Einfluss von Ostim® kombiniert mit autologen

thrombozytären Wachstumsfaktoren

Olaf Kilian¹, Sabine Wenisch², Christian Heiss¹, Uwe Horas¹, Elvira Dingeldein³, Reinhard Schnettler¹

Schlagworte:

Wachstumsfaktoren –
Knochendefektheilung
– Knochenersatz-
material

Die Wirkung autologer thrombozytärer Wachstumsfaktoren in Kombination mit einer biodegradierbaren, osteokonduktiven Matrix (Ostim®) wurde in der Frühphase der Knochendefektheilung untersucht. Dazu wurden zwei Hausschweine bifemoral wie folgt operiert: Zwei Knochendefekte wurden in der Interkondylärregion des femoropatellaren Gleitlagers mit dem DBCS-System (Diamond Bone Cutting System, Durchmesser 7 mm, Tiefe 20 mm) gesetzt und mit Hydroxylapatit (Ostim®) bzw. mit Hydroxylapatit (Ostim®) in Kombination mit Wachstumsfaktoren aufgefüllt. Bereits zehn Tage post operationem entwickelten sich unter dem Einfluss der applizierten Wachstumsfaktoren zahlreiche Blutgefäße innerhalb des Defektes. Darüber hinaus waren die zellvermittelten Abbauprozesse im Unterschied zu Ostim® ohne Zugabe Wachstumsfaktoren deutlich vorangeschritten und im zellreichen Granulationsgewebe verteilten sich bereits unregelmäßig gestaltete, osteoblastenhaltige Knocheninseln. Auch nach Ablauf der 20-tägigen Versuchsdauer blieben diese Unterschiede bestehen. Wie die vorliegenden Ergebnisse gezeigt haben, beschleunigen die thrombozytären Wachstumsfaktoren das Regenerationsgeschehen im Zuge der Knochendefektheilung.

Einleitung

In der Unfallchirurgie und der orthopädischen Chirurgie ist der Einsatz von Biomaterialien zur Unterstützung der Knochendefektheilung eine schonende Alternative zur autogenen Spongiosatransplantation. Indikationen für die Verwendung von Knochenersatzmaterialien biologischer oder synthetischer Herkunft sind vor allem Kompressionsfrakturen und zystische Knochentumoren, die zu Spontanfrakturen neigen. Die Materialeigenschaften orientieren sich vor dem Hintergrund einer adäquaten Knochendefektregeneration an der Zusammensetzung des natürlichen Knochens, denn die Implantate sollen die Knochenbildung stimulieren sowie im Verlauf der Regeneration allmählich abgebaut und durch körpereigenen Knochen ersetzt werden. Dieses hohe und spezifisch definierte Anforderungsprofil basiert auf der Kenntnis biologischer Heilungsabläufe, die in vivo komplexe zelluläre Reaktionskaskaden umfassen – angefangen bei der Entzündungsphase, über die Proliferationsphase bis hin zur Reifungsphase [5]. So initiiert die Zerstörung der Knochenintegrität einen Regenerationsprozess, der insbesondere durch Wachstumsfaktoren vermittelt und reguliert wird. Infolge frakturbedingter Verletzungen von Blutgefäßwänden bilden zirkulierende Thrombozyten Fibrinkoagula und entlassen zahlreiche Wachstumsfaktoren und Cytokine wie PDGF (Platelet derived growth factor),

VEGF (Vascular endothelial growth factor), FGF (Fibroblast growth factor) und TGFβ (Transforming growth factor β). Gemeinsam kontrollieren diese Faktoren die Rekrutierung, Proliferation und Differenzierung von Zellen, welche in den Entzündungsprozess, die Bildung von Granulationsgewebe, die Matrixsynthese und die Angiogenese involviert sind [2].

