



100 micrometers

Mikrovaskularisation und knöchernes Remodelling eines nanopartikulären Hydroxylapatit-Implantates

X
R. Schnettler

X
Klinik und Poliklinik für Unfallchirurgie
(Direktor: Univ.-Prof. Dr. Dr. R. Schnettler)
Universitätsklinikum Giessen-Marburg

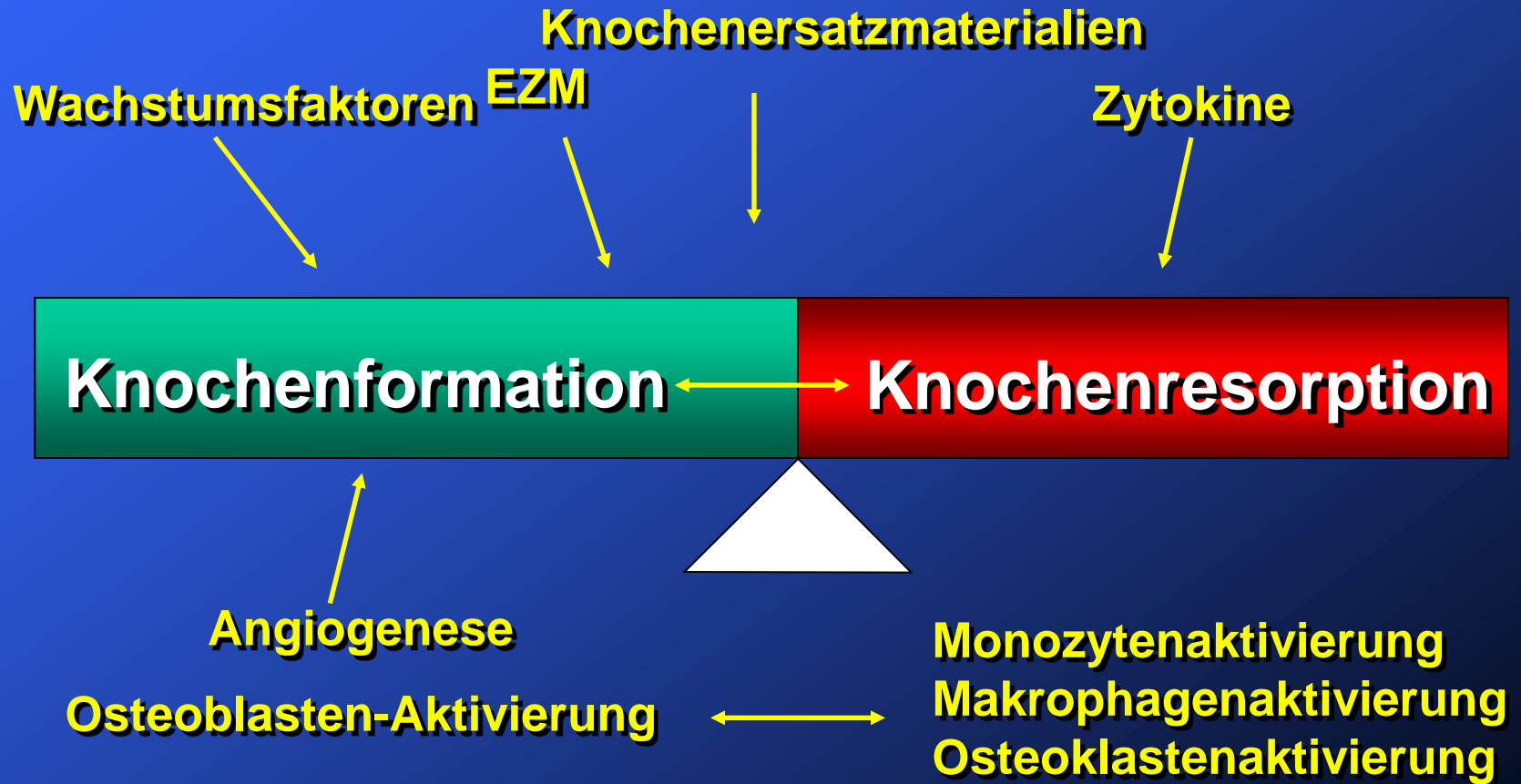
Ziele

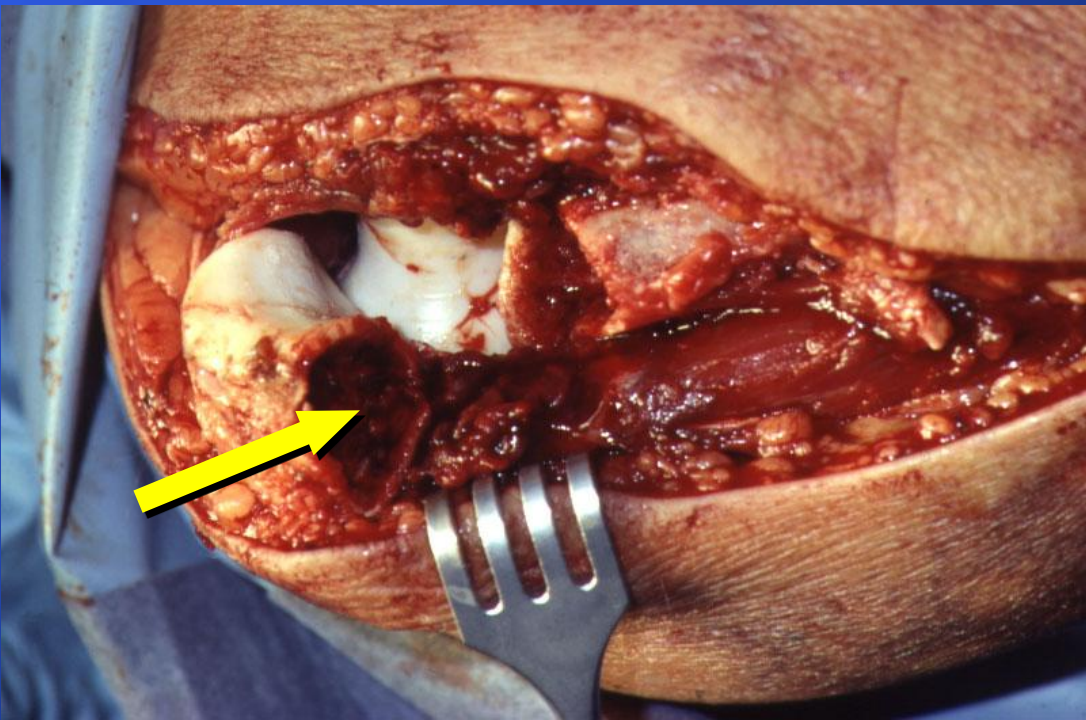
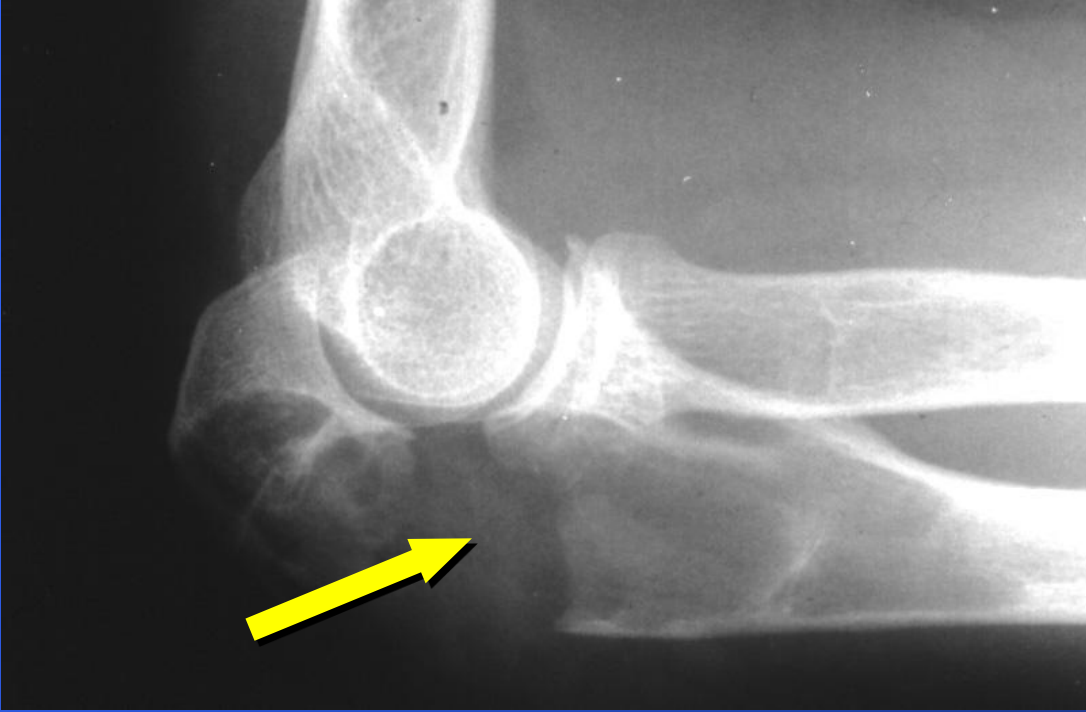
- **Knochenersatzmaterialien und ihre klinische Relevanz**
- **Mikrovaskularisation**
- **Degradation**
- **Integration von Knochenersatzmaterialien - Ergebnisse einer Mini-pig-Studie**

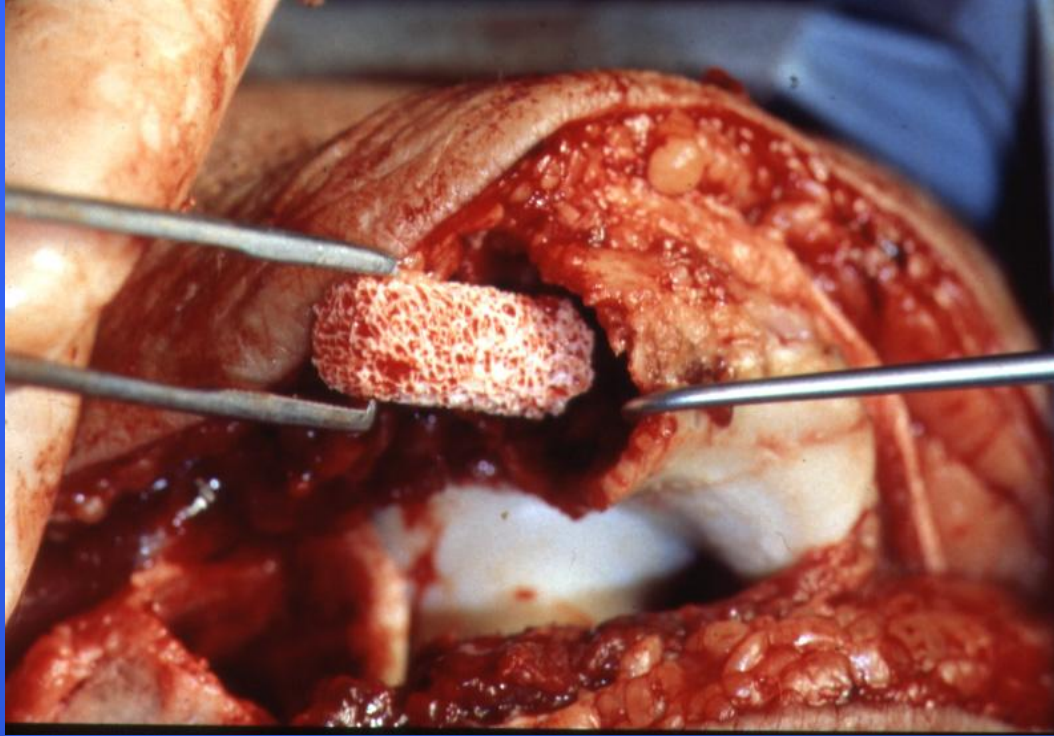
**Knochendefekte stellen ein
Hauptproblem in der
Unfallchirurgie und
Orthopädie dar**

**In Europa werden bei ca. 20 %
aller rekonstruktiven Eingriffe
Knochentransplantation oder
Knochenersatzmaterialien
eingesetzt**

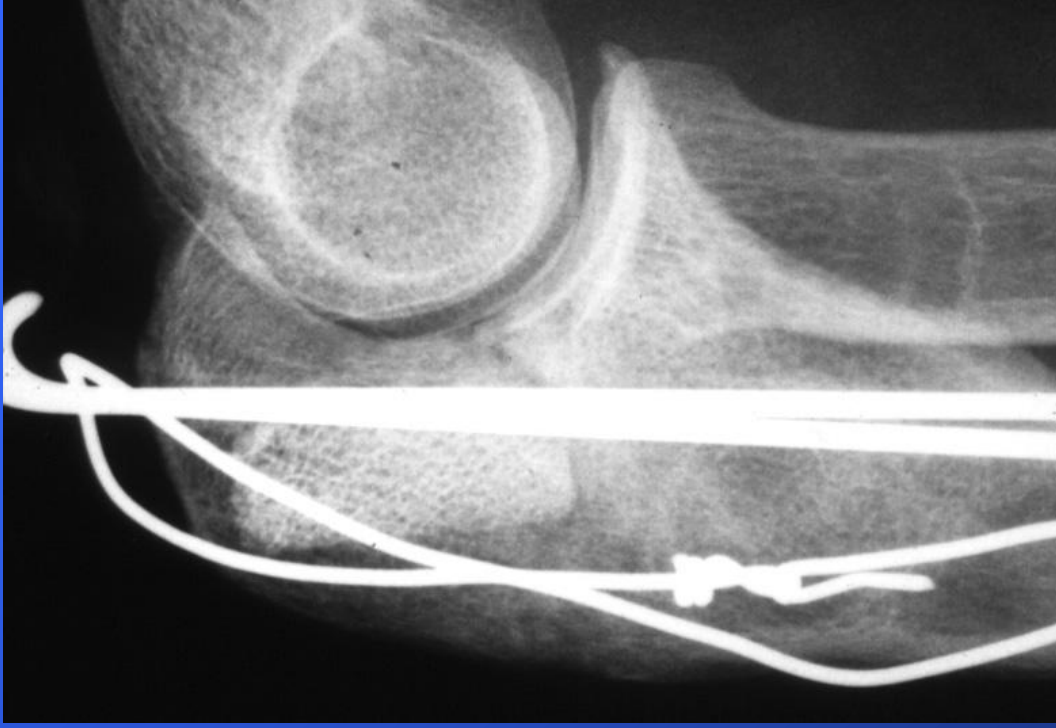
Interaktionen Biomaterialien - Knochen







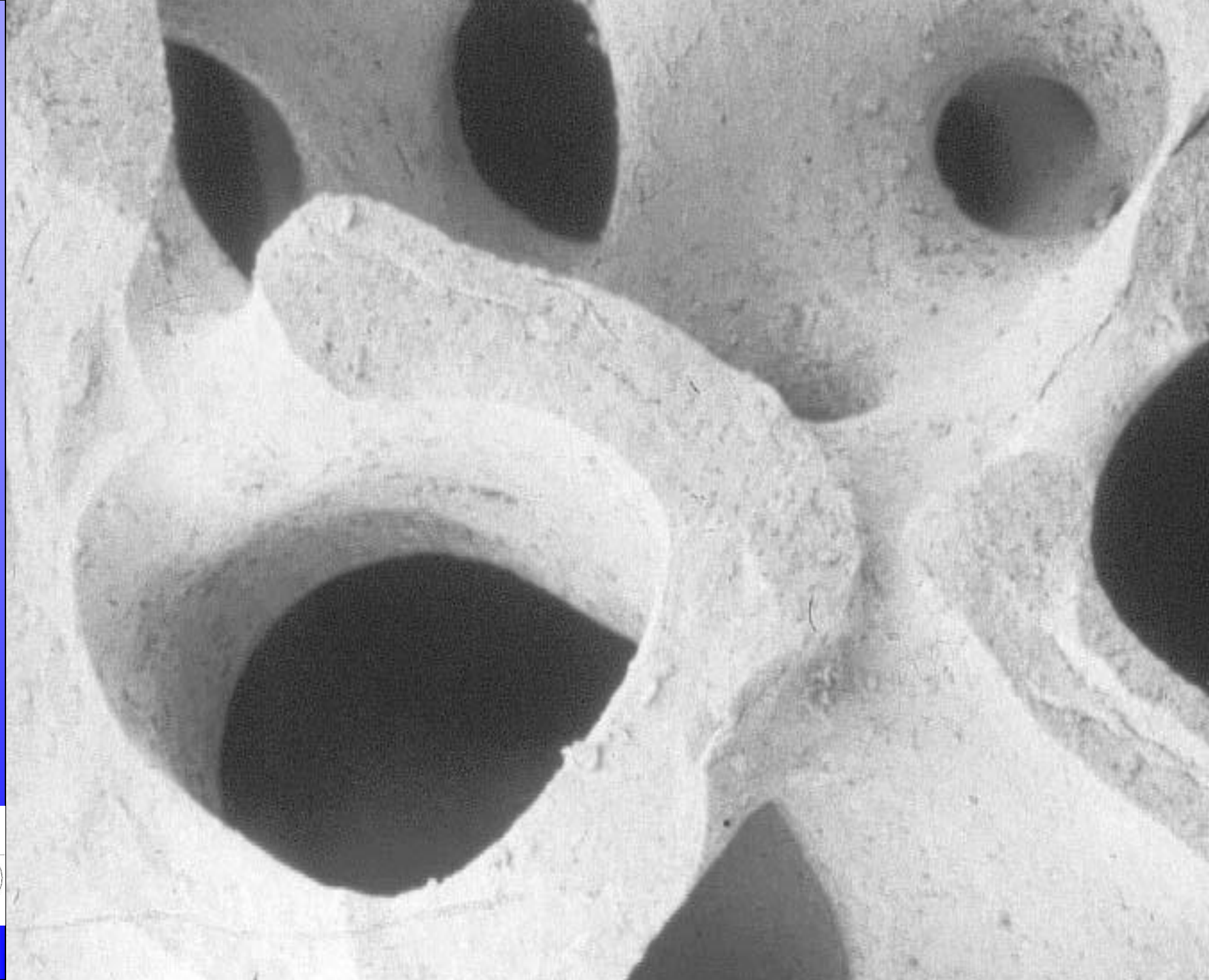
HA-Keramik - Endobon®

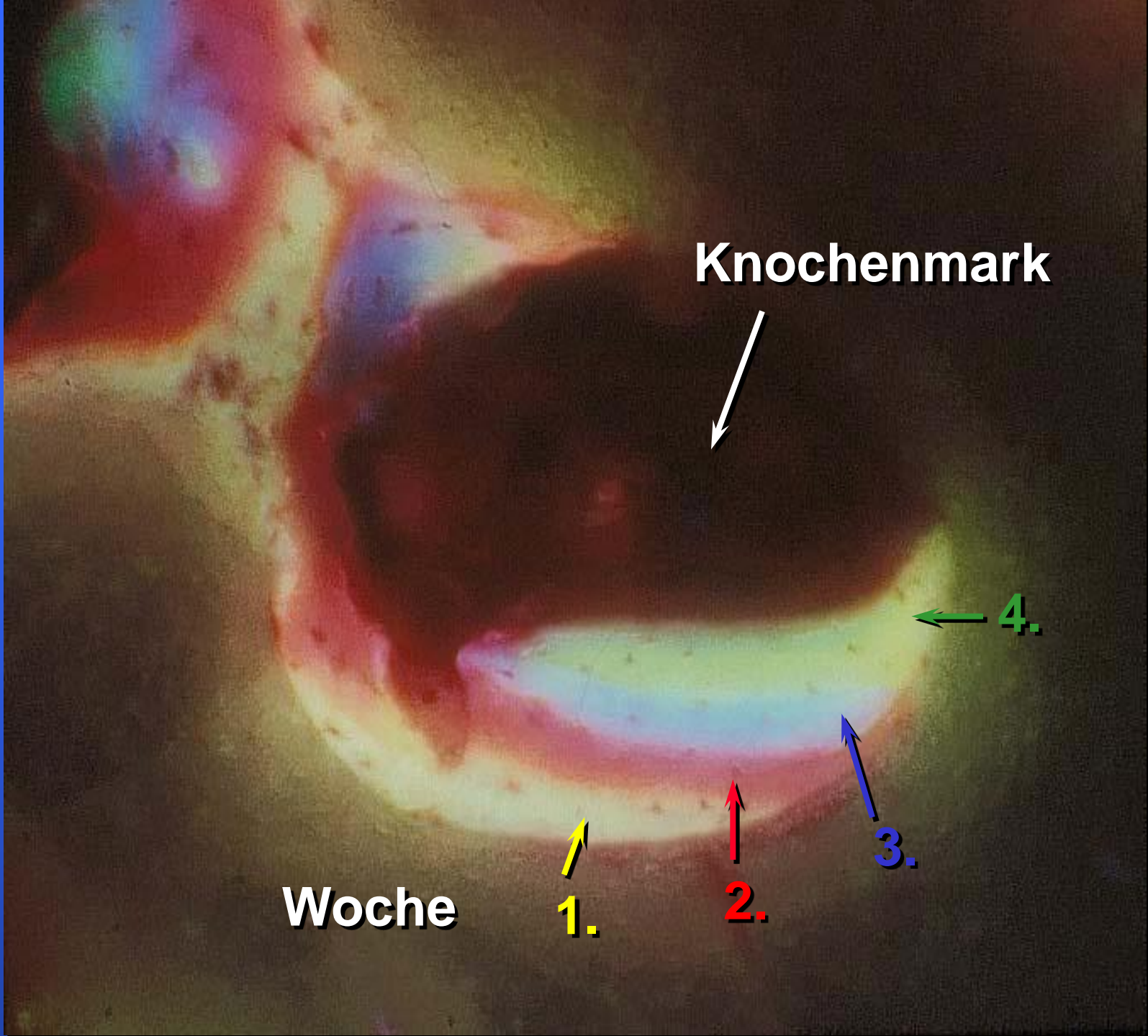


PE-Zylinder



**Problem:
Nicht resorbierbare
Knochenersatzmaterialien**





Knochenmark

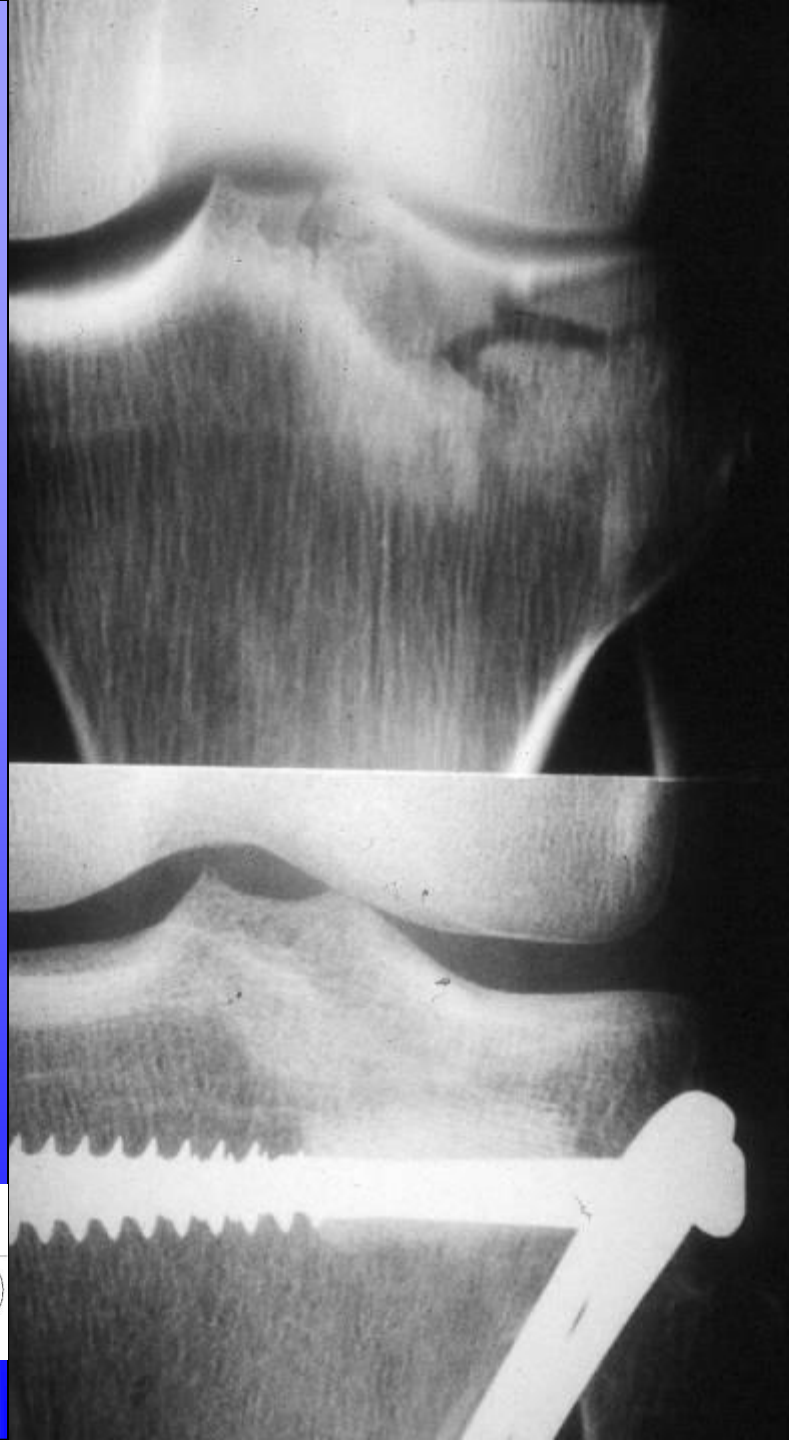
Woche

1.

2.

3.

4.



