoklastendichten auf.

In der Cage ROI konnten keine signifikanten Unterschiede im Vergleich mit der Spongiosagruppe ausgemacht werden. Gruppe 3 zeigte aber auch hier die geringste Osteoklastendichte. In der dorsalen und kaudalen ROI wies Gruppe 6 eine signifikant niedrigere Osteoklastendichte auf. Lediglich Gruppe 5 wies in der kranialen ROI eine signifikant höhere Osteoklastendichte auf als die Spongiosagruppe. Die Spongiosagruppe zeigte demnach nicht wie in den dieser Arbeit vorausgegangenen Studien die niedrigste Osteoklastendichte.

So lag die niedrigste Osteoklastendichte zum einen bei der Gruppe mit der niedrigsten PHT-Konzentration, zum anderen bei der Gruppe mit der höchsten Konzentration. Daraus konnte geschlossen werden, dass es durch die verwendeten PTH<sub>1-34</sub> – Konzentrationen nicht zur Aktivierung der Osteoklasten kam, auch nicht bei den höheren PTH-Konzentrationen. Die bei der histomorphometrischen Auswertung sichtbaren Osteoklasten waren damit nicht mit einem verstärkten Knochenabbau beschäftigt, sondern lediglich zum normalen Remodelling des Knochengewebes anwesend. Auch der niedrigere Knochenanteil aus der histomorphometrischen Auswertung in Gruppe 6 war demnach nicht auf einen erhöhten Abbau von Knochen zum zwölf Wochen Zeitpunkt zurück zu führen, sondern ließ auf eine insgesamt niedrigere Knochenneubildung schließen. In dieser Studie zeigte die lokale Verwendung von 0,2 bis 1,0 mg PTH<sub>1-34</sub>/ml Fibrin zum zwölf Wochen Zeitpunkt keinen katabolen Effekt auf den Knochenstoffwechsel im untersuchten Wirbelsegment.

### **5.3.5 Vergleich mit weiteren Studien**

Ein direkter Vergleich dieser Studie mit weiteren gestaltete sich schwierig. Zum einen wurde das in dieser Arbeit lokal verabreichte Parathormon kovalent gebunden in eine Fibrinmatrix zuvor nur in wenigen Studien (Arrighi, 2009; Mark, 2007) eingesetzt, zum anderen nie zuvor zur experimentellen Fusion der Schafshalswirbelsäule. Der dritte und vierte Schafshalswirbel als Modell für den Menschen ist schon länger etabliert, ein Vergleich mit den bisherigen Studien jedoch durch andere histologischen Auswertungsmethoden erschwert und zum Teil durch die Verwendung von anderen Wachstumsfaktoren wie BMP-2 oder TNF- $\alpha$  sowie der Verwendung anderer Implantate nicht sinnvoll (Dresbach, 2007; Eindorf, 2005; Kandziora, 2001a; Kandziora, 2002; Kandziora, 2003; Kandziora, 2002b; Kandziora, 2001; Kandziora, 2002a; Kandziora, 2002c; Koch, 2005; Koch, 2008; Schulz, 2008; Wagner, 2005). In anderen Studien zur Wirbelfusion wurde häufig eine andere Tierart wie Ziege, Hund, Ratte oder Kaninchen verwendet, ein anderes Wirbelsäulensegmentes operiert oder eine andere Operationstechnik gewählt. In wenigen Studien war die histologische Analyse zudem detailliert.

Dresbach und Kandziora (Dresbach, 2007; Kandziora, 2002b) verwendeten ebenfalls den SynCage-C<sup>®</sup> augmentiert mit autologer Spongiosa aus dem Beckenkamm. Dabei wurde das

autologe Knochenmaterial jedoch nur direkt in den Cage appliziert, nicht wie in dieser Studie in und um den Cage herum im ehemaligen Bandscheibenfach. Einen weiteren Unterschied stellte das bei Dresbach angewandte zusätzliche Anfräsen der Deck- und Bodenplatte mittels einer Hochgeschwindigkeitsfräse zur Vorbereitung des Implantatlagers nach der Bearbeitung mittels eines scharfen Löffels dar. Auf diese Weise wurde ein Teil der Kortikalis mit entfernt. Diese Unterschiede erklärten das bereits bei der Diskussion der histologischen und histomorphometrischen Ergebnisse erwähnte schlechtere Fusionsergebnis. Das Wirbelsäulensegment war insgesamt instabiler, sechs von acht Tieren zeigten eine Sinterung des Implantates und drei von acht Tieren eine Dislokation des Cages. Nur bei einem Tier verband eine Knochenbrücke den dritten und vierten Halswirbel miteinander (Dresbach, 2007; Kandziora, 2002b).

Systemisch, intermittierend verabreichtes PTH<sub>1-34</sub>, wurde, ähnlich wie zur Osteoporosetherapie (Cappuzzo, 2004; Cosman, 2005; Finkelstein, 1994; Hodzman, 2005; Jiang, 2003; Jilka, 2007; Lane, 1998) und der experimentellen Verbesserung der Frakturheilung (Alkhiary, 2005; Andreassen, 1999; Andreassen, 2001; Andreassen, 2004; Holzer, 1999; Kakar, 2007; Komatsubara, 2005; Manabe, 2007; Nakajima, 2002; Nozaka, 2008), bereits zur experimentellen Wirbelfusion verwendet. Hierzu wurde jedoch ein Kleintiermodell, Ratte oder Kaninchen gewählt, sowie der Proc. transversus des Wirbelsäulensegmentes L4/L5 oder L5/L6. Anders als in der vorliegenden Arbeit ging es dabei nicht um den Ersatz des autologen Knochenmaterials zur Wirbelfusion durch ein neuartiges osteoinduktives und osteokonduktives Material, sondern lediglich um die Verbesserung der Einheilung eines Gemisches aus autologem spongiösem und kortikalem Knochen aus dem Beckenkamm. Dazu wurden täglich 10, 20 oder 40 µg PTH<sub>1-34</sub>/kg Körpergewicht systemisch als subkutane Injektionen verabreicht. Im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe konnte die Fusionsrate stets gesteigert werden (Abe, 2007; Lawrence, 2006; Lehman, 2010; O'Loughlin, 2009). Die Fusionsmasse stellte sich als strukturell überlegen dar (Abe, 2007; Lehman, 2010); ein größeres und dichteres Trabekelvolumen sowie eine frühere Resorption und Remodelling des autologen Knochentransplantates wurde festgestellt (Abe, 2007). Bei O'Loughlin und Mitarbeitern war die ermittelte Knochen- und Knorpelfläche in der mit PTH behandelten Gruppe signifikant größer, ebenso das im CT gemessene Knochenvolumen. Die Anzahl der aktiven Osteoblasten und die Osteoklastenzahl war höher als in der Kontrollgruppe (O'Loughlin, 2009). Durch die unterschiedlichen Fragestellungen ist ein Vergleich mit der vorliegenden Arbeit nur schwer möglich, jedoch wurde keine erhöhte Anzahl an Osteoklasten in den PTH-Gruppen gezählt. Die höchste Osteoklastendichte in der Gesamt-ROI gab es in der Fibrinkontrollgruppe. In der PTH-Gruppe mit der höchsten Konzentration war die Osteoklastendichte sogar signifikant niedriger als in der Spongiosagruppe. Auch in der

Messung der Knochenfläche waren die PTH-Gruppen der Spongiosagruppe nicht überlegen, lediglich die Konzentration 0,2 mg PTH<sub>1-34</sub>/ml Fibrin lieferte ein mit der Spongiosagruppe vergleichbares Ergebnis.

Das in dieser Arbeit verwendete Material wurde zuvor auch in einem zylindrischen Bohr-Defekt-Modell am Schaf getestet. Im  $\mu$ CT konnte ein höherer Prozentsatz von neu gebildetem Knochen durch TGpIP<sub>TH1-34</sub> in der Fibrinmatrix im Vergleich zur Fibrinmatrix ohne TGpIP<sub>TH1-34</sub> bzw. der Leerdefekt-Gruppe verzeichnet werden. Die Bildung von neuem Knochen war konzentrationsabhängig. Bei der höchsten Konzentration von 1,0 mg PTH<sub>1-34</sub>/ml wurde dreimal mehr Knochen gebildet als in den Defekten, die Fibrin alleine erhielten. Am wenigsten wurde neuer Knochen jedoch in den Leerdefekten gebildet. Dabei zeigte das Material seine osteokonduktiven und osteoinduktiven Eigenschaften, indem der Knochen sowohl von der Peripherie ins Zentrum des Defektes einwuchs, als auch zentrale Knochenneuf ormation zu sehen war. Bei der histomorphometrischen Auswertung wurden diese Ergebnisse bestätigt, nur wenig neu gebildeter Knochen wurde in den Leerdefekten und den Defekten, die nur mit dem Fibringel gefüllt waren, gemessen. Die qualitative histologische Auswertung zeigte vor allem in der Gruppe mit der höchsten, verwendeten Konzentration (1,0 mg PTH<sub>1-34</sub>/ml) eine hohe Anzahl an Osteoprogenitorzellen, Osteoidsäume und aktiven Osteoblasten, sowie eine gute Vaskularisierung des Defektes. Keins der Tiere zeigte eine Entzündungsreaktion auf das verwendete Material (Arrighi, 2009). In der vorliegenden Studie wurde ebenfalls eine konzentrationsabhängige Wirkung des Parathormons festgestellt, wobei nicht die höchste Konzentration wie in der Arrighi-Studie mit 1,0 mg PTH<sub>1-34</sub>/ml Fibrin den größten Knochenanteil in der Gesamt-ROI aufwies, sondern die Gruppe mit der niedrigsten Konzentration von PTH (0,2 PTH<sub>1-34</sub>/ml Fibrin). Diese Gruppe zeigte bezüglich des Knochenanteils dieselben Ergebnisse wie die Spongiosagruppe. Ebenso wies die Fibringruppe nicht die niedrigsten Knochenflächen auf, sondern die Gruppe mit der höchsten Konzentration von 1,0 mg PTH<sub>1-34</sub>/ml Fibrin. So lassen sich die Konzentrationen an PTH mit gutem Heilungsergebnis in der experimentellen Knochenheilung am Schaf nicht auf die besondere Situation zur Wirbelfusion übertragen. Hier weisen niedrige PTH-Konzentrationen ein besseres Fusionsergebnis auf.

Das in dieser Arbeit eingesetzte Material wurde auch in einem Tibia-Osteotomiemodell am Schaf getestet. Es wurde ein ein Zentimeter großer segmentaler Defekte in der Diaphyse gesetzt und mittels dynamischer Kompressionsplatte mit elf Schrauben fixiert. In die Defekte wurde die gleiche Fibrinmatrix mit unterschiedlichen Konzentrationen an TGpIP<sub>TH1-34</sub> (0,4, 1, 2, 5, 10 mg/ml) und einer definierten Menge an Hydroxyapatittrikalziumphosphat-Granulat bei jeweils sechs Tieren pro Gruppe eingebracht. Als Kontrollgruppen fungierte eine Gruppe, die das Fibrin- und Hydroxyapatittrikalziumphosphatmaterial ohne TGpIP<sub>TH1-34</sub> erhielt, sowie eine Gruppe, bei der der Defekt mit autologem Knochen gefüllt wurde. Radiologisch zeigte

sich vier Wochen nach der Operation in den PTH-Gruppen bereits eine Kallusbildung im Vergleich zu der Kontrollgruppe, die ausschließlich das Granulat erhielt. Nach zwölf Wochen konnte bei der radiologischen Auswertung eine komplette Überbrückung des Osteotomiespaltes in der Spongiosagruppe nachgewiesen werden, gefolgt von den Gruppe mit 0,4 mg/ml und 1,0 mg/ml TGpIPTH<sub>1-34</sub>. In der semiquantitativen histologischen Auswertung zum Vorkommen von Osteoblasten, Osteoprogenitorzellen und Osteoklasten zeigten sich in den Gruppen mit den niedrigen Konzentrationen des PTHs (0,4 mg/ml und 1,0 mg/ml TGpIPTH<sub>1-34</sub>) mehr Osteoblasten und Osteoprogenitorzellen im Vergleich zur Materialkontrollgruppe. In allen PTH-Gruppen waren weniger Osteoklasten nachweisbar als in der Materialkontrollgruppe. Die meisten Osteoblasten und Osteoprogenitorzellen, sowie die wenigsten Osteoklasten waren allerdings in der Gruppe darstellbar, die mittels autologem Knochenmaterial versorgt wurden (Mark, 2007). Die Anzahl der Osteoklasten wurden in der vorliegenden Studie quantitativ bestimmt. Anders als in der Studie von Mark und Mitarbeitern waren die wenigsten Osteoklasten in Gruppe 6 mit 1,0 mg PTH<sub>1-34</sub>/ml Fibrin vorhanden, signifikant weniger als in der Spongiosagruppe. Statistisch signifikant niedriger als die Osteoklastendichte der Spongiosagruppe in der Gesamt-ROI und der ventralen ROI waren die Osteoklastendichten der Gruppe 3 und 6. In der Cage ROI konnten keine signifikanten Unterschiede im Vergleich mit der Spongiosagruppe ausgemacht werden. Gruppe 3 zeigte aber auch hier die geringste Osteoklastendichte. In der dorsalen und kaudalen ROI wies Gruppe 6 eine signifikant niedrigere Osteoklastendichte auf. Die Osteoklastendichte lag bei den PTH-Gruppen mit Ausnahme von Gruppe 5 in der kranialen ROI nicht höher als die der Spongiosagruppe. So konnte man davon ausgehen, dass es durch das PTH zu keiner Aktivierung der Osteoklasten kam. Die gezählten Osteoklasten waren demnach im Sinne eines normalen Remodellings im Knochengewebe nachweisbar.

Ein Vergleich zu den bisherigen Ergebnissen aus dem klinischen Einsatz des Materials wurde durch die fehlende histologische Auswertung nicht gezogen.