Die Angiogenese nimmt nach heutigem Kenntnisstand eine Schlüsselrolle im Frakturgeschehen ein. Sie koinzidiert zeitlich und räumlich mit der Bildung des Granulationsgewebes, indem in Abhängigkeit thrombozytärer Wachstumsfaktoren Fibroblasten, Endothel- und Mesenchymzellen zum Entzündungsort rekrutiert werden. Proliferation und Differenzierung dieser heterogenen Zellpopulationen gewährleisten die Wiederherstellung der Blutgefäßversorgung sowie die knöcherne Konsolidierung und Integration. VEGF ist der entscheidende Mediator der Angiogenese [3]. Endothelzellen exprimieren die VEGF-Rezeptoren-1 und 2, die nach Ligandenbindung die Proliferation und Matrixsynthese induzieren. Darüber hinaus verweisen immunhistochemische Untersuchungen auf das Osteoklasten-assoziierte Vorkommen der VEGF-Rezeptoren. Das Ergebnis der Rezeptor-Liganden Interaktion ist die Stimulation der Osteoklastengnese [4].

Der kontinuierliche Abbau von mineralisiertem Gewebe ist auf funktioneller Ebene eng mit der Differenzierung und resorptiven Aktivität der Osteoklasten verknüpft. Er ist nicht nur eine notwendige Voraussetzung für die Knochenneubildung während der Morphogenese und des Wachstums, son-

¹ Klinik und Poliklinik für Unfallchirurgie, Justus-Liebig-Universität Gießen

² Labor für experimentelle Unfallchirurgie, Justus-Liebig-Universität Gießen

³ Osartis GmbH & Co KG, 63784 Oberrung

Abb. 1: Transmissionselektronenmikroskopische Übersicht von zwei mehrkernigen Makrophagen, die 10 Tage post operationem in den Ostim®-Abbau involviert sind.

a) Ostimpartikel (O) im Zytoplasma eines Makrophagen nach lokaler Applikation von Wachstumsfaktoren. Die Organellen sind durch den großen Durchmesser des Konglomerats auf einen schmalen Plasmasaum der Zellperipherie zurückgedrängt. Im Extrazellularraum sind Kollagen-

fasern in unterschiedlichen Schnittebenen zu erkennen. N = Nukleus. 8892x.

b) Typischer Repräsentant einer mehrkernigen Riesenzelle, die innerhalb des Granulationsgewebes zwischen den Ostimfragmenten lokalisiert ist. Intrazytoplasmatisch liegen Ostim-Inklusionen (O) variierender Elektrodendichte. Diese beruht möglicherweise auf unterschiedlichen Funktionsstadien des Zellverdaues. 3952x.

dern auch nach Implantation biodegradierbarer Matrices, denn nur die Balance zwischen Osteoklasten-vermitteltem Implantatabbau und Osteoblasten-vermitteltem Knochenaufbau gewährleistet die physiologische Substitution eines Knochenersatzmaterials durch körpereigenen Knochen.

Vor dem Hintergrund der Erkenntnis über die zentrale Rolle der Wachstumsfaktoren im Zuge der Knochendefektheilung wurde im Tiermodell eine biodegradierbare Matrix (Ostim®) mit autologen thrombozytären Wachstumsfaktoren kombiniert. Es war Ziel des experimentellen Verfahrens den Heilungsverlauf selektiv während der Proliferationsphase durch Stimulation der Angio- und Osteogenese zu beschleunigen.

Material und Methoden

Für die Pilotstudie wurden im Rahmen eines genehmigten Tierversuches zwei Hausschweine (Tier 1: 34,2 kg, Tier 2: 36,2 kg) im Forschungszentrum für Medizintechnik und Biotechnologie e. V. Bad Langensalza operiert.

Zur Gewinnung der autologen thrombozytären Wachstumsfaktoren wurden jedem Tier durch zentralnervöse Punktion zirka 150 ml Vollblut in einen handelsüblichen Vollblutbeutel abgenommen. Durch Zentrifugation konnte das plättchenreiche Plasma (PRP) gewonnen werden, wobei der Thrombozytengehalt 31200/l betrug. Anschließend erfolgte die Zugabe von 500 IE humanem Thrombin und 5 ml Calciumglukonat. Nach vollständiger Thrombozytenagglutination bei Raumtemperatur wurde der flüssige Überstand abpipettiert und bei -20 °C eingefroren. Der ELISA-Test (RnD-System) ergab den Nachweis folgender Wachstumsfaktoren: PDGF, TGF β , bFGF, VEGF, IGF (Insulin-like growth factor).