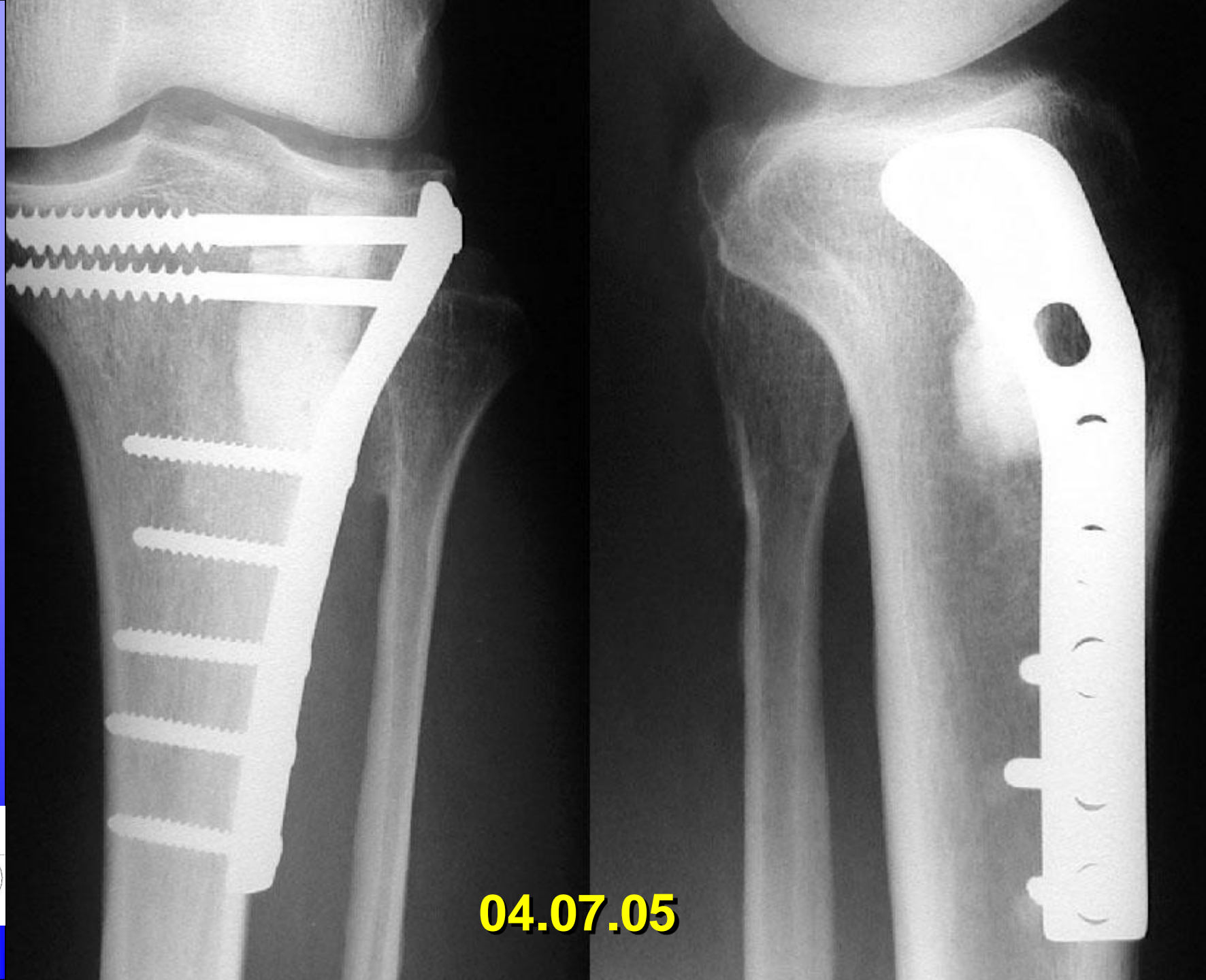


Lösung

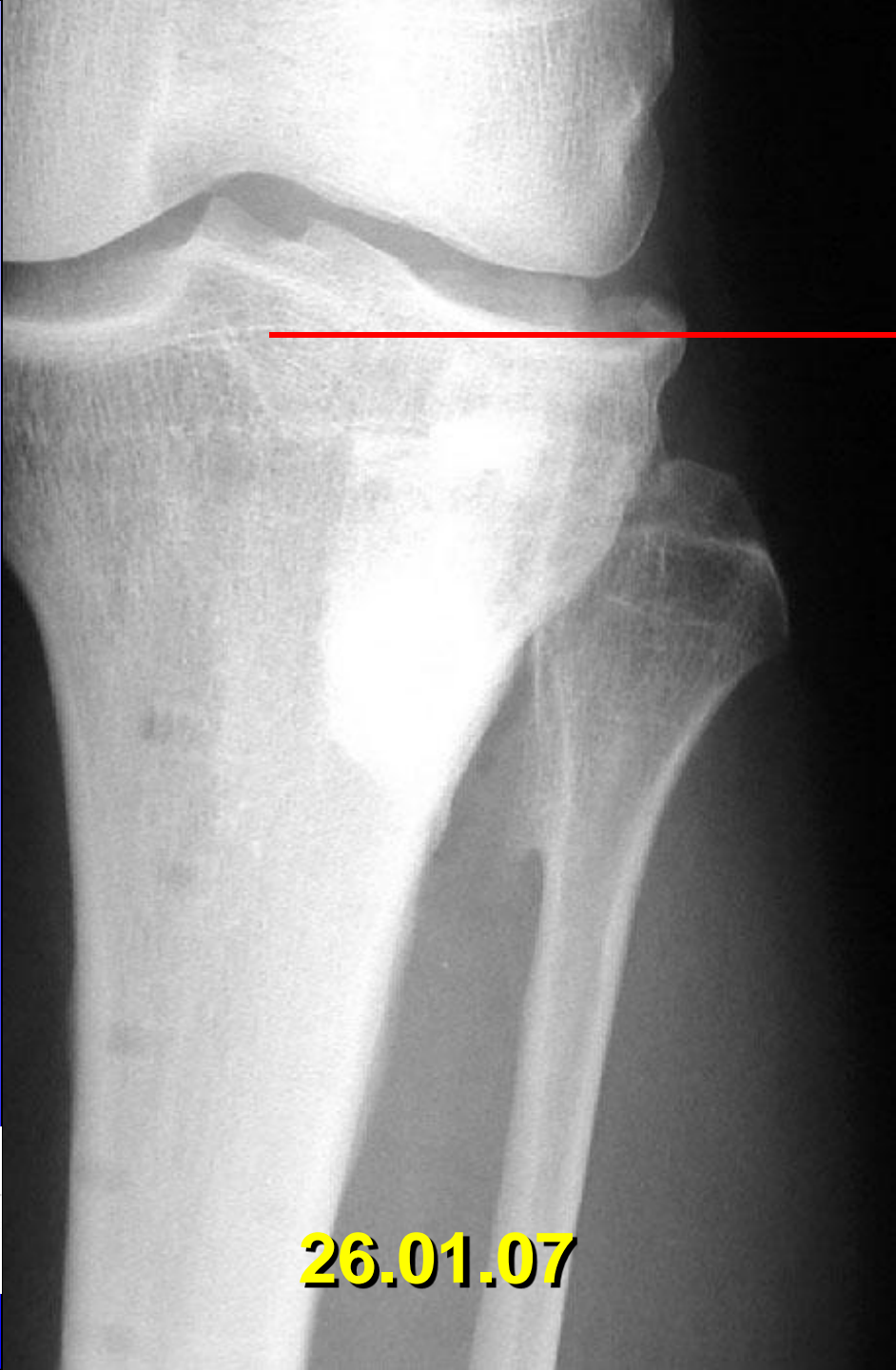
Resorbierbare Materialien

AO 41 – B3

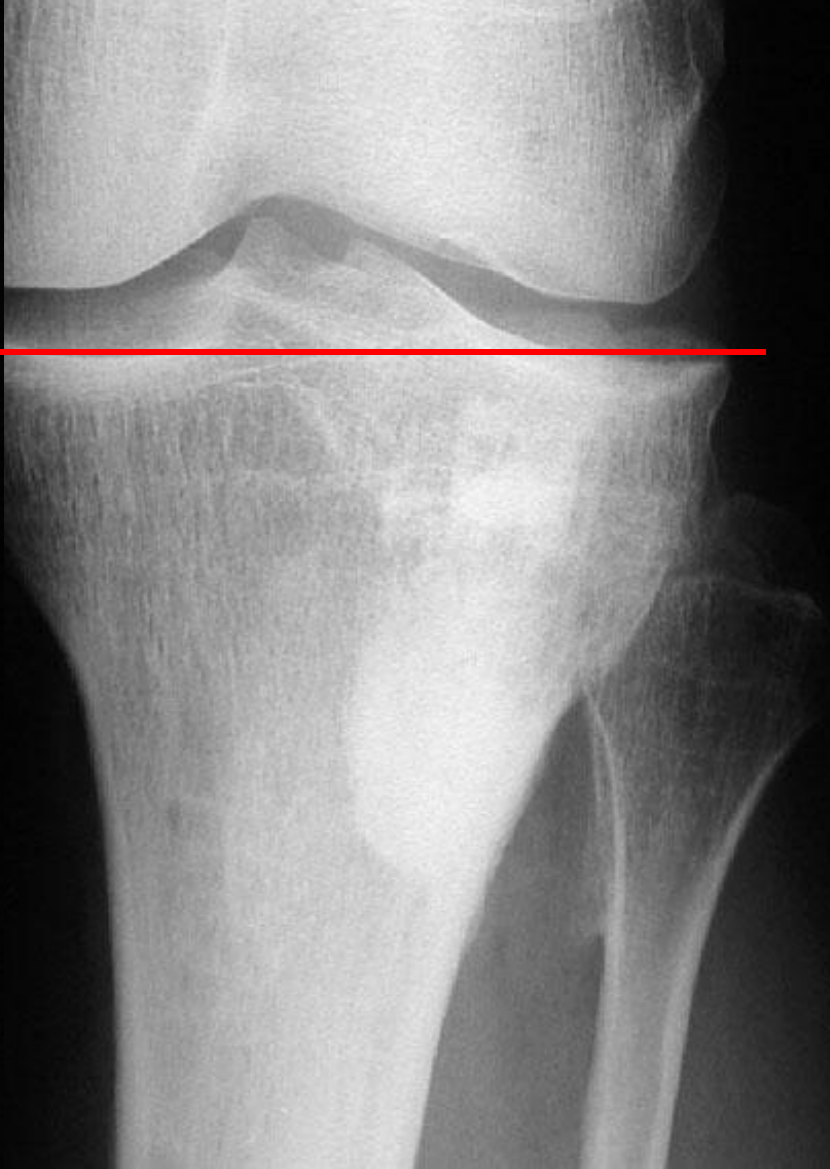




04.07.05



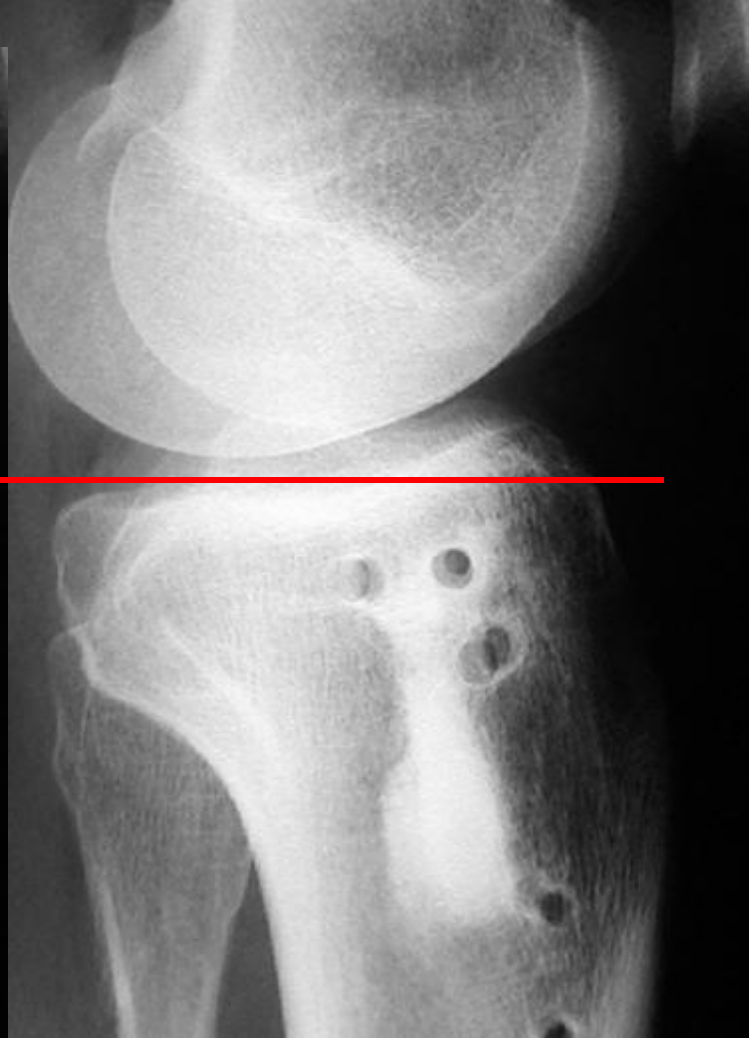
26.01.07



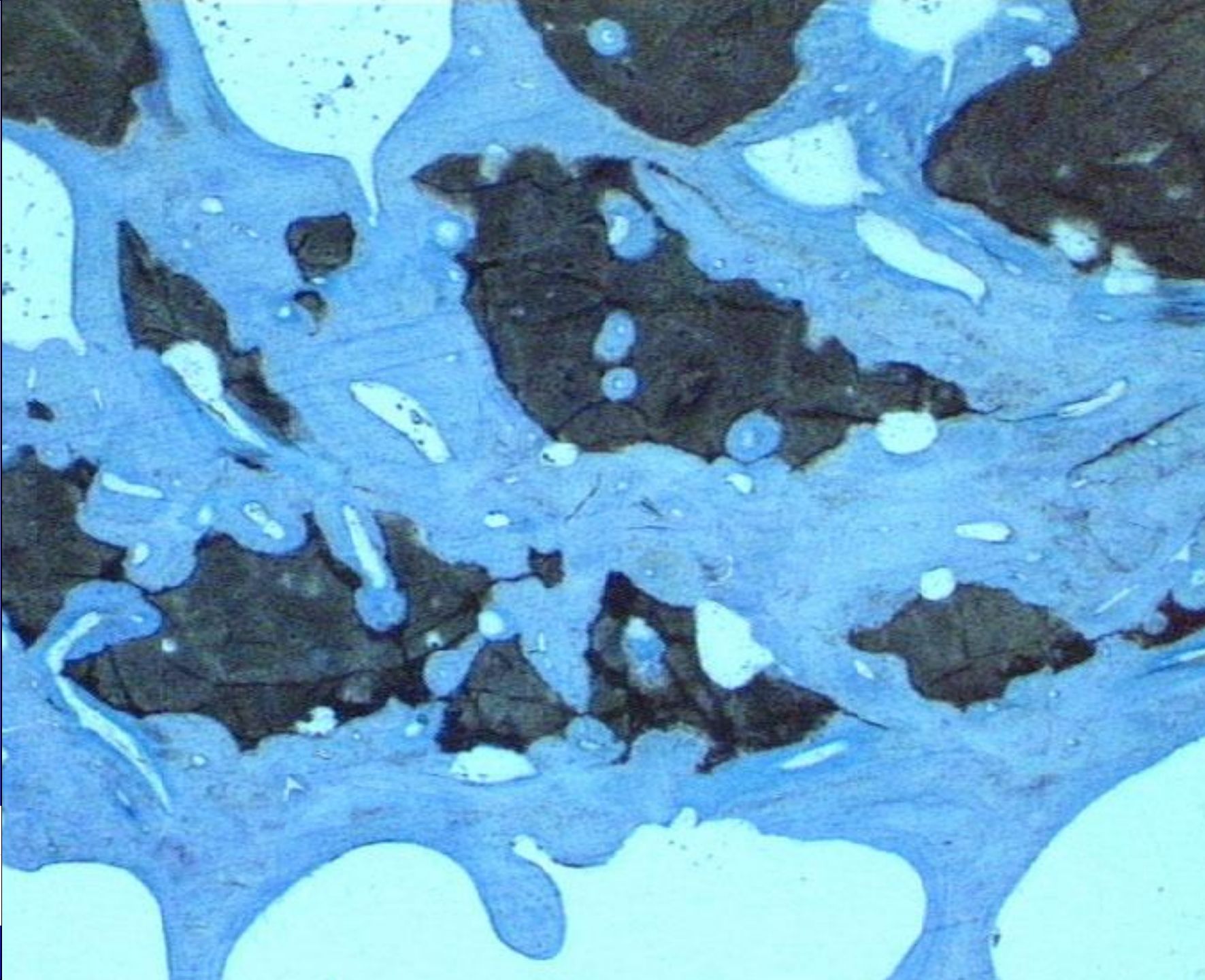
23.04.07



26.01.07



23.04.07

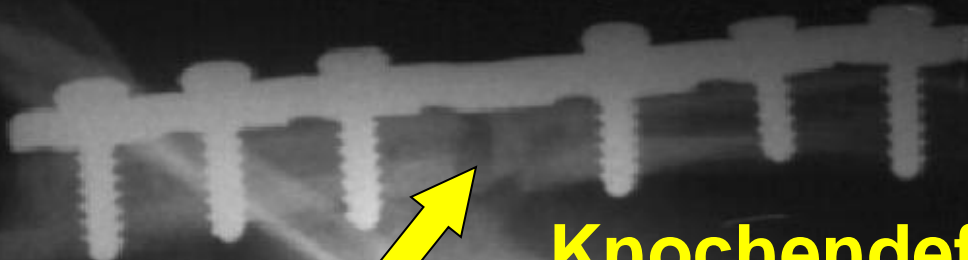




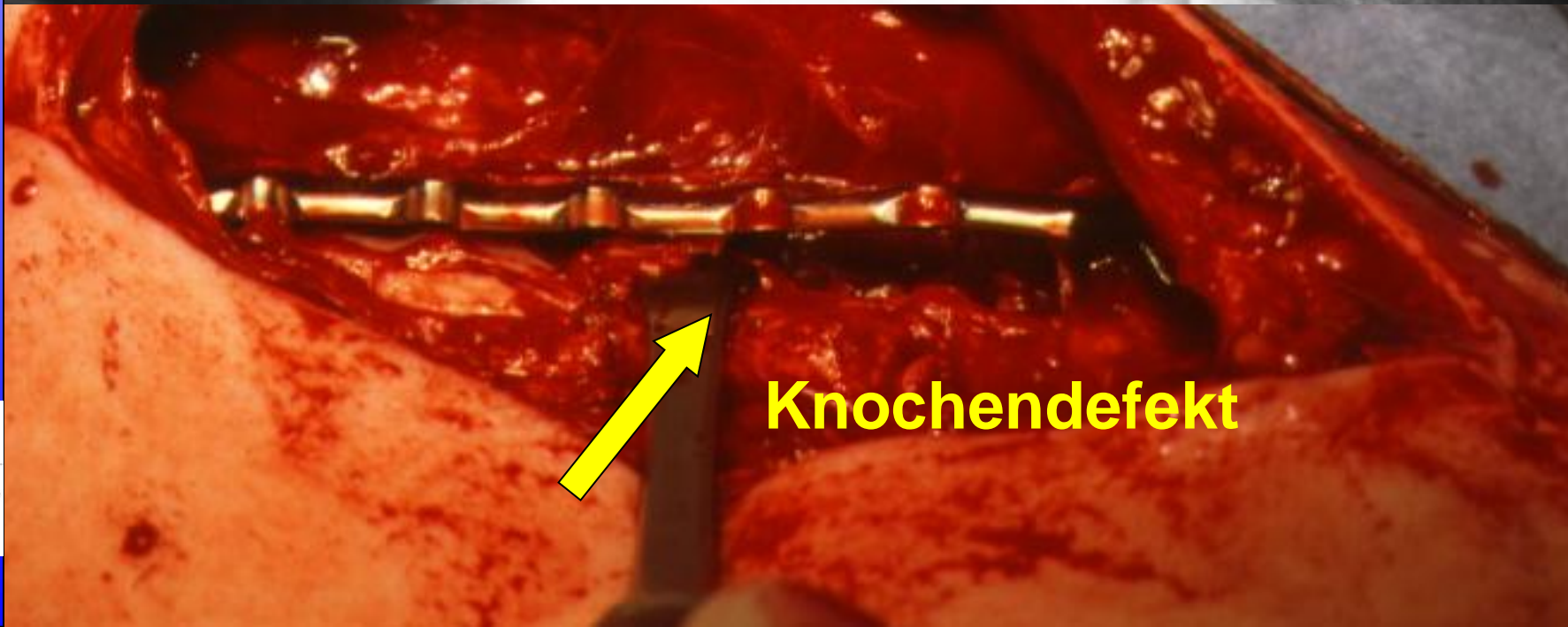


P.N. 22J fem.

