

**Immunphänomene bei der Einheilung hitzesterilisierter kortikaler  
Knochentransplantate?  
Experimentelle Untersuchungen an der Ratte**

Klemens Dorr

TECHNISCHE UNIVERSITÄT MÜNCHEN  
Institut für Experimentelle Onkologie und Therapieforschung  
(Direktor: Univ.-Prof. Dr. B. Gänsbacher)

**Immunphänomene bei der Einheilung hitzesterilisierter kortikaler  
Knochentransplantate?  
Experimentelle Untersuchungen an der Ratte**

Klemens Dorr

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Medizin  
der Technischen Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines  
Doktors der Medizin  
genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. D. Neumeier

Prüfer der Dissertation:

1. apl. Prof. Dr. A. Stemberger
2. Univ.-Prof. Dr. R. Gradinger

Die Dissertation wurde am 27.10.2008 bei der Technischen Universität  
München eingereicht und durch die Fakultät für Medizin  
am 21.01.2009 angenommen.

Meiner Familie

## Inhaltsverzeichnis:

1	Einleitung.....	3
2	Fragestellung.....	6
3	Geschichtlicher Überblick.....	7
4	Grundlagen Immunologie.....	10
4.1	Antigen.....	10
4.2	Lymphknoten und Lymphsystem.....	12
4.3	Milz.....	13
4.4	Humorale Immunreaktion.....	14
4.5	Zelluläre Immunreaktionen.....	16
5	Material und Methoden.....	20
5.1	Versuchsablauf.....	20
5.2	Versuchstier Wistar-Ratte und Tierhaltung.....	21
5.3	Anästhesie und Operationsvorbereitung.....	21
5.4	Operationstechnik.....	22
5.4.1	Instrumentarium.....	22
5.4.2	Operationsverfahren.....	23
5.5	Untersuchte Parameter.....	26
5.5.1	Histologie Lymphknoten.....	26
5.5.2	Histologie Milz.....	27
5.5.3	Kapillarpräzipitationstest.....	29
5.5.4	Leukozyten-Migrations-Inhibitions-Test.....	30
5.6	Statistische Methoden.....	34
6	Ergebnisse.....	37
6.1	Postoperativer Verlauf und Komplikationen.....	37
6.2	Lymphknothenhistologie.....	38
6.2.1	Autogen frische Transplantate.....	38
6.2.2	Allogen frische Transplantate.....	39
6.2.3	Autogen hitzesterilisierte Transplantate.....	40
6.2.4	Allogen hitzesterilisierte Transplantate.....	40
6.2.5	Vergleich zum Ausgangswert und Vergleich der Gruppen untereinander.....	41
6.3	Milzplanimetrie.....	43
6.3.1	Autogen frische Transplantate.....	43
6.3.2	Allogen frische Transplantate.....	43
6.3.3	Autogen hitzesterilisierte Transplantate.....	44
6.3.4	Allogen hitzesterilisierte Transplantate.....	45
6.3.5	Vergleich zum Ausgangswert und Vergleich der Gruppen untereinander.....	46
6.4	Ringpräzipitationstests (Auswertung ohne Statistik siehe 5.6).....	48
6.4.1	Autogen frische Transplantate.....	48
6.4.2	Allogen frische Transplantate.....	48
6.4.3	Autogen hitzesterilisierte Transplantate.....	50
6.4.4	Allogen hitzesterilisierte Transplantate.....	51
6.4.5	Vergleich der Gruppen untereinander.....	53
6.5	Leukozyten-Migrations-Inhibitions-Test.....	54
6.5.1	Autogen frische Transplantate.....	54
6.5.2	Allogen frische Transplantate.....	55
6.5.3	Autogen hitzesterilisierte Transplantate.....	56
6.5.4	Allogen hitzesterilisierte Transplantate.....	57

6.5.5 Vergleich der Gruppen untereinander .....	59
7 Diskussion .....	62
7.1 Beurteilung des Transplantationsmodells.....	62
7.2 Untersuchte Parameter.....	63
7.2.1 Histologie Lymphknoten .....	64
7.2.2 Histologie Milz .....	66
7.2.3 Ringpräzipitationstest .....	67
7.2.4 Leukozyten-Migrations-Inhibitions-Test.....	70
8 Beantwortung der Fragestellung.....	74
9 Zusammenfassung .....	87
10 Appendix.....	89
11 Abkürzungen.....	92
12 Literaturverzeichnis .....	95
13 Tabellenverzeichnis: .....	109
14 Abbildungsverzeichnis .....	109
15 Gleichungsverzeichnis .....	110
16 Danksagung .....	111
17 Lebenslauf.....	113

## 1 Einleitung

Situationen mit ausgedehnten Knochendefekten entstehen durch immer häufiger werdende Trümmerfrakturen bei Verkehrsunfällen, extremitätenerhaltender Tumorchirurgie, die durch die moderne Chemotherapie sinnvoll wurde, sowie bei Wechseloperationen im Rahmen der Gelenkendoprothetik. Des Weiteren werden Knochentransplantate bei Operationen wegen Knochenzysten, Skoliose, Arthrodesen und Pseudarthrosen häufig benötigt.

Die Schlüsselrolle auf dem Weg zur Wiederherstellung der Kontinuität und Funktion der Extremität nimmt dabei die Knochentransplantation ein. Die Transplantation von Knochen ist ein häufig durchgeführter knochenchirurgischer Eingriff (FRIEDLAENDER 1987a) auf den Orthopäden und Chirurgen heute nicht mehr verzichten können (FRIEDLAENDER 1987b). Unangefochten bietet dabei der autogen frische Knochen die besten Chancen hinsichtlich eines schnellen und unkomplizierten Heilungsprozesses (SAMMARCO 2002) und gilt als „goldener Standard“ (BURCHARD 1987, ALBERT 2006) bei der vergleichenden Beurteilung von Knochentransplantaten.

Die Gefährdung und Beeinträchtigung des Patienten (KHAN 2005) durch die Verlängerung des Eingriffes, Schädigung einer intakten Struktur, Komplikationen an der Entnahmestelle sowie die Begrenzung des Transplantates in Hinsicht auf Menge, Form und Art erzwingen auf der einen Seite eine strenge Indikationsstellung zur autogenen Knochentransplantation. Auf der anderen Seite geben sie dem Einsatz von Alternativen (PARIKH 2002) ihre Berechtigung und erheben die Suche nach dem bestmöglichen Ersatz zu einem vorrangigen Problem der orthopädisch-chirurgischen Forschung.

Das Auftreten der Immunschwächekrankheit AIDS, die ab ca. 1984 bekannt wurde, bewirkte ein neues Bewußtsein für die Gefahren der Übertragung einer Infektion von Mensch zu Mensch durch Transplantationen und Transfusionen. Nach wie vor steht sicher die Posttransfusionshepatitis zahlenmäßig an erster Stelle der durch Gewebe- oder Zellübertragung stattgehabten Infektionen. Sie hat damit die größte Bedeutung für das Individuum wie auch für die Gesellschaft (Kosten im Gesundheitswesen, Ausfall der Arbeitskraft...).

Schon lange vor dem Auftreten der AIDS Krankheit wurde versucht, durch geeignete Spenderausschlußverfahren die Gefahr der Übertragung von Krankheiten auf ein Minimum zu reduzieren.

Die Autoren KUNER und HENDRICH (1984), TOMFORD et al. (1987), MANKIN et al. (1987) und MALININ et al. (1989) beschrieben die jeweils in ihrer Knochenbank verwendeten Ausschlußkriterien. In Deutschland gelten die vom Wissenschaftlichen Beirat der Bundesärztekammer veröffentlichten „Richtlinien zum Führen einer Knochenbank“ (HOPPE und SEWING 2001). Dabei müssen auch Richtlinien der Europäischen Union (PRUSS 2005) berücksichtigt werden.

Trotz intensivster Bemühungen im Transplantationswesen waren Übertragungen von Infektionen oder sogar Tumoren mit katastrophalen Auswirkungen für den Patienten nicht immer zu vermeiden. Beispiele wie die Übertragung von AIDS (MMWR 1988), Tuberkulose (JAMES 1953) und Hepatitis (SHUTKIN 1954) anlässlich einer Knochentransplantation, Creutzfeldt-Jacob-Krankheit (DUFFY et al.1974) und Tollwut (HOUFF et al.1979) anlässlich einer Cornealtransplantation oder AIDS (L`AGE-STEHR et al. 1985), Hypernephrom (WILSON und PENN 1975) und Tollwut (ZYLKA-MENHORN 2005) anlässlich einer Nierentransplantation mögen dies verdeutlichen. Das Risiko für eine Übertragung von HIV, HBV, HCV und HTLV unter Spendern muskuloskeletalen Gewebes in Australien wurde in einer aktuellen Arbeit von YAO et al. (2007) beschrieben.

Wegen der hohen Personal-, Material-, und Verwaltungskosten sowie dem hohen Aufwand zur sterilen Entnahme in Operationsräumen, sind frische allogene Transplantate sehr teuer. Die Kosten für ein solches Transplantat beliefen sich 1979 auf 2000 US \$ (DOPPELT et al. 1981), 1982 auf 2500 US \$ (TOMFORD et al. 1983). GARREL et al. (2004) bezifferten die Kosten für ein freigegebenes Transplantat aus einer allogenen Femurkopf-Knochenbank auf 208,43 €.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es nun, im Rahmen eines durch die Deutsche Forschungsgesellschaft geförderten Projektes zur Erforschung verschiedener Sterilisierungsverfahren für Knochen, das immunologische Verhalten von hitzesterilisierten kortikalen Knochentransplantaten am Tiermodell Ratte zu untersuchen.

Beim Autoklavieren handelt es sich um die Standardmethode zur Hitzesterilisation von Operationsmaterialien wie Instrumentarium und Wäsche, die in jedem Krankenhaus, oft sogar für jeden Operationssaal, zur Verfügung steht.

Durch Energieübertragung auf das Sterilisationsgut durch gespannten Wasserdampf kommt es zur Aufhebung der inter- und intramolekularen Wasserstoffbrückenbindungen und somit zur irreversiblen Denaturierung der Proteinstruktur (LIST 1985). Dieser Prozeß führt auf der einen Seite zur Abtötung von Keimen und Sporen. Auf der anderen Seite werden Makroproteine, die mit zunehmender Größe und Komplexität stärker immunogen sind (GOODMANN 1987), denaturiert. Somit läßt sich vermuten, dass der hitzesterilisierte Knochen eine schwächere Immunogenität besitzt. Für die eigentliche Immunreaktion sind jedoch oft nur kleinste Molekülfragmente (Haptene, Epitope) entscheidend. Diese könnten den Vorgang des Hitzesterilisierens überdauern. An denaturierte Proteinklumpen (Carrier) aufgelagert oder gebunden, könnten diese als Auslöser einer Immunreaktion wirken. Daneben wäre es denkbar, dass die denaturierten Proteine selbst, alleine wegen der stark veränderten Struktur, immunogen wirken.

Von mehreren Autoren werden über klinische Erfolge bei der Verwendung von hitzesterilisierten kortikalen Knochentransplantaten berichtet. Meist handelt es sich um Publikationen von Einzelfällen in der Traumatologie (ABELL 1966, HARPER 1982, OSAWA et al. 1990, ROUVILLAIN et al. 2006, KUMAR et al. 2006) wo die Wiedereinpflanzung des hitzesterilisierten Knochens als letzte Möglichkeit vor der Amputation angesehen wurde. Klinische Ergebnisse werden aber auch aus kleineren Serien in der Tumorchirurgie (JOHNSTON et al. 1983, EWERS und WAGERIG 1986, HARDING 1957, SIJE BRAND 1978, EVANS et al. 1969, SANJAY 1999, MANABE et al. 2004) berichtet. In experimentellen Arbeiten wurde mit verschiedenen Methoden der Einheilungsprozeß hitzesterilisierter Kortikalistransplantate untersucht.

**Tab. 1: Literatur Einheilungsverhalten von hitzesterilisiertem Knochen**

Autor	Jahr	Spezies	Parameter
KÖHLER et al.	1986	Kaninchen	Torsionstest
KÖHLER et al.	1987	Kaninchen	Röntgen, Szintigraphie, Autoradiographie, Histologie
KREICBERGS et al.	1987	Kaninchen	Röntgen, Histologie, Szintigraphie, Autoradiographie, Torsionstest
KU et al.	1985	Schaf	Fluorochrom, Disulphan, Röntgen, Torsionstest, Histologie
LENZ et al.	1989	Ratte	Histologie, Fluorochrom, Röntgen
SMITH et al.	1984	Schaf	Fluorochrom, Disulphan, Torsionstest, Röntgen
WAGERIN et al.	1985	Hund	Fluorochrom, Histologie, Szintigraphie



Trotz der großen Bedeutung (EWERS und WANGERIN 1986) finden sich in der internationalen Literatur nur einzelne Arbeiten (z.B. WANGERIN et al. 1983) zum immunologischen Verhalten von hitzesterilisierter Kortikalis, so dass auch heute noch die Aussage von LENTZ und WANKE (1955) gilt: „Wie so häufig in der Medizin, ist auch hier die Praxis der Theorie vorangeilt. Es ist nötig, das bisher Versäumte nachzuholen, um eine in jeder Weise klare Indikation zur Verwendung von fremden Knochen zu haben.“

## **2 Fragestellung**

Zur Klärung der zum Teil diametral entgegengesetzten Überlegungen hinsichtlich der Antigenität des hitzesterilisierten Knochens sollten durch diese Untersuchungen folgende Fragen beantwortet werden.

- a) Finden sich Hinweise für Immunreaktionen im Bereich der Sammellymphknoten als Ausdruck einer lokalen Reaktion nach Transplantation von hitzesterilisiertem kortikalem Knochen?
- b) Finden sich histologische Veränderungen in der Milz als Hinweis für eine generelle Aktivierung des Immunsystems?
- c) Lassen sich humorale Immunreaktionen nachweisen?
- d) Lassen sich zelluläre Immunreaktionen nachweisen?
- e) Welche Schlüsse lassen sich daraus für den klinischen Einsatz von hitzesterilisierten kortikalen Knochentransplantaten ziehen?

### 3 Geschichtlicher Überblick<sup>1</sup>

Schon sehr früh beschäftigten sich Ärzte mit dem Problem der Rekonstruktion knöcherner Defekte. Über die wohl erste gelungene Knochenübertragung berichtete der holländische Chirurg Job VAN MEEKREN 1668. Einem Soldaten wurde, nachdem er eine traumatische Schädelverletzung erlitten hatte, zur Deckung des Defektes ein Stück Knochen aus einem Hundeschädel eingesetzt. Wegen der anscheinend barbarischen Methode wurde der Soldat exkommuniziert. Als er daraufhin den Chirurgen bat, das Stück Knochen wieder zu entfernen, war das nicht mehr möglich, weil das Transplantat fest eingewachsen war. Erste Erkenntnisse über die Struktur des Knochens verdanken wir Anton VAN LEEUWENHOEK 1674, der kleine Löcher und Röhren im Knochen beschrieb, die wir heute als Havers-Kanäle bezeichnen. DE HEYDE 1682 schloß aus Beobachtungen am Frosch, dass sich der Frakturkallus durch Verkalkung des Frakturhämatoms bildet. DUHAMEL beschäftigte sich als erster mit dem Problem der Osteogenese. 1739 implantierte er Silberdrähte unter dem Periost und beobachtete Wochen später eine Bedeckung der Drähte mit neuem Knochen.

Als eine herausragende Figur in der Geschichte der Knochen transplantation muß wohl OLLIER bezeichnet werden, der sich ab 1858 mit der Knochen transplantation beschäftigte. Er faßte die bestehende Literatur zusammen und betonte in seinen Arbeiten, dass das Überleben von Periost und Knochen unter günstigen Umständen möglich sei. Dem widersprach BARTH 1893. Er behauptete, dass transplantierte Knochen, Mark und Periost absterben und durch das umgebende Lager ersetzt werden. Diesen Vorgang belegte er mit dem Begriff „schleichender Ersatz“, der durch PHEMISTER 1914 als „creeping substitution“ in die englische Fachsprache übernommen wurde. Weitere hervorragende Forscher auf dem Gebiet der Knochen transplantation waren AXHAUSEN 1907, der die Bedeutung des Periostes zur Knochenregeneration durch Tierexperimente und Untersuchungen an Präparaten von Menschen erneut hervorhob und LEXER 1908, der sich mit der freien Gelenktransplantation beschäftigte.

---

<sup>1</sup> Zusammenfassung nach den Literaturstellen: LENTZ UND WANKE (1955), DEBOER (1989), CHASE und HERNDORN (1955), PURANEN (1966)

Durch die beiden Weltkriege mit ungezählten knöchernen Verletzungen und daraus folgenden Amputationen, wurde die Forschung stark vorangetrieben. Ab 1934 beschäftigten sich die ersten Arbeitsgruppen z.B. LEVANDER mit der Herstellung von Knochenextrakten und deren Wirkung auf die Knochenregeneration. INCLAN 1942 richtete die erste Knochenbank auf der Basis des in Citratblut konservierten Knochens ein. Voll Bestürzung steht man vor den Dokumenten im Buch „Medizin ohne Menschlichkeit“ von MITSCHERLICH und MIELKE (1995). Unter dem nationalsozialistischen Regime wurden, im Namen der Forschung, an wehrlosen Frauen im Konzentrationslager Ravensbrück unter anderem Versuche zu Knochenbrüchen, Knochentransplantation, Knochenspänen und Transplantation eines Schulterblattes durchgeführt.

Nach dem Zweiten Weltkrieg setzte eine stürmische Entwicklung der Literatur des Knochentransplantationswesens ein. Verschiedenste Tiermodelle, Fragestellungen, Untersuchungskriterien, Ergebnisse und deren Gegendarstellung durch andere Untersuchungen, machen die Literatur zu diesem Thema zu einem undurchdringlichen Dickicht. Exemplarisch sollen einige wichtige Entwicklungen dennoch kurz angerissen werden.

Nach Vorarbeit von mehreren Autoren, setzte sich BUSCH 1945 für die Einführung der Kältekonservierung als Knochenbanksystem in die Klinik ein. URIST machte sich ab ca. 1952 um die Erforschung der Osteoinduktion durch chemische Mediatorstoffe verdient, die in der Entdeckung des „bone morphogenetic protein“ (BMP) gipfelte. Ab 1955 beschäftigten sich mehrere Autoren wie BASSETT, BURWELL, CHALMERS, ENNEKING, ELVES, FRIEDLAENDER, GOLDBERG, LANGER und RODRIGO mit immunologischen Aspekten der Knochentransplantation. Sie zeigten, dass frische Allotransplantate mit einer Immunreaktion verbunden sind, die hauptsächlich zellulären-, jedoch auch zu einem gewissen Anteil humoralen Ursprungs sind. Als weitere wichtige Persönlichkeiten seien noch BURCHARD, MANKIN, und TOMFORD genannt, die sich mit der klinischen Anwendung und mit verschiedenen Aspekten der Knochenbank auseinandersetzen.

Nach wie vor sind die Probleme Immunologie und Infektionsgefahr bei der Allotransplantation von Knochengewebe noch nicht gelöst. Konservierter allogener Knochen, mit seiner meist abgeschwächten Immunogenität, nimmt einen wichtigen Platz im klinischen Alltag der Knochenverpflanzung ein. Gestielte

Allotransplantate, die immunologisch jedem anderen transplantierten Organ gleichzusetzen sind (GOTFRIED et al. 1987), haben klinisch nur geringe Bedeutung z.B bei der Transplantation ganzer Kniegelenke (Diefenbeck et al. 2007). Die Indikation zur notwendigen Immunsuppression, mit den z.T. schwerwiegenden Nebenwirkungen (Fishman 2007), ist nur bei Organtransplantationen, bei der die Lebenserhaltung im Vordergrund steht, gegeben (AEBI und GANZ 1989). Dies trifft bei Knochen- und Organtransplantationen meist nicht zu. Die Wertigkeit der neueren immunsuppressiven Medikamente in diesem Kontext wird derzeit experimentell erforscht (Voggenreiter et al. 2005, JOHNES et al. 2001)

## **4 Grundlagen Immunologie**

Auf Fremdstoffe, die in den Organismus eindringen, reagiert der Körper mit einer Toleranzentwicklung oder mit dem Abwehrsystem. Neben den allgemeinen Schutzmechanismen (Haut als mechanische Barriere, physiologische Bakterienflora z.B. *Lactobacillus acidophilus* in der Vagina oder Lysozym in der Tränenflüssigkeit) unterscheidet man ein unspezifisches Abwehrsystem, bestehend hauptsächlich aus neutrophilen Granulozyten und Makrophagen, sowie ein spezifisches Abwehrsystem.

Das spezifische Abwehrsystem läßt sich in zwei Bereiche untergliedern: Auf der einen Seite handelt es sich um die durch Antikörper vermittelte humorale Immunreaktion, auf der anderen Seite um die hauptsächlich durch T-Lymphozyten vermittelte zelluläre Immunreaktion. Beide Systeme können jedoch nicht absolut getrennt voneinander betrachtet werden. Die zelluläre Immunreaktion bedarf oft der Wirkung von Antikörpern (Opsonine), während die humorale Immunreaktion zelluläre Elemente (z.B. zur Antigenpräsentation) benötigt. Ob nun eine humorale- oder zelluläre Immunreaktion abläuft, hängt vom Antigen ab und davon, unter welchen Umständen das Antigen den immunkompetenten Zellen dargeboten wird. Bei vielen Immunreaktionen laufen beide Reaktionsprinzipien parallel ab.

Um ihre Aufgabe möglichst effektiv erfüllen zu können, sind die an der Immunantwort beteiligten Zellen z.T. in Gewebeverbänden und Organen zusammengefaßt. Man unterscheidet die primären lymphatischen Organe Thymus, fötale Leber und Knochenmark, die Hauptort der Lymphopoese, Proliferation und Reifung sind, sowie die sekundären lymphatischen Organe Lymphknoten, Milz und Schleimhautstrukturen wie Tonsillen und Peyersche-Plaques. Die letztgenannten Organe bilden die Umgebung in welcher die Lymphozyten miteinander und mit dem Antigen reagieren. Des weiteren dienen sie dazu, eine angelaufene Immunantwort in Gang zu halten.

### **4.1 Antigen**

Substanzen, die von einem lebenden Organismus als fremd erkannt werden und eine spezifische Immunantwort auslösen, werden als Antigene bezeichnet. Für die Immunreaktion entscheidend ist meist jedoch nicht das Molekül an sich, sondern antigene Determinanten (Epitope). Zwanglos läßt sich daraus ableiten:

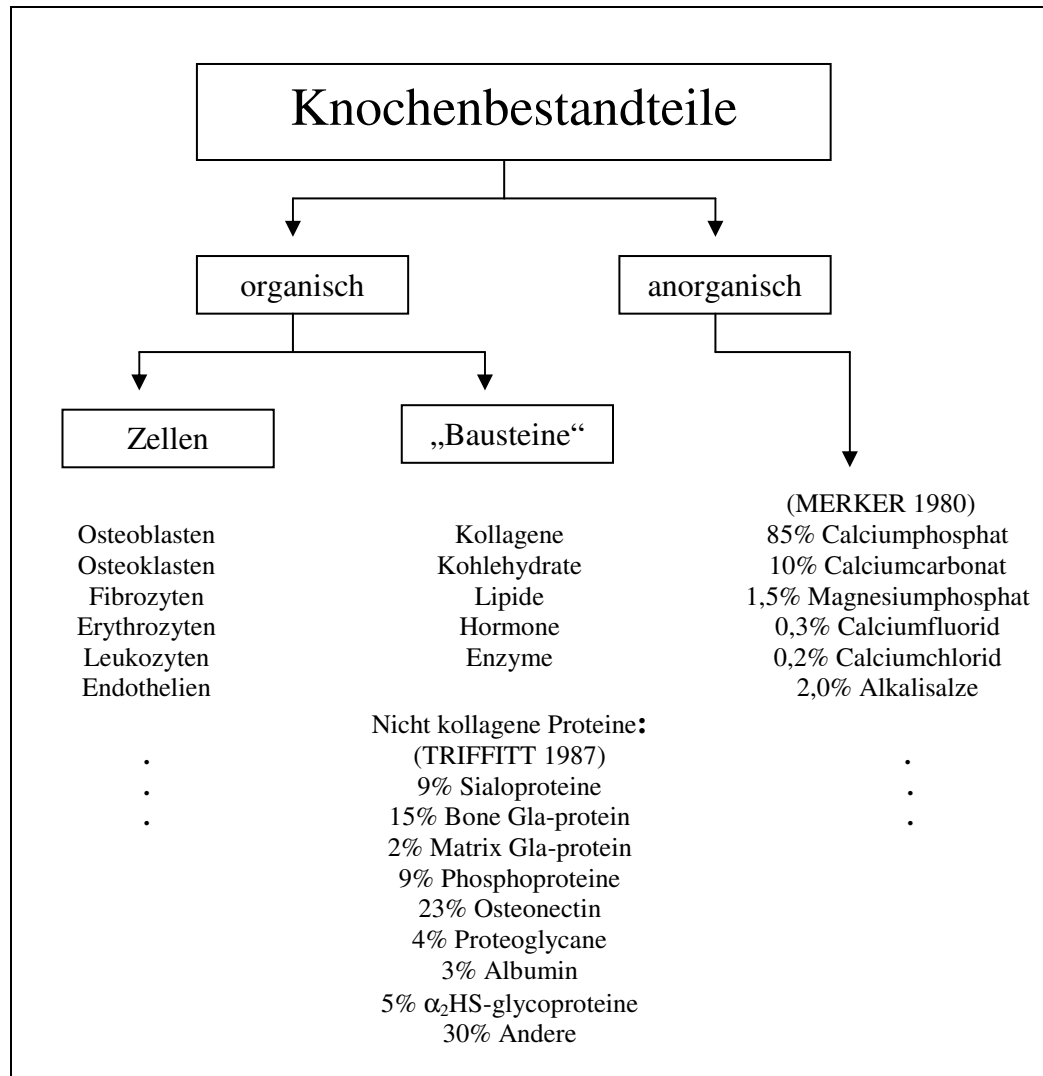
Je komplexer ein Molekül aber auch eine Bakterienstruktur oder ein Transplantat ist, desto mehr antigene Determinanten besitzt es. Dabei spielen nicht nur die Primärstruktur (Aminosäuresequenz), sondern auch die Sekundärstruktur (z.B.  $\alpha$ -Helix), Tertiärstruktur (räumliche Anordnung) und Quartärstruktur (z.B. bei Enzymen) eine wesentliche Rolle. Gewöhnlich sind bestimmte Stellen eines Antigens besonders immunogen, so dass ein Großteil der Antikörper an dieser Region bindet. Diese immundominanten Regionen befinden sich vor allem an exponierten Stellen des Anliegens, besonders wenn dort Polypeptidketten vorhanden sind, die nicht in einer besonderen tertiären Struktur gebunden sind.