Operationstechnik

Vor der Intubation und der Inhalationsnarkose wurde beiden Tieren Ketamin (2,0 ml/kgKG), Stresnil (0,5 ml/kgKG) und Atropin verabreicht. Darüberhinaus erfolgte die perioperative Gabe von 1 g Gentamycin i. v. und 200 mg Gentamycin i. m. Nach Rückenlagerung der Tiere, mehrfacher

Hautdesinfektion, sterilem bifemoralem Abdecken und einem mediopatellaren, 4 cm langen Hautschnitt schloss sich die Präparation des Musculus vastus medialis, die Darstellung des medialen Retinaculum extensorum, dessen Incision sowie die Eröffnung der Gelenkkapsel und die Luxation der Patella nach lateral an. Das DBCS-System (Diamond Bone Cutting Sytem, Fa. Merck) diente dem Setzen eines Knochendefektes (Durchmesser 7 mm, Tiefe 20 mm) in der proximalen Interkondylärregion. Nach Entfernen des Knochenzylinders mit dem Extraktor wurde 2 cm distal ein zweiter Zylinder in gleicher Vorgehensweise entnommen. Der proximale Defekt wurde mit Ostim plus Wachstumsfaktoren in einem Mischverhältnis 10:1, der distale Defekt dagegen nur mit Ostim aufgefüllt. Im Anschluss erfolgte der Defektverschluss mit Hilfe eines Zementdeckels.

Nach Wundverschluss und Operation der kontralateralen Interkondylarregion in entsprechender Weise, belasteten die Tiere nach der Aufwachphase beide Hintergliedmaßen.

Nach zehn Tagen wurde das erste Schwein, nach 20 Tagen das zweite Schwein mit T61 euthanasiert. Bei beiden Tieren dienten die Stanzdefekte des linken Knies nach ihrer Entnahme zur Lagerung bei -80 °C. Zur Fixation in Vorbereitung für die licht- und immunhistochemischen Untersuchungen standen Karnowski-Lösung und 4%iges Paraformaldehyd zur Verfügung. Zur Gewährleistung einer adäquaten Fixierung der Proben für die Transmissionselektronenmikroskopie erfolgte die Perfusionsfixierung der rechten Hintergliedmaßen mittels 4% Paraformaldehyd und 2% Glutaraldehyd über die Arteria femoralis.

Fixierung und Präparation für die Transmissionselektronenmikroskopie

Der Perfusionsfixierung schloss sich nach Probenentnahme die Nachfixierung für 24 Stunden bei 4 °C in Yellow Fix (4% Paraformaldehyd, 2% Glutaraldehyd, 0,04 % Pikrinsäure) an. Nach mehrmaligem, gründlichen Spülen in 0,1 M Phosphatpuffer (pH 7,2) fixierten die Proben für zwei weite-

Abb. 2: Ausschnitt eines Osteoklasten, der enge räumliche Beziehung zu einem Ostimfragment (O) aufnimmt - 10 Tage post operationem nach lokaler Applikation von Wachstumsfaktoren. Typischerweise handelt es sich um eine polarisierte Zelle, die apikale Membranınvaginationen (→) aufweist. Vertreter dieses implantatassoziierten Zelltypes reagieren stets saure Phosphatase-positiv. Intrazytoplasmatisch sind zahlreiche Lysosomen (▼) und Mitochondrien zu identifizieren. N = Nukleus. 6348x.

re Stunden in 1% Osmiumsäure (OsO_4). Danach wurden sie wiederholt in 0,1 M Phosphatpuffer gewaschen und in der aufsteigenden Alkoholreihe dehydriert. Epon (Serva, Heidelberg, Deutschland) diente als Einbettungsmedium. Die anschließende Polymerisation erfolgte bei 60 °C für 20 Stunden. Die Ultradünnschnitte (800 nm) wurden mit einem Diamantmesser (450, Diatome, Schweiz) am Ultracut (Reichert-Jung, Deutschland) angefertigt, anschließend mit Uranylacetat und Bleizitrat nachkontrastiert und am Zeiss EM 109 untersucht. Zusätzlich fanden mit Richardson (1% Methylblau, 1% Borax, 1%, Azur II) gefärbte Semidünnschnitte (1 µm) Eingang in die Untersuchung.

