



Auf der Suche nach dem optimalen Material

Möglichkeiten und Grenzen der Knochenheilung

Abb. 1: Mikroskopischer Ausschnitt einer Defektregion. Die Schnittdicke dieses unentkalkten Präparates beträgt lediglich $1\ \mu\text{m}$ und wurde mit dem 40er Objektiv aufgenommen. Der Knochen ist durch den Farbstoff Safranin rot gefärbt. Seine Oberflächen sind von knochenbildenden Zellen, den Osteoblasten, besetzt. Diese sind – wie auch die übrigen Zellen im Bildausschnitt – durch den Farbstoff Toluidinblau in unterschiedlichen Blautönen hervorgehoben. Die optisch leeren Räume repräsentieren die Lumina von neugebildeten Blutgefäßen.

Von Sabine Wenisch, Katja Trinkaus, Ursula Sommer, Anne Hild und Reinhard Schnettler

Operative Maßnahmen zur Behandlung von knöchernen Defekten müssen bei der Versorgung von Unfallverletzten, aber auch nach der Entfernung von Knochentumoren und -zysten tagtäglich in der Unfallchirurgie durchgeführt werden. Überschreitet das Ausmaß der Defekte eine kritische Größe, kann der Körper diesen Substanzverlust nicht mehr aus eigener Kraft regenerieren, was die statischen und dynamischen Skelettfunktionen beträchtlich einschränkt. Dies ist für die betroffenen Patienten mit weitreichenden Einbußen an Lebensqualität verknüpft. Daher ist es klinisch notwendig, knöcherne Substanzverluste ab einer bestimmten Größe mit einem Material zu ersetzen, das die körpereigenen Regenerationsmechanismen unterstützt, damit letztendlich die ursprüngliche Skelettarchitektur wiederhergestellt wird. Die Überprüfung der Gewebeerträglichkeit von neu entwickelten Knochenersatzmaterialien und die Charakterisierung der Mechanismen, die für ihren Abbau im Körper verantwortlich sind, bilden einen Forschungsschwerpunkt in der Experimentellen Unfallchirurgie der Universität Gießen.



Sabine Wenisch, Jahrgang 1962, studierte Veterinärmedizin in Gießen und arbeitete bis zu ihrer Habilitation über die Entwicklung und Zelldifferenzierung des zentralen Nervensystems am Institut für Veterinär-Anatomie. Seit 2001 leitet sie die Forschungsabteilung – das Labor für experimentelle Unfallchirurgie – der Klinik und Poliklinik für Unfallchirurgie in Gießen. Zu den aktuellen wissenschaftlichen Arbeitsgebieten zählen Knochenersatzstoffe, zellvermittelte Abwehr- und Regenerationsmechanismen nach Implantation von Biomaterialien sowie die Charakterisierung multipotenter Stammzellen.

Körpereigener Knochen gilt bis heute als der 'Goldene Standard' zur Auffüllung knöcherner Defekte, da er keine immunologischen Reaktionen hervorruft und infolge der raschen Versorgung mit Blutgefäßen zur schnellen knöchernen Regeneration der Defekte führt. In der Regel wird er aus dem Beckenkamm entnommen. Die Entnahme erfordert jedoch einen operativen Eingriff, der immer auch ein Risiko für den Patienten darstellt. Darüber hinaus können Schmerzen, Blutergüsse und Infektionen im Bereich der Entnahmestelle entstehen. Desweiteren steht zur Entnahme nur eine begrenzte Menge körpereigenen Knochens zur Verfügung. All diese Nachteile limitieren die Möglichkeit, Knochendefekte mit körpereigenem Material komplikationslos zu behandeln.

Alternativ kommen körperfremde, aber von derselben Spezies stammende, so genannte allogene

Knochentransplantate in Frage. Diese bergen jedoch das große Risiko, immunologische Reaktionen im Empfänger auszulösen. Auch kann die Übertragung von infektiösem Material, wie Hepatitisviren oder HIV, niemals sicher ausgeschlossen werden. Nicht zuletzt setzt die Beschaffung, Sterilisation und Lagerung von allogenem Knochen eine äußerst kostenintensive Infrastruktur voraus.