Für die Transplantationsmedizin von herausragender Bedeutung war die Entdeckung des „major histocompatibility complex“ (MHC). In seiner Rede zur Verleihung des Nobelpreises 1931 bemerkte LANDSTEINER, dass es noch andere „Blutgruppen“ geben müsse, die für die Abstoßung oder das Angehen von Transplantaten wichtig seien. Nach Entdeckung des MHC Systems bei der Maus (H-2 auf Chromosom 17) konnte das MHC System bisher bei jeder untersuchten Säugetierspezies nachgewiesen werden. Beim Menschen ist der MHC-Gen-Komplex auf Chromosom 6 lokalisiert und wird auch als „human-leucocyte-antigen-system“ (HLA-System) bezeichnet. Drei Hauptgruppen von Molekülen werden von diesem Genkomplex kodiert. Dies sind die Klasse I-Antigene (HLA-A, HLA-B und HLA-C), die Klasse II-Antigene (DP, DQ und DR) sowie die Klasse III-Antigene (C2, Faktor B, C4-A, C4-B und Cytochrom-P-450-21 Hydroxylasen).

Das folgende Schaubild soll die möglichen immunogenen Bestandteile des Knochens veranschaulichen. Jede der unten angeführten Zellen trägt zumindest Oberflächenmerkmale der Klasse I-Antigene, die von zytotoxischen T-Zellen erkannt werden können und müssen daher als immunogen eingestuft werden. Die Proteinkomponenten des Knochens können als große Moleküle mit vielen Epitopen aufgefaßt werden und sind ebenfalls als immunogen zu werten.

Die entscheidende Frage bei der allogenen Transplantation ist, ob diese Moleküle interindividuelle Unterschiede aufweisen und ob diese Unterschiede als solche erkannt werden. Bei der xenogenen Transplantation stellt sich die Frage ob und in welchem Ausmaß Unterschiede in der Molekülstruktur zwischen den verschiedenen Arten bestehen. Die anorganischen Bestandteile des Knochens

als relativ kleine Moleküle, die bei allen Vertebraten in identischer Struktur vorkommen, dürften im Rahmen der Transplantationsimmunologie keine Rolle spielen.



**Abb. 1: Knochenbestandteile**

#### **4.2 Lymphknoten und Lymphsystem**

Lymphknoten bilden einen Teil des Netzwerkes in dem Antigene aus der Gewebsflüssigkeit oder Lymphe während ihrer Passage von der Peripherie zum Ductus thoracicus herausgefiltert werden. Man unterscheidet dabei zwischen regionären Lymphknoten, die nur aus einem umschriebenen Gebiet Lymphflüssigkeit beziehen, während größere Ansammlungen von Lymphknoten als Sammellymphknoten an strategisch wichtigen Punkten plaziert sind. Die Drainage der Lymphflüssigkeit im Bereich der unteren Extremität erfolgt entlang der Vasa femoralia (SCHUTT und GARDNER 1961). Lymphknoten sind

meist nierenförmige, durch eine Bindegewebskapsel begrenzte, in die Strombahn der Lymphgefäße eingeschaltete, Organe. Die Lymphknoten sind aus einem B-Zell-Areal (Kortex), einem T-Zell-Areal (Parakortex) und der zentralen Medulla, die T-Zellen, B-Zelle und Plasmazellen enthält, zusammengesetzt. Nach GRUNDMANN (1986) existieren histologisch vier grundsätzlich unterschiedliche Reaktionsmuster (kortikale Plasmazellreaktion, parakortikale Plasmazellreaktion, Keimzentrumsreaktion und zellvermittelte Immunreaktion), die sich nach Lokalisation und immunhistochemischem Verhalten unterscheiden lassen. Dies macht eine quantitative Bewertung, der im Lymphknoten ablaufenden Immunreaktionen, sehr schwer möglich.

Zwischen 1961 und 1963 berichtete BURWELL in einer Serie von Untersuchungen (BURWELL und GOWLAND 1961b, 1962a, BURWELL 1962b, BURWELL et al. 1963) über Veränderungen an Lymphknoten nach heterotoper Transplantation verschiedener Knochenpräparationen. Er beschrieb neben einer Gewichtszunahme der Lymphknoten und einer in der Methylgrün-Pyronin Färbung nachweisbaren Nukleolenvermehrung das Auftreten von Sekundärfollikeln nach Transplantation von allogenen Frischknochen. Da immunhistochemische Methoden und Histomorphometrie nicht zur Verfügung standen, wurde als semiquantitativer Nachweis einer Immunreaktion in den Lymphknoten die Sekundärfollikelbildung ausgewertet.

### **4.3 Milz**

Die Milz ist als parenchymatöses Organ direkt in den Blutkreislauf eingeschaltet. Die Blutströmungsgeschwindigkeit wird stark verlangsamt und die Blutstrombahn verbreitert. Neben der Sequestrierung von überalterten Erythrozyten, liegt die Hauptaufgabe der Milz in der immunologischen Funktion.

Bereits makroskopisch sind auf der unfixierten Schnittfläche stecknadelkopf-große Knötchen zu erkennen. Sie werden in ihrer Summe als weiße Pulpa bezeichnet und entsprechen dem lymphatischen Anteil. Des weiteren unterscheidet man im Feinbau der Milz die rote Pulpa, die hauptsächlich aus weiten, postkapillären Sinus besteht. Diese verlaufen im retikulären Bindegewebe der Milz zusammengefaßt als Pulpastränge. Zwischen diesen beiden Gewebeanteilen findet sich die sogenannte Marginalzone, die aus lockerem lymphatischem Gewebe, sowie einer Vielzahl von Sinusoiden besteht. In dieser



Zone findet die Antigenpräsentation durch antigenpräsentierende Zellen statt (NIEUWENHUIS und FORD 1976). Als Korrelat dafür finden sich in diesen Zonen zahlreiche Makrophagen. Auch die B- und T- Lymphozyten zeigen eine der Funktion entsprechende morphologische Verteilung. Die B-Zellen befinden sich im peripheren Anteil der periarteriolen Scheiden, in Follikeln und im Bereich der Marginalzone. Die T-Zellen lassen sich hauptsächlich im Zentrumsbereich der periarteriolen Scheiden nachweisen (GROGAN et al. 1983, VEERMAN und VAN EWIK 1975). Das Volumenverhältnis zwischen weißer und roter Pulpa hängt wesentlich von der immunologischen Reaktionslage des Organismus ab. In Anlehnung an die Arbeitsmethode von NAGY und FEHR (1972) wurde in der vorliegenden Arbeit das Verhältnis von roter und weißer Milzpulpa computergestützt durch Planimetrie (SEIBT 1991<sup>2</sup>) bestimmt.

#### **4.4 Humorale Immunreaktion**

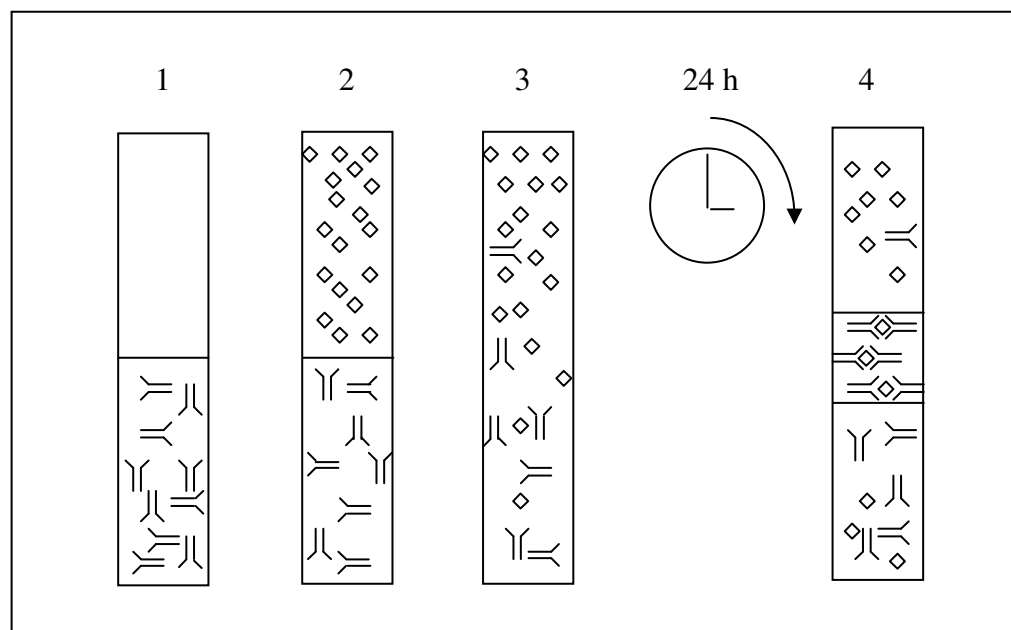
Bei Eindringen des Antigens in den Körper (z.B. Transplantation) gelangen die antigenpräsentierenden Zellen (Makrophagen, dendritische Zellen, Langerhans-Zellen u.a.) in Kontakt mit dem Antigen. Dieses wird phagozytiert und in kleinere Fragmente zerlegt zusammen mit Klasse II Molekülen des MHC auf der Zelloberfläche den T-Helferzellen dargeboten. Gleichzeitig erkennen B-Zellen über ihren antigenspezifischen Rezeptor (Antikörper) das Antigen. Durch die Interaktion zwischen T-Helferzelle und B-Zelle wird die klonale Proliferation der B-Zelle ausgelöst. Da nun eine antigen wirkende Substanz (z.B. Knochen) nach „Verarbeitung“ in den antigenpräsentierenden Zellen für das Immunsystem in viele verschiedene immunologisch relevante Molekülfragmente (Epitope) zerlegt wird, kommt es immer zur Vermehrung mehrerer B-Zell Klone. Nach einer Latenzzeit kommt es zum exponentiellen Anstieg der IgM Antikörperproduktion durch die B-Zellen auf eine Plateauphase, gefolgt von einem langsamen Abfall der IgM- Konzentration. Gleichzeitig werden sogenannte Gedächtniszellen produziert, die bei Rekontakt mit dem gleichen Antigen zu einer wesentlich rascheren Antikörperproduktion führen. Vornehmlich werden jetzt Antikörper der Klasse IgG gebildet.

---

<sup>2</sup> Seibt V: Graphische Datenerfassung mittels Digitalisierer: LRZ-Rechenzentrum der TUM 1991

Grundsätzlich hat jeder Antikörper zwei Aufgaben. Der eine Teil des Antikörpers (N-terminales Ende) bindet das Antigen, der andere Teil des Antikörpers (C-terminales Ende) ermöglicht den Kontakt zu den verschiedenen Zellen des Immunsystems. Diese beiden Funktionen werden in der Immunologie für verschiedene Testmethoden verwendet. „Eine der ersten Beobachtungen über die Reaktionen zwischen Antigen und Antikörper war, dass es zu einer Präzipitation kommt, wenn beide Reaktionspartner in annähernd äquivalentem Verhältnis vorliegen“ (STEWART und MALE 1991).

Die Immunpräzipitationsmethode wurde in ihrer einfachsten Form als Kapillarpräzipitationstest (KWAPINSKI 1982) in der vorliegenden Arbeit verwendet. Zum Nachweis von humoralen Immunreaktionen nach Knochentransplantation, wurde dieser Test bereits von BURWELL (1961a) eingesetzt. Mit der gleichen Technik wies SPYRA et al. (1988) humorale Immunreaktionen nach Transplantation von kältekonservierter Rattenkortikalis nach. Folgendes Bild soll die Technik der Kapillarpräzipitation schematisch darstellen:



1. Serum mit Antikörpern.
2. Das Serum wird mit Antigen Lösung überschichtet.
3. Durch Diffusion kommt es langsam zur Durchmischung von Antigen und Antikörpern
4. Antigen und Antikörper liegen in einem bestimmten Bereich der Kapillare in annähernd äquivalentem Verhältnis vor, es kommt zur Bildung von Präzipitaten.

**Abb. 2: Schema Kapillarpräzipitation**

Die bisher vorliegenden Ergebnisse zu humoralen Immunreaktionen nach Knochentransplantationen sind in der Literaturzusammenstellung auf der folgenden Seite dargestellt.

**Tab. 2 :Literatur zu humoralen Immunreaktionen nach allogener Knochen transplantation**

Autor	Jahr	Spezies	Präparat	Testsystem	Ergebnis
BONFIGLIO und JETER	1972	Kaninchen	Kortikal	Präzipitationstests	neg.
			Extrakt + CFA	Komplementfixation	neg.
				Präzipitationstests	neg.
BOS et al.	1983	Ratte	Kortikal	Cytotoxizitätstest	pos.
BURWELL und GOWLAND	1961a	Kaninchen	Spongiosa	Hämagglutination	neg.
				Agarosepräzipitation	neg.
				Kapillarpräzipitation	neg.
				Elektrophorese	neg.
		Maus	Kaninchenextrakt in Mäusen	Hämagglutination	pos.
				Präzipitationstests	pos.
CURTISS und HERNDORN	1956	Kaninchen,		Hämagglutination	pos.
		Hund			
ELVES	1974a	Ratte	kortikal/ Spongiosa	Cytotoxizitätstest	pos.
ELVES und SALAMA	1974b	Ratte/ Schaf	unbehandelt	Cytotoxizitätstest	pos.
			gewaschen	Cytotoxizitätstest	pos.
			gefriergetrocknet	Cytotoxizitätstest	grenzwertig
			entkalkt, gefroren	Cytotoxizitätstest	pos.
			entkalkt, gefriergetrocknet	Cytotoxizitätstest	grenzwertig
			deproteinisiert (Kiel)	Cytotoxizitätstest	grenzwertig
FRIEDLAENDER et al	1976	Kaninchen	unbehandelt	Cytotoxizitätstest	pos.
			gefroren	Cytotoxizitätstest	pos.
			gefriergetrocknet	Cytotoxizitätstest	neg.
MUSCOLO et al.	1976	Ratte	kortikal	Cytotoxizitätstest	pos.
			kortikal, ohne Mark	Cytotoxizitätstest	pos.
MUSCOLO und KAWAI	1977	Ratte	kortikal	Cytotoxizitätstest	pos.
			kortikal ohne Mark	Cytotoxizitätstest	pos.
SPYRA et al.	1988	Ratte	kortikal	Kapillarpräzipitation	pos.
			kortikal gefroren	Kapillarpräzipitation	pos.
TOMFORD et al.	1981	Katze	osteoartikulär, gefroren	Cytotoxizitätstest	pos.

#### **4.5 Zelluläre Immunreaktionen**

Wie auch bei der humoralen Immunreaktion ist bei der zellulären Immunreaktion der Kontakt von antigenpräsentierenden Zellen mit dem Antigen Voraussetzung für den Ablauf der Immunreaktion. Insbesondere können T-Helferzellen freies Antigen nicht erkennen. Das prozessierte Antigen wird zusammen mit Molekülen der MHC Klasse II von den antigenpräsentierenden Zellen, den T-Helferzellen, angeboten. Diese können nun direkt zytotoxische T-Zellen aktivieren oder über die Ausschüttung von Mediatorsubstanzen (Lymphokine) Effektorzellen (z.B. natürliche Killer-Zellen, Makrophagen, und

Granulozyten) aktivieren. Zum Nachweis zellulärer Immunreaktionen werden unter anderem folgende Testmethoden in verschiedenen Varianten eingesetzt:

1. Die „mixed lymphocyte culture reaction“ (MLC):

T-Lymphozyten werden durch Zellen, die fremde Antigene der Histokompatibilitätsklasse II tragen, zur Proliferation angeregt (afferenter Schenkel der zellulären Immunreaktion). Die Stimulation wird über die Messung von inkorporiertem  $^3\text{H}$ -Thymidin nachgewiesen. Eingesetzt wird dieses Testsystem vor allem zur Spender/Empfänger Auswahl vor Transplantationen, sowie zur HLA-D Typisierung.

2. Der „Zytotoxizitätstest“:

Zielzellen werden mit  $^{51}\text{Cr}$  inkubiert, welches in die Zellen aufgenommen wird und sich an Proteine bindet. Zu den  $^{51}\text{Cr}$  markierten Zielzellen werden nun Effektorzellen (s.o.) zugegeben (efferenter Schenkel der zellulären Immunantwort). Sind nun die Effektorzellen über den Weg antigenpräsentierende Zellen und T-Helferzellen sensibilisiert, erfolgt die Zerstörung der Zielzellen. Das dabei freigesetzte  $^{51}\text{Cr}$  wird gemessen. Eingesetzt wird dieser Test vor allem zum Nachweis von zytotoxischen T-Zellen, Zellmembranantigenen und Oberflächenmarkern.

3. Der „Migrationsinhibitionstest“

Als „klassische Methode zum qualitativen Nachweis einer zellulären Sensibilisierung“ (FRIEMEL 1984) wurde in der vorliegenden Arbeit der Leukozyten-Migrations-Inhibitions-Test verwendet. Nach Sensibilisierung werden bei Rekontakt bzw. Mitogenstimulation im Rahmen der nun ablaufenden Immunreaktion zu deren Steuerung verschiedene Mediatorstoffe, sogenannte Zytokine, freigesetzt. Diese stammen von unterschiedlichen Zellen. Es handelt sich um glykosilierte oder nichtglykosilierte Polypeptide. Dazu gehören die Interleukine (IL  $1\alpha$ , IL  $1\beta$ , IL 2-6), Tumornekrosefaktoren (TNF  $\alpha$ , TNF  $\beta$ ), Interferone (IFN  $\alpha$ , IFN  $\beta$ , IFN  $\gamma$ ), Wachstumsfaktoren (M-CSF, G-CSF, GM-CSF) sowie der „macrophage inhibition faktor“ (MIF). Die Wirkung des letztgenannten Faktors wurde erstmals von RICH und LEWIS 1927<sup>3</sup> beschrieben.

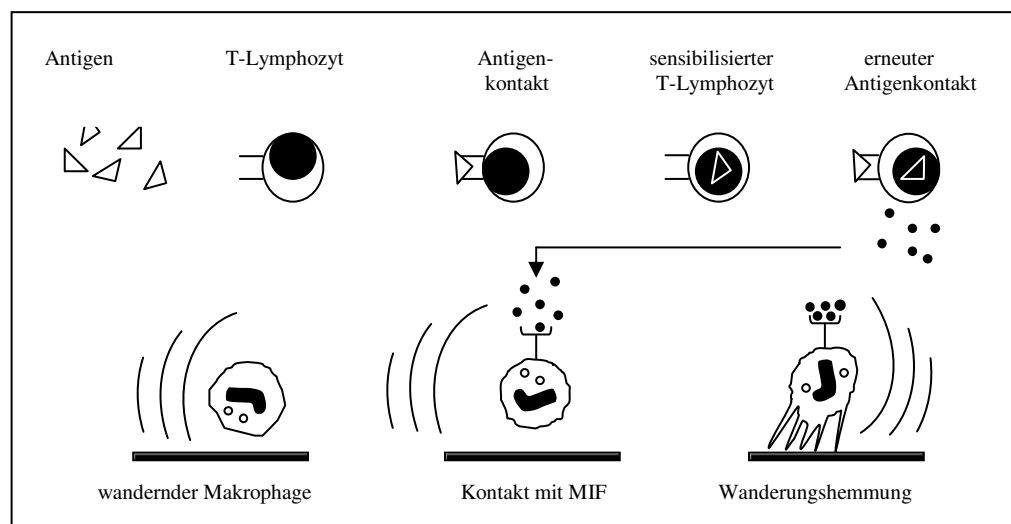
Der MIF (BUNDSCHUH 1988, Mischke 2000) ist ein saures Glykoprotein mit kleinem Polysaccharidanteil, MG 17000 bis 25000, hitzestabil (+56 °C, 30 min), resistent gegenüber einer Behandlung mit RNase, DNase, Neuraminida-

---

<sup>3</sup> Zitiert nach Scheu (1978)

se, und Diisofluorophosphat. Er wird durch Chymotrypsin zerstört, ist nicht dialysierbar und wirkt unspezifisch. Für den Migrationsinhibitionstest ist die Anwesenheit von zumindest zwei Zellarten, nämlich Lymphozyten und polymorphkernigen (=segmentkernigen) Granulozyten, unumgänglich. Wahrscheinlich ist die Anwesenheit von antigenpräsentierenden Zellen ebenfalls erforderlich (READ und ZABRISKIE 1972). In dem hier verwendeten Test wurde EDTA-Vollblut verwendet, so dass sämtliche erforderliche Zellen sicher vorhanden waren.

In der Literatur werden verschiedene Einzeltechniken vorgeschlagen. Die zwei grundsätzlichen Techniken sind die Agarosetechnik nach CLAUSEN (1971) und die Kapillartechnik nach SOBORG und BENDIXEN (1967). Dabei werden in der Literatur wiederum verschiedene Medienzusammensetzungen, Blutpräparationen und Reaktionsgefäße angegeben. Mittlerweile werden in der Transplantationsmedizin quantitative Bestimmungen des MIF (BROWN et al. 2001) eingesetzt. In der vorliegenden Arbeit wurde die einfache Kapillartechnik, wie sie von SCHEU und FIEDLER (1979) vorgestellt wurde, verwendet. Die Transplantation entspricht dem Erstkontakt der immunkompetenten Zellen mit dem Antigen. Nach den unterschiedlich langen Versuchszeiten von (0), 3, 6, 9, und 18 Wochen erfolgt der Zweitkontakt der Zellen mit dem Antigen in vitro. Sind nun die Zellen des Immunsystems durch den Erstkontakt sensibilisiert, so kommt es zu einer Hemmung der Wanderung im Test. Vereinfacht wird dieser Zusammenhang in folgendem Schaubild dargestellt:



**Abb. 3: Schema Migrationsinhibition**

In der folgenden Tabelle sollen die bisher vorliegenden Untersuchungen zur zellulären Immunreaktion nach Knochen transplantation dargestellt werden.

**Tab. 3: Literatur zu zellulären Immunreaktionen nach allogener Knochen transplantation**

Autor	Jahr	Spezies	Präparat	Testsystem	Ergebnis
ASCHERL et al.	1987	Mensch	Spongiosa, kältekons.	LMI	pos.
BOS et al.	1983	Ratte	Crista iliaca	Cytotoxizitätstest	pos.
			Crista iliaca kältekons.	Cytotoxizitätstest	grenzwertig
ELVES	1978	Ratte	Spongiosa	LMI	pos.
			Kortikal		pos.
			Spongiosa , kältekons.		pos.
			Spongiosa, gefrierget.		grenzwertig
FRIEDLAENDER	1976	Kaninchen	Kortikal	Cytotoxizitätstest	pos.
et al.			Kortikal, kältekons.	Cytotoxizitätstest	grenzwertig
			Kortikal, gefrierget.	Cytotoxizitätstest	neg.
			Kortikospongiös	Cytotoxizitätstest	pos.
			Kortikospongiös, kältekons.	Cytotoxizitätstest	pos.
			Kortikospongiös, gefriergetr.	Cytotoxizitätstest	grenzwertig
LANGER et al.	1975	Ratte	Kortikospongiös	LMI	pos.
			Kortikospongiös, kältekons.	LMI	pos.
MUSCOLO et al.	1976	Ratte	Knochen	MLC	pos.
			Kortikal	MLC	pos.
MUSCOLO und	1977	Ratte	Knochenzellen	MLC	pos.
KAWAI			Knochenzellen	ML / bonecell	pos.
SCHRATT et al.	1988	Ratte	Kortikal	LMI	pos.
			Kortikal, kältekons.	LMI	pos.
SCHRATT et al.	1990	Mensch	Spongiosa, kältekons.	LMI	pos.
SPYRA et al.	1988	Ratte	Kortikal	LMI	pos.
			Kortikal, kältekons.	LMI	pos.

## 5 Material und Methoden

### 5.1 Versuchsablauf

Nach Genehmigung (Regierung von Oberbayern AZ: 211-2531-24/88) wurde Wistar-Ratten in Narkose das mittlere Drittel der Tibia des rechten Hinterlaufes unter Operationsbedingungen entfernt. Durch Marknagelung mit Kirschnerdraht wurde den Tieren der Versuchsgruppen „autogen“ in der gleichen Sitzung das Knochenstück unbehandelt (= autogen frisch), oder nachdem es sterilisiert wurde (= autogen hitzesteril) orthotop replantiert. Bei den Tieren der Versuchsgruppen „allogen“ wurde nach Resektion das gewonnene Tibiaresektat verworfen und dafür ein entsprechendes Transplantat von einem zugeordneten Spendertier unbehandelt (= allogen frisch), oder nach Sterilisation (=allogen hitzesteril) unter gleichem Vorgehen transplantiert. Der entstandene Defekt bei den Spendertieren wurde mit einem Tefloninterponat und einer Marknagelung mit Kirschnerdraht überbrückt. Folgende Tabelle gibt einen Überblick über die Zahl der Tiere sowie über die Versuchsdauer.

**Tab. 4: Übersicht Zeitplan, Versuchsgruppen und Tierzahlen**

<b>Versuchsdauer in Wochen:</b>	<b>0</b>	<b>3</b>	<b>6</b>	<b>9</b>	<b>12</b>	<b>15<sup>4</sup></b>	<b>18</b>
<b>Transplantation</b>	<b>n = Anzahl der Tiere pro Versuchsgruppe</b>						
Autogen frisch	18	12	11	11	9	0	7
Allogen frisch	0	7	10	7	12	0	7
Autogen hitzesteril	0	10	7	7	7	0	7
Allogen hitzesteril	0	7	7	8	9	0	9

Bei der Opferung in Narkose wurden aus kardialer Punktion 5 ml EDTA-Blut und 5-10 ml Blut zur Serumgewinnung entnommen. Aus dem Serum wurden Ringpräzipitationstests zum Nachweis von humoralen Immunreaktionen angesetzt. Aus dem EDTA-Blut wurden Leukozyten-Migrations-Inhibitions-Tests zum Nachweis zellulärer Sensibilisierung angesetzt.

Bei der folgenden Teilsektion wurde die rechte Tibia mit dem Transplantat entnommen und in Formalin fixiert. Diese Präparate wurden zur weiteren wis-

---

<sup>4</sup> Der Versuchszeitpunkt 15 Wochen wurde zur Vereinfachung der graphischen Darstellung mitgeführt, obwohl zu diesem Zeitpunkt nie Tiere untersucht wurden.

senschaftlichen Untersuchung (Histologie, Radiologie), die nicht Gegenstand dieser Arbeit war, abgegeben (BARCA 1998).