### **5.3.6 Schlussfolgerung**

Die operative Versteifung eines oder mehrerer Wirbelsäulensegmente ist in der Humanmedizin noch heute das häufigste Verfahren zu dem autologes Knochenmaterial verwendet wird (Abe, 2007). Dabei sind die Vorteile offensichtlich: als körpereigenes Material könnte es nicht biokompatibler sein, durch sein Grundgerüst wirkt es osteokonduktiv auf einwachsende Zellen und Gefäße sowie osteoinduktiv durch natürlich enthaltene Wachstumsfaktoren. Ein anderer wichtiger Faktor für die klinische Verwendung ist ein wirtschaftlicher: autologe Spongiosa ist im Vergleich zu anderen kommerziell erhältlichen Materialien wie BMP-2 deutlich günstiger. Spätestens jedoch für multisegmentale Fusionen reicht die Menge des aus dem Beckenkamm zu gewinnenden autologen Knochenmaterials

nicht mehr aus (Boden, 2002). In dieser tierexperimentellen Studie konnte gezeigt werden, dass modifiziertes PTH<sub>1-34</sub> kovalent gebunden in eine Fibrinmatrix in niedrigen Konzentrationen Knochenneubildung an der Halswirbelsäule induzierte. Bei Verwendung von autologer Spongiosa aus dem Beckenkamm sowie 0,2 mg PTH<sub>1-34</sub>/ml Fibrin wiesen beide Gruppen zum zwölf Wochen Untersuchungszeitpunkt histomorphologisch und histomorphometrisch ein vergleichbares weit fortgeschrittenes Fusions- und Heilungsergebnis auf. Höhere Konzentrationen beeinflussten das Heilungsergebnis dagegen nicht positiv und waren der alleinigen Verwendung von Fibrin nicht überlegen. Die histologischen Bilder zeigten, wie schon in vorherigen Studien nachgewiesen werden konnte, dass neu gebildeter Knochen bei der Wirbelfusion von der Deck- und Bodenplatte des dritten und vierten Schafshalswirbels in Richtung Zentrum des ehemaligen Bandscheibenraumes wächst. Enchondrale Knochenbildung war vor allem auf der Oberfläche der Knochenzubildungen als Kappe oder Saum von säulenförmig angeordneten, zum Knochen hin zunehmend hypertrophen Chondrozyten sichtbar. Desmale Ossifikation erfolgte zeitgleich im Inneren des Trabekelgeflechts. Lokale Entzündungsreaktionen konnten im Gegensatz zur Spongiosagruppe und früheren Studien (Arrighi, 2009; Mark, 2007) verzeichnet werden. Da sie jedoch stets auf kleine Areale begrenzt waren, stehen sie einer weiteren Verwendung des Materials zur Wirbelfusion nicht entgegen. Eine dichtere Vaskularisierung konnte in den Gruppen mit weit fortgeschrittenem Fusionsergebnis verzeichnet werden. Osteoklasten wurden auch durch die höheren Konzentrationen des PTH<sub>1-34</sub> nicht verstärkt aktiviert. Durch die vorliegende Arbeit konnte die aus der Literatur bereits bekannte anabole Wirkung des PTH<sub>1-34</sub> auch lokal zur Wirbelfusion genutzt werden. So ist das Gemisch aus Fibrin und PTH<sub>1-34</sub> zur Verbesserung der Wirbelfusion an der Schafshalswirbelsäule geeignet. Die lokale Wirkung des modifiziertem PTH<sub>1-34</sub> zur Wirbelfusion sollte jedoch in weiterführenden Studien untersucht werden, da seine Effekte noch nicht gänzlich verstanden sind. Ebenso sollten die Langzeiteffekte des lokal verabreichten PTHs zu späteren Untersuchungszeitpunkten untersucht und weitere Konzentrationen getestet werden, um die optimale Konzentration zur ventralen, intervertebrale Wirbelfusion mittels Cage zu finden. Für eine spätere klinische Verwendung am Menschen bietet PTH<sub>1-34</sub> kovalent in eine Fibrinmatrix gebunden der autologen Spongiosa gegenüber generell den Vorteil in gleichbleibend hoher Qualität in unbegrenzter Menge zur Verfügung zu stehen und den mit hoher Morbidität assoziierten zusätzlichen Eingriff am Becken überflüssig zu machen. Die medizinischen Kosten für das Gesundheitssystem könnten durch kürzere Zeiten für Narkose und Operation gesenkt werden, ebenso wie durch den Wegfall der zum Teil erheblichen Kosten für die medizinische Nachsorge am Becken.

## 6 Zusammenfassung

Die Spondylodese nach degenerativ-, entzündlich- oder traumatisch bedingten Bandscheibenerkrankungen sowie Instabilitäten der Halswirbelsäule anderer Genese ist eine der häufigsten Operationen an der menschlichen Halswirbelsäule. Zur ventralen, intervertebralen Wirbelfusion wird zunehmend der Cage als dauerhaft stabilisierendes Implantat verwendet. Zusätzlich erfolgt häufig eine Füllung mit osteokonduktiven oder osteoinduktiven Materialien. Autologe Spongiosa wird aus diesem Grund immernoch häufig aus dem Beckenkamm entnommen. Nachteilig ist dabei jedoch der zusätzliche Eingriff, sowie die damit assoziierte Morbiditätsrate und limitierte Verfügbarkeit.

Aus der Literatur ist die anabole Wirkung von Parathormon<sub>1-34</sub> (PTH<sub>1-34</sub>) auf den Knochen bei intermittierender, systemischer Gabe bereits bekannt. Ein modifiziertes PTH<sub>1-34</sub>, kovalent in eine Fibrinmatrix gebunden, konnte seine osteokonduktiven und osteoinduktiven Eigenschaften in *in vivo* Studien zur Knochenheilung im langen Röhrenknochen bereits unter Beweis stellen. Ziel der vorliegenden Studie war es den lokalen Effekt des neuartigen Materials zur ventralen, intervertebralen Spondylodese des dritten und vierten Schafshalswirbels mittels Titancage (SynCage-C®) zu untersuchen. Insbesondere sollte analysiert werden, ob das Material konzentrationsabhängig Knochenneubildung induziert, Entzündungsreaktionen verursacht und die autologe Spongiosa im direkten Vergleich ersetzen kann. 48 Merino-Mix Schafe wurden dazu randomisiert in sechs Gruppen eingeteilt. Nach Discektomie erfolgte die Füllung des SynCage-C® und des restlichen Bandscheibenraumes mit Ausnahme des dorsalen Bereiches in Gruppe 1 mittels autologer Spongiosa. Gruppe 2 erhielt eine Füllung durch den Fibrinkleber (3,5 ml) als solchem und die Gruppen 3 bis 6 die PTH<sub>1-34</sub>-Konzentrationen 0,2, 0,4, 0,7 und 1,0 mg/ml Fibrin. Zwölf Wochen post operationem erfolgte die Entnahme und histomorphologische, histomorphometrische und immunhistologische Auswertung des Fusionsergebnisses. Die Spongiosagruppe wies zu diesem Untersuchungszeitpunkt eine weit fortgeschrittene Wirbelfusion auf. Ein vergleichbares Fusions- und Heilungsergebnis zeigte insgesamt nur die niedrigste PTH<sub>1-34</sub>-Konzentration. Histomorphometrisch wiesen beide Gruppen bei Betrachtung des gesamten ehemaligen Bandscheibenraumes die größte Knochenfläche auf. Die Knochenflächen der Fibrinkontrollgruppe und aller höheren PTH-Konzentrationen waren im Vergleich zu Spongiosagruppe signifikant niedriger. Dieser Ergebnisse spiegelten sich auch in der histomorphologischen Auswertung und der Einteilung mittels Score wieder. Neuer Knochen wurde hauptsächlich von Deck- und Bodenplatte ausgehend gebildet. In allen Gruppen erfolgte die Ossifikation sowohl enchondral als auch desmal. Lokal begrenzte

Entzündungsreaktionen konnten im Gegensatz zur Spongiosagruppe in allen anderen Gruppen verzeichnet werden, stehen einer weiteren Verwendung des Materials zur Wirbelfusion jedoch nicht entgegen. Eine dichtere Vaskularisierung war in den Gruppen mit weiter fortgeschrittener Fusion nachweisbar. Osteoklasten wurden auch durch die höheren Konzentrationen des PTH<sub>1-34</sub> nicht verstärkt aktiviert.

Die Wirkung des lokal applizierten PTH<sub>1-34</sub> kovalent in eine Fibrinmatrix gebunden auf die ventrale, cervicale, intervertebrale Fusion war konzentrationsabhängig. In niedriger Konzentration lieferte das Hormon ein mit der Spongiosagruppe durchaus vergleichbares Fusions- und Heilungsergebnis und bietet durch nahezu unbegrenzte Verfügbarkeit bei gleichbleibender Qualität ohne zusätzlichen Eingriff eine Alternative zum autologen Knochenmaterial.

## 7 Summary

### **Local application of modified parathyroid hormone<sub>1-34</sub> in a fibrin matrix in anterior, interbody fusion of the cervical sheep spine – a histological evaluation**

Spinal fusion of the human cervical spine is a common surgical procedure in order to treat degenerative, inflammatory or traumatical disorders of the intervertebral disc or instabilities of different origin in the cervical spine. Increasingly, the cage as a lasting stabilisation device is used for the anterior, intervertebral spinal fusion. Additionally it is often filled with osteoconductive and osteoinductive materials. On this account cancellous bone graft is still harvested from the iliac crest. Although the additional surgical intervention as well as the associated donor site morbidity rate and restricted availability of the graft are unfavourable.

It is widely accepted that intermittent, systemical administration of parathyroid hormone has an anabolic effect on bone metabolism. Modified parathyroid hormone<sub>1-34</sub> that is bound covalently in a fibrin matrix was able to show its osteoconductive and osteoinductive abilities on bone healing in *in vivo* studies of long bones. The goal of this study was to determine the effects of the locally applied novel material for the anterior, interbody spinal fusion of the third and fourth sheep vertebra by using a titanium cage (SynCage-C<sup>®</sup>), particularly with regard to dose-dependent bone formation, inflammatory reactions induced by the material and as an alternative to cancellous bone graft.

48 merino-mix sheep were randomly assigned in six groups. After explantation of the disc, the cage and the rest of the former disc space except the dorsal region were filled with cancellous bone graft in group 1. Group 2 received a filling with pure fibrin glue (3,5 ml) and group 3 to 6 with the PTH<sub>1-34</sub> concentrations 0.2, 0.4, 0.7, and 1.0 mg per ml fibrin glue. Twelve weeks after surgical treatment, spines were removed for histomorphological, histomorphometrical and immunohistological examination of the fusion. At this investigation time point, the cancellous bone graft group showed an advanced spinal fusion. A comparable fusion and healing result was overall only seen in the group with the lowest concentration of the PTH<sub>1-34</sub>. In regard to the whole former intervertebral disc space, both groups exhibited histomorphometrical the largest bone percentage. The bone percentage of the fibrin control group and all groups with higher PTH<sub>1-34</sub> concentrations were significantly smaller compared to the autograft group. These findings were also reflected in the histomorphological examination and the score results. New bone was primarily built at the upper and lower endplate. In all groups new bone formation was built via endochondral and desmal

ossification. Locally restricted inflammatory reactions could be seen in all groups except the autograft group, however these findings do not exclude the material for further use in spinal fusion. A denser vascularisation could be seen in the groups with more advanced fusion results. Furthermore the high concentrations of PTH<sub>1-34</sub> did not increase the activation of osteoclasts.

The effect of local applied PTH<sub>1-34</sub> covalently bound in a fibrin matrix for anterior, cervical, interbody spinal fusion was in fact dose-dependent. In lower concentration the hormone led to an absolutely comparable fusion and healing result in relation to the autograft group. The novel material has the advantage of unlimited availability at constant quality and avoids the additional surgical procedure of harvesting autograft material.

## 8 Literatur

**Abe, Y., Takahata, M., Ito, M., Irie, K., Abumi, K. und Minami, A.** (2007): *Enhancement of graft bone healing by intermittent administration of human parathyroid hormone (1-34) in a rat spinal arthrodesis model.* Bone, 41(5): 775-85.

**Abiraman, S., Varma, H. K., Umashankar, P. R. und John, A.** (2002): *Fibrin glue as an osteoinductive protein in a mouse model.* Biomaterials, 23(14): 3023-31.

**Ahlmann, E., Patzakis, M., Roidis, N., Shepherd, L. und Holtom, P.** (2002): *Comparison of anterior and posterior iliac crest bone grafts in terms of harvest-site morbidity and functional outcomes.* J Bone Joint Surg Am, 84-A(5): 716-20.

**Albrektsson, T.** (1980): *In vivo studies of bone grafts. The possibility of vascular anastomoses in healing bone.* Acta Orthop Scand, 51(1): 9-17.

**Albrektsson, T.** (1980a): *The healing of autologous bone grafts after varying degrees of surgical trauma. A microscopic and histochemical study in the rabbit.* J Bone Joint Surg Br, 62(3): 403-10.

**Albrektsson, T.** (1980b): *Repair of bone grafts. A vital microscopic and histological investigation in the rabbit.* Scand J Plast Reconstr Surg, 14(1): 1-12.

**Albrektsson, T., Bach, A., Edshage, S. und Jonsson, A.** (1982): *Fibrin adhesive system (FAS) influence on bone healing rate: a microradiographical evaluation using the bone growth chamber.* Acta Orthop Scand, 53(5): 757-63.

**Albrektsson, T., Branemark, P. I., Hansson, H. A. und Lindstrom, J.** (1981): *Osseointegrated titanium implants. Requirements for ensuring a long-lasting, direct bone-to-implant anchorage in man.* Acta Orthop Scand, 52(2): 155-70.

**Albrektsson, T. und Johansson, C.** (2001): *Osteoinduction, osteoconduction and osseointegration.* Eur Spine J, 10 Suppl 2: 96-101.

**Alkhiary, Y. M., Gerstenfeld, L. C., Krall, E., Westmore, M., Sato, M., Mitlak, B. H. und Einhorn, T. A.** (2005): *Enhancement of experimental fracture-healing by systemic administration of recombinant human parathyroid hormone (PTH 1-34)*. J Bone Joint Surg Am, 87(4): 731-41.

**Anderson, H. C.** (2003): *Matrix vesicles and calcification*. Curr Rheumatol Rep, 5(3): 222-6.

**Andreassen, T. T., Ejersted, C. und Oxlund, H.** (1999): *Intermittent parathyroid hormone (1-34) treatment increases callus formation and mechanical strength of healing rat fractures*. J Bone Miner Res, 14(6): 960-8.

**Andreassen, T. T., Fledelius, C., Ejersted, C. und Oxlund, H.** (2001): *Increases in callus formation and mechanical strength of healing fractures in old rats treated with parathyroid hormone*. Acta Orthop Scand, 72(3): 304-7.

**Andreassen, T. T., Willick, G. E., Morley, P. und Whitfield, J. F.** (2004): *Treatment with parathyroid hormone hPTH(1-34), hPTH(1-31), and monocyclic hPTH(1-31) enhances fracture strength and callus amount after withdrawal fracture strength and callus mechanical quality continue to increase*. Calcif Tissue Int, 74(4): 351-6.

**Arbes, H., Bosch, P., Lintner, F. und Salzer, M.** (1981): *First clinical experience with heterologous cancellous bone grafting combined with the fibrin adhesive system (F.A.S.)*. Arch Orthop Trauma Surg, 98(3): 183-8.

**Aronson, N., Filtzer, D. L. und Bagan, M.** (1968): *Anterior cervical fusion by the smith-robinson approach*. J Neurosurg, 29(4): 396-404.

**Arrighi, I., Mark, S., Alvisi, M., von Rechenberg, B., Hubbell, J. A. und Schense, J. C.** (2009): *Bone healing induced by local delivery of an engineered parathyroid hormone prodrug*. Biomaterials, 30(9): 1763-71.

**Arrington, E. D., Smith, W. J., Chambers, H. G., Bucknell, A. L. und Davino, N. A.** (1996): *Complications of iliac crest bone graft harvesting*. Clin Orthop Relat Res, (329): 300-9.

**Assietti, R., Beretta, F. und Arienta, C.** (2002): *Two-level anterior cervical discectomy and cage-assisted fusion without plates*. Neurosurg Focus, 12(1): E3.