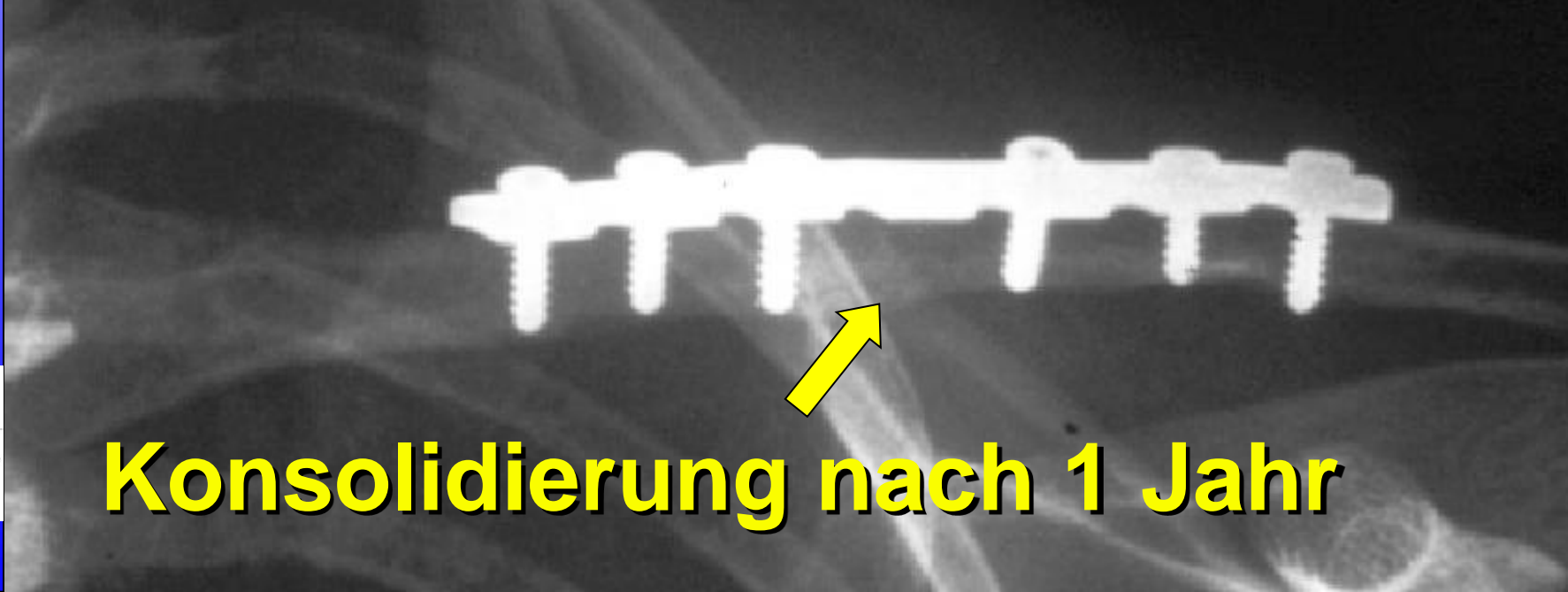
Klavikula-Pseudarthrose



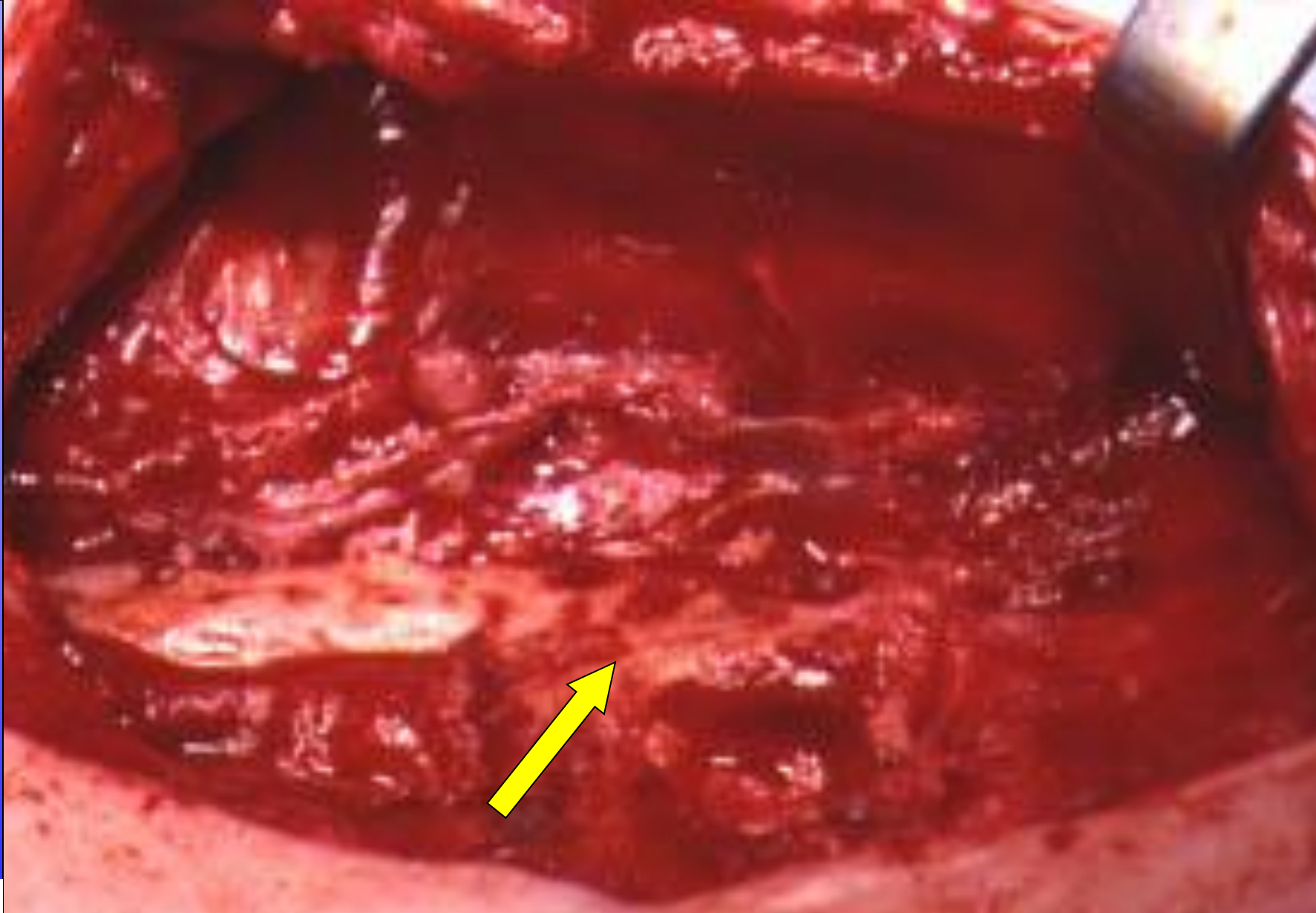
Knochendefekt



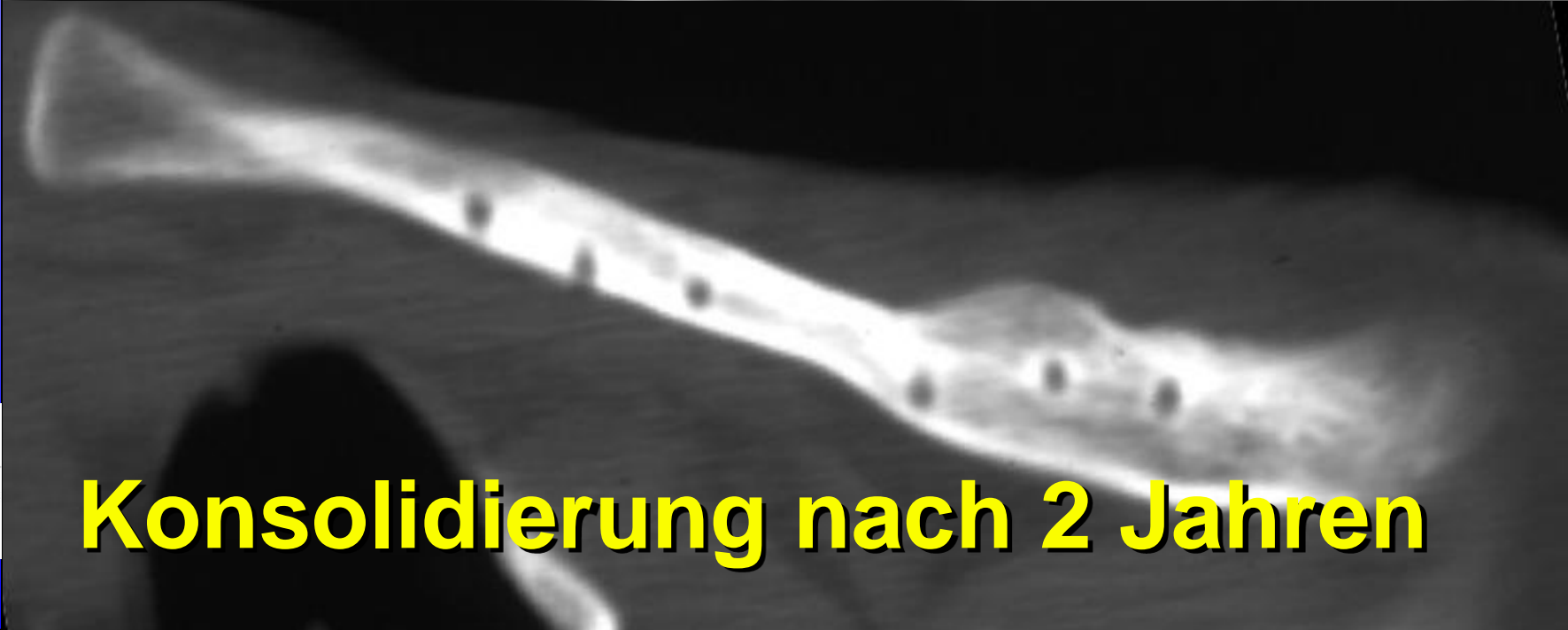
Knochendefekt



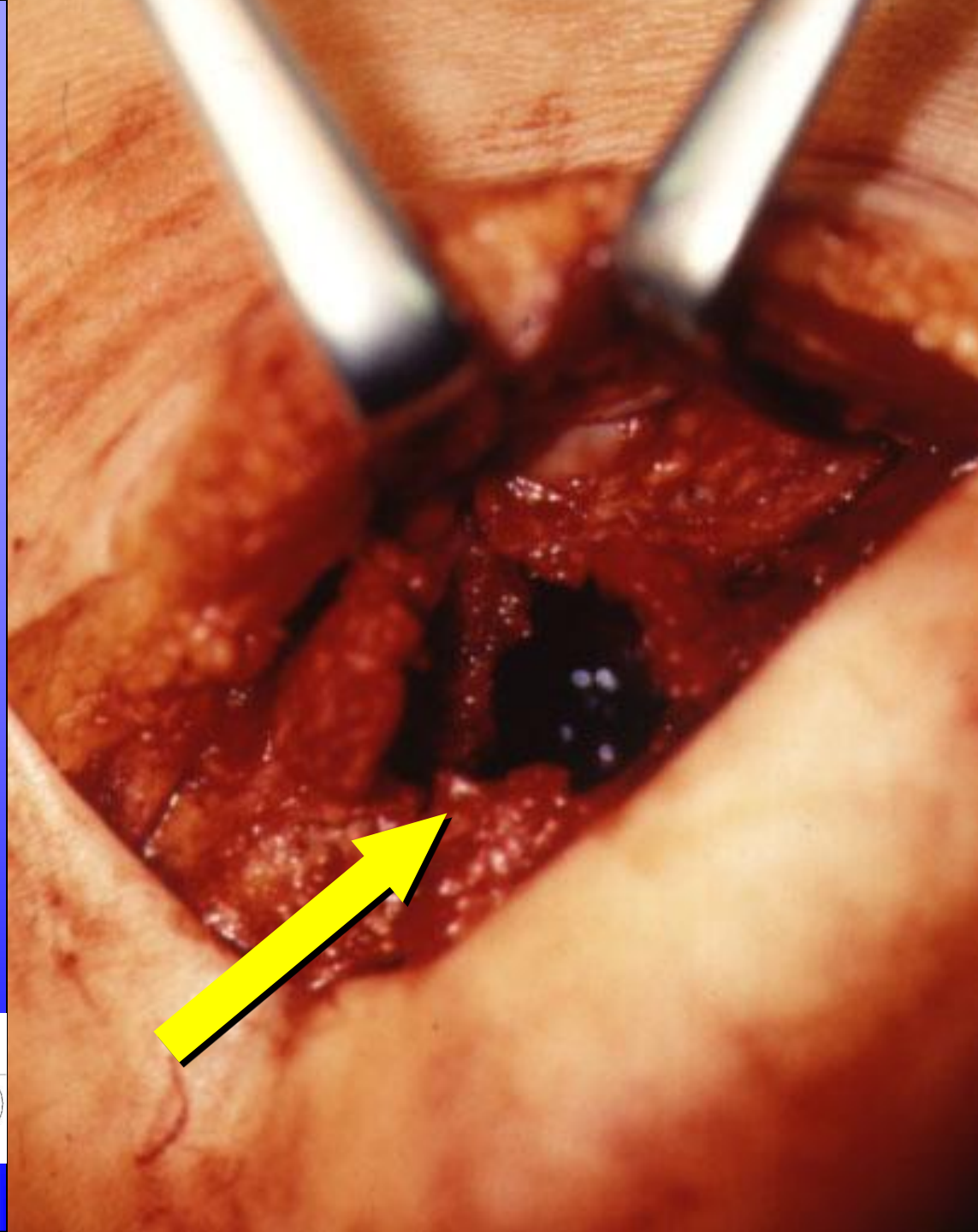
Konsolidierung nach 1 Jahr



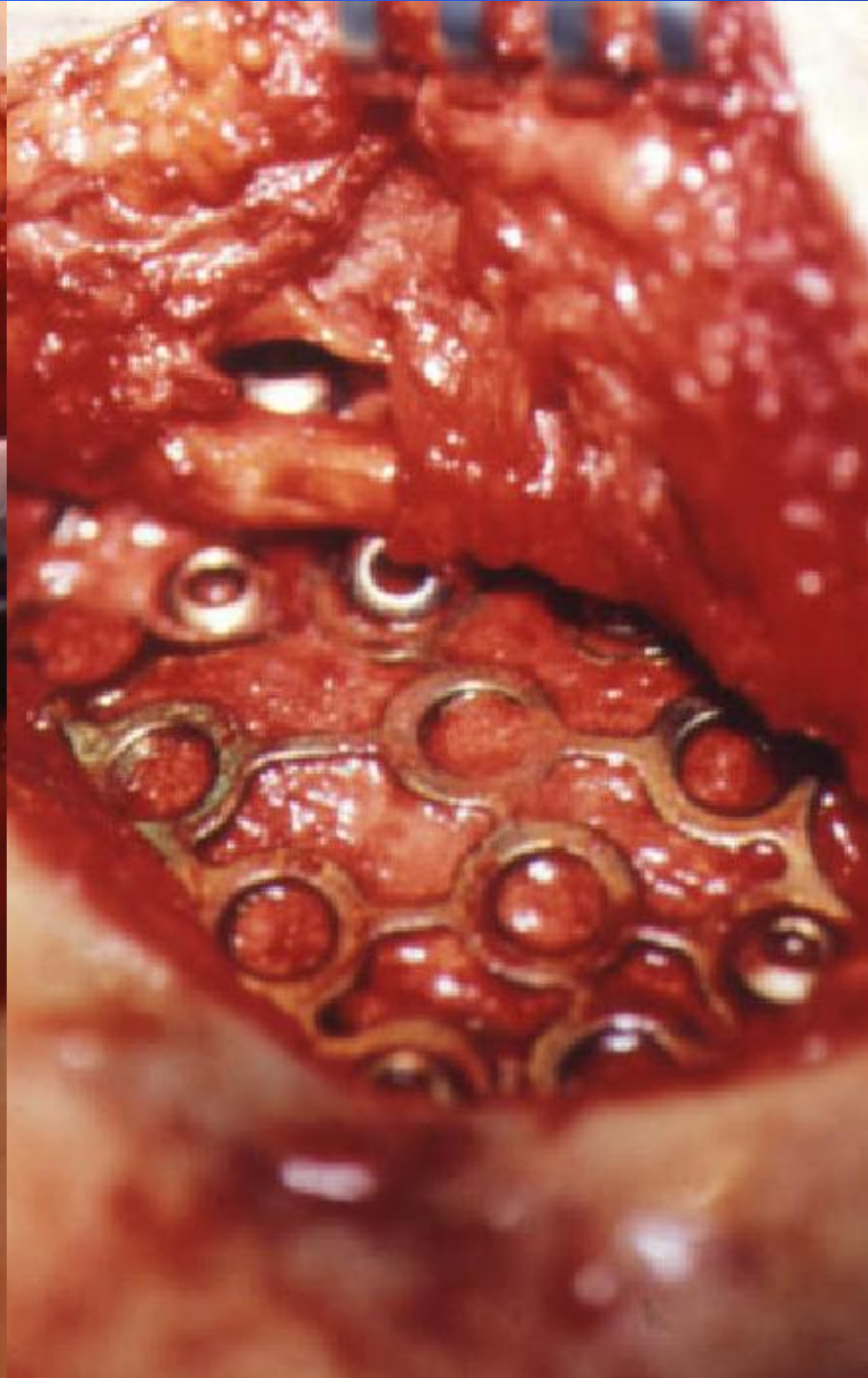
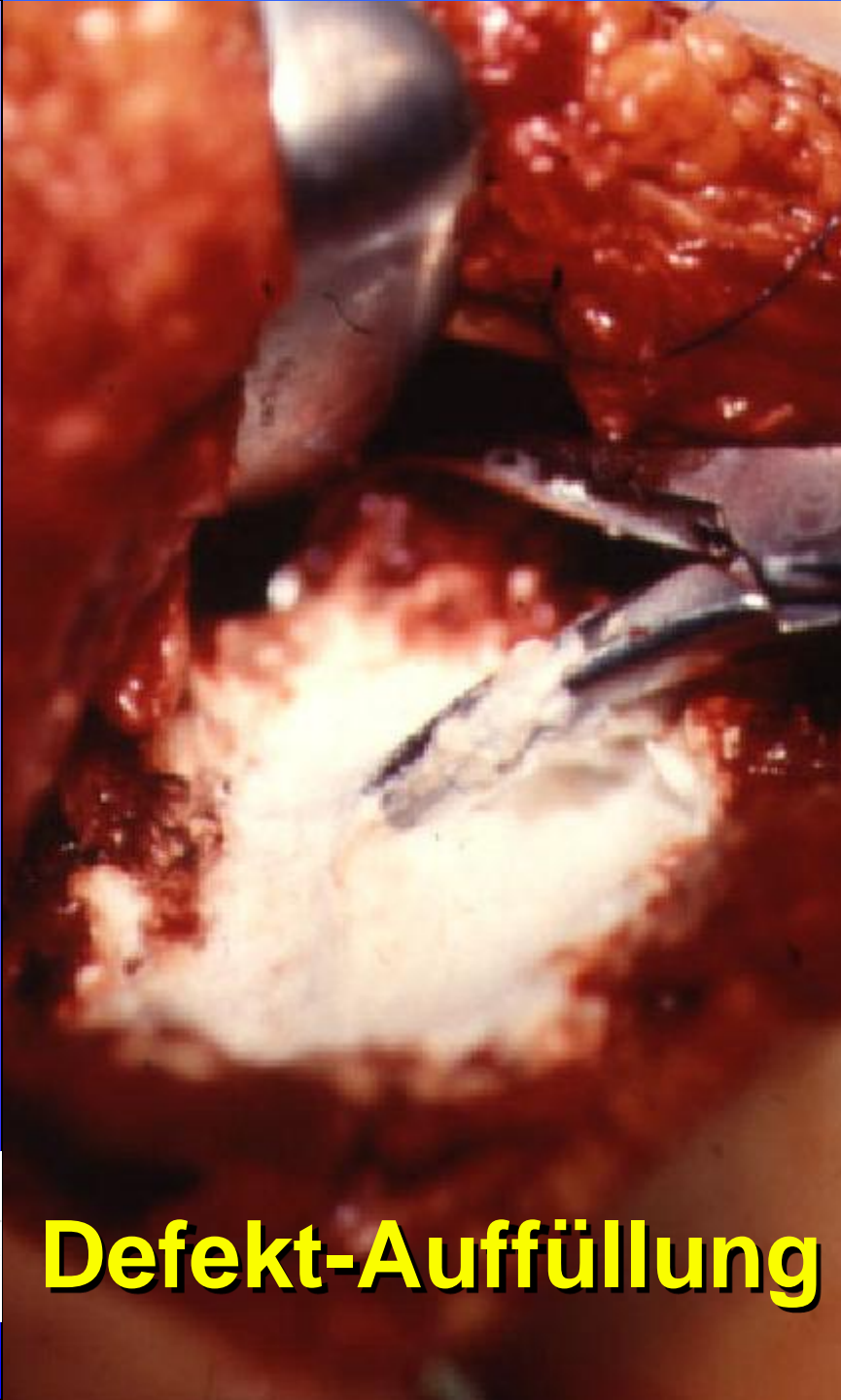
Konsolidierung nach 1 Jahr

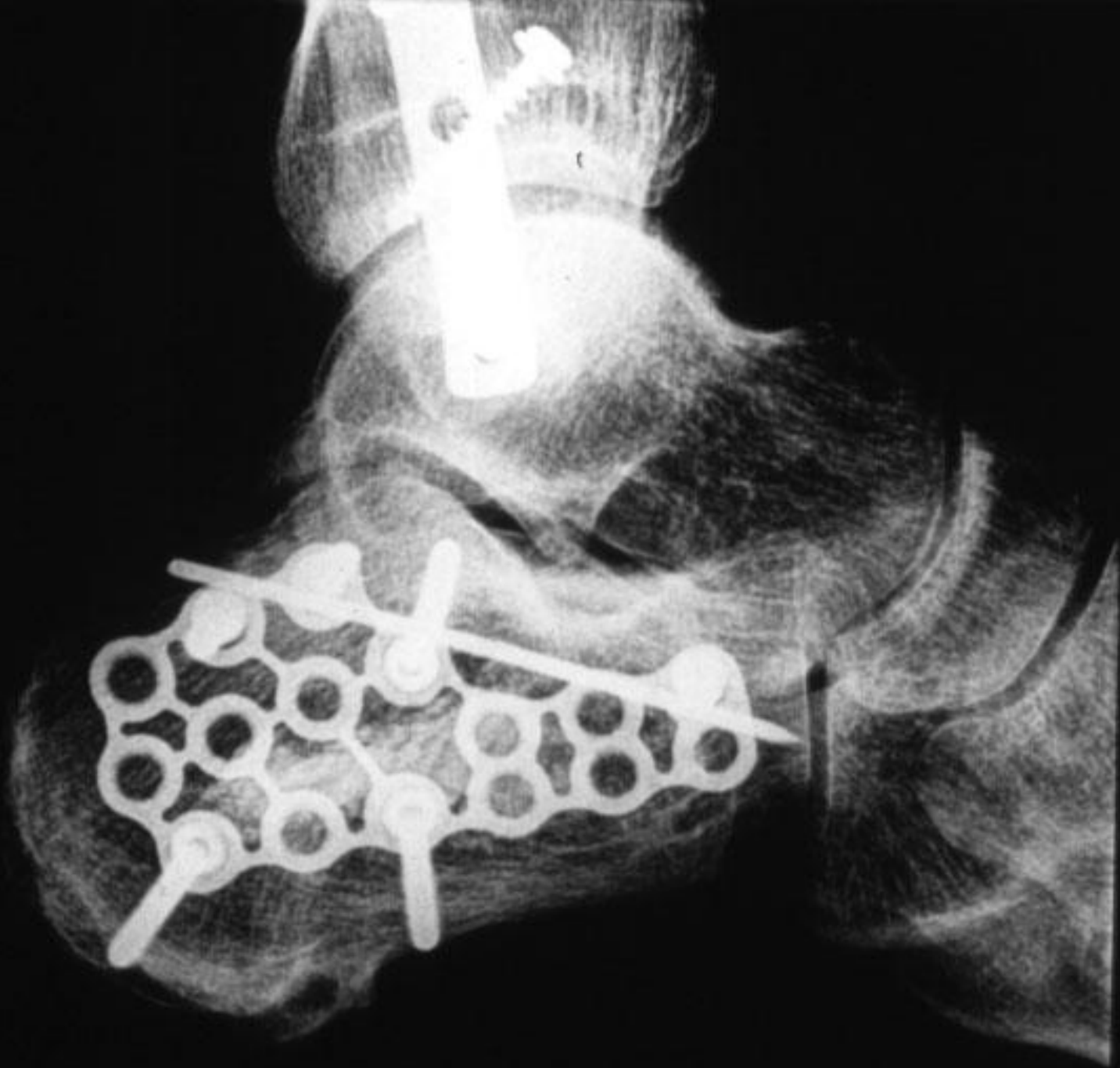


Konsolidierung nach 2 Jahren



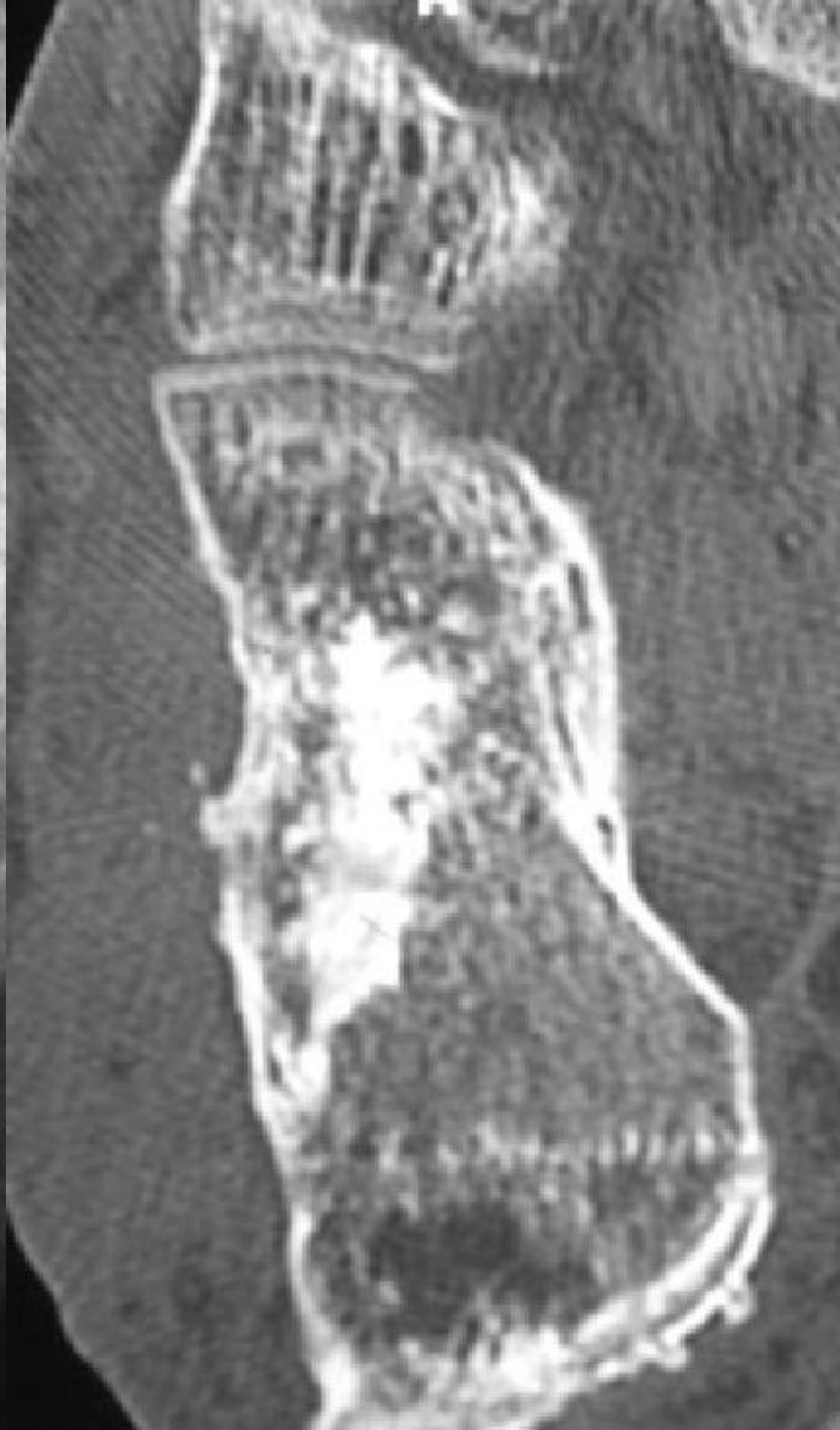
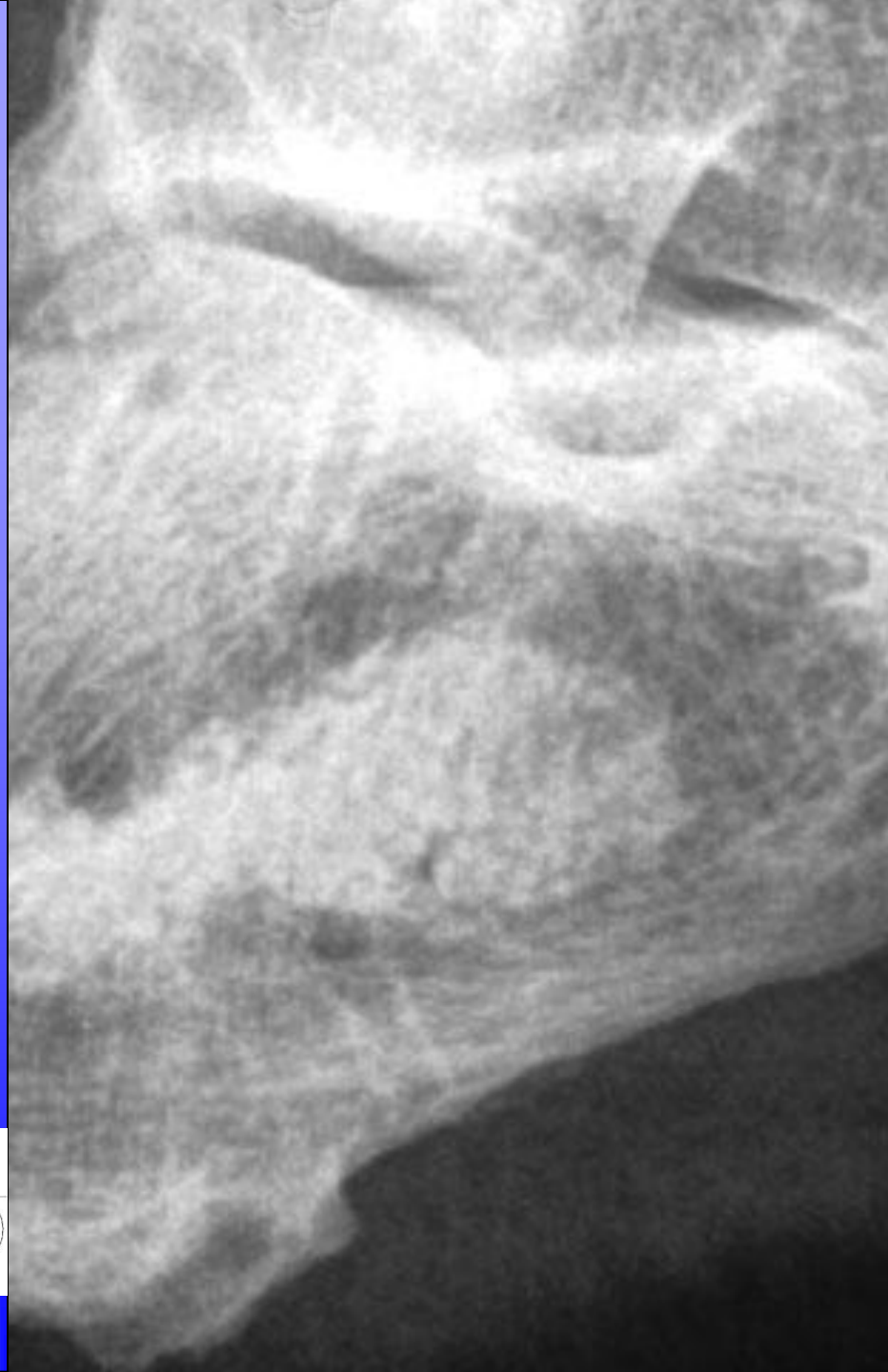
Defekt-Auffüllung









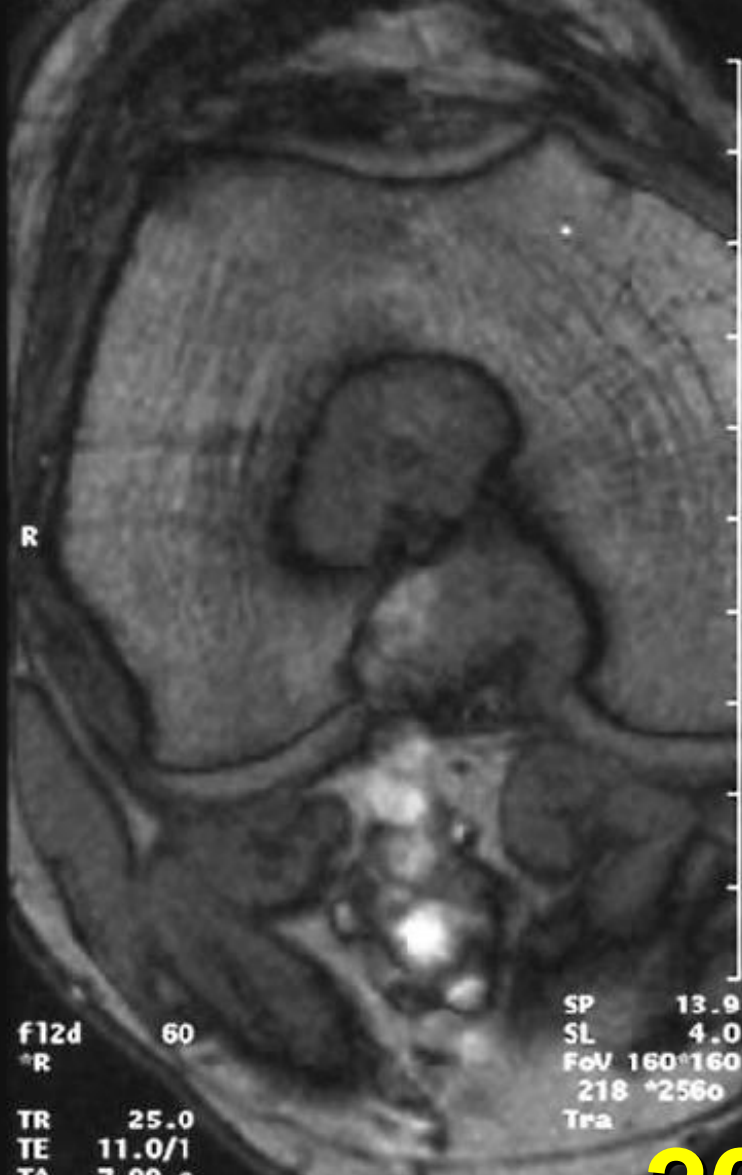




intraosseäre Zyste

15.01.2003

22633/02 Radiologie Friedberg
07-MAY-1939 F-SP-CR VB33D
11:15 + : F A L
14-NOV-2002
IMAGE 81
SER 1-8



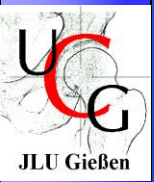
f12d 60
*R
TR 25.0
TE 11.0/1
TA 7.99 s
AC 1
SP 13.9
SL 4.0
FoV 160*160
218 *256o
Tra
DRES. PEIL/PATZAK W 1980
RE. KNIE C 1020

22633/02 Radiologie Friedberg
07-MAY-1939 F-SP VB33D
11:17 + : F A L
14-NOV-2002
IMAGE 87
SER 1-12



Post CM
tse2-5 180
TR 1521.0
TE 22.0/1
01:20
SP -98.1
SL 3.0
FoV 165*220
130 *256o
Sag>Tra 16
>Cor 7
DRES. PEIL/PATZAK W 1980
RE. KNIE C 1020