Die linke Tibia sowie beide Femora wurden zur Gewinnung von Knochenmehl für die Ringpräzipitations- und Migrationshemmtests entnommen und bis zur Verarbeitung in sterilen 10 ml Spritzen gelagert. Das paraaortale Lymphknotenpaket wurde mit Nakayamapinzetten präpariert und ebenfalls in Formalin fixiert. Nach Hämatoxylin-Eosin Färbung (H. E.) folgte die Auswertung. Aus den Schnitten sollte auf lokal ablaufende Immunreaktionen geschlossen werden. Danach wurden die Milz der Tiere präpariert und in Formalin fixiert. Nach Aufarbeitung zu Hämatoxylin-Eosin Schnitten wurden diese im Fotolabor vergrößert, abgezeichnet und computergestützt planimetriert. Zuletzt wurde der Prozentsatz der weißen Pulpa im Verhältnis zur Gesamtfläche als Ausdruck einer systemischen Immunreaktion errechnet.

## **5.2 Versuchstier Wistar-Ratte und Tierhaltung**

Eingesetzt wurden männliche Wistar Auszuchttratten mit einem Gewicht von 250-300 g, Alter ca. 3 Monate. Die genaue Stammbezeichnung lautet:

„Wistar-Ratte Chbb: Thom“. Sie wurden unter der Versuchstierpaßnummer 10 A 1 von der Firma Thomae, Biberach an der Riß bezogen. Die Haltung erfolgte zu sechs Tieren in Macrolonkäfigen mit einer Bodenfläche von 1851 cm. Bei Bedarf wurden die Tiere auch in Einzelkäfigen mit einer Grundfläche von 825 cm gehalten. Bei täglicher Reinigung der Käfige erhielten die Tiere handelsübliches Standardtrockenfutter (Altromin Standard-Haltung Diät RM-1310) sowie frisches Trinkwasser ad libitum. Die Käfige wurden in einem speziell nach den Tierschutzbestimmungen ausgerüsteten Raum unter Beachtung der entsprechenden Bestimmungen aufgestellt.

## **5.3 Anästhesie und Operationsvorbereitung**

Zur Anästhesie wurden die Tiere aus den Käfigen genommen und zur i.m. Injektion in die laterale Oberschenkelmuskulatur links gehalten (KRAUS 1980). Verwandt wurde eine Narkose aus 100 mg/kg KG Ketamin<sup>5</sup> und 5 mg/kg KG Xylazin<sup>6</sup> in einer Mischspritze. Nach 5-10 min. Ruhezeit setzte die narkotische Wirkung mit einer chirurgischen Toleranzzeit von 75-90 min. ein, die mit einer

---

<sup>5</sup> Ketanest®, Fa. Parke-Davis, Berlin BRD

<sup>6</sup> Rompun®, Fa. Bayer, Leverkusen BRD

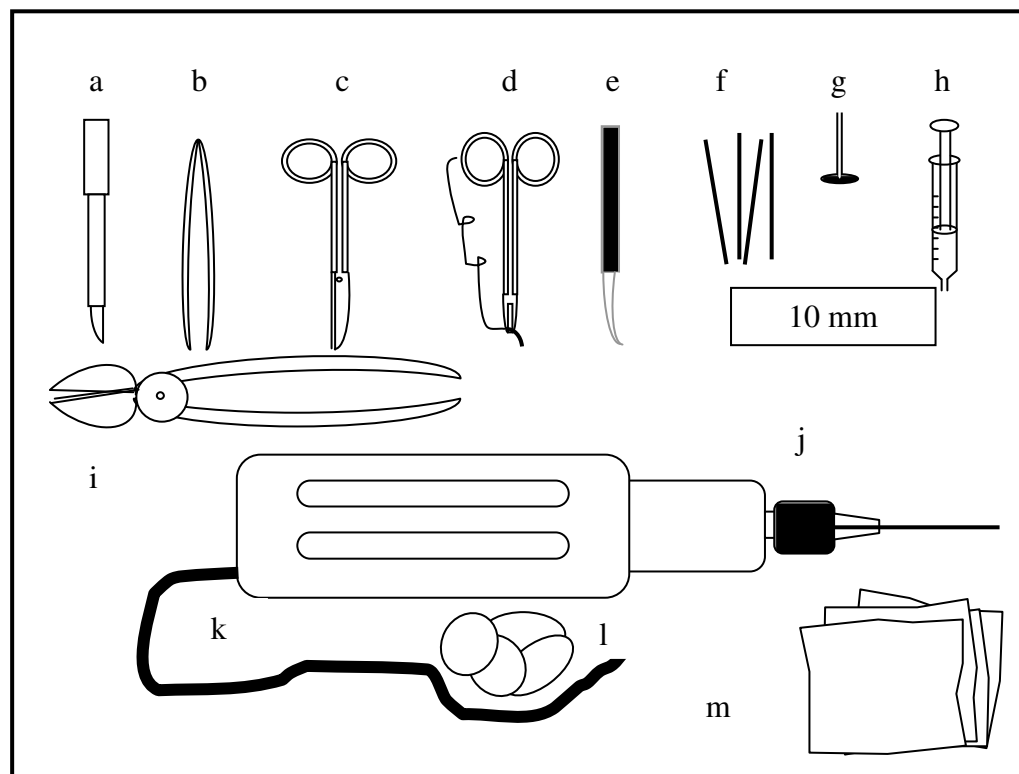


Nachschlafphase von ca. 30 min. wieder abgeklungen war. Die Spontanatmung blieb dabei erhalten, die Narkose konnte durch Nachinjektion verlängert werden. (ERHARD et al. 1986).

Den Ratten wurden, nachdem die Narkose eingesetzt hatte, der rechte Unter- und Oberschenkel, sowie Flanken- und Bauchhaut der rechten Seite bis zur Höhe des Rippenbogens rasiert. Nach zweimaligem Waschen des Operationsgebietes mit 70% Alkohol, zusätzlichem Einsprühen mit einem Antiseptikum<sup>7</sup> und Abdeckung der Augen mit Bepanthen<sup>8</sup> Augensalbe zum Schutz gegen Austrocknung, wurden die Tiere in Rückenlage auf den Operationstisch gelagert. Es folgte nun das Abdecken mit sterilen Tüchern.

## 5.4 Operationstechnik

### 5.4.1 Instrumentarium



a) Skalpell b) Pinzette c) Schere d) Nadelhalter e) Raspatorium f) Kirschnerdraht 1,2 mm<sup>9</sup>  
g) Modellsägeblatt<sup>10</sup> h) Spritze 10 ml i) Seitenschneider j) Alu-Platte 10 mm  
k) Modellbaubohrmaschine<sup>11</sup> l) Tupfer m) Kompressen

### Abb. 4: Verwendetes Instrumentarium

<sup>7</sup> Chlorhexidinlösung 5%, Apotheke des Klinikums R.d.I.

<sup>8</sup> Bepanthen Roche Augen und Nasensalbe®, Hofmann-La Roche AG, Grenzach-Wyhlen, BRD

<sup>9</sup> Art. Nr. LX 98 S, 1,2 mm, Fa. Aesculap, Tuttlingen, BRD

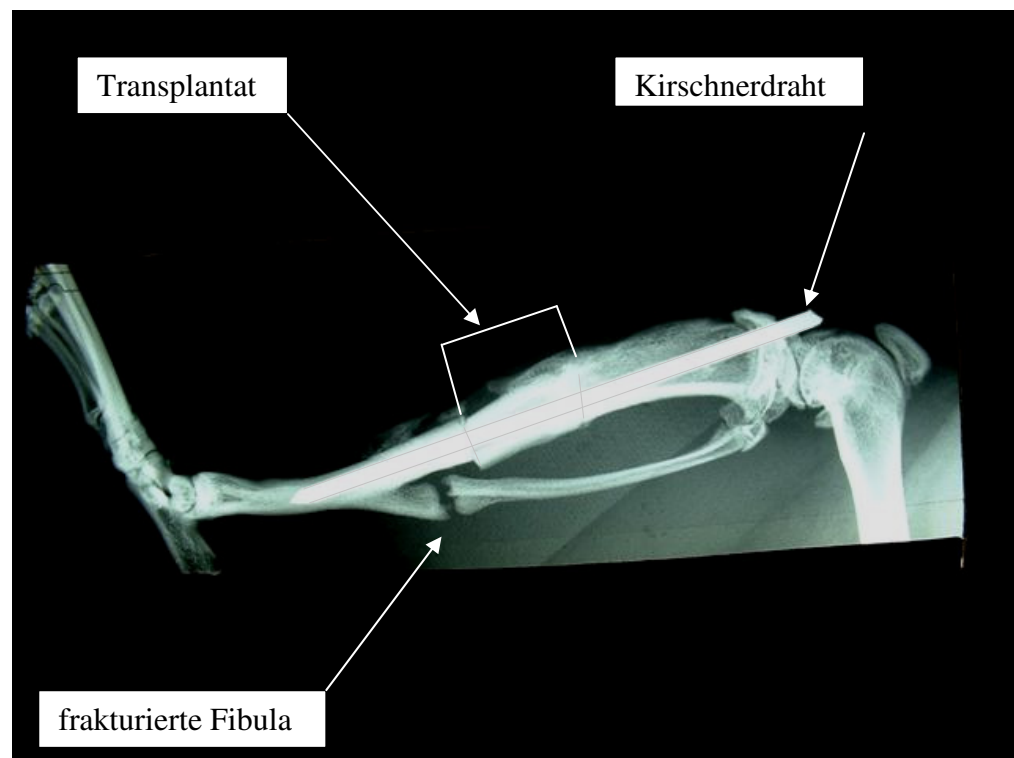
<sup>10</sup> Modellsägeblatt 18 mm, Fa. Kustermann, München, BRD

<sup>11</sup> Minicraft Black & Becker, Idenstein, BRD

## 5.4.2 Operationsverfahren

### 5.4.2.1 Transplantation

Das im folgenden verwendete Transplantationsmodell wurde zuerst von JAHN (1980) beschrieben. Nach Rasur und Desinfektion des Operationsgebietes (siehe 4.3) erfolgte die sterile Abdeckung der Tiere mit Operationstüchern mittlerer Größe, sowie mit kleinen Schlitztüchern in der aseptischen Operationskabine. Unter den für Humanoperationen üblichen aseptischen Regeln (Operationshaube, Mundschutz, Operationsmantel und sterile Handschuhe) erfolgte nun der Hautschnitt.



**Abb. 5 : Röntgenbild 3 Wochen nach Transplantation und Marknagelung<sup>12</sup>**

Dieser wurde von der Höhe des Tibiaplateaus ca. 2 mm lateral der Margo anterior tibiae etwa 25 mm nach distal geführt. Nun erfolgte die Spaltung der Unterschenkelfaszie. Die Muskelgruppen der Fußheber lateral und der Fußbeuger medial wurden unter stumpfem Vorgehen mit dem Raspatorium zur Seite ge-

<sup>12</sup> Röntengerät: Torr Radifluor 120; C.H.F Müller GmbH, Hamburg, BRD, Film: Kodak X-Omat MA 24 x 30 ohne Verstärkerfolie (28 kV; 3,0 mA; 30 sec); Randkonturen z.T. nachgezeichnet

drängt und blieben größtenteils unverletzt. Die Membrana interossea wurde nun auf Höhe des mittleren Tibiadrittels mit einer schmalen anatomischen Pinzette durchstoßen. Dann wurde die Pinzette zwischen Tibia und Fibula liegend geöffnet und eine Aluminiumplatte als Maß für die Osteotomien und zum Schutz der nun nach unten gedrängten Weichteile vor Sägeverletzungen zwischen Tibia und Fibula platziert. Unter Kühlung mit isotonischer Kochsalzlösung wurden nun die zwei Querosteotomien mit einer Distanz von 7 mm durchgeführt. Das Bohrfutter wurde dabei vorher mit den anderen Instrumenten sterilisiert, die Bohrmaschine nebst Stromkabel wurde in einem speziell angefertigten und ebenfalls sterilisierten Sack aus einem Operationstuch untergebracht. Nach Brechen der Fibula wurde nun das herausgesägte Tibiastückchen sorgfältig von anhaftendem Weichteilgewebe gereinigt, mit dem Raspatorium das Periost entfernt, sowie die Markhöhle mit isotonischer Kochsalzlösung freigespült.

Zur Replantation wurde die Bohrmaschine nun mit einem Kirschnerdraht (1,2 mm Durchmesser) umgerüstet. Nach Längsspaltung der Patellarsehne auf ca. 2 mm Länge wurde der Kirschnerdraht auf die proximale Gelenkfläche der Tibia vorgeschoben. Jetzt wurde der Draht durch die Markhöhle vorgebohrt bis die Spitze etwa 10 mm über die Osteotomiestelle herausragte.

Anschließend wurde bei den Operationsgruppen

- Transplantation autogen frisch - das selbe Knochenstückchen,
- Transplantation autogen hitzesterilisiert - das Knochenstückchen, nachdem es durch das Operationspersonal bei 134 °C, 2 bar, 3 min. hitzesterilisiert wurde,
- Transplantation allogene frisch - das fremde Knochenstückchen (siehe Spender Operation),
- Transplantation allogene hitzesterilisiert - das fremde Knochenstückchen nach Sterilisation,

auf den Kirschnerdraht aufgefädelt. Unter leichtem Zug wurde jetzt der distale Tibiaanteil ebenfalls auf den Draht aufgefädelt. Nun wurde unter geringer axialer Kompression der Tibia der Kirschnerdraht in der Markhöhle um ca. 5 mm vorgebohrt. Nach Überprüfung der Achsenstellung, sowie der Festigkeit der Osteotomie durch geringe Zug- und Rotationsbewegungen, wurde der Draht so

knapp wie möglich oberhalb des Tibiaplateaus mit einem Seitenschneider gekürzt. Spülung des Operationssitus mit isotonischer Kochsalzlösung. Zur Muskeldeckung der Osteosynthese erfolgte die lockere Adaptation der Faszien von Beuge- und Streckmuskulatur des Unterschenkels durch zwei resorbierbare Nähte<sup>13</sup>. Der Hautverschluß wurde durch drei Rückstichnähte<sup>14</sup> sowie Wund-spray<sup>15</sup> erreicht.

#### *5.4.2.2 Spender OP*

Bei den Spendertieren identisches Vorgehen wie zur Operation der Transplantatempfänger. Der Defekt wurde jedoch durch einen sterilisierten, 7 mm langen Teflonzylinder<sup>16</sup> (5 mm Durchmesser), der eine zentrale Bohrung (1 mm Durchmesser) enthielt, überbrückt. Das gewonnene Tibiastückchen wurde entweder in eine mit isotonischer Kochsalzlösung befeuchtete Kompresse eingeschlagen und nach ca. 30 min. transplantiert oder in handelsübliche Sterilisationstüten doppelt verpackt und hitzesterilisiert. Am gleichen, spätestens am darauffolgenden Tag wurden die hitzesterilisierten Knochen transplantiert.

#### *5.4.2.3 Probenentnahme bei Opferung*

Am Opferungstag wurden die Tiere mit der halben Dosis Ketamin/Xylazin (siehe 4.3) narkotisiert. Die Rasur erfolgte wie zur Operationsvorbereitung. Zusätzlich wurden der linke Hinterlauf und die linke Flanke sowie der linke Hemithorax rasiert.

Nach der Desinfektion wurden die Tiere in Rückenlage gelagert. Zunächst wurde der Herzspitzenstoß im Bereich der vierten bis sechsten Rippe ertastet. Dann wurde eine Kanüle Nr. 1, die auf einer 10 ml Spritze befestigt war, in einem Winkel von ca. 45<sup>0</sup> zur horizontalen und vertikalen Achse des Tieres durch die Thoraxwand in den linken Ventrikel vorgeschoben (KRAUS 1980). Nach Aspiration von 5 ml Blut wurde die Spritze von der Nadel abgezogen, das gewonnene Blut sofort in ein Reagenzgefäß mit EDTA-Lösung umgefüllt und durch vorsichtiges Umkippen schonend durchmischt. Die Spritze wurde

---

<sup>13</sup> Dexon<sup>®</sup> Art.Nr. 097 012/x3, B.Braun-Dexon GmbH, Spangenberg, BRD

<sup>14</sup> Ethilon<sup>®</sup> 4-0 Ethicon, Norderstedt, BRD

<sup>15</sup> Nobecutan<sup>®</sup>Spray, Astra Chemicals GmbH, Wedel, BRD

<sup>16</sup> Teflon 5 mm, Fa. Stahlberg, München, BRD

nun wieder auf die liegende Nadel aufgesetzt und weitere 5 -10 ml Blut zur Serumgewinnung entnommen. Die Blutröhrchen mit dem EDTA-Blut wurden bis zur Weiterverwendung im LMI-Test im Kühlschrank bei 4 °C aufbewahrt. Die Serumröhrchen wurden in einer Zentrifuge bei 3000 U/min zentrifugiert. Der Serumüberstand wurde in Eppendorf ReaktionsgefäÙe abgefüllt und nach entsprechender Beschriftung bei -20 °C in der Tiefkühltruhe bis zur weiteren Verwendung gelagert. Nach Beendigung der Blutabnahme wurden die Tiere durch eine Überdosis (160 mg) Pentobarbital<sup>17</sup> intrakardial über die liegende Nadel getötet.

Nach Hautschnitt über der linken Tibiavorderkante und scharfem Abpräparieren der Weichteile wurde die Tibia im Knie- und Sprunggelenk exartikuliert. Die Gelenkflächen wurden nun reseziert, um die Markhöhle mit isotonischer Kochsalzlösung zu spülen. Das Periost wurde nun entfernt und die Tibia in einer beschrifteten 10 ml Spritze gelagert.

Bei gleichem Vorgehen wurden nun die Femora beiderseits präpariert und ebenfalls in der Spritze gelagert. Sowohl die Blutproben als auch die frischen Knochen verblieben bis zur weiteren Aufarbeitung für die immunologischen Tests im Kühlschrank bei 4°C.

Nun wurden die Proben für die histologische Aufarbeitung gewonnen. Dazu wurde, wie oben schon für die linke Tibia beschrieben, nun auch die rechte Tibia, die das Transplantat enthielt, gewonnen und in vorbereitete, mit 10 ml neutralisiertem Formalin 6% gefüllte Probenröhrchen gelegt. Über einen mittleren Bauchschnitt wurde die Bauchhöhle eröffnet und die Milz sowie das paraaortale Lymphknotenpaket mit zwei Nakayamaklemmen präpariert und ebenfalls in 6% neutralisiertem Formalin fixiert.

## **5.5 Untersuchte Parameter**

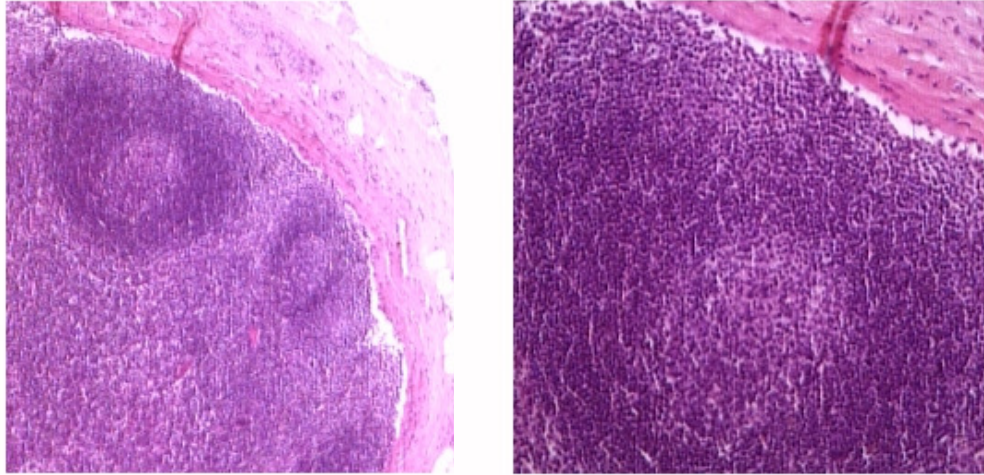
### 5.5.1 Histologie Lymphknoten

Die oben beschriebenen, präparierten und fixierten Lymphknoten wurden zu histologischen Präparaten mit einer Schichtdicke von 5 µm aufgearbeitet. Nach

---

<sup>17</sup> Narcoren® Rhone Merieux GmbH, Laubheim, BRD

Hämatoxylin-Eosin-Färbung wurde die Anzahl der Sekundärfollikel pro Schnittfläche mikroskopisch bestimmt.



**Abb. 6: Photographie Histologie Sekundärfollikel im Lymphknoten, Färbung H.E, Vergrößerung 25 X bzw. 60X**

#### 5.5.2 Histologie Milz

Die Milzen wurden, wie oben beschrieben, als gesamtes Organ präpariert und fixiert. Unter standardisierten Bedingungen (Schnitt senkrecht zur Längsachse, in der Mitte des Organs) wurden 5 µm dicke Schnitte angefertigt und in Hämatoxylin-Eosin-Technik gefärbt. Da keine Histomorphometrie-Technik zur Verfügung stand, wurden die histologischen Präparate im Fotolabor mit dem Vergrößerungsgerät auf das 10-fache vergrößert. Die Umrisse des gesamten Milzschnittes sowie die Umrisse der weißen Pulpafelder wurden auf Papier nachgezeichnet und durch ein Kopiergerät nochmals um den Faktor 2 vergrößert. Später wurden mit Hilfe eines computergestützten Planimetriergerätes die Flächen der weißen Pulpafelder sowie die Gesamtfläche des Milzschnittes bestimmt. Zuletzt wurde der prozentuale Anteil der Summe der weißen Pulpa an der Gesamtschnittfläche errechnet.

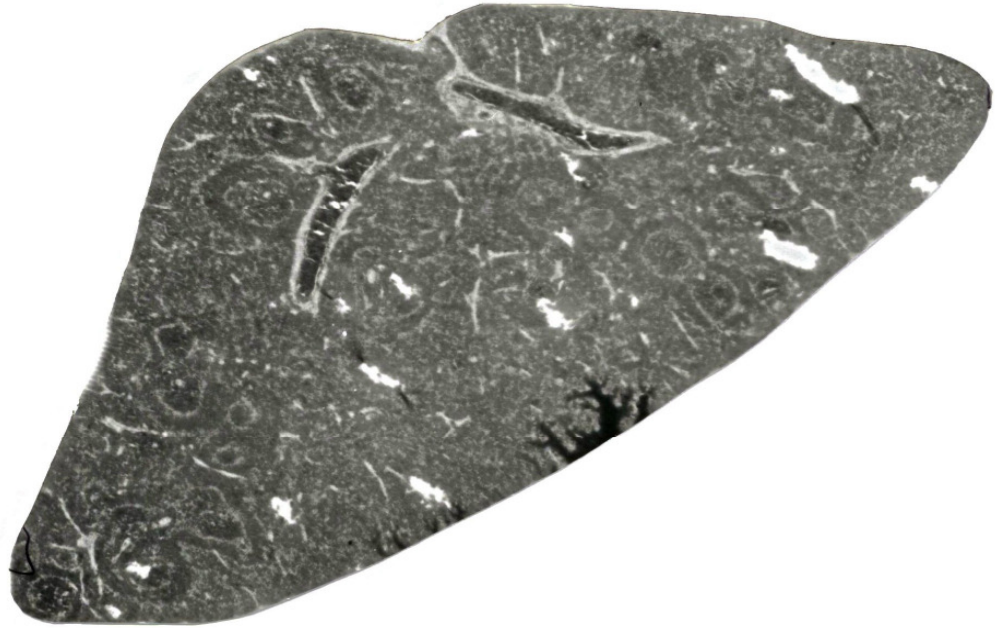


Abb. 7: Photographie Histologie Milz, Färbung H.E, Vergrößerung 20 X

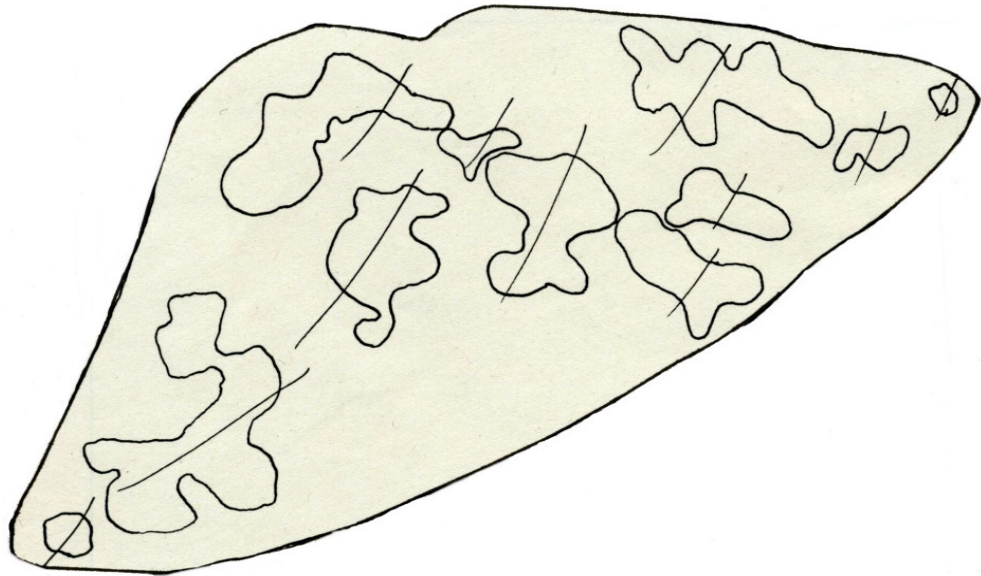


Abb. 8 : Zeichnung Milz zur Planimetrie

Tab. 5: Zahlenbeispiel Milzplanimetrie

<b>Gesamtfläche:</b>						
Mittelwert aus drei Messungen:						
	113,60	112,11	113,44			= 113,05
<b>Fläche der weißen Pulpa:</b>						
Summe aus den Einzelmessungen:						
	0,14	1,44	5,13	1,56	3,19	3,47
	1,27	5,99	0,72	0,21	7,07	= 30,19
<b>Anteil der weißen Pulpa:</b>						
						= 26,70 %

### 5.5.3 Kapillarpräzipitationstest

Für den Präzipitationstest wurde die Antigenpräparation wie folgt durchgeführt: Nach aseptischer Entnahme (siehe 4.4.2.4) wurde ein Teil der gewonnenen Knochen (meist ein Femur) grob zerkleinert. Nach dem Abwiegen (mindestens 100 mg) wurden die Knochenfragmente in ein steriles Reagenzglas verbracht und 3 molarer KCL-Barbitallösung bis zu einem Verhältnis von 100 mg Knochen pro ml KCL-Barbitallösung zupipetiert. Nach Hitzesterilisation des zweiten Femur wurde auf gleiche Weise der Ansatz für den Knochenextrakt „hitzesterilisierter Knochen“ zubereitet. Die so vorbereiteten Röhrchen wurden unter gelegentlichem Schütteln für 2 Wochen im Kühlschrank bei 4 °C zur Antigenfällung inkubiert (Werner 1984).

Die Seren, die am Tage getestet werden sollten, wurden als erstes aus der Tiefkühltruhe genommen und bei Raumtemperatur aufgetaut. Die Reagenzgläser mit den Antigenpräparationen wurden aus dem Kühlschrank genommen und die Lösung vorsichtig in beschriftete Reaktionsgefäße dekantiert. Diese wurden nun bei 500 U/min für 1 min. kurz zentrifugiert, um mögliche kleinste Knochenfragmente zu sedimentieren.

