

Aus der Chirurgischen Klinik und Poliklinik  
der Universität Würzburg

Direktor: Professor Dr. med. A. Thiede

---

**REKOMBINANTES HUMANES BONE MORPHOGENETIC PROTEIN-7  
(rhBMP-7, rhOP-1) ERMÖGLICHT DIE TRANSPEDIKULÄRE  
INTERKORPORELLE SPONDYLODESE AN DER LENDENWIRBELSÄULE  
DES SCHAFES**

INAUGURAL - DISSERTATION

zur Erlangung der Doktorwürde der

Medizinischen Fakultät

der

Bayerischen Julius-Maximilians-Universität zu Würzburg

vorgelegt von

Horst Balling

aus

Rittershausen

Würzburg, Oktober 2002

Referent: Prof. Dr. med. A. Weckbach

Korreferent: Prof. Dr. med. J. Eulert

Dekan: Prof. Dr. med. S. Silbernagl

Tag der mündlichen Prüfung: 07.05.2003

Der Promovend ist Arzt.

Meinen Eltern gewidmet.



## Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
2. Methode und Versuchsdurchführung	3
2.1 In-vitro Pilotversuch	3
2.2 In-vivo Vorversuch	3
2.3 Hauptversuch	3
2.3.1 Operatives Vorgehen (Allgemeiner Teil)	4
2.3.2 Operatives Vorgehen (Spezieller Teil)	6
2.3.3 Postoperative Phase	9
2.3.4 Fluoreszenzmarkierung	9
2.3.5 Röntgenologische Untersuchung	10
2.3.6 Makrophotographische Untersuchung und Fluorochromsequenzanalyse	11
2.3.7 Statistische Analyse	13
3. Ergebnisse	15
3.1 Pilot- und Vorversuch	15
3.2 Hauptversuch	16
3.2.1 Intraoperative Komplikationen	16
3.2.2 Postoperativer klinischer Verlauf	17
3.2.3 Postoperative Komplikationen	18
3.2.4 Radiologische Ergebnisse	18
3.2.5 Makrophotographische Ergebnisse und Fluorochromsequenzanalyse	22
3.2.5.1 Semiquantitative makromorphologische Analyse	22
3.2.5.2 Quantitative makromorphometrische Analyse	24
3.2.5.3 Qualitative Fluorochromsequenzanalyse	25
4. Diskussion	27
5. Zusammenfassung	33
6. Literaturverzeichnis	35
7. Anhang	41
7.1 Alter, Gewichtsparameter, appliziertes Kompositvolumen, Drainageninhalt, röntgenologischer und histologischer Score	41
7.2 Statistische Analyse des Parameters „Bandscheibenausräumung“ mit Hilfe des Kruskal-Wallis-Tests	45

7.3	Statistische Analyse des Parameters „Dekortikationsausmaß“ mit Hilfe des Kruskal-Wallis-Tests	50
7.4	Statistische Analyse der Parameter „Knochenneubildung“ und „Zement- bzw. Kompositfläche“ mit Hilfe des Wilcoxon-Tests	55
7.5	Kortikalisanteil	58
7.6	Tabellarische Darstellung sämtlicher Mittelwerte und Standardabweichungen	59
	Danksagung	
	Lebenslauf	

## 1. Einleitung

Seit Urist 1982 die aktive Komponente boviner Knochenmatrix, das Bone Morphogenetic Protein (BMP), isoliert hatte,<sup>50</sup> und es ihm im darauffolgenden Jahr gelungen war, humanes BMP zu isolieren,<sup>51</sup> sind viele präklinische Studien im Bereich der Wirbelsäulenchirurgie durchgeführt worden, die als Wegbereiter einer klinischen Nutzung dieser osteoinduktiv wirkenden Substanzen fungieren sollten.<sup>6,7,8,10,11,18,22,23,35,38,39,44</sup> Die meisten Untersuchungen sind relativ neu, da die gezielte Herstellung rekombinanter humaner BMPs (Molekulargewicht 36 kD) erst nach Sequenzanalyse einige Jahre später gelang.<sup>43</sup>

Die Indikation zur Spondylodese kann bei schmerzhaften degenerativen und traumatischen Bandscheibenschäden, Frakturen, Spondylolisthesis und ausgeprägten skoliotischen bzw. kyphotischen Deformitäten bestehen.<sup>5,53</sup> Im Falle einer nur relativen Operationsindikation sind Vorteile und Risiken eines Eingriffes gegeneinander abzuwägen.<sup>53</sup> Einen Goldstandard bezüglich der Operationstechnik gibt es bis heute nicht. Alle Verfahren weisen hohe Pseudarthrosehäufigkeiten auf.<sup>21</sup>

Bisherige Versuche durch posterolaterale, intertransverse oder interspinöse Fusion die hintere Säule zu stabilisieren, sind zwar vergleichsweise komplikationsarm durchführbar, haben aber eine Pseudarthroserate von 5-35 %.<sup>8,45,47</sup> Die Verfahren zur Stabilisierung der hinteren Säule zeigen außerdem einen Korrekturverlust der Wirbelsäulenaufriechung in der Sagittalebene von 10-20° nach Entfernung des Fixateur interne.<sup>5</sup> Eine Kyphosierung über 30° führt beim Patienten signifikant häufiger zu Schmerzen.<sup>17,52</sup> Posterolaterale intertransverse Fusionen weisen zwar primär höhere Fusionsraten auf als anteriore Verfahren, haben aber ein schlechteres klinisches Ergebnis.<sup>15,19,20,40</sup>

Innerhalb der Gruppe der anterioren Fusionsverfahren gehen anteriore lumbale interkorporelle Fusionen (ALIF) eher mit vaskulären Verletzungen einher, während posteriore lumbale interkorporelle Fusionen (PLIF) eher mit neurologischen Komplikationen assoziiert sind.<sup>15</sup> Die anteriore interkorporelle Fusion kann durch autogenen oder allogenen Knochen,<sup>32,58</sup> einen trikortikalen Beckenkammspan<sup>3</sup> oder Cage-Interposition<sup>36</sup> erreicht werden. Die zugangsassoziierte Morbidität<sup>9,26,34</sup> beträgt bis zu 29 %.

Wird ein dorsaler Zugang für die Stabilisierung der ventralen Säule gewählt, muß sich der Chirurg zwischen dem technisch aufwendigen transforaminalen, dem in seiner Anwendbarkeit auf bestimmte Wirbelsäulenetagen restringierten posterioren, dem posterolateralen und dem transpedikulären Zugang entscheiden.

Die Synthese aus dorsalem Zugang, interkorporeller Fusion und geringer Gefährdung neuraler Strukturen stellt das transpedikuläre Verfahren nach Daniaux<sup>12</sup> dar. Es vereinigt minimale Invasivität, Anwendbarkeit an der gesamten lumbalen Wirbelsäule und potentiell hohe Fusionsraten durch Stabilisierung der vorderen und mittleren Säule mit einer relativ geringen Komplikationsrate. Es ist weniger komplex als der transforaminale Zugang und hat ein weiteres Anwendbarkeitsspektrum als das Verfahren der posterioren lumbalen interkorporellen Fusion (PLIF), das oberhalb von L3 wegen der Gefahr der Verletzung von Dura und Conus medullaris keine Indikation besitzt.<sup>24</sup>

Offensichtlich scheiterte diese vielversprechende Methode wegen der unzureichenden primären axialen Belastungsstabilität des Spongiosatransplantates<sup>16</sup> am hohen Korrekturverlust nach Metallentfernung.<sup>27,46,54</sup> Hält man aber an der Methode in ihren Grundzügen fest und ersetzt das Knochentransplantat durch ein Material, das für eine hohe primäre axiale Belastungsstabilität sorgt, könnte eine erfolgreiche Operationstechnik mit geringer Invasivität ohne Knochenentnahmemorbidität resultieren. Letztere beläuft sich laut Literatur immerhin auf 8-25 %.<sup>1,2,14,29,48,59</sup> Wir testeten diese Hypothese und untersuchten die Verwendbarkeit eines injizierbaren Komposits aus Hydroxylapatit und Wachstumsprotein rhOP-1 im Schafsmodell unter Anwendung einer optimierten transpedikulären Technik gegen Spongiosatransplantat und reines Hydroxylapatit als Kontrollen.



## **2. Methode und Versuchsdurchführung**

Das Versuchsprotokoll wurde von der Regierung von Unterfranken geprüft und nach § 8 Abs. 1 TierSchG genehmigt (Genehmigungszeichen: 621-2531.01-73/99 vom 9. Dezember 1999). Beim Umgang mit den Versuchstieren fanden die „Principles Of Laboratory Animal Care“ (NIH publication No. 86 - 23, revised 1985) Beachtung.

Mit der biometrischen Planung war das Institut für Angewandte Mathematik und Statistik der Universität Würzburg (Prof. Dr. rer. nat. H. Vogt) betraut.

### **2.1 In-vitro Pilotversuch**

Mit den gleichen internen Fixateuren, die auch am Menschen zum Einsatz kommen, wurde zunächst an Schafwirbelsäulenpräparaten aus einem Fleischereifachgeschäft getestet, ob die Lendenwirbelsäule des Schafes für das transpedikuläre Vorgehen zur Bandscheibenausräumung geeignet ist.

### **2.2 In-vivo Vorversuch**

An zwei weiblichen Merino-Schafen (Alter: 13 und 14 Monate, Gewicht: 65,0 und 63,0 kg) wurde die geplante Operationstechnik in vivo erprobt. Nach dem Eingriff wurde die Lendenwirbelsäule in zwei Ebenen geröntgt und postmortal, d.h. 2 bzw. 4 Wochen später, der betreffende Abschnitt der Wirbelsäule samt Fixateur entnommen, in zwei Ebenen geröntgt und computertomographisch koronar in 2 mm Schichtdicke sowie mit einer sagittalen und axialen Rekonstruktion untersucht.

### **2.3 Hauptversuch**

Im Hauptversuch wurden drei Gruppen (Gruppe 1: Spongiosa-Gruppe, Gruppe 2: Hydroxylapatit-Gruppe, Gruppe 3: rhOP-1-Hydroxylapatit-Gruppe) zugrunde gelegt. Die Gruppen bestanden aus jeweils 12 weiblichen Merino-Schafen (Alter:  $14,95 \pm 4,69$  Monate (8-23 Monate) bzw.  $11,46 \pm 1,56$  Monate (9-14 Monate) bzw.  $12,67 \pm 2,57$  Monate (11-18 Monate), Gewicht:  $57,52 \pm 3,13$  kg (52,4-62,0 kg) bzw.  $56,93 \pm 3,33$  kg (51,0-65,0 kg) bzw.  $51,15 \pm 6,78$  kg (41,9-63,0 kg); Anhang: Tabellen A1 und A14).

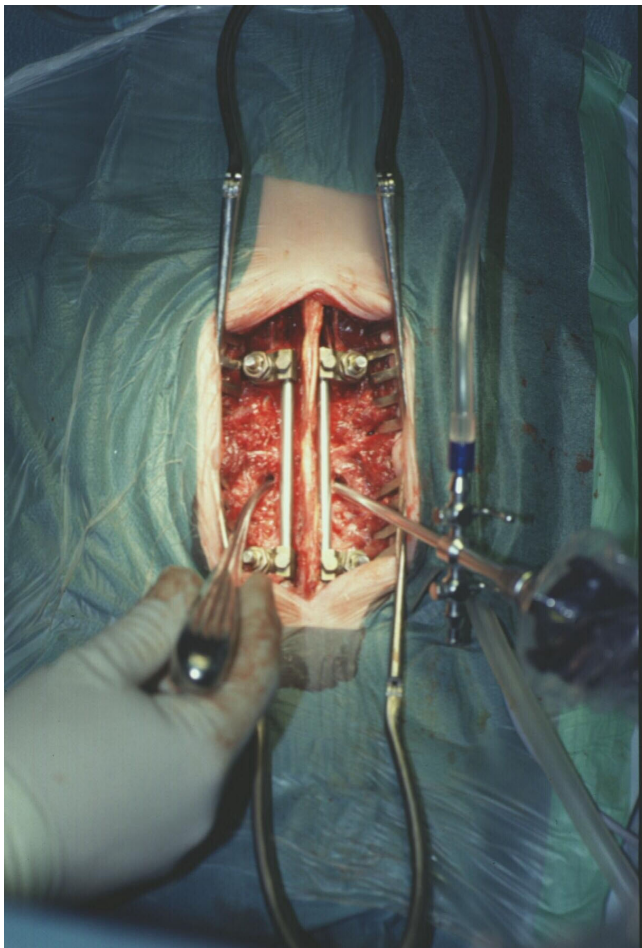
### 2.3.1 Operatives Vorgehen (Allgemeiner Teil)

Die Tiere wurden zunächst mit 1,3 ml Xylazin (Rompun<sup>®</sup>) i.m. sediert, dann mit 10 ml Thiopental (Trapanal<sup>®</sup>) i.v. narkotisiert und schließlich oropharyngeal mit einem extralangen Tubus endotracheal intubiert. Die intraoperative Narkose erfolgte mit Halothan (Halothan<sup>®</sup>) und Lachgas, die intraoperative Analgesie mit Piritramid (Dipidolor<sup>®</sup>) i.v. und die intravenöse Volumentherapie mit Ringer<sup>®</sup>-Lactat- und 6 %iger HAES-Lösung. Blutdruck und Puls wurden kontinuierlich blutig gemessen, die kapillare O<sub>2</sub>-Sättigung mit dem Pulsoximeter angezeigt und die arteriellen Blutgase regelmäßig analysiert. Die Tiere waren über eine Elektrode am geschorenen rechten Vorderlauf geerdet.

Präoperativ erhielt jedes Schaf aus den Vorversuchen und den ersten beiden Gruppen prophylaktisch 8 ml eines Langzeitpenicillins (Penicillin G) i.m., aus der dritten Gruppe 4 ml eines Kombinationsantibiotikums (Langzeitpenicillin und Dihydrostreptomycin) i.m. Der Wechsel des Antibiotikums erfolgte, weil das Langzeitpenicillin nicht mehr erhältlich war. Das Kombinationsantibiotikum war in seiner verwendeten Dosierung äquivalent. Das Operationsgebiet (Lendenwirbelsäule, zusätzlich linker hinterer Beckenkamm in der Spongiosa-Gruppe) wurde geschoren und mit Enthaarungssalbe (Calcium-Thioglykolat (Pilca-med<sup>®</sup>)) behandelt. Um lagerungsbedingte Nervenschäden zu vermeiden, hingen die Tiere während der Operation in Bauchlage in einer Polsterung, die an einer speziell zu diesem Zweck hergestellten Metallhalterung angebracht war. Zur Orientierung wurde die Lokalisation des fünften Lendenwirbels unter Durchleuchtung auf der Haut markiert und anschließend das Operationsareal mit Cutasept<sup>®</sup> G (2-Propanol, gefärbt) desinfiziert und steril abgedeckt.

Analog dem Vorgehen beim Menschen wurden nun nach dorsalem medianem Hautschnitt und Faszienspaltung über den Wirbelkörpern L4-6 (das Schaf besitzt im Gegensatz zum Menschen sieben Lendenwirbelkörper) die autochthonen Rückenmuskeln nach lateral mobilisiert. L4 und L6 wurden transpedikulär mit jeweils zwei Schanzschrauben (Durchmesser: 5 mm) instrumentiert und durch zwei je 100 mm lange Längsträger über die beiden Bewegungssegmente verbunden. Es ergaben sich im Vergleich zum Menschen lediglich zwei Modifikationen: Wegen der sehr harten Kortikalis beim Schaf wurde der pedikuläre Schraubenkanal mit einem 3,2 mm oszillierenden Bohrer statt einer Eröffnungs- und Vertiefungssahle gebohrt, und durch die weiter lateral gelegenen Pedikel mußte die Schraubenneigung in der Horizontalebene stärker konzentrisch ausfallen. Bei den verwendeten Fixateurs internes handelte es sich um bereits beim

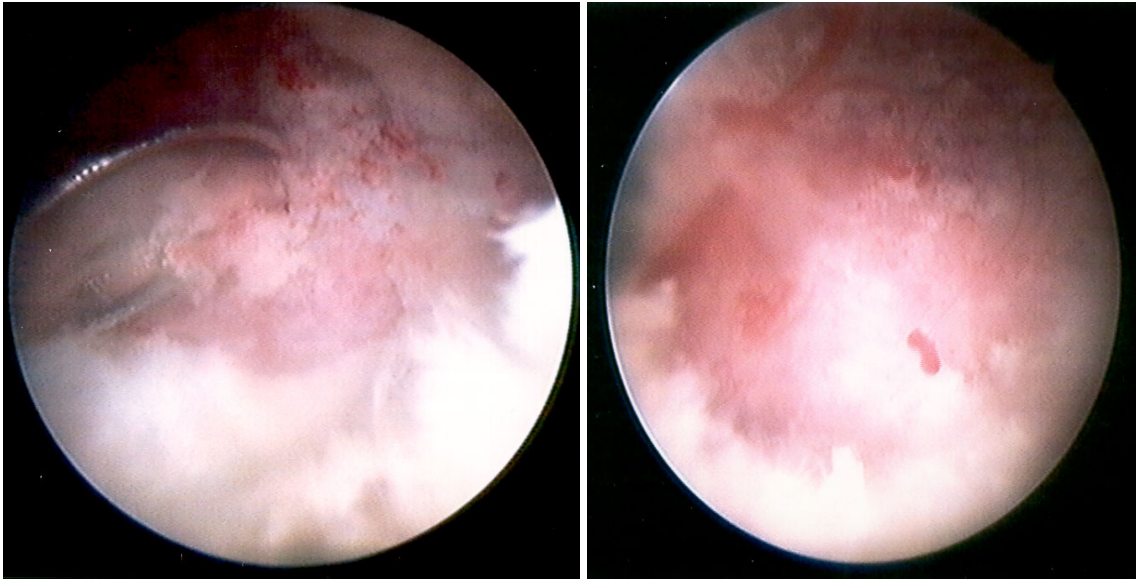
Menschen eingesetzt und nach Explantation erneut sterilisierte Titan-Implantate des Systems USS Universal Spine System (Synthes, Umkirch, Deutschland). Nun wurden beidseitig mittels Bohrmaschine, Oszillationsaufsatz und sukzessiver Verwendung von Bohrern ansteigender Diameter (3,2 mm, 4,5 mm und 6,0 mm) unter Durchleuchtung durch L5 transpedikuläre Zugangswege zur Zwischenwirbelscheibe L4/5 gebohrt. Mit scharfen Löffeln und Rongeuren wurden der Nucleus pulposus der Bandscheibe L4/5 unter Belassung des Anulus fibrosus entfernt und die Endplatten der Lendenwirbelkörper 4 und 5 dekortiziert. Eines der Bohrlöcher diente abwechselnd als Arbeitskanal, während das jeweils andere den Sichtkanal darstellte, durch den mit einem herkömmlichen Kniegelenksarthroskop mit 30°-Winkeloptik, dazugehörigem Trokar und Wasserspülung die sogenannte Pedikuloskopie erfolgte (Abb. 1).