- Bagby, G. W.** (1988): *Arthrodesis by the distraction-compression method using a stainless steel implant*. Orthopedics, 11(6): 931-4.
- Baker, J. W., Spotnitz, W. D. und Nolan, S. P.** (1987): *A technique for spray application of fibrin glue during cardiac operations*. Ann Thorac Surg, 43(5): 564-5.
- Banerjee, S. K. und Glynn, L. E.** (1960): *Reactions to homologous and heterologous fibrin implants in experimental animals*. Ann N Y Acad Sci, 86: 1064-74.
- Banwart, J. C., Asher, M. A. und Hassanein, R. S.** (1995): *Iliac crest bone graft harvest donor site morbidity. A statistical evaluation*. Spine, 20(9): 1055-60.
- Barlocher, C. B., Barth, A., Krauss, J. K., Binggeli, R. und Seiler, R. W.** (2002): *Comparative evaluation of microdiscectomy only, autograft fusion, polymethylmethacrylate interposition, and threaded titanium cage fusion for treatment of single-level cervical disc disease: a prospective randomized study in 125 patients*. Neurosurg Focus, 12(1): E4.
- Bartels, R. H., Donk, R. D. und Feuth, T.** (2006): *Subsidence of stand-alone cervical carbon fiber cages*. Neurosurgery, 58(3): 502-8; discussion 502-8.
- Beidelschies, M. A., Huang, H., McMullen, M. R., Smith, M. V., Islam, A. S., Goldberg, V. M., Chen, X., Nagy, L. E. und Greenfield, E. M.** (2008): *Stimulation of macrophage TNFalpha production by orthopaedic wear particles requires activation of the ERK1/2/Egr-1 and NF-kappaB pathways but is independent of p38 and JNK*. J Cell Physiol, 217(3): 652-66.
- Bellido, T., Ali, A. A., Plotkin, L. I., Fu, Q., Gubrij, I., Roberson, P. K., Weinstein, R. S., O'Brien, C. A., Manolagas, S. C. und Jilka, R. L.** (2003): *Proteasomal degradation of Runx2 shortens parathyroid hormone-induced anti-apoptotic signaling in osteoblasts. A putative explanation for why intermittent administration is needed for bone anabolism*. J Biol Chem, 278(50): 50259-72.
- Berguer, R., Staerkel, R. L., Moore, E. E., Moore, F. A., Galloway, W. B. und Mockus, M. B.** (1991): *Warning: fatal reaction to the use of fibrin glue in deep hepatic wounds. Case reports*. J Trauma, 31(3): 408-11.
- Bi, Y., Van De Motter, R. R., Ragab, A. A., Goldberg, V. M., Anderson, J. M. und Greenfield, E. M.** (2001): *Titanium particles stimulate bone resorption by inducing differentiation of murine osteoclasts*. J Bone Joint Surg Am, 83-A(4): 501-8.

- Blair, H. C., Teitelbaum, S. L., Ghiselli, R. und Gluck, S.** (1989): *Osteoclastic bone resorption by a polarized vacuolar proton pump*. Science, 245(4920): 855-7.
- Boden, S. D.** (1998): *The biology of posterolateral lumbar spinal fusion*. Orthop Clin North Am, 29(4): 603-19.
- Boden, S. D.** (2002): *Overview of the biology of lumbar spine fusion and principles for selecting a bone graft substitute*. Spine (Phila Pa 1976), 27(16 Suppl 1): 26-31.
- Boden, S. D., Martin, G. J., Jr., Horton, W. C., Truss, T. L. und Sandhu, H. S.** (1998): *Laparoscopic anterior spinal arthrodesis with rhBMP-2 in a titanium interbody threaded cage*. J Spinal Disord, 11(2): 95-101.
- Boden, S. D. und Schimandle, J. H.** (1995c): *Biologic enhancement of spinal fusion*. Spine (Phila Pa 1976), 20(24 Suppl): 113-123.
- Boden, S. D., Schimandle, J. H. und Hutton, W. C.** (1995b): *An experimental lumbar intertransverse process spinal fusion model. Radiographic, histologic, and biomechanical healing characteristics*. Spine (Phila Pa 1976), 20(4): 412-20.
- Boden, S. D., Schimandle, J. H., Hutton, W. C. und Chen, M. I.** (1995d): *1995 Volvo Award in basic sciences. The use of an osteoinductive growth factor for lumbar spinal fusion. Part I: Biology of spinal fusion*. Spine (Phila Pa 1976), 20(24): 2626-32.
- Boden, S. D. und Sumner, D. R.** (1995): *Biologic factors affecting spinal fusion and bone regeneration*. Spine (Phila Pa 1976), 20(24 Suppl): 102-112.
- Boden, S. D., Zdeblick, T. A., Sandhu, H. S. und Heim, S. E.** (2000): *The use of rhBMP-2 in interbody fusion cages. Definitive evidence of osteoinduction in humans: a preliminary report*. Spine (Phila Pa 1976), 25(3): 376-81.
- Bohlman, H. H., Emery, S. E., Goodfellow, D. B. und Jones, P. K.** (1993): *Robinson anterior cervical discectomy and arthrodesis for cervical radiculopathy. Long-term follow-up of one hundred and twenty-two patients*. J Bone Joint Surg Am, 75(9): 1298-307.
- Bonadio, J., Smiley, E., Patil, P. und Goldstein, S.** (1999): *Localized, direct plasmid gene delivery in vivo: prolonged therapy results in reproducible tissue regeneration*. Nat Med, 5(7): 753-9.

- Bonucci, E. und Nanci, A.** (2001): *Alkaline phosphatase and tartrate-resistant acid phosphatase in osteoblasts of normal and pathologic bone*. Ital J Anat Embryol, 106(2 Suppl 1): 129-33.
- Boos, N., Aebis, Max** (2008): *Spinal Disorders, Fundamentals of Diagnosis and Treatment*. 1. New York: Springer-Verlag: 449-479.
- Bosch, P., Braun, F., Eschberger, J., Kovac, W. und Spangler, H. P.** (1977): [*The action of high-concentrated fibria on bone healing (author's transl)*]. Arch Orthop Unfallchir, 89(3): 259-73.
- Bosch, P., Lintner, F., Arbes, H. und Brand, G.** (1980): *Experimental investigations of the effect of the fibrin adhesive on the Kiel heterologous bone graft*. Arch Orthop Trauma Surg, 96(3): 177-85.
- Boyle, W. J., Simonet, W. S. und Lacey, D. L.** (2003): *Osteoclast differentiation and activation*. Nature, 423(6937): 337-42.
- Branemark, P. I., Adell, R., Breine, U., Hansson, B. O., Lindstrom, J. und Ohlsson, A.** (1969): *Intra-osseous anchorage of dental prostheses. I. Experimental studies*. Scand J Plast Reconstr Surg, 3(2): 81-100.
- Brantigan, J. W. und Steffee, A. D.** (1993): *A carbon fiber implant to aid interbody lumbar fusion. Two-year clinical results in the first 26 patients*. Spine, 18(14): 2106-7.
- Brodke, D. S. und Zdeblick, T. A.** (1992): *Modified Smith-Robinson procedure for anterior cervical discectomy and fusion*. Spine, 17(10 Suppl): 427-30.
- Bucciero, A., Zorzi, T. und Piscopo, G. A.** (2008): *Peek cage-assisted anterior cervical discectomy and fusion at four levels: clinical and radiographic results*. J Neurosurg Sci, 52(2): 37-40.
- Burchardt, H.** (1983): *The biology of bone graft repair*. Clin Orthop Relat Res, (174): 28-42.
- Burger, E. H., Klein-Nulend, J. und Smit, T. H.** (2003): *Strain-derived canalicular fluid flow regulates osteoclast activity in a remodelling osteon--a proposal*. J Biomech, 36(10): 1453-9.

- Cadosch, D., Chan, E., Gautschi, O. P., Meagher, J., Zellweger, R. und Filgueira, L.** (2009): *Titanium IV ions induced human osteoclast differentiation and enhanced bone resorption in vitro.* J Biomed Mater Res A, 91(1): 29-36.
- Cadosch, D., Gautschi, O. P., Chan, E., Simmen, H. P. und Filgueira, L.** (2010): *Titanium induced production of chemokines CCL17/TARC and CCL22/MDC in human osteoclasts and osteoblasts.* J Biomed Mater Res A, 92(2): 475-83.
- Cahill, D. W., Martin, G. J., Jr., Hajjar, M. V., Sonstein, W., Graham, L. B. und Engelman, R. W.** (2003): *Suitability of bioresorbable cages for anterior cervical fusion.* J Neurosurg, 98(2 Suppl): 195-201.
- Cain, C. C. und Fraser, R. D.** (1995): *Bony and vascular anatomy of the normal cervical spine in the sheep.* Spine, 20(7): 759-65.
- Cappuzzo, K. A. und Delafuente, J. C.** (2004): *Teriparatide for severe osteoporosis.* Ann Pharmacother, 38(2): 294-302.
- Carter, P. H. und Schipani, E.** (2006): *The roles of parathyroid hormone and calcitonin in bone remodeling: prospects for novel therapeutics.* Endocr Metab Immune Disord Drug Targets, 6(1): 59-76.
- Cauthen, J. C., Theis, R. P. und Allen, A. T.** (2003): *Anterior cervical fusion: a comparison of cage, dowel and dowel-plate constructs.* Spine J, 3(2): 106-17; discussion 117.
- Chang, W. C., Tsou, H. K., Chen, W. S., Chen, C. C. und Shen, C. C.** (2009): *Preliminary comparison of radiolucent cages containing either autogenous cancellous bone or hydroxyapatite graft in multilevel cervical fusion.* J Clin Neurosci, 16(6): 793-6.
- Chen, H., Frankenburg, E. P., Goldstein, S. A. und McCauley, L. K.** (2003): *Combination of local and systemic parathyroid hormone enhances bone regeneration.* Clin Orthop Relat Res, (416): 291-302.
- Cho, D. Y., Lee, W. Y. und Sheu, P. C.** (2004): *Treatment of multilevel cervical fusion with cages.* Surg Neurol, 62(5): 378-85, discussion 385-6.

**Chou, Y. C., Chen, D. C., Hsieh, W. A., Chen, W. F., Yen, P. S., Harnod, T., Chiou, T. L., Chang, Y. L., Su, C. F., Lin, S. Z. und Chen, S. Y.** (2008): *Efficacy of anterior cervical fusion: comparison of titanium cages, polyetheretherketone (PEEK) cages and autogenous bone grafts.* J Clin Neurosci, 15(11): 1240-5.

**Clarke, B.** (2008): *Normal bone anatomy and physiology.* Clin J Am Soc Nephrol, 3 Suppl 3: 131-9.

**Cloward, R. B.** (1959): *Vertebral body fusion for ruptured cervical discs.* Am J Surg, 98: 722-7.

**Cook, S. D., Dalton, J. E., Tan, E. H., Tejeiro, W. V., Young, M. J. und Whitecloud, T. S., 3rd** (1994): *In vivo evaluation of anterior cervical fusions with hydroxylapatite graft material.* Spine (Phila Pa 1976), 19(16): 1856-66.

**Cosman, F., Nieves, J., Zion, M., Woelfert, L., Luckey, M. und Lindsay, R.** (2005): *Daily and cyclic parathyroid hormone in women receiving alendronate.* N Engl J Med, 353(6): 566-75.

**Cottrell, J. M., van der Meulen, M. C., Lane, J. M. und Myers, E. R.** (2006): *Assessing the stiffness of spinal fusion in animal models.* Hss J, 2(1): 12-8.

**Cunningham, B. W., Kanayama, M., Parker, L. M., Weis, J. C., Sefter, J. C., Fedder, I. L. und McAfee, P. C.** (1999): *Osteogenic protein versus autologous interbody arthrodesis in the sheep thoracic spine. A comparative endoscopic study using the Bagby and Kuslich interbody fusion device.* Spine (Phila Pa 1976), 24(6): 509-18.

**Cunningham, B. W., Kotani, Y., McNulty, P. S., Cappuccino, A., Kanayama, M., Fedder, I. L. und McAfee, P. C.** (1998): *Video-assisted thoracoscopic surgery versus open thoracotomy for anterior thoracic spinal fusion. A comparative radiographic, biomechanical, and histologic analysis in a sheep model.* Spine (Phila Pa 1976), 23(12): 1333-40.

**Cunningham, B. W., Orbegoso, C. M., Dmitriev, A. E., Hallab, N. J., Sefter, J. C. und McAfee, P. C.** (2002): *The effect of titanium particulate on development and maintenance of a posterolateral spinal arthrodesis: an in vivo rabbit model.* Spine, 27(18): 1971-81.

**DeBowes, R. M., Grant, B. D., Bagby, G. W., Gallina, A. M., Sande, R. D. und Ratzlaff, M. H.** (1984): *Cervical vertebral interbody fusion in the horse: a comparative study of bovine xenografts and autografts supported by stainless steel baskets*. Am J Vet Res, 45(1): 191-9.

**Dejana, E., Colella, S., Languino, L. R., Balconi, G., Corbascio, G. C. und Marchisio, P. C.** (1987): *Fibrinogen induces adhesion, spreading, and microfilament organization of human endothelial cells in vitro*. J Cell Biol, 104(5): 1403-11.

**Dejana, E., Languino, L. R., Polentarutti, N., Balconi, G., Ryckewaert, J. J., Larrieu, M. J., Donati, M. B., Mantovani, A. und Marguerie, G.** (1985): *Interaction between fibrinogen and cultured endothelial cells. Induction of migration and specific binding*. J Clin Invest, 75(1): 11-8.

**Depprich, R., Ommerborn, M., Zipprich, H., Naujoks, C., Handschel, J., Wiesmann, H. P., Kubler, N. R. und Meyer, U.** (2008): *Behavior of osteoblastic cells cultured on titanium and structured zirconia surfaces*. Head Face Med, 4: 29.

**Dobnig, H. und Turner, R. T.** (1995): *Evidence that intermittent treatment with parathyroid hormone increases bone formation in adult rats by activation of bone lining cells*. Endocrinology, 136(8): 3632-8.

**Dobnig, H. und Turner, R. T.** (1997): *The effects of programmed administration of human parathyroid hormone fragment (1-34) on bone histomorphometry and serum chemistry in rats*. Endocrinology, 138(11): 4607-12.

**Dodds, R. A., York-Ely, A. M., Zhukauskas, R., Arola, T., Howell, J., Hartill, C., Cobb, R. und Fox, C.** (2009): *Biomechanical and Radiographic Comparison of Demineralized Bone Matrix, and a Coralline Hydroxyapatite in a Rabbit Spinal Fusion Model*. J Biomater Appl.

**Dresbach, A.** (2007): *Histologische Untersuchung zum Einfluß des Cagedesigns auf die intervertebrale Fusion am Modell der Schafshalswirbelsäule (autologer Beckenkammspan, Harms Cage, SynthesC-Cage)*. Berlin, Charité-Universitätsmedizin Berlin. 1-94.

**Drespe, I. H., Polzhofer, G. K., Turner, A. S. und Grauer, J. N.** (2005): *Animal models for spinal fusion*. Spine J, 5(6 Suppl): 209-216.

**Dulchavsky, S. A., Geller, E. R., Maurer, J., Kennedy, P. R., Tortora, G. T. und Maitra, S. R.** (1991): *Autologous fibrin gel: bactericidal properties in contaminated hepatic injury*. J Trauma, 31(7): 991-4; discussion 994-5.

**Dunn, C. J. und Goa, K. L.** (1999): *Fibrin sealant: a review of its use in surgery and endoscopy*. Drugs, 58(5): 863-86.

**Dvorak, H. F., Harvey, V. S., Estrella, P., Brown, L. F., McDonagh, J. und Dvorak, A. M.** (1987): *Fibrin containing gels induce angiogenesis. Implications for tumor stroma generation and wound healing*. Lab Invest, 57(6): 673-86.

**Eindorf, T.** (2005): *Histologische Evaluation eines biodegradierbaren Implantats zur Spondylodese der Halswirbelsäule - Eine tierexperimentelle Studie im Schafsmodell*. Berlin, Freie Universität Berlin. 1-131.