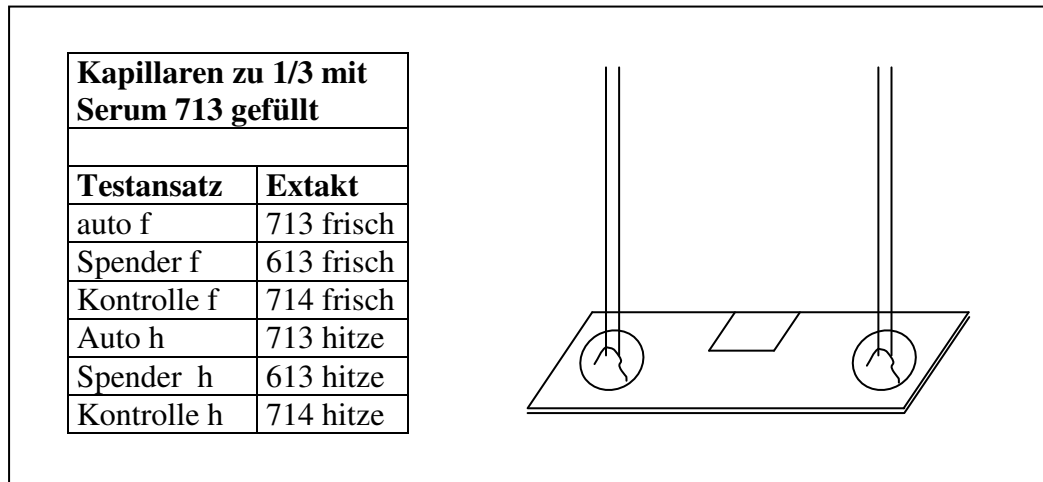
Pro Testansatz wurden nun je zwei Kapillaren zu einem Drittel mit dem zu testenden Serum gefüllt. Nach Abwischen des Kapillarendes mit einem Alkoholtupfer, um Kontaminationen von einem ins andere Gefäß zu verhindern, wurden die Kapillare mit dem zu testenden Proteinextrakt zu einem weiteren Drittel aufgefüllt. Zum Schluß wurden die zwei fertigen Kapillaren senkrecht mit dem nicht gefüllten Drittel nach unten in Vinyl-Plastik-Kitt<sup>18</sup> gesteckt, der auf einem beschrifteten Objektträger festgepreßt war. Die Tests wurden nach 12 h Inkubation im Brutschrank bei 37 °C im Licht auf eine ringförmige Trübung untersucht. Der Test liefert nur eine qualitative Ja/Nein Aussage. Bei eindeutiger Trübung in beiden Kapillaren wurde der Test als positiv bewertet. Zur Erläuterung wird auf der folgenden Seite ein kompletter Testansatz für eine Transplantation von allogenen hitzesterilisierten Knochen tabellarisch dargestellt.

---

<sup>18</sup> Cristaseal , Kat.Nr.: 1503. Hawksley & Sons Limited, West Sussex, GB



Beispiel: Ratte 713 wurde ein hitzesterilisiertes Tibiassegment von Ratte 613 transplantiert; der Knochenextrakt von Ratte 714 dient als Kontrolle; alle Kapillaren sind zu einem Drittel mit Serum von Ratte 713 gefüllt.



**Abb. 9: Schema Ansätze Ringpräzipitationstest**

#### 5.5.4 Leukozyten-Migrations-Inhibitions-Test

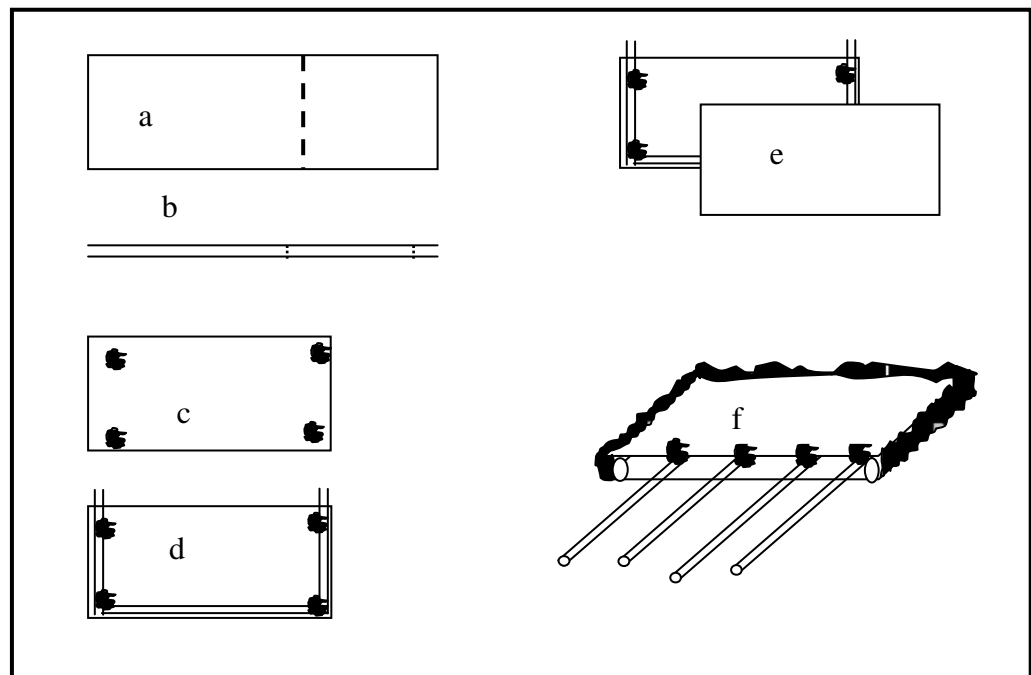
##### 5.5.4.1 Bau der Wanderungskammern

Objektträger 7,5 X 2,5 cm wurden auf die Maße 4,5 X 2,5 cm mit einem Glasschneider abgeschnitten (s.Abb. 6 a). Die so gewonnenen Glasflächen dienten als Boden und Abdeckung der Wanderungskammern. Dann wurden Hämatokritkapillaren<sup>19</sup> mit einem Diamantglasschneider auf die Maße 4,5 cm und 2,5 cm geschnitten (b). Nachdem die Glasflächen in 70 % Alkohol entfettet und daraufhin trockengerieben waren, wurde auf die vier Ecken ein kleiner Tropfen durchsichtigen Aquariumsilikons<sup>20</sup> aufgetragen (c). Nun wurde eine Kapillare (Länge 4,5 cm) auf die Längsseite und zwei Kapillaren (Länge 2,5 cm) an den Seiten der Bodenfläche aufgebracht (d). Nachdem die Deckplatte ebenfalls mit vier Silikontropfen versehen war, wurde nun die Deckplatte auf die vorbereitete Bodenplatte aufgedrückt (e). Nach einem Trockenvorgang von etwa einer Stunde wurden die aus den Kapillaren gebildeten Seitenflächen

<sup>19</sup> Heparinized tubes, Kat. Nr. 01603 Hawksley & Sons Limited, West Sussex, GB

<sup>20</sup> Rax ®, Silikonkautschuk, Brustmann GmbH & Co.KG, Oestrich-Winkel, BRD

durch zusätzliches Silikon abgedichtet. Reaktionskammer (f) bestückt mit Testkapillaren.



**Abb. 10: Bau der LMI-Wanderungskammern**

Nach einer Trockenzeit von 12 h wurden die Kammern in handelsübliche Sterilisationstüten eingeschweißt und im Autoklaven bei 120 °C, 1 bar 20 min. sterilisiert.

#### 5.5.4.2 Zusammensetzung Testmedium

Das Zellkulturmedium wurde folgendermaßen zusammengestellt:

- 500 ml RPMI - Medium 1640<sup>21</sup>

zugegeben über Sterilfilter<sup>22</sup> wurden:

- 50 ml fötales Kälberserum<sup>23</sup> mitogengetestet
- 5 ml Penicillin/Streptomycin<sup>24</sup>
- 5 ml L-Glutamin<sup>25</sup>

Zur Gewinnung des Knochenmehls wurden die entsprechenden Knochen (siehe 4.1) mit einer sterilisierten Klemme aus den Spritzen entnommen und auf

<sup>21</sup> Biochrom F 1215

<sup>22</sup> Millex GS, Millipore s.a. Molsheim, France

<sup>23</sup> Biochrom S 0115

<sup>24</sup> Biochrom K 0282

<sup>25</sup> Biochrom A 2212

handelsüblichen, ebenfalls sterilisierten Feilen aufgearbeitet. Als Auffangbehälter dienten dabei aus sterilisierter Aluminiumfolie geformte Wannen (Größe ca. 8 X 8 cm), die mit der entsprechenden Tiernummer gekennzeichnet wurden.

Das so gewonnene Knochenmehl wurde nun (sterilisierte Aluminiumfolie als Unterlage) auf einer Präzisionswaage zu 40 mg abgewogen. Dann wurden die Knochenmehlportionen mit der Folie in eine 10 ml Spritze geschoben. Die Spritze wurde mit der entsprechenden Tiernummer beschriftet und verschlossen. Durch Auffüllen der Spritze mit 8 ml des vorbereiteten RPMI-Mediums wurde eine Antigensuspension von 5 mg/ml hergestellt.

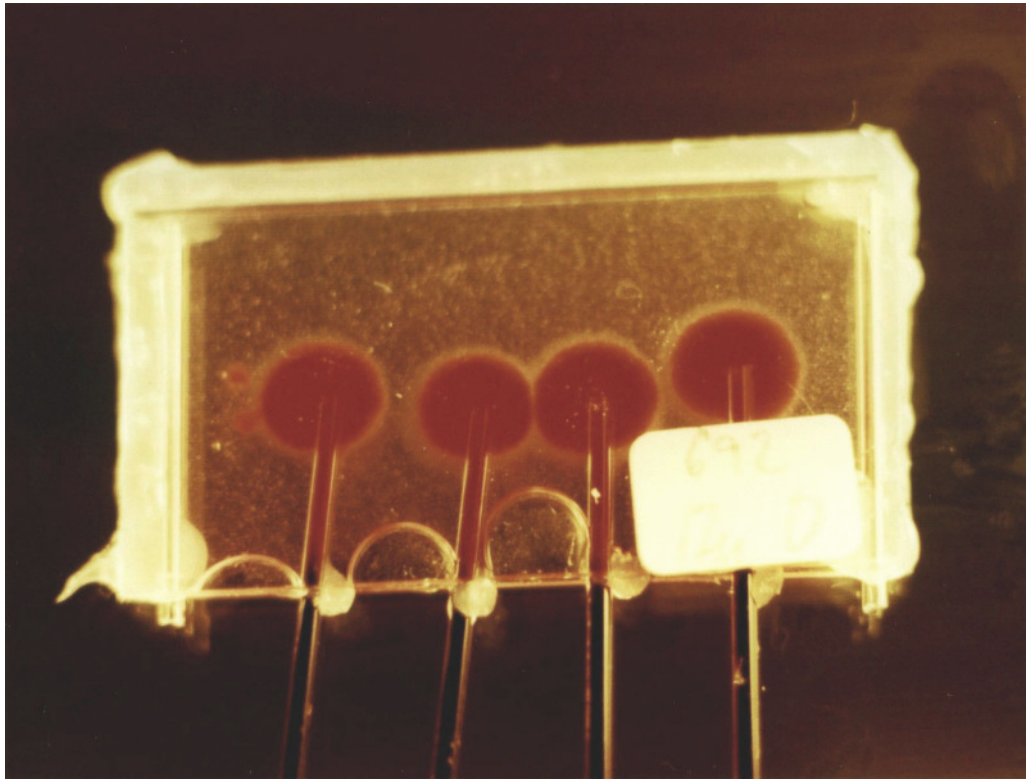
#### *5.5.4.3 Testausführung*

Pro Testansatz, mit zwei Wanderungskammern, wurden acht heparinisierte Hämatokritkapillaren vollständig mit dem EDTA-Blut aus dem Kühlschrank gefüllt und mit Vinyl-Plastik-Kitt<sup>(18 S.29)</sup> verschlossen. Die Kapillaren wurden dann in wassergefüllte Reagenzgläser gestellt und bei 1400 U/min für 5 min. zentrifugiert. Die wassergefüllten Reagenzgläser hatten beim Zentrifugieren den Sinn, die Eigenbewegung der Kapillaren beim Beschleunigen und Abbremsen zu dämpfen und somit das Zerschneiden der Kapillaren, sowie das Herausschleudern des Kitts aus den Kapillaren zu verhindern.

Eine Glasplatte, die mit 70 % Alkohol intensiv gereinigt und desinfiziert wurde, diente als Arbeitsfläche. Aus den Reagenzgläsern wurde das Wasser abgeschüttet. Nun wurden jeweils vier Kapillaren aus den Reagenzgläsern entnommen und ebenfalls mit einer in 70% Alkohol getränkten Kompresse gereinigt und desinfiziert. Dann wurden mit einem auf gleiche Weise desinfizierten Diamantglasschneider die vier Kapillaren an der gut sichtbaren Grenze zwischen Serumüberstand und Leukozytensaum angeritzt und abgebrochen. Der Kapillarrest mit dem Serum wurde verworfen.

Die so gewonnenen Kapillaren wurden mit dem Leukozytensaum voraus bis in halbe Kammertiefe in die Wanderungskammern geschoben. Die vier Kapillaren wurden in ungefähr gleichem Abstand mit einem Tropfen Silikon festgeklebt. Nach Auffüllen der Wanderungsgefäße mit den entsprechenden Medien

wurden diese in feuchten Kammern horizontal in einem Brutschrank bei 37 °C für 20 h gelagert.



**Abb. 11: Photo Leukozyten-Migrations-Inhibitions-Test**

Nach der Inkubationszeit wurden die Wanderungshöfe anhand von vier Durchmesser (horizontal, vertikal und zwei mal diagonal) ausgemessen. Aus den so gemessenen Wanderungstrecken wurde der Migrationsinhibitionsfaktor MIF folgendermaßen berechnet (WATANUKI und HAGA 1977).

$$\text{MIF} = 100 \% - \frac{\text{Wanderungstrecke mit Testantigen}}{\text{Wanderungstrecke ohne Antigen}} \times 100$$

**Gleichung 1: Berechnung des Migrationsinhibitionsfaktors MIF**

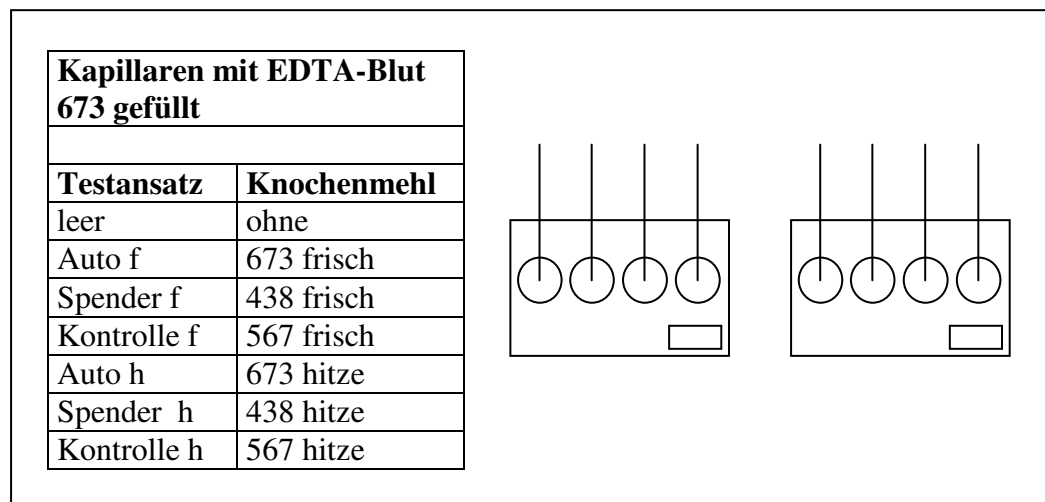
Der Normwert wurde durch die Bestimmung der mittleren Wanderungshemmung beim Testansatz 0-Wochen Auto f plus der zweifachen Standardabweichung festgelegt.

**Tab. 6: Wertetabelle zur Berechnung der MIF Normgrenze**

Mittelwert 0 Wochen, Tx autogen frisch		7,35 %
Standardabweichung	5,45 X 2	+10,89%
Normgrenze		=18,24%
Gerundet:		<b>18,25%</b>

Zur Veranschaulichung ist ein kompletter Testansatz für eine Transplantation von allogenen hitzesterilisiertem Knochen schematisch dargestellt.

Beispiel: Ratte Nr. 673 wurde der hitzesterilisierte Knochen von Ratte Nr. 438 transplantiert; alle Kapillaren sind mit EDTA-Blut von Ratte Nr. 673 gefüllt; Ratte Nr. 567 dient als Kontrolle.



**Abb. 12: Schema Ansätze LMI-Test**

### 5.6 Statistische Methoden

Zur statistischen Untersuchung der gewonnenen Meßwerte wurden drei verschiedene Testverfahren verwendet. Als erstes wurden die Meßwerte auf Normalverteilung untersucht. Dazu wurde der Test nach DAVID, PEARSON und STEPHENS (RAMM 1987) durchgeführt. Es wurde die Prüfgröße  $a$  nach unten angegebenen Formel berechnet.

War nun die Prüfgröße  $a$  in Abhängigkeit vom Stichprobenumfang größer als eine untere Schranke und kleiner als eine obere Schranke (RAMM 1987), so wurde die Normalverteilung der Grundgesamtheit mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit  $\alpha = 5\%$  angenommen.

Die Analyse ergab, dass von 147 Meßwertgruppen 27 Gruppen (19%) nicht normal verteilt waren, so dass die weitere Untersuchung mit verteilungsfreien statistischen Tests erfolgte.

$$a = \frac{R}{S_x}$$

Mit:  
a = Prüfgröße  
R = Variationsbreite (Rang) = Differenz zwischen größtem und kleinstem Wert der Stichprobe  
S<sub>x</sub> = Standardabweichung der Einzelwerte

**Gleichung 2: Berechnung der Prüfgröße a beim Test auf Normalverteilung nach DAVID, PEARSON und STEPHENS**

Um Testergebnisse unabhängiger Meßwertgruppen zu bewerten wurde der U-Test nach WILCOXON, MANN und WHITNEY (RAMM 1987) eingesetzt. Dazu wurden die Prüfgrößen U<sub>1</sub> und U<sub>2</sub> nach folgender Formel berechnet und anhand einer Tabelle (RAMM 1987) für eine Irrtumswahrscheinlichkeit von α = 5% festgestellt, ob ein signifikanter Unterschied zwischen den Meßwertgruppen besteht. Für ca. 500 Vergleichsberechnungen wurde dieser Test verwendet.

$$U_1 = n_1 \times n_2 + \frac{n_1(n_1 + 1)}{2} - R_1$$

$$U_2 = n_1 \times n_2 + \frac{n_2(n_2 + 1)}{2} - R_2$$

Mit:  
U<sub>1</sub>= Prüfgröße 1  
U<sub>2</sub>= Prüfgröße 2  
n<sub>1</sub> = Stichprobenumfang 1  
n<sub>2</sub> = Stichprobenumfang 2  
R<sub>1</sub>= Rangzahlensumme Reihe 1  
R<sub>2</sub>= Rangzahlensumme Reihe 2

**Gleichung 3 und Gleichung 4: Berechnung der Prüfgrößen U1 und U2 beim U-Test nach WILCOXON, MANN und WHITNEY**

Zur statistischen Untersuchung von zwei abhängigen Stichproben wurde der WILCOXON-Test (RAMM 1987) mit entsprechenden Tabellen (Ramm 1987) für eine Irrtumswahrscheinlichkeit α = 5% bei ca. 140 Berechnungen eingesetzt.

1. Schritt: Von den Wertepaaren wurden die Differenzen gebildet.

$$d_i = x_{i1} - x_{i2}$$

Mit:

$d_i$  = Differenz des Wertepaares  $i$

$x_{i1}$  = Wert 1 des Wertepaares

$x_{i2}$  = Wert 2 des Wertepaares

### **Gleichung 5: Berechnung der Wertepaar-Differenz beim WILCOXON-Test**

2. Schritt: Die Absolutbeträge der Differenzen werden in aufsteigenden Reihen sortiert, dabei werden Differenzen, die Null ergeben, nicht berücksichtigt.
3. Schritt: Der neuen Zahlenfolge werden Rangzahlen zugeordnet, wobei vermerkt wird, ob die Differenz positiv oder negativ war.
4. Schritt: Es wird die Summe der Rangzahlen der positiven ( $R_p$ ) und die Summe der Rangzahlen der negativen ( $R_n$ ) Differenzen ermittelt.
5. Schritt: Als Prüfgröße dient die kleinere der beiden Größen  $R_p$  oder  $R_n$ .
6. Schritt: Anhand der Gesamtzahl der Differenzen ungleich Null wird nun aus der Tabelle der kritische Wert  $R_0$  mit der errechneten Prüfgröße verglichen. Ist die Prüfgröße (der kleinere der beiden Größen  $R_p$  oder  $R_n$ ) kleiner oder gleich dem zugehörigen Tabellenwert  $R_0$ , besteht mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von  $\alpha = 5\%$  ein signifikanter Unterschied.

Allen folgenden in dieser Arbeit getroffenen Feststellungen, die auf Meßwerten basieren, liegt eine geprüfte Signifikanz ( $\alpha = 5\%$ ) zu Grunde, ohne dass dies explizit erwähnt wird. Die Ergebnisse der Ringpräzipitationstests wurden nicht mit statistischen Methoden untersucht. Der wesentliche Grund dafür war, dass für dieses qualitative Merkmal (Präzipitation ja/nein) der Stichprobenumfang viel zu klein war. Die Ergebnisse bei dieser speziellen Untersuchung sind deshalb rein deskriptiv dargestellt.

## 6 Ergebnisse

### **6.1 Postoperativer Verlauf und Komplikationen**

Bei ungestörtem Heilungsverlauf konnte die Teilbelastung ab dem zweiten postoperativen Tag, die Vollbelastung ab dem fünften bis siebten Tag post operationem beobachtet werden.

Von insgesamt 279 Tieren, die für die Versuche eingesetzt wurden, mußten 58 (20.8%) vorzeitig aus dem Versuch genommen werden. Wegen weiterer Komplikationen bei der Opferung und den Laboruntersuchungen konnten weitere 32 Tiere (11.5 %) nicht vollständig ausgewertet werden.

Insgesamt 11 Tiere wurden wegen intraoperativer, technischer Schwierigkeiten (unsteriles Transplantat 1, Weichteilverletzungen durch den Sägevorgang 2+2 Spender, zerquetschtes hitzesterilisiertes Transplantat 2 + 1 Spender, Ausprengung distale Tibia 2 + 1 Spender) getötet.

Intraoperativ verstarben 6 Tiere (Anästhesie, Abdeckung mit Operationstüchern?).

Wegen insuffizienter Osteosynthese wurden bis drei Tage nach OP 2 Empfänger und 1 Spender aus dem Versuch genommen.

Die meisten Tiere (26 = 9,3%) mußten wegen offensichtlicher Infekte vorzeitig geopfert werden. (Spritzenabszeß 2, infizierte Bißverletzung 1, Tefloniterponatträger 8, Frischtransplantatträger autogen 1, -allogen 1, hitzesterilisiertes Transplantat autogen 6, -allogen 7).

Wegen Spätkomplikationen, länger als drei Tage nach der Operation, wurden 12 Tiere (4,3 %) geopfert. Darunter befanden sich vor allem Tiere der Langzeitversuchsgruppen 12 und 18 Wochen (Geschwulsterkrankung 1 + zugeordneter Spender, ausgerissene Ohrmarkierungen, die eine eindeutige Zuordnung nicht mehr möglich machten 5 + 3 Spender, unklare Todesursache 1 + 1 Spender).

Bei 7 Versuchstieren (3 Spender) gelang es nicht, Blut in ausreichender Menge bei der kardialen Punktion zu gewinnen. Wegen zu langsamer Blutentnahme war bei 2 Versuchstieren (1 zugeordneter Spender) das EDTA-Blut geronnen. Von 6 Versuchstieren (6 Spender) wurden die Kapillaren in der Zentrifuge zertrümmert. Wegen ausgelaufener LMI-Wanderungskammern konnten von 6 Versuchstieren (1 Spender) die Tests nicht ausgewertet werden.



In der folgenden Tabelle sind die Komplikationen zusammengefasst.

**Tab. 7: Komplikationen**

		N =	%
Eingesetzte Tiere gesamt		294	
Erlernen der Operations-/Labortechnik		15	
<b>Eingesetzt für die Versuche</b>		<b>279</b>	
<b>Gesamtkomplikationen</b>		<b>90</b>	<b>32,3 %</b>
<b>Vorzeitig aus dem Versuch genommen:</b>		<b>58</b>	<b>20,8 %</b>
Anästhesie	4+2 Spender	6	2,2 %
Operationstechnik	7+4 Spender	11	3,9 %
Bis zu 3 Tagen	2+1 Spender	3	1,1 %
Über 3 Tage	7+5 Spender	12	4,3 %
Infekte	18+8 Spender	26	9,3 %
<b>Unvollständig auswertbar:</b>		<b>32</b>	<b>11,5 %</b>
Cardiale Punktion	7+3 Spender	10	3,6 %
EDTA-Blut	2+1 Spender	3	1,1 %
LMI	6+1 Spender	7	2,5 %
Zentrifuge	6+6 Spender	12	4,3 %

## **6.2 Lymphknotenhistologie**

### **6.2.1 Autogen frische Transplantate**

Mikromorphologisch zeigte sich ab der 6. Woche eine leichte Zunahme der parakortikalen Zone. Im Vergleich zum Ausgangswert (0-Wochen) war der 6-Wochen Wert signifikant kleiner. Der 6-Wochen Wert war auch signifikant kleiner als die Werte zur 12. und 18. Woche. Weitere signifikante Unterschiede wurden bei großer Standardabweichung in dieser Gruppe nicht gefunden.