2006

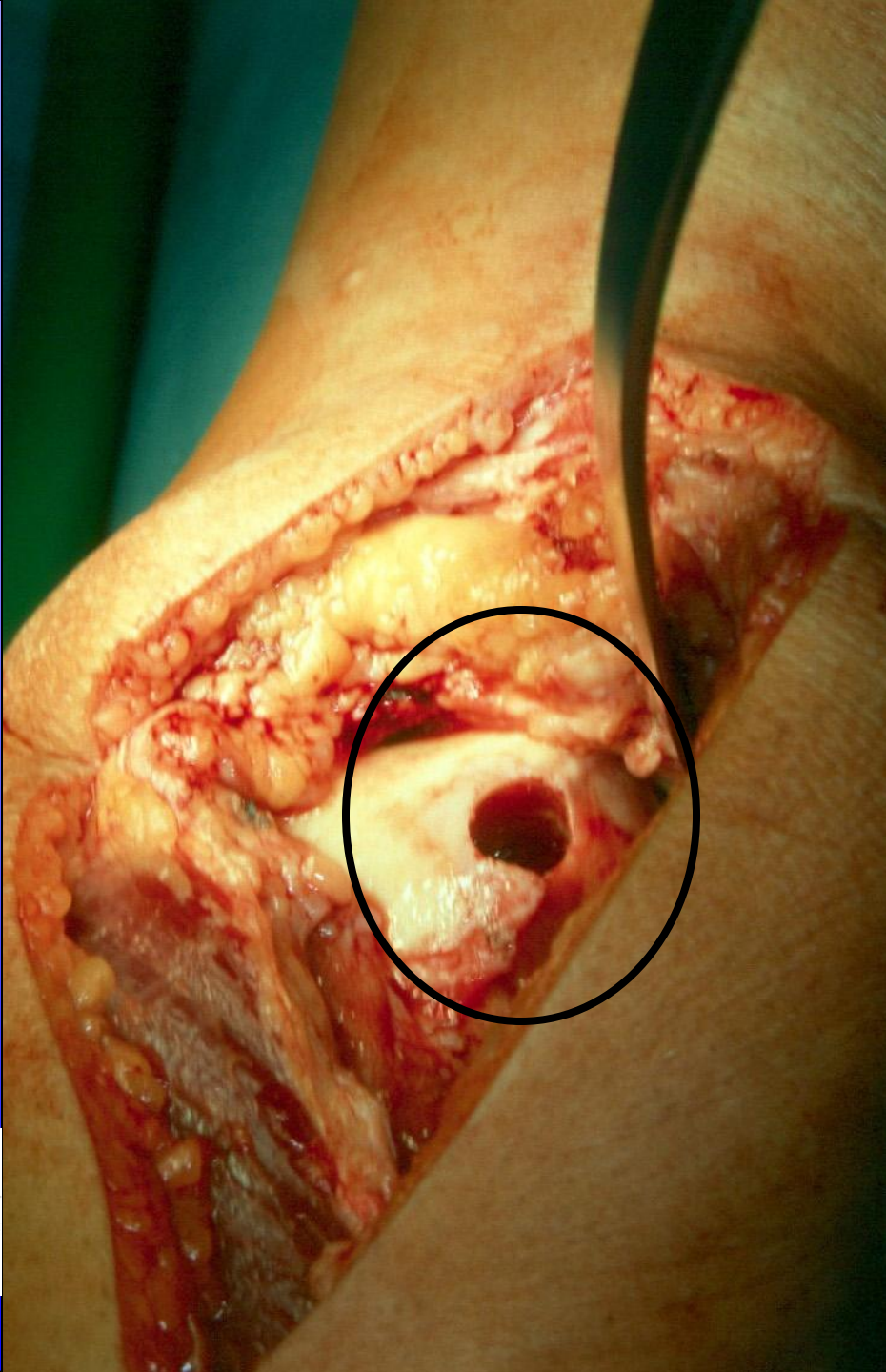


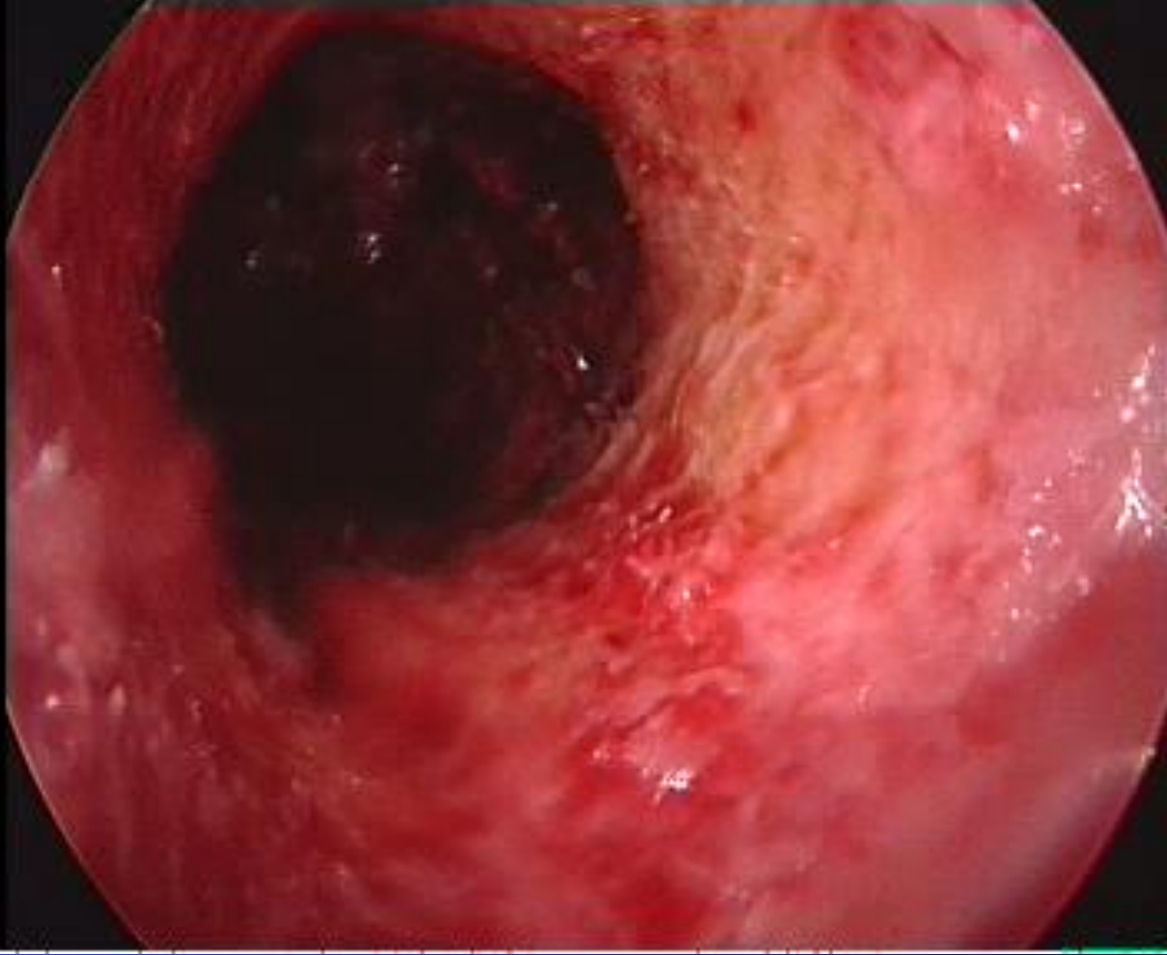


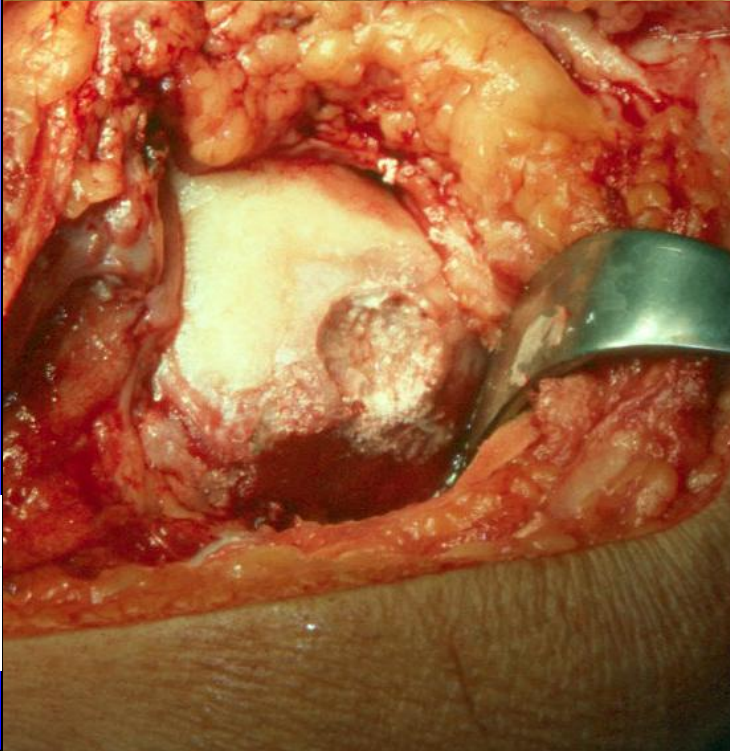
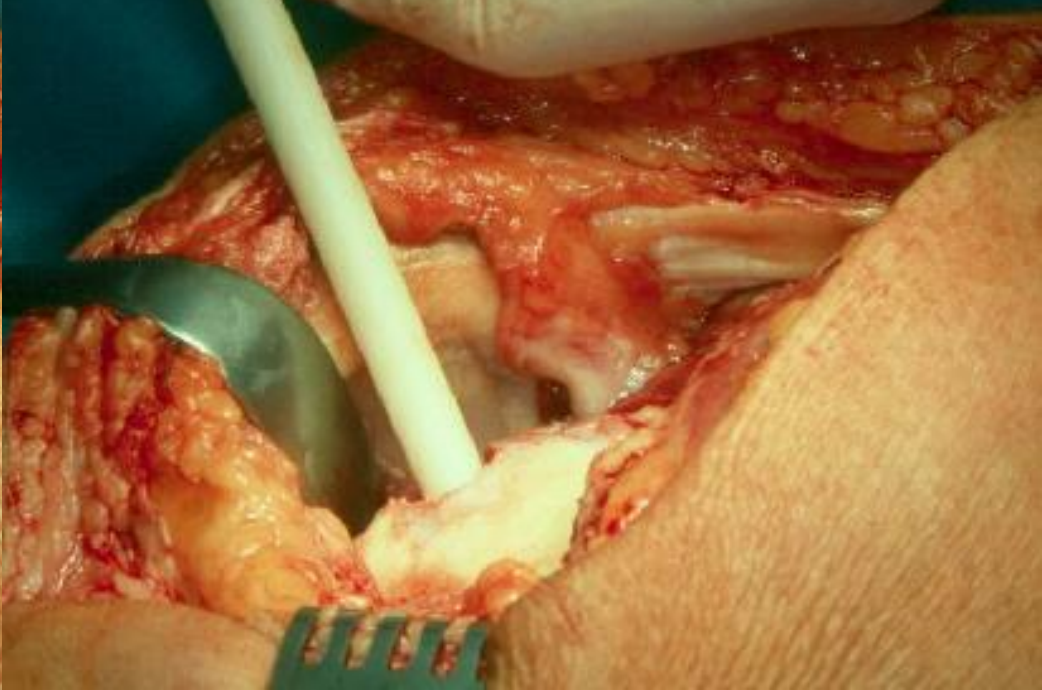
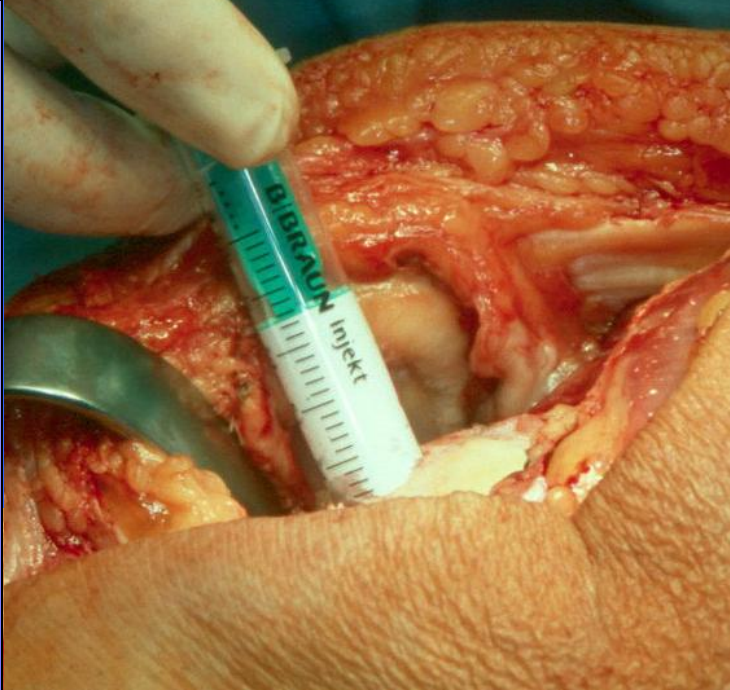


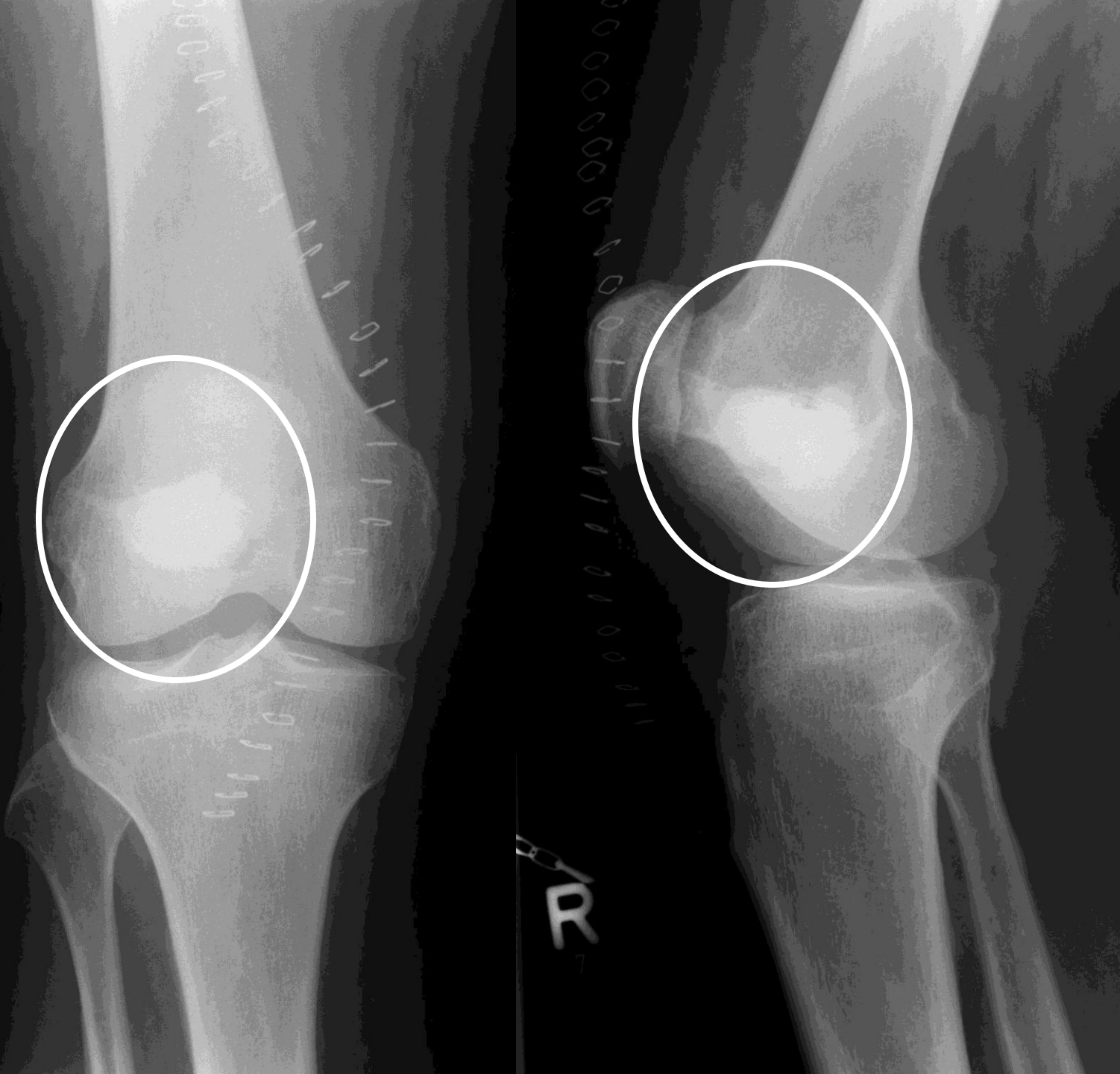
Diamond Bone Cutting System (DBCS)







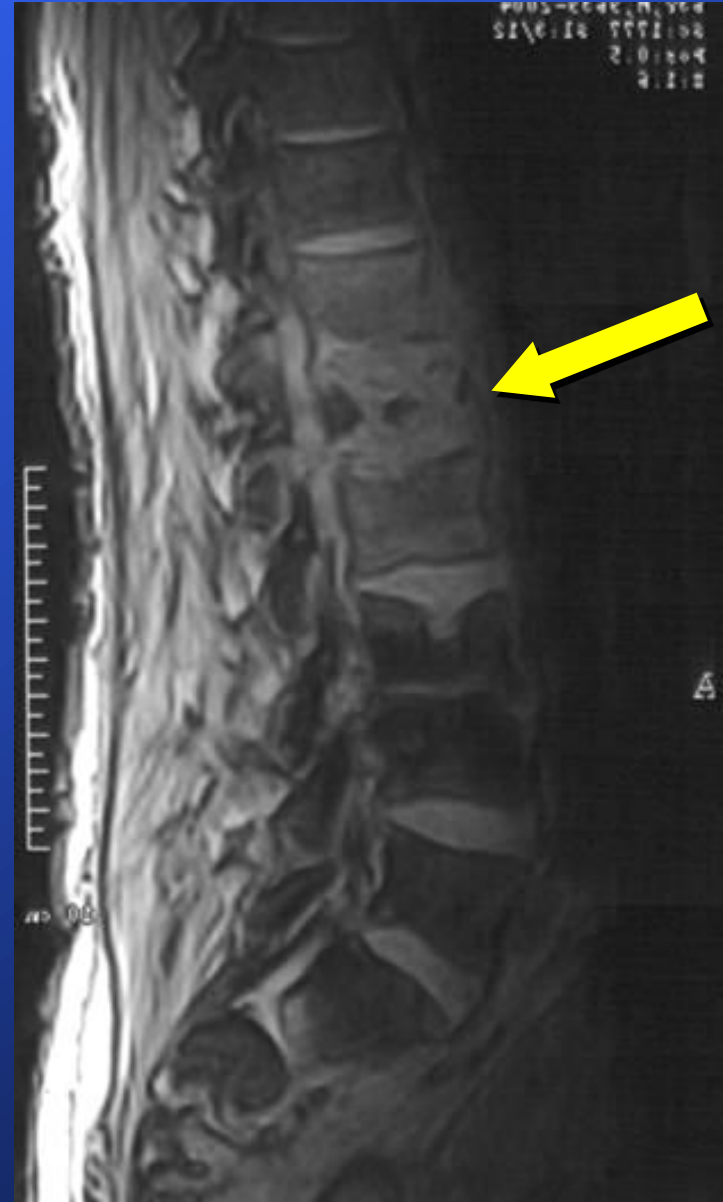
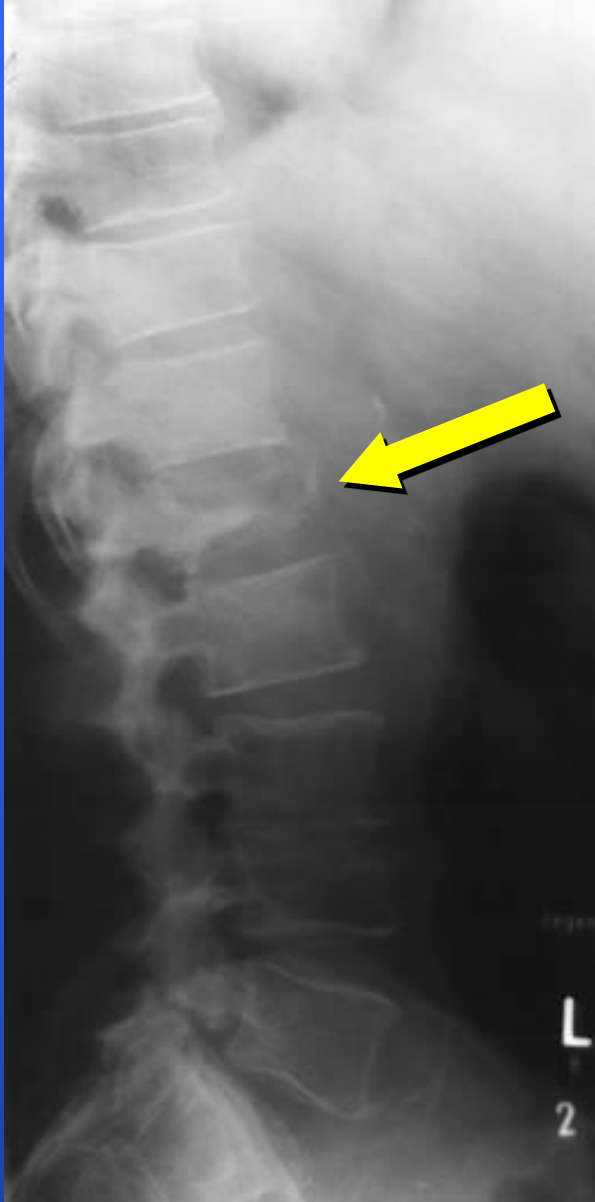






24.08.2009

Spondylodiszitis Th12/L1 MRSA

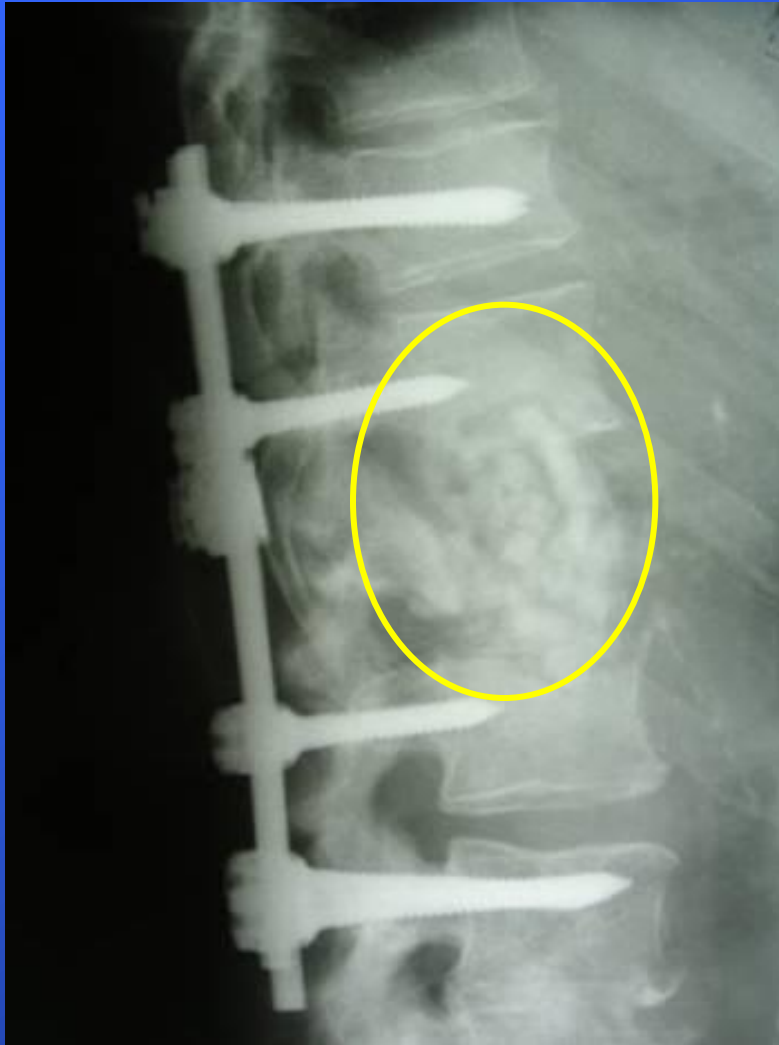


Operativer Situs Thorakotomie



**Augmentation mit Knochenersatzmaterial und
Wirkstoffträger (Vancomycin)**

Dorso-ventrale Spondylodese Th 11/12- L2/3 Corporectomie L 1



postop



6 Monate

➤ Augmentation mit Knochenersatzmaterial



Februar 2005



Mai 2009

➤ Wirkstoffträger (Rifampicin)



Augmentation mit Knochenersatzmaterial und Wirkstoffträger (Gentamycin / Clindamycin)



4 Wochen postop.



12 Monate postop.

- **Die knöchernerne Integration von Knochenersatzmaterialien hängt von der Mikrovaskularisation des Implantates ab**

Kidd, KR et al.; J Biomed Mat Res (2002)

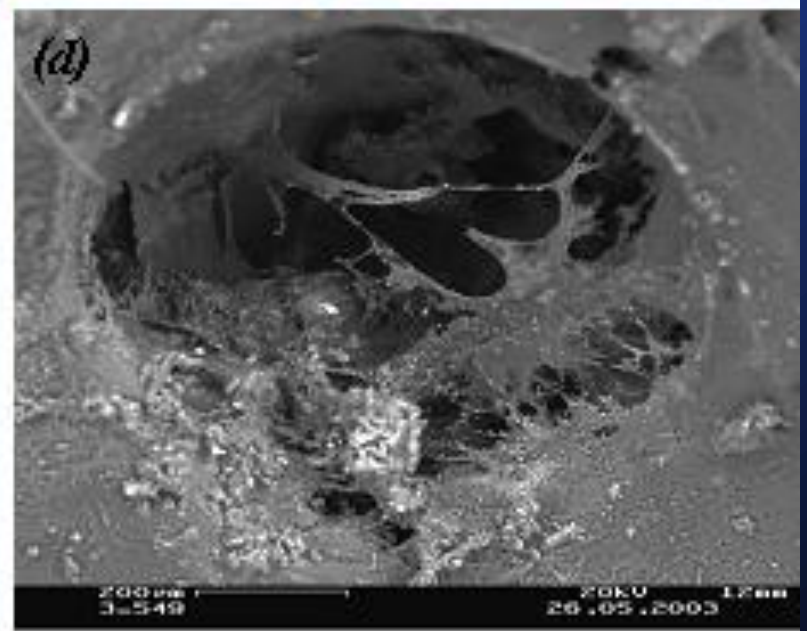
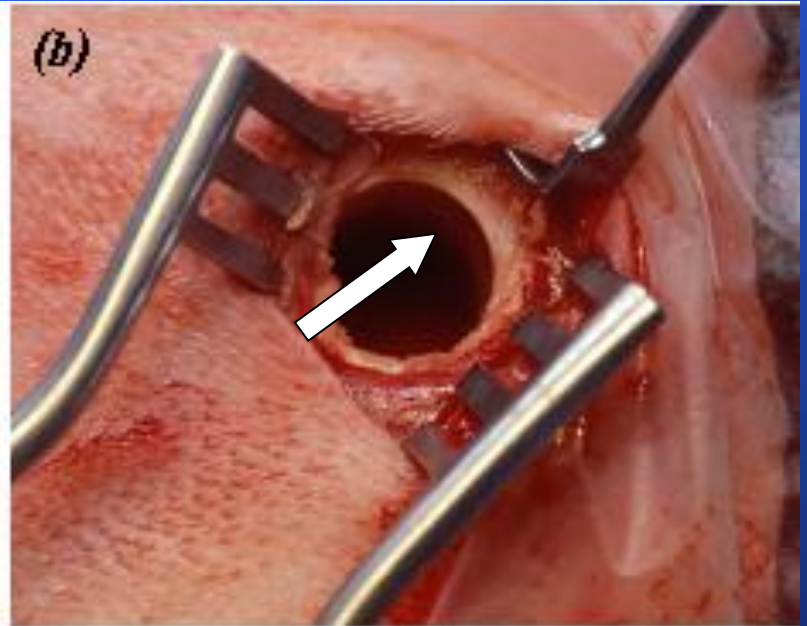
Sung, HJ et al.; Biomaterials (2004)

Williams, SK et al.; J Biomed Mat Res (A) (2006)

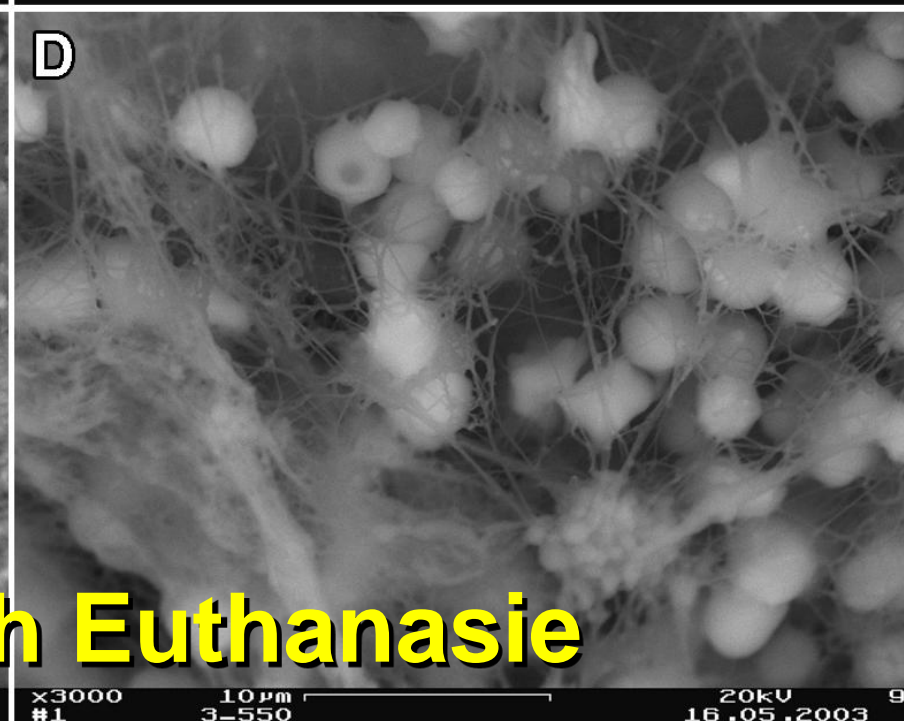
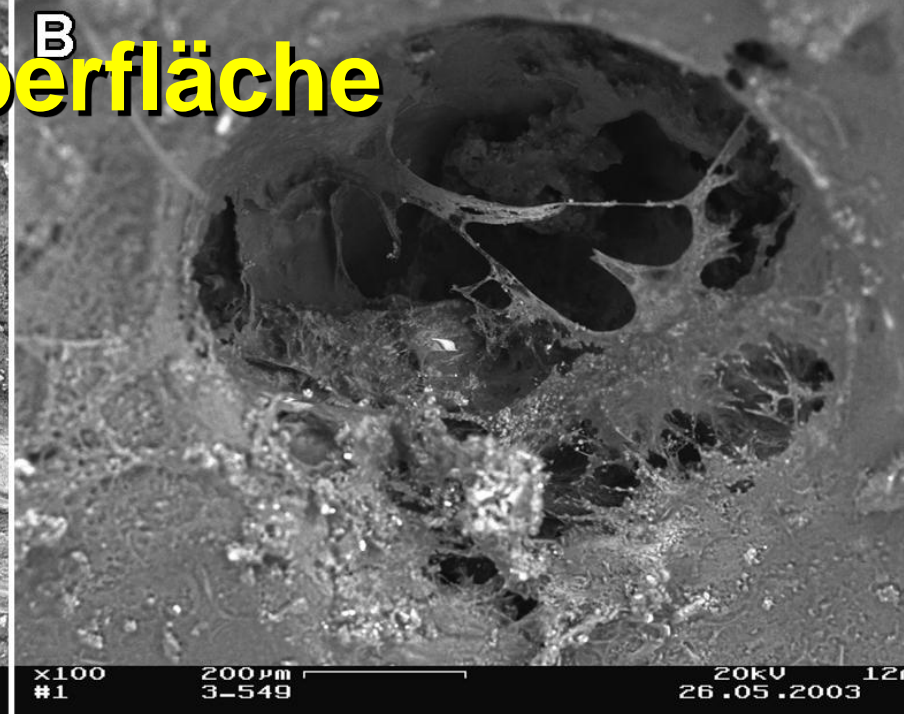
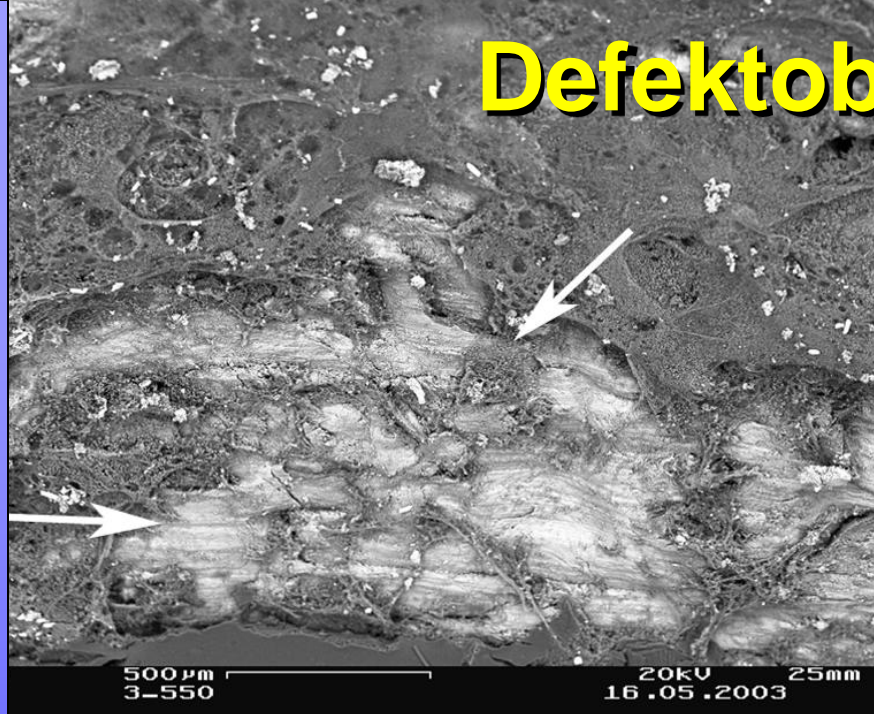
- 
- **Spielt das Lymphsystem eine wesentliche Rolle beim Abbau von Biomaterialien?**

- **Lymphgefäße konnten im kortikalen und spongiösen Knochen nicht nachgewiesen werden**

Edwards JR et al.; Hum Pathol 39 (2008)