**Abb. 1:** Intraoperativer Situs: Die posteriore Instrumentierung L4/L6 ist abgeschlossen, im linken transpedikulären Kanal befindet sich der zur Dekortikation verwendete scharfe Löffel, im rechten transpedikulären Kanal das zur Pedikuloskopie verwendete Kniegelenksarthroskop.

Die Bandscheibenausräumung über den Arbeitskanal konnte so per Bildschirm intraoperativ dargestellt und auf Videokassette aufgezeichnet werden. Röntgendichte Strukturen, die sich der pedikuloskopischen Darstellung entziehen, wurden unter Durchleuchtung mit dem C-Bogen fluoroskopisch erfaßt und zur Dokumentation auf Videoprints festgehalten. Die Intaktheit des Anulus fibrosus ist wichtig, um den regelrechten intervertebralen Verbleib des anschließend einzubringenden Füllungsmaterials zu gewährleisten. Zwei pedikuloskopische Aufnahmen zeigen die dekortizierte L4-Grundplatte (Abb. 2a, 2b). Die punktförmig erkennbaren Blutungen aus Spongiosagefäßen treten erst bei ausreichender Dekortikation auf.

Die bisher dargestellten Arbeitsschritte waren im Vorversuch und in allen drei Hauptversuchsgruppen identisch.



**Abb. 2a, 2b:** Endoskopische transpedikuläre Aufnahmen: Dekortikation der L4-Grundplatte mit einem scharfen Löffel, gut sichtbare Blutung aus dem kortikalen Knochen, am unteren Bildrand kommt der verbliebene Anulus fibrosus der Zwischenwirbelscheibe zur Darstellung (a). In den geschaffenen Defektbereich wölbt sich Zementmasse vor (b).

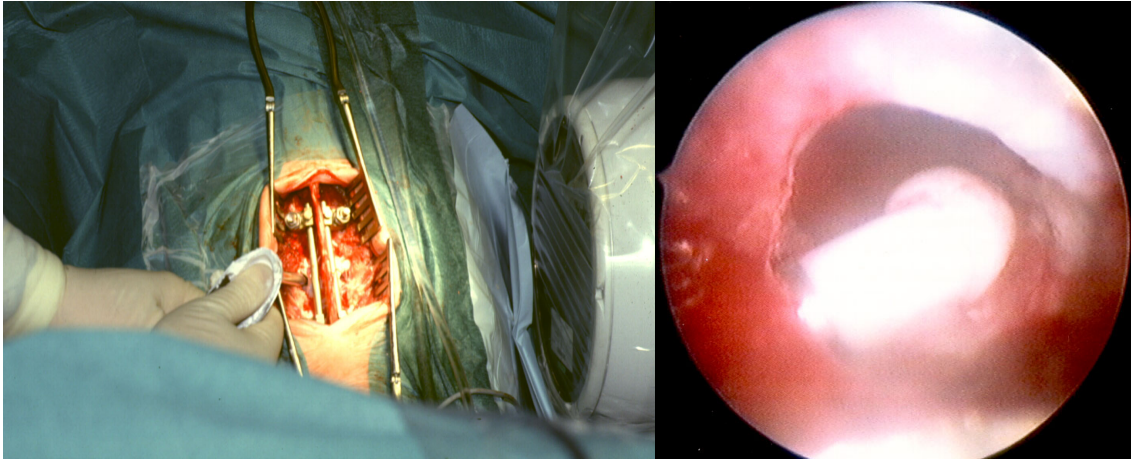
### 2.3.2 Operatives Vorgehen (Spezieller Teil)

Der weitere Operationsverlauf war in den einzelnen Gruppen unterschiedlich: Bei den Tieren der Spongiosa-Gruppe wurde unmittelbar zuvor aus dem linken hinteren Beckenkamm entnommene autologe Spongiosa via Spongiosatrichter (Daniaux-Trichter) und Stößel (Abb. 3a) auf transpedikulärem Wege intra- und interkorporell eingebracht.



**Abb. 3a:** Daniaux-Trichter und Stößel zur transpedikulären Applikation des Augmentats.





**Abb. 3b, 3c:** Intraoperativer Situs (Hydroxylapatit-Gruppe): Die posteriore Instrumentation L4/L6 ist abgeschlossen, der im linken transpedikulären Kanal von L5 steckende Daniaux-Trichter enthält Hydroxylapatit-Zement, aus dem kontralateralen Bohrkanal wird nach vollständiger Defektfüllung überschüssiger Zement gefördert (b). Endoskopische transpedikuläre Darstellung des Defektfüllungsvorganges: Der Zementwulst aszendiert im Sichtkanal in Richtung der Pedikuloskop-Optik (c).

Die Tiere des Vorversuches und der Hydroxylapatit-Gruppe erhielten eine transpedikulär applizierte intra- und interkorporelle Füllung aus 5,0 ml eines biphasischen, synthetischen Zweikomponenten-Tri-/Tetracalciumphosphat-Zements (BoneSource<sup>TM</sup>, Stryker Howmedica-Osteonics, Mahwah, New Jersey, USA) (Abb. 3b, 3c). Bei den beiden Komponenten handelt es sich um eine Kombination aus BoneSource<sup>TM</sup>-Zementpulver und flüssiger NaPO<sub>4</sub>-Lösung, die im Knochen in sieben Minuten abbindet, eine Druckfestigkeit von  $25,56 \pm 3,70$  MPa erreicht und binnen 24 Stunden in einer isothermischen Reaktion, also ohne thermische Schädigung benachbarter Gewebe, vollständig zu Hydroxylapatit auskristallisiert. Die porenartige Mikrostruktur ermöglicht die osteokonduktive Wirksamkeit des Zements (Porenvolumenanteil am Zementvolumen: 5,9-10,3 %).

Die Füllung in der rhOP-1-Hydroxylapatit-Gruppe enthielt neben dem erwähnten Knochenzement zusätzlich 2,2 mg des zu testenden mikroverkapselten Wachstumsproteins rhOP-1 (rhBMP-7, Stryker<sup>®</sup>Biotech, Hopkinton, Massachusetts, USA). Das in Polylactidglycolsäure (PLGA) verkapselte rhOP-1 (Kapseldurchmesser: 53-500 µm) wurde zunächst mit dem BoneSource<sup>TM</sup>-Pulver vermischt und dann in flüssiger NaPO<sub>4</sub>-Pufferlösung zu 5,5 ml einer injizierbaren Flüssigkeit gelöst. Der osteokonduktive Calciumphosphat-Zement wird als Carrier für das osteoinduktive OP-1 benötigt. Nach sieben Minuten erreicht diese Kombination eine Druckfestigkeit von  $24,21 \pm 2,64$  MPa. Durchschnittlich wurden  $4,0 \pm 0,5$  ml der Lösung intra- und interkorporell deponiert, entsprechend einer rhOP-1-Menge von  $1,6 \pm 0,2$  mg (Anhang: Tabelle A2). Weitere

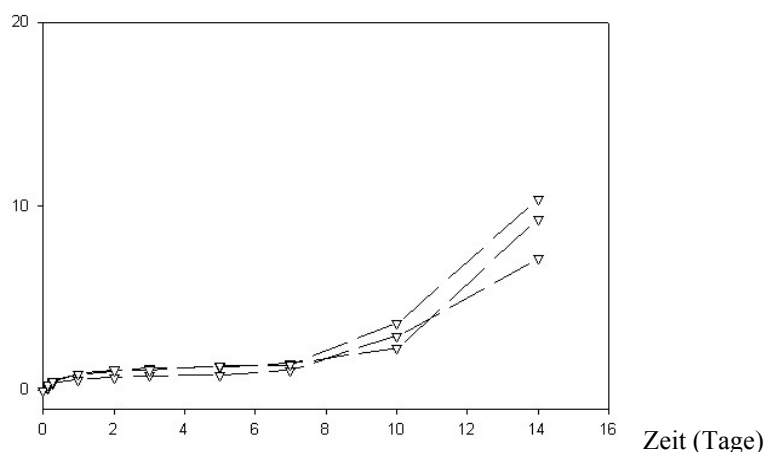
biomechanische Daten über die verwendeten Füllungsmaterialien liefert Tabelle 1. Die rhOP-1-Freisetzungsrates zeigt Abbildung 4.

**Tabelle 1**

Biomechanische Daten zum Zweikomponentenzement BoneSource™ und dem OP-1-BoneSource™-Komposit (Stryker® Biotech, 35 South Street, Hopkinton, MA 01748).

OP-1-Gewichtsanteil am Mikrokapselgesamtwicht	0,3 % (= 2,2 mg / 739 mg)
Gewichtsverhältnis Mikrokapseln : Zement	0,739 g : 10 g (= 6,88 % Mikrokapselanteil am Gesamtwicht)
Kompositgesamtwicht (Mikrokapseln + BoneSource™)	10,739 g
Kompositgesamtvolumen (Mikrokapseln + BoneSource™ + Phosphatpuffer)	5,5 ml [5-6 ml]
OP-1-Gesamtwicht	2,2 mg
Kompressionsstabilität des Zementes	25,56 ± 3,70 MPa (100 % BoneSource™) 24,21 ± 2,64 MPa (10 % Mikrokapseln / 90 % BoneSource™)
Polymergröße	2 Å (~16 kD Molekulargewicht)
Mikrokapseldurchmesser	53-500 µm

Kumulative Freisetzungsrates (%)



**Abb. 4:** In-vitro gemessene rhOP-1-Freisetzungsrates aus seiner Polylactidglycolsäure-Verkapselung. Dargestellt ist der mittels ELISA gemessene freigesetzte rhOP-1-Anteil in % (Ordinate) in Abhängigkeit von der Zeit in Tagen (Abszisse). Geringe Freisetzungsrates bis Tag 10, danach „burst release“. (Stryker® Biotech, 35 South Street, Hopkinton, MA 01748)

Die abschließenden Operationsschritte waren bei allen Schafen identisch mit Drainageeinlage (subfaszial und subkutan, lediglich in der ersten Gruppe wurde zusätzlich eine Drainage am Beckenkamm gelegt), schichtweisem Wundverschluß und sterilem Pflasterverband.

### 2.3.3 Postoperative Phase

Zur weiteren Dokumentation folgten unmittelbar im Anschluß an die Operation eine Nativ-Röntgenuntersuchung der LWS in zwei Ebenen, bei der sich die Schafe noch in abklingender Narkose befanden. An den folgenden Tagen erhielten die operierten Tiere eine intramuskuläre Schmerzmedikation, bestehend aus 100 mg Tramadol (Tramal<sup>®</sup>, 2 ml Ampullen) und 1 g Metamizol (Novalgin<sup>®</sup>, 2 ml Ampullen), die Applikation erfolgte antizipatorisch alle 6-12 Stunden, bei Schmerzzeichen häufiger. Die Drainagen wurden am zweiten postoperativen Tag entfernt, der Redoninhalt abgelesen und notiert. Bis hierhin befanden sich die Tiere in der Intensiv-Tierhaltung, danach bis zum 14. postoperativen Tag im Schafstall und anschließend wieder im Freigehege. Am dritten postoperativen Tag erfolgte eine zweite intramuskuläre Gabe des oben genannten Langzeitpenicillins bzw. Kombinationsantibiotikums in gleicher Dosierung wie bei der ersten Verabreichung. Die Operationswunden wurden täglich kontrolliert, das Körpergewicht wiederholt gemessen, um auch anhand des Gewichtsverlaufes den Gesundheitszustand der Tiere kontrollieren zu können.

Mit Hilfe einer Tabelle wurde postoperativ jedes Schaf täglich bezüglich der Sparten Allgemeinzustand, Körpergewicht, Spontanverhalten, klinischer Befund beurteilt, die Punktwerte wurden dokumentiert. Zu erreichen waren jeweils 0-20 Punkte pro Sparte, wobei „0“ keine Beeinträchtigung und „20“ ein Höchstmaß an Beeinträchtigung bedeutet. Die Einzelergebnisse jeden Tages wurden addiert und folgendermaßen ausgewertet:

- Belastungsgrad 0 (Punktsumme 0): keine Belastung,
- Belastungsgrad 1 (Punktsumme 1-9): geringe Belastung, sorgfältige weitere Beobachtung erforderlich,
- Belastungsgrad 2 (Punktsumme 10-19): mittelgradige Belastung, ggf. tierärztliche Versorgung einleiten (Analgesie),
- Belastungsgrad 3 (Punktsumme 20-80): hochgradige Belastung, bei mehrtägiger Andauer – evtl. auch sofort – Versuch abbrechen, tierärztliche Versorgung einleiten, ggf. Tier einschläfern.

### 2.3.4 Fluoreszenzmarkierung

Zwei Wochen nach der Operation erhielten die Schafe nach intramuskulärer Sedierung mit Xylazin (Rompun<sup>®</sup>) über eine Venenverweilkanüle im Ohr den Fluoreszenzfarbstoff

Xylenol-Orange 90 mg/ml (Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland, 1,00 ml/kg Körpergewicht in 100 ml NaCl-Lösung). Das Hautnahtmaterial wurde entfernt. Auf gleichem Wege wurden jeweils in zweiwöchigem Abstand Calcein-Grün 30 mg/ml (Synopharm, Barsbüttel, Deutschland, 0,33 ml/kg Körpergewicht in 100 ml NaCl-Lösung) und Doxycyclin-Gelb 20 mg/ml (Doxyhexal<sup>®</sup>, Hexal, Holzkirchen, Deutschland, 1,00 ml/kg Körpergewicht in der ersten Gruppe, in den Gruppen 2 und 3 unabhängig vom Körpergewicht 2 g) appliziert.<sup>37,42,49</sup> Acht Wochen postoperativ erfolgte in Ketamin-Narkose (100-500 mg Ketanest<sup>®</sup>, Ketavet<sup>®</sup>, i.m.) die Tötung der Tiere mit 5 bis 15 ml T-61<sup>®</sup> (Kombinationspräparat aus Embutramid (Narkotikum), Mebezonium (Muskeldepolarisans) und Tetracain (Lokalanästhetikum)) intravenös. Anschließend wurde das Lendenwirbelsäulensegment L3-7 explantiert, in 3,5 %ige Formalinlösung eingelegt, röntgenologisch untersucht und zur histologischen Aufbereitung an das Institut für Pathologie der Universität Hamburg, Abteilung Osteopathologie (Direktor: Prof. Dr. med. G. Delling) verschickt.

### **2.3.5 Röntgenologische Untersuchung**

Wie direkt postoperativ die untere Lendenwirbelsäule, wurde auch das post mortem entnommene Spezimen in zwei Ebenen nativ geröntgt (Gerät: Opti 150/40/73 C-100L, Siemens, München, Deutschland). Zusätzlich wurde das Präparat in 2 mm Schichtdicke in drei Ebenen computertomographisch untersucht (koronar, sagittal, axial; Gerät: Somatom Plus4, Siemens, Forchheim, Deutschland). Die entnommenen Wirbelsäulenabschnitte wurden in koronarer Ebene in mehrere je 4 mm dicke Scheiben geschnitten, von denen hochauflösende Kontaktmakroradiographien angefertigt wurden (Gerät: Faxitron X-Ray Corp., Wheeling, Illinois).

Nur wenn von den beiden unabhängigen, geblindeten Untersuchern in allen drei bildgebenden Verfahren eine Fusion festgestellt wurde, wurde diese als vorhanden gewertet. Dazu war im Falle der konventionellen Röntgenbilder und bei den Kontaktmakroradiographien eine kontinuierliche Knochen-Zement-Verbindung zwischen den entsprechenden Endplatten erforderlich, bei den CT-Bildern wurde eine solche Verbindung in drei aufeinanderfolgenden Schnittbildern in jeder Ebene gefordert. Zur semiquantitativen Auswertung wurden 0-3 Punkte vergeben, wobei 0 Punkte ein Fehlen von inselartigen röntgendichten Strukturen im Intervertebralraum, 1 Punkt vereinzelte röntgendichte



Areale, 2 Punkte eine einseitige und 3 Punkte eine beidseitige Überbrückung des Inter-vertebralspalt durch eine kontinuierliche Knochen-Zement-Verbindung bedeuten.

### 2.3.6 Makrophotographische Untersuchung und Fluorochromsequenzanalyse

Am Institut für Pathologie der Universität Hamburg wurden die hochauflösende Kontaktmakroradiographie, eine histologische und histomorphometrische Untersuchung sowie die Fluorochromsequenzanalyse durchgeführt. Die 4 mm dicken Präparatscheiben wurden im Bereich L4/5 makrophotographiert. Der Fluorochromsequenzanalyse lagen 15 µm dicke Schliffe in koronarer Schnitfführung aus derselben Region zugrunde. Die von zwei unabhängigen Untersuchern erarbeiteten und digital erfaßten Ergebnisse beruhen auf folgenden Untersuchungen:

1. Semiquantitative makromorphologische Analyse: Vorhandensein von Knorpelgewebe, Entzündungsreaktion und Ausmaß der knöchernen intervertebralen Überbrückung wurden mit einer Mehrpunktbewertung an Makrophotographien evaluiert (Tabelle 2).

**Tabelle 2**

Evaluation der Menge an Knorpelgewebe, Entzündungsreaktion und des Ausmaßes einer knöchernen intervertebralen Überbrückung an Makrophotographien.

Evaluationsgröße	Definition	Punktwert
Menge an Knorpelgewebe	Kein makroskopisch sichtbares Knorpelgewebe	2
	Knorpelgewebe vereinzelt im Intervertebralspalt	1
	Knorpelgewebe im gesamten Intervertebralspalt	0
Entzündungsreaktion	Keine makroskopisch sichtbare Entzündung	1
	Entzündung mit sichtbarer Hyperämie	0
Fusionsausmaß	Bilaterale Fusion	3
	Unilaterale Fusion	2
	Keine Fusion, nur Knocheninseln	1
	Keine Fusion, keine sichtbaren Knochenformationen	0

2. Quantitative makromorphometrische Analyse: Folgende Aspekte wurden mittels rechnerunterstützter Planimetrie (SigmaScan Pro, Jandel, San Rafael, Kalifornien) an digitalisierten Makrophotographien ausgewertet:

- o Breite des durch die pedikuloskopische Bandscheibenausräumung entstandenen Defektes (in % der Gesamtbandscheibenbreite),
- o Ausmaß der L4-Grundplattendekortikation und der so erreichten Eindringtiefe des Defektfüllungsmaterials (in % der Wirbelkörperhöhe),
- o Fläche der Ossifikationszone um den Knochenzement bzw. um das rhOP-1-Zement-Komposit (in  $\text{mm}^2$ ),
- o Fläche des nicht-resorbierten Knochenzements bzw. des nicht-resorbierten rhOP-1-Zement-Komposits (in  $\text{mm}^2$ ).