**Eitel, F., Klapp, F., Jacobson, W. und Schweiberer, L.** (1981): *Bone regeneration in animals and in man. A contribution to understanding the relative value of animal experiments to human pathophysiology*. Arch Orthop Trauma Surg, 99(1): 59-64.

**Eitel, F. a., Seiler, H. und Schweiberer, L.** (1981a): *Vergleichende morphologische Untersuchungen zur Übertragbarkeit tierexperimenteller Ergebnisse auf den Regenerationsprozeß des menschlichen Röhrenknochens. I. Untersuchungsmethoden*. Unfallheilkunde, 84: 250-254.

**Eitel, F. b., Seiler, H. und Schweiberer, L.** (1981b): *Vergleichende morphologische Untersuchungen zur Übertragbarkeit tierexperimenteller Ergebnisse auf den Regenerationsprozeß des menschlichen Röhrenknochens. II. Untersuchungsergebnisse*. Unfallheilkunde, 84: 255-264.

**Emery, S. E., Brazinski, M. S., Koka, A., Bensusan, J. S. und 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(4): 540-8.

**Emery, S. E., Fisher, J. R. und Bohlman, H. H.** (1997): *Three-level anterior cervical discectomy and fusion: radiographic and clinical results*. Spine, 22(22): 2622-4; discussion 2625.

**Enneking, W. F., Burchardt, H., Puhl, J. J. und Piotrowski, G.** (1975): *Physical and biological aspects of repair in dog cortical-bone transplants*. J Bone Joint Surg Am, 57(2): 237-52.

**Fang, J., Zhu, Y. Y., Smiley, E., Bonadio, J., Rouleau, J. P., Goldstein, S. A., McCauley, L. K., Davidson, B. L. und Roessler, B. J.** (1996): *Stimulation of new bone formation by direct transfer of osteogenic plasmid genes*. Proc Natl Acad Sci U S A, 93(12): 5753-8.

**Filgueira, L.** (2004): *Fluorescence-based staining for tartrate-resistant acidic phosphatase (TRAP) in osteoclasts combined with other fluorescent dyes and protocols*. J Histochem Cytochem, 52(3): 411-4.

**Finkelstein, J. S., Klibanski, A., Schaefer, E. H., Hornstein, M. D., Schiff, I. und Neer, R. M.** (1994): *Parathyroid hormone for the prevention of bone loss induced by estrogen deficiency*. N Engl J Med, 331(24): 1618-23.

**Flygare, L., Hosoki, H., Rohlin, M. und Petersson, A.** (1997): *Bone histomorphometry using interactive image analysis. A methodological study with application on the human temporomandibular joint*. Eur J Oral Sci, 105(1): 67-73.

**Francis, C. W., Bunce, L. A. und Sporn, L. A.** (1993): *Endothelial cell responses to fibrin mediated by FPB cleavage and the amino terminus of the beta chain*. Blood Cells, 19(2): 291-306; discussion 306-7.

**Frederic, S., Benedict, R. und Payer, M.** (2006): *Implantation of an empty carbon fiber cage or a tricortical iliac crest autograft after cervical discectomy for single-level disc herniation: a prospective comparative study*. J Neurosurg Spine, 4(4): 292-9.

**Fuerst, A., Derungs, S., von Rechenberg, B., Auer, J. A., Schense, J. und Watson, J.** (2007): *Use of a parathyroid hormone peptide (PTH(1-34))-enriched fibrin hydrogel for the treatment of a subchondral cystic lesion in the proximal interphalangeal joint of a warmblood filly*. J Vet Med A Physiol Pathol Clin Med, 54(2): 107-12.

**Gercek, E., Arlet, V., Delisle, J. und Marchesi, D.** (2003): *Subsidence of stand-alone cervical cages in anterior interbody fusion: warning*. Eur Spine J, 12(5): 513-6.

**Gerngross, H., Burri, C., Kinzli, L., Merk, J. und Muller, G. W.** (1982): *[Complications at removal sites of autologous cancellous bone transplants]*. Aktuelle Traumatol, 12(3): 146-52.

**Goldberg, V. M. und Stevenson, S.** (1987): *Natural history of autografts and allografts*. Clin Orthop Relat Res, (225): 7-16.

**Gonzales, J. B., Purdon, M. A. und Horowitz, S. M.** (1996): *In vitro studies on the role of titanium in aseptic loosening*. Clin Orthop Relat Res, (330): 244-50.

**Gore, D. R. und Sepic, S. B.** (1984): *Anterior cervical fusion for degenerated or protruded discs. A review of one hundred forty-six patients*. Spine, 9(7): 667-71.

**Goulet, J. A., Senunas, L. E., DeSilva, G. L. und Greenfield, M. L.** (1997): *Autogenous iliac crest bone graft. Complications and functional assessment*. Clin Orthop Relat Res, (339): 76-81.

**Greco, F., de Palma, L., Spagnolo, N., Rossi, A., Specchia, N. und Gigante, A.** (1991): *Fibrin-antibiotic mixtures: an in vitro study assessing the possibility of using a biologic carrier for local drug delivery*. J Biomed Mater Res, 25(1): 39-51.

**Greenfield, E. M., Bi, Y., Ragab, A. A., Goldberg, V. M. und Van De Motter, R. R.** (2002): *The role of osteoclast differentiation in aseptic loosening*. J Orthop Res, 20(1): 1-8.

**Grob, D.** (1986): *[Problems at the donor site in autologous bone transplantation]*. Unfallchirurg, 89(8): 339-45.

**Guizzardi, S., Galli, C., Martini, D., Belletti, S., Tinti, A., Raspanti, M., Taddei, P., Ruggeri, A. und Scandroglio, R.** (2004): *Different titanium surface treatment influences human mandibular osteoblast response*. J Periodontol, 75(2): 273-82.

**Ha, S. K., Park, J. Y., Kim, S. H., Lim, D. J., Kim, S. D. und Lee, S. K.** (2008): *Radiologic Assessment of Subsidence in Stand-Alone Cervical Polyetheretherketone (PEEK) Cage*. J Korean Neurosurg Soc, 44(6): 370-4.

**Hacker, R. J.** (2000): *A randomized prospective study of an anterior cervical interbody fusion device with a minimum of 2 years of follow-up results*. J Neurosurg, 93(2 Suppl): 222-6.

**Hacker, R. J., Cauthen, J. C., Gilbert, T. J. und Griffith, S. L.** (2000): *A prospective randomized multicenter clinical evaluation of an anterior cervical fusion cage*. Spine, 25(20): 2646-54; discussion 2655.

**Haid, R. W., Jr., Branch, C. L., Jr., Alexander, J. T. und Burkus, J. K.** (2004): *Posterior lumbar interbody fusion using recombinant human bone morphogenetic protein type 2 with cylindrical interbody cages*. Spine J, 4(5): 527-38; discussion 538-9.

**Hallab, N., Merritt, K. und Jacobs, J. J.** (2001): *Metal sensitivity in patients with orthopaedic implants*. J Bone Joint Surg Am, 83-A(3): 428-36.

**Hallab, N. J., Cunningham, B. W. und Jacobs, J. J.** (2003): *Spinal implant debris-induced osteolysis*. Spine, 28(20): 125-38.

**Haverich, A., Walterbusch, G. und Borst, H. G.** (1981): *The use of fibrin glue for sealing vascular prostheses of high porosity*. Thorac Cardiovasc Surg, 29(4): 252-4.

**Hayman, A. R.** (2008): *Tartrate-resistant acid phosphatase (TRAP) and the osteoclast/immune cell dichotomy*. Autoimmunity, 41(3): 218-23.

**Haynes, D. R., Rogers, S. D., Hay, S., Percy, M. J. und Howie, D. W.** (1993): *The differences in toxicity and release of bone-resorbing mediators induced by titanium and cobalt-chromium-alloy wear particles*. J Bone Joint Surg Am, 75(6): 825-34.

**Hecht, B. P., Fischgrund, J. S., Herkowitz, H. N., Penman, L., Toth, J. M. und Shirkhoda, A.** (1999): *The use of recombinant human bone morphogenetic protein 2 (rhBMP-2) to promote spinal fusion in a nonhuman primate anterior interbody fusion model*. Spine (Phila Pa 1976), 24(7): 629-36.

**Hida, K., Iwasaki, Y., Yano, S., Akino, M. und Seki, T.** (2008): *Long-term follow-up results in patients with cervical disk disease treated by cervical anterior fusion using titanium cage implants*. Neurol Med Chir (Tokyo), 48(10): 440-6; discussion 446.

**Hodsman, A. B., Bauer, D. C., Dempster, D. W., Dian, L., Hanley, D. A., Harris, S. T., Kendler, D. L., McClung, M. R., Miller, P. D., Olszynski, W. P., Orwoll, E. und Yuen, C. K.** (2005): *Parathyroid hormone and teriparatide for the treatment of osteoporosis: a review of the evidence and suggested guidelines for its use*. Endocr Rev, 26(5): 688-703.

**Holmes, R., Mooney, V., Bucholz, R. und Tencer, A.** (1984): *A coralline hydroxyapatite bone graft substitute. Preliminary report*. Clin Orthop Relat Res, (188): 252-62.

- Holzer, G., Majeska, R. J., Lundy, M. W., Hartke, J. R. und Einhorn, T. A.** (1999): *Parathyroid hormone enhances fracture healing. A preliminary report.* Clin Orthop Relat Res, (366): 258-63.
- Hurley, L. A., Stinchfield, F. E., Bassett, A. L. und Lyon, W. H.** (1959): *The role of soft tissues in osteogenesis. An experimental study of canine spine fusions.* J Bone Joint Surg Am, 41-A: 1243-54.
- Hwang, S. L., Hwang, Y. F., Lieu, A. S., Lin, C. L., Kuo, T. H., Su, Y. F., Howng, S. L. und Lee, K. S.** (2005): *Outcome analyses of interbody titanium cage fusion used in the anterior discectomy for cervical degenerative disc disease.* J Spinal Disord Tech, 18(4): 326-31.
- Hwang, S. L., Lin, C. L., Lieu, A. S., Lee, K. S., Kuo, T. H., Hwang, Y. F., Su, Y. F. und Howng, S. L.** (2004): *Three-level and four-level anterior cervical discectomies and titanium cage-augmented fusion with and without plate fixation.* J Neurosurg Spine, 1(2): 160-7.
- Isogai, N., Landis, W. J., Mori, R., Gotoh, Y., Gerstenfeld, L. C., Upton, J. und Vacanti, J. P.** (2000): *Experimental use of fibrin glue to induce site-directed osteogenesis from cultured periosteal cells.* Plast Reconstr Surg, 105(3): 953-63.
- Jabs, A. D., Jr., Wider, T. M., DeBellis, J. und Hugo, N. E.** (1992): *The effect of fibrin glue on skin grafts in infected sites.* Plast Reconstr Surg, 89(2): 268-71.
- Jacobs, J. J., Shanbhag, A., Glant, T. T., Black, J. und Galante, J. O.** (1994): *Wear Debris in Total Joint Replacements.* J Am Acad Orthop Surg, 2(4): 212-220.
- Jagannathan, J., Shaffrey, C. I., Oskouian, R. J., Dumont, A. S., Herrold, C., Sansur, C. A. und Jane, J. A.** (2008): *Radiographic and clinical outcomes following single-level anterior cervical discectomy and allograft fusion without plate placement or cervical collar.* J Neurosurg Spine, 8(5): 420-8.
- Jahng, J. S. und Kim, H. W.** (2000): *Effect of intermittent administration of parathyroid hormone on fracture healing in ovariectomized rats.* Orthopedics, 23(10): 1089-94.
- Jarzem, P., Harvey, E. J., Shenker, R. und Hajipavlou, A.** (1996): *The effect of fibrin sealant on spinal fusions using allograft in dogs.* Spine, 21(11): 1307-12.

**Jiang, Y., Zhao, J. J., Mitlak, B. H., Wang, O., Genant, H. K. und Eriksen, E. F.** (2003): *Recombinant human parathyroid hormone (1-34) [teriparatide] improves both cortical and cancellous bone structure.* J Bone Miner Res, 18(11): 1932-41.

**Jilka, R. L.** (2007): *Molecular and cellular mechanisms of the anabolic effect of intermittent PTH.* Bone, 40(6): 1434-46.

**Jilka, R. L., Weinstein, R. S., Bellido, T., Roberson, P., Parfitt, A. M. und Manolagas, S. C.** (1999): *Increased bone formation by prevention of osteoblast apoptosis with parathyroid hormone.* J Clin Invest, 104(4): 439-46.

**Jonas, R. A., Schoen, F. J., Levy, R. J. und Castaneda, A. R.** (1986): *Biological sealants and knitted Dacron: porosity and histological comparisons of vascular graft materials with and without collagen and fibrin glue pretreatments.* Ann Thorac Surg, 41(6): 657-63.

**Jorgensen, N. R., Teilmann, S. C., Henriksen, Z., Civitelli, R., Sorensen, O. H. und Steinberg, T. H.** (2003): *Activation of L-type calcium channels is required for gap junction-mediated intercellular calcium signaling in osteoblastic cells.* J Biol Chem, 278(6): 4082-6.

**Joung, Y. I., Oh, S. H., Ko, Y., Yi, H. J. und Lee, S. K.** (2007): *Subsidence of Cylindrical Cage (AMSLUtrade mark Cage): Postoperative 1 Year Follow-up of the Cervical Anterior Interbody Fusion.* J Korean Neurosurg Soc, 42(5): 367-70.

**Kakar, S., Einhorn, T. A., Vora, S., Miara, L. J., Hon, G., Wigner, N. A., Toben, D., Jacobsen, K. A., Al-Sebaei, M. O., Song, M., Trackman, P. C., Morgan, E. F., Gerstenfeld, L. C. und Barnes, G. L.** (2007): *Enhanced chondrogenesis and Wnt signaling in PTH-treated fractures.* J Bone Miner Res, 22(12): 1903-12.

**Kandziora, F., Pflugmacher, R., Schafer, J., Born, C., Duda, G., Haas, N. P. und Mittlmeier, T.** (2001a): *Biomechanical comparison of cervical spine interbody fusion cages.* Spine, 26(17): 1850-7.

**Kandziora, F., Pflugmacher, R., Scholz, M., Knispel, C., Hiller, T., Schollmeier, G., Bail, H., Schmidmaier, G., Duda, G., Raschke, M. und Haas, N. P.** (2002): *Comparison of BMP-2 and combined IGF-I/TGF- $\alpha$ 1 application in a sheep cervical spine fusion model.* Eur Spine J, 11(5): 482-93.

**Kandziora, F., Pflugmacher, R., Scholz, M., Schafer, J., Schollmeier, G., Schmidmaier, G., Duda, G., Raschke, M. und Haas, N. P. (2003):** *Dose-dependent effects of combined IGF-I and TGF-beta1 application in a sheep cervical spine fusion model.* Eur Spine J, 12(5): 464-73.

**Kandziora, F., Pflugmacher, R., Scholz, M., Schafer, J., Schollmeier, G., Schnake, K. J., Bail, H., Duda, G. und Haas, N. P. (2002b):** *[Experimental fusion of the sheep cervical spine. Part I: Effect of cage design on interbody fusion].* Chirurg, 73(9): 909-17.