Ergebnisse

Bereits zehn Tage post operationem hatte sich bei beiden Tieren innerhalb der proximalen und distalen Defektregion zellreiches Granulationsgewebe ausgebildet, welches in Abhängigkeit von der Implantatzusammensetzung unterschiedliche Morphologien aufzeigte. So war die Vaskularisation und der zellvermittelte Abbau innerhalb der Defekte, die mit Wachstumsfaktoren angereichertem Ostim aufgefüllt wurden weiter vorangeschritten als es ohne den Gebrauch von Wachstumsfaktoren zu beobachten war.

Der beschleunigte Abbau verdeutlichte sich durch die in Abhängigkeit der Wachstumsfaktoren in geringerer Anzahl auftretenden Ostimfragmente, bei gleichzeitiger Anwesenheit zahlreicher, implantatabbauender Zellen. Hierbei handelte es sich um ein- und mehrkernige Riesenzellen (Abb. 1), aber auch um Osteoklasten (Abb. 2).

Während die Makrophagen mit inkorporiertem Implantatmaterial überwiegend zwischen den Ostimfragmenten zu finden waren, traten die Osteoklasten stets mit den freien Implan-

toberflächen in engen Kontakt. Die Differenzierung zwischen mehrkernigen Riesenzellen und Osteoklasten wurde nicht nur aufgrund ultrastruktureller Kriterien getroffen, sondern auch aufgrund der sauren Phosphatase-Reaktivität.

Räumlich und zeitlich mit den zellvermittelten Abbauprozessen koinzidierend, vollzogen sich nach lokaler Applikation von Wachstumsfaktoren Knochenneubildungsprozesse. Unregelmäßig geformte Inseln aus Geflechtknochen, die intakte Osteoblasten umschlossen (Abb. 3), verteilten sich innerhalb des Granulationsgewebes und traten stellenweise in engen räumlichen Kontakt zu den Ostimfragmenten (Abb. 4).

Abb. 3: Innerhalb des Granulationsgewebes lokalisierter Geflechtknochen - 10 Tage post operationem nach lokaler Applikation von Wachstumsfaktoren. Der Kollagen-synthetisierende Osteoblast ist in elektronenhellen Geflechtknochen eingebettet und ist von einem schmalen Saum, nicht-mineralisierter organischer Matrix umgeben (▼). Intrazytoplasmatisch dominieren als Kennzeichen der hohen Syntheseleistung die erweiterten, mit mäßig elektronendichtem Inhalt angefüllten Zisternen des endoplasmatischen Retikulums (er). Am unteren Bildrand sind Ostimreste (O) zu erkennen. N = Nukleus. 5763x.

Dr. med. Olaf Kilian

Arzt für Chirurgie/Orthopädie/Unfallchirurgie

Korrespondenzanschrift:

Dr. med. Olaf Kilian
Klinik und Poliklinik für Unfallchirurgie
Rudolf-Buchheim-Straße 7
35392 Gießen

geb. am

08.05.1960 in Merseburg (Sachsen-Anhalt)

1981 - 1987 Studium Humanmedizin an der Friedrich-Schiller-Universität Jena

1989 Promotion zum Dr. med. an der Medizinischen Fakultät der FSU Jena

1987 - 1992 Facharztausbildung Chirurgie am Kreis-krankenhaus Blankenhain/Thüringen

1992 - 1996 Facharztausbildung Orthopädie an der Zentralklinik Bad Berka und Orthopädische Klinik Erfurt

1996 - 1999 Oberarzt der Klinik für Orthopädie der Thüringenklinik Saalfeld

seit 1999 Oberarzt der Klinik für Unfallchirurgie der Justus-Liebig-Universität Gießen

Schlussfolgerungen

Wie die vorliegenden Ergebnisse aufgezeigt haben, beschleunigen die Wachstumsfaktoren die Knochendefektheilung durch

- Stimulation des zellvermittelten Implantatabbaus durch Makrophagen und Osteoklasten in Übereinstimmung mit den Befunden von Nakagawa et al. [4].