Zunächst wurden als Voreinstellungen der Software die „Distance“- und „Area“-Messungsoptionen aktiviert (Pfad: „Measure“ - „Trace Measurement Options“) und unter dem Hauptmenüpunkt „Tools“ der „Trace“-Modus angewählt. Danach wurden die digitalisierten Makrophotographien innerhalb der Planimetrie-Software auf das vierfache vergrößert, der Abstand der am weitesten voneinander entfernten Teilstriche des zur Größenabschätzung mitphotographierten Zentimetermaßstabes als Bildpunktabstand berechnet und mit dem Kalibrierungsmodus („Calibrate Distance and Area“) aus der „Measure“-Funktion der Hauptmenüleiste in Millimeter umgewandelt. Dieser Arbeitsschritt mußte für jede einzelne Makrophotographie gesondert erfolgen, weil der Linsenabstand des Photoapparates zum Präparat nicht normiert war. Zwar hätte sich die Kalibrierung für die Prozentangaben der Bandscheibenausräumung und des Dekortikationsausmaßes erübrigt, nicht aber für die Angabe der absoluten Maßzahl der Bandscheibendefektbreite (in mm), der Bandscheibenbreite (in mm), der Eindringtiefe (in mm), der Wirbelkörperhöhe (in mm), der Ossifikationszonenfläche (in  $\text{mm}^2$ ) und der Zement- bzw. Kompositfläche (in  $\text{mm}^2$ ). Die Software liefert im „Distance“-Modus den Abstand zweier durch Mausclick markierter Punkte innerhalb einer zu vermessenden Bilddatei in der durch die Kalibrierung gewählten Maßeinheit. Für die Vermessung von Flächen wird der „Area“-Modus angewählt, der in der zu vermessenden Bilddatei den Flächeninhalt eines Areals berechnet, dessen Eckpunkte durch Mausclick markiert werden müssen. Die Einheit der Flächenmaßzahl ist wiederum durch die voreingestellte Kalibrierung determiniert.

3. Qualitative Fluorochromsequenzanalyse: Auswertung von koronaren 15- $\mu$ m-Schliffen unter dem UV-Licht-Mikroskop nach trifluorochromatischer in-vivo Markierung.

Die Analyse des zeitlichen Beginns einer Knochenneubildung erfolgte lediglich für die Tiere der ersten Gruppe. Weiterführende Untersuchungen diesbezüglich stehen noch aus und sind nicht Gegenstand dieser Arbeit.

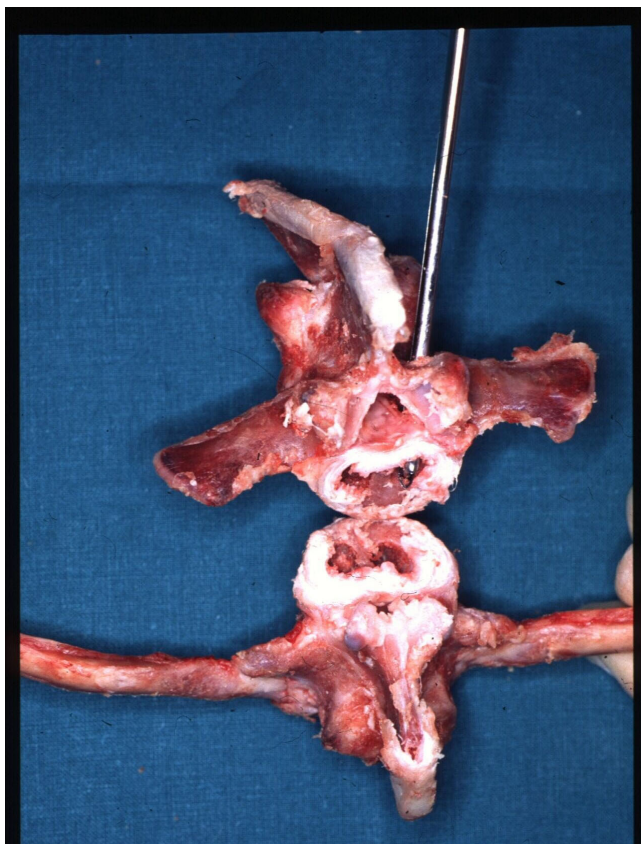
### **2.3.7 Statistische Analyse**

Statistische Ergebnisse werden als Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung angegeben. Für die statistischen Tests wird ein Signifikanz-Niveau von  $p < 0,05$  zugrundegelegt. Zum Vergleich der Versuchsgruppenergebnisse wird der Kruskal-Wallis-Test für drei voneinander unabhängige Vergleichsgruppen und danach - im Falle signifikanter Unterschiede in den Ergebnissen - der Wilcoxon-Test für zwei voneinander unabhängige, unpaarige Vergleichsgruppen herangezogen. Wo nur zwei Ergebnisse miteinander verglichen werden können, kommt nur der Wilcoxon-Test zur Anwendung. Die statistischen Tests wurden mit der SAS-Software (SAS Institute Inc., Cary, North Carolina) durchgeführt.



### 3. Ergebnisse

#### 3.1 Pilot- und Vorversuch



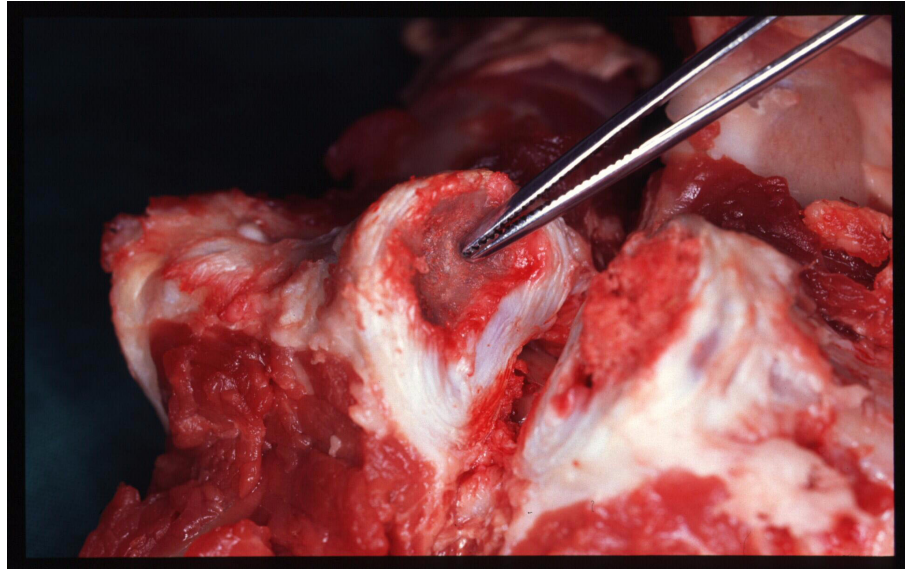
**Abb. 5:** Schafswirbelsäulenabschnitt aus dem Pilotversuch: Der verbliebene Anulus fibrosus L4/5 ist horizontal gespalten, das Präparat dorsal aufgeklappt. Die Sonde erreicht durch den transpedikulären Zugang den Zwischenwirbelraum L4/5.

die vollständige Bandscheibenausräumung (der gesamte Nucleus pulposus ist entfernt) und die dekortizierte Grundplatte.

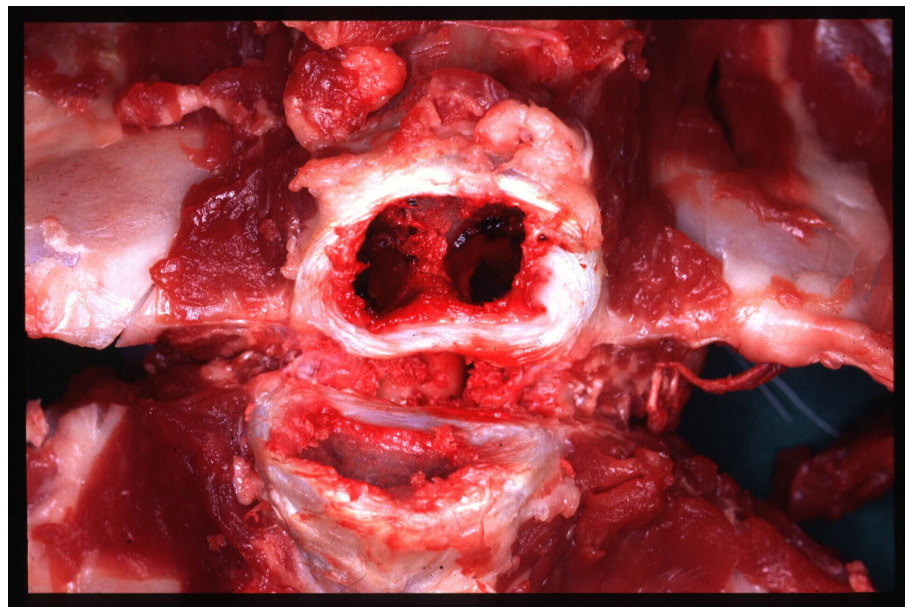
Im Pilotversuch ließ sich zeigen, daß die beim Menschen verwendeten dorsalen Fixateure für die in-vitro-Stabilisierung lumbaler Bewegungssegmente am Wirbelsäulenpräparat des Schafes geeignet sind und daß Zwischenwirbelscheibe und Grundplatte des kranialen Wirbelkörpers durch den transpedikulären Zugang von dorsal zugänglich sind (Abb.5).

Durch den Vorversuch gelang der Nachweis, daß die Operationstechnik und im besonderen die Pedikuloskopie in vivo erfolgreich durchführbar sind.

In den Abbildungen 6 und 7 ist ein makroskopisch aufgearbeitetes Spezimen zu sehen. Man erkennt



**Abb. 6:** Schafswirbelsäulenabschnitt aus dem Pilotversuch: Der verbliebene Anulus fibrosus L4/5 ist horizontal gespalten, das Präparat ventral aufgeklappt. Die Pinzette weist auf die vollständige Entfernung des Nucleus pulposus der Bandscheibe L4/5.



**Abb. 7:** Schafswirbelsäulenabschnitt aus dem Pilotversuch: Der verbliebene Anulus fibrosus L4/5 ist horizontal gespalten, das Präparat ventral aufgeklappt. Man blickt auf die dekortizierte L4-Grundplatte (unterer Bildrand) und frontal auf die L5-Deckplatte mit den beiden Bohrkanälen.

## 3.2 Hauptversuch

### 3.2.1 Intraoperative Komplikationen

Die ersten beiden Schafe der Spongiosa-Gruppe zeigten eine primäre postoperative Paraplegie der hinteren Extremitäten wegen nach medial aberrierter Pedikelschrauben,

die das Rückenmark komprimiert hatten. Die Tiere mußten deshalb nach zwei bzw. drei Tagen euthanasiert werden, so daß in der ersten Gruppe nur mehr zehn Schafe zur Versuchsauswertung zur Verfügung standen. Die beiden Tiere fallen aus allen weiteren Betrachtungen heraus. Beim dritten Schaf derselben Gruppe mußte die rechte kraniale Schanz-Schraube in L3 eingebracht werden, weil sich der zunächst in L4 vorgebohrte rechte Schraubenkanal lateral ausweitete.

Die rechte mediale Pedikelwand des Arbeits-/Sichtkanals in L5 des sechsten Schafes wurde durch den Rongeur geschädigt, allerdings ohne Duraalteration oder nachfolgenden Duraprolaps, so daß das Tier keine neurologische Symptomatik zeigte.

Derartige durch die besondere Pedikelanatomie des Schafes bedingte Komplikationen konnten bei den übrigen Tieren durch eine geänderte Schraubenführung vermieden werden.

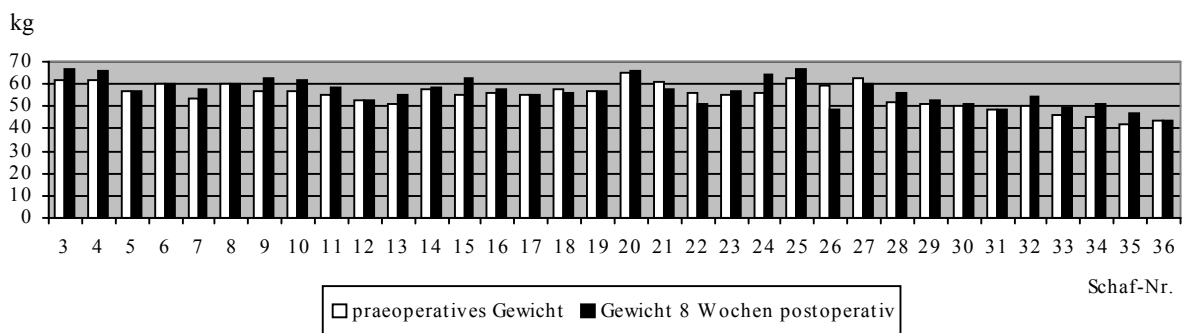
### **3.2.2 Postoperativer klinischer Verlauf**

Die postoperative Schmerzmittelgabe erstreckte sich auf 48 bis 72 Stunden. Nach dieser Zeit waren bei den Tieren nach abgeklungener analgetischer Wirksamkeit der Medikamente keine Schmerzzeichen mehr vorhanden.

Die semiquantitative Erfassung des postoperativen körperlichen Belastungsgrades der Tiere ergab für alle verbliebenen 34 Versuchstiere Punktwerte zwischen „1“ (gering vom normalen abweichendes Spontanverhalten) und „2“ (gering vom normalen abweichendes Spontanverhalten und gering vom normalen abweichender klinischer Befund). Nach 24 Stunden überschritt keines der Schafe mehr die 1-Punkte-Marke, nach 72 Stunden wiesen alle Tiere den Belastungsgrad „0“ auf.

Die Vakuum-Saugdrainagen wurden in allen Fällen am zweiten postoperativen Tag entfernt, das Fördervolumen dokumentiert (durchschnittliche Fördermenge: subfaszial  $205 \pm 72$  ml [90-350 ml], subkutan  $48 \pm 33$  ml [0-140 ml], Beckenkamm  $49 \pm 26$  ml [20-120 ml]; Anhang: Tabellen A3 und A14). Lediglich bei einem Schaf in Gruppe 1 erfolgte die subkutane Drainagenentfernung durch das Tier selbst am ersten postoperativen Tag, so daß im folgenden die Drainagen angenäht wurden - eine Maßnahme, die nicht verhindern konnte, daß bei einem anderen Schaf derselben Gruppe ein Beistelltier den vorzeitigen Drainagenzug bewerkstelligte, woraufhin die Beistelltiere jeweils im Nachbarstall gehalten wurden.

Wiederholte Messungen des Körpergewichtes ergaben eine mittlere Gewichtszunahme von  $3,22 \pm 2,15$  kg [0,1-7,7 kg] (n = 25) bzw. einen konstanten Gewichtsverlauf (n = 3) innerhalb der acht postoperativen Wochen. Bei 6 Schafen war ein mittlerer Gewichtsverlust von  $3,95 \pm 3,37$  kg [0,5-10,7 kg] zu verzeichnen (Abb. 8 und Anhang: Tabelle A1).



**Abb. 8:** Gewichtsverlauf der 34 Versuchstiere.

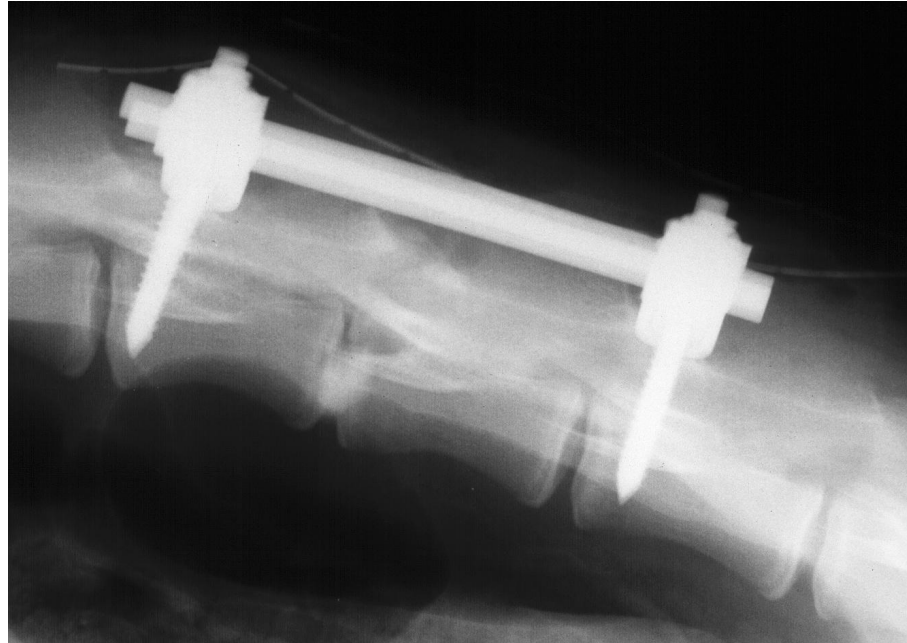
### 3.2.3 Postoperative Komplikationen

Bei keinem der Schafe beobachteten wir postoperativ Wundheilungsstörungen oder chirurgisch bedeutsame Nachblutungen. Bei einem Tier der Spongiosa-Gruppe bildete sich ein Serom von 20 ml, das abpunktiert und mikrobiologisch untersucht wurde. Der Keimnachweis war negativ.

### 3.2.4 Radiologische Ergebnisse

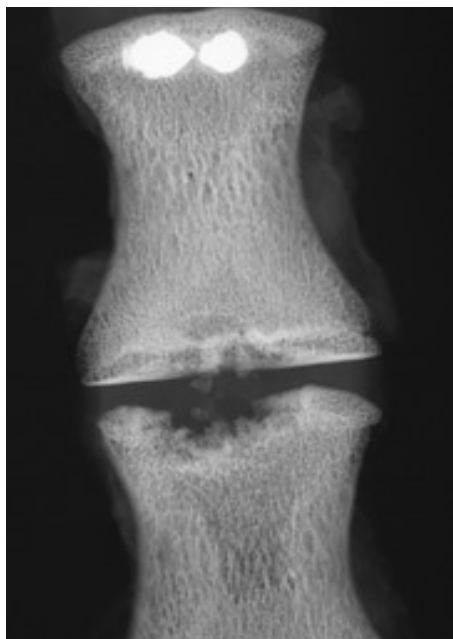
Durch die postoperativ in zwei Ebenen durchgeführten Nativ-Röntgen-Bilder ließen sich die korrekte Lage des Fixateur interne und die intra- und intervertebral eingebrachte Spongiosa bzw. die Knochenzementfüllung oder rhOP-1-Zement-Kompositfüllung darstellen (Abb. 9).