Neue Wege werden beschritten

Die Nachteile der Knochen transplantation unter Verwendung von autogenen und allogenem Knochen transplantaten begrenzen zweifelsohne die Möglichkeiten ihrer klinischen Anwendung und verdeutlichen den Bedarf an Knochenersatzmaterialien, die in unbegrenzten Mengen zur Verfügung stehen, deren Gewinnung keinen operativen Zweiteingriff erfordert und die im

Hinblick auf die Infektionsübertragung keine Risiken in sich bergen. Prinzipiell erfüllen synthetisch hergestellte, kommerziell erhältliche Ersatzstoffe zwar diese Anforderungskriterien, dennoch existiert bis heute noch kein Material, das darüber hinaus die regenerationsfördernde Potenz des körpereigenen Knochens aufweist. Daher läuft die Forschung auf der Suche nach dem optimalen Material auf Hochtouren.

Calcium-Phosphat-basierte Knochenersatzmaterialien

In der Experimentellen Unfallchirurgie der Universität Gießen konzentrieren sich die Forschungsarbeiten auf die Evaluation von Calcium-Phosphat-basierten Knochenersatzmaterialien, die sich in die beiden Gruppen der nicht abbaubaren und der abbaubaren Werkstoffe einteilen lassen. Häufig werden

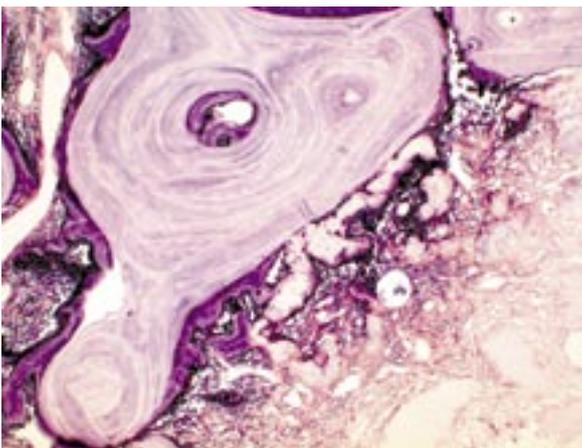


Abb. 2: Nachweis der Alkalischen Phosphatase im Randgebiet eines knöchernen Defektes, der zehn Tage zuvor mit einem Knochenersatzmaterial gefüllt wurde. Die Alkalische Phosphatase ist ein Enzym, das besonders von den knochenbildenden Zellen, den Osteoblasten, in hohem Maße gebildet wird. Ihr Nachweis spiegelt daher die Aktivität dieser Zellpopulation wider, lässt aber auch – wie in diesem Ausschnitt zu erkennen – sehr schön die Lamellenstruktur des Knochen in Erscheinung treten. Dieser mikroskopische Ausschnitt wurde mit dem 10er Objektiv fotografiert.

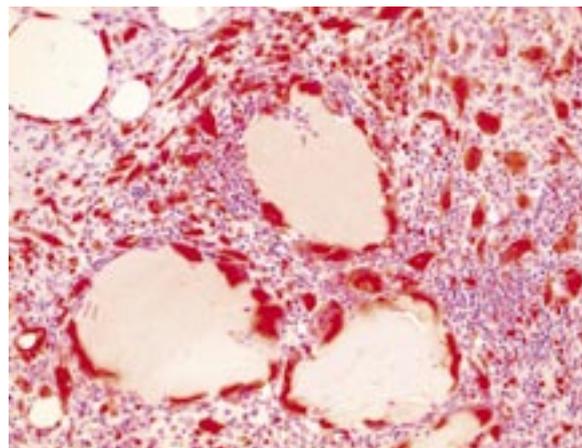


Abb. 3: Resorbierbare Knochenersatzstoffe werden von körpereigenen Zellen abgebaut. Diese sind in diesem mikroskopischen Ausschnitt einer Defektregion orange-braun dargestellt. Bei den hellen, rundlich bis oval geformten Partikeln handelt es sich um den Knochenersatzstoff, der 20 Tage zuvor in den Defekt implantiert wurde. Die färbereiche Darstellung der Zellen beruht auf dem spezifischen Nachweis eines Proteins, das im Zytoplasma der implantatabbauenden Zellen lokalisiert ist. Die Abbildung wurde mit dem 20er Objektiv angefertigt.



Katja Trinkaus, Jahrgang 1963, studierte von 1984 bis 1990 Veterinärmedizin an den Universitäten Parma, München und Gießen. Sie promovierte am Institut für Geflügelkrankheiten, wo sie als wissenschaftliche Mitarbeiterin tätig war. 1998 erwarb sie die Anerkennung als Fachtierärztin für Wirtschafts-, Wild- und Ziergeflügel. Seit 2001 arbeitet sie im Labor für experimentelle Unfallchirurgie. Hier ist sie für die Planung und Ausführung der Zellkulturexperimente verantwortlich.