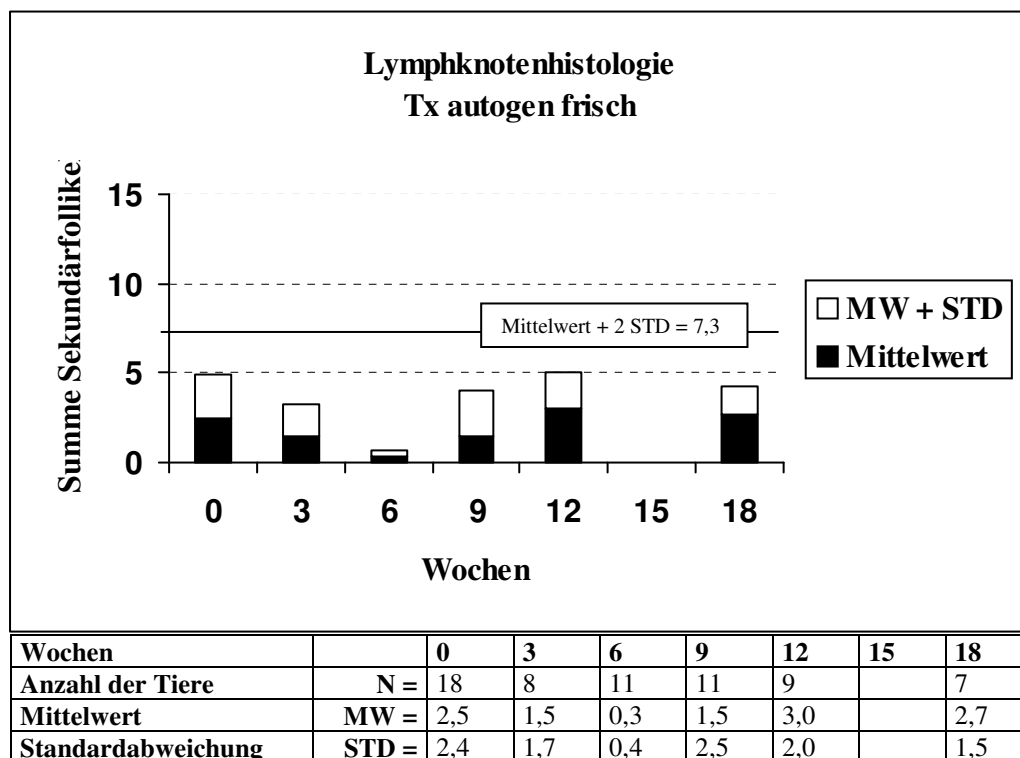


Abb. 13: Lymphknotenhistologie, Tx autogen frisch

### 6.2.2 Allogen frische Transplantate

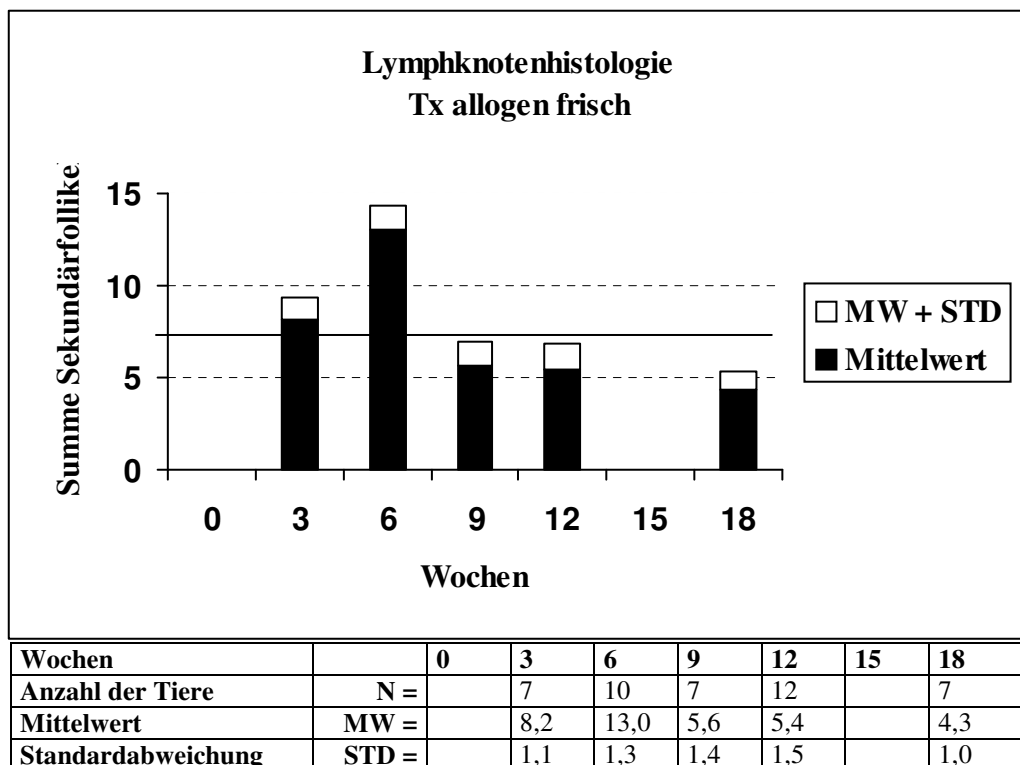
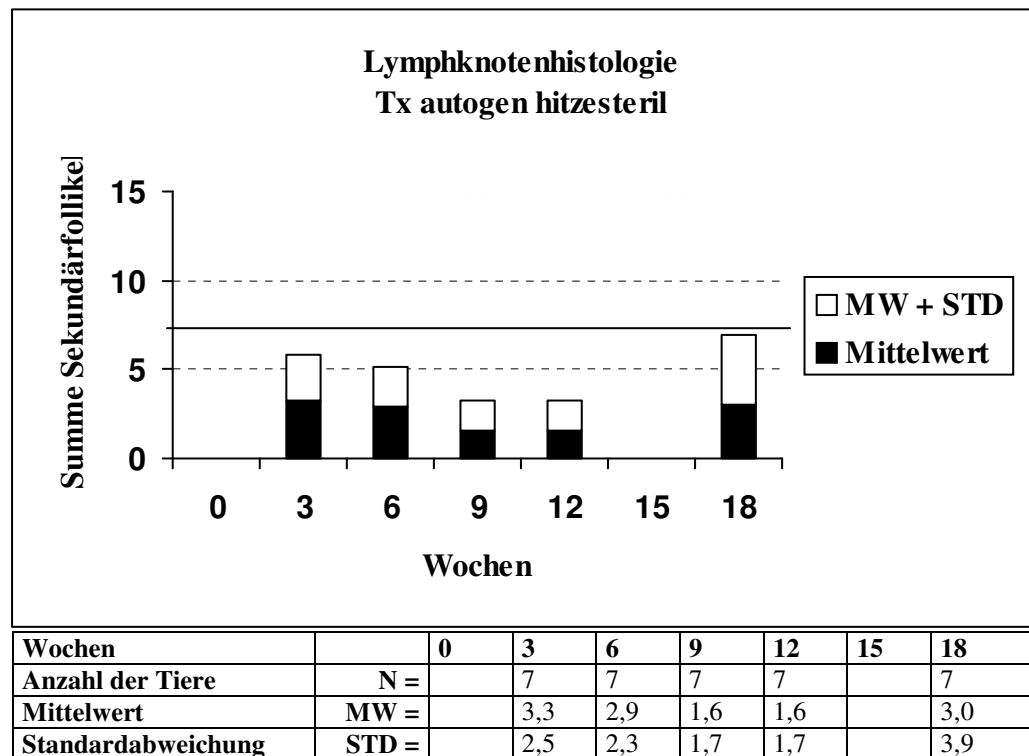


Abb. 14: Lymphknotenhistologie, Tx allogen frisch

Nach allogenen frischer Transplantation fand sich histologisch eine Verbreiterung der parakortikalen Zone ab der 9. Woche. Im Vergleich zum 3-Wochen Wert war der 6-Wochen Wert signifikant größer, der 9-, 12- und 18-Wochen Wert signifikant kleiner. Der 6-Wochen Wert war statistisch signifikant größer als der 9-, 12- und 18-Wochen Wert. Weitere statistisch signifikante Unterschiede konnten in dieser Gruppe nicht festgestellt werden.

### 6.2.3 Autogen hitzesterilisierte Transplantate

Spezifische Veränderungen der parakortikalen Zone konnten zu keinem Zeitpunkt mikroskopisch beobachtet werden. Es fanden sich keine signifikanten Unterschiede beim Vergleich der Meßwertgruppen zu den verschiedenen Zeitpunkten.



**Abb. 15: Lymphknotenhistologie, Tx autogen hitzesteril**

### 6.2.4 Allogenen hitzesterilisierte Transplantate

Tendenziell zeigte sich eine Abnahme der Sekundärfollikel im Zeitverlauf. Statistisch signifikant größer war der 3-Wochen Wert jedoch nur im Vergleich zum 12- und 18-Wochen Wert. Spezielle Veränderungen der Lymphknotenregionen konnten nicht beobachtet werden.



Beim statistischen Vergleich zwischen Ausgangswert (Tx autogen frisch 0 Wochen) und den restlichen Meßwerten zeigten sich folgende signifikante Unterschiede:

- Für Versuchsgruppe autogen frisch siehe 6.2.1
- Bei der Versuchsgruppe allogen frisch war der 3-, 6-, 9- und 12- Wochen Wert signifikant größer
- Kein signifikanter Unterschied zeigte sich bei der Versuchsgruppe autogen dampf-steril
- Bei der Versuchsgruppe allogen hitzesteril war der 3-Wochen Meßwert signifikant größer

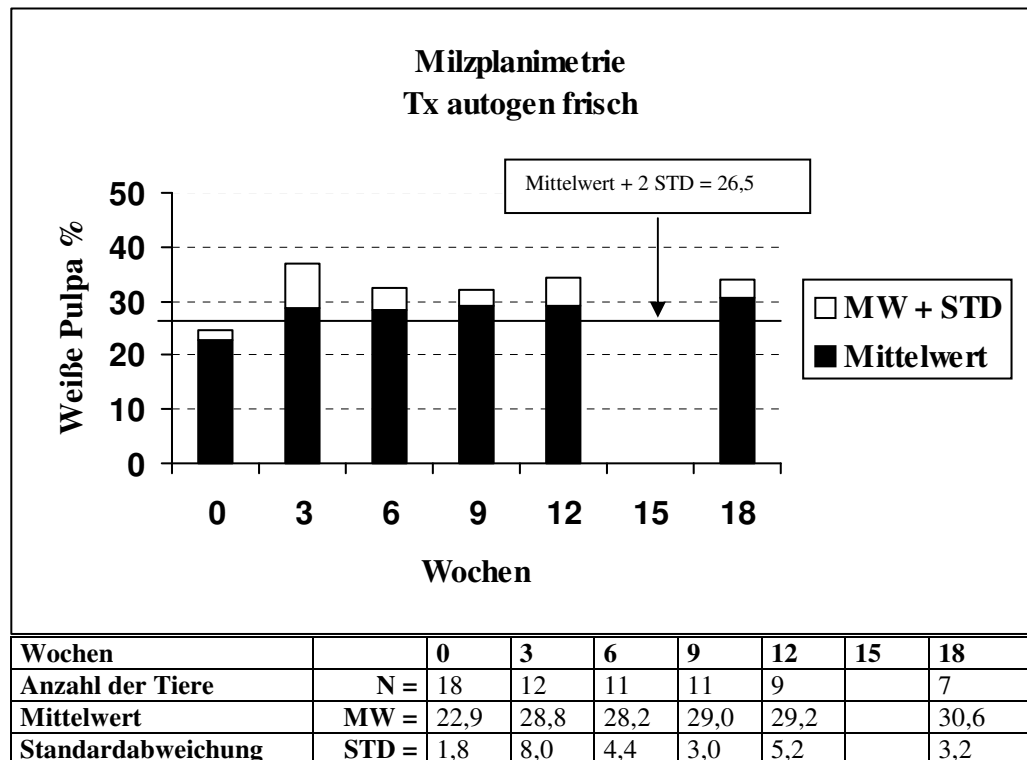
Beim Vergleich der verschiedenen Operationsgruppen zum gleichen Zeitpunkt waren folgende statistische Vergleiche signifikant:

- 3-Wochen allogen frisch und 3-Wochen allogen hitzesteril größer als 3-Wochen autogen frisch. 3-Wochen autogen hitzesteril kleiner als 3-Wochen allogen frisch
- 6-Wochen allogen frisch, 6-Wochen autogen hitzesteril und 6-Wochen allogen hitzesteril größer als 6-Wochen autogen frisch. 6-Wochen autogen hitzesteril und 6-Wochen allogen hitzesteril kleiner als 6-Wochen allogen frisch. 6-Wochen allogen frisch größer als 6-Wochen autogen hitzesteril und 6-Wochen allogen hitzesteril
- 9-Wochen autogen frisch kleiner als 9-Wochen allogen frisch und kleiner als 9-Wochen allogen hitzesteril
- 12-Wochen autogen frisch kleiner als 12-Wochen allogen frisch, 12-Wochen allogen frisch größer als 12-Wochen autogen hitzesteril und 12-Wochen allogen hitzesteril
- 18-Wochen autogen frisch größer als 18-Wochen allogen hitzesteril

### 6.3 Milzplanimetrie

#### 6.3.1 Autogen frische Transplantate

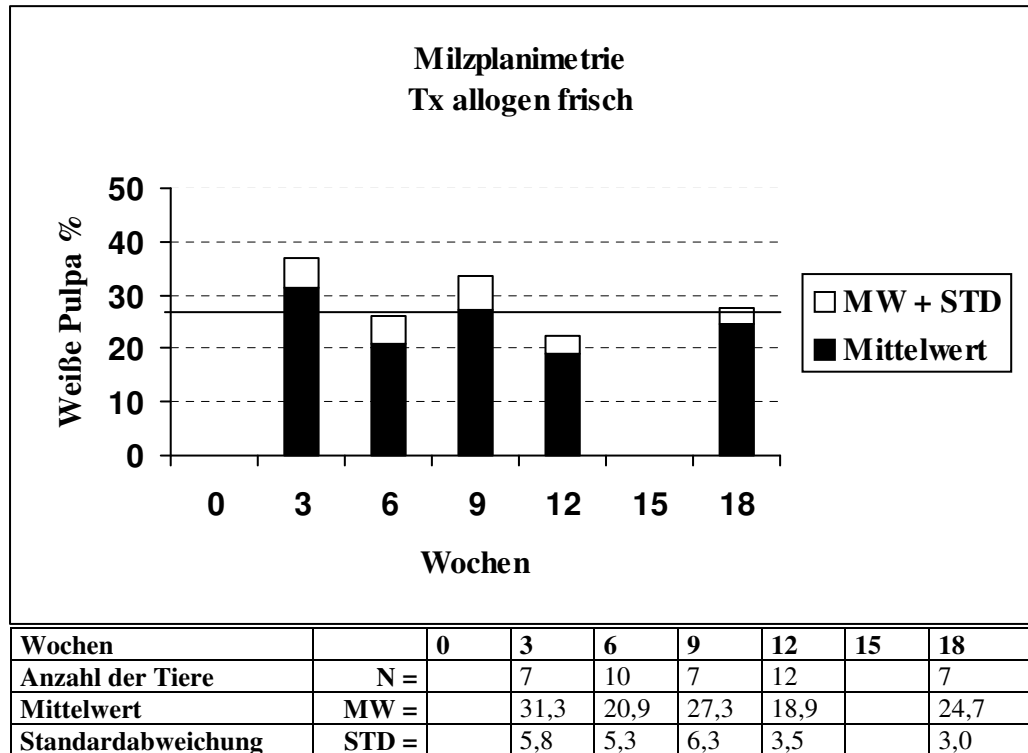
Der Anteil der weißen Milzpulpa nach autogen frischer Transplantation fand sich ab der 3. Woche über den gesamten Versuchszeitraum im Vergleich zum Referenzwert (0 Wochen) erhöht. Weitere Unterschiede konnten nicht festgestellt werden.



**Abb. 18: Milzplanimetrie, Tx autogen frisch**

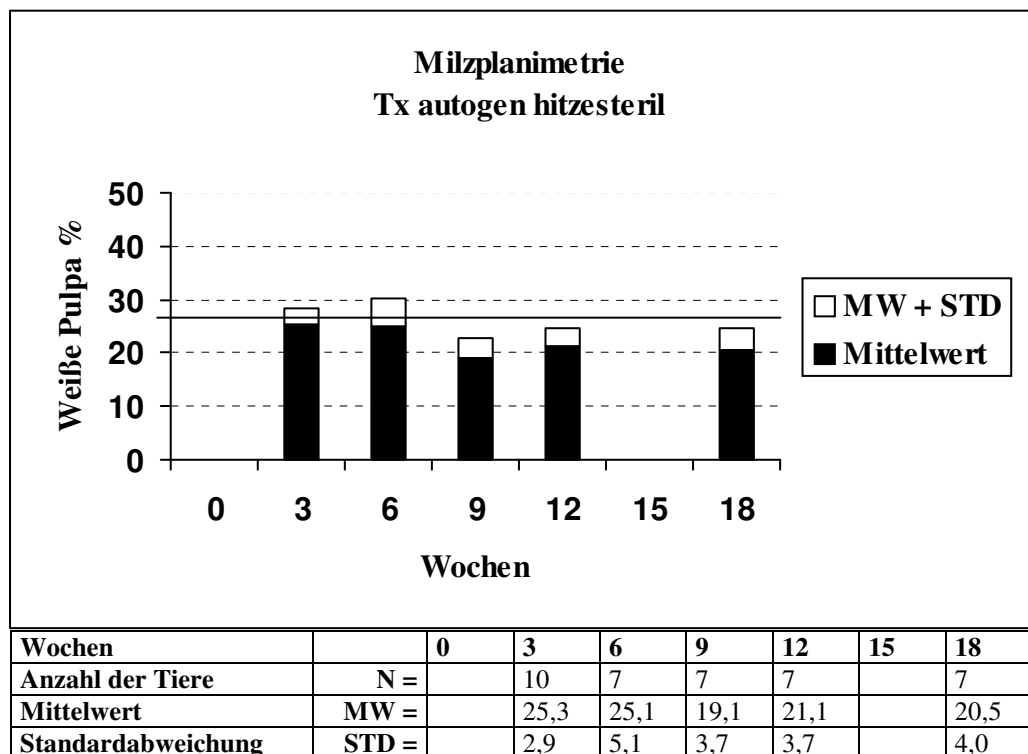
#### 6.3.2 Allogen frische Transplantate

Bei beträchtlichen Schwankungen der Einzelwerte konnte nach allogener Frischtransplantation eine signifikante Abnahme der Fläche der weißen Pulpa zur 6. und 12. Woche im Vergleich zur 3. Woche beobachtet werden. Der 12-Wochen Wert war kleiner als der 9-Wochen Wert, der 18-Wochen Wert größer als der 12-Wochen Wert.



**Abb. 19: Milzplanimetrie, Tx allogenen frisch**

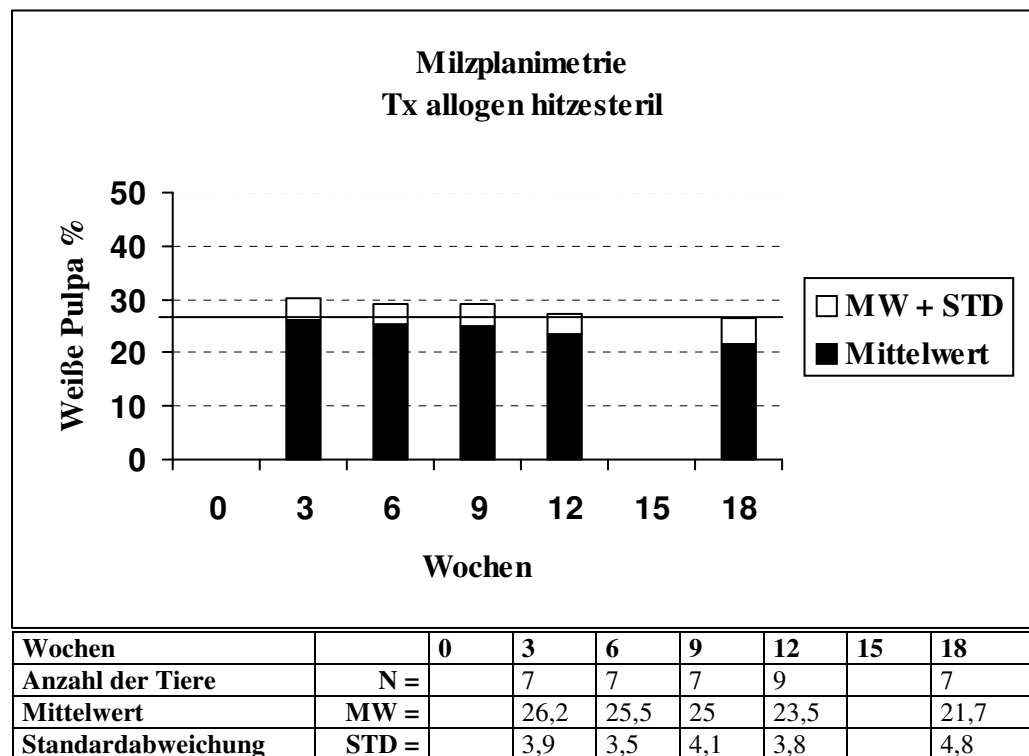
### 6.3.3 Autogen hitzesterilisierte Transplantate



**Abb. 20: Milzplanimetrie, Tx autogen hitzesteril**

Nach Transplantation von autogenem hitzesterilisierten Knochen waren die Meßwerte 9-Wochen, 12-Wochen und 18-Wochen kleiner als der Meßwert zur 3. Woche. Weitere statistisch signifikante Unterschiede konnten bei den restlichen rechnerischen Vergleichen nicht festgestellt werden.

#### 6.3.4 Allogen hitzesterilisierte Transplantate

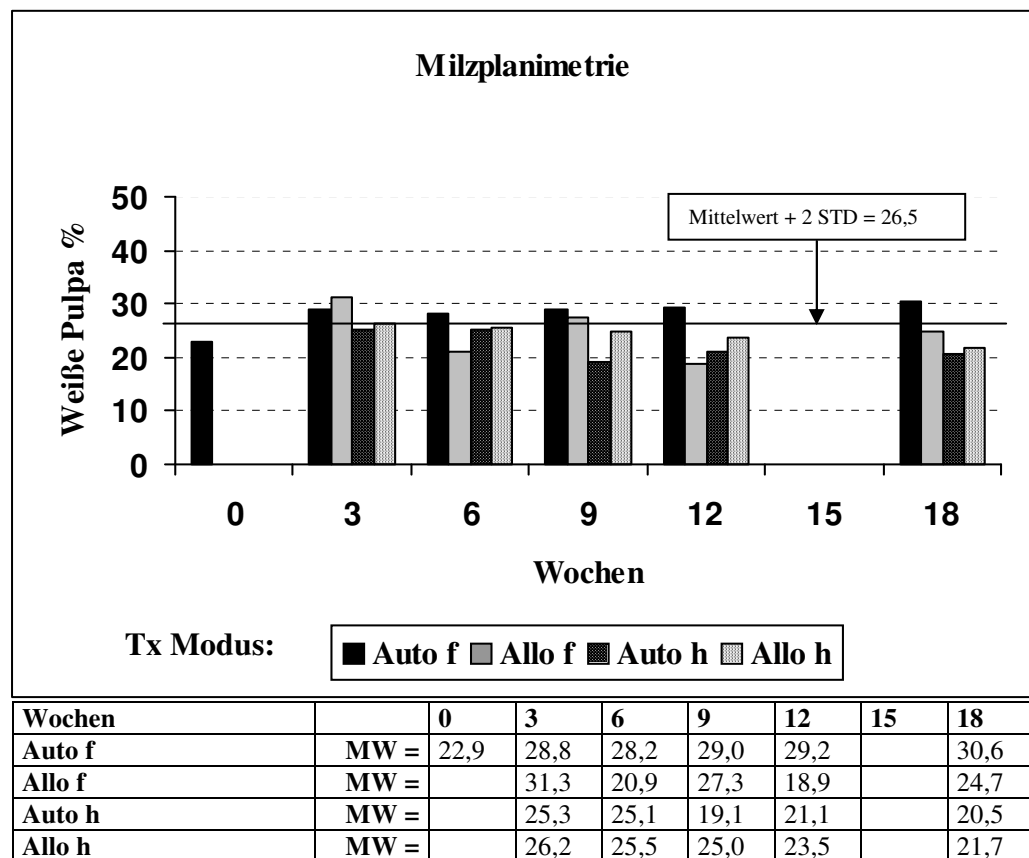


**Abb. 21: Milzplanimetrie, Tx allogen hitzesteril**

Beim statistischen Vergleich der Meßwerte in dieser Versuchsgruppe zu den verschiedenen Zeitpunkten konnte kein Unterschied festgestellt werden.



6.3.5 Vergleich zum Ausgangswert und Vergleich der Gruppen untereinander



**Abb. 22: Milzplanimetrie, Vergleich der Gruppen**

Beim Vergleich der Meßwerte, bezogen auf den Ausgangswert (0-Wochen autogen frisch), wurden folgende statistisch signifikante Unterschiede festgestellt:

- Für autogen frisch siehe Abschnitt 6.3.1
- Die 3-Wochen Meßwerte der Gruppen allogen frisch, autogen hitzesteril und allogen hitzesteril waren größer
- Der 9-Wochen Meßwert aus der Gruppe autogen hitzesteril war kleiner, ebenso der 12-Wochen Meßwert aus der Gruppe allogen frisch

Weitere signifikante Unterschiede zum Ausgangswert waren nicht festzustellen. Beim Vergleich der Operationsgruppen zum gleichen Zeitpunkt zeigten sich folgende signifikante Unterschiede:

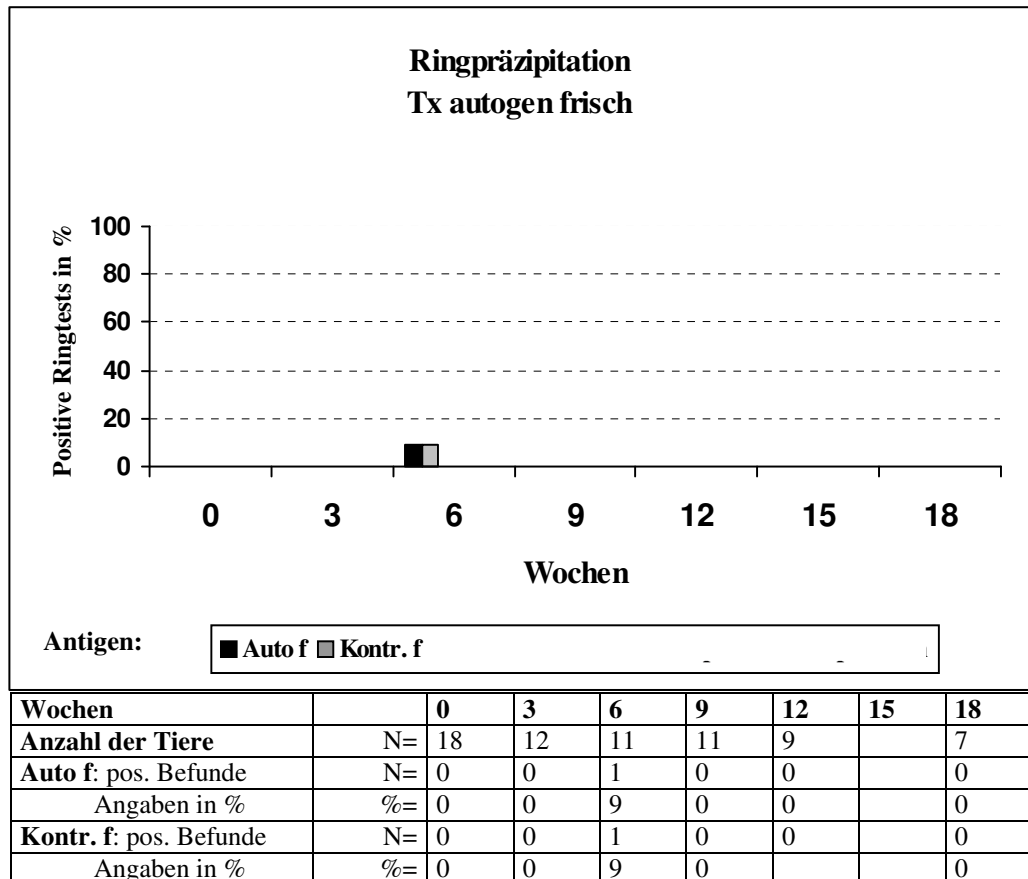
- Zum Zeitpunkt 3-Wochen war der Wert nach Implantation allogenen frischer Transplantate größer als nach Transplantation autogen hitzesterilisierter Transplantate
- Zum Zeitpunkt 6-Wochen war der Wert nach allogenen frischer Transplantation signifikant kleiner als nach autogen frischer Transplantation
- Zum Zeitpunkt 9-Wochen waren die Werte autogen hitzesteril und allogenen hitzesteril kleiner als nach autogen frischer Transplantation
- Zum 12-Wochen-Zeitpunkt waren die Werte allogenen frisch, autogen hitzesteril und allogenen hitzesteril niedriger als bei der Gruppe autogen frisch. Der 12-Wochen-Wert allogenen hitzesteril war größer als der 12-Wochen-Wert allogenen frisch
- 18-Wochen-Zeitpunkt: Wert nach autogen frischer Transplantation größer als nach allogenen frischer-, autogen hitzesteriler- und allogenen hitzesteriler Transplantation.