**Kandziora, F., Pflugmacher, R., Scholz, M., Schnake, K., Lucke, M., Schroder, R. und Mittlmeier, T. (2001):** *Comparison between sheep and human cervical spines: an anatomic, radiographic, bone mineral density, and biomechanical study.* Spine, 26(9): 1028-37.

**Kandziora, F., Schmidmaier, G., Schollmeier, G., Bail, H., Pflugmacher, R., Gorke, T., Wagner, M., Raschke, M., Mittlmeier, T. und Haas, N. P. (2002a):** *IGF-I and TGF-beta1 application by a poly-(D,L-lactide)-coated cage promotes intervertebral bone matrix formation in the sheep cervical spine.* Spine, 27(16): 1710-23.

**Kandziora, F., Scholz, M., Pflugmacher, R., Krummrey, G., Schollmeier, G., Schmidmaier, G., Schnake, K. J., Duda, G., Raschke, M. und Haas, N. P. (2002c):** *[Experimental fusion of the sheep cervical spine. Part II: Effect of growth factors and carrier systems on interbody fusion].* Chirurg, 73(10): 1025-38.

**Kast, E., Derakhshani, S., Bothmann, M. und Oberle, J. (2009):** *Subsidence after anterior cervical inter-body fusion. A randomized prospective clinical trial.* Neurosurg Rev, 32(2): 207-14.

**Keller, E. E. und Triplett, W. W. (1987):** *Iliac bone grafting: review of 160 consecutive cases.* J Oral Maxillofac Surg, 45(1): 11-4.

**Kettler, A., Liakos, L., Haegele, B. und Wilke, H. J. (2007):** *Are the spines of calf, pig and sheep suitable models for pre-clinical implant tests?* Eur Spine J, 16(12): 2186-92.

**Kim, H. W. und Jahng, J. S. (1999):** *Effect of intermittent administration of parathyroid hormone on fracture healing in ovariectomized rats.* Iowa Orthop J, 19: 71-7.

**Kim, P., Wakai, S., Matsuo, S., Moriyama, T. und Kirino, T.** (1998): *Bisegmental cervical interbody fusion using hydroxyapatite implants: surgical results and long-term observation in 70 cases.* J Neurosurg, 88(1): 21-7.

**Koch, C.** (2005): *Histologische Evaluation eines bioaktiven Implantates zur Spondylodese der Halswirbelsäule - eine experimentelle Studie am Schaf.*Berlin, Freie Universität Berlin. 1-169.

**Koch, C., Kandziora, F., Huenigen, H. und Plendl, J.** (2008): *Histological evaluation of the sheep's cervical spine segment 3/4--a histomorphological and histomorphometrical study.* Anat Histol Embryol, 37(3): 200-4.

**Komatsubara, S., Mori, S., Mashiba, T., Nonaka, K., Seki, A., Akiyama, T., Miyamoto, K., Cao, Y., Manabe, T. und Norimatsu, H.** (2005): *Human parathyroid hormone (1-34) accelerates the fracture healing process of woven to lamellar bone replacement and new cortical shell formation in rat femora.* Bone, 36(4): 678-87.

**Koolwijk, P., van Erck, M. G., de Vree, W. J., Vermeer, M. A., Weich, H. A., Hanemaaijer, R. und van Hinsbergh, V. W.** (1996): *Cooperative effect of TNFalpha, bFGF, and VEGF on the formation of tubular structures of human microvascular endothelial cells in a fibrin matrix. Role of urokinase activity.* J Cell Biol, 132(6): 1177-88.

**Kostenuik, P. J., Harris, J., Halloran, B. P., Turner, R. T., Morey-Holton, E. R. und Bikle, D. D.** (1999): *Skeletal unloading causes resistance of osteoprogenitor cells to parathyroid hormone and to insulin-like growth factor-I.* J Bone Miner Res, 14(1): 21-31.

**Kousteni, S. und Bilezikian, J. P.** (2008): *The cell biology of parathyroid hormone in osteoblasts.* Curr Osteoporos Rep, 6(2): 72-6.

**Kram, H. B., Shoemaker, W. C., Hino, S. T. und Harley, D. P.** (1984): *Splenic salvage using biologic glue.* Arch Surg, 119(11): 1309-11.

**Krämer, J.** (2006): *Bandscheibenbedingte Erkrankungen.* 5. Georg Thieme Verlag KG;1: 120-125.

- Kuslich, S. D., Ulstrom, C. L., Griffith, S. L., Ahern, J. W. und Dowdle, J. D.** (1998): *The Bagby and Kuslich method of lumbar interbody fusion. History, techniques, and 2-year follow-up results of a United States prospective, multicenter trial.* Spine, 23(11): 1267-78; discussion 1279.
- Lack, W., Bosch, P. und Arbes, H.** (1987): *Chronic osteomyelitis treated by cancellous homografts and fibrin adhesion.* J Bone Joint Surg Br, 69(2): 335-7.
- Lalor, P. A., Revell, P. A., Gray, A. B., Wright, S., Railton, G. T. und Freeman, M. A.** (1991): *Sensitivity to titanium. A cause of implant failure?* J Bone Joint Surg Br, 73(1): 25-8.
- Lane, N. E., Sanchez, S., Modin, G. W., Genant, H. K., Pierini, E. und Arnaud, C. D.** (1998): *Parathyroid hormone treatment can reverse corticosteroid-induced osteoporosis. Results of a randomized controlled clinical trial.* J Clin Invest, 102(8): 1627-33.
- Lawrence, J. P., Ennis, F., White, A. P., Magit, D., Polzhofer, G., Drespe, I., Troiano, N. W. und Grauer, J. N.** (2006): *Effect of daily parathyroid hormone (1-34) on lumbar fusion in a rat model.* Spine J, 6(4): 385-90.
- Le Guehennec, L., Goyenvalle, E., Aguado, E., Pilet, P., Bagot D'Arc, M., Bilban, M., Spaethe, R. und Daculsi, G.** (2005): *MBCP biphasic calcium phosphate granules and tissucol fibrin sealant in rabbit femoral defects: the effect of fibrin on bone ingrowth.* J Mater Sci Mater Med, 16(1): 29-35.
- Le Guehennec, L., Layrolle, P. und Daculsi, G.** (2004): *A review of bioceramics and fibrin sealant.* Eur Cell Mater, 8: 1-10; discussion 10-1.
- Lehman, R. A., Jr., Dmitriev, A. E., Cardoso, M. J., Helgeson, M. D., Christensen, C. L., Raymond, J. W., Eckel, T. T. und Riew, K. D.** (2010): *Effect of teriparatide [rhPTH(1,34)] and calcitonin on intertransverse process fusion in a rabbit model.* Spine (Phila Pa 1976), 35(2): 146-52.
- Lemcke, J., Menz, H., Al-Zain, F. und Meier, U.** (2007): *[Outcome after cervical anterior fusion--a clinical study of 368 patients].* Z Orthop Unfall, 145(6): 744-52.
- Liao, J. C., Niu, C. C., Chen, W. J. und Chen, L. H.** (2008): *Polyetheretherketone (PEEK) cage filled with cancellous allograft in anterior cervical discectomy and fusion.* Int Orthop, 32(5): 643-8.

**Liebich, H.-G.** (2004): *Funktionelle Histologie der Haussäugetiere*. 4. Stuttgart: Schattauer: 88-98.

**Lienau, J., Schell, H., Duda, G. N., Seebeck, P., Muchow, S. und Bail, H. J.** (2005): *Initial vascularization and tissue differentiation are influenced by fixation stability*. J Orthop Res, 23(3): 639-45.

**Lin, C. N., Wu, Y. C., Wang, N. P. und Howng, S. L.** (2003): *Preliminary experience with anterior interbody titanium cage fusion for treatment of cervical disc disease*. Kaohsiung J Med Sci, 19(5): 208-16.

**Lind, B. I., Zoega, B., Rosen, H., Leonard, R. C., Lind, M., Twelves, C., Coleman, R., van Belle, S., Wilson, C., Ledermann, J., Kennedy, I., Barrett-Lee, P., Perren, T., Verrill, M., Cameron, D., Foster, E., Yellowlees, A., Crown, J., Mooney, V., Massie, J. B., Lind, B. I., Rah, J. H., Negri, S. und Holmes, R. E.** (2007): *Autograft versus interbody fusion cage without plate fixation in the cervical spine: a randomized clinical study using radiostereometry*  
*Conventional adjuvant chemotherapy versus single-cycle, autograft-supported, high-dose, late-intensification chemotherapy in high-risk breast cancer patients: a randomized trial*  
*Comparison of hydroxyapatite granules to autogenous bone graft in fusion cages in a goat model*. Eur Spine J, 16(8): 1251-6.

**Lindsay, R., Cosman, F., Zhou, H., Bostrom, M. P., Shen, V. W., Cruz, J. D., Nieves, J. W. und Dempster, D. W.** (2006): *A novel tetracycline labeling schedule for longitudinal evaluation of the short-term effects of anabolic therapy with a single iliac crest bone biopsy: early actions of teriparatide*. J Bone Miner Res, 21(3): 366-73.

**Lindsay, R., Nieves, J., Formica, C., Henneman, E., Woelfert, L., Shen, V., Dempster, D. und Cosman, F.** (1997): *Randomised controlled study of effect of parathyroid hormone on vertebral-bone mass and fracture incidence among postmenopausal women on oestrogen with osteoporosis*. Lancet, 350(9077): 550-5.

**Lüllemann-Rauch, R.** (2003): *Histologie*. 1. Stuttgart: Georg Thieme Verlag;1: 135-163.

**Manabe, T., Mori, S., Mashiba, T., Kaji, Y., Iwata, K., Komatsubara, S., Seki, A., Sun, Y. X. und Yamamoto, T.** (2007): *Human parathyroid hormone (1-34) accelerates natural fracture healing process in the femoral osteotomy model of cynomolgus monkeys*. Bone, 40(6): 1475-82.

**Mark, S., Schense, J., Arrighi, I., Hubbell, J., Andrianaly, N. und Von Rechenberg, B.** (2007): *Enhancement of bone healing by locally delivered parathyroid hormone fusion peptide in a diaphyseal defect in the sheep tibia.* Poster No:1445. 53rd Annual Meeting of the Orthopaedic Research Society. San Diego Convention Center San Diego, California, USA.

**Marques, M. R., dos Santos, M. C., da Silva, A. F., Nociti, F. H., Jr. und Barros, S. P.** (2009): *Parathyroid hormone administration may modulate periodontal tissue levels of interleukin-6, matrix metalloproteinase-2 and matrix metalloproteinase-9 in experimental periodontitis.* J Periodontal Res, 44(6): 744-50.

**Matge, G.** (2002): *Cervical cage fusion with 5 different implants: 250 cases.* Acta Neurochir (Wien), 144(6): 539-49; discussion 550.

**Matge, G. und Leclercq, T. A.** (2000): *Rationale for interbody fusion with threaded titanium cages at cervical and lumbar levels. Results on 357 cases.* Acta Neurochir (Wien), 142(4): 425-33; discussion 434.

**Mattsson, J. P., Schlesinger, P. H., Keeling, D. J., Teitelbaum, S. L., Stone, D. K. und Xie, X. S.** (1994): *Isolation and reconstitution of a vacuolar-type proton pump of osteoclast membranes.* J Biol Chem, 269(40): 24979-82.

**McAfee, P. C., Regan, J. J., Farey, I. D., Gurr, K. R. und Warden, K. E.** (1988): *The biomechanical and histomorphometric properties of anterior lumbar fusions: a canine model.* J Spinal Disord, 1(2): 101-10.

**Meyers, M. H. und Herron, M.** (1984): *A fibrin adhesive seal for the repair of osteochondral fracture fragments.* Clin Orthop Relat Res, (182): 258-63.

**Milde, L. N.** (1989): *An anaphylactic reaction to fibrin glue.* Anesth Analg, 69(5): 684-6.

**Minkin, C.** (1982): *Bone acid phosphatase: tartrate-resistant acid phosphatase as a marker of osteoclast function.* Calcif Tissue Int, 34(3): 285-90.

**Minkin, C. und Marinho, V. C.** (1999): *Role of the osteoclast at the bone-implant interface.* Adv Dent Res, 13: 49-56.

**Miyamoto, S., Hadama, T., Tanaka, H., Anai, H., Sako, H., Wada, T., Iwata, E. und Hamamoto, H.** (2004): *MRSA aortic valve endocarditis treated by pericardium-lined Dacron patch and vancomycin-containing fibrin glue*. *Ann Thorac Cardiovasc Surg*, 10(4): 252-4.

**Mody, D. R., Esses, S. I. und Heggeness, M. H.** (1994): *A histologic study of soft-tissue reactions to spinal implants*. *Spine (Phila Pa 1976)*, 19(10): 1153-6.

**Moore, R. J.** (2000): *The vertebral end-plate: what do we know?* *Eur Spine J*, 9(2): 92-6.

**Moore, R. J., Osti, O. L., Vernon-Roberts, B. und Fraser, R. D.** (1992): *Changes in endplate vascularity after an outer annulus tear in the sheep*. *Spine (Phila Pa 1976)*, 17(8): 874-8.

**Moreland, D. B., Asch, H. L., Clabeaux, D. E., Castiglia, G. J., Czajka, G. A., Lewis, P. J., Egnatchik, J. G., Cappuccino, A. und Huynh, L.** (2004): *Anterior cervical discectomy and fusion with implantable titanium cage: initial impressions, patient outcomes and comparison to fusion with allograft*. *Spine J*, 4(2): 184-91; discussion 191.

**Mouritzen, C., Dromer, M. und Keinecke, H. O.** (1993): *The effect of fibrin glueing to seal bronchial and alveolar leakages after pulmonary resections and decortications*. *Eur J Cardiothorac Surg*, 7(2): 75-80.

**Movat, H. Z.** (1955): *Demonstration of all connective tissue elements in a single section; pentachrome stains*. *AMA Arch Pathol*, 60(3): 289-95.

**Msezane, L. P., Katz, M. H., Gofrit, O. N., Shalhav, A. L. und Zorn, K. C.** (2008): *Hemostatic agents and instruments in laparoscopic renal surgery*. *J Endourol*, 22(3): 403-8.

**Murphy, G. und Gavrilovic, J.** (1999): *Proteolysis and cell migration: creating a path?* *Curr Opin Cell Biol*, 11(5): 614-21.

**Murray, D. W. und Rushton, N.** (1990): *Macrophages stimulate bone resorption when they phagocytose particles*. *J Bone Joint Surg Br*, 72(6): 988-92.

**Nakajima, A., Shimoji, N., Shiomi, K., Shimizu, S., Moriya, H., Einhorn, T. A. und Yamazaki, M.** (2002): *Mechanisms for the enhancement of fracture healing in rats treated with intermittent low-dose human parathyroid hormone (1-34)*. *J Bone Miner Res*, 17(11): 2038-47.