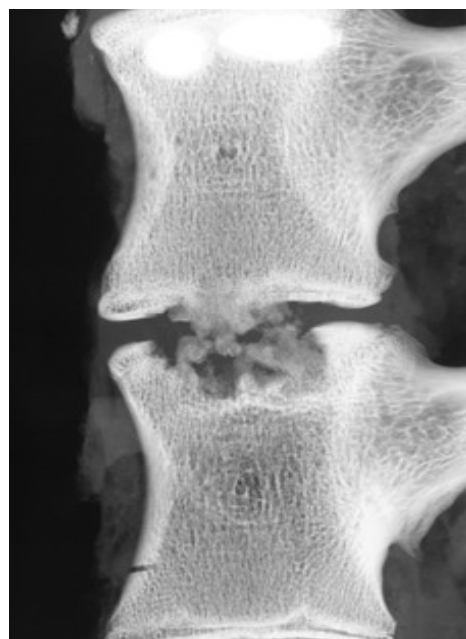


**Abb. 9:** Postoperative Röntgenaufnahme der LWS von lateral (Spongiosa-Gruppe). Sowohl der Fixateur interne als auch die in den Zwischenwirbelsraum L4/5 eingebrachte Spongiosa stellen sich regelrecht dar.

Von den zehn Tieren der ersten Gruppe ist lediglich bei einem eine vollständige einseitige Fusion durch knöchernen Überbrückung des Zwischenwirbelspaltes nachweisbar. Die übrigen neun zeigen entweder nur Knocheninseln ( $n = 4$ ) oder keine Knochenneubildung ( $n = 5$ ) (Abb. 10a, 10b). Persistierendes transplantiertes Knochenmaterial findet sich bei sieben Tieren, während zwei durch vollständige Transplantatresorption



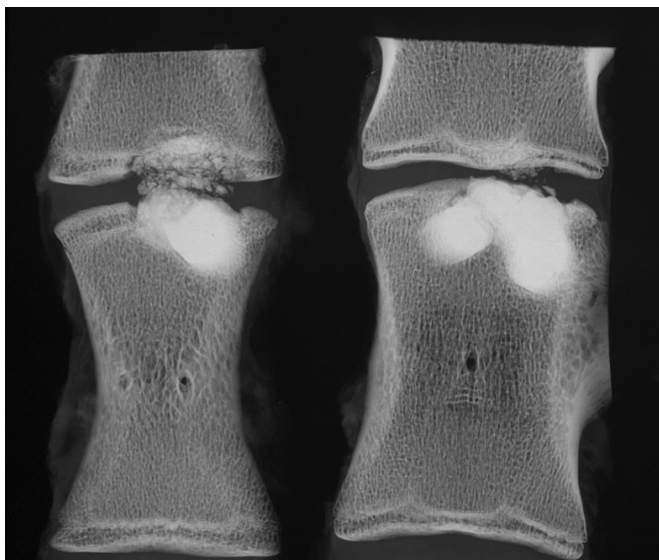
**Abb. 10a:** HR-Kontaktmakroradiographie einer 4 mm dicken Präparatscheibe (Spongiosa-Gruppe): Fehlende Knochenneubildung ( $n = 5$ ).



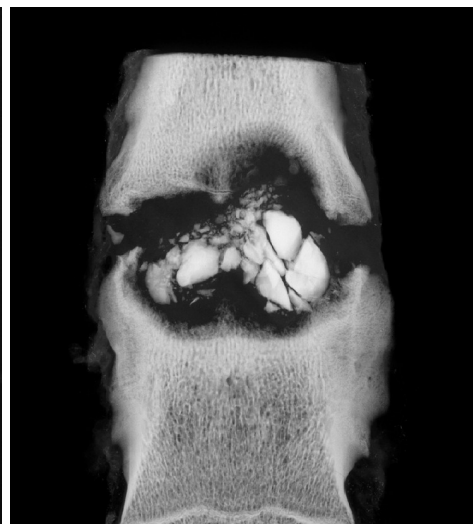
**Abb. 10b:** HR-Kontaktmakroradiographie einer 4 mm dicken Präparatscheibe (Spongiosa-Gruppe): Intervertbrale Knocheninseln ( $n = 4$ ).

gekennzeichnet sind. Vier fallen durch ossäres Gewebe im Defektbereich der Wirbelkörper auf, drei durch knöcherne Strukturen ventral oder lateral des Intervertebralraumes. Osteolysen werden nicht beobachtet.

Die Zement-Gruppe präsentiert sich mit einer einseitigen und einer beidseitigen Wirbelkörperperfusion. Die übrigen zehn Tiere dieser Gruppe weisen eine mehr oder weniger ausgeprägte Resorption und Fragmentierung des eingebrachten Knochenzementes auf. Die Hydroxylapatit-Plombe hat einen homogen milchigen Aspekt. Charakteristisch ist die Art der Fragmentierung, die sich mit einer intervertebral verlaufenden horizontalen Bruchlinie darstellt, während der intravertebrale Anteil der Plombe intakt ist (Abb. 11a). Vier der Tiere haben Knocheninseln gebildet ohne Überbrückung der Defektzone. Es werden vier Fälle von Osteolyse beobachtet (Abb. 11b).

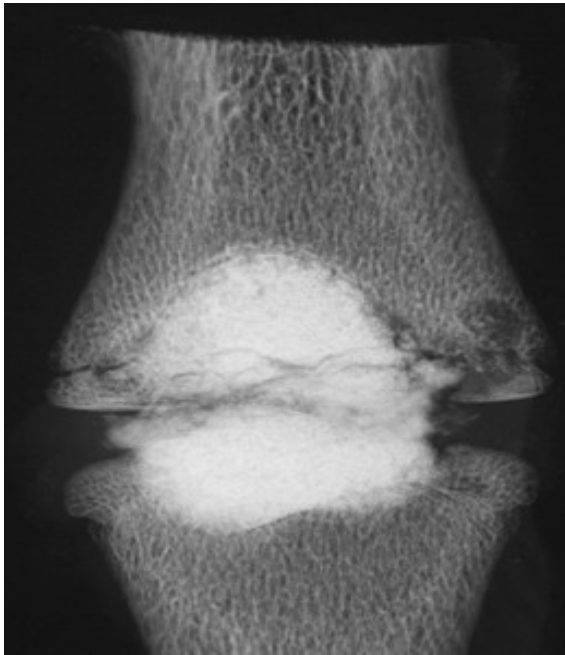


**Abb. 11a:** HR-Kontaktmakroradiographie zweier je 4 mm dicker Präparatscheiben (Hydroxylapatit-Gruppe): Fragmentierung des Zements mit intervertebraler horizontaler Bruchlinie, keine Fragmentierung intravertebral.



**Abb. 11b:** HR-Kontaktmakroradiographie einer 4 mm dicken Präparatscheibe (Hydroxylapatit-Gruppe): Osteolyse der an den erheblich fragmentierten Zement angrenzenden Wirbelkörperregionen (n = 4).

In der OP-1-Hydroxylapatit-Gruppe werden zehn Wirbelkörperfusionen bei erheblicher Knochenneubildung verzeichnet, davon sind sechs als bilateral und vier als unilateral nachweisbar. In den beiden Fällen ohne Fusion ist es zu vergleichbarer Knochenneubildung im Zwischenwirbelspalt gekommen, jedoch ohne kontinuierliche Verbindung zwischen den beiden Wirbelkörperendplatten. Die Komposit-Plombe erscheint inhomogen, ihre poröse Struktur ist selbst ohne vergrößernde Hilfsmittel leicht erkennbar. Es findet sich zwar auch in dieser Gruppe eine horizontale Bruchlinie, doch die zusätzliche ausgeprägte Fragmentierung intervertebral ist nicht vorhanden. Im Falle der Fusionen verläuft die Bruchlinie diskontinuierlich. Die Unterbrechung wird



**Abb. 12:** HR-Kontaktmakroradiographie einer 4 mm dicken Präparatscheibe (OP-1-Hydroxylapatit-Gruppe): Unilaterale Fusion (n = 4) mit histologisch erwiesener ossärer Integration der gesamten Kompositmasse und diskontinuierlich verlaufender, zwischenzeitlich durchbaurer Kompositbruchlinie.

hervorgerufen durch röntgendichtes Material (Abb. 12), das sich in der histologischen Untersuchung als knöchern durchbaurer Zement erweist. Auf die histologischen Ergebnisse wird in dieser Arbeit nicht näher eingegangen, es sei an dieser Stelle auf Arbeiten von Prof. Dr. med. G. Delling von der Universität Hamburg verwiesen. Statt zu einer ausgeprägten Resorption des eingebrachten Materials ist es zu einer Integration der Materialfragmente gekommen. Es kommen keine Osteolysen vor. Die Ergebnisse sind in Tabelle 3 zusammengefaßt, Tabelle 4 zeigt die statistische Analyse des Fusionsgrades anhand einer Vier-Punkte-Bewertung (Anhang: Tabelle A4).

**Tabelle 3:**

Fusionsraten der Versuchsgruppen (makroskopische Auswertung der Kontaktmakroradiographien und Makrophotographien).

Gruppe	Fusionsrate	Signifikanz
Spongiosagruppe (S)	1/10	S/H: p = 0,33119
Hydroxylapatit-Gruppe (H)	2/12	
OP-1-Hydroxylapatit-Gruppe (O)	10/12	O/S: p = 0,00005 O/H: p = 0,00019

**Tabelle 4:**

Statistische Analyse des Fusionsgrades auf der Basis einer Vier-Punkte-Bewertung der röntgenologisch objektivierbaren Fusion.

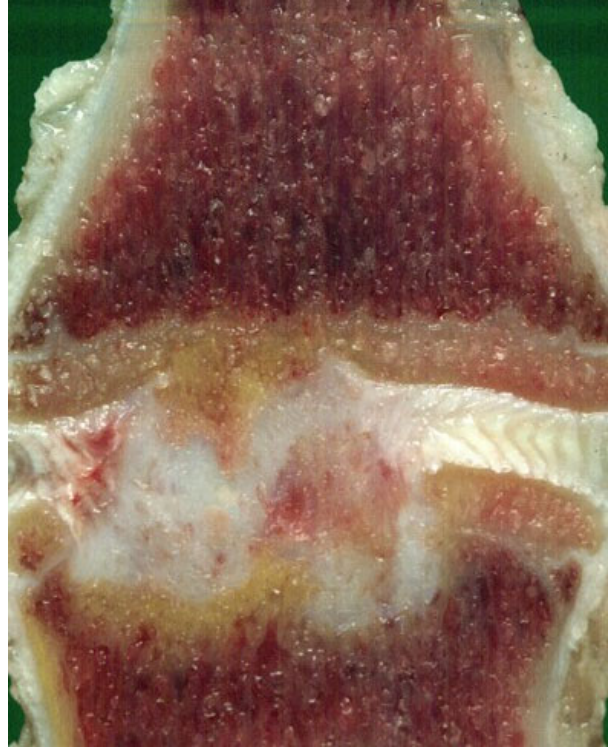
Gruppe	Mittelwert	Standardabweichung	Signifikanz
Spongiosagruppe (S)	0,60	0,66	S/H: p = 0,33892
Hydroxylapatit-Gruppe (H)	0,75	0,92	
OP-1-Hydroxylapatit-Gruppe (O)	2,33	0,75	O/S: p = 0,00001 O/H: p = 0,00012

Punkteschlüssel: 0 = keine röntgendichte Strukturen im Intervertebralspalt, 1 = vereinzelte röntgendichte inselartige Areale, 2 = unilaterale Überbrückung des Intervertebralspalt durch röntgendichtes Material, 3 = bilaterale Überbrückung des Intervertebralspalt durch röntgendichtes Material

### 3.2.5 Makrophotographische Ergebnisse und Fluorochromsequenzanalyse

#### 3.2.5.1 Semiquantitative makromorphologische Analyse

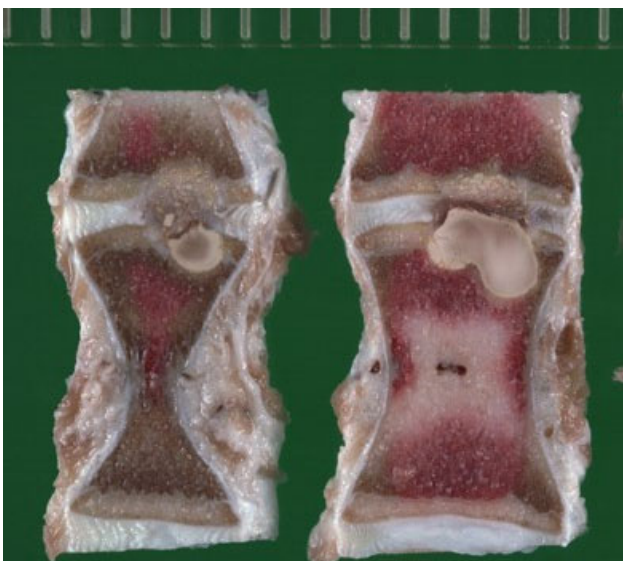
Die makroskopisch-histologische Untersuchung der Makrophotographien zeigt bei den Präparaten der Spongiosa-Gruppe eine unilaterale und neun unterbliebene Fusionen. Intervertebral sind in allen Präparaten verbliebene Spongiosa und knorpelartig erscheinendes Gewebe zu sehen sowie in acht der zehn Fälle Knochenformationen, die fingerförmig über das ursprüngliche Niveau der Endplatten hinausreichen und somit als Neubildung oder zumindest Integration der eingebrachten Spongiosa zu deuten sind (Abb. 13). Keine der Photographien enthält Hinweise auf Entzündungsreaktionen.



**Abb. 13:** Makrophotographie einer 4 mm dicken Präparatscheibe (Spongiosa-Gruppe): Fingerförmig in den Intervertebralraum reichende Knochenneubildung bzw. Integration der transplantierten Spongiosa, keine Fusion, im ehemaligen Defektbereich wenige verbliebene avitale Spongiosareste und metaplastisches Knorpelgewebe.

In der Hydroxylapatit-Gruppe liegen eine unilaterale, eine bilaterale und zehn unterbliebene Fusionen vor. Die Makrophotographien zeigen eine horizontal verlaufende Bruchlinie durch den Zement und eine Fragmentierung der Zementplombe im intervertebralen Bereich mit unterschiedlich ausgeprägter Resorption der Bruchstücke. Intravertebral ist der Zement intakt. Intervertebral befindet sich in neun Fällen makroskopisch sichtbar knorpeliges Gewebe (Abb. 14). Bei vier Präparaten imponiert eine vorherrschende Entzündungsreaktion mit Hyperämie, stärkerer Zementplombenfragmentierung und Umkapselung der Zementzone mit Bindegewebe. Die angrenzenden Wirbelkörperanteile sind osteolytisch verändert (Abb. 15). Mikrobiologisch konnte kein Erreger isoliert werden. In den beiden fusionierten Fällen ist keine Zementplombenfragmentierung oder

-resorption vorhanden, der Bruchspalt im Zement ist ein- bzw. beidseitig knöchern durchbaut mit einer ossären Kontinuitätsüberbrückung des Intervertebralraumes.



**Abb. 14:** Makrophotographie zweier 4 mm dicker Präparatscheiben (Hydroxylapatit-Gruppe): Zementplombenfragmentierung und -resorption, Bindegewebsformationen umgeben die Fragmente.



**Abb. 15:** Makrophotographie einer 4 mm dicken Präparatscheibe (Hydroxylapatit-Gruppe): Entzündlich verändertes Präparat mit ausgeprägter bindegewebiger Umscheidung des erheblich fragmentierten Zements.

Bei den zwölf Schafen der OP-1-Hydroxylapatit-Gruppe liegt in zehn Fällen eine Fusion in Form einer beidseitigen (n = 6) oder einseitigen (n = 4) knöchernen Überbrückung des Intervertebralspalt vor. Auch in den Präparaten dieser Gruppe findet sich eine den Zwischenwirbelraum horizontal durchziehende Kompositbruchlinie, die aber in den erfolgreich fusionierten einen diskontinuierlichen Verlauf zeigt und von neugebildetem Knochen durchbaut ist (Abb. 16). Die beiden Präparate ohne kontinuierliche Brückenbildung zeigen ein vergleichbares Ausmaß an Knochenneubildung. Das eingebrachte Fremdmaterial ist nicht fragmentiert wie in der Hydroxylapatit-Gruppe, es findet sich makroskopisch keine intervertebrale Knorpelformation. Die Zementplomben sind von



**Abb. 16:** Makrophotographie einer 4 mm dicken Präparatscheibe (OP-1-Hydroxylapatit-Gruppe): Knöcherne Fusion bei ossär integrierter Kompositmasse mit umgebender ockerfarbener Ossifikationszone.

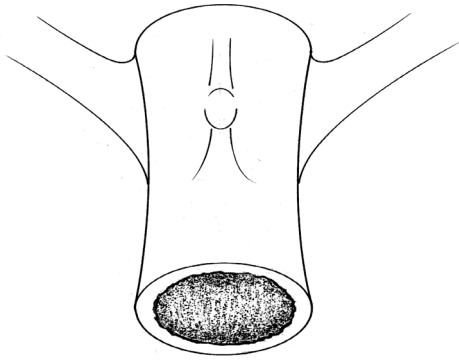
makroskopisch sichtbaren Vakuolen unterschiedlicher Größe durchsetzt. Diese entstanden aus den ursprünglich mit dem mikroverkapselten, mittlerweile freigesetzten OP-1 bestückten Vakuolen. Die mikroskopisch-histologische Untersuchung zeigt in diesen Vakuolen Kapillaren als morphologisches Pendant einer stattgehabten Biointegration des Fremdmaterials und Vorstufen von Blutzellen als Zeichen der hämatopoetischen Erschließung des Plombenareals im Sinne von Blutbildungsstätten. Entzündungsreaktionen oder osteolytische Veränderungen sind nicht aufgetreten. Die Fusionsraten entsprechen denen der radiologischen Auswertung und sind in Tabelle 3 wiedergegeben, die statistische Auswertung des Fusionsgrades anhand histologischer Kriterien zeigt Tabelle 5 (Anhang: Tabelle A4).

**Tabelle 5:** Statistische Analyse des Fusionsgrades auf der Basis der semiquantitativen Auswertung der Makrophotographien gemäß Tabelle 2.

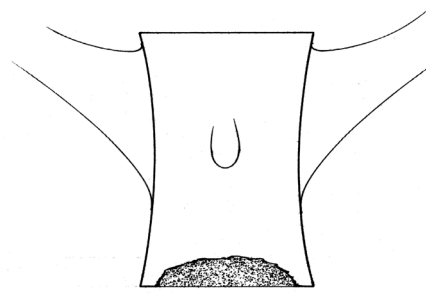
Gruppe	Mittelwert	Standardabweichung	Signifikanz
Spongiosagruppe (S)	1,20	0,60	S/H: p = 0,33356
Hydroxylapatit-Gruppe (H)	1,42	1,50	
OP-1-Hydroxylapatit-Gruppe (O)	4,42	0,76	O/S: p < 0,00001 O/H: p < 0,00001
Punkteschlüssel: Tabelle 2			

### 3.2.5.2 Quantitative makromorphometrische Analyse

Die an Makrophotographien computerunterstützt gemessenen Einzelergebnisse der Bandscheibenausräumung der insgesamt 34 Versuchstiere sind in Tabelle A5 (Anhang) gezeigt. Das Ausmaß der Bandscheibenausräumung in der Spongiosa-Gruppe beträgt  $81,51 \pm 8,18$  % (Abb. 17). Vergleiche der Qualität der Bandscheibenausräumung zwischen Spongiosa- und Hydroxylapatit-Gruppe bzw. Spongiosa- und OP-1-Hydroxylapatit-Gruppe ergeben keine signifikante Verbesserung im Sinne einer learning curve ( $60,47 \pm 14,16$  % (H) und  $62,97 \pm 4,65$  % (O); Anhang: Kapitel 7.2 und Tabellen A6, A7, A14).