Sonst keine weiteren signifikanten Unterschiede.

## 6.4 Ringpräzipitationstests (Auswertung ohne Statistik siehe 5.6)

### 6.4.1 Autogen frische Transplantate

Nach Transplantation von autogen frischem Knochen fand sich im Ringpräzipitationstest einmal eine Reaktion gegen den eigenen frischen Knochen. Bei einem anderen Tier fand sich eine positive Reaktion gegen einen frischen Kontrollknochen.



**Abb. 23: Ringpräzipitationstest, Tx autogen frisch**

### 6.4.2 Allogen frische Transplantate

Gegen den transplantierten allogen frischen Knochen fand sich zu den Zeitpunkten:

- 6. Woche zu 60,0%
- 9. Woche zu 28,5%
- 12. Woche zu 50,0%

eine positive Reaktion.

Gegen den eigenen frischen Knochen fanden sich zu den Zeitpunkten:

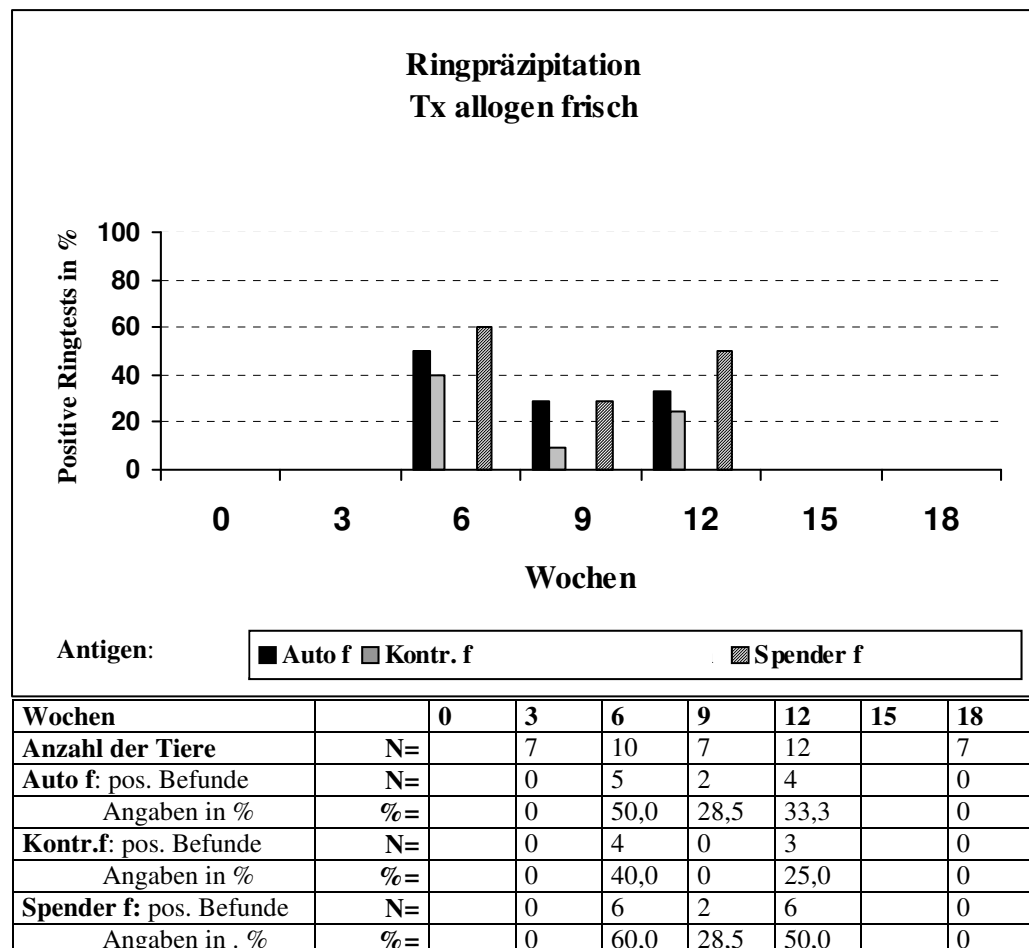
- 6. Woche zu 50,0%
- 9. Woche 28,5%
- 12. Woche 33,3%

positive Testansätze.

Reaktionen gegen einen frischen Kontrollknochen fanden sich zu den Zeitpunkten:

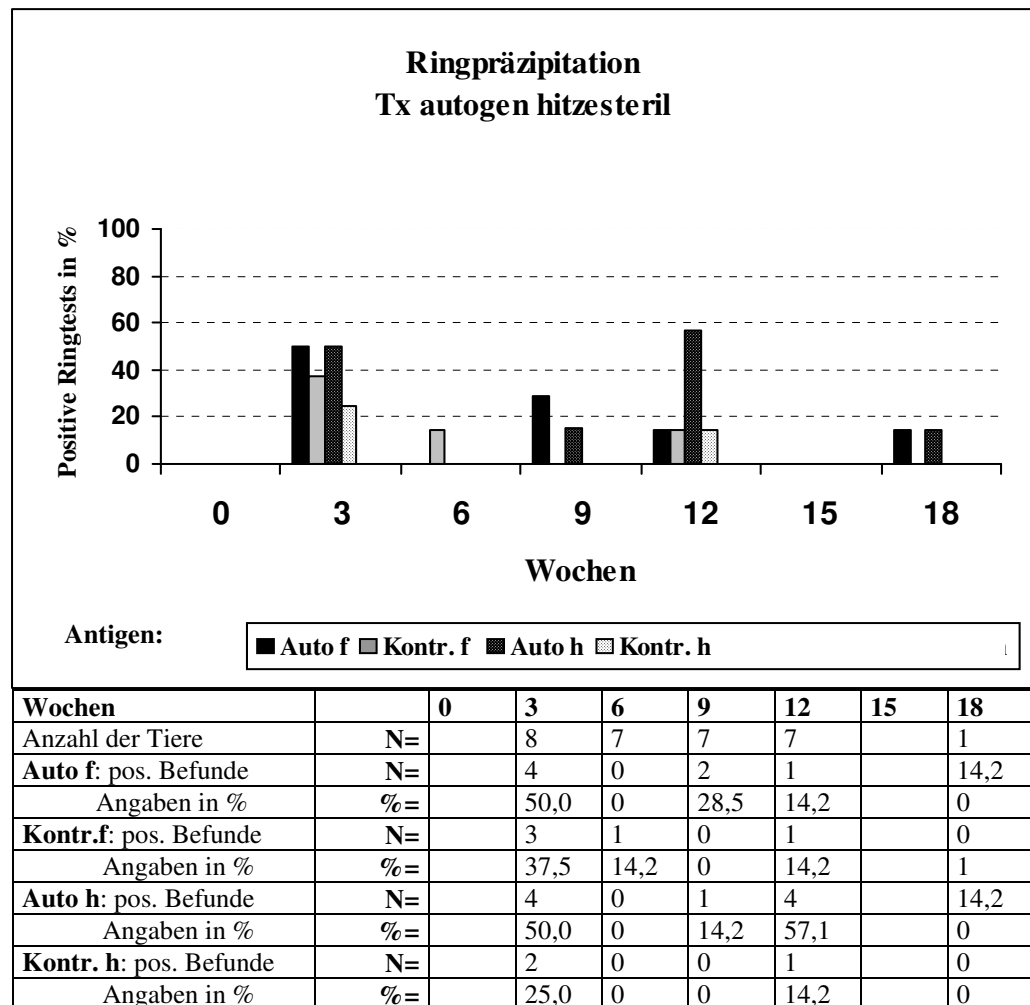
- 6. Woche zu 48,9%
- 12. Woche zu 25,0 %.

Eine Reaktion gegen sterilisierten Spenderknochen konnte nicht nachgewiesen werden.



**Abb. 24: Ringpräzipitationstest, Tx allogren frisch**

### 6.4.3 Autogen hitzesterilisierte Transplantate



**Abb. 25: Ringpräzitationstest, Tx autogen hitzesteril**

Bei diesem Transplantationsmodus fanden sich positive Tests gegen das Transplantat (autoger hitzesterilisierten Knochen) zu den Zeitpunkten:

- 3. Woche zu 50,0%
- 9. Woche zu 14,2%
- 12. Woche zu 57,1%
- 18. Woche zu 14,2%

Reaktivität gegen den eigenen frischen Knochen fand sich in der:

- 3. Woche zu 50,0%
- 9. Woche zu 28,5%
- 12. Woche zu 14,2%
- 18. Woche zu 14,2%.

Gegen frischen Kontrollknochen konnten zu den Zeitpunkten:

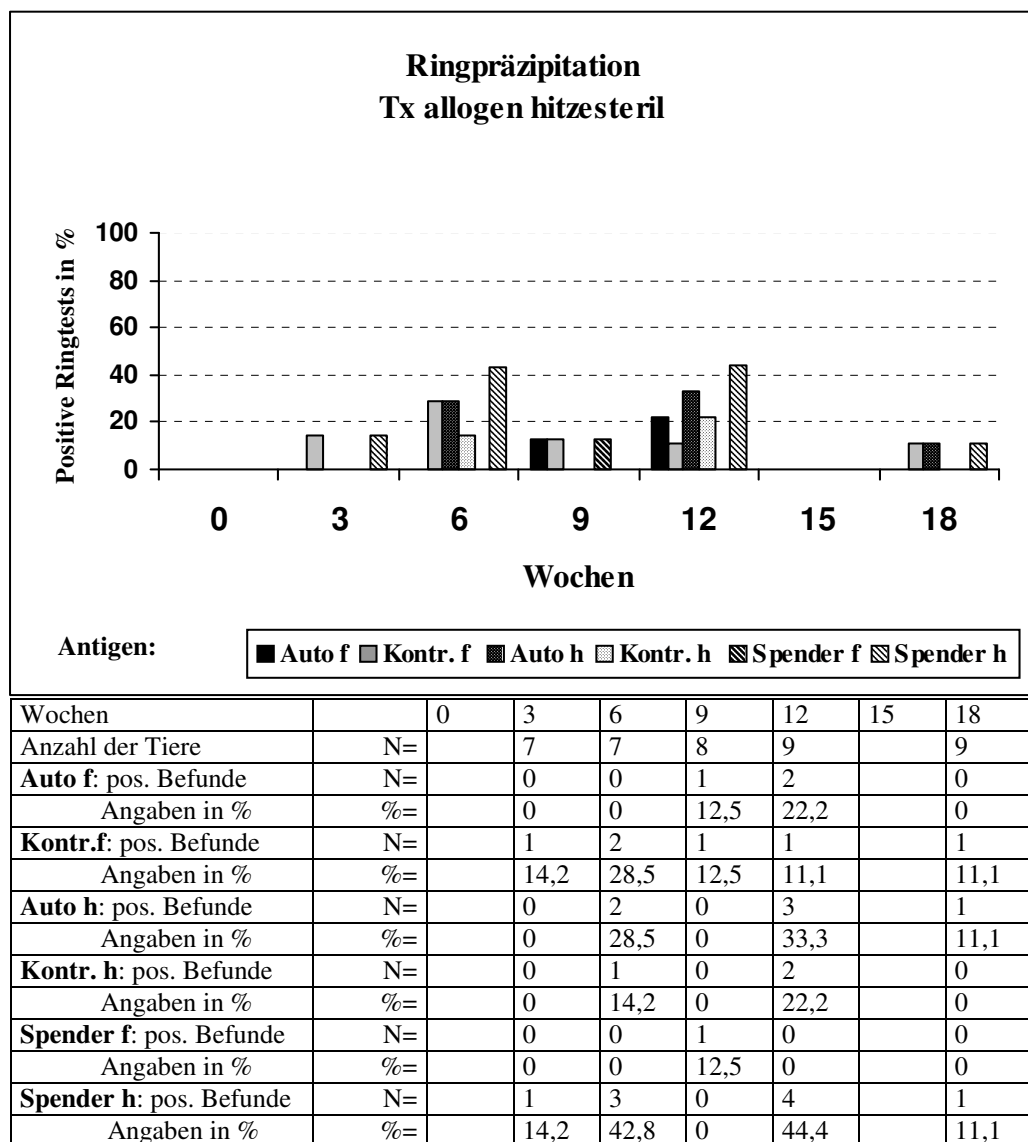
- 3. Woche zu 37,5%,
- 6. Woche zu 14,2%
- 12. Woche zu 14,2%

Reaktionen beobachtet werden.

Eine Reaktion gegen hitzesterilisierten Kontrollknochen fand sich zu den Zeitpunkten:

- 3. Woche zu 25,0%
- 12. Woche zu 14,2%.

#### 6.4.4 Allogen hitzesterilisierte Transplantate



**Abb. 26: Ringpräzipitationstest, Tx allogen hitzesteril**

Nach Implantation von allogenen hitzesterilisierten Transplantaten fanden sich positive Reaktionen gegen das Transplantat zu den Zeitpunkten:

- 3. Woche zu 14,2%
- 6. Woche zu 42,8%
- 12. Woche zu 44,4%
- 18. Woche zu 11,1%

Gegen den eigenen frischen Knochen fanden sich positive Tests zu den Zeitpunkten:

- 9. Woche zu 12,5%
- 12. Woche zu 22,2%

Eine Reaktion gegen Extrakt aus frischem Kontrollknochen konnte zu allen Zeitpunkten festgestellt werden:

- 3. Woche zu 14,2%
- 6. Woche zu 28,5%,
- 9. Woche zu 12,5%
- 12. Woche zu 11,1%
- 18. Woche zu 11,1.

Gegen den eigenen hitzesterilisierten Knochen fand sich humorale Immunreaktionen zu den Zeitpunkten:

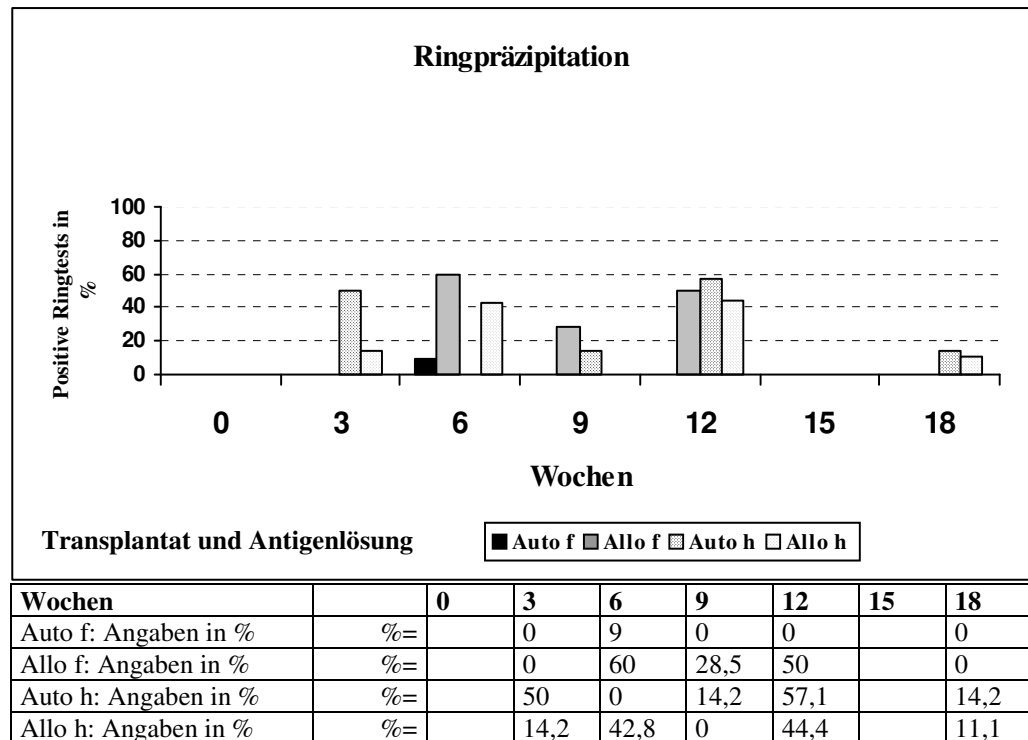
- 6. Woche zu 28,5%
- 12. Woche zu 33,3%
- 18. Woche zu 11,1%.

Beim hitzesterilisierten Kontrollknochen waren Reaktionen zu den Zeitpunkten:

- 6. Wochen mit 14,2%
- 12-Wochen mit 22,2% festzustellen.

Zu keinem Zeitpunkt war eine Reaktion gegen frischen Spenderknochen festzustellen.

#### 6.4.5 Vergleich der Gruppen untereinander



**Abb. 27: Ringpräzipitationstests, Vergleich der Gruppen**

Nach Transplantation von

- autogen frischem Knochen war lediglich zum Zeitpunkt 6 Wochen einmal (1 von 11 Ansätzen) eine Reaktion gegen das Transplantat festzustellen.

Nach Transplantation von

- allogenen frischem Knochen waren zu den Meßzeitpunkten 6 Wochen (6 von 10 Ansätzen), 9 Wochen (2 von 7 Ansätzen), und 12 Wochen (6 von 12 Ansätzen) humorale Reaktionen gegen das Transplantat festzustellen.

Nach Transplantation von

- hitzesterilisiertem autogenen Knochen fand sich eine Reaktion gegen das Transplantat zu den Zeitpunkten 3 Wochen (4 von 8 Ansätzen), 9 Wochen (1 von 7 Ansätzen), 12 Wochen (4 von 7 Ansätzen) und 18 Wochen (1 von 7 Ansätzen).

Nach Transplantation von

- hitzesterilisiertem Spenderknochen fand sich eine Reaktion gegen das Transplantat zu den Meßzeitpunkten 3 Wochen (1 von 7 Ansätzen), 6 Wochen (3 von 7 Ansätzen), 12 Wochen (4 von 9 Ansätzen) und 18 Wochen (1 von 7 Ansätzen).



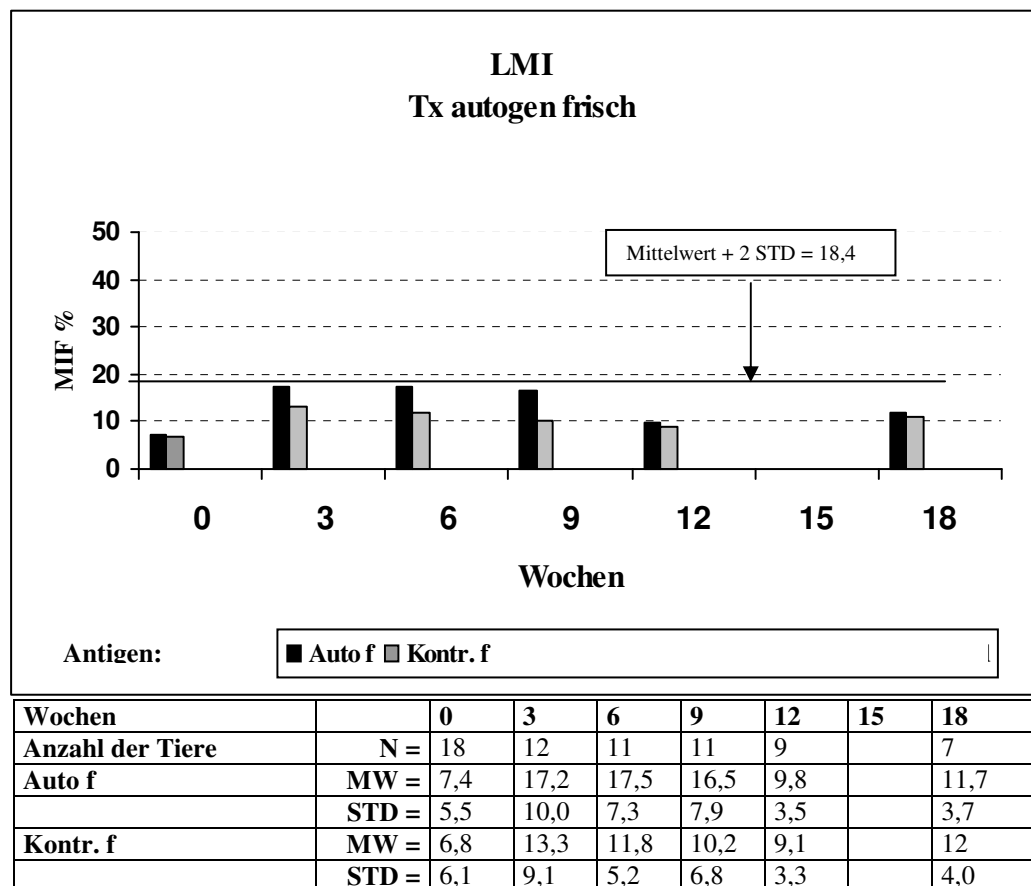
## 6.5 Leukozyten-Migrations-Inhibitions-Test

### 6.5.1 Autogen frische Transplantate

#### 6.5.1.1 Zeitverlauf

Nach Transplantation von autogenem frischen Knochen zeigte sich im LMI-Test bei Verwendung von autogenem frischen Knochen als Testantigen (Transplantat), dass die 3-, 6- und 9-Wochen-Meßwerte über dem 0-Wochen Wert lagen. Der 12-Wochen Wert lag unter dem Meßwert für 3, und 6 Wochen. Beim Kontrollknochen zeigt sich deskriptiv eine ähnliche Meßwertentwicklung über der Zeit, wobei der 3-, 6-, und 18-Wochen Wert über dem Meßwert für die Kontrolle frisch 0 Wochen lag.

#### 6.5.1.2 Vergleich zum Ausgangswert und Vergleich der Ansätze untereinander



**Abb. 28: LMI, Tx autogen frisch**

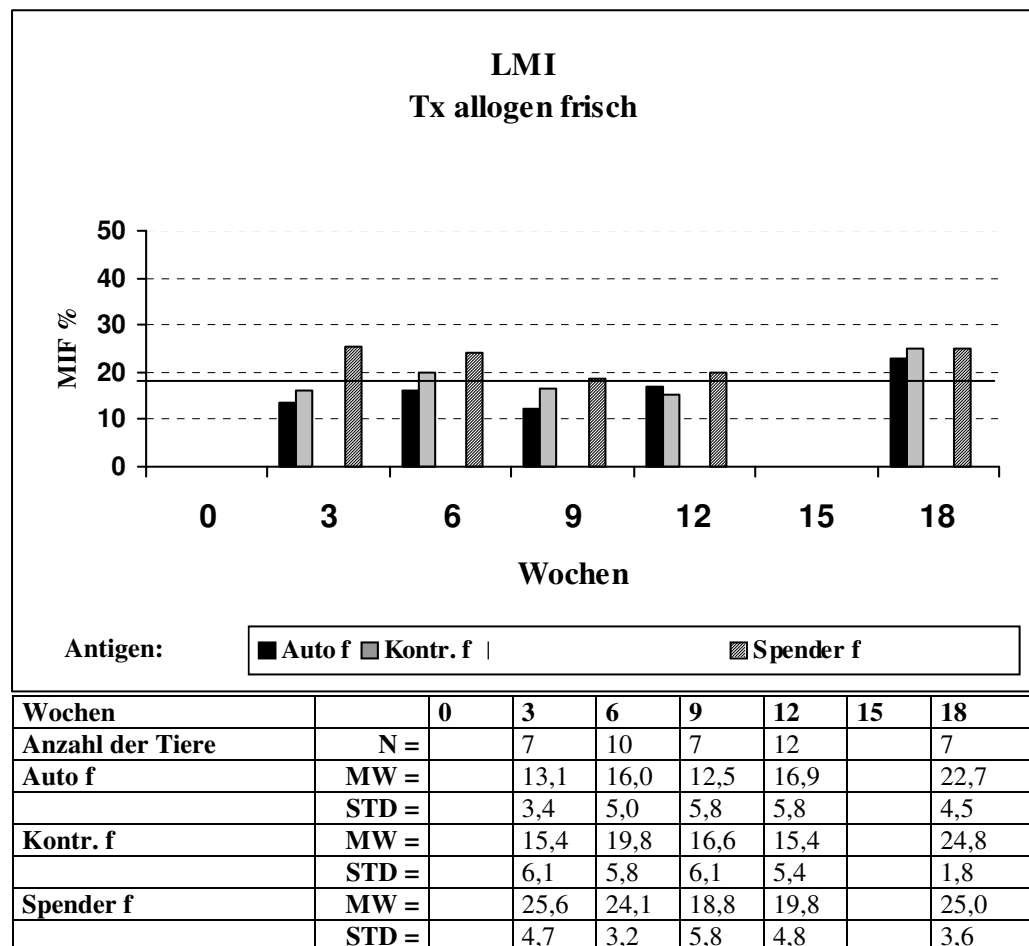
Für den Testansatz autogen frisch siehe 6.5.1. Gegenüber dem Bezugswert 0 Wochen autogen frisch lag von den Messungen mit Kontrollknochen frisch

lediglich der 6-Wochen-Meßwert über dem Bezugswert. Bei den übrigen Vergleichen wie auch bei den Vergleichen zum gleiche Zeitpunkt konnte kein signifikanter Unterschied festgestellt werden.