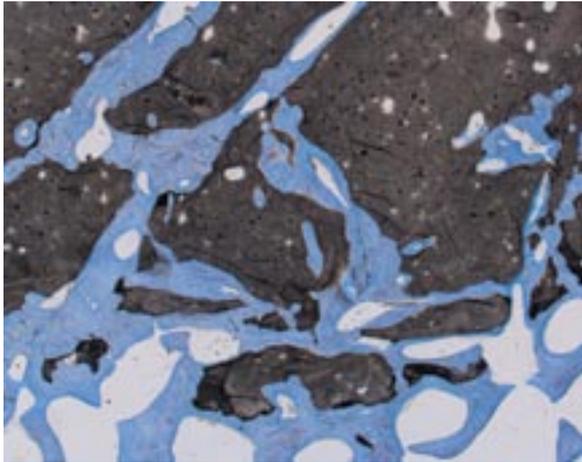


Abb. 4: Diese mikroskopische Darstellung zeigt einen knöchernen Defekt 20 Tage nach der Implantation eines Knochenersatzstoffes. Die Herstellung des Präparates beruht auf einer Sägetechnik, die speziell dazu entwickelt wurde, sehr hartes Gewebe – wie unentkalkten Knochen – für die Diagnostik zu bearbeiten. Während das Knochenersatzmaterial als braune Struktur zu erkennen ist, stellt sich der Knochen blau dar. Aufnahme mit dem 2,5er Objektiv.

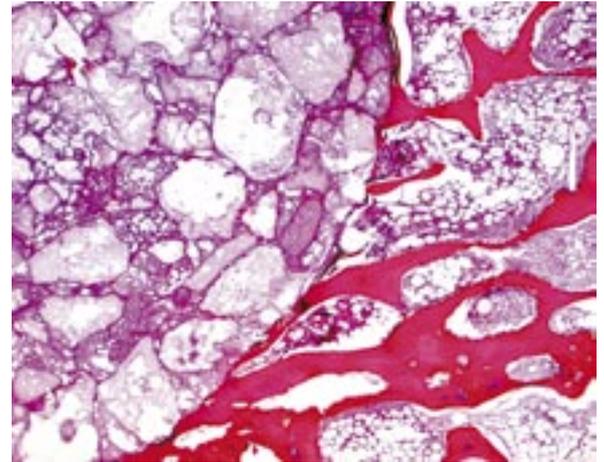


Abb. 5: Diese mikroskopische Aufnahme (mit dem 2,5er Objektiv) zeigt den Ausschnitt aus einer Defektregion, die zehn Tage zuvor mit einem Knochenersatzmaterial gefüllt wurde. Der Defekt wird von intakten Knochenbälkchen umgeben, die sich nach entsprechender Anfärbung intensiv rot hervorheben.

diese Ersatzstoffe auch als ‚Biomaterialien‘ bezeichnet – ein Begriff, der auf ihre chemischen und physikalischen Eigenschaften verweist, die der anorganischen Phase des natürlichen Knochens sehr stark ähneln. Biomaterialien sind somit als eine ‚Mimikry‘ des Knochens zu betrachten. Sie werden nach Implantation in knöcherne Defekte vom

Empfänger nicht nur immunologisch toleriert, sondern weisen auch eine dauerhafte Gewebeverträglichkeit auf.

Nicht-abbaubare Materialien werden in der Regel als poröse Festkörper in die Defekte implantiert. Vom dreidimensionalen Aufbau her gleichen sie einem Schwamm, wobei das Porennetz-

werk dem neu gebildeten Knochen als räumliche Leitstruktur dient. Wie die eigenen Untersuchungen immer wieder zeigen, ist der innige Kontakt zwischen dem Wirtsknochen und dem implantierten Werkstoff sowie dessen feste Verankerung im Implantationsbett für den erfolgreichen Ein- und Durchbau von Knochenersatzstoffen von gro-

Das Labor für Experimentelle Unfallchirurgie in Gießen

Das Labor für Experimentelle Unfallchirurgie, das von Professor Schnettler im Jahre 1995 gegründet wurde, befindet sich im so genannten Europaviertel in Gießen, nur wenige Autominuten vom Universitätsklinikum entfernt. Die Gesamtfläche der deutschlandweit einzigartigen unfallchirurgischen Forschungseinrichtung dieser Art umfasst 300 qm. Mehrere Laborräume bieten zehn wissenschaftlichen und technischen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des Labors, zahlreichen Doktoranden sowie Habilitanden die Möglichkeit, wissenschaftlich zu arbeiten. Finanzielle Basis für die umfangreiche apparative und personelle Ausstattung bilden Drittmittel-geförderte Forschungsprojekte, die auch künftig die Anpassung an den internationalen Forschungsstandard ermöglichen sollen.