**Abb. 17:** Schematische Darstellung der durchschnittlichen L4/5-Bandscheibenausräumung in der Spongiosa-Gruppe ( $81,51 \pm 8,18 \%$ ).



**Abb. 18:** Schematische Darstellung des Dekortikationsausmaßes der L4-Grundplatte in der Spongiosa-Gruppe ( $13,81 \pm 2,45 \%$ ).

Die durch die Grundplattendekortikation von L4 erreichte jeweilige Eindringtiefe in den Wirbelkörper ist in Tabelle A8 (Anhang) dargestellt. Das im Durchschnitt in der Spongiosa-Gruppe gemessene mittlere Dekortikationsausmaß beträgt  $13,81 \pm 2,45 \%$  (Abb. 18, Anhang: Tabelle A14). Wiederum besteht kein signifikanter Unterschied beim Vergleich der Hydroxylapatit-Gruppe ( $14,30 \pm 6,72 \%$ ) mit den beiden anderen Gruppen. Der Unterschied zwischen Spongiosa-Gruppe und OP-1-Komposit-Gruppe ( $17,62 \pm 2,64 \%$ ) ist allerdings signifikant (Anhang: Kapitel 7.3 und Tabellen A9, A10, A14).

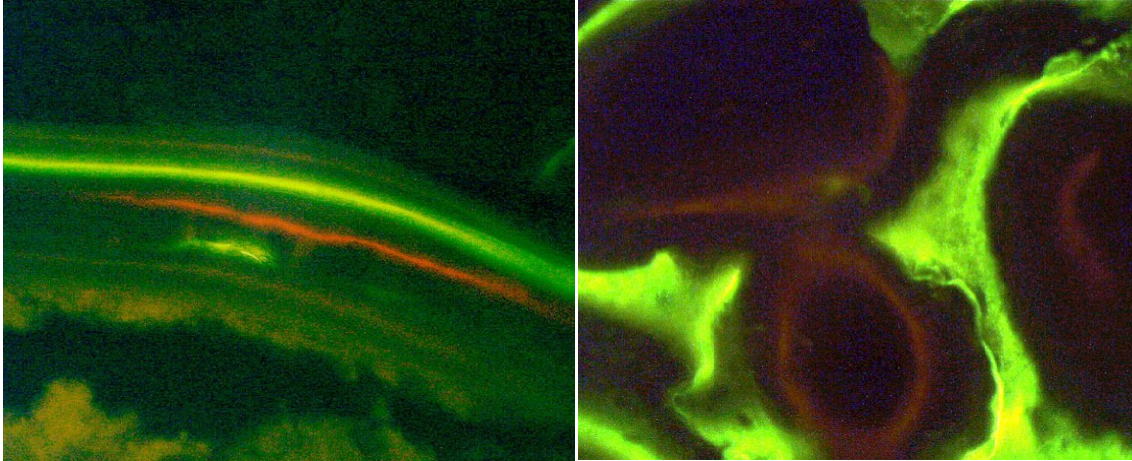
Die durch computerassistierte Planimetrie bestimmten Flächen neugebildeten Knochens um die Zementplombe der Hydroxylapatit-Gruppe messen im Mittel  $19,98 \pm 20,95 \text{ mm}^2$ , in der OP-1-Hydroxylapatit-Gruppe  $69,59 \pm 23,51 \text{ mm}^2$ . Dieser Unterschied ist auf dem Signifikanzniveau von  $p < 0,05$  hochsignifikant ( $p = 0,00003$ , Wilcoxon-Test). Die mittlere Flächenausdehnung der Hydroxylapatit-Fragmente beträgt  $88,92 \pm 31,39 \text{ mm}^2$  (Hydroxylapatit-Gruppe), die der Kompositmasse  $123,34 \pm 23,18 \text{ mm}^2$  (rhOP-1-Hydroxylapatit-Gruppe). Auch hier besteht ein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Gruppen ( $p = 0,00801$ , Wilcoxon-Test). Die Daten gehen aus Kapitel 7.4 und Tabellen A11, A12, A14 des Anhangs hervor.

### 3.2.5.3 Qualitative Fluorochromsequenzanalyse

Die histologischen  $15\text{-}\mu\text{m}$ -Schliffe zeigen unter dem UV-Mikroskop an den Wirbelkörpern L4 und L5 drei Farbbande entsprechend den postoperativ intravenös verabreichten Fluoreszenzfarbstoffen Xylenol-Orange, Calcein-Grün und Doxycyclin-Gelb. Innerhalb des Intervertebralspalttes, dort wo postoperativ eine Knochenneubildung stattgefunden



hat, finden sich allerdings nur Banden der Farbstoffe Calcein-Grün und Doxycyclin-Gelb. Da die Applikation dieser Fluorochromfarbstoffe auf die vierte und sechste postoperative Woche zurückdatiert, muß die Knochenneubildung nach der zweiten, aber vor der vierten Woche begonnen haben (Abb. 19a, 19b).



**Abb. 19a, 19b:** UV-Licht-mikroskopische Mikrophotographien zweier histologischer 15- $\mu$ m-Schliffe (100fache Vergrößerung): Darstellung des Randbereiches von L4 mit gut sichtbaren, parallel verlaufenden Fluoreszenzbanden der drei verwendeten Fluoreszenzfarbstoffe Xylenol-Orange, Calcein-Grün und Doxycyclin-Gelb (a) und der Fusionsregion L4/5 mit fehlender Xylenol-Orange-Bande (Applikationszeitpunkt: Zweite postoperative Woche) (b).



#### 4. Diskussion

Die Wahl des Schafes als Versuchstier für Fragestellungen zu spinalen Fusionstechniken hat sich in zahlreichen experimentellen Studien bewährt.<sup>35,55,56</sup> Die Wirbelkörpergröße und die anatomischen Verhältnisse der thorakolumbalen Wirbelsäule sind mit der Situation beim Menschen vergleichbar, auch das Schaf hat eine Lendenlordose, die physiologischen Restaurationsvorgänge am Knochen kommen denen des menschlichen Knochens sehr nahe.<sup>56</sup> Selbst im biomechanischen Bereich weist die Wirbelsäule des Schafes trotz der zunächst problematisch erscheinenden Wahl eines Vierbeiners als Modell für den Menschen und seine statischen Gegebenheiten überraschende Parallelen zu den Belastungsverhältnissen an der menschlichen Wirbelsäule auf, wie Untersuchungen von Wilke, Kettler, Claes<sup>55</sup> zeigen.

Der Zeitraum bis zur Tötung der Tiere wurde auf acht Wochen festgelegt. Durch den relativ frühen Tötungszeitpunkt bedingt sahen wir uns nicht mit dem Problem einer in allen Fällen bereits abgeschlossenen Fusion konfrontiert, die außerdem den Wert einer sequentiellen Polychrommarkierung zunichte machen würde, weil in einem solchen Fall die späten Färbungen keine neuen Ergebnisse brächten. Die Fluorochromsequenzanalyse erlaubt die Beurteilung der Verhältnisse zwischen L4 und 5 nicht nur im Sinne einer Momentaufnahme acht Wochen nach dem Eingriff, sondern gewährt dem Betrachter darüber hinaus Einblick in frühere Zwischenschritte des Fusionsprozesses, zu drei unterschiedlichen Zeitpunkten der beginnenden und fortschreitenden Fusion. Auf diese Weise kann die Dynamik des ossären Umbaus während des Zeitraumes seiner höchsten Aktivität engmaschig nachvollzogen werden.

Die bisherigen Bemühungen um eine dauerhafte Wiederaufrichtung im sagittalen Wirbelsäulenprofil nach Wirbelsäulenverletzungen waren bislang nicht erfolgreich. Es existiert eine Reihe von Methoden zur interkorporellen Fusion meist mit ventralem transthorakalem bzw. retroperitonealem Zugangsweg für die ventrale Abstützung, auch ein - in Europa allerdings kaum übliches - posterolaterales oder transforaminales Vorgehen ist möglich. Doch weder die Transplantation von Spongiosa zur Abstützung der vorderen Säule noch die Verwendung eines biointegrierten Kalzium-Phosphat-Zements führen zu der gewünschten dauerhaften Höhenkorrektur im Intervertebralspalt: Der durch Resorption und Osteonekrose zu Lasten des Spongiosatransplantats gehende Korrekturverlust bis zur Nachuntersuchung beträgt ca. 75 %, <sup>54</sup> der Zement weist ebenfalls erhebliche resorptionsbedingte Volumenverluste auf<sup>4</sup>. In beiden Fällen erleidet die

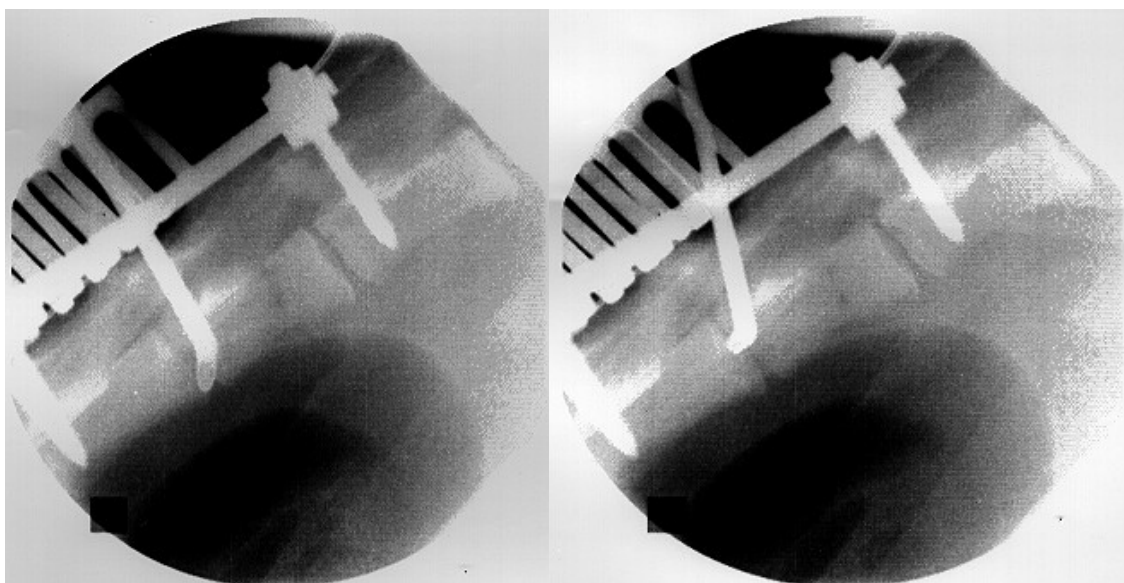
Wirbelsäule nach Fixateurentnahme einen Korrekturverlust. Hinzu kommen bei Verwendung des Knochenzements im Zuge der mechanischen Belastung eine Zerrüttung des Zements durch einwirkende Scher- und Rotationskräfte, die der Fixateur interne nicht verhindern kann, und damit ein Verlust der primären axialen Stabilität der Zementplombe. Typische Probleme der Knochenspanmethode sind Spandislokation, Spanfraktur, Kollaps und Sequesterbildung nach mangelnder ossärer Integration mit ausbleibender Fusion,<sup>13</sup> die entnahmeassoziierte Morbidität<sup>2,14,29,48,59</sup> sowie die Gefahr des Akquirierens übertragbarer Krankheiten im Falle von allogenen Knochentransplantaten.

Auch ventral eingebrachte winkelstabile Plattensysteme lösen das Problem der mangelhaften Stabilität im betroffenen Bewegungssegment nicht, weil der spongiöse Knochen im thorakalen oder lumbalen Wirbelkörper per se keine stabile Verankerungsmöglichkeit bietet<sup>3,41</sup> - nicht beim jungen und noch viel weniger beim osteoporotischen alten Knochen. Eine bessere Verankerung erlauben unter Umständen Klingenplattensysteme.

Die besten Ergebnisse werden im Moment mit der Cage-Technik erzielt. Zwar können die Prothesen auch aus ihrer vorderen interkorporellen Position dislozieren, das Problem einer resorptionsbedingte Höhenminderung des Implantates entfällt hier jedoch. Falls eine knöcherne Durchbauung allerdings ausbleiben sollte, wird der Erfolg dieser relativ jungen Methode von der mechanischen Belastbarkeit und Haltbarkeit der verwendeten Materialien abhängen. Dies wirkt sich besonders beim jungen Patienten limitierend auf die klinische Indikation aus. Bislang sind keine Aussagen über Langzeitergebnisse zur Fremdkörperverträglichkeit, bezüglich Statik und Funktion verfügbar.<sup>30,31</sup>

Die in unserem Versuch verwendete Operationsmethode (transpedikuläre lumbale interkorporelle Fusion, TLIF) bietet wegen des transpedikulären Zugangsweges vielfache Vorteile gegenüber den übrigen etablierten Techniken mit anteriorem oder kombiniert antero-posteriorem Zugang: Kürzere Operationszeiten, eine verminderte Patientenmorbidität, einen geringeren Personalbedarf und niedrige Kosten-Nutzen-Relation.<sup>9,15,21,24,26,33,34</sup> Sie basiert im wesentlichen auf dem aus den 80er Jahren stammenden Daniauxschen Prinzip des solitären dorsalen transpedikulären Vorgehens.<sup>12</sup> Doch auch bei dieser Technik zeigte sich ein Korrekturverlust des Wirbelsäulenprofils in der Sagittalebene nach Entfernung des Fixateur interne.<sup>27,54</sup> Durch virtuelle Computersimulation wurde eine unausgereifte Operationstechnik als möglicherweise ursächlich für das Scheitern dieser Methode angeschuldigt.<sup>57</sup> Eine unzureichende Bandscheibenausräumung und Endplattendekortikation unter fluoroskopischer Kontrolle und ein Ausbleiben der Transplantatintegration mit nachfolgender Transplantatnekrose durch

fehlenden Anschluß an das vaskuläre System.<sup>45</sup> Durch die verfeinerte Technik der Bandscheibenausräumung und Endplattendekortikation kann zwar ein besseres Resultat erzielt werden, die Häufigkeit herbeigeführter Fusionen bleibt allerdings - zumindest bei gleichzeitiger dorsaler Instrumentierung - von einer suffizienten Dekortikation unberührt.<sup>25</sup> Anstelle einer lediglich fluoroskopischen Kontrolle mit dem C-Bogen, bei der die Verhältnisse im interessierenden Zwischenwirbelspalt L4/5 nur in Projektion zur Darstellung kommen, erlaubt die Pedikuloskopie die direkte Sicht der Strukturen im Intervertebralraum per Videokette. Die beiden hierfür erforderlichen transpedikulären Bohrkanäle können sowohl als Arbeits- als auch als Sichtkanal genutzt werden, wodurch die Effizienz der Bandscheibenausräumung zusätzlich erhöht wird, da die Instrumentenreichweite bei einseitigem Einsatz begrenzt wäre. Mit der verbesserten Methodik ist jetzt eine Bandscheibenausräumung von durchschnittlich  $67,54 \pm 13,43$  % [40,88-95,31 %] möglich (Abb. 16, Anhang: Tabellen A5, A14). Daß diese Prozentzahl nicht nur die Verhältnisse im zweidimensionalen Schnitt widerspiegelt, sondern für das gesamte von Bandscheibengewebe befreite intervertebrale Volumen zutrifft, läßt sich bereits intraoperativ durch die Kombination aus Durchleuchtung und Pedikuloskopie sichern: Nachdem der Operateur mit Hilfe der Pedikuloskopie unter direkter Sichtkontrolle ein Transplantat- bzw. Zementlager im Intervertebralraum geschaffen hat, das ausreichend gründlich von Bandscheibenmaterial befreit ist, läßt sich die relative Ausdehnung des Bandscheibendefektes in antero-posteriorer Richtung im Vergleich zur Wirbelkörpertiefe fluoroskopisch im seitlichen Strahlengang beurteilen (Abb. 20a, 20b).



**Abb. 20a, 20b:** Intraoperative Durchleuchtungssequenz: Der Fixateur interne ist implantiert, ein Rongeur dient der Darstellung der anterioren (a) und posterioren (b) Ausdehnung des Bandscheibendefektes nach Bandscheibenausräumung.

Um ein Überleben des transplantierten Spongiosamaterials zu gewährleisten, ist eine ausreichende vaskuläre Versorgung notwendig. Durch eine suffiziente Dekortikation der an den Zwischenwirbelraum L4/5 angrenzenden Wirbelkörperendplatten kommt es zur Arrosion von Blutgefäßen und zu kapillären Blutungen (Abb. 2b) mit anschließender Gefäßeinsprossung in das Transplantat. Die optimierte Operationstechnik ermöglicht unter Sicht eine Endplattendekortikation von durchschnittlich  $15,33 \pm 4,80$  % der Wirbelkörperhöhe bei einem Kortikalisanteil von  $2,8 \pm 0,5$  % der gesamten Wirbelkörperhöhe (Anhang: Tabellen A13 und A14).