## 6.5.2 Allogen frische Transplantate

### 6.5.2.1 Zeitverlauf

Bei den Messungen mit frischem Spenderknochen (Transplantat) als Testantigen zeigte sich, dass der Meßwert für die Woche 12 kleiner war als die Meßwerte zur Woche 3, 6 und 18. Der Meßwert für die Woche 9 zeigt ein ähnliches Verhalten. Bei höherer Streuung wurde jedoch das Signifikanzniveau nicht erreicht. Weitere Unterschiede waren nicht festzustellen.



**Abb. 29: LMI, Tx allogen frisch**

Bei Verwendung von autogen frischem Knochen als Testantigen war der 18-Wochen-Meßwert größer als die Meßwerte mit autogen frischem Knochen zu den übrigen Zeitpunkten. Die übrigen Vergleichsuntersuchungen mit autogen frischem Knochen als Testantigen lieferten keine Unterschiede. Der Meßwert-

vergleich unter Verwendung von Kontrollknochen frisch als Testantigen zu den verschiedenen Zeitpunkten ergab, dass der 18-Wochen-Meßwert über denen für die übrigen Zeitpunkte lag. Der 12-Wochen-Meßwert war kleiner als der Meßwert für die 6. Woche. Sonst keine weiteren Unterschiede.

#### *6.5.2.2 Vergleich zum Ausgangswert und der Ansätze untereinander*

In bezug auf den Wert 0 Wochen autogen frisch waren alle Meßwerte bis auf den Meßwert autogen frisch 9 Wochen größer. Weitere Unterschiede konnten nicht festgestellt werden. Beim Vergleich zu den gleichen Zeitpunkten in diesen Operationsgruppen lag der Meßwert 3 Wochen Spender frisch über den 3 Wochen Meßwerten für autogen frisch und Kontrolle frisch. Der Meßwert für 6 Wochen Spender frisch lag über dem Meßwert für 6-Wochen autogen frisch. Der Wert 9 Wochen Kontrolle frisch lag über dem für 9 Wochen autogen frisch und der Meßwert 12 Wochen Kontrolle frisch war kleiner als der für 12 Wochen autogen frisch. Weitere signifikante Unterschiede konnten nicht festgestellt werden.

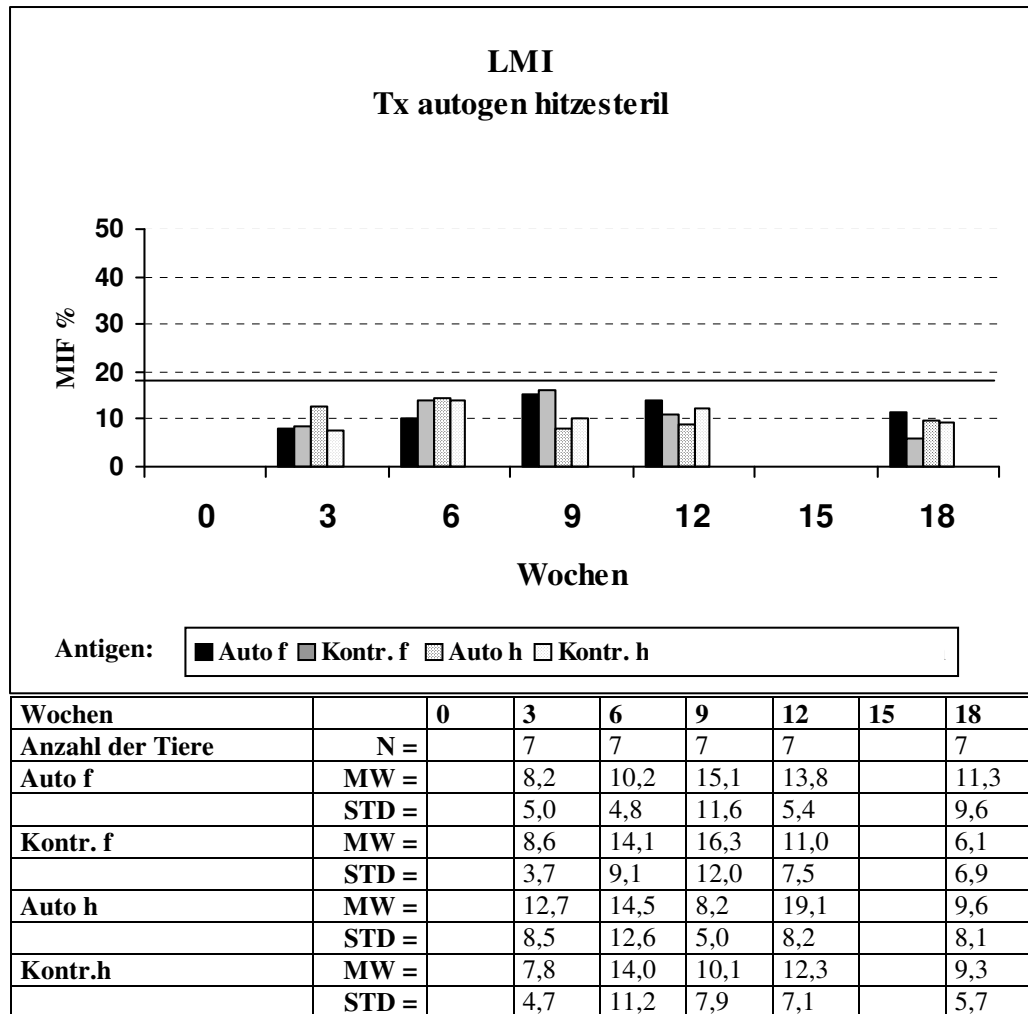
### 6.5.3 Autogen hitzesterilisierte Transplantate

#### *6.5.3.1 Zeitverlauf*

In den Operationsgruppen mit autogen hitzesterilisierten Transplantaten waren bei den verschiedenen Messungen sehr große Standardabweichungen festzustellen, so dass sehr wenig signifikante Unterschiede festzustellen waren. Im Zeitverlauf für die Testansätze mit autogenem hitzesterilisierten Knochen war lediglich der Meßwert für die Woche 12 größer als der für den Zeitpunkt 9 Wochen. Bei den übrigen Testansätzen (auto frisch, Kontrolle frisch und Kontrolle hitzesteril) zeigten sich keine Unterschiede im Zeitverlauf.

#### *6.5.3.2 Vergleich zum Ausgangswert und der Ansätze untereinander*

In bezug auf den Meßwert 0 Wochen autogen frisch war der 12-Wochen-Wert mit Antigen aus autogenem frischen Knochen und autogenem hitzesterilisierten Knochen größer. Weitere Unterschiede waren nicht festzustellen. Beim Vergleich der einzelnen Meßwerte zum gleichen Zeitpunkt untereinander konnten keine Unterschiede festgestellt werden.



**Abb. 30: LMI, Tx autogen hitzesteril**

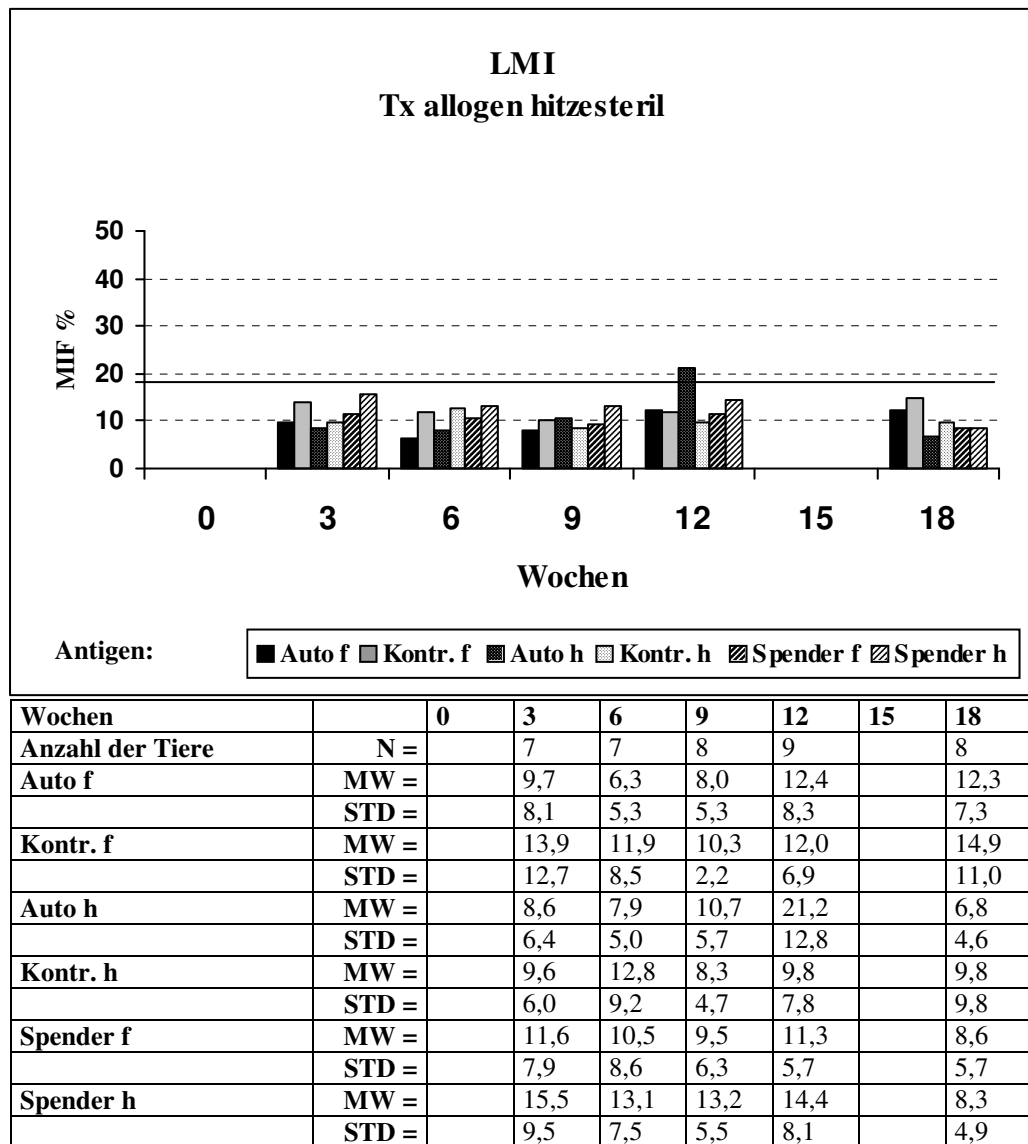
#### 6.5.4 Allogen hitzesterilisierte Transplantate

##### 6.5.4.1 Zeitverlauf

Wie auch nach Transplantation von autogenem hitzesterilisierten Knochen zeigte sich bei der Meßwertanalyse nach Transplantation von hitzesterilisiertem allogenen Knochen eine große Standardabweichung und deshalb nur wenige signifikante Unterschiede. Im Zeitverlauf mit hitzesterilisiertem allogenen Spenderknochen konnten keine Unterschiede festgestellt werden. Ebenso fanden sich keine statistisch signifikanten Unterschiede im Zeitverlauf bei den Testansätzen autogen frisch und Kontrolle frisch. Bei den Testansätzen autogen hitzesteril war der 12-Wochen-Wert größer als der 18-Wochen-Wert. Bei den Testansätzen Kontrolle hitzesteril und Spender frisch waren wiederum keine Unterschiede zu den verschiedenen Zeitpunkten festzustellen.

### 6.5.4.2 Vergleich zum Ausgangswert und Vergleich der Ansätze untereinander

Wurden die Meßwerte aus diesen Operationsgruppen nun mit dem Bezugswert 0-Wochen autogen frisch statistisch verglichen, zeigte sich kein Unterschied bei Verwendung von Antigen aus autogen frischem Knochen, hitzesterilisiertem Kontrollknochen und frischem Spenderknochen. Bei Verwendung von Antigen aus frischem Kontrollknochen waren der 9- und 18-Wochen-Wert deutlich größer. Beim Antigen aus autogenem hitzesterilisierten Knochen war der 12-Wochen-Wert größer.



**Abb. 31: LMI, Tx allogen hitzesteril**

Wurde Antigen von hitzesterilisiertem Spenderknochen eingesetzt, waren der 3- und 9-Wochen-Wert statistisch größer als der Bezugswert. Die Datenanalyse der verschiedenen Antigene zum gleichen Zeitpunkt zeigte, dass der 9-Wochen-Meßwert für das Antigen Kontrollknochen hitzesterilisiert kleiner war als der Meßwert für den hitzesterilisierten Spenderknochen zum gleichen Zeitpunkt.

Ein weiterer Unterschied zeigte sich beim 18-Wochen-Zeitpunkt. Hier war der Meßwert für das Antigen autogen hitzesterilisiert kleiner als der für autogen frische Knochen. Weitere signifikante Unterschiede konnten nicht festgestellt werden.

### 6.5.5 Vergleich der Gruppen untereinander

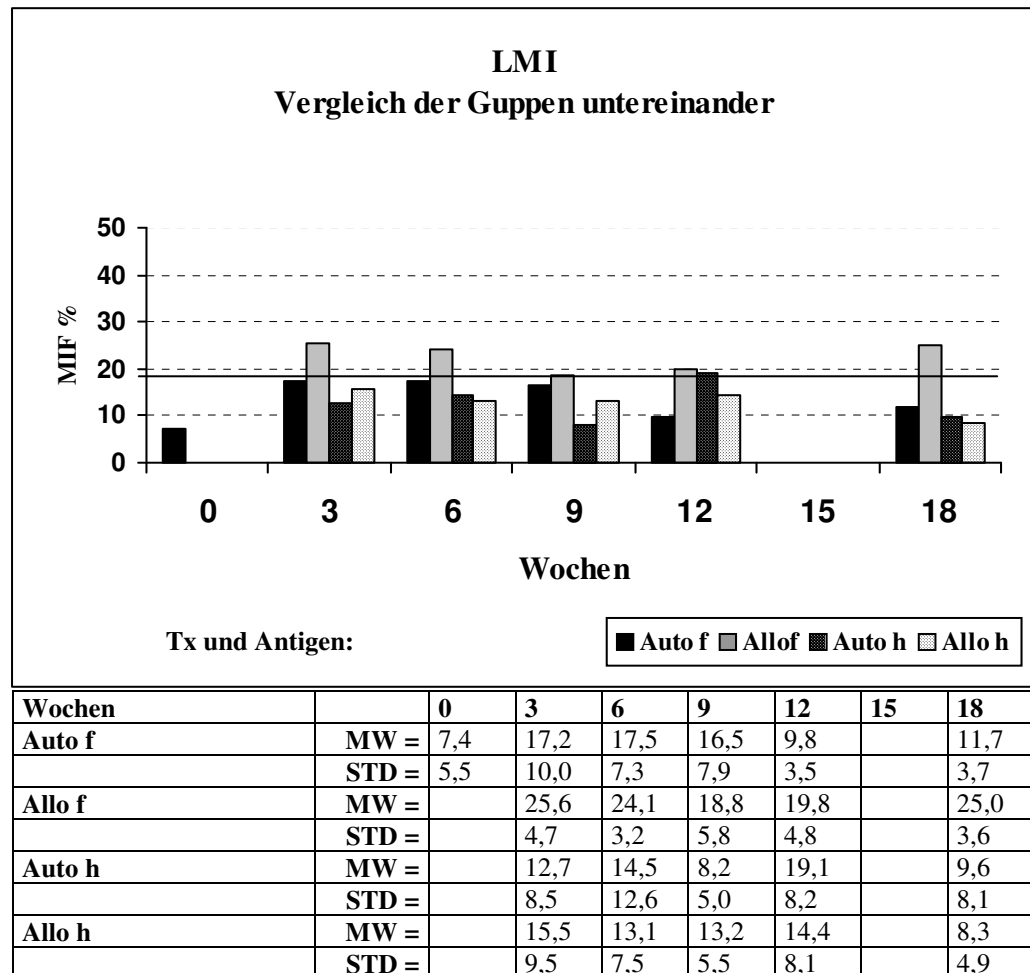


Abb. 32: LMI, Vergleich der Gruppen untereinander

- Reaktion gegen autogen frisches Transplantat:
  - Zeitverlauf: Der 12-Wochen-Wert lag unter dem 3 und 6 Wochen Meßwert.
  - Vergleich zum Ausgangswert: Die 3-, 6- und 9-Wochen-Meßwerte lagen über dem 0-Wochen- Wert.
- Reaktion gegen allogenen frisches Transplantat:
  - Zeitverlauf: Der Meßwert für die Woche 12 war kleiner als die Meßwerte zur Woche 3, 6 und 18.
  - Vergleich zum Ausgangswert: Alle Meßwerte waren größer als der 0-Wochen Wert.
- Reaktion gegen autogen hitzesterilisiertes Transplantat:
  - Zeitverlauf: Der Meßwert für die Woche 12 war größer als der Meßwert für 9 Wochen.
  - Vergleich zum Ausgangswert: Der 12-Wochen-Wert für autogen hitzesterilisierten Knochen war größer.
- Reaktion gegen allogenen hitzesterilisiertes Transplantat:
  - Zeitverlauf: Es fanden sich keine erkennbaren Unterschiede.
  - Vergleich zum Ausgangswert: Der 3-und 9-Wochen-Wert war statistisch signifikant größer als der 0-Wochen-Wert

Vergleich der Gruppen zum gleichen Zeitpunkt.

- Woche 3:
  - Die Reaktion gegen allogenen Frischknochen war größer als gegen autogenen Frischknochen und gegen autogenen hitzesterilisierten Knochen.
- Woche 6:
  - Die Reaktion gegen allogenen frischen Knochen war größer als gegen allogenen hitzesterilisierten Knochen.
- Woche 9:
  - Die Meßwert autogen frisch und allogenen frisch waren größer als autogen hitzesteril.
- Woche 12:
  - Die Meßwerte für allogenen frisch und autogen hitzesteril waren größer als autogen frisch.

- Woche 18:
  - Der Meßwert für allogen frisch war signifikant größer als autogen frisch, autogen hitzesteril und allogen hitzesteril.

Neben den oben angegebenen Unterschieden ließen sich keine weiteren Aussagen mit statistischer Signifikanz ableiten.



## 7 Diskussion

### *7.1 Beurteilung des Transplantationsmodells*

Die Auswahl einer geeigneten Versuchstierspezies wird immer ein Kompromiß zwischen ethischen und finanziellen Überlegungen, sowie der Frage nach der Übertragbarkeit der Ergebnisse auf den Menschen darstellen. Frakturheilung, Einbau von Transplantaten und Reaktionen auf Mediatorstoffe hängen von dem „metabolic activity index“ (MAI) ab. Dieser ist für den Menschen 1.0, für Hunde 1.5, für Affen 1.67, für Ratten 5.15 und für Mäuse 15.6. Nach URIST (1989) ist deshalb das Hundemodell mit einem dem Menschen sehr ähnlichen MAI Faktor am besten für orthopädisch-chirurgische Fragestellungen geeignet. Bei Fragestellungen, die durch Labortests zu beantworten sind, kann aus Zeit- und Kostengründen auf Ratten- und Mausmodelle nicht verzichtet werden. In der vorliegenden Arbeit lag der Schwerpunkt bei den immunologischen Untersuchungen. Das Immunsystem sowie das MHC-System ist bei Ratten und Mäusen hervorragend untersucht, so dass diese Versuchstierarten besonders geeignet sind. Um eine möglichst wirklichkeitsnahe Sensibilisierung zu erreichen wurde bewußt auf intravenöse oder intraperitoneale Sensibilisierung durch Knochenextrakte, sowie auf Immunverstärker wie „complete freund adjuvans“ (CFA) verzichtet. Unter dem gleichen Gesichtspunkt wurde nach einem Operationsmodell gesucht, das eine orthotope Transplantation von einem ausreichend großen Stück Knochen erlaubt. Wegen der zu kleinen Strukturen konnten Mäuse nicht verwendet werden. Ein Kaninchenmodell erschien wegen der höheren Infektanfälligkeit sowie eines relativ „trägen Immunsystems“ (ELVES 1976) weniger geeignet. Wegen der großen Versuchstierzahl mußte ein Operationsmodell gefunden werden, das mit relativ geringem Aufwand eine reproduzierbar stabile Osteosynthese ermöglichte, um bei der Einheilung verschiedener Transplantate möglichst gleiche Bedingungen zu erhalten. Bei der von JAHN (1980) angegebenen Methode der intramedullären Osteosynthese werden Ausfallzahlen von unter 10 % (in der vorliegenden Arbeit 9,3 %) berichtet. Sie ist der von ROGGE et al. (1986) angegebenen Plattenosteosynthese mit Ausfallszahlen bis 30 % überlegen. Abweichend vom JAHN-Modell wurde in dieser Arbeit darauf geachtet, dass die Fibula, wie bei MØLSTER et al. (1982) beschrieben, bei der Operation frakturiert wurde, um

eine Sperrwirkung zu verhindern. Wegen des großen Defektes mit AO-Sägen wurde eine Modellbausäge mit sehr schmalen Sägeblättern verwendet. Durch Kühlung mit Kochsalzlösung beim Sägen wurde versucht, den negativen Effekt der Hitzeentwicklung durch den Sägevorgang (JACOBS und RAY 1972) gering zu halten.

## **7.2 Untersuchte Parameter**

Sämtliche in dieser Arbeit verwendeten Testsysteme können nicht als Testparameter eines alleinigen kausalen Zusammenhangs zwischen Ursache (Transplantation) und Wirkung (Veränderung der Ausgangsbefunde) im Sinne von physikalischen Meßwerten gesehen werden. Das Immunsystem muß als hochkomplexes Wirkgefüge gesehen werden, bei dem nicht erfaßbare Einflüsse zu einer starken Veränderung der Ausgangssituation und somit auch der beobachteten Resultate führen. Konkret können minimale Bißverletzungen, die sich die Versuchstiere gegenseitig beigebracht haben, oder z.B. abklingende banale Infekte zu einer veränderten Reaktionslage des gesamten Organismus führen. Ähnlich ist die Verwendung der komplexen Zusätze wie etwa fötales Kälberserum zu beurteilen, deren Zusammensetzung sicher von Charge zu Charge variiert. Weitere Meßfehler wurden durch verarbeitungsbedingte Schwankungen in der Fertigung selbstgebaute Komponenten (z.B. Füllvolumen der Wanderungskammern) hervorgerufen. Häufig konnten z.B. die mit Leukozyten und Erythrozyten gefüllten Kapillaren nicht in die Wanderungskammern eingeschoben werden, weil deren Außendurchmesser größer war als der Durchmesser der Kapillaren, die zum Bau Wanderungskammern verwendet wurden (neue Charge). Durch Mittelwertbildung (mehrere Tiere pro Versuchsgruppe und Mehrfachansätze bei den Tests) wurde, wo immer möglich versucht, diese Einflüsse zu reduzieren. Trotzdem zeigten die einzelnen Meßwerte selbst bei den „0-Wochen-Beobachtungen“ starke Streuungen, wie sie typischerweise bei Beobachtungen in biologischen Systemen (z.B. Körpergröße) anzutreffen sind. Wegen der relativ geringen Tierzahlen zu den einzelnen Zeitpunkten war zu fast 20% keine Normalverteilung der Daten festzustellen. Die statistische Untersuchung der Parameter erfolgte deshalb verteilungsfrei mit dem U-Test nach WILCOXON, MANN und WITHNEY sowie mit dem WILCOXON-Test. Eine Verbesserung dieser Situation wäre zum einen durch deutlich höhere Tierzahlen zu erreichen, was auf Grund ethischer und finanzieller Überlegungen aber

nicht ohne weiteres möglich ist. Zum anderen wären bessere Testsysteme vonnöten.

Die Methoden zur Beurteilung der Immunologie im Rahmen von Knochen-  
transplantationen sind keinesfalls als sicher anzusehen. Zum einen zeigt sich  
diese Unsicherheit in der Vielfalt der verwendeten Testsysteme (siehe Tabelle  
2 und 3), von denen sich keines eindeutig durchsetzen konnte. Zum anderen  
wird dies durch z.T. widersprüchliche Untersuchungsbefunde mit gleichen  
Testsystemen unterstrichen.

Solange diese Einwände bestehen ist es sicher sinnvoll, die erhobenen immu-  
nologischen Befunde mit histologischen und radiologischen Befunden der  
Knochen-  
transplantateinheilung zu vergleichen, da die Einheilung das wesentli-  
che klinische Korrelat darstellt.

### 7.2.1 Histologie Lymphknoten

BURWELL et al. (1961b; 1962a; 1962b; 1963) beschäftigte sich ausführlich  
mit Reaktionen der regionären Lymphknoten nach heterotoper Knochen-  
transplantation in eine subcutane Tasche am Ohr von Kaninchen. Als Parameter der  
Immunreaktion wurden Gewichtsunterschiede der regionären Lymphknoten  
(rechtes gegen linkes Ohr), sowie das Auftreten von „large lymphoid cells“ und  
„medium size lymphoid cells“ im Rindenbereich der Lymphknoten ausgewer-  
tet. BURWELL und GOWLAND (1962a) konnte signifikante Reaktionsunter-  
schiede sowohl im Gewicht als auch in der Zellverteilung für verschiedene  
Knochen-  
transplantate und Knochenpräparationen nachweisen. Bei den eigenen  
Voruntersuchungen (15 Tiere zum Erlernen der Operationstechnik siehe 5.1)  
zeigten sich bereits sehr große Schwankungen im Gewicht der regionären  
Lymphknoten (Mittelwert 21,46 mg, Standardabweichung 9,17 mg). Eine  
Auswertung hinsichtlich der immunologischen Fragestellung erschien deshalb  
nicht sinnvoll. Als wertvoller ergänzender Meßwert erwies sich hingegen die  
Bestimmung des Lymphknotengewichts bei der Beurteilung von infizierten  
Osteosynthesen. Dabei wurden Lymphknotengewichte bis 175 mg gemessen.  
Mit den verfügbaren histologischen Methoden konnte eine grobe, regionale  
Einteilung in B- und T-Zell betonte Reaktionen durchgeführt werden. Des wei-  
teren war die Bestimmung der Follikelzahl (BURWELL 1961b) als Hinweis  
auf einen regional ablaufenden Immunprozeß möglich. Wünschenswerte, spe-  
zielle Untersuchungsmethoden wie etwa Immunhistologie oder Histomorpho-

metrie hätten sicher differenziertere Aussagen ermöglicht, standen aber nicht zur Verfügung. Die hier durchgeführte Bestimmung der Sekundärfollikel ist somit lediglich als „Screening-Methode“ zu betrachten.