Die Forschungsschwerpunkte des Labors konzentrieren sich auf das Skelettsystem und damit auf ein Gewebe, das sich aufgrund seiner Härte nur sehr schwer bearbeiten lässt. Daher war es erforderlich, eine auf Hartgewebe spezialisierte apparative Ausrüstung anzuschaffen, die es ermöglicht, mikroskopische Präparate bis zu einer Dicke von 1 µm aus unentkalktem Knochen einschließlich der darin verankerten Implantate anzufertigen.

Neben dem Labor für Hartgewebepathologie stehen mehrere Arbeitsflächen und Räume für die enzym-, immunochemische (Western Blot, Immunhistochemie), molekularbiologische und elektronenmikroskopische Probenaufbereitung zur Verfügung. Da zahlreiche Forschungsarbeiten auch auf in vitro-Experimenten basieren, verfügt die Einrichtung außerdem über ein Zellkulturlabor.



Ursula Sommer, Jahrgang 1962, studierte von 1982 bis 1988 Veterinärmedizin an der Justus-Liebig-Universität Gießen. Sie promovierte am Institut für Veterinär-Anatomie, -Histologie und -Embryologie, wo sie im Bereich des Verdauungstraktes von Rind und Pferd ultrastrukturell und immunhistochemisch forschte. 1999 erwarb sie sich die Anerkennung als Fachärztin für Anatomie. Seit Juli 2005 ist als wissenschaftliche Mitarbeiterin im Labor für experimentelle Unfallchirurgie der Klinik und Poliklinik beschäftigt.

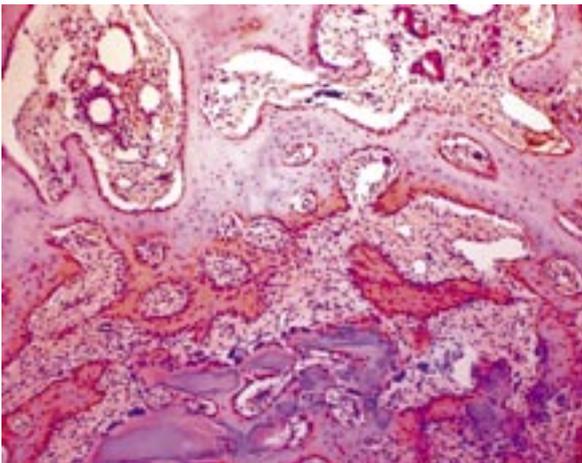


Abb. 6: Im mikroskopischen Bild unter dem 10er Objektiv verzweigen sich die Knochenbälkchen unregelmäßig und gehen in die Defektregion über, die 20 Tage zuvor mit einem nanopartikeläres Knochensatzmaterial gefüllt wurde. Dieses ist in Gestalt blau gefärbter Partikel am unteren Bildrand zu erkennen. Prinzipiell ist der neugebildete Knochen orange-braun angefärbt. Die Zellkerne der gesamten Region sind durch den Gebrauch eines Kernfarbstoffes als blaue, meist rundliche Gebilde hervorgehoben.

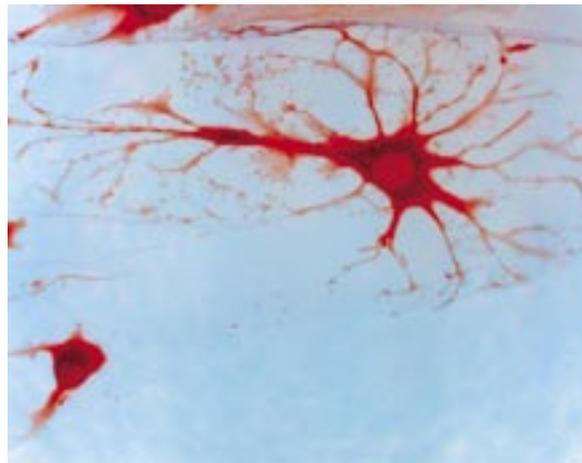


Abb. 7: Eine mesenchymale Stammzelle wurde zunächst aus dem unfallchirurgischen Abfallprodukt 'Bohrmehl' isoliert und anschließend in einem speziellen Differenzierungsmedium inkubiert. Das Ergebnis der Inkubation zeigt eine Zelle mit nervenzellähnlichem Erscheinungsbild. Die dunkle Färbung der 'Nervenzelle' beruht auf dem Nachweis eines spezifischen Proteins. Die Aufnahme erfolgte mit dem 40er Objektiv.