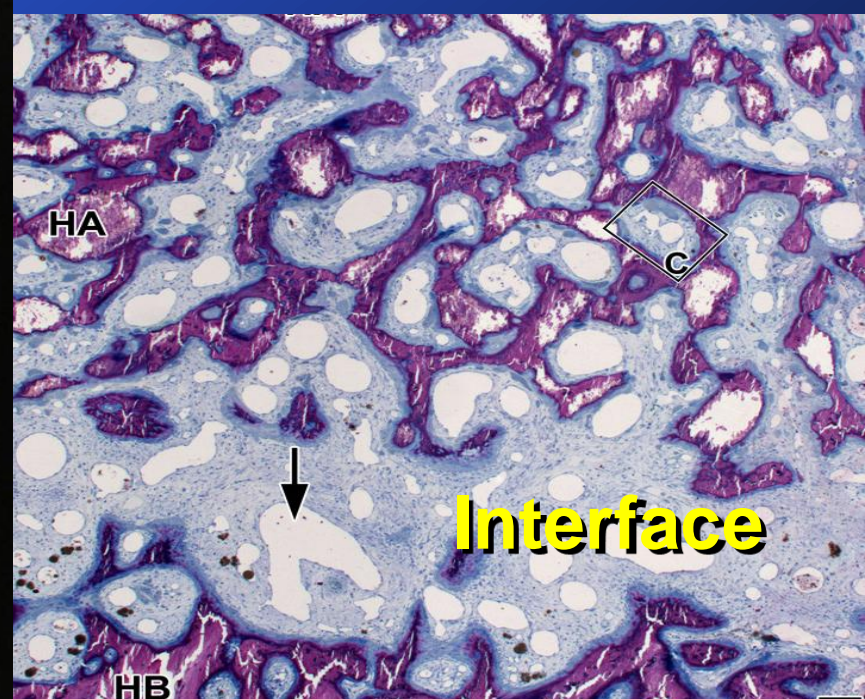
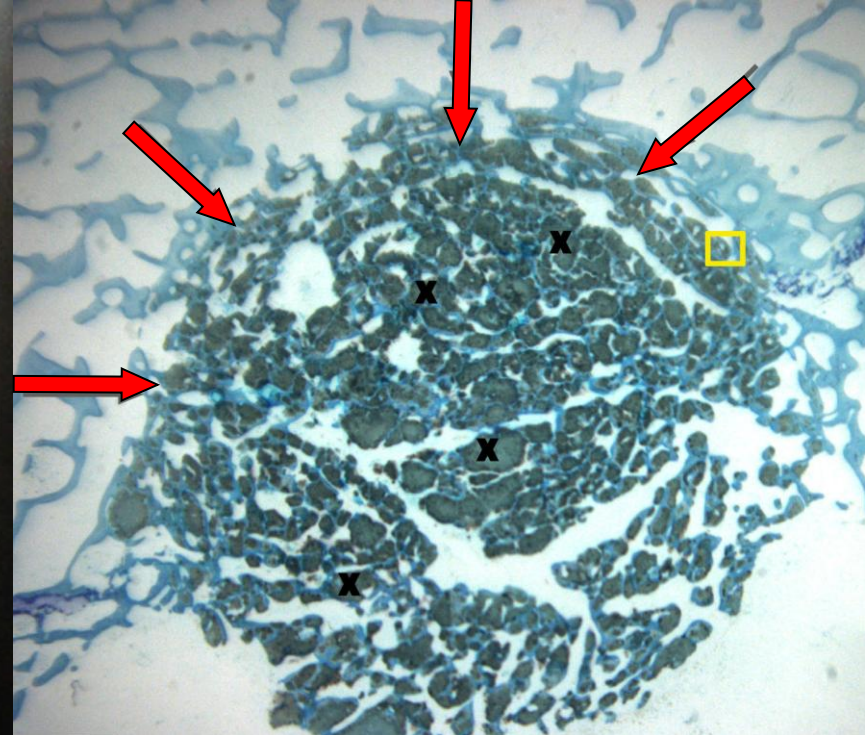
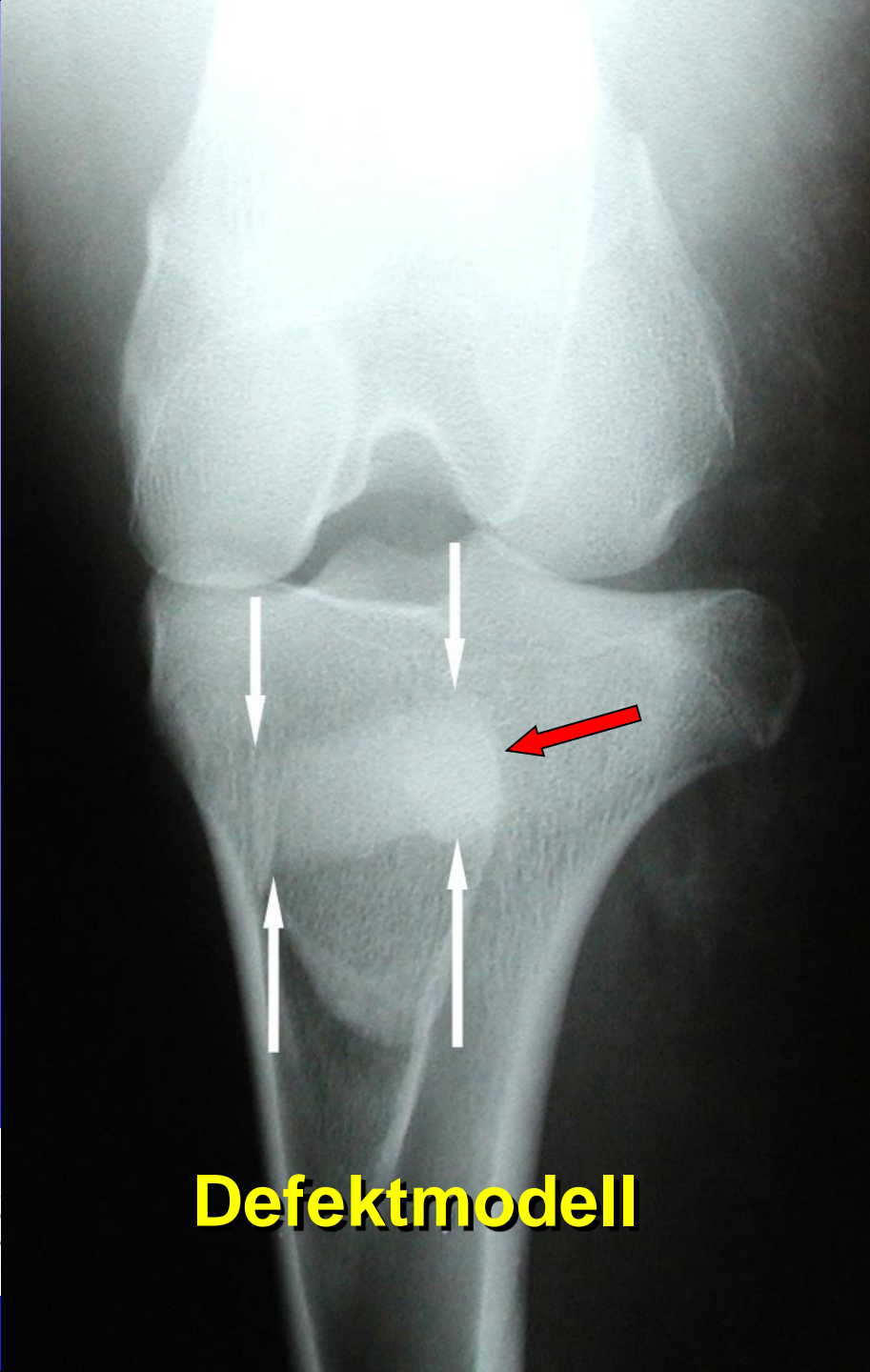


Defektoberfläche

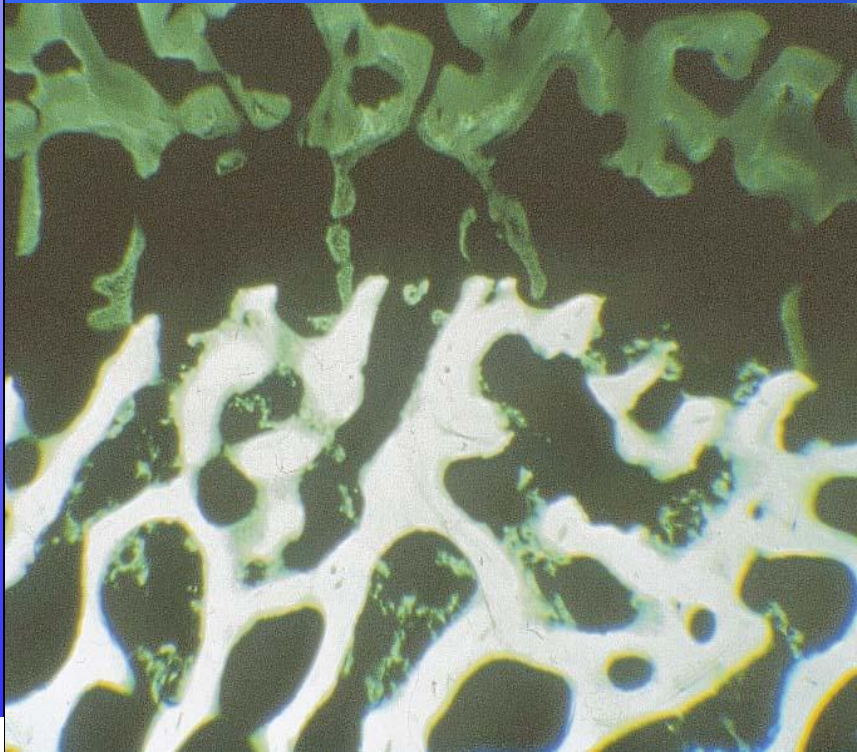


1 Minute nach Euthanasie

Defektmodell



➤ Interface



➤ **Angiogenese ist definiert als Prozess der Kapillargefäßbildung durch Intussusception oder Invagination bereits existierender Gefäße**

Bussolino, F et al.; Trends Biochem Sci (1997)

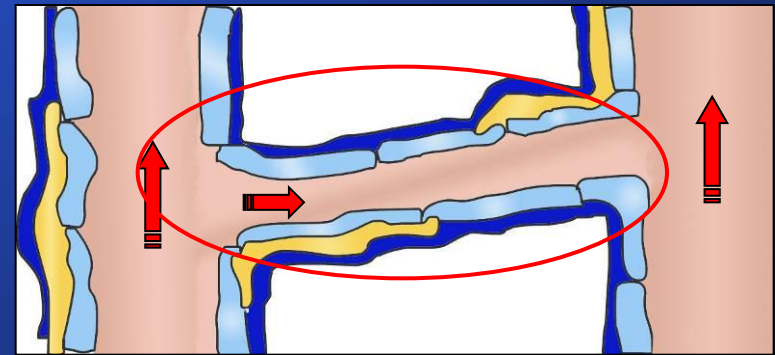
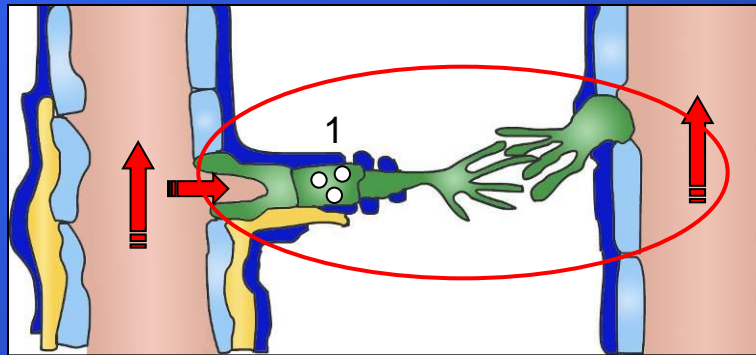
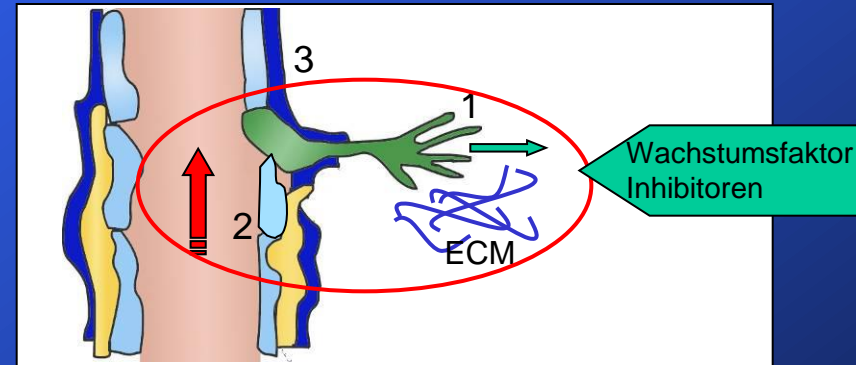
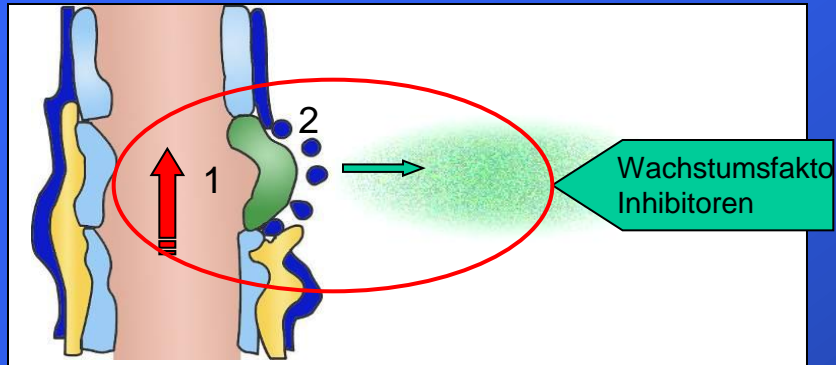
Risau, W; Nature (1997)

Djonov, V et al.; Cell Tissue Res (2003)

- **frühere Untersuchungen der Mikrovaskularisation bei der Frakturheilung im diaphysären Knochen zeigten Blutgefäßbildung durch**
 - **Sprouting**
 - **vasculogenetische Prozesse**

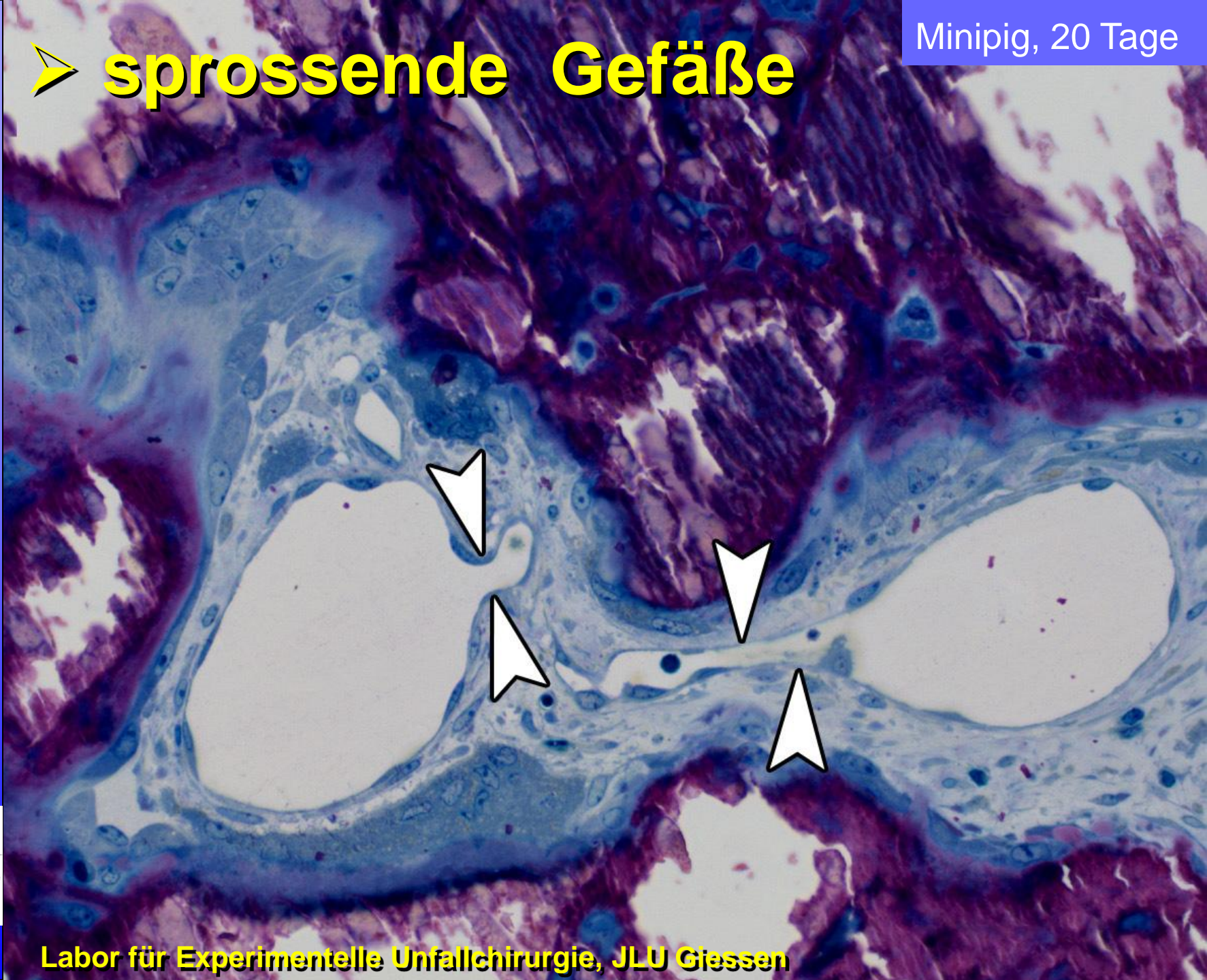
Asahara, T et al.; Science (1997)

Angiogenetisches Wachstum von Kapillaren



- Sprouting wird durch das Wechselspiel zwischen proangiogenetischen Signalen, wie z.B. VEGF, und abschwächenden Faktoren, wie z.B. VEGF-Inhibitoren, bestimmt

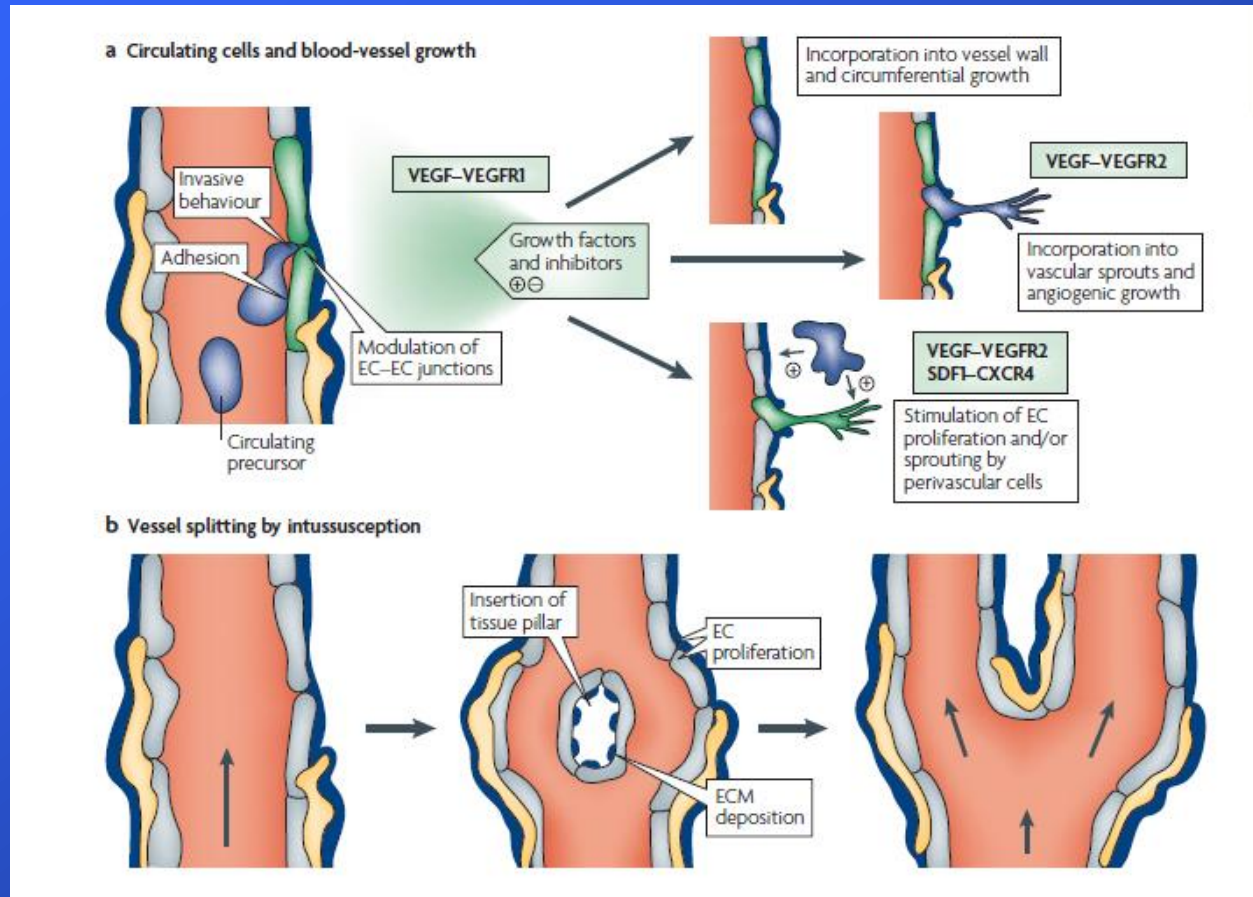
➤ sprossende Gefäße



➤ sprossende Gefäße



Wachstum von Blutgefäßen Vasculogenese und Intussusception

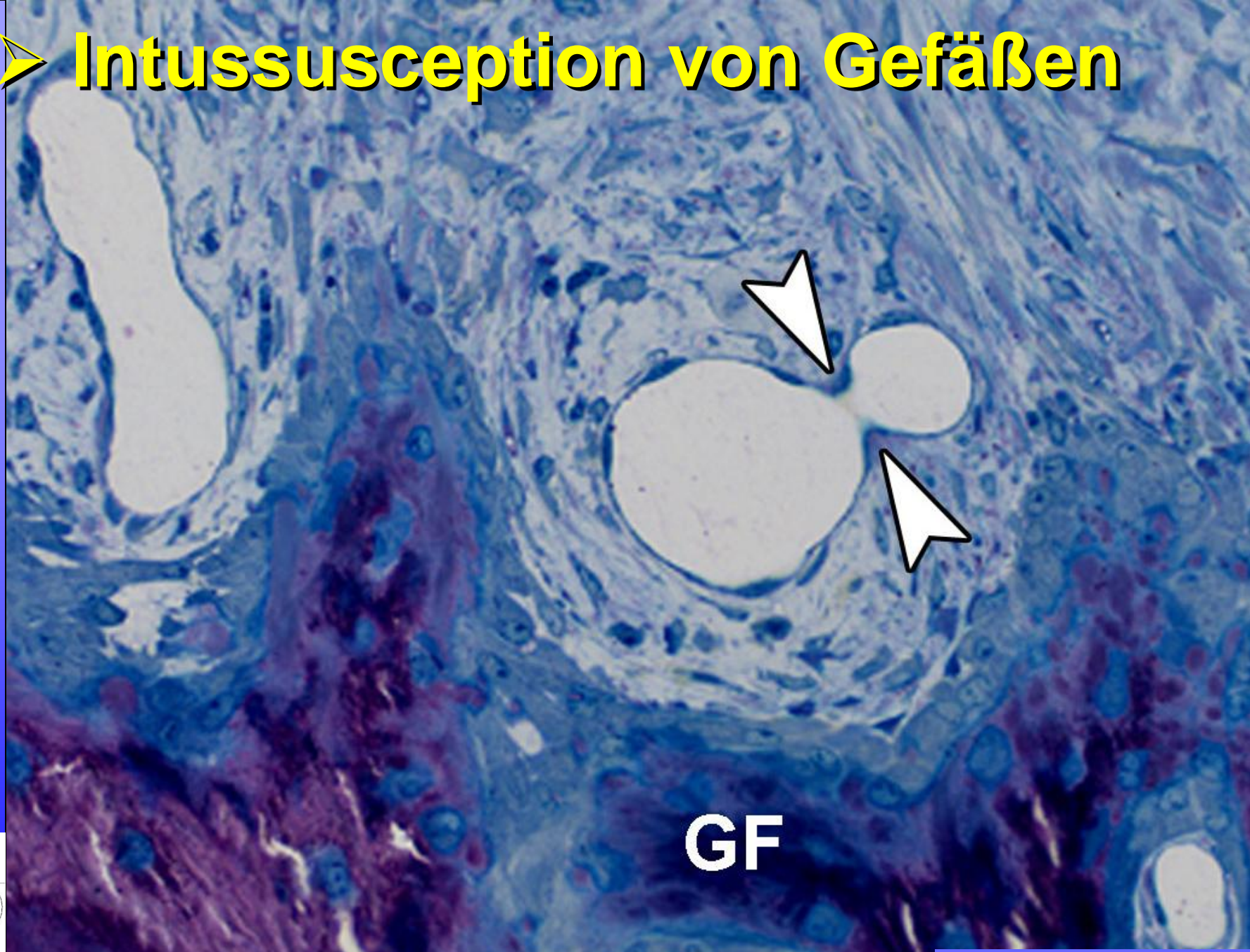


- Nur wenig ist über das Wachstum von Blutgefäßen durch Intussusception bekannt

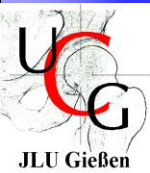
Adams RH, Alitalo K: Nature Reviews (2007)

➤ Intussusception von Gefäßen

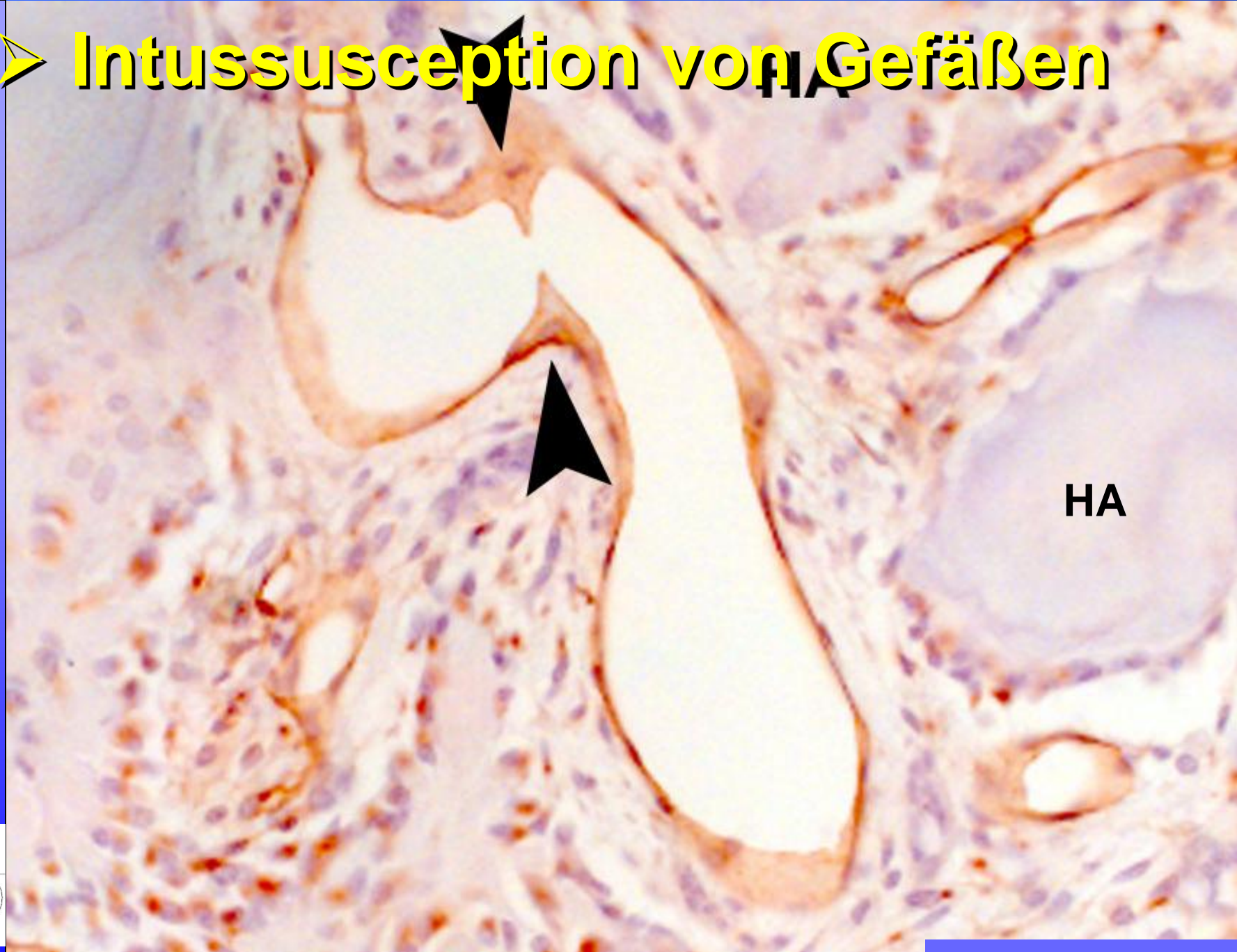
www.uniklinikum-giessen.de/ucg



GF

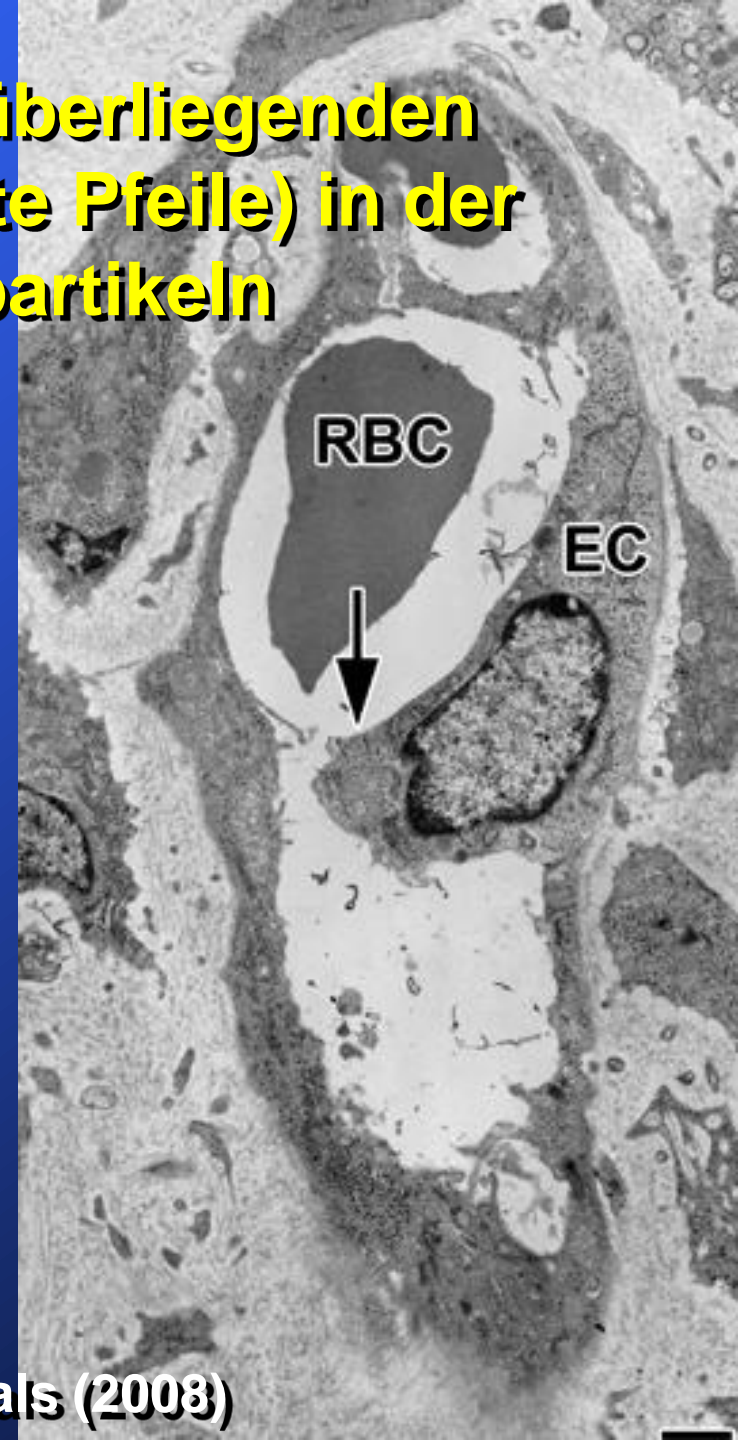
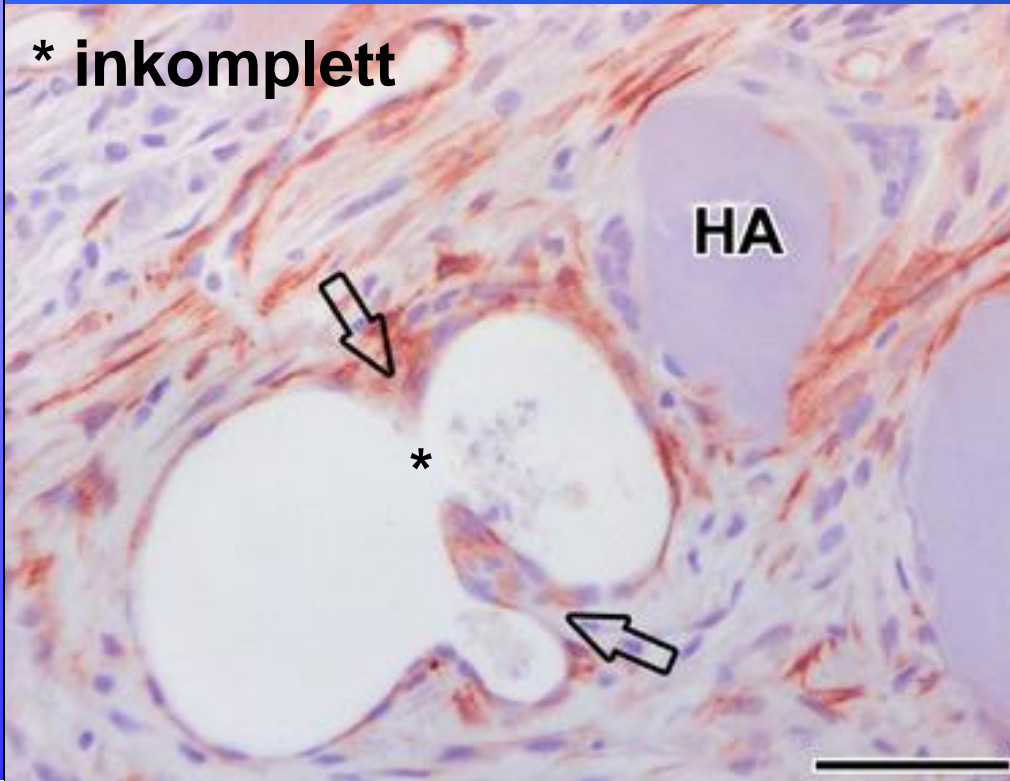