Die vielversprechenden Ergebnisse der verbesserten Operationstechnik sind jedoch offensichtlich kein Garant für eine erfolgreiche Wirbelkörperfusion. In der Spongiosa-Gruppe kommt es lediglich in einem von zehn Fällen zu einer Fusion. Knop, Blauth, Herlein et al. (1997) berichten von einer interkorporellen Einheilung der transpedikulären Spongiosaplastik bei einem Drittel der Patienten.<sup>28</sup> Wichtig für die erfolgreiche Integration von transplantierte Spongiosa ist neben einer genügend großen Kontaktfläche zum dekortizierten Knochen, der suffizienten Menge und Güte des Transplantates und geeigneten Druckverhältnissen im Spongiosalager die suffiziente primäre axiale Belastungsstabilität.<sup>16</sup>

Arbeitet man mit Knochenersatzstoffen anstelle von Spongiosa, sind folgende Anforderungen an das Material zu stellen: Es muß den inter- und intravertebral auftretenden biomechanischen Belastungsverhältnissen standhalten und transpedikulär applizierbar sein. Der von uns verwendete osteokonduktive Hydroxylapatit-Zement ist von pastenartiger Konsistenz und entwickelt eine Druckstabilität, die der eines gesunden Lendenwirbelkörpers gleichkommt. Doch auch in der Hydroxylapatit-Gruppe sind nur in zwei von zwölf Fällen erfolgreiche Wirbelkörperfusionen zu verzeichnen. Die acht Wochen postoperativ angefertigten CT- und HR-Kontaktröntgenbilder zeigen eine multiple Frakturierung und Resorption der Zementplombe im intervertebralen Anteil der Plombe ohne Sinterungszeichen. Ausgehend von der gemäß den biomechanischen Daten zugesicherten suffizienten Kompressionsstabilität des Zementes ist dessen Zerrüttung wohl am ehesten auf die im Intervertebralraum zusätzlich auftretende Seitneigungs- und Rotationsbelastung zurückzuführen.<sup>55</sup> Die beschriebene horizontale Bruchlinie im Zement, die in jedem Präparat nachweisbar ist, rührt vermutlich von einem initialen postoperativen Belastungsereignis, während die multiple Fragmentierung das Ergebnis nachfolgender Bewegungen ist. Entstehen dabei Partikel im Größenordnungsbereich von einigen Mikrometern, reagiert der Körper mit einer Fremdkörperabräumung durch

Makrophagen, was zu einer sterilen Entzündungsreaktion mit Zementresorption führt. Die HR-Kontaktröntgenbilder von vier Präparaten dieser Gruppe zeigen osteolytische Veränderungen, deren Ursache vermutlich eine derartige sterile Entzündungsreaktion ist. Der intravertebrale Zementanteil hingegen ist durch seine vor Scherkräften geschützte Lage erheblich weniger von Fragmentationsprozessen betroffen. Es zeigt sich, daß ein Knochenersatzmaterial mit ausreichender axialer Kompressionsstabilität, aber fehlender Stabilität gegen Scherkräfte keine Verbesserung, allenfalls eine Alternative zur Verwendung autologen Knochens darstellt. Ein Knochenersatzmaterial mit den erforderlichen Eigenschaften steht zur Zeit nicht zur Verfügung.

Kombiniert man stattdessen osteokonduktiven Hydroxylapatit-Zement mit osteoinduktivem Wachstumsprotein (rhOP-1), so ist eine erfolgreiche Wirbelkörperfusion signifikant häufiger erreichbar. Zehn der zwölf Tiere der rhOP-1-Hydroxylapatit-Gruppe zeigen eine erfolgreiche Fusion. Zwar wurde bereits mit Kombinationen aus Wachstumsprotein und Carrier an der Wirbelsäule experimentiert, jedoch handelte es sich hierbei nicht um injizierbare Zusammensetzungen<sup>7,10,18,22,23,35,39,44</sup> oder es fehlte die erforderliche Druckstabilität des Präparates. Zwar findet sich eine horizontale Bruchlinie auch im rhOP-1-Zement-Gemisch, jedoch kommt es zu keiner weiteren Fragmentierung der Kompositmasse mit resorptionsbedingten Spaltbildungen. Die rhOP-1-Zementplombe zeigt sich auf den HR-Kontaktröntgenbildern als inhomogenes Areal. Mit bloßem Auge ist die poröse Struktur erkennbar. Die Hydroxylapatit-Plombe hingegen hat ein homogenes milchiges Aussehen. Anhand der kontaktradiographischen Bilder sind die Präparate problemlos den Behandlungsgruppen zuzuordnen. Histologische Untersuchungsergebnisse dokumentieren eine knöcherne Durchbauung und Biointegration der Kompositmasse.

Die geringere Restzementmenge in der Hydroxylapatit-Gruppe verglichen mit der in der rhOP-1-Hydroxylapatit-Gruppe erklärt sich durch stärkere Resorptionsvorgänge vor allem in der intervertebralen Region. Demgegenüber weist die rh-OP-1-Zement-Komposit-Gruppe eine signifikant höhere Menge an neugebildetem Knochen in der Ossifikationszone um den Zement auf.

Ein Vergleich der berechneten Standardabweichungen zwischen den verschiedenen Versuchsgruppen zeigt für fast alle untersuchten Parameter die höchsten Streuwerte in der Hydroxylapatit-Gruppe. Da Vergleichbarkeit innerhalb und zwischen den Gruppen vorausgesetzt wird, läßt sich das hohe Streumaß in Gruppe 2 nur durch eine behandlungsspezifische hohe Variabilität der Therapieresultate erklären. Es kommen hier

sowohl erfolgreiche Fusionen, als auch instabile Bewegungssegmente mit osteolytischen Veränderungen und Entzündungszeichen vor. Dagegen ergeben sich für die dritte Gruppe durchweg gute Resultate, da hier selbst der niedrigste planimetrisch gemessene Wert der Knochenneubildung ( $32,37 \text{ mm}^2$ ) bei unterbliebener Fusion höher ist als der Mittelwert der Knochenneubildung in der Hydroxylapatit-Gruppe  $19,98 \text{ mm}^2$ .

Dadurch daß die Zuordnung der Schafe zu den Behandlungsgruppen nicht randomisiert erfolgte, sondern die Tiere der Spongiosa-Gruppe zuerst, dann die der Hydroxylapatit-Gruppe und zuletzt die der rhOP-1-Gruppe operiert wurden, liegt es nahe, die Vergleichbarkeit der Versuchsergebnisse zu kritisieren und das bessere Abschneiden der dritten Gruppe auf die vermeintlich verbesserten Fähigkeiten des Operateurs im Sinne einer learning-curve zurückzuführen. Doch zeigen die makromorphometrischen Ergebnisse der Bandscheibenausräumung als Indikator der Bonität der operativen Behandlung keine signifikanten Unterschiede im Gruppenvergleich im Sinne einer kontinuierlichen Verbesserung (Anhang: Kapitel 7.2).

Der Grund für das Ausbleiben einer Fusionsrate von 100 % in der dritten Gruppe liegt vielleicht in einer eher niedrigen Dosierung des verwendeten Wachstumsproteins rhOP-1 von 1,6 mg pro Schaf. Eine verspätete Fusion nach der achten Woche ist für die beiden betroffenen Schafe durchaus wahrscheinlich.

Ob die beschriebene Vorgehensweise sich allerdings auch klinisch am frakturierten Wirbelkörper bewährt, kann nicht vorhergesagt werden. Die Bandscheibenausräumung wird sich sicherlich schwieriger gestalten als bei intaktem Diskus. Erforderlich sind klinische Erprobungen, da die vorgestellten tierexperimentellen Ergebnisse nicht zwingend auf den Menschen übertragbar sind.

## 5. Zusammenfassung

- (1) Zum ersten Mal ist im Großtiermodell eine Lendenwirbelkörperfusion mit alleinigem transpedikulärem Zugang (transpedikuläre lumbale interkorporelle Fusion, TLIF) erfolgreich durchgeführt worden.
- (2) Die Operationstechnik benötigt nur einen posterioren Zugang, ist minimal invasiv und geht u.a. durch das Wegfallen der Spongiosaentnahme am Beckenkamm mit einer geringen Morbidität einher.
- (3) Die Pedikuloskopie wird als neues Hilfsmittel für ein besseres Operationsergebnis eingeführt.
- (4) Es werden Gründe für das Versagen von Spongiosatransplantat und Hydroxylapatit-Zement als Knochenersatz aufgezeigt und die erfolgreiche Fusion unter Verwendung eines rhOP-1-Hydroxylapatit-Komposites beschrieben.
- (5) Zum ersten Mal wird die Verwendung eines osteokonduktiv und osteoinduktiv wirkenden Knochenersatzmaterials beschrieben, das folgende Eigenschaften auf sich vereinigt: Injektabilität, verlässliche Eindämmung und verzögerte Freisetzung von rhOP-1 durch Mikroverkapselung sowie primäre biomechanische axiale Kompressionsstabilität.
- (6) Die Operationstechnik ist vollständig auf CT-unterstützte Navigation übertragbar zur Verringerung intraoperativer Strahlenbelastung für das OP-Personal.





## 6. Literaturverzeichnis

1. Arrington ED, Smith WJ, Chambers HG, Bucknell AL, Davino NA. Complications of iliac crest bone graft harvesting. *Clin Orthop* 1996;329:300-9.
2. Banwart JC, Asher MA, Hassanein RS. Iliac crest bone graft harvest donor site morbidity. A statistical evaluation. *Spine* 1995;20:1055-60.
3. Beisse R, Potulski M, Ufer B, Bühren V. Thorakoskopische Behandlung von Frakturen der Brust- und Lendenwirbelsäule. Operationstechnik und Frühergebnisse von 100 Fällen. *Arthroskopie* 1999;12:92-7.
4. Blattert TR, van Seil B, Wagner R, Weckbach A. Ventrale Abstützung von Frakturen der thorakolumbalen Wirbelsäule durch thorakoskopische Applikation eines Calciumphosphatzementes (abstr). 118. Kongreß der Deutschen Gesellschaft für Chirurgie, München, 2001.
5. Blauth M, Knop C, Bastian L. Brust- und Lendenwirbelsäule. In: Tscherne H, Blauth M (eds) *Unfallchirurgie - Wirbelsäule*. Springer, Berlin Heidelberg New York 1998;241.
6. Boden SD, Martin GJ Jr, Horton WC, Truss TL, Sandhu HS. Laparoscopic anterior spinal arthrodesis with rhBMP-2 in a titanium interbody threaded cage. *J Spinal Disord* 1998;11:95-101.
7. Boden SD, Martin GJ Jr, Morone M, Ugbo JL, Titus L, Hutton WC. The use of coralline hydroxyapatite with bone marrow, autogenous bone graft, or osteoinductive bone protein extract for posterolateral lumbar spine fusion. *Spine* 1999;24:320-7.
8. Boden SD, Moskovitz PA, Morone MA, Toribitake Y. Video-assisted lateral intertransverse process arthrodesis. Validation of a new minimally invasive lumbar spine fusion technique in the rabbit and nonhuman primate (rhesus) models. *Spine* 1996;21:2689-97.
9. Christensen FB, Bungler CE. Retrograde ejaculation after retroperitoneal lower lumbar interbody fusion. *Int Orthop* 1997;21:176-80.
10. Cook SD, Dalton JE, Tan EH, Whitecloud III TS, Rueger DC. In vivo evaluation of recombinant human osteogenic protein (rhOP-1) implants as a bone graft substitute for spinal fusions. *Spine* 1994;19:1655-63.
11. Cunningham BW, Kanayama M, Parker LM, Weis JC, Seftor JC, Fedder IL, McAfee PC. Osteogenic protein versus autologous interbody arthrodesis in the sheep thoracic spine. A comparative endoscopic study using the Bagby and Kuslich interbody fusion device. *Spine* 1999;24:509-18.
12. Daniaux H. Transpedikuläre Reposition und Spongiosaplastik bei Wirbelkörperbrüchen der unteren Brust- und Lendenwirbelsäule. *Unfallchirurg* 1986;89:197-213.
13. Emery SE, Hughes SS, Junglas WA, Herrington SJ, Pathria MN. The fate of anterior vertebral bone grafts in patients irradiated for neoplasm. *Clin Orthop* 1994;300:207-12.

14. Fernyhough JC, Schimandle JJ, Weigel MC, Edwards CC, Levine AM. Chronic donor site pain complicating bone graft harvesting from the posterior iliac crest for spinal fusion. *Spine* 1992;17:1474-80.
15. Fraser RD. Interbody, posterior, and combined lumbar fusions. *Spine* 1995;20:167S-77S.
16. Fuller DA, Stevenson S, Emery SE. The effects of internal fixation on calcium carbonate. Ceramic anterior spinal fusion in dogs. *Spine* 1996;21:2131-6.
17. Gertzbein SD. Scoliosis Research Society. Multicenter spine fracture study. *Spine* 1992;17:528-40.
18. Grauer JN, Patel TC, Erulkar JS, Troiano NW, Panjabi MM, Friedlaender GE. 2000 Young Investigator Research Award Winner: Evaluation of OP-1 as a graft substitute for intertransverse process lumbar fusion. *Spine* 2001;26:127-33.
19. Greenough CG, Peterson MD, Hadlow S, Fraser RD. Instrumented posterolateral lumbar fusion. Results and comparison with anterior interbody fusion. *Spine* 1998;23:479-86.
20. Greenough CG, Taylor LJ, Fraser RD. Anterior lumbar fusion: results, assessment techniques and prognostic factors. *Eur Spine J* 1994;3:225-30.
21. Hacker RJ. Comparison of interbody fusion approaches for disabling low back pain. *Spine* 1997;22:660-6.
22. Hecht BP, Fischgrund JS, Herkowitz HN, Penman L, Toth JM, Shirkhoda A. The use of recombinant human bone morphogenetic protein 2 (rhBMP-2) to promote spinal fusion in a nonhuman primate anterior interbody fusion model. *Spine* 1999;24:629-36.
23. Helm GA, Sheehan JM, Sheehan JP, Jane JA Jr, diPierro CG, Simmons NE, Gillies GT, Kallmes DF, Sweeney TM. Utilization of type I collagen gel, demineralized bone matrix, and bone morphogenetic protein-2 to enhance autologous bone lumbar spinal fusion. *J Neurosurg* 1997;86:93-100.
24. Humphreys SC, Hodges SD, Patwardhan AG, Eck JC, Murphy RB, Covington LA. Comparison of posterior and transforaminal approaches to lumbar interbody fusion. *Spine* 2001;26: 567-71.
25. Ishikawa S, Shin HD, Bowen JR, Cummings RJ. Is it necessary to decorticate segmentally instrumented spines to achieve fusion? *Spine* 1994;19:1686-90.
26. Isiklar ZU, Lindsey RW, Coburn M. Ureteral injury after anterior lumbar interbody fusion. A case report. *Spine* 1996;21:2379-82.
27. Knop C, Blauth M, Bastian L, Lange U, Becker T, Tscherne H. Frakturen der thorakolumbalen Wirbelsäule - Spätergebnisse nach dorsaler Instrumentierung und ihre Konsequenzen. *Unfallchirurg* 1997;100:630-9.
28. Knop C, Blauth M, Herlein S, Tscherne H. Klinische und computertomographische Spätergebnisse nach transpedikulärer Spongiosaplastik. *Hefte Unfallchirurg* 1997;268:200-203.

29. Kurz LT, Garfin SR, Booth RE Jr. Harvesting autogenous iliac bone grafts. A review of complications and techniques. *Spine* 1989;14:1324-31.
30. Kuslich SD, Danielson G, Dowdle JD, Sherman J, Fredrickson B, Yuan H, Griffith SL. Four-year follow-up results of lumbar spine arthrodesis using the Bagby and Kuslich lumbar fusion cage. *Spine* 2000;25:2656-62.
31. Leclercq TA, Matge G. Lumbar interbody fusion with threaded titanium cages. Results on 222 cases. *Neurochirurgie* 2001;47:25-33.
32. Liljenqvist U, O'Brien JP, Renton P. Simultaneous combined anterior and posterior lumbar fusion with femoral cortical allograft. *Eur Spine J* 1998;7:125-31.
33. Lin PM. Posterior lumbar interbody fusion technique: complications and pitfalls. *Clin Orthop* 1985;193:90-102.
34. Loguidice VA, Johnson RG, Guyer RD, Stith WJ, Ohnmeiss DD, Hochschuler SH, Rashbaum RF. Anterior lumbar interbody fusion. *Spine* 1988;13:366-9.
35. Magin MN, Delling G. Improved lumbar vertebral interbody fusion using rhOP-1. A comparison of autogenous bone graft, bovine hydroxylapatite (Bio-Oss), and BMP-7 (rhOP-1) in sheep. *Spine* 2001;26:469-78.
36. McAfee PC. Interbody fusion cages in reconstructive operations on the spine. *J Bone Joint Surg [Am]* 1999;81:859-80.
37. Milch RA, Rall DP, Tobie JE. Fluorescence of tetracycline antibiotics in bone. *J Bone Joint Surg [Am]* 1958;40:897-910.
38. Minamide A, Kawakami M, Hashizume H, Sakata R, Tamaki T. Evaluation of carriers of bone morphogenetic protein for spinal fusion. *Spine* 2001;26:933-9.
39. Minamide A, Tamaki T, Kawakami M, Hashizume H, Yoshida M, Sakata R. Experimental spinal fusion using sintered bovine bone coated with type I collagen and recombinant human bone morphogenetic protein-2. *Spine* 1999;24:1863-72.
40. Penta M, Fraser RD. Anterior lumbar interbody fusion. A minimum 10-year follow-up. *Spine* 1997;22:2429-34.
41. Potulski M, Beisse R, Bühren V. Die thorakoskopisch gesteuerte Behandlung der „vorderen Säule“. *Technik und Ergebnisse. Orthopäde* 1999;28:723-30.
42. Rahn BA, Perren SM. Xylenol orange, a fluorochrome useful in polychrome sequential labeling of calcifying tissues. *Stain Technol* 1971;46:125-9.
43. Sampath TK, Maliakal JC, Hauschka PV, Jones WK, Sasak H, Tucker RF, White KH, Coughlin JE, Tucker MM, Pang RH, et al. Recombinant human osteogenic protein-1 (hOP-1) induces new bone formation in vivo with a specific activity comparable with natural bovine osteogenic protein and stimulates osteoblast proliferation and differentiation in vitro. *J Biol Chem* 1992;267:20352-62.

44. Sandhu HS, Kanim LE, Toth JM, Kabo JM, Liu D, Delamarter RB, Dawson EG. Experimental spinal fusion with recombinant human bone morphogenetic protein-2 without decortication of osseous elements. *Spine* 1997;22:1171-80.
45. Slappey G, Toribatake Y, Ganey TM, Ogden JA, Hutton WC. Guidelines for decortication in posterolateral spine fusion. *J Spinal Disord* 1998;11:102-9.
46. Speth MJ, Oner FC, Kadic MA, deKlerk LW, Verbout AJ. Recurrent kyphosis after posterior stabilization of thoracolumbar fractures. 24 cases treated with a Dick internal fixator followed for 1.5-4 years. *Acta Orthop Scand* 1995;66:406-10.
47. Steinmann, JC, Herkowitz HN. Pseudarthrosis of the spine. *Clin Orthop* 1992;284:80-90.
48. Summers BN, Eisenstein SM. Donor-site pain from the ilium. A complication of lumbar spine fusion. *J Bone Joint Surg [Br]* 1989;71:677-80.
49. Sun TC, Mori S, Roper J, Brown C, Hooser T, Burr DB. Do different fluorochrome labels give equivalent histomorphometric information? *Bone* 1992;13:443-6.
50. Urist MR, Lietze A, Mitzutani H, Takagi K, Triffitt JT, Amstutz J, DeLange R, Termine J, Finerman GA. A bovine low molecular weight bone morphogenetic protein (BMP) fraction. *Clin Orthop* 1982;162:219-32.
51. Urist MR, Sato K, Brownell AG, Malinin TI, Lietze A, Huo YK, Prolo DJ, Oklund S, Finerman GA, DeLange RJ. Human bone morphogenetic protein (hBMP). *Proc Soc Exp Biol Med* 1983;173:194-9.
52. Vogel S, Weckbach A, Wagner R. Schmerzen nach operativer Versorgung von instabilen Wirbelfrakturen im thorakolumbalen Übergang. *Hefte Unfallchirurg* 1997;268:192-3.
53. Weckbach A, Blattert T. Die thorakolumbale Wirbelsäulenverletzung - Operationsindikation und -zeitpunkt. *Zentralbl Chir* 1998;123:930-5.
54. Weckbach A, Vogel S. Einfluß der transpedikulären intercorporellen Spongiosaplastik auf den Korrekturverlust nach alleiniger dorsaler Instrumentierung thoracolumbalen Wirbelsäulenverletzungen. *Hefte Unfallchirurg* 1997;268:205-8.
55. Wilke HJ, Kettler A, Claes LE. Are sheep spines a valid biomechanical model for human spines? *Spine* 1997;20:2365-74.
56. Wilke HJ, Kettler A, Wenger KH, Claes LE. Anatomy of the sheep spine and its comparison to the human spine. *Anat Rec* 1997;247:542-55.
57. Winkler H. Der Korrekturverlust nach operativer Stabilisierung thorakolumbalen Wirbelfrakturen unter besonderer Berücksichtigung des Spongiosatransplantates und der morphologischen Bedingungen des Intervertebralraumes. Klinische und experimentelle Untersuchungen durch virtuelle Analyse des Intervertebralraumes. *DGU - Mitteilungen und Nachrichten* 39:81-4.