ßer Bedeutung. Dies setzt eine ideale Passform des Implantates bei der biologischen Verankerung voraus.

Nachteile der nicht-abbaubaren Implantate sind biomechanischer Natur und treten mit zunehmender knöcherner Konsolidierung auf. So wird der implantierte Formkörper zwar von neu gebildetem Knochengewebe vollkommen eingeschlossen, dennoch ist er nicht an den stetig ablaufenden, natürlichen Prozessen des Knochenauf- und -abbaus beteiligt. Dadurch passt er sich nicht den statischen und dynamischen Kräften des heilenden Knochens an.

Biologisch abbaubare Knochenimplantate

Biologisch abbaubare Implantate besitzen dagegen einen ganz entscheidenden Vorteil: Im Zuge des Heilungsverlaufes werden sie von körpereigenen Zellen abgebaut und durch neugebildeten Knochen ersetzt, so dass die ursprüngliche Skelettarchitektur in Anpassung an die mechanischen Erfordernisse des Knochens ungehindert wieder-

hergestellt wird. Dies setzt jedoch ein zeitlich genau abgestimmtes Verhältnis von Implantatabbau und Knochenneubildung voraus. Idealerweise muss der Abbau mit der selben Geschwindigkeit erfolgen wie neuer Knochen aufgebaut wird. Schlimmstenfalls schreitet der Implantatabbau der Knochenformation so schnell voran, dass keine knöcherne Durchbauung erfolgen kann.

Unfallchirurgie auf zellulärer Ebene

Wie unsere Untersuchungen gezeigt haben, entscheiden die Materialeigenschaften eines abbaubaren Implantates ganz wesentlich über das weitere Schicksal eines Knochendefektes. Dabei spielen nicht nur physikalische und chemische Parameter eine Rolle, sondern auch Oberflächeneigenschaften der Werkstoffe, mit ihrer Kapazität verschiedene körpereigene Proteine aufzunehmen. Die große Bedeutung der Materialeigenschaften spiegelt sich vor allem in der Rekrutierung von unterschiedlichen Zellpopulationen zur Implantatoberfläche wider.

Die genaue Charakterisierung der Zellen am Implantationsort ist ein weiterer Forschungsschwerpunkt in der Experimentellen Unfallchirurgie. Allem voran muss sichergestellt werden, dass Entzündungszellen in qualitativer und quantitativer Hinsicht niemals das naturgemäße Ausmaß einer Entzündungsreaktion überschreiten. Überschießende Entzündungen können zu bindegewebiger Einkapselung des implantierten Materials führen, was nicht nur der Stabilität der Implantate schadet, sondern auch das knöcherne Einwachsen in den Defekt verzögert oder schlimmstenfalls sogar verhindert. Mäßige Entzündungsreaktionen sind dagegen

JUSTUS-LIEBIG-
UNIVERSITÄT
GIESSEN

Prof. Dr. Dr. Reinhard Schnettler
Priv.-Doz. Dr. Sabine Wenisch

Labor für experimentelle Unfallchirurgie
Kerkrader Str. 9
35394 Gießen
Telefon: 0641/4994-160
E-Mail: Sabine.Wenisch@chiru.med.uni-giessen.de



Anne Hild, Jahrgang 1950, ist seit dem Jahr 2000 im Rahmen einer halben Stelle als Technische Assistentin im Labor für experimentelle Unfallchirurgie tätig. Darüber hinaus nimmt sie seit 1970 labortechnische Aufgaben am Institut für Veterinär-Anatomie in Gießen wahr. Sie ist durch die Ausübung verschiedener mikroskopischer Präparationstechniken, immunochemischer und molekularbiologischer Methoden sowie der technischen Bilddokumentation in umfangreiche Forschungsprojekte involviert.