- Nakazawa, T., Nakajima, A., Shiomi, K., Moriya, H., Einhorn, T. A. und Yamazaki, M.** (2005): *Effects of low-dose, intermittent treatment with recombinant human parathyroid hormone (1-34) on chondrogenesis in a model of experimental fracture healing.* Bone, 37(5): 711-9.
- Neer, R. M., Arnaud, C. D., Zanchetta, J. R., Prince, R., Gaich, G. A., Reginster, J. Y., Hodsman, A. B., Eriksen, E. F., Ish-Shalom, S., Genant, H. K., Wang, O. und Mitlak, B. H.** (2001): *Effect of parathyroid hormone (1-34) on fractures and bone mineral density in postmenopausal women with osteoporosis.* N Engl J Med, 344(19): 1434-41.
- Ney, A. L., Kelly, P. H., Tsukayama, D. T. und Bublick, M. P.** (1990): *Fibrin glue-antibiotic suspension in the prevention of prosthetic graft infection.* J Trauma, 30(8): 1000-5; discussion 1005-6.
- Nishida, S., Yamaguchi, A., Tanizawa, T., Endo, N., Mashiba, T., Uchiyama, Y., Suda, T., Yoshiki, S. und Takahashi, H. E.** (1994): *Increased bone formation by intermittent parathyroid hormone administration is due to the stimulation of proliferation and differentiation of osteoprogenitor cells in bone marrow.* Bone, 15(6): 717-23.
- Niu, C. C., Chen, L. H., Lai, P. L., Fu, T. S. und Chen, W. J.** (2005): *Trapezoidal titanium cage in anterior cervical interbody fusion: a clinical experience.* Chang Gung Med J, 28(4): 212-21.
- Nozaka, K., Miyakoshi, N., Kasukawa, Y., Maekawa, S., Noguchi, H. und Shimada, Y.** (2008): *Intermittent administration of human parathyroid hormone enhances bone formation and union at the site of cancellous bone osteotomy in normal and ovariectomized rats.* Bone, 42(1): 90-7.
- O'Loughlin, P. F., Cunningham, M. E., Bukata, S. V., Tomin, E., Poynton, A. R., Doty, S. B., Sama, A. A. und Lane, J. M.** (2009): *Parathyroid hormone (1-34) augments spinal fusion, fusion mass volume, and fusion mass quality in a rabbit spinal fusion model.* Spine, 34(2): 121-30.
- Olander, J. V., Bremer, M. E., Marasa, J. C. und Feder, J.** (1985): *Fibrin-enhanced endothelial cell organization.* J Cell Physiol, 125(1): 1-9.

- Ono, K., Yamamuro, T., Nakamura, T., Kakutani, Y., Kitsugi, T., Hyakuna, K., Kokubo, T., Oka, M. und Kotoura, Y.** (1988): *Apatite-wollastonite containing glass ceramic-fibrin mixture as a bone defect filler*. J Biomed Mater Res, 22(10): 869-85.
- Payer, M., May, D., Reverdin, A. und Tessitore, E.** (2003): *Implantation of an empty carbon fiber composite frame cage after single-level anterior cervical discectomy in the treatment of cervical disc herniation: preliminary results*. J Neurosurg, 98(2 Suppl): 143-8.
- Péhu, M., Policard, A. und Dufort, A.** (1931): *L`Osteoporose ou maladie des os marmoréens*. La Presse Medicale, 53: 999-1003.
- Peolsson, A., Hedlund, R. und Vavruch, L.** (2004): *Prediction of fusion and importance of radiological variables for the outcome of anterior cervical decompression and fusion*. Eur Spine J, 13(3): 229-34.
- Perka, C., Schultz, O., Spitzer, R. S., Lindenhayn, K., Burmester, G. R. und Sittinger, M.** (2000): *Segmental bone repair by tissue-engineered periosteal cell transplants with bioresorbable fleece and fibrin scaffolds in rabbits*. Biomaterials, 21(11): 1145-53.
- Pflugger, G., Bosch, P., Grundschober, F., Kristen, H., Plenk, H., Jr. und Schider, S.** (1979): *[Investigation of bone growth into porous metal implants (author's transl)]*. Wien Klin Wochenschr, 91(14): 482-7.
- Profeta, G., de Falco, R., Ianniciello, G., Profeta, L., Cigliano, A. und Raja, A. I.** (2000): *Preliminary experience with anterior cervical microdiscectomy and interbody titanium cage fusion (Novus CT-Ti) in patients with cervical disc disease*. Surg Neurol, 53(5): 417-26.
- Prolo, D. J. und Rodrigo, J. J.** (1985): *Contemporary bone graft physiology and surgery*. Clin Orthop Relat Res, (200): 322-42.
- Pugsley, L. I. und Selye, H.** (1933): *The histological changes in the bone responsible for the action of parathyroid hormone on the calcium metabolism of the rat*. J Physiol, 79(1): 113-7.
- Qin, L., Raggatt, L. J. und Partridge, N. C.** (2004): *Parathyroid hormone: a double-edged sword for bone metabolism*. Trends Endocrinol Metab, 15(2): 60-5.
- R. Nickel, A. S., E. Seiferle** (1992): *Lehrbuch der Anatomie der Haustiere*. 6. Berlin: Verlag Paul Parey.(Bewegungsapparat);1: 626.

**Radosevich, M., Goubran, H. I. und Burnouf, T. (1997):** *Fibrin sealant: scientific rationale, production methods, properties, and current clinical use.* Vox Sang, 72(3): 133-43.

**Ray, C. D. (1997):** *Threaded titanium cages for lumbar interbody fusions.* Spine, 22(6): 667-79; discussion 679-80.

**Ray, R. D. (1972a):** *Vascularization of bone grafts and implants.* Clin Orthop Relat Res, 87: 43-8.

**Reeve, J., Hesp, R., Williams, D., Hulme, P., Klenerman, L., Zanelli, J. M., Darby, A. J., Tregear, G. W. und Parsons, J. A. (1976):** *Anabolic effect of low doses of a fragment of human parathyroid hormone on the skeleton in postmenopausal osteoporosis.* Lancet, 1(7968): 1035-8.

**Remedios, A. (1999):** *Bone and bone healing.* Vet Clin North Am Small Anim Pract, 29(5): 1029-44.

**Riggs, B. L. und Parfitt, A. M. (2005):** *Drugs used to treat osteoporosis: the critical need for a uniform nomenclature based on their action on bone remodeling.* J Bone Miner Res, 20(2): 177-84.

**Riley, L. H., Jr., Robinson, R. A., Johnson, K. A. und Walker, A. E. (1969):** *The results of anterior interbody fusion of the cervical spine. Review of ninety-three consecutive cases.* J Neurosurg, 30(2): 127-33.

**Roach, H. I., Shearer, J. R. und Archer, C. (1989):** *The choice of an experimental model. A guide for research workers.* J Bone Joint Surg Br, 71(4): 549-53.

**Rodrigues, D. C., Urban, R. M., Jacobs, J. J. und Gilbert, J. L. (2009):** *In vivo severe corrosion and hydrogen embrittlement of retrieved modular body titanium alloy hip-implants.* J Biomed Mater Res B Appl Biomater, 88(1): 206-19.

**Rodriguez Fuchs, C. A. und Bruno, M. (1987):** *Plugging liver biopsy sites with coagulation factors.* Lancet, 2(8567): 1087.

**Rouach, Y., Delongchamps, N. B., Patey, N., Fontaine, E., Timsit, M. O., Thiounn, N. und Mejean, A. (2009):** *Suture or hemostatic agent during laparoscopic partial nephrectomy? A randomized study using a hypertensive porcine model.* Urology, 73(1): 172-7.

**Ryu, S. I., Mitchell, M. und Kim, D. H. (2006):** *A prospective randomized study comparing a cervical carbon fiber cage to the Smith-Robinson technique with allograft and plating: up to 24 months follow-up.* Eur Spine J, 15(2): 157-64.

**Sadri, H., Pfander, G., Siebenrock, K. A., Tannast, M., Koch, P., Fujita, H., Ballmer, P. und Ganz, R. (2008):** *Acetabular reinforcement ring in primary total hip arthroplasty: a minimum 10-year follow-up.* Arch Orthop Trauma Surg, 128(8): 869-77.

**Sakiyama-Elbert, S. E. und Hubbell, J. A. (2000):** *Development of fibrin derivatives for controlled release of heparin-binding growth factors.* J Control Release, 65(3): 389-402.

**Sakiyama, S. E., Schense, J. C. und Hubbell, J. A. (1999):** *Incorporation of heparin-binding peptides into fibrin gels enhances neurite extension: an example of designer matrices in tissue engineering.* Faseb J, 13(15): 2214-24.

**Salame, K., Ouaknine, G. E., Razon, N. und Rochkind, S. (2002):** *The use of carbon fiber cages in anterior cervical interbody fusion: report of 100 cases.* Neurosurg Focus, 12(1): E1.

**Salomon F., G. H., Gille U. (2005):** *Anatomie für die Tiermedizin.* 1. Stuttgart: Enke Verlag Stuttgart;1: 790.

**Sandhu, H. S., Kanim, L. E., Toth, J. M., Kabo, J. M., Liu, D., Delamarter, R. B. und Dawson, E. G. (1997):** *Experimental spinal fusion with recombinant human bone morphogenetic protein-2 without decortication of osseous elements.* Spine (Phila Pa 1976), 22(11): 1171-80.

**Sandhu, H. S., Toth, J. M., Diwan, A. D., Seim, H. B., 3rd, Kanim, L. E., Kabo, J. M. und Turner, A. S. (2002):** *Histologic evaluation of the efficacy of rhBMP-2 compared with autograft bone in sheep spinal anterior interbody fusion.* Spine (Phila Pa 1976), 27(6): 567-75.

**Sandhu, H. S., Turner, S., Kabo, J. M., Kanim, L. E., Liu, D., Nourparvar, A., Delamarter, R. B. und Dawson, E. G. (1996):** *Distractive properties of a threaded interbody fusion device. An in vivo model.* Spine (Phila Pa 1976), 21(10): 1201-10.

**Sawin, P. D., Traynelis, V. C. und Menezes, A. H. (1998):** *A comparative analysis of fusion rates and donor-site morbidity for autogeneic rib and iliac crest bone grafts in posterior cervical fusions.* J Neurosurg, 88(2): 255-65.

**Scheele, J., Gentsch, H. H. und Matteson, E.** (1984): *Splenic repair by fibrin tissue adhesive and collagen fleece*. Surgery, 95(1): 6-13.

**Schell, H., Lienau, J., Epari, D. R., Seebeck, P., Exner, C., Muchow, S., Bragulla, H., Haas, N. P. und Duda, G. N.** (2006): *Osteoclastic activity begins early and increases over the course of bone healing*. Bone, 38(4): 547-54.

**Schense, J. C., Bloch, J., Aebischer, P. und Hubbell, J. A.** (2000): *Enzymatic incorporation of bioactive peptides into fibrin matrices enhances neurite extension*. Nat Biotechnol, 18(4): 415-9.

**Schense, J. C. und Hubbell, J. A.** (1999): *Cross-linking exogenous bifunctional peptides into fibrin gels with factor XIIIa*. Bioconjug Chem, 10(1): 75-81.

**Schimandle, J. H. und Boden, S. D.** (1994): *Spine update. Animal use in spinal research*. Spine, 19(21): 2474-7.

**Schlag G, Redl H, Turner M und Dinges HP** (1986): *The Importance of Fibrin in Wound Repair*. Berlin: Springer-Verlag.(General Surgery and Abdominal Surgery);6.

**Schlesinger, P. H., Blair, H. C., Teitelbaum, S. L. und Edwards, J. C.** (1997): *Characterization of the osteoclast ruffled border chloride channel and its role in bone resorption*. J Biol Chem, 272(30): 18636-43.

**Schmieder, K., Wolzik-Grossmann, M., Pechlivanis, I., Engelhardt, M., Scholz, M. und Harders, A.** (2006): *Subsidence of the wing titanium cage after anterior cervical interbody fusion: 2-year follow-up study*. J Neurosurg Spine, 4(6): 447-53.

**Schmoekel, H., Schense, J. C., Weber, F. E., Gratz, K. W., Gnagi, D., Muller, R. und Hubbell, J. A.** (2004): *Bone healing in the rat and dog with nonglycosylated BMP-2 demonstrating low solubility in fibrin matrices*. J Orthop Res, 22(2): 376-81.

**Schmoekel, H. G., Weber, F. E., Hurter, K., Schense, J. C., Seiler, G., Ryrz, U., Spreng, D., Schawalder, P. und Hubbell, J.** (2005): *Enhancement of bone healing using non-glycosylated rhBMP-2 released from a fibrin matrix in dogs and cats*. J Small Anim Pract, 46(1): 17-21.

**Schmoekel, H. G., Weber, F. E., Schense, J. C., Gratz, K. W., Schawalder, P. und Hubbell, J. A.** (2005): *Bone repair with a form of BMP-2 engineered for incorporation into fibrin cell ingrowth matrices*. *Biotechnol Bioeng*, 89(3): 253-62.

**Schmokel, H. G., Weber, F. E., Seiler, G., von Rechenberg, B., Schense, J. C., Schawalder, P. und Hubbell, J.** (2004): *Treatment of nonunions with nonglycosylated recombinant human bone morphogenetic protein-2 delivered from a fibrin matrix*. *Vet Surg*, 33(2): 112-8.

**Schnee, C. L., Freese, A., Weil, R. J. und Marcotte, P. J.** (1997): *Analysis of harvest morbidity and radiographic outcome using autograft for anterior cervical fusion*. *Spine*, 22(19): 2222-7.

**Schnoke, M., Midura, S. B. und Midura, R. J.** (2009): *Parathyroid hormone suppresses osteoblast apoptosis by augmenting DNA repair*. *Bone.*, 45(3): 590-602.

**Schroder, J., Grosse-Dresselhaus, F., Schul, C. und Wassmann, H.** (2007): *PMMA versus titanium cage after anterior cervical discectomy - a prospective randomized trial*. *Zentralbl Neurochir*, 68(1): 2-7.

**Schroeder, A., Pohler, O. und Sutter, F.** (1976): *[Tissue reaction to an implant of a titanium hollow cylinder with a titanium surface spray layer]*. *SSO Schweiz Monatsschr Zahnheilkd*, 86(7): 713-27.

**Schulz, A.** (2008): *Osteointegration eines biodegradierbaren Implantates zur Spondylodese: eine histologische und histomorphometrische Analyse im Tiermodell*. Berlin, Charité-Universitätsmedizin Berlin. 1-69.

**Seguin, J. R., Frapier, J. M., Colson, P. und Chaptal, P. A.** (1992): *Fibrin sealant for early repair of acquired ventricular septal defect*. *J Thorac Cardiovasc Surg*, 104(3): 748-51.

**Selye, H.** (1932): *A condition simulating human scleroderma in rats injected with parathyroid hormone*. *J Am Med Assoc*, 99: 108.

**Selye, H.** (1932 a): *On the stimulation of new bone formation with parathyroid extract and irradiated ergosterol*. *Endocrinology*, 16: 547-558.