58. Wittenberg RH, Moeller J, Shea M, White AA 3rd, Hayes WC. Compressive strength of autologous and allogeneous bone grafts for thoracolumbar and cervical spine fusion. *Spine* 1990;15:1073-8.
59. Younger EM, Chapman MW. Morbidity at bone graft donor sites. *J Orthop Trauma* 1989;3:192-5.



## 7. Anhang

### Statistische Berechnungen und Tabellen

#### 7.1 Alter, Gewichtsparameter, appliziertes Kompositivolumen, Drainageninhalt, röntgenologischer und histologischer Score

Das Alter der Schafe, ihr Gewicht praeoperativ und acht Wochen postoperativ sowie die Gewichtsänderung in diesem Zeitraum ist der folgenden Tabelle zu entnehmen:

**Tabelle A1**

Alter und Gewichtsparameter.

Schaf-Nr.	Alter bei Operation [Monate]	praoperatives Gewicht [kg]	postoperatives Gewicht [kg]	Gewichtsänderung [kg]
3	23	61,5	67,0	5,5
4	17	62,0	65,5	3,5
5	17	57,1	56,6	-0,5
6	17	60,0	60,0	0,0
7	16,5	53,5	57,3	3,8
8	17	60,0	60,0	0,0
9	17	57,2	62,6	5,4
10	8	56,5	61,8	5,3
11	8	55,0	58,5	3,5
12	9	52,4	52,9	0,5
13	10	51,0	55,1	4,1
14	9	58,0	58,8	0,8
15	10	55,5	62,3	6,8
16	10,5	56,0	57,7	1,7
17	10,5	55,0	55,4	0,4
18	10	57,3	56,2	-1,1
19	12,5	57,0	57,0	0,0
20	12	65,0	66,2	1,2
21	13	61,3	57,3	-4,0
22	13	55,6	50,8	-4,8
23	13	55,1	56,8	1,7
24	14	56,4	64,1	7,7
25	17,5	63,0	67,0	4,0
26	15,5	59,0	48,3	-10,7
27	18	63,0	60,4	-2,6
28	11	52,0	56,1	4,1
29	11	51,0	52,6	1,6
30	11	50,0	51,0	1,0
31	11,5	48,5	48,7	0,2
32	11,5	50,0	54,2	4,2
33	11	46,4	49,4	3,0
34	11,5	45,7	51,4	5,7
35	11	41,9	46,7	4,8
36	11,5	43,3	43,4	0,1

Das in Gruppe drei applizierte Zementvolumen und die darin enthaltene OP-1-Menge gehen aus Tabelle A2 hervor.

**Tabelle A2**

Kompositvolumen und enthaltene OP-1-Menge.

Schaf-Nr.	Kompositvolumen [ml]	OP-1-Menge [mg]
25	4,1	1,6
26	4,5	1,8
27	3,5	1,4
28	4,9	2,0
29	4,1	1,6
30	3,2	1,3
31	4,6	1,8
32	3,3	1,3
33	3,6	1,4
34	4,6	1,8
35	3,7	1,5
36	3,6	1,4



Der Drainageninhalt am zweiten postoperativen Tag ist in Tabelle A3 dargestellt.

**Tabelle A3**  
Drainageninhalt.

Schaf-Nr.	Subfasziale Drainage [ml]	Subkutane Drainage [ml]	Iliakale Drainage [ml]
3	175	75	45
4	300	100	40
5	90	130	30
6	150	80	60
7	340	50	20
8	140	10	40
9	280	25	50
10	160	5	30
11	140	20	120
12	350	50	50
13	320	20	-
14	100	10	-
15	260	25	-
16	120	20	-
17	200	50	-
18	280	50	-
19	250	20	-
20	200	50	-
21	170	100	-
22	130	30	-
23	260	20	-
24	100	60	-
25	150	0	-
26	130	30	-
27	270	30	-
28	200	50	-
29	230	50	-
30	180	140	-
31	250	30	-
32	310	50	-
33	165	65	-
34	210	50	-
35	150	70	-
36	220	80	-

Die Analyse des Fusionsgrades ergibt

1. für die röntgenologische Auswertung gemäß der Vier-Punkte-Bewertung aus Tabelle 4 und
2. für die histologische Auswertung auf der Bewertungsgrundlage der Tabelle 2 anhand der Makrophotographien

die in Tabelle A4 wiedergegebenen Punktwerte.

**Tabelle A4**

Röntgenologischer und histologischer Score.

Schaf-Nr.	röntgenologischer Score	histologischer Score
3	2	3
4	0	1
5	1	1
6	1	1
7	1	1
8	0	1
9	1	1
10	0	1
11	0	1
12	0	1
13	0	1
14	1	3
15	1	2
16	0	0
17	3	5
18	0	0
19	0	0
20	0	1
21	0	0
22	1	1
23	1	3
24	2	1
25	2	4
26	2	4
27	3	5
28	1	3
29	3	5
30	2	5
31	2	4
32	1	3
33	3	5
34	3	5
35	3	5
36	3	5

## 7.2 Statistische Analyse des Parameters „Bandscheibenausräumung“ mit Hilfe des Kruskal-Wallis-Tests

Das Ausmaß der Bandscheibenausräumung zeigt Tabelle A5.

**Tabelle A5**

Ausmaß der Bandscheibenausräumung.

Schaf-Nr.	Bandscheibenbreite [mm]	Defektbreite [mm]	Bandscheibenausräumung [%]
3	26,62	24,89	93,50
4	28,38	20,54	72,37
5	25,83	21,08	81,61
6	23,66	20,24	85,55
7	31,57	29,84	94,52
8	25,22	22,38	88,74
9	28,67	22,46	78,34
10	26,51	19,42	73,26
11	24,43	18,12	74,17
12	29,98	21,90	73,05
13	24,35	18,76	77,04
14	26,05	10,65	40,88
15	25,93	16,89	65,14
16	27,56	17,98	65,24
17	25,83	14,69	56,87
18	27,14	15,24	56,15
19	28,38	27,05	95,31
20	28,09	13,27	47,24
21	35,07	21,74	61,99
22	27,55	12,79	46,42
23	26,88	13,85	51,53
24	26,27	16,25	61,86
25	26,49	18,48	69,76
26	24,66	14,05	56,97
27	27,65	17,10	61,84
28	25,69	14,05	54,69
29	27,27	18,44	67,62
30	26,43	18,57	70,26
31	25,57	16,78	65,62
32	26,47	16,43	62,07
33	20,48	12,39	60,50
34	23,96	15,43	64,40
35	26,01	16,42	63,13
36	23,26	13,68	58,81

Die Prüfung der Nullhypothese  $H_0$ : „Die Bandscheibenausräumung erfolgte in allen drei Gruppen gleich gut“, erfordert bei der Anwendung des Kruskal-Wallis-Tests zunächst eine Rangfolgenbestimmung aller Stichprobenelemente (Tabelle A6).

**Tabelle A6**

Ranking des Parameters „Bandscheibenausräumung [%]“ im Vergleich aller Gruppen (Spongiosa-Gruppe (S), Hydroxylapatit-Gruppe (H), rhOP-1-Gruppe (O)).

Ranking	S	H	O
1		40,88	
2		46,42	
3		47,24	
4		51,53	
	5		54,69
6		56,15	
7		56,87	
	8		56,97
	9		58,81
	10		60,50
	11		61,84
12		61,86	
13		61,99	
	14		62,07
	15		63,13
	16		64,40
17		65,14	
18		65,24	
	19		65,62
	20		67,62
	21		69,76
	22		70,26
23	72,37		
24	73,05		
25	73,26		
26	74,17		
	27	77,04	
28	78,34		
29	81,61		
30	85,55		
31	88,74		
32	93,50		
33	94,52		
	34	95,31	
<b>281</b>	<b>144</b>	<b>170</b>	<b>←Rangsummen</b>

Nach der Kruskal/Wallis-Formel

$$(1) \quad H = \frac{12}{n \cdot (n + 1)} \cdot \sum_{i=1}^k R_i^2/n_i - 3 \cdot (n + 1)$$

mit  $n = 34$ ;  $k = 3$ ;  $R_1 = 281$ ,  $R_2 = 144$ ,  $R_3 = 170$  erhält man

$$\begin{aligned} H &= 12/1190 \cdot (281^2/10 + 144^2/12 + 170^2/12) - 3 \cdot 35 \\ &= 12/1190 \cdot (78961/10 + 20736/12 + 28900/12) - 105 \\ &= 12/1190 \cdot (947532/10 + 20736 + 28900)/12 - 105 \\ &= 144389,2/1190 - 105 \approx 16,33546 \end{aligned}$$

$H_0$  wird abgelehnt, wenn  $H > \chi^2_{f;\alpha}$  (mit Freiheitsgrad  $f = k - 1$  und  $\alpha = 0,05$ ) ist. Die Berechnung von  $\chi^2_{f;\alpha}$  ergibt näherungsweise den Wert 5,9917.  $\chi^2_{f;\alpha} \approx 5,9917 < 16,33546 \approx H$ , d.h. die Bandscheibenausräumung unterscheidet sich für  $\alpha = 0,05$  signifikant innerhalb der Grundgesamtheit ( $n = 34$ ), die Nullhypothese wird abgelehnt, der Wilcoxon-Test ist durchzuführen.

Für die Wilcoxon-Testung der Bandscheibenausräumung zwischen jeweils zwei Gruppen werden wiederum die zu vergleichenden Werte nach Rangfolge geordnet (Tabelle A7).

**Tabelle A7**

Ranking des Parameters „Bandscheibenausräumung [%]“ im Vergleich Spongiosa-Gruppe (S) versus Hydroxylapatit-Gruppe (H), Spongiosa-Gruppe (S) versus rhOP-1-Gruppe (O) und Hydroxylapatit-Gruppe (H) versus rhOP-1-Gruppe (O).

Ranking	S	H	Ranking	S	O	Ranking	H	O
1		40,88	1		54,69	1	40,88	
2		46,42	2		56,97	2	46,42	
3		47,24	3		58,81	3	47,24	
4		51,53	4		60,50	4	51,53	
5		56,15	5		61,84	5		54,69
6		56,87	6		62,07	6	56,15	
7		61,86	7		63,13	7	56,87	
8		61,99	8		64,40	8		56,97
9		65,14	9		65,62	9		58,81
10		65,24	10		67,62	10		60,50
11	72,37		11		69,76	11		61,84
12	73,05		12		70,26	12	61,86	
13	73,26		13	72,37		13	61,99	
14	74,17		14	73,05		14		62,07
15		77,04	15	73,26		15		63,13
16	78,34		16	74,17		16		64,40
17	81,61		17	78,34		17	65,14	
18	85,55		18	81,61		18	65,24	
19	88,74		19	85,55		19		65,62
20	93,50		20	88,74		20		67,62
21	94,52		21	93,50		21		69,76
22		95,31	22	94,52		22		70,26
						23	77,04	
						24	95,31	
<b>161</b>	<b>92</b>	<b>←Rangsummen</b>	<b>175</b>	<b>78</b>	<b>←Rangsummen</b>	<b>130</b>	<b>170</b>	<b>←Rangsummen</b>

Die Nullhypothese  $H_0$  lautet:  $\mu(S) = \mu(H)$  bzw.  $\mu(S) = \mu(O)$  bzw.  $\mu(H) = \mu(O)$ , d.h. die Bandscheibenausräumung erfolgte in allen drei Versuchsgruppen gleich gut, der Effekt einer learning-curve kann vernachlässigt werden.

Für die Prüfgrößen (siehe Formeln (1) - (6)) erhält man folgende Werte:

- (1)  $U_1 = n_1 \cdot n_2 + n_1 \cdot (n_1+1)/2 - R_1$  mit  $n_1 = 10, n_2 = 12, R_1 = 161$
- (2)  $U_2 = n_1 \cdot n_2 + n_2 \cdot (n_2+1)/2 - R_2$  mit  $n_1 = 10, n_2 = 12, R_2 = 92$
- (3)  $U_3 = n_1 \cdot n_3 + n_1 \cdot (n_1+1)/2 - R_3$  mit  $n_1 = 10, n_3 = 12, R_3 = 175$
- (4)  $U_4 = n_1 \cdot n_3 + n_3 \cdot (n_3+1)/2 - R_4$  mit  $n_1 = 10, n_3 = 12, R_4 = 78$
- (5)  $U_5 = n_2 \cdot n_3 + n_2 \cdot (n_2+1)/2 - R_5$  mit  $n_2 = 12, n_3 = 12, R_5 = 130$
- (6)  $U_6 = n_2 \cdot n_3 + n_3 \cdot (n_3+1)/2 - R_6$  mit  $n_2 = 12, n_3 = 12, R_6 = 170$

Dies ergibt für

$$(1) \quad U_1 = 120 + 110/2 - 161 = 14$$

$$(2) \quad U_2 = 120 + 156/2 - 92 = 106$$

$$(3) \quad U_3 = 120 + 110/2 - 175 = 0$$

$$(4) \quad U_4 = 120 + 156/2 - 78 = 120$$

$$(5) \quad U_5 = 144 + 156/2 - 130 = 92$$

$$(6) \quad U_6 = 144 + 156/2 - 170 = 52$$

Die Ergebnisse werden überprüft mit Formel (7):

$$(7) \quad U_1 + U_2 = n_1 \cdot n_2 \quad \text{bzw.} \quad U_3 + U_4 = n_1 \cdot n_3 \quad \text{bzw.} \quad U_5 + U_6 = n_2 \cdot n_3$$
$$14 + 106 = 120 \quad \text{bzw.} \quad 0 + 120 = 120 \quad \text{bzw.} \quad 92 + 52 = 144$$

Für  $n_1 = 10$  und  $n_2 = 12$  liest man aus der Wilcoxon-Tabelle für  $\alpha = 0,05$   $U_{\text{krit}} = 29$ , für  $n_1 = 10$  und  $n_3 = 12$  ebenso. Für  $n_2 = 12$  und  $n_3 = 12$  ist in der Wilcoxon-Tabelle für  $\alpha = 0,05$   $U_{\text{krit}} = 37$  angegeben. In den ersten beiden Fällen liegt  $U_{\text{krit}}$  betragsmäßig zwischen den jeweils zusammengehörigen Werten ( $U_1$  und  $U_2$  bzw.  $U_3$  und  $U_4$ ). Es besteht also ein signifikanter Unterschied beim Vergleich der Spongiosagruppe mit den beiden anderen Gruppen. Im dritten Fall ist  $U_{\text{krit}}$  kleiner als die errechneten Werte  $U_5$  und  $U_6$ . Die Hypothese, die Bandscheibenausräumung zeige im Vergleich zwischen Gruppe 2 und 3 keine signifikanten Unterschiede, wird daher angenommen. Die Nullhypothesen  $H_0: \mu(S) = \mu(H)$  bzw.  $\mu(S) = \mu(O)$  werden also auf dem Signifikanzniveau von  $\alpha = 0,05$  verworfen, die Nullhypothese  $H_0: \mu(H) = \mu(O)$  wird auf demselben Signifikanzniveau angenommen. Da aber offensichtlich die besten Ergebnisse in der ersten Gruppe erzielt wurden, während die beiden anderen Gruppen vergleichbare Ergebnisse zeigen, und weil die Operationen auch chronologisch in dieser Reihenfolge durchgeführt wurden, kann zumindest festgestellt werden, daß trotz signifikanter Unterschiede im Gruppenvergleich der Effekt einer learning-curve nicht vorliegt.

### 7.3 Statistische Analyse des Parameters „Dekortikationsausmaß“ mit Hilfe des Kruskal-Wallis-Tests

Die Tabelle A8 dokumentiert das Dekortikationsausmaß der L4-Grundplatte.

**Tabelle A8**

Ausmaß der Dekortikation des kranialen Wirbelkörpers L4.

Schaf-Nr.	Eindringtiefe [mm]	Wirbelkörperhöhe [mm]	Dekortikation [%]
3	6,60	37,65	17,53
4	4,29	37,39	11,47
5	3,85	35,74	10,77
6	5,85	33,13	17,66
7	3,99	34,72	11,49
8	5,00	34,26	14,59
9	5,53	37,44	14,77
10	5,37	34,37	15,62
11	3,92	34,04	11,52
12	4,97	39,36	12,63
13	4,00	38,00	10,53
14	2,20	36,72	5,99
15	1,84	37,12	4,96
16	3,20	31,86	10,04
17	5,95	36,79	16,17
18	9,29	33,81	27,48
19	5,21	32,07	16,25
20	8,21	36,13	22,72
21	7,83	34,20	22,89
22	4,59	35,34	12,99
23	4,14	35,98	11,51
24	3,82	37,90	10,08
25	6,68	36,29	18,41
26	8,03	36,99	21,71
27	4,78	33,94	14,07
28	6,22	35,33	17,61
29	7,24	36,06	20,08
30	5,95	35,24	16,88
31	8,59	36,04	12,57
32	5,70	36,27	15,72
33	7,14	33,57	21,27
34	6,72	35,21	19,09
35	6,16	34,44	17,89
36	5,47	33,98	16,10



Um die Nullhypothese „Die Dekortikationsgüte ist in allen drei Gruppen gleich“ zu testen, ist bei der Anwendung des Kruskal-Wallis-Tests eine Rangfolgenbestimmung aller Stichprobenelemente nötig (Tabelle A9).

**Tabelle A9**

Ranking des Parameters „Dekortikation [%]“ im Vergleich aller Gruppen (Spongiosa-Gruppe (S), Hydroxylapatit-Gruppe (H), rhOP-1-Gruppe (O)).