➤ Intussusception von Gefäßen

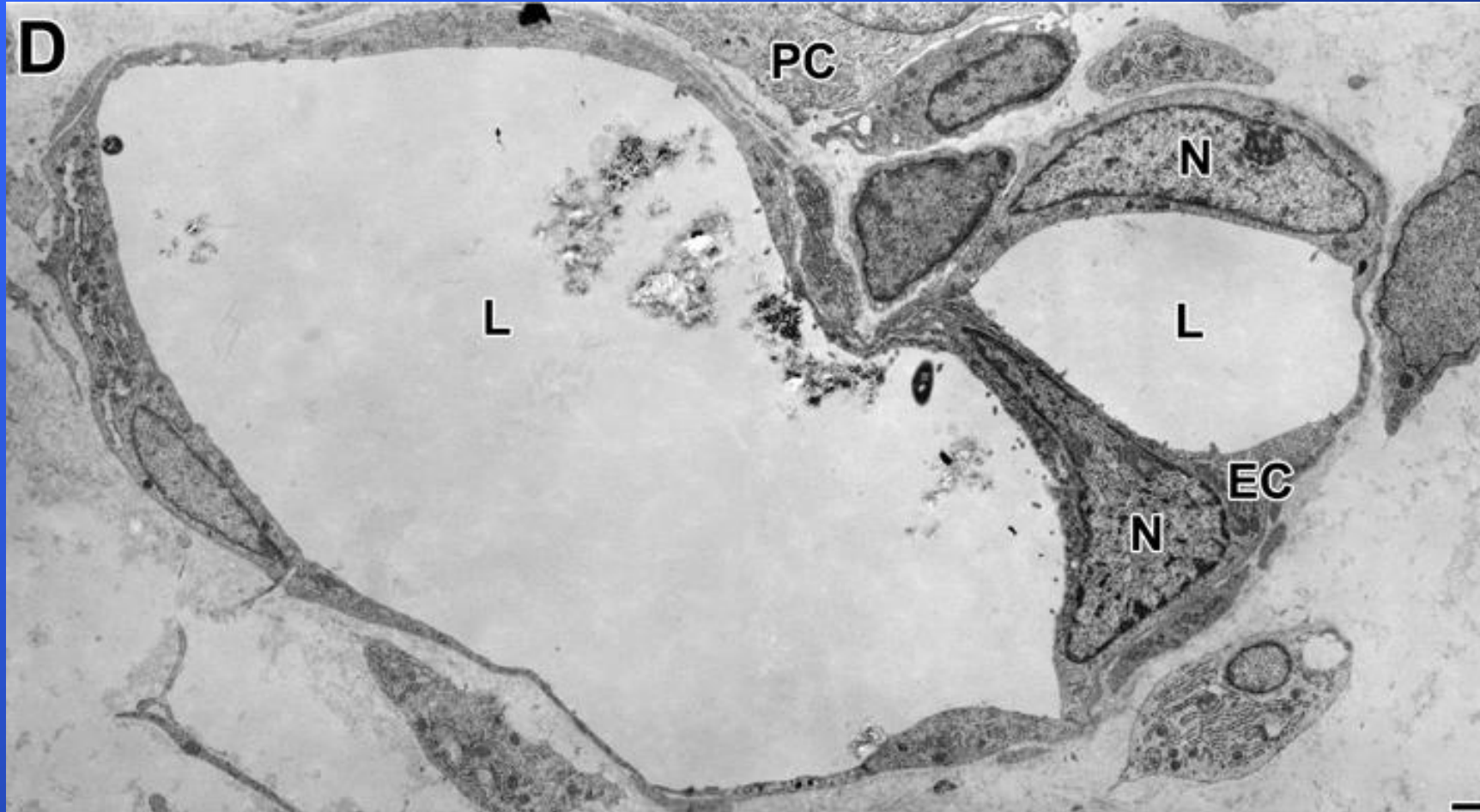


HA

➤ **Invagination einer gegenüberliegenden Kapillarwand (transparente Pfeile) in der Nähe von Hydroxylapatitpartikeln**



➤ Zwei reife Gefäße nach Intussusception mit intravasalem Debris (komplett)



Intussusception

- **Proteolyse der Intima**
- **Vasodilatation und Fenestrierung der Basallamina**
- **erhöhte Permeabilität**
- **Extra-Vaskularisation der Plasma-Proteine (Fibrinogen und Plasminogen)**
- **beide agieren als Matrix für Endothelzellenmigration**

Hanahan, D et al; Cell (1996)

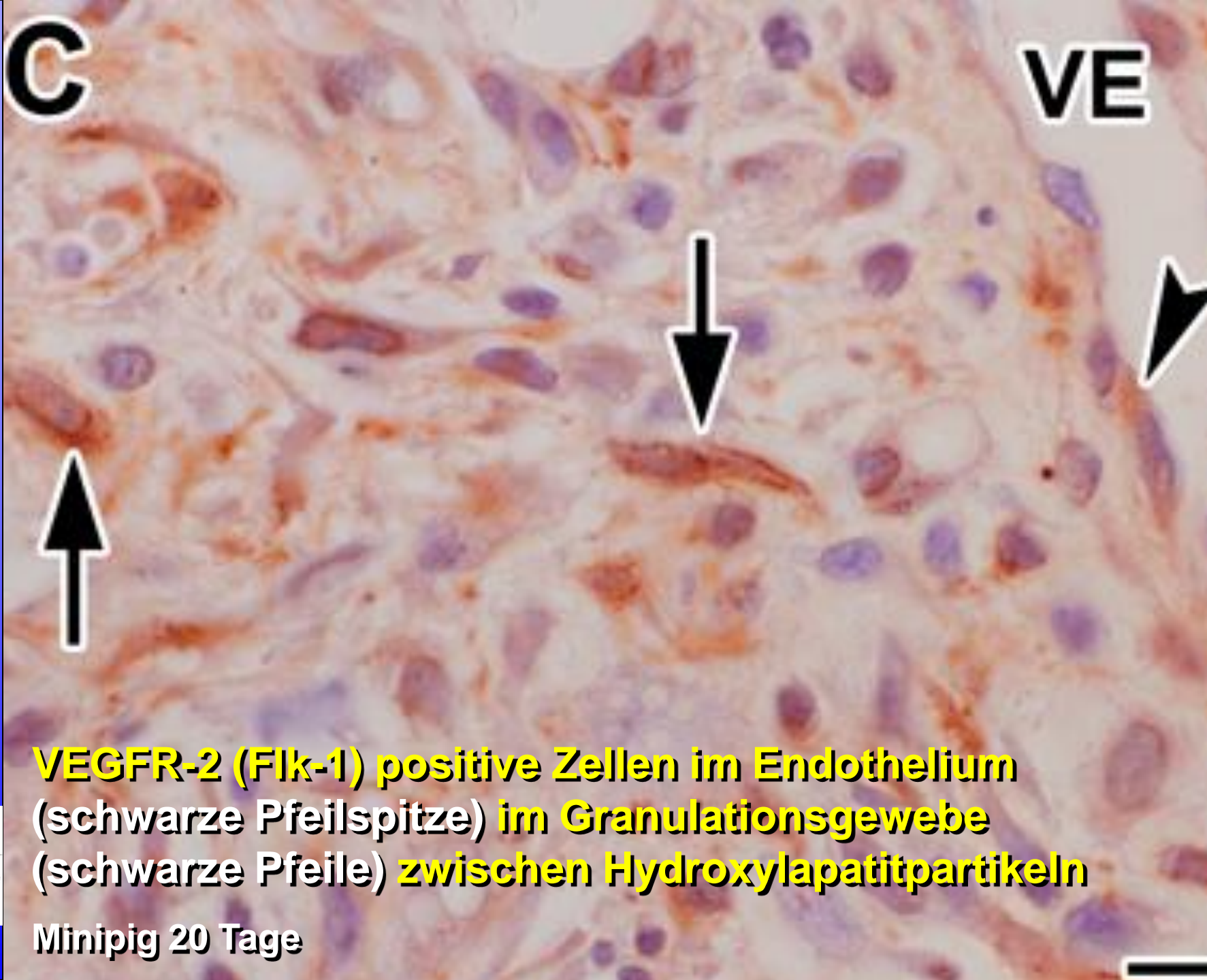


- **Fenestriertes Endothelium** (transparenter Pfeil)
- **Membrane-Vesikulation** (schwarzer dünner Pfeil)
- **Adhärente Verbindungen mit Desmoplakin** (schwarze Pfeilspitzen) **zweier Endothelzellen**, alle scale bars = 1 μm

- **die Bildung von Blutgefäßen wird durch Zell-Adhäsions-Moleküle geregelt**
(Pecam-1; Zytokine, z.B. VEGF, bFGF, PDGF)

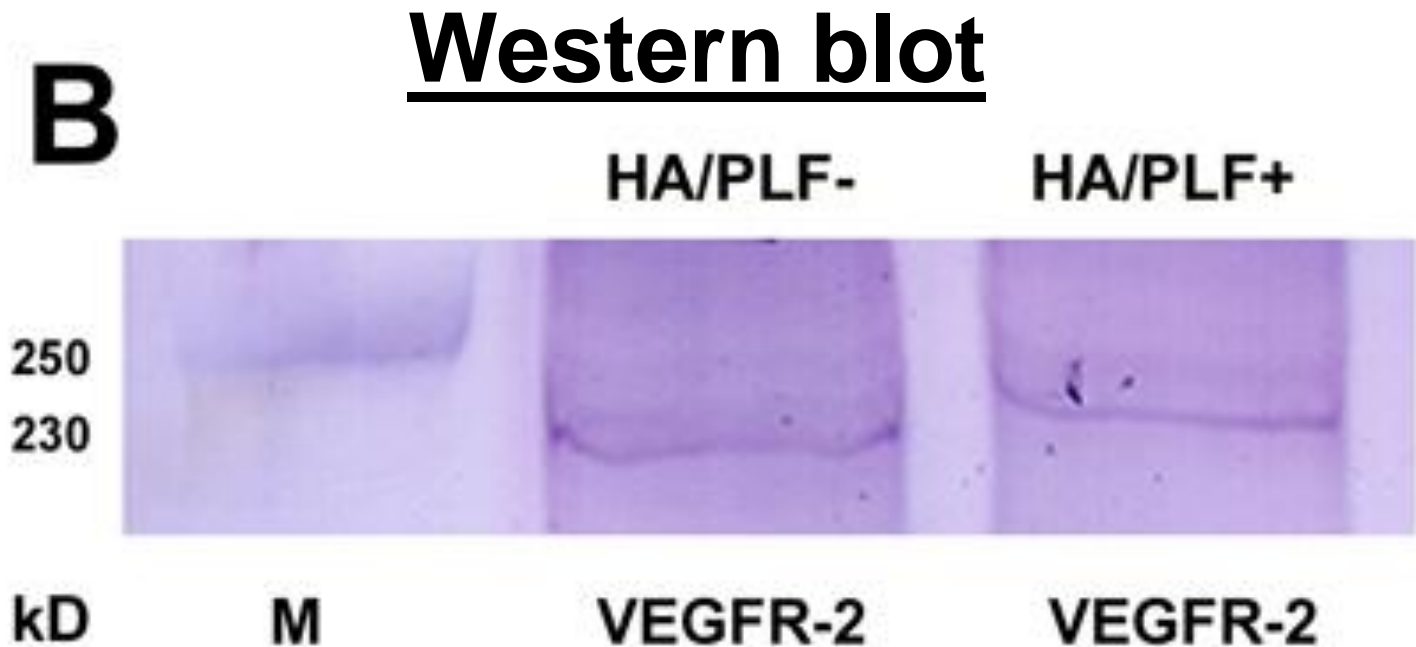
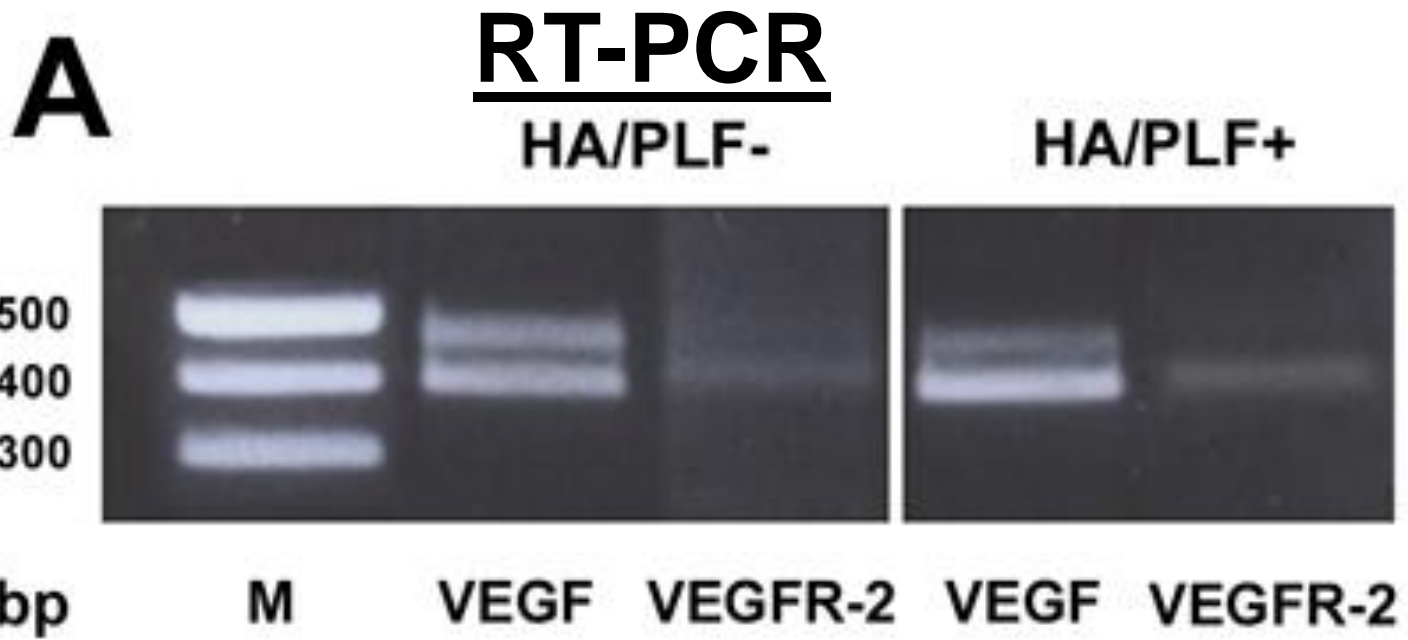
Risau, W; Nature (1997)

Auguste, P et al.; Cell Tissue Res (2003)

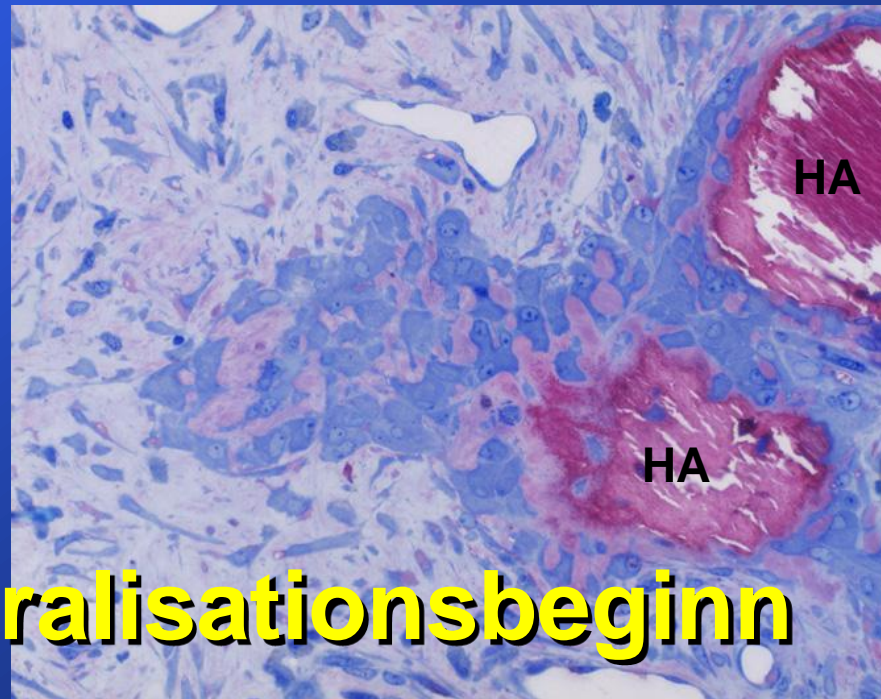
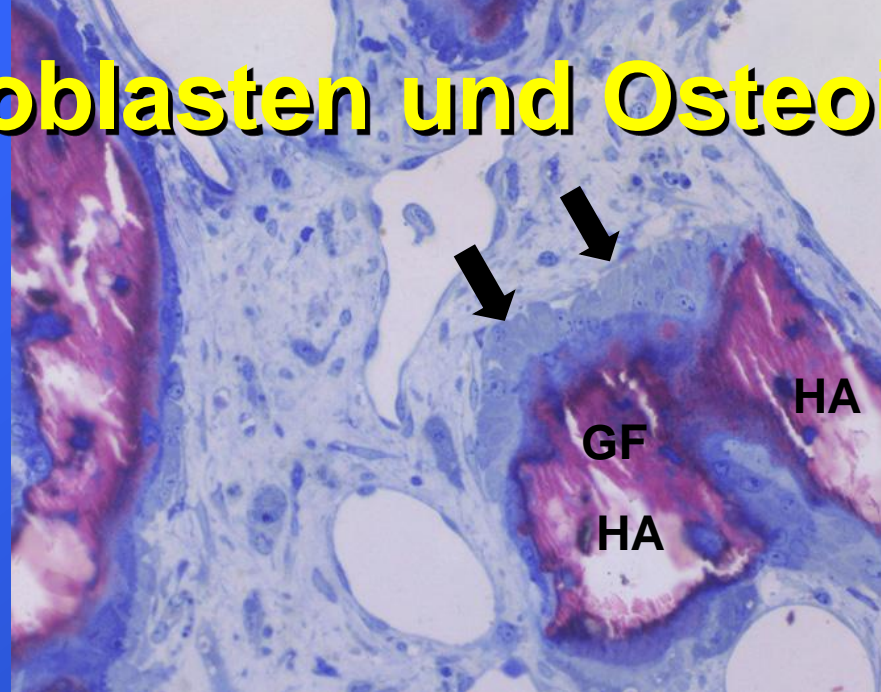


VEGFR-2 (Flk-1) positive Zellen im Endothelium
(schwarze Pfeilspitze) **im Granulationsgewebe**
(schwarze Pfeile) **zwischen Hydroxylapatitpartikeln**