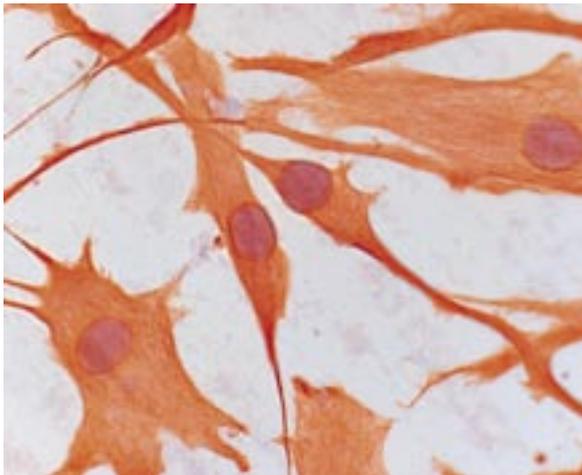


Abb. 8: Aus dem unfallchirurgischen Abfallprodukt 'Bohrmehl' isolierte mesenchymale Stammzellen in der Kultur. Die bräunliche Färbung der Zellen ist durch den Nachweis eines spezifischen Proteins hervorgerufen. Die Aufnahme erfolgte mit dem 100er Objektiv.

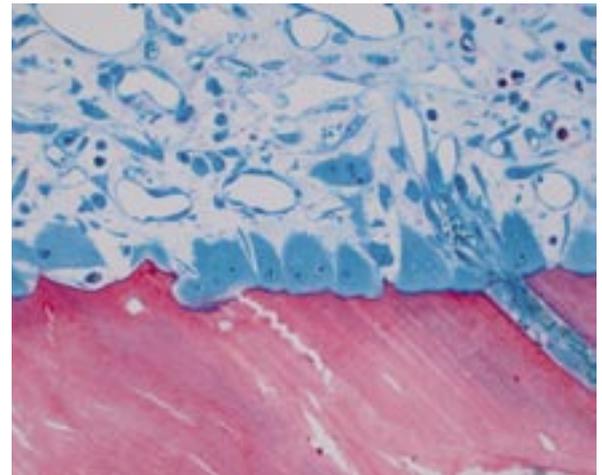


Abb. 9: Osteoklasten sind mehrkernige, für den Abbau des Knochens verantwortliche Zellen. In dieser mikroskopischen Darstellung mit Hilfe des 40er Objektivs reihen sie sich nebeneinander, entlang der Oberfläche des Knochens auf. Dieser ist durch den Farbstoff Safranin rot dargestellt.

eine lokale Schutzmaßnahme des Empfängers und vollziehen sich im Zuge der phylogenetisch hoch konservierten Schutzmaßnahmen der Wirbeltiere. Sie fördern die Knochenheilung, indem die Entzündungszellen lösliche Faktoren in die Umgebung abgeben, welche wiederum Zellen anlocken und aktivieren, die für den Gewebeaufbau verantwortlich sind. Dazu gehören die knochenbildenden Zellen, die Osteoblasten, aber auch deren Vorstufen, die Präosteoblasten, die wiederum aus mesenchymalen Stammzellen hervorgehen, aber auch Zellen, die sich am Aufbau neuer Blutgefäße in der Defektregion beteiligen.

Das Lichtmikroskop allein reicht nicht aus, um die Palette der genannten Zellen zu identifizieren. Hierzu bedarf es weiterführender Methoden der Proteinchemie und Molekularbiologie, die häufig durch ultrastrukturelle Untersuchungen ergänzt werden müssen, um die Befunde zu sichern.

Neue Strategien zur Optimierung der implantatgestützten Knochenheilung

In den letzten Jahren belegten grundlagenwissenschaftliche Unter-

suchungen unserer und anderer Arbeitsgruppen den heilungsfördernden Einfluss bestimmter löslicher Faktoren am Implantationsort. Aufgrund ihrer Wirkung werden diese Faktoren ganz allgemein als Wachstumsfaktoren bezeichnet. Sie werden im Zuge des natürlichen Heilungsverlaufes von Zellen gebildet, die nach der Implantation eines Werkstoffes in die Defektregion einwandern. Die Basis dieses Erkenntnis ermöglicht die Entwicklung neuer Therapien, die das Ziel haben, die Knochenneubildung am Implantationsort selektiv zu stimulieren. So konnten wir im Tierexperiment nachweisen, dass die Oberflächenbeschichtung von Implantaten mit einzelnen synthetisch hergestellten Wachstumsfaktoren, aber auch mit Gemischen verschiedener Wachstumsfaktoren, die aus dem Eigenblut gewonnen wurden, die Knochenheilung deutlich beschleunigt.