Ranking	S	H	O
1		4,96	
2		5,99	
3		10,04	
4		10,08	
5		10,53	
6	10,77		
7	11,47		
8	11,49		
9		11,51	
10	11,52		
	11		12,57
12	12,63		
	13	12,99	
	14		14,07
15	14,59		
16	14,77		
17	15,62		
	18		15,72
	19		16,10
	20	16,17	
	21	16,25	
	22		16,88
23	17,53		
	24		17,61
25	17,66		
	26		17,89
	27		18,41
	28		19,09
	29		20,08
	30		21,27
	31		21,71
32		22,72	
33		22,89	
34		27,48	
<b>139</b>	<b>177</b>	<b>279</b>	<b>← Rangsummen</b>

Nach der Kruskal-Wallis-Formel

$$(1) \quad H = \frac{12}{(n \cdot (n + 1))} \cdot \sum_{i=1}^k R_i^2/n_i - 3 \cdot (n + 1)$$

mit  $n = 34$ ;  $k = 3$ ;  $R_1 = 139$ ,  $R_2 = 177$ ,  $R_3 = 279$  erhält man

$$\begin{aligned} H &= 12/1190 \cdot (139^2/10 + 177^2/12 + 279^2/12) - 3 \cdot 35 \\ &= 12/1190 \cdot (1932,1 + 31329/12 + 77841/12) - 105 \\ &= 12/1190 \cdot (23185,2 + 38416 + 77841)/12 - 105 \\ &= 139442,2/1190 - 105 \approx 12,17832. \end{aligned}$$

$H_0$  wird abgelehnt, wenn  $H > \chi^2_{f;\alpha}$  (mit Freiheitsgrad  $f = k - 1$  und  $\alpha = 0,05$ ) ist:  $\chi^2_{f;\alpha} \approx 5,9917 < 12,17832 \approx H$ , d.h. die Dekortikationsgüte unterscheidet sich für  $\alpha = 0,05$  signifikant innerhalb der Grundgesamtheit ( $n = 34$ ).

Die nun durchzuführende Wilcoxon-Testung des Dekortikationsausmaßes zeigt, zwischen welchen Gruppen ein signifikanter Unterschied besteht. Es ergeben sich folgende Rangfolgen (Tabelle A10):

**Tabelle A10**

Ranking des Parameters „Dekortikation [%]“ im Vergleich Spongiosa-Gruppe (S) versus Hydroxylapatit-Gruppe (H), Spongiosa-Gruppe (S) versus rhOP-1-Gruppe (O) und Hydroxylapatit-Gruppe (H) versus rhOP-1-Gruppe (O).

Ranking	S	H	Ranking	S	O	Ranking	H	O
1		4,96	1	10,77		1	4,96	
2		5,99	2	11,47		2	5,99	
3		10,04	3	11,49		3	10,04	
4		10,08	4	11,52		4	10,08	
5		10,53	5		12,57	5	10,53	
6	10,77		6	12,63		6	11,51	
7	11,47		7		14,07	7		12,57
8	11,49		8	14,59		8	12,99	
9		11,51	9	14,77		9		14,07
10	11,52		10	15,62		10		15,72
11	12,63		11		15,72	11		16,10
12		12,99	12		16,10	12	16,17	
13	14,59		13		16,88	13	16,25	
14	14,77		14	17,53		14		16,88
15	15,62		15		17,61	15		17,61
16		16,17	16	17,66		16		17,89
17		16,25	17		17,89	17		18,41
18	17,53		18		18,41	18		19,09
19	17,66		19		19,09	19		20,08
20		22,72	20		20,08	20		21,27
21		22,89	21		21,27	21		21,71
22		27,48	22		21,71	22	22,72	
						23	22,89	
						24	27,48	
<b>121</b>	<b>132</b>	<b>←Rangsummen</b>	<b>73</b>	<b>180</b>	<b>←Rangsummen</b>	<b>123</b>	<b>177</b>	<b>←Rangsummen</b>

Die Nullhypothese  $H_0$  lautet:  $\mu(S) = \mu(H)$  bzw.  $\mu(S) = \mu(O)$  bzw.  $\mu(H) = \mu(O)$ , d.h. die durch Dekortikation erreichte Eindringtiefe zeigt in jeweils zwei der drei Versuchsgruppen keine signifikanten Unterschiede.

Für die Prüfgrößen (siehe Formeln (1) - (6)) erhält man folgende Werte:

- (1)  $U_1 = n_1 \cdot n_2 + n_1 \cdot (n_1+1)/2 - R_1$  mit  $n_1 = 10, n_2 = 12, R_1 = 121$
- (2)  $U_2 = n_1 \cdot n_2 + n_2 \cdot (n_2+1)/2 - R_2$  mit  $n_1 = 10, n_2 = 12, R_2 = 132$
- (3)  $U_3 = n_1 \cdot n_3 + n_1 \cdot (n_1+1)/2 - R_3$  mit  $n_1 = 10, n_3 = 12, R_3 = 73$
- (4)  $U_4 = n_1 \cdot n_3 + n_3 \cdot (n_3+1)/2 - R_4$  mit  $n_1 = 10, n_3 = 12, R_4 = 180$
- (5)  $U_5 = n_2 \cdot n_3 + n_2 \cdot (n_2+1)/2 - R_5$  mit  $n_2 = 12, n_3 = 12, R_5 = 123$
- (6)  $U_6 = n_2 \cdot n_3 + n_3 \cdot (n_3+1)/2 - R_6$  mit  $n_2 = 12, n_3 = 12, R_6 = 177$

Dies ergibt für

$$(1) \quad U_1 = 120 + 110/2 - 121 = 54$$

$$(2) \quad U_2 = 120 + 156/2 - 132 = 66$$

$$(3) \quad U_3 = 120 + 110/2 - 73 = 102$$

$$(4) \quad U_4 = 120 + 156/2 - 180 = 18$$

$$(5) \quad U_5 = 144 + 156/2 - 123 = 99$$

$$(6) \quad U_6 = 144 + 156/2 - 177 = 45$$

Die Ergebnisse werden überprüft mit Formel (7):

$$(7) \quad U_1 + U_2 = n_1 \cdot n_2 \quad \text{bzw.} \quad U_3 + U_4 = n_1 \cdot n_3 \quad \text{bzw.} \quad U_5 + U_6 = n_2 \cdot n_3$$
$$54 + 66 = 120 \quad \text{bzw.} \quad 102 + 18 = 120 \quad \text{bzw.} \quad 99 + 45 = 144$$

Für  $n_1 = 10$  und  $n_2 = 12$  liest man aus der Wilcoxon-Tabelle für  $\alpha = 0,05$   $U_{\text{krit}} = 29$ , für  $n_1 = 10$  und  $n_3 = 12$  ebenso. Für  $n_2 = 12$  und  $n_3 = 12$  ist in der Wilcoxon-Tabelle für  $\alpha = 0,05$   $U_{\text{krit}} = 37$  angegeben. Beim Vergleich der Gruppen S und H sowie H und O ist  $U_{\text{krit}}$  kleiner als beide jeweils zusammengehörigen Werte ( $U_1$  und  $U_2$  bzw.  $U_5$  und  $U_6$ ). Die Nullhypothese, die Dekortikation zeige im Vergleich zwischen je zwei Gruppen keine signifikanten Unterschiede, wird in diesen Fällen angenommen. Beim Vergleich zwischen den Gruppen S und O allerdings liegt  $U_{\text{krit}}$  betragsmäßig zwischen  $U_3$  und  $U_4$ , wobei  $U_4 < U_{\text{krit}} < U_3$  gilt. Das bedeutet, daß die Dekortikation in der rhOP-1-Gruppe in signifikant höherem Ausmaß erfolgt ist als in der Spongiosa-Gruppe. Die Nullhypothese  $H_0: \mu(S) = \mu(O)$  muß also auf dem Signifikanzniveau von  $\alpha = 0,05$  verworfen werden.

#### 7.4 Statistische Analyse der Parameter „Knochenneubildung“ und „Zement- bzw. Kompositfläche“ mit Hilfe des Wilcoxon-Tests

Tabelle A11 gibt die computerunterstützt planimetrisch gemessenen Werte der Fläche des neugebildeten Knochens und der Zement- bzw. Kompositfläche in mm<sup>2</sup> wieder.

**Tabelle A11**

Flächengröße des neugebildeten Knochens und des Zements bzw. Komposits.

Schaf-Nr.	Fläche neugebildeten Knochens [mm <sup>2</sup> ]	Zement- bzw. Kompositfläche [mm <sup>2</sup> ]
3	153,83	-
4	76,59	-
5	78,87	-
6	87,58	-
7	139,76	-
8	32,64	-
9	93,94	-
10	42,68	-
11	69,49	-
12	42,01	-
13	63,20	34,72
14	35,06	66,67
15	8,75	35,01
16	0	70,35
17	11,80	127,43
18	0	119,50
19	0	123,45
20	55,64	114,75
21	0	83,48
22	29,89	107,05
23	17,40	76,78
24	17,98	107,79
25	74,15	108,80
26	76,05	91,92
27	110,31	133,17
28	56,45	161,33
29	32,37	155,77
30	40,14	106,86
31	103,21	111,16
32	46,99	138,34
33	67,07	100,51
34	61,20	138,90
35	69,86	140,70
36	97,27	92,59

Zur Anwendung des Wilcoxon-Tests für unverbundene Vergleichsgrößen ist zunächst das Ordnen der zu vergleichenden Werte nach ihrer Rangfolge erforderlich. Für den Vergleich der Hydroxylapatit-Zement-Gruppe (H) mit der OP-1-Hydroxylapatit-Gruppe (O) bezüglich der Fläche neugebildeten Knochens und der Zement- bzw. Kompositfläche lautet die Nullhypothese:  $H_0: \mu(H) = \mu(O)$ ;  $H_1: \mu(H) < \mu(O)$ . Der Nullhypothese liegt also die Annahme zugrunde, Knochenneubildung und Zement- bzw. Kompositfläche unterscheiden sich nicht signifikant beim Vergleich beider Gruppen. Es ergibt sich das in Tabelle A12 gezeigte Ranking.

**Tabelle A12**

Ranking der Parameter „Fläche neugebildeten Knochens“ und „Zement- bzw. Kompositfläche“.

		Fläche neugebildeten Knochens [mm <sup>2</sup> ]		Zement- bzw. Kompositfläche [mm <sup>2</sup> ]	
Ranking		Hydroxylapatit-Gruppe	OP-1-Hydroxylapatit-Gruppe	Ranking	
2,5		0		1	34,72
2,5		0		2	35,01
2,5		0		3	66,67
2,5		0		4	70,35
5		8,75		5	76,78
6		11,8		6	83,48
7		17,4		7	91,92
8		17,98		8	92,59
9		29,89		9	100,51
10			32,37	10	106,86
11		35,06		11	107,05
12			40,14	12	107,79
13			46,99	13	108,80
14		55,64		14	111,16
15			56,45	15	114,75
16			61,2	16	119,50
17		63,2		17	123,45
18			67,07	18	127,43
19			69,86	19	133,17
20			74,15	20	138,34
21			76,05	21	138,90
22			97,27	22	140,70
23			103,21	23	155,77
24			110,31	24	161,33
87	213	←Rangsummen		110	190
					←Rangsummen

Somit ergeben sich als Prüfgrößen nach den Formeln

$$(1) \quad U_1 = n_1 \cdot n_2 + n_1 \cdot (n_1+1)/2 - R_1 \quad \text{mit } n_1 = 12, n_2 = 12, R_1 = 87$$

$$(2) \quad U_2 = n_1 \cdot n_2 + n_2 \cdot (n_2+1)/2 - R_2 \quad \text{mit } n_1 = 12, n_2 = 12, R_2 = 213$$

$$(3) \quad U_3 = n_1 \cdot n_2 + n_1 \cdot (n_1+1)/2 - R_3 \quad \text{mit } n_1 = 12, n_2 = 12, R_3 = 110$$

$$(4) \quad U_4 = n_1 \cdot n_2 + n_2 \cdot (n_2+1)/2 - R_4 \quad \text{mit } n_1 = 12, n_2 = 12, R_4 = 190$$

die Werte:

$$(1) \quad U_1 = 144 + 156/2 - 87 = 135$$

$$(2) \quad U_2 = 144 + 156/2 - 213 = 9$$

$$(3) \quad U_3 = 144 + 156/2 - 110 = 112$$

$$(4) \quad U_4 = 144 + 156/2 - 190 = 32$$

Das Ergebnis überprüft man nach Formel (5):

$$(5) \quad U_1 + U_2 = n_1 \cdot n_2 \quad \text{bzw.} \quad U_3 + U_4 = n_1 \cdot n_2$$
$$135 + 9 = 144 \quad \text{bzw.} \quad 112 + 32 = 144$$

Für  $n_1 = 12$  und  $n_2 = 12$  liest man aus der Wilcoxon-Tabelle für  $\alpha = 0,05$   $U_{\text{krit}} = 37$ . Die Nullhypothese  $H_0: \mu(H) = \mu(O)$  wird verworfen, wenn  $U_{\text{krit}}$  betragsmäßig zwischen den Werten für  $U_1$  und  $U_2$  bzw.  $U_3$  und  $U_4$  liegt. Die Hypothesen, die Verwendung von OP-1 beeinflusse die Knochenneubildung bzw. führe zu einer geringeren Hydroxylapatit-Resorption, werden daher angenommen. Da die Werte für  $U_2$  bzw.  $U_4$  kleiner sind als  $U_{\text{krit}}$ , folgt daraus ein positiver Effekt von OP-1 auf Knochenneubildung und Hydroxylapatit-Integrität, die Nullhypothese wird verworfen.

## 7.5 Kortikalisanteil

Der anhand von 20 verschiedenen Wirbelkörpern errechnete prozentuale Anteil der Kortikalis an der Wirbelkörperhöhe geht aus Tabelle A13 hervor.

**Tabelle A13**

Kortikalisanteil [%] an der Wirbelkörperhöhe.

Kortikalisdicke	Wirbelkörperhöhe	Kortikalisanteil [%]
0,5	16	3,13
0,4	12	3,33
0,4	15	2,67
0,3	9,8	3,06
0,6	16,8	3,57
0,4	12	3,33
0,3	12,1	2,48
0,4	12	3,33
0,35	12,5	2,80
0,2	11	1,82
0,3	16	1,88
0,3	11	2,73
0,2	8	2,50
0,4	14,5	2,76
0,4	16,5	2,42
0,5	17,5	2,86
0,4	15	2,67
0,4	14	2,86
0,4	15	2,67
0,4	17,5	2,29



## 7.6 Tabellarische Darstellung sämtlicher Mittelwerte und Standardabweichungen

Die Mittelwerte und Standardabweichungen der gemessenen oder errechneten Größen zeigt Tabelle A14.

**Tabelle A14**

Mittelwerte ( $\mu$ ) und Standardabweichungen (SD).

Parameter		Spongiosa-Gruppe		Hydroxylapatit-Gruppe		OP-1-Hydroxylapatit-Gruppe	
		$\mu$	SD	$\mu$	SD	$\mu$	SD
Gewicht [kg]	praeoperativ	57,52	3,13	56,93	3,33	51,15	6,78
	8 Wochen postoperativ	60,22	4,00	58,14	4,05	52,43	6,12
Alter [Monate]		14,95	4,69	11,46	1,56	12,67	2,57
Kompositvolumen [ml]		-	-	-	-	4,0	0,5
Deponierte OP-1-Menge [mg]		-	-	-	-	1,6	0,2
Drainageninhalt [ml]	subfaszial	205*				72**	
	subkutan	48*				33**	
	iliakal	49	26	-	-	-	-
Fusionsgrad (röntgenologisch)		0,60	0,66	0,75	0,92	2,33	0,75
Fusionsgrad (histologisch)		1,20	0,60	1,42	1,50	4,42	0,76
Bandscheibenausräumung [%]		81,51	8,18	60,47	14,16	62,97	4,65
Bandscheibenausräumung [%]		67,54*				13,43**	
Dekortikation [%]		13,81	2,45	14,30	6,72	17,62	2,64
Dekortikation [%]		15,33*				4,80**	
Fläche neugebildeten Knochens [mm <sup>2</sup> ]		-	-	19,98	20,95	69,59	23,51
Zement- bzw. Kompositfläche [mm <sup>2</sup> ]		-	-	88,92	31,39	123,34	23,18
Kortikalisanteil [%]		2,8 <sup>†</sup>				0,5 <sup>††</sup>	

\*Mittelwert aller Tiere, \*\*Standardabweichung aller Tiere, <sup>†</sup>Mittelwert von 20 Tieren,

<sup>††</sup>Standardabweichung von 20 Tieren



## **Danksagung**

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. med. A. Weckbach für die Überlassung des Dissertationsthemas und für die Übernahme des Referates.

Herrn Dr. med. T. R. Blattert danke ich für die exzellente Betreuung während der Versuchsdurchführung und Erstellung der Arbeit.

Herrn Prof. Dr. med. J. Eulert danke ich für die Übernahme des Korreferates.

Frau Prof. Dr. rer. nat. K. Ulrichs und Herrn Prof. Dr. med. A. Thiede danke ich für die Möglichkeit, daß die für diese Arbeit erforderlichen Versuche in der Abteilung für Experimentelle Chirurgie der Chirurgischen Universitätsklinik Würzburg durchgeführt werden konnten.

Herrn Prof. Dr. med. G. Delling danke ich für die Anfertigung der Schnittpräparate und die Erstellung der Photographien und Kontaktströntgenbilder derselben.

Frau Dr. C. Schuhmacher danke ich für die Zubereitung der Fluoreszenzfarbstoffe.

Den Herren A. Reichert, M. Anetseder, R. Endl, W. Geise sowie Herrn A. Pierce von Stryker®Biotech danke ich für die technische Unterstützung sowie für darüber hinausgehende Hilfestellungen.

Den Tierpflegern der Chirurgischen Universitätsklinik Würzburg unter der Leitung von Frau S. Pantzner danke ich besonders sowohl für die Betreuung der Tiere als auch für die ausgezeichnete, immer freundliche Zusammenarbeit.

Die Durchführung der Arbeit erfolgte mit Förderung durch Synthes, Umkirch, die Biomaterialien für diese Arbeit wurden von Stryker®Biotech, Hopkinton, Massachusetts, USA, zur Verfügung gestellt. Auch hierfür herzlichen Dank.

## **Lebenslauf**

### **Persönliche Daten**

Name	Horst Balling
Geburtsdatum	08.11.1975
Geburtsort	Ochsenfurt
Eltern	Alfred Balling, Landmaschinenschlosser und Ingrid Balling, geborene Rückert, Arbeiterin
Konfession	römisch-katholisch
Familienstand	ledig

### **Schulbildung**

09/1982 – 07/1986	Grundschule Sonderhofen
09/1986 – 06/1995	Gymnasium Marktbreit
	Abschluß: Abitur

### **Hochschulausbildung**

04/1996 – 04/1998	Vorklinisches Studium an der Universität Würzburg
04/1998 – 04/2001	Klinisches Studium an der Universitätsklinik Würzburg
04/2001 – 04/2002	Praktisches Jahr
04/2002	Abschluß des Studiums
seit 06/2002	Arzt im Praktikum an der Stiftung Juliusspital Würzburg

Rittershausen, im Oktober 2002