- Senter, H. J., Kortyna, R. und Kemp, W. R.** (1989): *Anterior cervical discectomy with hydroxylapatite fusion*. Neurosurgery, 25(1): 39-42; discussion 42-3.
- Seo, I. Y., Lee, Y. H. und Rim, J. S.** (2008): *Case report: percutaneous fibrin glue injection for urine leakage in laparoscopic partial nephrectomy*. J Endourol, 22(5): 959-62.
- Shanbhag, A. S., Jacobs, J. J., Glant, T. T., Gilbert, J. L., Black, J. und Galante, J. O.** (1994): *Composition and morphology of wear debris in failed uncemented total hip replacement*. J Bone Joint Surg Br, 76(1): 60-7.
- Siddiqui, A. A. und Jackowski, A.** (2003): *Cage versus tricortical graft for cervical interbody fusion. A prospective randomised study*. J Bone Joint Surg Br, 85(7): 1019-25.
- Sierra, D. H.** (1993): *Fibrin sealant adhesive systems: a review of their chemistry, material properties and clinical applications*. J Biomater Appl, 7(4): 309-52.
- Silber, J. S., Anderson, D. G., Daffner, S. D., Brislin, B. T., Leland, J. M., Hilibrand, A. S., Vaccaro, A. R. und Albert, T. J.** (2003): *Donor site morbidity after anterior iliac crest bone harvest for single-level anterior cervical discectomy and fusion*. Spine, 28(2): 134-9.
- Singh, S. H. und Kirkaldy-Willis, W. H.** (1972): *Experimental "anterior" spinal fusion in guinea pigs: a histologic study of the changes in the anterior and posterior elements*. Can J Surg, 15(4): 239-48.
- Skripitz, R. und Aspenberg, P.** (2001): *Implant fixation enhanced by intermittent treatment with parathyroid hormone*. J Bone Joint Surg Br, 83(3): 437-40.
- Skripitz, R., Bohling, S., Ruther, W. und Aspenberg, P.** (2005): *Stimulation of implant fixation by parathyroid hormone (1-34)-A histomorphometric comparison of PMMA cement and stainless steel*. J Orthop Res, 23(6): 1266-70.
- Slappey, G., Toribatake, Y., Ganey, T. M., Ogden, J. A. und Hutton, W. C.** (1998): *Guidelines to decortication in posterolateral spine fusion*. J Spinal Disord, 11(2): 102-9.
- Slivka, M. A., Spenciner, D. B., Seim, H. B., 3rd, Welch, W. C., Serhan, H. A. und Turner, A. S.** (2006): *High rate of fusion in sheep cervical spines following anterior interbody surgery with absorbable and nonabsorbable implant devices*. Spine (Phila Pa 1976), 31(24): 2772-7.

**Smit, T. H.** (2002): *The use of a quadruped as an in vivo model for the study of the spine - biomechanical considerations.* Eur Spine J, 11(2): 137-44.

**Smit, T. H., Odgaard, A. und Schneider, E.** (1997): *Structure and function of vertebral trabecular bone.* Spine, 22(24): 2823-33.

**Smith, G. W. und Robinson, R. A.** (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(3): 607-24.

**Stanek, G., Bosch, P. und Weber, P.** (1978): *[Comparison of growth of Staphylococcus aureus in a fibrin-clotting system and in clotted blood - a quantitative investigation (author's transl)].* Zentralbl Bakteriolog Orig A, 240(4): 441-6.

**Summers, B. N. und Eisenstein, S. M.** (1989): *Donor site pain from the ilium. A complication of lumbar spine fusion.* J Bone Joint Surg Br, 71(4): 677-80.

**Sumner, D. R., Kienapfel, H., Jacobs, J. J., Urban, R. M., Turner, T. M. und Galante, J. O.** (1995): *Bone ingrowth and wear debris in well-fixed cementless porous-coated tibial components removed from patients.* J Arthroplasty, 10(2): 157-67.

**Taguchi, T.** (1984): *[Experimental anterior interbody fusion of the cervical spine. Comparative study between autograft and Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> ceramic implantation].* Nippon Seikeigeka Gakkai Zasshi, 58(2): 205-17.

**Takahashi, T., Tominaga, T., Watabe, N., Yokobori, A. T., Jr., Sasada, H. und Yoshimoto, T.** (1999): *Use of porous hydroxyapatite graft containing recombinant human bone morphogenetic protein-2 for cervical fusion in a caprine model.* J Neurosurg, 90(2 Suppl): 224-30.

**Takei, A., Tashiro, Y., Nakashima, Y. und Sueishi, K.** (1995): *Effects of fibrin on the angiogenesis in vitro of bovine endothelial cells in collagen gel.* In Vitro Cell Dev Biol Anim, 31(6): 467-72.

**Tam, C. S., Heersche, J. N., Murray, T. M. und Parsons, J. A.** (1982): *Parathyroid hormone stimulates the bone apposition rate independently of its resorptive action: differential effects of intermittent and continuous administration.* Endocrinology, 110(2): 506-12.

- Tashjian, A. H., Jr. und Chabner, B. A.** (2002): *Commentary on clinical safety of recombinant human parathyroid hormone 1-34 in the treatment of osteoporosis in men and postmenopausal women.* J Bone Miner Res, 17(7): 1151-61.
- Tho, K. S. und Krishnamoorthy, S.** (1996): *Use of coral grafts in anterior interbody fusion of the rabbit spine.* Ann Acad Med Singapore, 25(6): 824-7.
- Thomas, I., Kirkaldy-Willis, W. H., Singh, S. und Paine, K. W.** (1975): *Experimental spinal fusion in guinea pigs and dogs: the effect of immobilization.* Clin Orthop Relat Res, (112): 363-75.
- Thome, C., Leheta, O., Krauss, J. K. und Zevgaridis, D.** (2006): *A prospective randomized comparison of rectangular titanium cage fusion and iliac crest autograft fusion in patients undergoing anterior cervical discectomy.* J Neurosurg Spine, 4(1): 1-9.
- Togawa, D., Bauer, T. W., Brantigan, J. W. und Lowery, G. L.** (2001): *Bone graft incorporation in radiographically successful human intervertebral body fusion cages.* Spine (Phila Pa 1976), 26(24): 2744-50.
- Topuz, K., Colak, A., Kaya, S., Simsek, H., Kutlay, M., Demircan, M. N. und Velioglu, M.** (2009): *Two-level contiguous cervical disc disease treated with peek cages packed with demineralized bone matrix: results of 3-year follow-up.* Eur Spine J, 18(2): 238-43.
- Toribatake, Y., Hutton, W. C., Tomita, K. und Boden, S. D.** (1998): *Vascularization of the fusion mass in a posterolateral intertransverse process fusion.* Spine (Phila Pa 1976), 23(10): 1149-54.
- Toth, J. M., An, H. S., Lim, T. H., Ran, Y., Weiss, N. G., Lundberg, W. R., Xu, R. M. und Lynch, K. L.** (1995): *Evaluation of porous biphasic calcium phosphate ceramics for anterior cervical interbody fusion in a caprine model.* Spine (Phila Pa 1976), 20(20): 2203-10.
- Toth, J. M., Estes, B. T., Wang, M., Seim, H. B., 3rd, Scifert, J. L., Turner, A. S. und Cornwall, G. B.** (2002): *Evaluation of 70/30 poly (L-lactide-co-D,L-lactide) for use as a resorbable interbody fusion cage.* J Neurosurg, 97(4 Suppl): 423-32.
- Tredwell, S., Jackson, J. K., Hamilton, D., Lee, V. und Burt, H. M.** (2006): *Use of fibrin sealants for the localized, controlled release of cefazolin.* Can J Surg, 49(5): 347-52.

**Turgut, M., Erkus, M. und Tavus, N.** (1999): *The effect of fibrin adhesive (Tisseel) on interbody allograft fusion: an experimental study with cats.* Acta Neurochir (Wien), 141(3): 273-8.

**Udagawa, N., Takahashi, N., Akatsu, T., Tanaka, H., Sasaki, T., Nishihara, T., Koga, T., Martin, T. J. und Suda, T.** (1990): *Origin of osteoclasts: mature monocytes and macrophages are capable of differentiating into osteoclasts under a suitable microenvironment prepared by bone marrow-derived stromal cells.* Proc Natl Acad Sci U S A, 87(18): 7260-4.

**Vaananen, H. K., Zhao, H., Mulari, M. und Halleen, J. M.** (2000): *The cell biology of osteoclast function.* J Cell Sci, 113 (Pt 3): 377-81.

**Valenta, A., Roschger, P., Fratzl-Zelman, N., Kostenuik, P. J., Dunstan, C. R., Fratzl, P. und Klaushofer, K.** (2005): *Combined treatment with PTH (1-34) and OPG increases bone volume and uniformity of mineralization in aged ovariectomized rats.* Bone, 37(1): 87-95.

**van de Wijngaert, F. P. und Burger, E. H.** (1986): *Demonstration of tartrate-resistant acid phosphatase in un-decalcified, glycolmethacrylate-embedded mouse bone: a possible marker for (pre)osteoclast identification.* J Histochem Cytochem, 34(10): 1317-23.

**van Dijk, J. H. und Pes, P. L.** (2007): *Haemostasis in laparoscopic partial nephrectomy: current status.* Minim Invasive Ther Allied Technol, 16(1): 31-44.

**van Jonbergen, H. P., Spruit, M., Anderson, P. G. und Pavlov, P. W.** (2005): *Anterior cervical interbody fusion with a titanium box cage: early radiological assessment of fusion and subsidence.* Spine J, 5(6): 645-9; discussion 649.

**van Limbeek, J., Jacobs, W. C., Anderson, P. G. und Pavlov, P. W.** (2000): *A systematic literature review to identify the best method for a single level anterior cervical interbody fusion.* Eur Spine J, 9(2): 129-36.

**Vavruch, L., Hedlund, R., Javid, D., Leszniewski, W. und Shalabi, A.** (2002): *A prospective randomized comparison between the cloward procedure and a carbon fiber cage in the cervical spine: a clinical and radiologic study.* Spine, 27(16): 1694-701.

**Wagner, M.** (2005): *Histomorphologische und histomorphometrische Untersuchung zur Wirksamkeit von TGF-beta1 und IGF-I Applikation mittels Poly (D,L-laktid)-beschichteten*

*Cage am intervertebralen Fusionsmodell der Schafshalswirbelsäule.* Berlin, Univ.-Med., (Humboldt-Univ.). 1-78.

**Wagner, P., Grand, B., Bagby, G. W. und al., a.** (1979): *Evaluation of cervical spine fusion as a treatment in the equine "Wobbler" syndrome.* J Vet Surg, 8: 84-88.

**Walsh, N. C., Cahill, M., Carninci, P., Kawai, J., Okazaki, Y., Hayashizaki, Y., Hume, D. A. und Cassady, A. I.** (2003): *Multiple tissue-specific promoters control expression of the murine tartrate-resistant acid phosphatase gene.* Gene, 307: 111-23.

**Wang, G. J., Reger, S. I., Shao, Z. H., Morton, C. L. und Stamp, W. G.** (1984): *Comparative strength of anterior spinal fixation with bone graft or polymethylmethacrylate. Experimental operations and observations on dogs.* Clin Orthop Relat Res, (188): 303-8.

**Wang, J. C., Yu, W. D., Sandhu, H. S., Betts, F., Bhuta, S. und Delamarter, R. B.** (1999): *Metal debris from titanium spinal implants.* Spine (Phila Pa 1976), 24(9): 899-903.

**Weiner, B. K. und Fraser, R. D.** (1998): *Spine update lumbar interbody cages.* Spine (Phila Pa 1976), 23(5): 634-40.

**Welsch, U.** (2006): *Lehrbuch Histologie.* 2. München: Urban Fischer Verlag: 108-147.

**White, A. A., 3rd, Southwick, W. O., Deponte, R. J., Gainor, J. W. und Hardy, R.** (1973): *Relief of pain by anterior cervical-spine fusion for spondylosis. A report of sixty-five patients.* J Bone Joint Surg Am, 55(3): 525-34.

**Wigfield, C. C. und Nelson, R. J.** (2001): *Nonautologous interbody fusion materials in cervical spine surgery: how strong is the evidence to justify their use?* Spine, 26(6): 687-94.

**Wilke, H. J.** (2008): *Animal models for spinal research.* Eur Spine J, 17(1): 1.

**Wilke, H. J., Kettler, A. und Claes, L. E.** (1997): *Are sheep spines a valid biomechanical model for human spines?* Spine (Phila Pa 1976), 22(20): 2365-74.

**Wilke, H. J., Kettler, A., Wenger, K. H. und Claes, L. E.** (1997a): *Anatomy of the sheep spine and its comparison to the human spine.* Anat Rec, 247(4): 542-55.

**Williams, J. L., Allen, M. B., Jr. und Harkess, J. W.** (1968): *Late results of cervical discectomy and interbody fusion: some factors influencing the results.* J Bone Joint Surg Am, 50(2): 277-86.

**Willie, B. M., Yang, X., Kelly, N. H., Han, J., Nair, T., Wright, T. M., van der Meulen, M. C. und Bostrom, M. P.** (2010): *Cancellous Bone Osseointegration Is Enhanced by In Vivo Loading.* Tissue Eng Part C Methods.

**Willie, B. M., Yang, X., Kelly, N. H., Merkow, J., Gagne, S., Ware, R., Wright, T. M. und Bostrom, M. P.** (2010a): *Osseointegration into a novel titanium foam implant in the distal femur of a rabbit.* J Biomed Mater Res B Appl Biomater, 92(2): 479-88.

**Wippermann, B. W., Schrott, H. E., Steeg, S. und Tscherne, H.** (1997): *[Complications of spongiosa harvesting of the ilial crest. A retrospective analysis of 1,191 cases].* Chirurg, 68(12): 1286-91.

**Wissing, H., Stürmer, K. und Breidenstein, G.** (1990): *Die Wertigkeit verschiedener Versuchstierspezies für experimentelle Untersuchungen am Knochen.* Unfallheilkunde, 212: 479-488.

**Wolff, J.** (1892): *Das Gesetz der Transformation der Knochen.* Springer Verlag.

**Wolner, E.** (1982): *Fibrin gluing in cardiovascular surgery.* Thorac Cardiovasc Surg, 30(4): 236-7.

**Wright, C. D., Vedi, S., Garrahan, N. J., Stanton, M., Duffy, S. W. und Compston, J. E.** (1992): *Combined inter-observer and inter-method variation in bone histomorphometry.* Bone, 13(3): 205-8.

**Wright, I. P. und Eisenstein, S. M.** (2007): *Anterior cervical discectomy and fusion without instrumentation.* Spine, 32(7): 772-4; discussion 775.

**Younger, E. M. und Chapman, M. W.** (1989): *Morbidity at bone graft donor sites.* J Orthop Trauma, 3(3): 192-5.

**Zarate-Kalfopulos, B., Estrada-Villasenor, E., Lecona-Buitron, H., Arenas-Sordo Mde, L., Garza-Hernandez, A. C. und Reyes-Sanchez, A.** (2007): *[Use of fibrin glue in combination with autologous bone graft as bone enhancer in posterolateral spinal fusion. An experimental study in New Zealand rabbits]*. *Cir Cir*, 75(3): 201-5.

**Zdeblick, T. A., Cooke, M. E., Wilson, D., Kunz, D. N. und McCabe, R.** (1993): *Anterior cervical discectomy, fusion, and plating. A comparative animal study*. *Spine (Phila Pa 1976)*, 18(14): 1974-83.

**Zdeblick, T. A. und Ducker, T. B.** (1991): *The use of freeze-dried allograft bone for anterior cervical fusions*. *Spine*, 16(7): 726-9.

**Zdeblick, T. A., Ghanayem, A. J., Rapoff, A. J., Swain, C., Bassett, T., Cooke, M. E. und Markel, M.** (1998): *Cervical interbody fusion cages. An animal model with and without bone morphogenetic protein*. *Spine*, 23(7): 758-65; discussion 766.

**Zdeblick, T. A., Wilson, D., Cooke, M. E., Kunz, D. N., McCabe, R., Ulm, M. J. und Vanderby, R.** (1992): *Anterior cervical discectomy and fusion. A comparison of techniques in an animal model*. *Spine*, 17(10 Suppl): S418-26.

**Zevgaridis, D., Thome, C. und Krauss, J. K.** (2002): *Prospective controlled study of rectangular titanium cage fusion compared with iliac crest autograft fusion in anterior cervical discectomy*. *Neurosurg Focus*, 12(1): E2.