- Stimulation der Osteogenese, indem im Rahmen der Proliferationsphase Osteoblasten-Präkursoren gefäßassoziiert einwandern, differenzieren und mit der Matrixsynthese beginnen. So ist die Neovaskularisation eng mit der Einwanderung von Matrix-exprimierenden Zellen in das Granulationsgewebe verknüpft. Diese Zellpopulationen - zum größten Teil von Fibroblasten repräsentiert - degradieren die transiente Matrix und beginnen mit der Wachstumsfaktor-induzierten Proliferation und Synthese von extrazellulären Matrixproteinen. Beispielsweise stimuliert TGFβ die Expression von Kollagenen, Proteoglykanen und Fibronectin [1], während FGF die Proliferation von Präosteoblasten und annähernd differenzierten Osteoblasten aktiviert, aber auch die Syntheserate von Kollagen Typ I in vitro deutlich steigert. Darüber hinaus zeigt dieser Wachstumsfaktor in vivo deutlich positive Effekte auf die Knochenneubildung wie u. a. die Dosis-abhängige Induktion ektopischer Knochenformationen bei Ratten aufzeigt - eine Fähigkeit, die gleichermaßen dem PDGF aufgrund tierexperimenteller Studien zugesprochen wird [6]. Die zitierten Veröffentlichungen sind nur wenige Beispiele über die regenerationsfördernden Effekte der Wachstumsfaktoren im Rahmen der Wund- und Frakturheilung. Sie wurden repräsentativ aus einer Fülle von Veröffentlichungen ausgewählt und dokumentieren in Übereinstimmung mit den Befunden der vorliegenden Studie

den therapeutischen Nutzen der Wachstumsfaktoren bei der Behandlung knöcherner Defekte.

Abstract

Calcium phosphate-based bone substitutes of synthetic and biological origin are useful alternatives to autogenous bone grafting in traumatic surgery and orthopaedics. These matrices are able to stimulate osteogenesis and to serve as guiding structures for capillary ingrowth. Both, osteo- and angiogenesis are closely associated and necessary for bone regeneration. Therefore, for the treatment of fracture repair it may be beneficial to potentiate angio- and osteogenesis. As growth factors accelerate wound healing by stimulating eg. matrix production, potentiating angiogenesis or increasing the rate of contraction analogous effects could be applicable to fracture healing - especially as VEGF has been demonstrated to be not only a potent mediator of angiogenesis but also a mediator of differentiation of osteoclasts. Based upon this consideration the effect of autogenous growth factors - purified from pig platelets - in combination with a biodegradable osteoconductive matrix (Ostim®) has been examined in the pig during the early phase of fracture healing - especially regarding the cellular events of osteogenesis and matrix-degradation. For the experimental procedure two cylindrical defects were created within the intercondylar region of the pig femoral condyles using an inside-cooled Diamond Bone Cutting System (DBCS). The proximal defect was filled with Ostim®, the distal with Ostim® enriched with growth factors. Ten and twenty days after surgery the pigs were euthanized, and specimens of the defects fixed by perfusion were examined by means of transmission electron microscopy. Even after ten days of local treatment with growth factors circumscribed areas of woven bone including osteoblast could be identified within the defect area filled with granulation tissue containing numerous capillaries. Moreover it could be shown that the cells responsible for the accelerated degradation of the implant enriched with growth factors are multinucleated giant cells and osteoclasts. All in all, the results of the present study provide evidence that growth factors potentiate angio- and osteogenesis as well as cell-mediated degradation of the implant during the early phase of fracture healing.

Literatur

- [1] Branton M. H., Kopp, J. B.: Microbes Infect (1): 1349, 1999
- [2] Einhorn L.: Breakout Sessions, Fracture Repair. Clin Orthop (355): 353-360, 1998
- [3] Leung D. W., Cachianes G., Kuang W. J., Goeddel D. V., Ferrara N.: Vascular endothelial growth factor is a secreted angiogenic mitogen. Science 246, 1306 - 1309, 1989
- [4] Nakagawa M., Kaneda T., Arakawa T., Morita S., Sato T., Yomada T., Hanada K., Kumegawa M., Hakeda Y.: Vascular endothelial growth factor (VEGF) directly enhances osteoclastic bone resorption and survival of mature osteoclasts. FEBS Lett (473): 161-164, 2000
- [5] Probst S.: Cellular mechanisms of bone repair. J Invest Surg (10): 77-86, 1997
- [6] Zellin G.: Growth factors and bone regeneration. Implications of barrier membranes. Swed Dent J Suppl (129): 7-65, 1998