Minipig 20 Tage

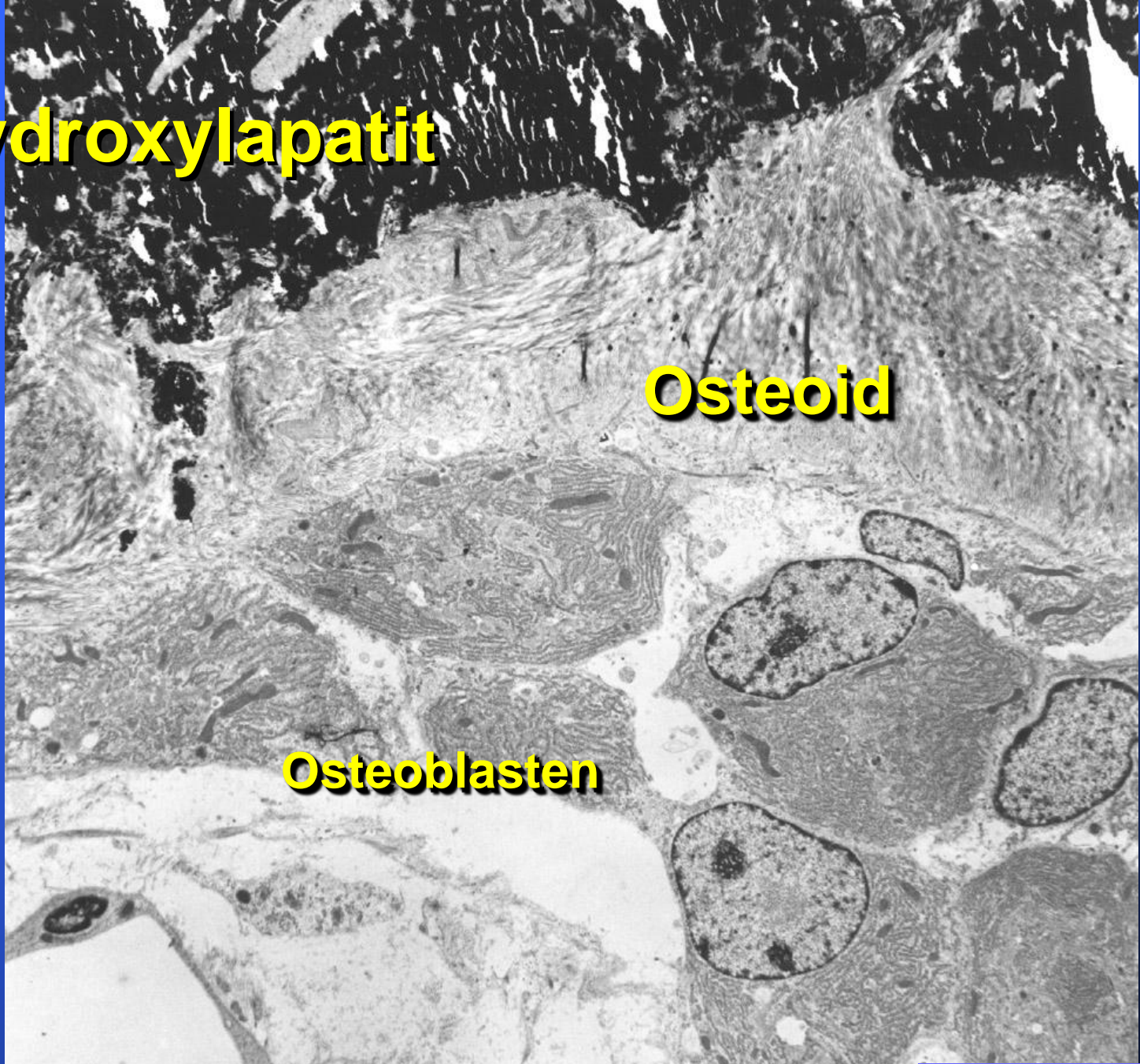


➤ Osteoblasten und Osteoid



➤ Mineralisationsbeginn

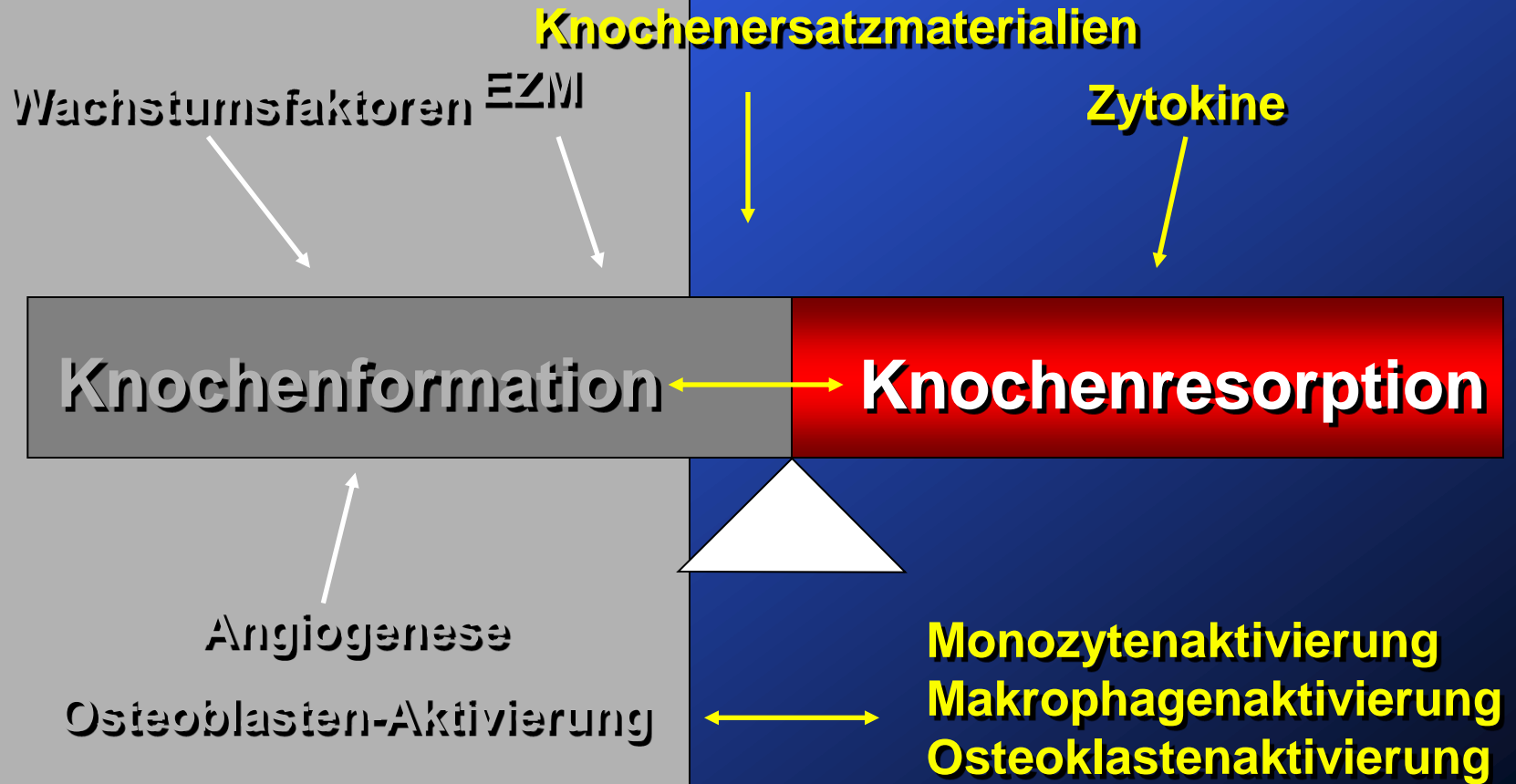
Hydroxylapatit

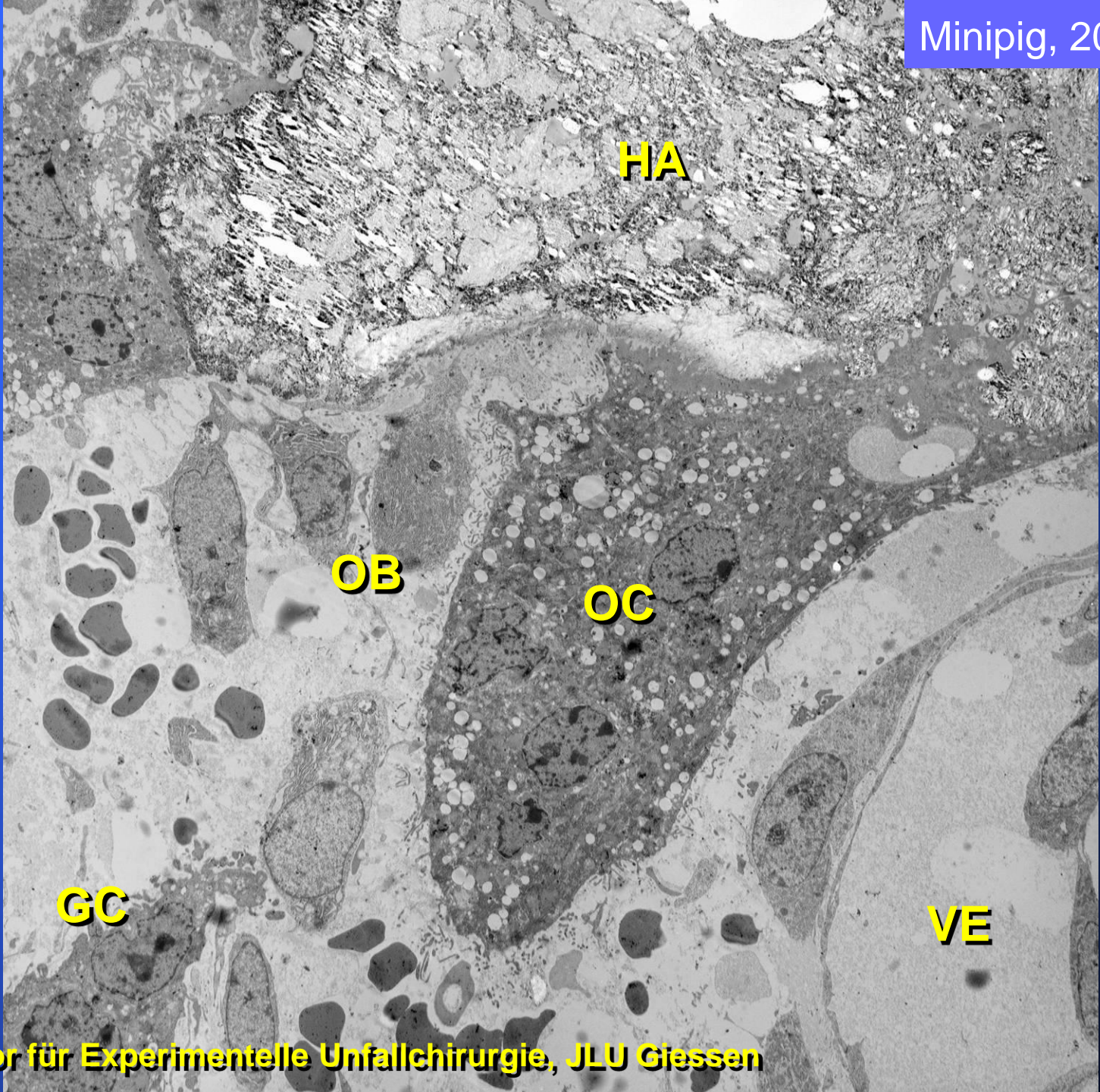


Osteoid

Osteoblasten

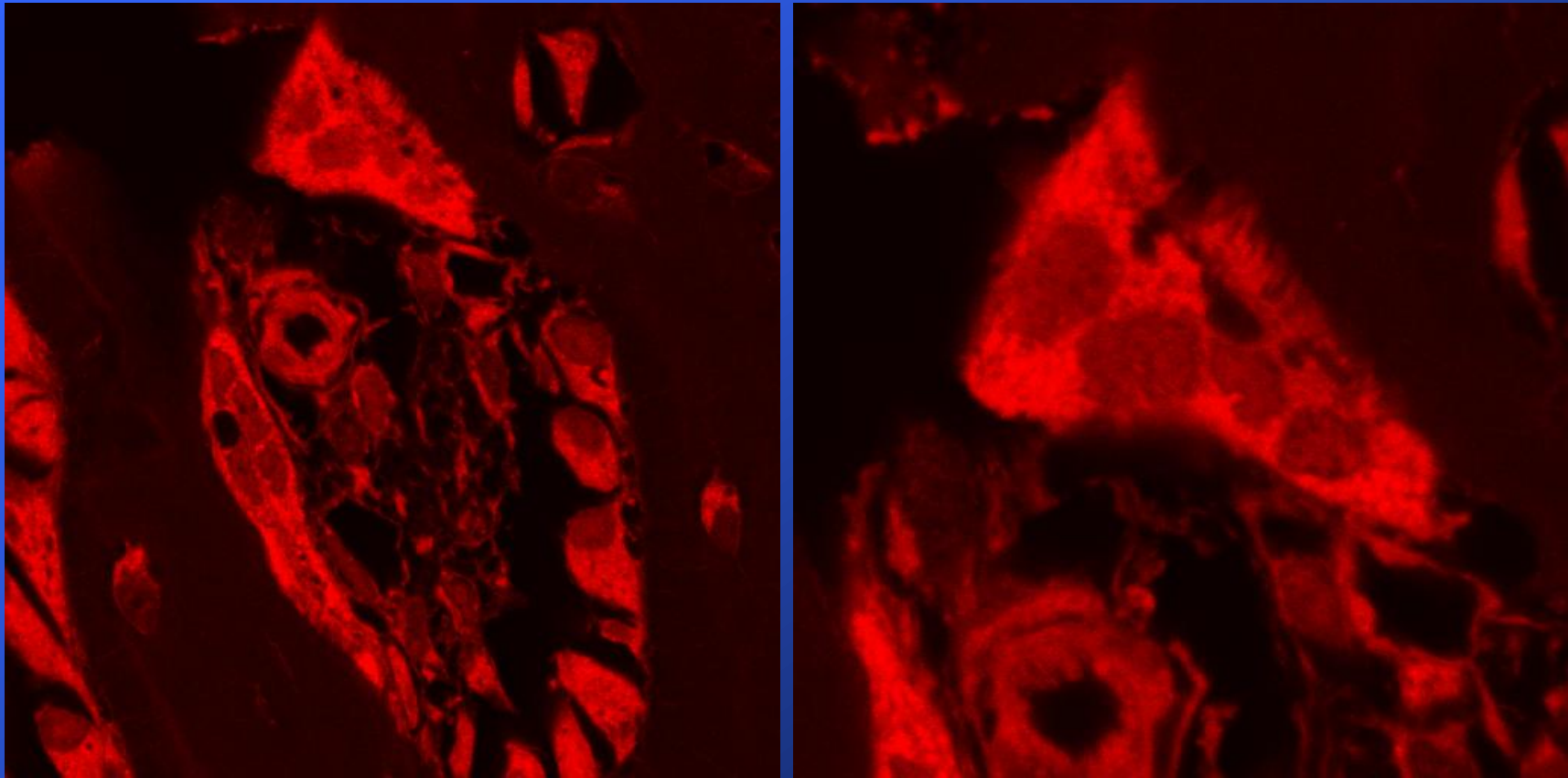
Interaktionen Biomaterialien - Knochen





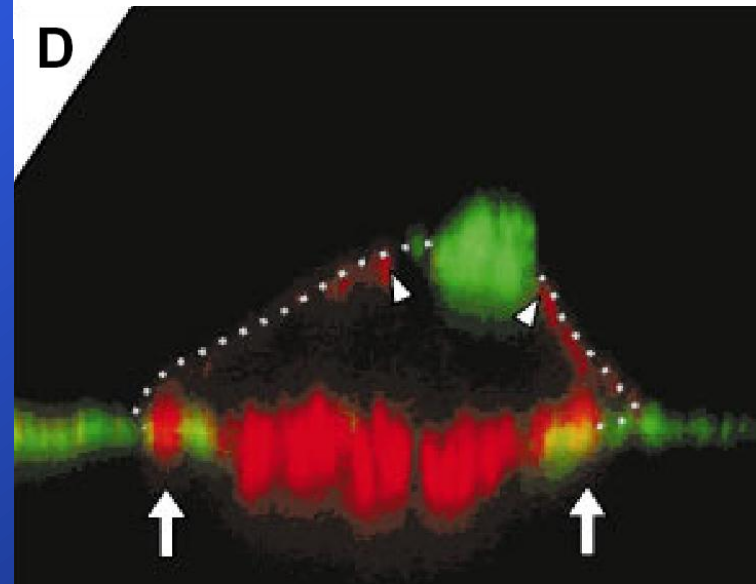
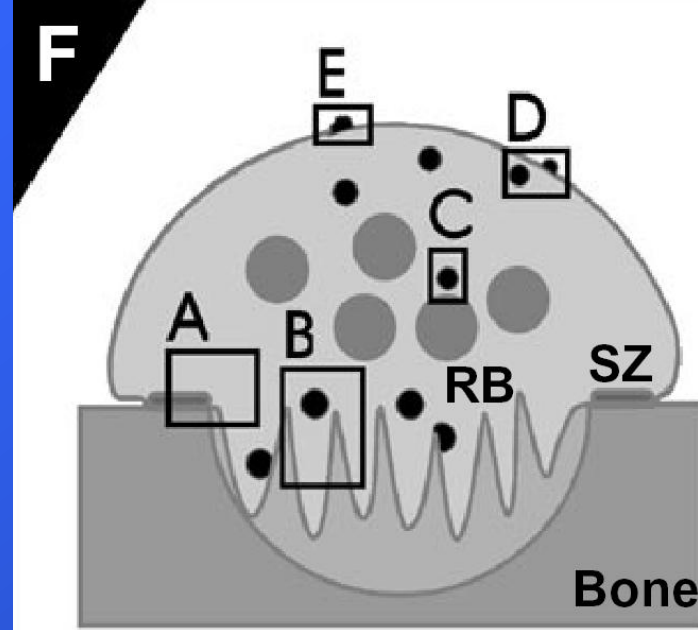
Osteoblasten und mehrkernige Riesenzellen

www.uniklinikum-giessen.de/ucg



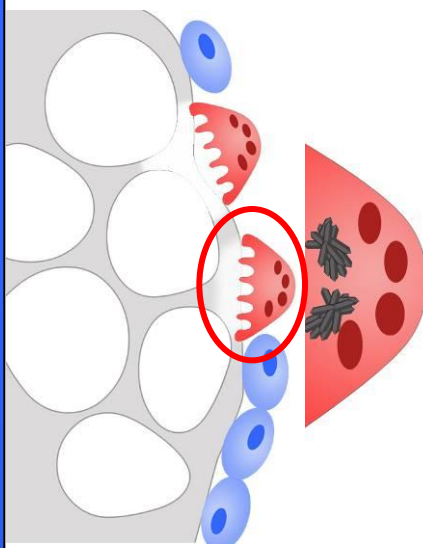
Phalloitin (AK)-TRITC-Markierung

Labor für Experimentelle Unfallchirurgie, JLU Giessen

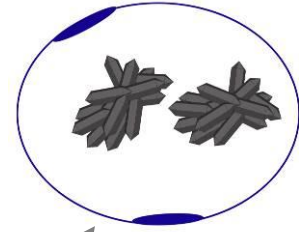


Salo J. et-al.; Science Vol. 276, 1997

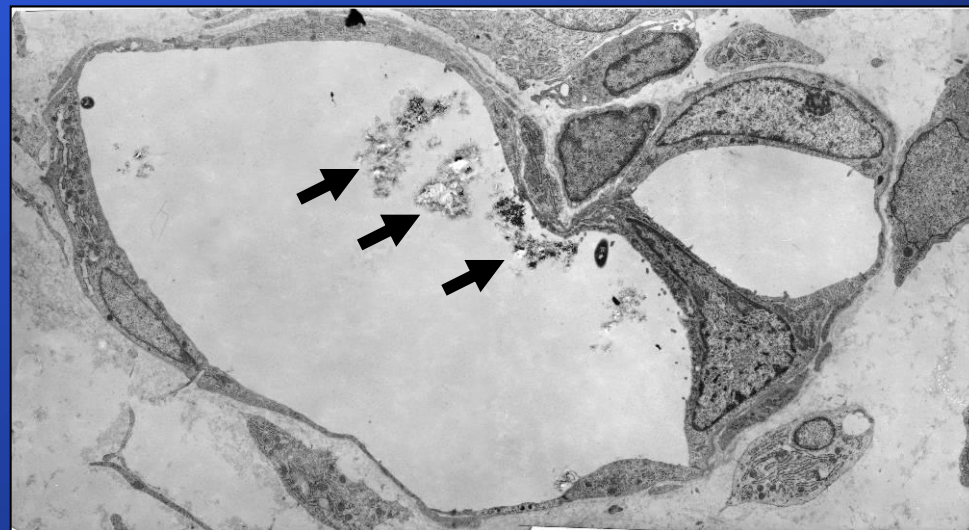
Transzytose



Vene

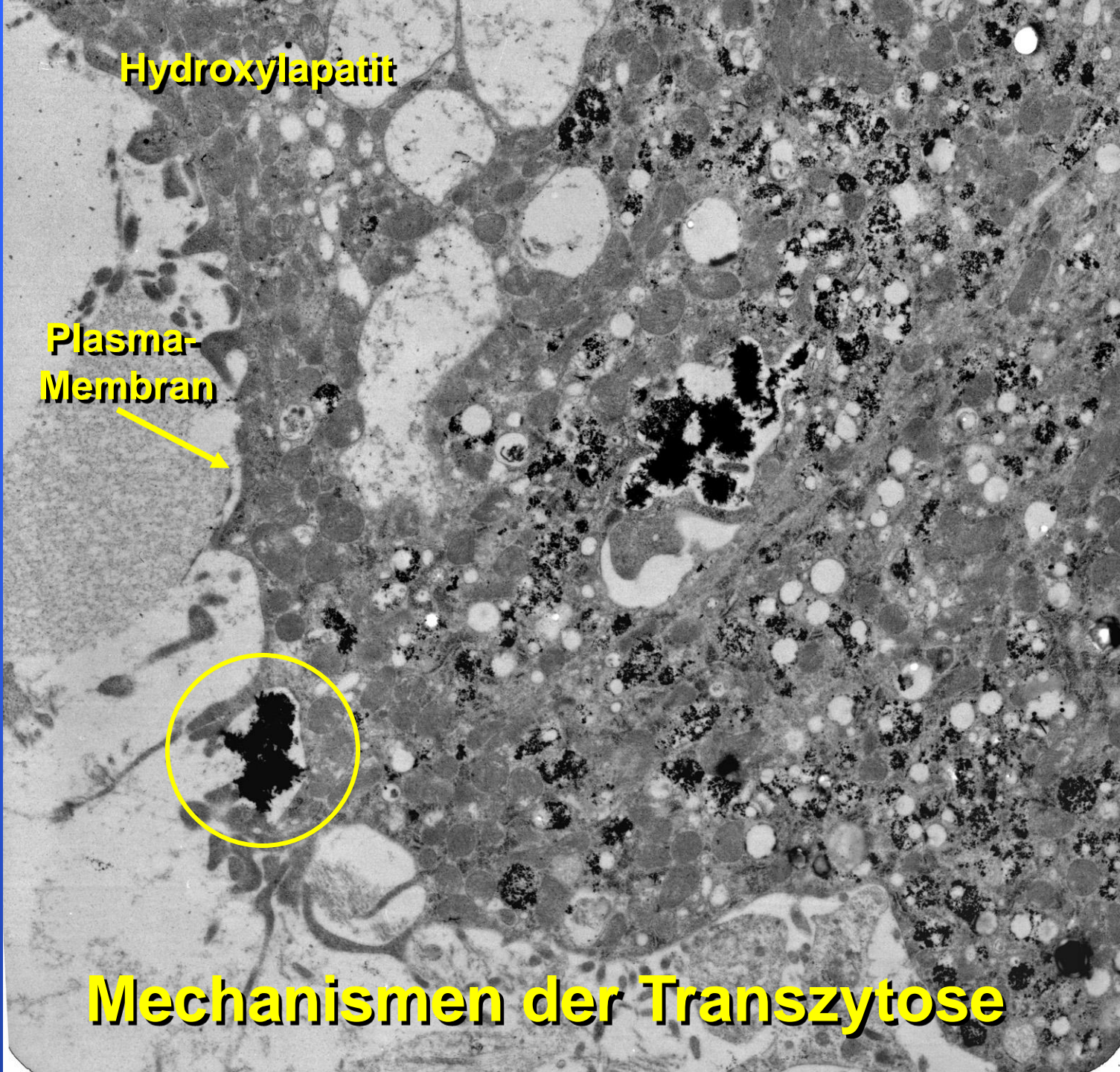


Riesenzelle

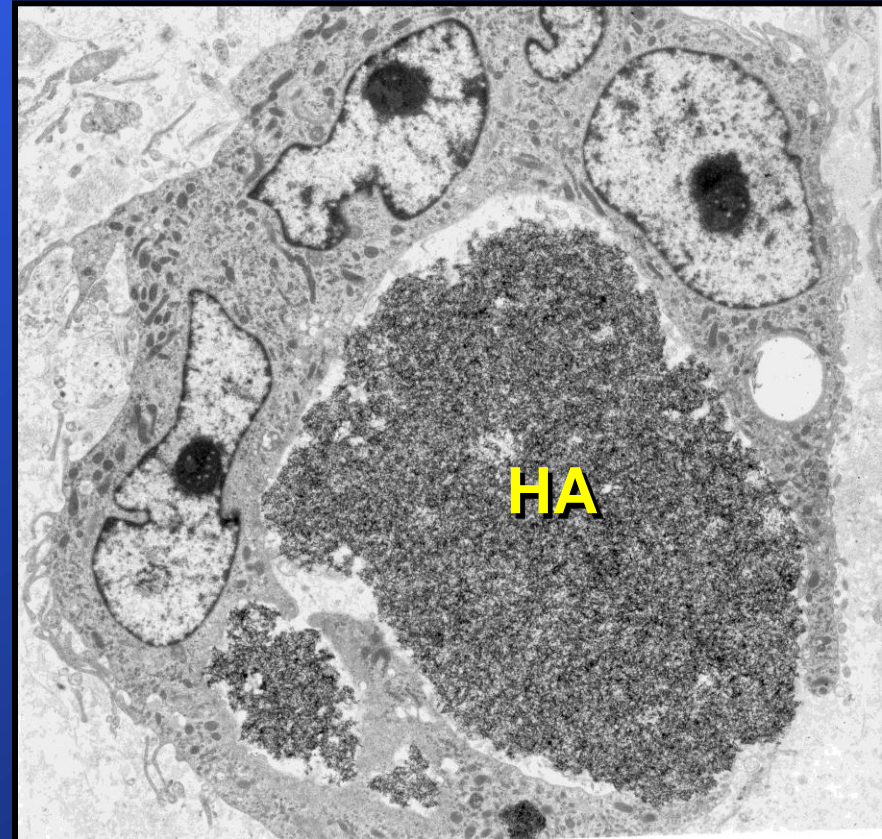
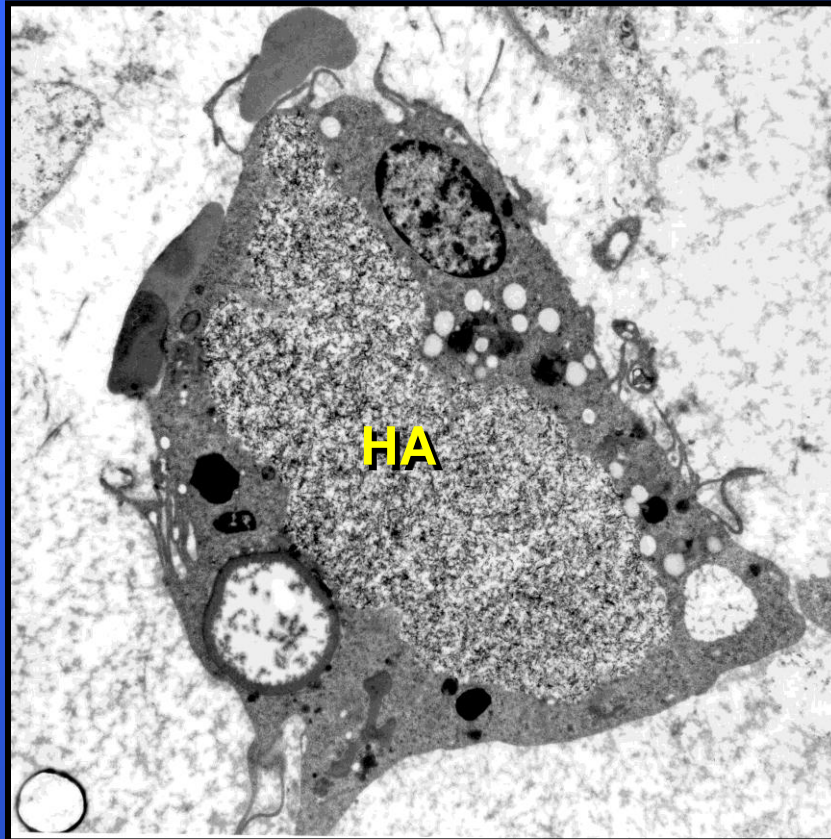


Transmissions-Elektronenmikroskop





➤ Phagozytose mit Hilfe von Riesenzellen



➤ Intrazytoplasmatische Einschlüsse von Hydroxylapatit

➤ **Makrophage –
Makrophage
Fusionsmechanismus**

HA

HA

Vignery A. Int. J. Exp. Path. 81: 291-304 (2000)

Bonnema H. et al. J. Biomed. Mater. Res. 65A: 501-508 (2003)



Ausgeprägte CD44-Antigen-Färbung vor allem bei Riesenzellen in direkter Nachbarschaft zum Implantat (weisse Pfeile),

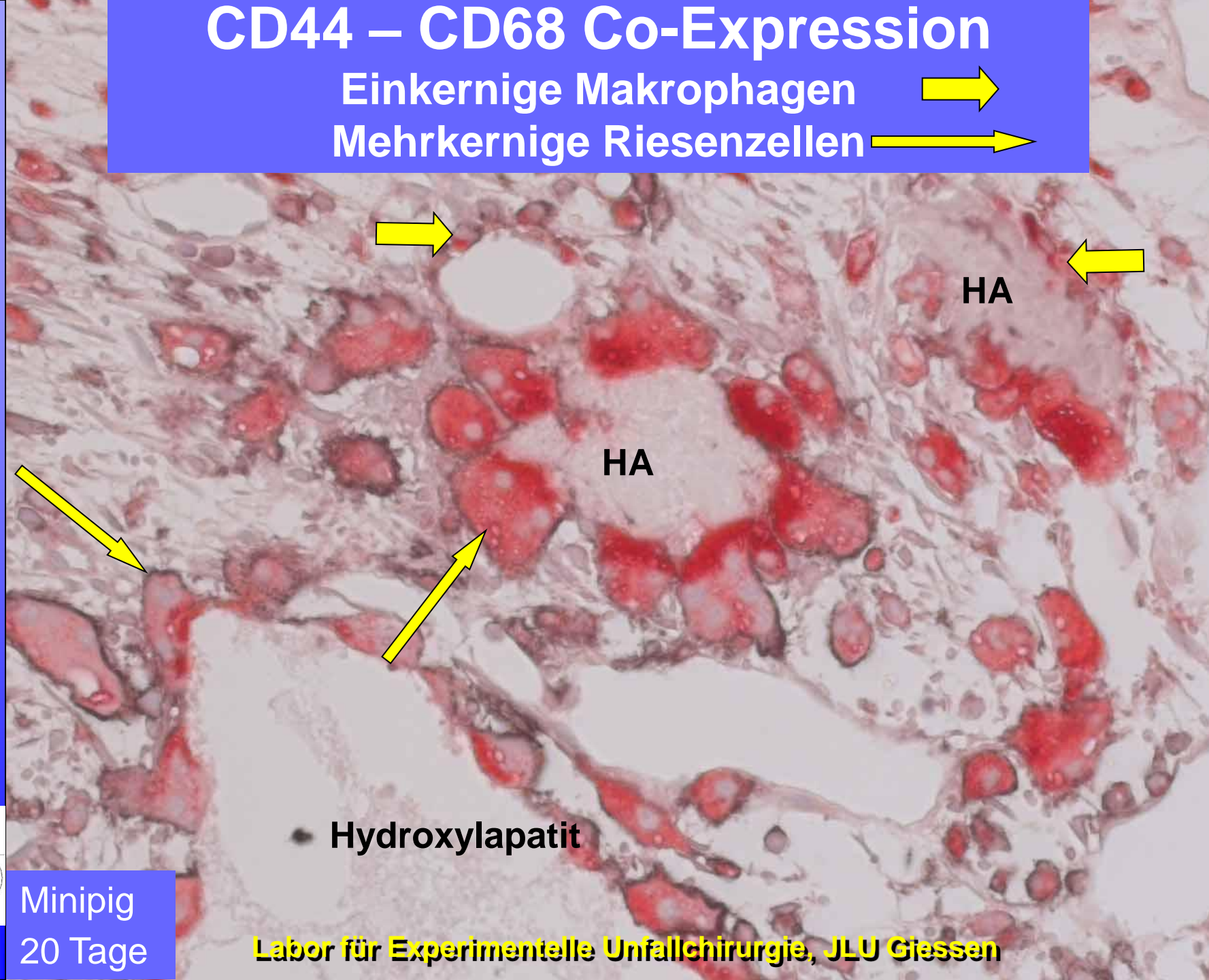
schwache Färbung (schwarze Pfeile) auf der Zellmembran, die dem Implantat abgewandt ist (scale bar=10 µm).