Neben löslichen Faktoren sind aber auch bestimmte Zellen in der Lage, die Knochenheilung zu forcieren. In dieser Hinsicht bergen – normalerweise im Knochenmark vorkommende – mesenchymale Stammzellen ein hohes therapeutisches Potenzial. Diese befinden sich nämlich in einem Differenzie-

rungsstadium, welches den Zellen gestattet, sich unter entsprechenden Umgebungsbedingungen in knochenbildende Zellen, Fettzellen oder in Knorpelzellen zu verwandeln. Prinzipiell ist also davon auszugehen, dass eine erhöhte Zahl von mesenchymalen Stammzellen im Bereich eines knöchernen Defektes dessen Regenerationskapazität deutlich verbessert, da sich die Zellen vor Ort in knochenbildende Zellen umwandeln können. Galt diese Schlussfolgerung lange Zeit nur als ein vielversprechendes Gedankenmodell, bewährten sorgfältige tierexperimentelle Untersuchungen in jüngster Zeit die regenerationsfördernde Wirkung von mesenchymalen Stammzellen, die operativ in knöchernen Defekte eingebracht wurden.

Mesenchymale Stammzellen werden normalerweise aus dem Knochenmark isoliert. Daher erfordert ihre Gewinnung – neben dem eigentlichen operativen Eingriff im Zuge der Defektbehandlung – eine zweite operative Maßnahme, die für den Patienten wieder mit allen potenziellen Komplikationen und Risiken behaftet ist. Um invasive Verfahren bei der Stammzellgewinnung künftig vermeiden zu können, wird zur Zeit weltweit inten-



Reinhard Schnettler, Jahrgang 1945, studierte von 1974 bis 1980 Humanmedizin an der Universität Frankfurt. Nach der Habilitation folgte er dem Ruf nach Gießen und ist seit 1995 Direktor der Klinik und Poliklinik für Unfallchirurgie am Fachbereich Medizin der Universität Gießen. Neben seinen arbeits- und zeitintensiven Verpflichtungen in Klinik und Lehre sowie im Rahmen von DFG-Gutachtertätigkeiten widmet er sich zusätzlich mit großem Engagement der Forschung. Wirkungsstätte ist das von ihm gegründete Labor für experimentelle Unfallchirurgie, wo sich die wissenschaftlichen Arbeitsgebiete auf die Themen Knochenersatzstoffe, Knorpeltransplantate, Knochenklebstoffe und Stammzellen fokussieren.

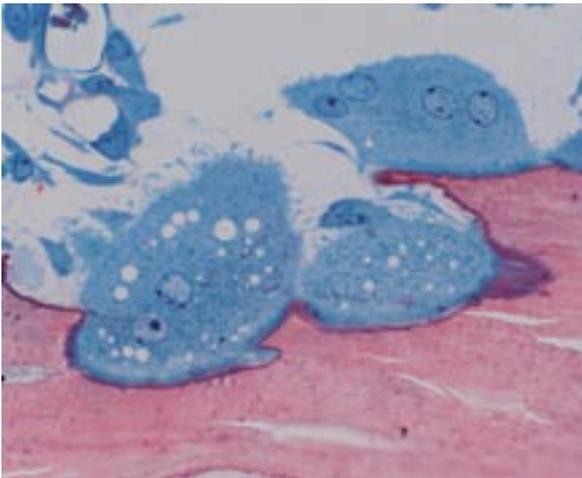


Abb. 10: Osteoklasten sind in dieser mikroskopischen Darstellung mit Hilfe des 100er Objektivs dargestellt.

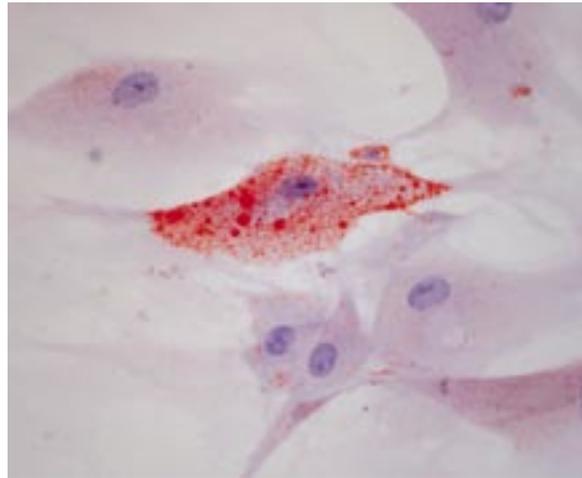


Abb. 11: Mesenchymale Stammzellen, die zunächst aus dem unfallchirurgischen Abfallprodukt 'Bohrmehl' isoliert wurden. Anschließend wurden sie in einem spezifischen Fettzell-Differenzierungsmedium inkubiert, in dem sie das Erscheinungsbild von Fettzellen angenommen haben. Die Fettvakuolen der Fettzelle in dieser Abbildung sind durch den Farbstoff Sudan III orange dargestellt und mit dem 40er Objektiv fotografiert.

siv nach alternativen Vorkommen von mesenchymalen Stammzellen geforscht.