**Zilch, H. und Lambiris, E.** (1986): *The sustained release of cefotaxim from a fibrin-cefotaxim compound in treatment of osteitis. Pharmacokinetic study and clinical results*. *Arch Orthop Trauma Surg*, 106(1): 36-41.

## 9 Anhang

### 9.1 Färbeprotokolle

Tabelle 29: Färbeprotokoll Movat-Pentachrom-Färbung

|   |                |
|---|----------------|
| 1. Entplasten in MEA<br>(Merck Schuchardt OHG, Hohenbrunn, Deutschland)   | 3 x 30 Minuten |
| 2. Absteigende Alkoholreihe:<br>100 %- Alkohol, 96 %-Alkohol, 80 %- Alkohol, 70 %- Alkohol<br>(Herbeta-Arzneimittel, Berlin, Deutschland)           | je 2 Minuten   |
| 3. Aqua dest.   | 2 Minuten      |
| 4. 1 % Alcianblaulösung<br>(8 GX, Sigma- Aldrich Chemie GmbH, Steinheim,<br>Deutschland)  | 10 Minuten     |
| 5. In Leitungswasser spülen   | 5 Minuten      |
| 6. Alkalischer Ethylalkohol<br>(10 ml 25 % Ammoniak (Merck, Darmstadt, Deutschland)<br>auf 180 ml 96 % Alkohol)                                     | 60 Minuten     |
| 7. In fließendem Leitungswasser spülen  | 10 Minuten     |
| 8. Aqua dest.   | 1x eintauchen  |
| 9. Weigerts Eisenhämatoxylin<br>(Eisenhämatoxylin A und B (Waldeck GmbH,<br>Dicision Chroma <sup>®</sup> , Münster, Deutschland) im Verhältnis 1:1) | 10 Minuten     |
| 10. In fließendem Leitungswasser spülen   | 15 Minuten     |
| 11. Waschen in Aqua dest.   | Kurz           |
| 12. Brillant Crocein- Säurefuchsin<br>(Brillantcrocein R, Waldeck GmbH, Dicision Chroma <sup>®</sup> ,<br>Münster, Deutschland)                     | 5 Minuten      |
| 13. Essigsäure 0,5 % (Merck DGaA, Darmstadt, Deutschland)   | kurz spülen    |
| 14. Phosphorwolframsäure 5 %<br>(Siegm Aldrich, Seelze, Deutschland)  | 20 Minuten     |
| 15. Essigsäure 0,5 % (darin bewegen)  | 2 Minuten      |
| 16. 3 x in 100 % Ethylalkohol spülen  |                |
| 17. 100 % Ethylalkohol  | 2 Minuten      |

- |   |               |
|---|---------------|
| 18. Entfetten in Xylol ( Mallinckrodt Baker BV., Deventer, Holland)   | 2 x 5 Minuten |
| 19. Eindecken mit Vitro-Clud® (R.Langenbrinck, Teningen, Deutschland) |               |

Tabelle 30: Färbeprotokoll kombinierte Safranin Orange/von Kossa-Färbung

- |  |                |
|--|----------------|
| 1. Entplasten in MEA   | 3 x 30 Minuten |
| 2. Absteigende Alkoholreihe:<br>100 %- Alkohol, 96 %-Alkohol, 80 %- Alkohol, 70 %- Alkohol | je 2 Minuten   |
| 3. Aqua dest.  | 2 Minuten      |
| 4. 3 % wässrige Silbernitratlösung<br>(Merck, Darmstadt, Deutschland)                      | 10 Minuten     |
| 5. 3 x spülen in Aqua dest.  |                |
| 6. Natriumcarbonat-Formaldehyd-Lösung  | 5 Minuten      |
| 7. In Leitungswasser wässern   | 10 Minuten     |
| 8. Natriumthiosulfat-Lösung 5 %<br>(Merck, Darmstadt, Deutschland)                         | 5 Minuten      |
| 9. In Leitungswasser wässern   | 10 Minuten     |
| 10. Aqua dest.   | 5 x eintauchen |
| 11. Safranin-O (Merck, Darmstadt, Deutschland)   | 8 Minuten      |
| 12. Aqua dest.   | 5 x eintauchen |
| 13. 96 % Alkohol   | 2 x 2 Minuten  |
| 14. 100 % Alkohol  | 2 x 2 Minuten  |
| 15. Entfetten in Xylol   | 2 x 5 Minuten  |
| 16. Eindecken mit Vitro-Clud®  |                |

Tabelle 31: Färbeprotokoll Toluidinblau-Färbung

- |  |                |
|--|----------------|
| 1. Entplasten in MEA   | 3 x 30 Minuten |
| 2. Absteigende Alkoholreihe:<br>100 %- Alkohol, 96 %-Alkohol, 80 %- Alkohol, 70 %- Alkohol | je 2 Minuten   |
| 3. Aqua dest.  | 2 Minuten      |
| 4. Toluidinblau O<br>(Waldeck GmbH, Dicsion Chroma®, Münster, Deutschland)                 | 5 Minuten      |
| 5. Aqua dest.  | Kurz           |

|                               |                |
|-------------------------------|----------------|
| 6. 70 % Alkohol               | differenzieren |
| 7. 100 % Alkohol              | 2 Minuten      |
| 8. 100 % Alkohol              | 2 Minuten      |
| 9. Entfetten in Xylol         | 2 x 5 Minuten  |
| 10. Eindecken mit Vitro-Clud® |                |

Tabelle 32: Trichromfärbung nach Masson-Goldner

|   |                |
|---|----------------|
| 1. Entplasten in MEA  | 3 x 30 Minuten |
| 2. Absteigende Alkoholreihe:<br>100 %- Alkohol, 96 %-Alkohol, 80 %- Alkohol, 70 %- Alkohol  | je 2 Minuten   |
| 3. Aqua dest.   | 2 Minuten      |
| 4. Weigerts Eisenhämatoxylin  | 2-4 Minuten    |
| 5. Leitungswasser   | 10 Minuten     |
| 6. Säurefuchsin-Ponceau<br>(Division Chroma®, Waldeck GmbH&CoKG, Münster,<br>Deutschland)   | 5 Minuten      |
| 7. Essigsäure 1 %   | abspülen       |
| 8. Differenzieren unter Sichtkontrolle in PMS-Orange-G<br>(Sigma- Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland)<br>(3-5g Phosphormolybdänsäure und 2g Orange-G in 100 ml a.d. lösen) | 5-15 Minuten   |
| 9. Essigsäure 1 %   | abspülen       |
| 10. Lichtgrün<br>(Division Chroma®, Waldeck GmbH&CoKG, Münster,<br>Deutschland; (1-2g Lichtgrün in 1000 ml a.d. lösen,<br>dann 2 ml Eisessig dazugeben)                             | 5-10 Minuten   |
| 11. Essigsäure 1 %  | abspülen       |
| 12. 100 % Alkohol   | kurz           |
| 13. 100 % Alkohol   | kurz           |
| 14. 100 % Alkohol   | kurz           |
| 15. Xylol   | 2x 5 Minuten   |
| 16. Eindecken mit Vitro-Clud®   |                |

Tabelle 33: Färbeprotokoll  $\alpha$ -sma-Färbung

|  |                |
|--|----------------|
| 1. Entparaffinieren in Xylol<br>(Mallinckrodt Baker BV., Deventer, Holland)  | 2 x 10 Minuten |
| 2. Rehydrieren absteigender Alkoholreihe:<br>2 x 100 %-, 96 %-I, 80 %- I, 70 %- Alkohol  | je 2 Minuten   |
| 3. Aqua dest.  | 2 Minuten      |
| 4. Spülen in Phosphatpuffer (pH-Wert 7,2) bestehend<br>aus 9 Teilen Aqua dest. und einem Teil Phosphatpuffer-<br>Lösung (Waldeck GmbH, Münster, Deutschland)   | 2 x 5 Minuten  |
| 5. Inkubation mit Normalserum bei Raumtemperatur<br>(Vektor <sup>®</sup> Laboratories, Burlingame, USA)  | 20 Minuten     |
| 6. Spülen in Phosphatpuffer  | 2 x 5 Minuten  |
| 7. Inkubation mit dem Primärantikörper (Biologo,<br>Kronshagen, Deutschland) bei 37°C  | 1 Stunde       |
| 8. Spülen in Phosphatpuffer  | 2 x 5 Minuten  |
| 9. Inkubation mit biotinyliertem und<br>enzymgekoppeltem (Alkalische Phosphatase)<br>Sekundärantikörper bei Raumtemperatur<br>(Vektor <sup>®</sup> Laboratories, Burlingame, USA)  | 30 Minuten     |
| 10. Spülen in Phosphatpuffer   | 2 x 5 Minuten  |
| 11. Inkubation mit Chromogenpuffer (pH-Wert: 8,3)  | 2 x 5 Minuten  |
| 12. Inkubation mit Alkalischer Phosphatase-Substrat<br>(Vektor <sup>®</sup> Red Alkaline Phosphatase Kit 1,<br>Burlingame, USA) unter Beobachtung der Farbreaktion<br>unter dem Mikroskop (Axioskop 2, Zeiss, Jena, Deutschland) | 2 - 4 Minuten  |
| 13. Abstoppen der Farbreaktion durch spülen in<br>Phosphatpuffer   | 2 x 5 Minuten  |
| 14. Kerngegenfärbung mit Hämalaun nach Mayer:  |                |
| a) Spülen in Aqua dest.  | kurz           |
| b) Hämalaun<br>(Hämalaunlösung, Merck, Darmstadt, Deutschland)   | 6 x eintauchen |
| c) Spülen in Aqua dest.  | kurz           |
| d) Spülen in Leitungswasser  | 2 Minuten      |
| e) Aufsteigende Alkoholreihe:<br>70 %- 80 %-, 96 %-, 2 x 100 %- Alkohol  | je 1 Minute    |
| 15. Entfetten in Xylol   | 2 x 5 Minuten  |

16. Eindecken mit Vitro-Clud®

Tabelle 34: Färbeprotokoll TRAP-Färbung

|   |                |
|---|----------------|
| 1. Entparaffinieren in Xylol  | 2 x 10 Minuten |
| 2. Rehydrieren absteigender Alkoholreihe:<br>2 x 100 %-, 96 %-, 80 %-, 70 %- Alkohol  | je 2 Minuten   |
| 3. Aqua dest.   | 2 Minuten      |
| 4. TRAP-Puffer pH 5,0<br>(3,28g Na-Acetat (Carl Roth GmbH&CoKG, Karlsruhe, Deutschland)<br>und 46,01g Na-Tartrat (Merck, Darmstadt, Deutschland) mit a. dest.<br>auf 1L auffüllen)  | 10 Minuten     |
| 5. TRAP-Färbelösung bei 37°C inkubieren<br>(200 ml TRAP-Puffer, 4 ml N, N-Dimethylformamid (Sigma- Aldrich Chemie GmbH,<br>Steinheim, Deutschland), 2 ml Triton X-100 (SIGMA ALDRICH CHEMIE GmbH,<br>Steinheim, Deutschland), 40 mg Naphthol AS-MIX-Phosphat (SIGMA ALDRICH<br>CHEMIE GmbH, Steinheim, Deutschland), 240 mg Fast Red Violet LB Salt (SIGMA<br>ALDRICH CHEMIE GmbH, Steinheim, Deutschland)) | 2 Stunden      |
| 6. Aqua dest.   | spülen         |
| 7. Kerngegenfärbung mit Hämalaun nach Mayer:  |                |
| f) Spülen in Aqua dest.   | kurz           |
| g) Hämalaun   | 6 x eintauchen |
| h) Spülen in Aqua dest.   | kurz           |
| i) Spülen in Leitungswasser   | 2 Minuten      |
| j) Aufsteigende Alkoholreihe:<br>70 %-, 80 %-, 96 %-, 2 x 100 %- Alkohol  | je 1 Minute    |
| 8. Entfetten in Xylol   | 2 x 5 Minuten  |
| 9. Eindecken mit Vitro- Clud®   |                |

## 10 Danksagung

Ich möchte Professor Dr. med. vet. Karl Dietrich Weyrauch für die Betreuung und Durchsicht meiner Doktorarbeit als Erstgutachter danken.

Ebenso danke ich Dr. med. vet. Anja Sterner-Kock für die Durchsicht meiner Doktorarbeit als Drittgutachterin.

Mein großer Dank gilt auch Prof. Dr.- Ing. G. Duda, an dessen Institut ich als wissenschaftliche Mitarbeiterin diese Arbeit erstellen durfte, für seine Unterstützung und Durchsicht der Arbeit als Zweitgutachter.

Ein herzliches Dankeschön an Dr. med. Robert Pflugmacher, der mir die Operationstechnik beibrachte und die Finanzierung meiner Arbeit ermöglichte sowie das selbständige Arbeiten.

Ebenso danke ich Silke Mark von Kuros Biosurgery, Switzerland für das Material und die Betreuung während dieser Studie.

Zu danken habe ich auch Dr. med. vet. Anja Peters für ihre Mühe bei der Durchsicht des Manuskripts und der Hilfe bei der histologischen Auswertung dieser Arbeit. Ebenso möchte ich mich bei Dr. med. vet. Hanna Schell und Dr. med. Patrick Strube für die Hilfe bei der Erstellung der Endfassung bedanken.

Meinem Bruder Philipp danke ich für die schnelle Korrektur des englischen Teils. Anna Kieslich, danke auch Dir dafür.

Bedanken möchte ich mich auch bei meinen Mitdoktoranden Sonja Dettmann, Christine Hanke, Cornelia Grewe, Philipp Mittmann und Moritz Giesecke für ihren großen Einsatz während des praktischen Teils. Ohne Euch wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen. Philipp danke ich besonders für die Unterstützung bei der Aufbereitung der histologischen Formaldehydproben und der Auszählung von Gefäßen und Osteoklasten. Gabriela Hardung, Marzenna Princ, Martin Wollny und vor allem Camilla Bergmann gilt mein Dank für die gute Atmosphäre und tatkräftige Hilfe im Labor. Philine Endres, vielen Dank für zahlreiche unterhaltsame Stunden im Labor und einer großartigen Hundebetreuung. Mario Thiele danke ich für das Schreiben des Makros für die Bildanalyse. Für die Hilfe bei Computerproblemen danke ich Roland Ilka und Steffen Wellsandt recht herzlich.

Ein kommunikatives Arbeitsklima und viel Spaß im Büro verdanke ich Friederike Bieler und Dr. med. vet. Hanna Schell.

Nicht zu vergessen war die gute Pflege und Unterstützung bei der Durchführung der Narkosen durch die Tierpfleger und Tierärzte der tierexperimentellen Einrichtung des Virchow Klinikums.

## Danksagung

---

Markus Hofmann danke ich für die Möglichkeit der praktischen Tätigkeit während der Erstellung dieser Arbeit.

Mein ganz besonderer Dank gilt meinen Eltern, Hannelore und Dieter, die immer an mich glaubten und mich stets sowohl moralisch als auch finanziell unterstützten.

Nicht zuletzt danke ich meinen Freunden, die auch in stressigen und arbeitsreichen Phasen für mich da waren und an das Gelingen dieser Arbeit glaubten.

## **11 Selbständigkeitserklärung**

Hiermit bestätige ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig angefertigt habe.

Ich versichere, dass ich ausschließlich die angegebenen Quellen und Hilfen in Anspruch genommen habe.

Berlin, den 02.11.2010

Anne-Marie Pobloth