CD44 – CD68 Co-Expression

Einkernige Makrophagen



Mehr kernige Riesenzellen



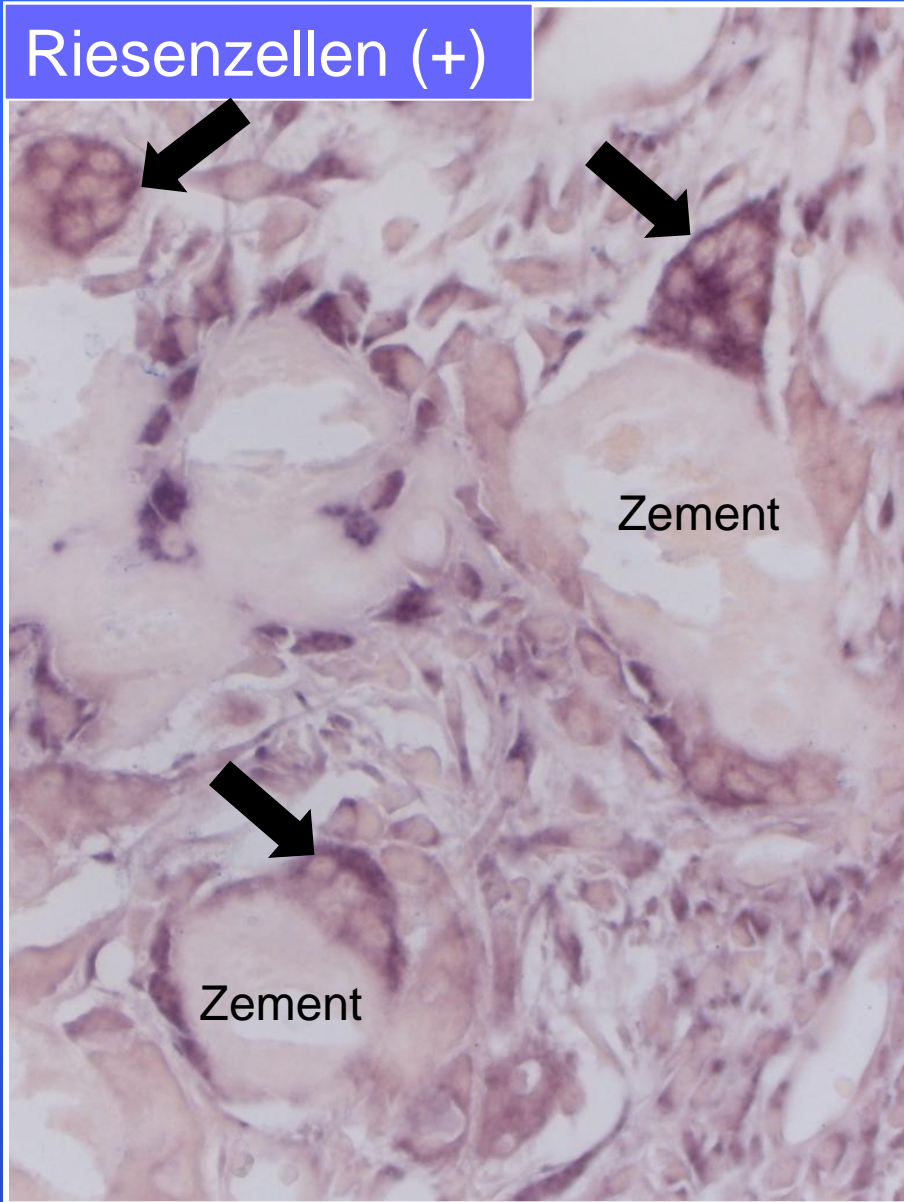
HA

HA

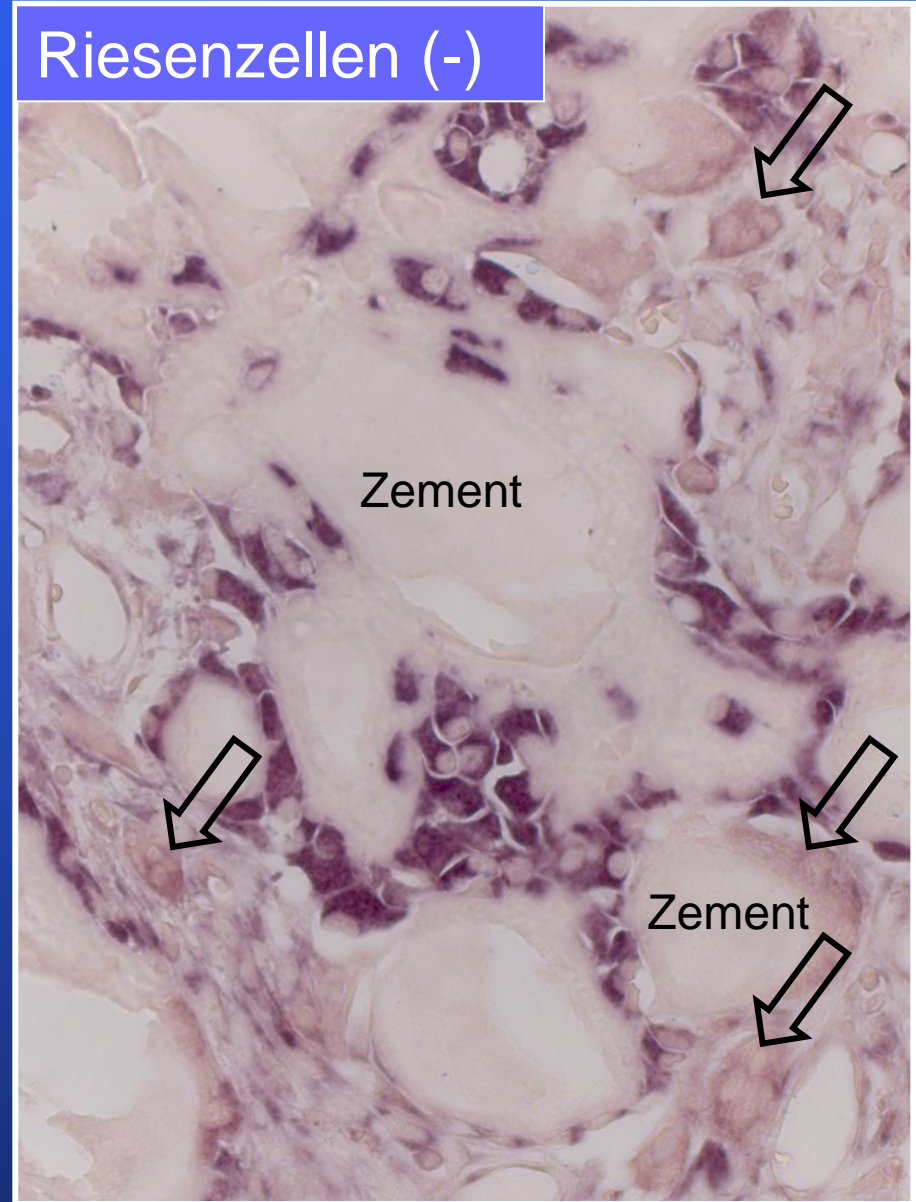
Hydroxylapatit

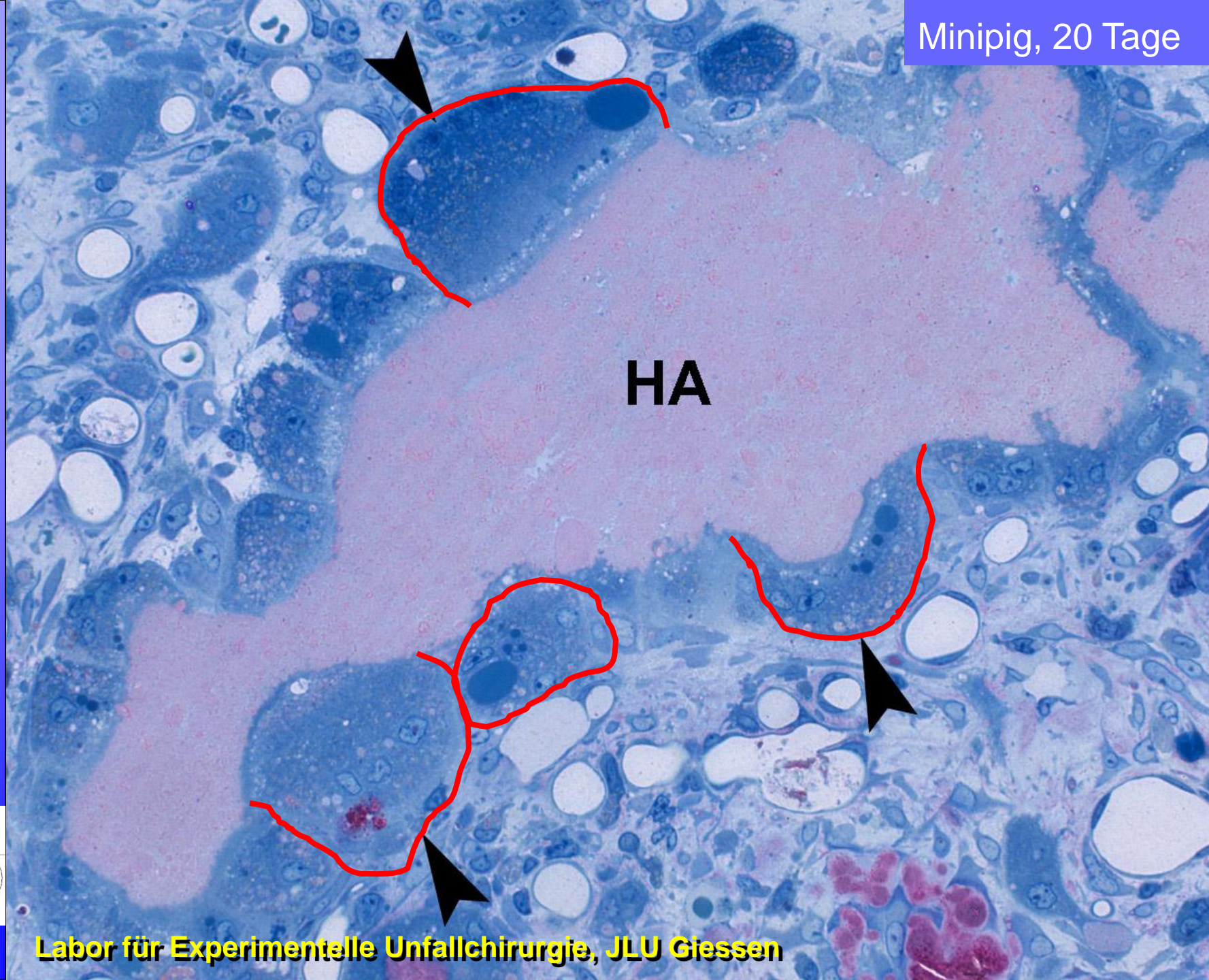
Connexin 43 mRNA

Riesenzellen (+)



Riesenzellen (-)





HA

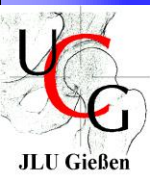
Minipig, 20 Tage

www.uniklinikum-giessen.de/ucg

Kapillare

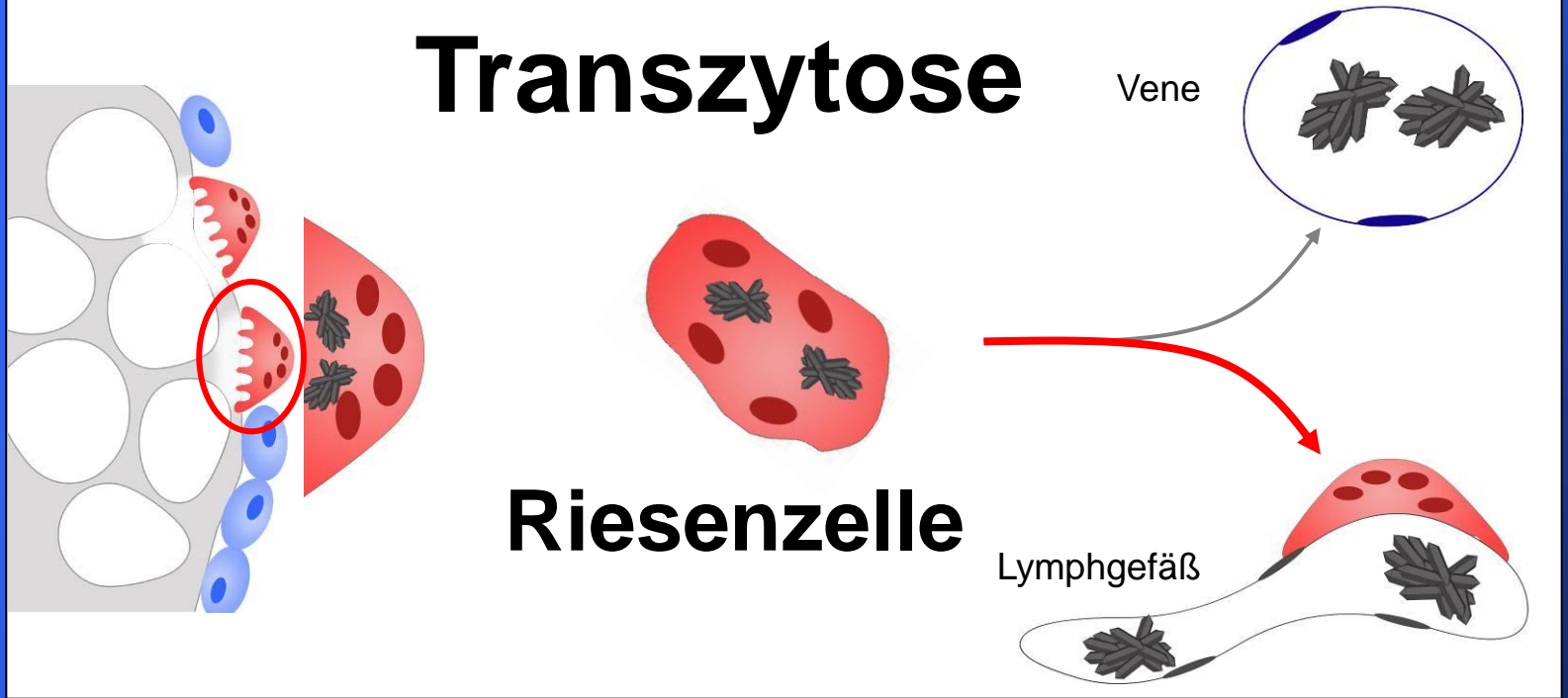
Riesenzelle

HA

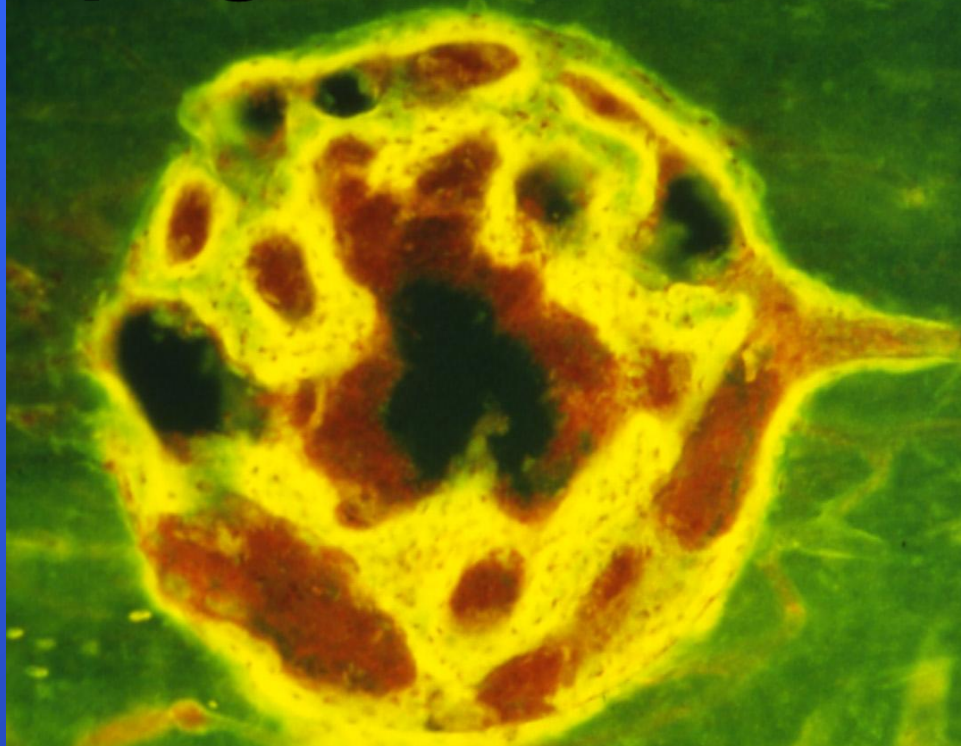


Labor für Experimentelle Unfallchirurgie, JLU Giessen

Transzytose



➤ Lymphgefäße



konnten im kortikalen und spongiösen Knochen nicht nachgewiesen werden

Edwards JR et al.; Hum Pathol 39 (2008)

➤ **Endothelzellen können
ein veno-lymphatisches
Gefäßsystem bilden**

Oliver, G; Detmar, M; Genes Dev (2002)

Jeltsch, M et al.; Cell Tissue Res (2003)

Parson-Wingerter, P et al.; Anat Rec (A) (2006)

➤ **momentan existieren
keine Daten über die
molekularen
Mechanismen der
Lymphangiogenese**

Edwards, JR et al.; Hum Pathol (2008)

- **lymphatische Marker** (prox-1; LYVE-1, podoplanin) ermöglichen seit kurzem die Untersuchung der Mechanismen bei Lymphangiogenese

Lymphangiogenese

LY

HA

HA



Lymphatische
Gefäße mit
offenem
Endothelium
(schwarzer Pfeil)
umgebender
Zellen mit
inkorporiertem
HA

Lymphangiogenese

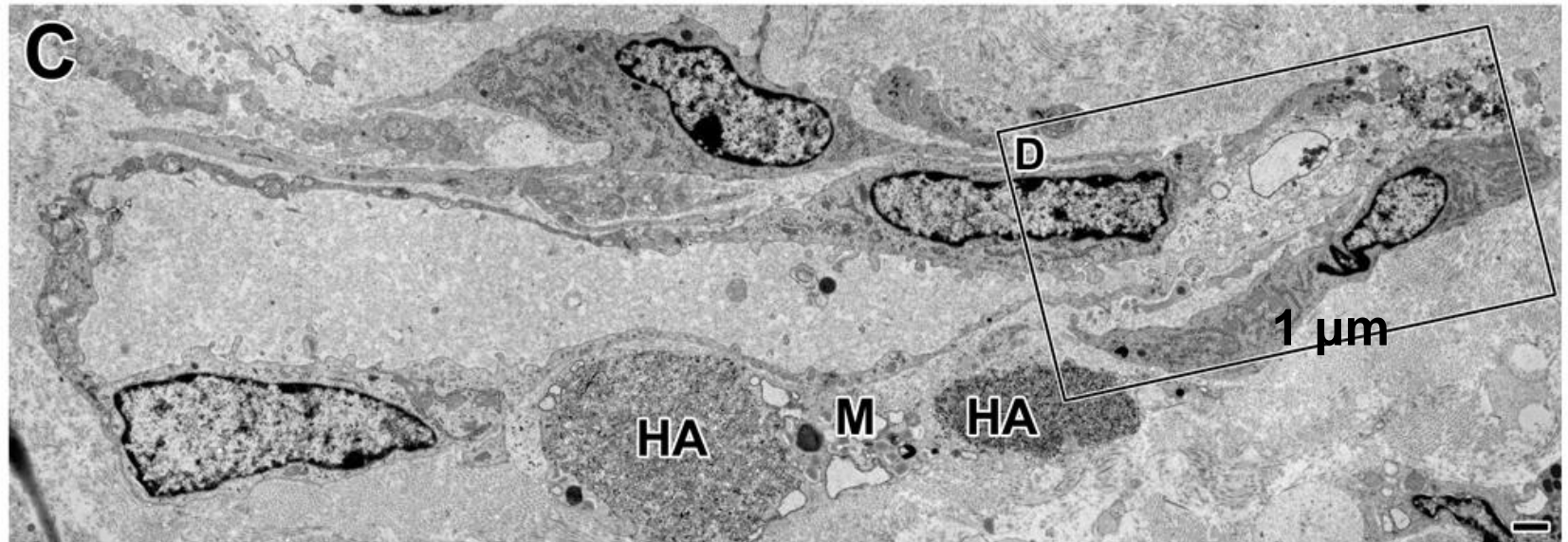
VE

blind-endendes
Sprouting-
Lymphgefäß,
Durchmesser 40
µm, intravasale
HA Partikel nach
Degradation

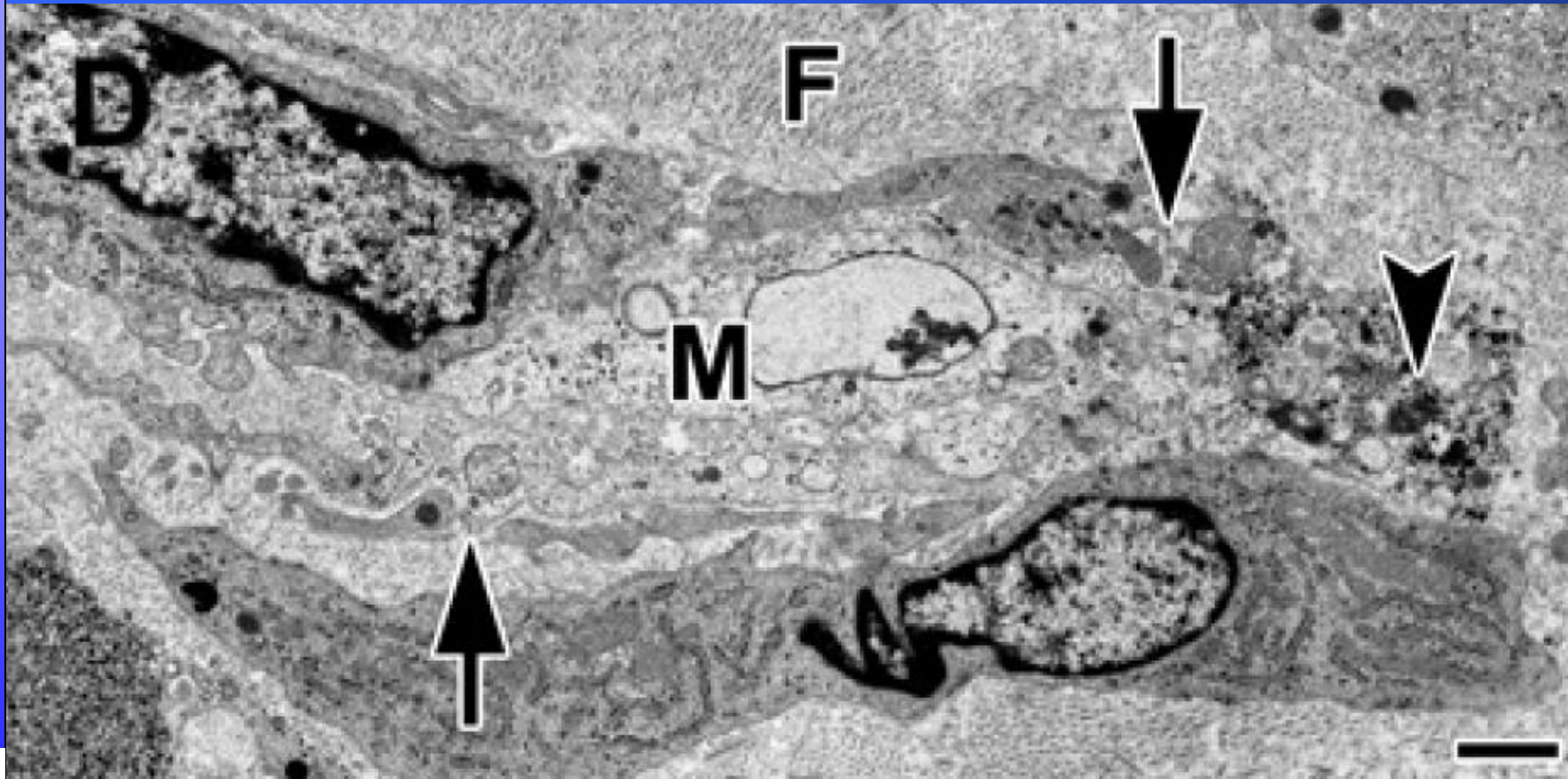
LY

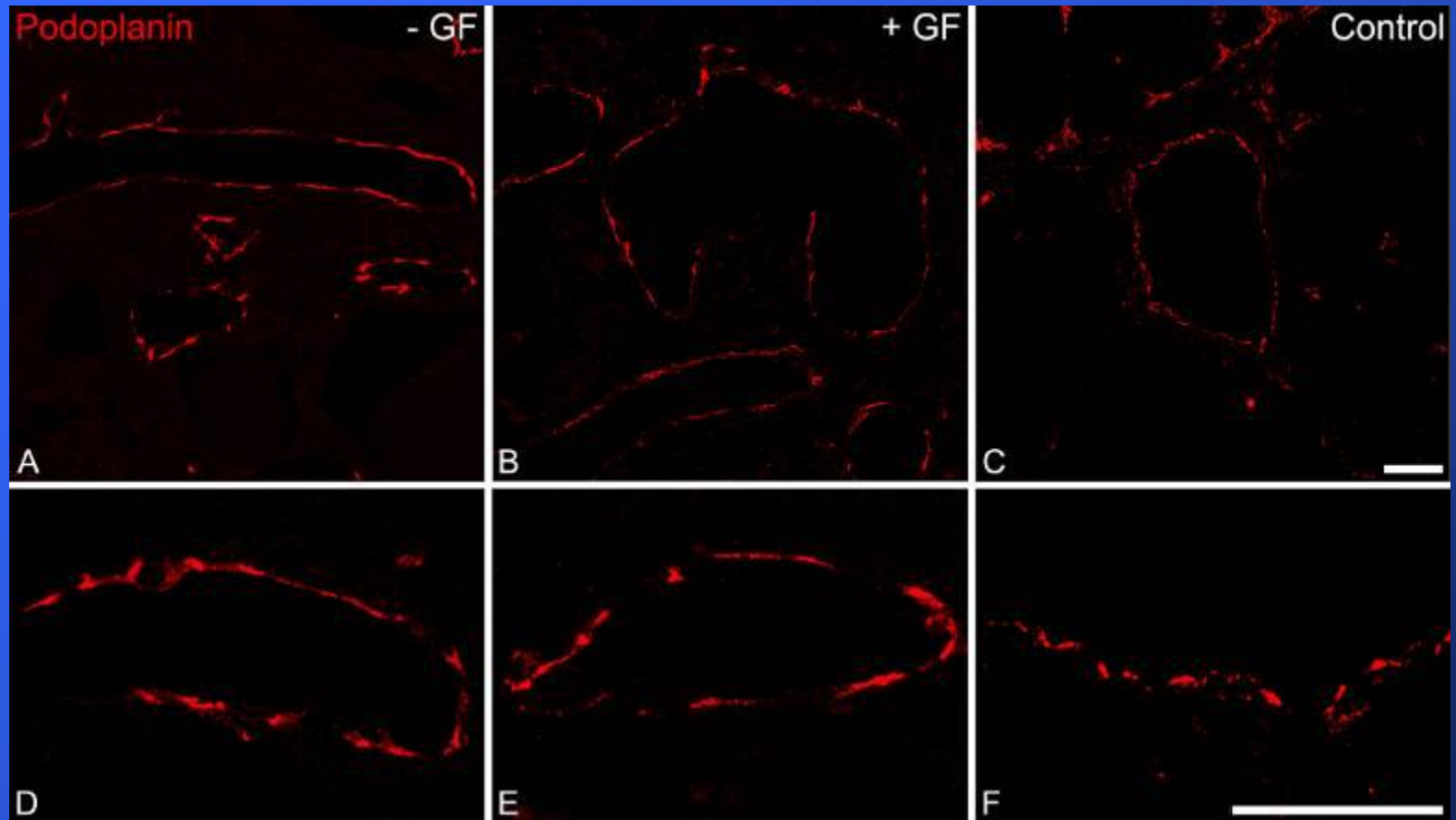


Lymphatisches Gefäß und Makrophagen



➤ Lymphatisches Gefäß und Makrophagen

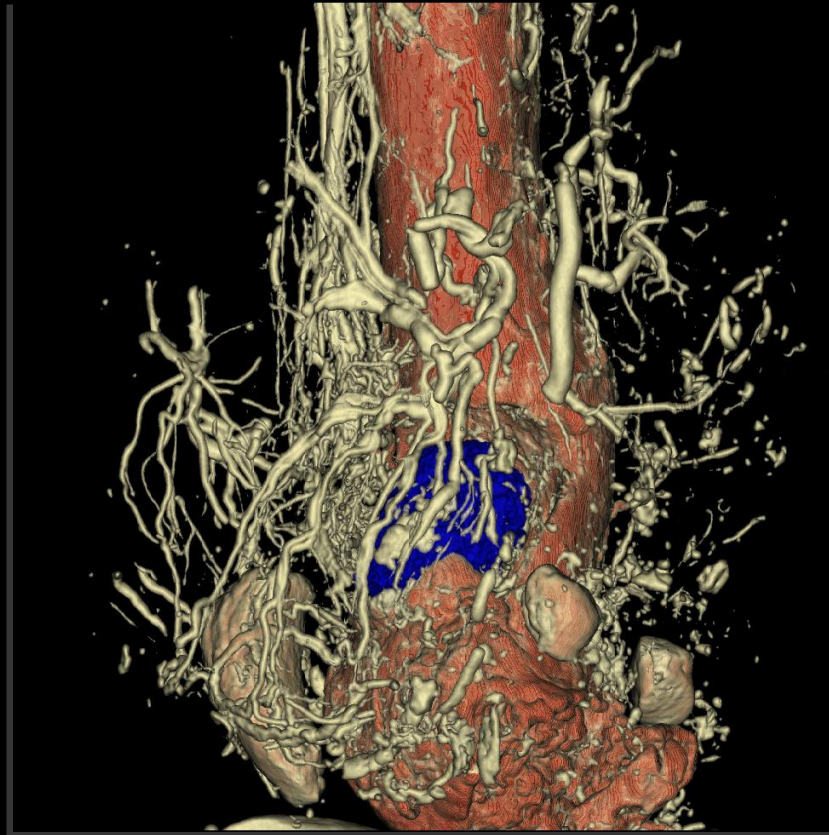




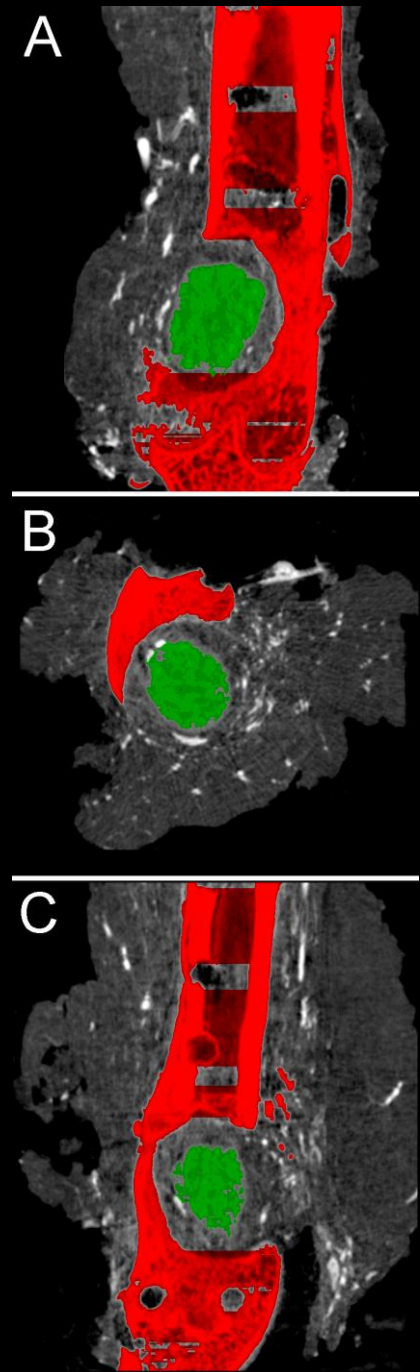
Konfokale Fluoreszenz-Mikroskopie von Podoplanin-markierten Lymphgefäßen im HA-Implantat (A,D) und HA/PLF+ Implantat (B, E), Tag 20 nach Implantation

- **Das lymphatische System spielt eine wichtige Rolle bei der Aufrechterhaltung der Gewebsflüssigkeitshomeostase**
- **Das lymphatische System spielt auch eine wichtige Rolle bei der Degradation und dem Abtransport von Knochenersatzmaterialien**

Quantitative Analytik der Vaskularisierung mittels 3D-Nano-CT Bildgebung



Nano-CT 3D-Oberflächenrekonstruktion bei 1.2 μm isotroper Voxelgröße



Danksagung

- **O. Kilian**
- **K. Lips**
- **S. Wenisch**
- **S. Hartmann**
- **A. Hild**
- **I. Schütz**
- **K. Hose**
- **A.C. Langheinrich**