Vielversprechender Ausblick

Unserer Arbeitsgruppe gelang es vor kurzem, mesenchymale Stammzellen aus winzigen Knochensplittern zu isolieren und in ausreichenden Mengen in der Zellkultur zu vermehren. Das Besondere an diesem Vorkommen ist, dass die Knochensplitter normalerweise ein ‚unfallchirurgisches Abfallprodukt‘ darstellen, dem in einer Vielzahl wissenschaftlicher Publikationen jeglicher therapeutischer Nutzen abgesprochen wurde. Mittels sorgfältiger Zellkulturexperimente und anschließender Zellcharakterisierung konnten wir das hohe Umwandlungspotenzial der Zellen belegen, die sich in der Kultur nicht nur in fett-, knochen- und knorpelbildende Zellen, sondern sogar in Nervenzellen umwandeln ließen. Diese neuesten Befunde der unfallchirurgischen Forschung bestärken die Hoffnung, bislang schlecht heilende Defekte – vor allem bei älteren und osteoporotischen Patienten – künftig erfolgreich behandeln zu können. •

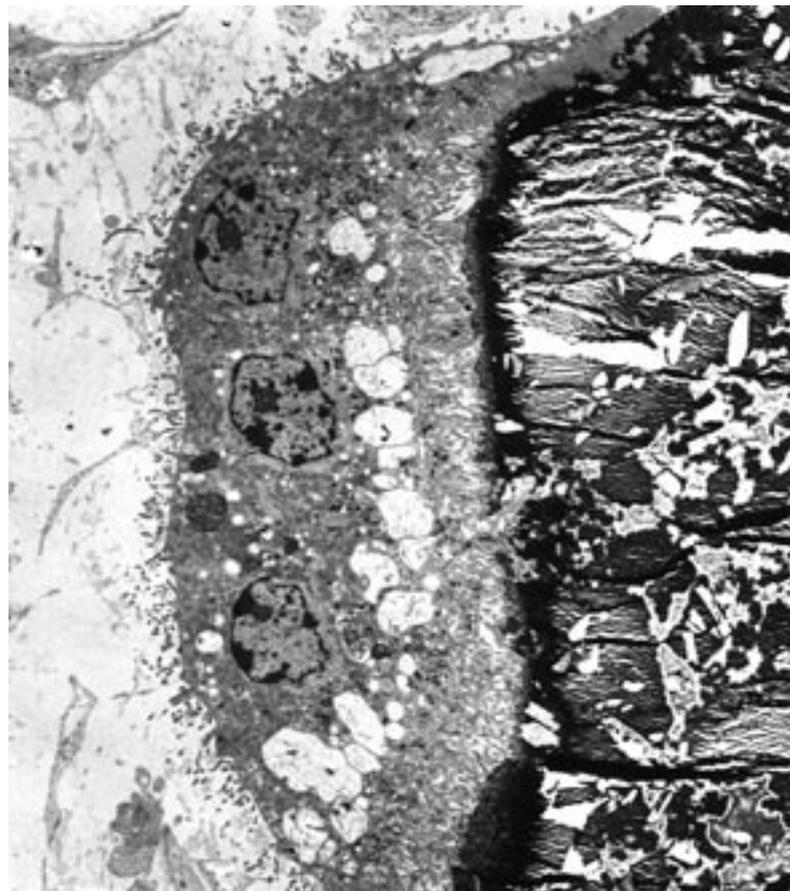


Abb. 12: Mit Hilfe des Transmissionselektronenmikroskopes angefertigte Darstellung einer kochenabbauenden Zelle. In dieser Abbildung haftet die mehrkernige Zelle dem resorbierbaren Implantat an, das sechs Wochen zuvor in den knöchernen Defekt implantiert wurde. Aufgrund seiner hohen Elektronendichte erscheint das Implantat als schwarze Struktur (Vergrößerung: 5763-fach).