In der vorliegenden Arbeit zeigte sich nach Transplantation von autogen frischem Knochen keine Vermehrung der Sekundärfollikel im Zeitverlauf. Lediglich zum Zeitpunkt 6 Wochen war die Summe der Sekundärfollikel deutlich erniedrigt. BURWELL und GOWLAND (1960) beschrieben eine Vermehrung des Lymphknotengewichtes nach Transplantation von autogen frischer Spongiosa mit einem Maximum am Tag 8 nach Transplantation im Sinne eines Operationseffektes. Da in dieser Arbeit der früheste Untersuchungstermin bei 21 Tagen festgelegt war konnte dieser Effekt nicht erfaßt werden. Im weiteren Zeitverlauf wird dort ein Absinken des Lymphknotengewichts unter das Ausgangsgewicht am Tag 21 beschrieben, die Anzahl N der Tiere zu diesem Untersuchungszeitraum beträgt allerdings nur 1.

SCHRATT (1990) beschreibt in seiner Arbeit bei identischem Tx-Modell und gleicher Untersuchungstechnik für die Lymphknoten eine Vermehrung der Sekundärfollikel zum Zeitpunkt 3 und 6 Wochen. Aussagen zur statistischen Signifikanz werden jedoch nicht gemacht. Im weiteren Zeitverlauf zeigte sich dort ebenfalls keine Vermehrung der Sekundärfollikel.

Nach Transplantation von allogenen frischem Knochen zeigt sich in der vorliegenden Arbeit eine Vermehrung der Sekundärfollikel zum Zeitpunkt 3, 6, 9 und 12 Wochen mit einem Maximum zur Woche 6. BURWELL (1960) beschreibt eine Zunahme des Lymphknotengewichtes nach Transplantation von allogener Spongiosa mit einem Maximum zum Zeitpunkt 8 und 14 Tage nach Tx. Zum Zeitpunkt 5 und 8 Tage nach Transplantation von kortikalem allogenen Knochen beschreiben BURWELL et al. (1963) eine Zunahme des Lymphknotengewichts, allerdings weniger ausgeprägt als nach Transplantation von allogener Spongiosa.

In der Arbeit von SCHRATT (1990) wird wiederum eine Zunahme der Sekundärfollikel nach Transplantation von allogener Kortikalis zur 3. und 6. Woche beschrieben, allerdings ohne Angabe zur Statistik.

Nach Transplantation von autogen hitzesterilisierter Kortikalis zeigt sich in dieser Arbeit keine Vermehrung der Sekundärfollikel. Nach Transplantation von hitzesterilisierter allogener Kortikalis zeigt sich eine erhöhte Zahl von Se-

kundärfollikeln zum Zeitpunkt 3 Wochen. Die Meßwerte zum Zeitpunkt 12 und 18 Wochen sind kleiner als der zur Woche 3, unterscheiden sich jedoch nicht in bezug auf den Ausgangswert (0 Wochen autogen frisch). BURWELL (1963) konnte nach Vorsensibilisierung und Transplantation von gekochter allogener Spongiosa (second set) keine Erhöhung des Lymphknotengewichts feststellen. Zusammenfassend läßt sich feststellen, dass in Übereinstimmung mit Untersuchungen in anderer Technik und von anderen Autoren eine Lymphknotenreaktion nach Transplantation von allogener Kortikalis nachweisbar ist. Diese Reaktion ist nach Transplantation von autogener Kortikalis und autogener hitzesterilisierter Kortikalis nicht nachweisbar. Nach Transplantation von allogener hitzesterilisierter Kortikalis findet sich eine Reaktion zum Zeitpunkt 3 Wochen. Diese ist ebenso wenig schlüssig zu interpretieren wie der Abfall der Reaktivität nach Transplantation von autogen frischer Kortikalis zum Zeitpunkt 6 Wochen.

### 7.2.2 Histologie Milz

Ähnliche methodische Einschränkungen gelten sicher auch für die hier durchgeführte Untersuchung der Milz. Durch viel Improvisation konnte eine histomorphometrische Auswertung mit relativ einfachen Mitteln durchgeführt werden. Grundlage dafür war die von NAGY und FEHR (1972) und FEHER und NAGY (1972) beschriebene Vermehrung der weißen Pulpa im Vergleich zum restlichen Milzgewebe bei Hühnern nach intraperitonealer und subcutaner Verabreichung einer Rinderalbuminfraktion. Wie auch bei der Untersuchung der Lymphknoten hätten neuere immunhistochemische Färbemethoden (standen nicht zur Verfügung) genauere Aufschlüsse über die topographische Zuordnung der B- und T-Zell-Verteilung und über die dort ablaufende Immunreaktion zugelassen (GROGAN et al.1983). Im Gegensatz zu den Beobachtungen bei den Lymphknoten zeigten die Meßwerte bei den Milzen sowohl bei den Ausgangswerten als auch bei den verschiedenen Meßzeitpunkten eine deutlich geringere Streuung. Bei allen vier Untersuchungsgruppen fand sich eine Vermehrung der weißen Pulpa zur 3. Woche. Dieser Befund ist am ehesten als Operationseffekt zu interpretieren. Eine Vergrößerung der Fläche der weißen Pulpa war bei der Versuchsgruppe mit autogen frischen Transplantaten über den gesamten Versuchszeitraum zu beobachten. Diese Befunde finden sich in gleicher Form in der Arbeit von SCHRATT (1990), der neben

autogen und allogen frischen Transplantaten autogen und allogen kältekonservierte Transplantate mit gleicher Technik und gleichem Versuchsaufbau untersuchte. Im weiteren Zeitverlauf war im Vergleich zum Ausgangswert (0 Wochen autogen frisch) und beim Vergleich der Operationsgruppen untereinander kein Unterschied festzustellen. Eine Ausnahme bildeten die Meßwerte allogen frisch 12 Wochen und autogen hitzesteril 9 Wochen, die niedriger lagen. Zusammenfassend läßt sich festhalten, dass es nach Transplantation von autogen frischer Kortikalis zu einer Vermehrung der weißen Pulpa in der Milz über den gesamten Versuchszeitraum kommt. Nach Transplantation von allogen frischer-, autogen hitzesteriler- und allogen hitzesteriler Kortikalis sind mit den oben dargestellten Ausnahmen keine signifikanten Unterschiede zum Ausgangswert festzustellen. NAGY und FEHR (1972) beschreiben eine maximale Zunahme der Fläche von MALPIGHIschen Körpern, die T-Lymphozyten enthalten, 4 Tage nach Antigenapplikation und die maximale Zunahme der Fläche von Follikeln die B-Lymphozyten enthalten 11 Tage nach Antigenapplikation (gleichzeitig intraperitoneal und subcutan). Diese frühe Reaktion war in dieser Arbeit nicht zu erwarten, da die Sensibilisierung nicht in gleicher optimaler Weise durchgeführt wurde. BURWELL und GOWLAND (1961b) konnten nach Transplantation von autogener und allogener Spongiosa bei Kaninchen keine Gewichtsunterschiede bei der Messung von Milzgewichten feststellen.

### 7.2.3 Ringpräzipitationstest

Zur Messung humoraler Immunphänomene werden verschiedene Testmethoden, die auf dem Nachweis von Antikörpern basieren, verwendet. Sie unterscheiden sich wesentlich in ihrer Sensitivität. Vom Institut für Mikrobiologie an der Ludwig Maximilians Universität in München wurden folgende Grenzwerte angegeben:<sup>26</sup>

---

<sup>26</sup> Kursunterlagen für das Praktikum der Mikrobiologie, Winterhalbjahr 1987/88, 4. Praktikum Institut für Mikrobiologie Ludwig Maximilians Universität München

**Tab. 8: Nachweisgrenze humoraler Tests**

Technik	Nachweisgrenze	Dimension
Doppeldiffusion nach Ouchterlony	6-35	µg/ml
Röhrchenpräzipitation (Ringtest)	3-5	µg/ml
Immunfluoreszenztest	1	µg/ml
Komplementbindungs-Reaktion	0,05-0,1	µg/ml
Passive Hämagglutination	0,001	µg/ml
Enzym-Immunoassay	0,001	µg/ml
Radio-Immunoassay	0,0001	µg/ml

Die oben angegebenen Testmethoden konnten bisher methodisch bei der Knochen transplantation noch nicht eingesetzt werden. Das Hauptproblem dabei stellt die Herstellung eines wässrigen Antigenextrakts dar. Beim vielfach verwendeten humoralen Zytotoxizitätstest (siehe 4.4) werden Spenderlymphozyten als Targetzellen verwendet. Der testtheoretische Ansatz setzt voraus, dass die Antigene der Targetzellen mit den Antigenen des Spendergewebes identisch sind. Wenn auch große Übereinstimmungen mit den Oberflächenantigenen z.B. MHC-Antigenen der Zellen bestehen, werden andere Antigene wie etwa „tissue-specific antigens“, wie sie MILGROM et al. (1965) nachgewiesen hat, nicht berücksichtigt. Der Knochen ist jedoch ein Gewebe, bei dem zellfreie organischer und anorganischer Substanzen überwiegen. Es ist deshalb sicher sinnvoll, ein Testsystem zu wählen, das durch Einsatz eines Gewebeextraktes gewährleistet, dass nicht nur die Antigene die von Zellen stammen, sondern auch Antigene von Makromolekülen im Test mit berücksichtigt werden. Bei dem hier verwendeten Testsystem wurde durch die 3-M-KCl Methode (Werner 1984) ein solcher wässriger Gewebeextrakt hergestellt. Wie oben dargestellt ist der verwendete Kapillarpräzipitationstest nicht sehr empfindlich, hatte aber den Vorteil, dass Gewebeextrakte verwendet werden konnten. Eine Anpassung der wesentlich empfindlicheren Nachweismethoden (Enzym-Immunoassay, Radio-Immunoassay...) für das spezielle Problem der Knochen transplantation ist deshalb für die zukünftige Forschung auf diesem Gebiet dringend erforderlich.

Die hier durchgeführten Untersuchungen mit dem Ringpräzipitationstest waren dadurch gekennzeichnet, dass sowohl bei den eigentlichen Testantigenen als

auch bei den Kontrollansätzen starke Schwankungen in der Reaktivität auftraten.

Nach Autotransplantation von frischer Kortikalis war nur zum Zeitpunkt 6 Wochen einmalig eine Ringpräzipitation sowohl bei Verwendung von Extrakt aus autogen frischem Knochen als auch bei Verwendung von Extrakt aus frischem Kontrollknochen festzustellen. Nach Transplantation von allogenen frischer Kortikalis lassen sich im Zeitintervall 6 bis 12 Wochen Präzipitationsreaktionen gegen das Transplantat in 28,5 – 60,0 % der Untersuchungen nachweisen. Gleichzeitig kommt es im selben Zeitintervall sowohl zur Bildung von präzipitierenden Antikörpern gegen den eigenen Knochen als auch zu Reaktionen gegen einen Kontrollknochen. Diese Befunde bestätigen mit Abweichungen in den Prozentzahlen die Ergebnisse von SCHRATT (1990).

Nach Transplantation von autogener hitzesterilisierter Kortikalis finden sich positive Reaktionen gegen das Transplantat zum Zeitpunkt 3, 9, 12 und 18 Wochen in 14,2 - 57,1 % der Fälle. Gleichzeitig finden sich aber auch Reaktionen gegen die mitgeführten Kontrolleextrakte autogen frisch, Kontrolle frisch und Kontrolle hitzesteril. Nach Transplantation von allogenen hitzesterilisierter Kortikalis lassen sich Reaktionen gegen das Transplantat zu den Zeitpunkten 3, 6, 12 und 18 Wochen mit 11,1 - 44,4 % nachweisen. Auch in dieser Versuchsgruppe finden sich Reaktionen bei den Kontrolleextrakten autogen frisch, Kontrolle frisch, Spender frisch, autogen hitzesteril und Kontrolle hitzesteril in verschiedener Häufigkeit. Eine eindeutige Interpretation dieser Befunde ist schwer möglich. Zusammenfassend läßt sich jedoch festhalten, dass nach Transplantation von autogen frischer Kortikalis nur bei 2 von 50 Tieren Präzipitationsreaktionen gegen das Transplantat bzw. einen Kontrollknochen im Zeitverlauf nachweisbar sind. Dies spricht dafür, dass durch die Transplantation kaum die Bildung von präzipitierenden Antikörpern induziert wird. Nach Transplantation von allogenen frischer-, autogen hitzesterilisierter- und allogenen hitzesterilisierter Kortikalis lassen sich im Zeitverlauf des Versuchs Ringpräzipitate sowohl gegen das Transplantat als auch gegen diverse Kontrollknochen in verschiedener Häufigkeit nachweisen. Das spricht dafür, dass durch die Transplantation die Bildung von präzipitierenden Antikörpern verschiedener Spezifität induziert wird. BONFIGLIO und JETER (1972) konnten bei Versuchen mit Kaninchen (Natriumchloridextrakte aus gepoolter Spenderkortikalis



-70<sup>0</sup> C und gepoolte Seren von first- und secondset transplantierten Tieren) keine Präzipitationen in der Interface- oder Gelpräzipitationstechnik nachweisen. BURWELL und GOWLAND (1961) konnten ebenfalls (Natriumchloridextrakte von Kaninchenspongiosa gekühlt) weder in der Agar-Plattentechnik, Agar-Säulentchnik, noch in der Kapillartechnik präzipitierende Antikörper nachweisen. Diese gegensätzlichen Befunde sind möglicherweise durch die unterschiedliche Technik der Extrakterstellung zu erklären. Eine Kontamination der Antigenpräparationen mit einem Antigen gegen das die meisten Tiere sensibilisiert sind (z.B. Schimmelpilzarten) wäre theoretisch denkbar und würde die vielen positiven Präzipitationsergebnisse in der vorliegenden Arbeit erklären. Gegen diese Theorie spricht jedoch sehr stark, dass dann nur die Antigenextrakte, die bei den Tieren nach autogen frischer Transplantation verwendet wurden, nicht kontaminiert waren.

#### 7.2.4 Leukozyten-Migrations-Inhibitions-Test

Die gleichen Einschränkungen in bezug auf das Testantigen, wie sie oben für den humoralen Zytotoxizitätstest beschrieben wurden, gelten auch für den z.B. von BOS et al. (1983) oder FRIEDLAENDER et al. (1976) eingesetzten zellulären Zytotoxizitätstest oder den z.B. von MUSCOLO et al. (1976) eingesetzten MLC-Test. Bei beiden wird wiederum die Gleichheit der Antigene von Targetzellen (Spenderlymphozyten) und Spenderorgan vorausgesetzt. Im Gegensatz zu diesen Testsystemen ermöglicht der LMI-Test neben dem Einsatz von Lymphozyten (FALK et al. 1970) auch die Verwendung von Antigenextrakten (BODIE et al.1975), Homogenisaten (BENDIXON 1967), sowie korpuskulären Antigenen (READ und ZABRISKIE 1972). BENDIXON et al. (1972) halten die korpuskulären Antigene generell sogar besser dafür geeignet, eine spezifische Migrationshemmung zu induzieren. Somit war es möglich, bei diesem Test den Knochen selbst als Antigen einzusetzen. Bei den Untersuchungen mit dem LMI-Test zeigten sich ebenfalls in bezug auf den jeweiligen Mittelwert sehr hohe Standardabweichungen, die natürlich die Aussagen auch in diesem Testsystem einschränken. BERGSTRAND und KÄLLEN (1973) untersuchten mit statistischen Methoden die Einflüsse verschiedener Größen beim Migrations-Inhibitions-Test. Von vielen Autoren wird bei diesem Test eine große Variabilität der Ergebnisse bei identischem Vorgehen beschrieben. Insbesondere tragen demnach z.B. individuelle Eigenschaften der Tiere, wech-

selnde Chargen bei den verwendeten Medien und Fläche des Wanderungshofes im Medium ohne Testantigen zur großen Variabilität der Testergebnisse bei. Zusätzlich sind beim Migrations-Inhibitions-Test in seltenen Fällen bei einzelnen Tests Situationen beschrieben, in denen es statt zur Wanderungshemmung wie bei anderen Tieren zur Wanderungsbeschleunigung kommt (SOBORG 1968). Diese Phänomene sind wahrscheinlich auf blockierende Antikörper (LANGER et al.1975, BERNSTEIN und WRIGHT 1971), die während der Immunreaktion im eigenen Serum gebildet werden, zurückzuführen. Diese Phänomene waren bei den vorliegenden Untersuchungen auch gelegentlich festzustellen und trugen deutlich zur hohen Standardabweichung bei. Diesen Schwachpunkt könnte man durch Verwendung von mehrfach gewaschenen Leukozyten, wie sie bei vielen anderen LMI- Varianten von verschiedenen Autoren beschrieben werden, deutlich verbessern. In der vorliegenden Arbeit konnte wegen der oben beschriebenen vielfachen Einflußmöglichkeiten bereits bei der Berechnung des „Normalwertes“ (Mittelwert Tx autogen frisch, Ansatz autogen frisch + 2 x Standardabweichung) bei identischer Arbeitsweise keine Übereinstimmung mit dem Wert von SCHRATT (1990) festgestellt werden.

**Tab. 9: LMI „Normalwert“ verschiedener Autoren**

	Mittelwert +	2 X STD	=
Eigene Arbeit	7,4	11,0	18,4
SCHRATT (1990)	5,0	4,9	9,9
ELVES (1978)	4,4	15,4	19,8

In der grundlegenden Literatur über den Migrations-Inhibitions-Test, z.B. FRIEMEL (1984), werden Streuungen der Ergebnisse um 10 % angegeben. Migrationsindizes nach der unten angegebenen Formel werden unter 0,80 (und über 1,20 bei beschleunigter Wanderung) als positiv angesehen.

$$\text{Migrationsindex} = \frac{\text{Wanderung mit Antigen}}{\text{Wanderung ohne Antigen}};$$

**Gleichung 6: Berechnung des Migrationsindex MI**

Vergleicht man nun diese Werte mit den Werten aus der vorliegenden Arbeit, so ergibt sich eine recht gute Übereinstimmung aus der Umformulierung der Berechnung des „Normwertes“ (siehe Gleichung 1) mit der Grenze von 0,816 als Migrationsindex MI in dieser Arbeit.

$$\text{MIF} = 100\% - \frac{\text{Wanderungsstrecke mit Antigen}}{\text{Wanderungsstrecke ohne Antigen}} * 100;$$

Nach Umstellung:

$$\text{MI} = \frac{\text{Wanderungsstrecke mit Antigen}}{\text{Wanderungsstrecke ohne Antigen}} = \frac{100\% - \text{MIF}}{100};$$

**Mit MIF = 18,4** für Tx autogen frisch, LMI-Ansatz autogen frisch

$$(\text{Mittelwert} = 7,4 + 2 \times \text{STD} = 11,0)$$

$$\text{MI} = \frac{\text{Wanderungsstrecke mit Antigen}}{\text{Wanderungsstrecke ohne Antigen}} = \frac{100\% - 18,4\%}{100};$$

$$\text{MI} = 0,816;$$

Nach Transplantation von autogen frischem Knochen zeigt sich im Zeitverlauf eine deutliche Reaktion im LMI-Test zu den Zeitpunkten 3, 6 und 9 Wochen mit einer tendenziellen Abnahme der Reaktion zum Ende der Versuchsdauer. Ein ähnliches Verhalten ist zu den Zeitpunkten 3, 6 und 18 Wochen auch bei den Meßwerten für den frischen Kontrollknochen festzustellen. Trotz unterschiedlicher Ergebnisse in der Berechnung des „Normwertes“ sind diese Resultate in vergleichbarer Weise in der Arbeit von SCHRATT (1990) zu finden. Nach Transplantation von allogenen frischer Kortikalis fanden sich zu allen Meßzeitpunkten Reaktionen in Sinne einer Immunreaktion gegen das Transplantat mit einem Maximum zur Woche 3, gefolgt von einem geringen Abfall zur Woche 9 und einem erneuten Anstieg der Reaktivität zur Woche 18. Diese Ergebnisse werden durch die Arbeit von SCHRATT (1990) erneut bei ganz ähnlichem Meßwertverlauf bestätigt. Bei LANGER et al. (1975) findet sich,

bei etwas anderer Arbeitstechnik (Leukozyten gewonnen aus der Milz, kortikospongiöser Span heterotop), ebenfalls ein zweigipfeliges Geschehen mit Maxima zur Woche 2 und 12. Die mitgeführten Kontrollen (Kontrolle frisch, autogen frisch) ergaben ebenfalls positive Resultate. Zu den Meßzeitpunkten 3 und 6 Wochen lag der Meßwert für den frischen Spenderknochen über dem für den Kontrollknochen. Nach Transplantation von autogen hitzesterilisiertem Knochen war lediglich zum Meßzeitpunkt 12 Wochen eine positive Reaktion sowohl gegen das Transplantat, als auch gegen den eigenen frischen Knochen festzustellen. Nach Transplantation von allogenen hitzesterilisiertem Knochen fanden sich Reaktionen gegen das Transplantat zu den Meßzeitpunkten 3 und 9 Wochen. Von den mitgeführten Kontrollen waren die Reaktionen gegen autogen frischen, hitzesterilisierten Kontrollknochen und frischen Spenderknochen über den gesamten Versuchszeitraum nicht signifikant.

Signifikante Reaktionen waren bei den Antigenpräparationen von frischem Kontrollknochen (9 und 18 Wochen) sowie von autogen hitzesterilisiertem Knochen (12 Wochen) festzustellen. Zusammenfassend läßt sich festhalten, dass in Übereinstimmung mit der Arbeit von SCHRATT (1990) sowohl nach Transplantation von autogen frischer, als auch nach Transplantation von allogenen frischer Kortikalis signifikante Reaktionen im LMI-Test nachzuweisen sind. Zu den Meßzeitpunkten 3, 12 und 18 Wochen liegen die Meßwerte nach Transplantation von allogenen frischer Kortikalis über den Meßwerten nach Transplantation von autogen frischer Kortikalis, zum Meßzeitpunkt 6 Wochen ist dieser Unterschied nur knapp nicht signifikant, so dass davon ausgegangen werden kann, dass nach Transplantation von allogenen frischer Kortikalis die Reaktion im LMI-Test deutlich kräftiger ausfällt. Im Gegensatz zu den Befunden nach Transplantation von autogenem bzw. allogenen frischen Knochen finden sich nach Transplantation von autogenem bzw. allogenen hitzesterilisierten Knochen deutlich weniger positive Befunde gegen das eigentliche Transplantat im LMI-Test. Von den mitgeführten Kontrollen waren nach Transplantation autogen hitzesterilisierte Kortikalis 1 von 15 Kontrollen positiv (12 Wochen autogen frisch). Nach Transplantation von allogenen hitzesterilisierte Kortikalis waren 5 von 25 Kontrollansätzen positiv.

## 8 Beantwortung der Fragestellung

- a) Finden sich nach Transplantation von hitzesterilisierter Kortikalis Hinweise für Immunreaktionen im Bereich der Sammellymphknoten als Ausdruck einer lokalen Reaktion ?

Nach Transplantation von allogenen frischer Kortikalis fand sich zu den Zeitpunkten 3, 6, 9 und 12 Wochen eine Vermehrung der Summe der Sekundärfollikel, so dass von einer lokal ablaufenden Immunreaktion ausgegangen werden kann. Nach Transplantation von autogen frischer, autogen hitzesterilisierter und allogenen hitzesterilisierter Kortikalis findet sich im Bereich der Sammellymphknoten keine Vermehrung der Sekundärfollikel im Vergleich zum Bezugswert im Sinne einer lokal ablaufenden Immunreaktion. Ausnahmen bilden der 3-Wochen-Wert nach Transplantation von allogenen hitzesterilisierter Kortikalis, wo eine signifikante Vermehrung der Summe der Sekundärfollikel festzustellen war, sowie der Zeitpunkt 6 Wochen nach Transplantation von autogen frischer Kortikalis, wo die Summe der Sekundärfollikel signifikant kleiner gefunden wurde.

- b) Finden sich histologische Veränderungen in der Milz als Hinweis für eine generelle Aktivierung des Immunsystems ?

Bei allen vier Versuchsgruppen zeigte sich eine signifikante Vermehrung der weißen Pulpa im Sinne eines Operationseffektes zum Zeitpunkt 3 Wochen. Nach Transplantation von autogen frischer Kortikalis blieb die Vermehrung der weißen Pulpa über den gesamten Versuchszeitraum im Sinne einer Aktivierung des Immunsystems erhalten. Bei den Versuchsgruppen allogenen frisch, autogen hitzesteril und allogenen hitzesteril war außer dem oben geschilderten Operationseffekt keine Vermehrung der weißen Milzpulpa im Sinne einer Aktivierung des Immunsystems über den gesamten Versuchszeitraum festzustellen.

Nach Transplantation von allogenen frischer Kortikalis war der 12-Wochen-Wert, nach Transplantation von autogen hitzesterilisierter Kortikalis der Wert zur Woche 9 signifikant kleiner als der Bezugswert mit autogen frischer Kortikalis.

c) Lassen sich humorale Immunreaktionen nachweisen ?

Nach Transplantation von autogen frischer Kortikalis fand sich nur einmalig eine positive Reaktion im Ringpräzipitationstest gegen den eigenen frischen Knochen (Transplantat), sowie gegen einen frischen Kontrollknochen, so dass die Bildung von präzipitierenden Antikörpern nach Transplantation von autogen frischer Kortikalis als seltenes Ereignis anzusehen ist. Nach Transplantation von allogenen frischer, autogen hitzesterilisierter und allogenen hitzesterilisierter Kortikalis sind in bis zu maximal 60% präzipitierende Antikörper gegen das Transplantat nachweisbar. Dabei waren hohe Prozentzahlen für positive Tests vor allem zum Zeitpunkt 12 Wochen festzustellen. Gleichzeitig lassen sich bei diesen Versuchsgruppen präzipitierende Antikörper gegen nahezu alle mitgeführten Kontrollantigene nachweisen. Eine zeitliche Häufung des Auftretens dieser Antikörper ist zu keinem Zeitpunkt festzustellen.

d) Lassen sich zelluläre Immunreaktionen nachweisen ?

Nach Transplantation von autogen frischer Kortikalis lassen sich zu den Zeitpunkten 3, 6, und 9 Wochen signifikante Wanderungshemmungen im Sinne einer zellulären Sensibilisierung feststellen. Zu den Zeitpunkten 3, 6, und 18 Wochen finden sich auch signifikante Wanderungshemmungen bei Verwendung von frischem Kontrollknochen als Antigen. Nach Transplantation von allogenen frischem Knochen sind die LMI-Tests über den gesamten Versuchszeitraum im Sinne einer zellulären Sensibilisierung positiv. Es zeichnet sich ein zweigipfeliges Geschehen ab (3 und 18 Wochen). Ebenfalls über den gesamten Versuchszeitraum fanden sich positive LMI-Befunde für die mitgeführten Kontrollen (autogen frisch und Kontrolle frisch). Dabei lagen die Meßwerte für das Transplantat zu den Zeitpunkten 3 und 6 Wochen signifikant über den Meßwerten für die Kontrollen.

Zu den Meßzeitpunkten 3, 12, und 18 Wochen lagen die Meßwerte für allogene frische Transplantate signifikant über den Meßwerten für autogene frische Transplantate. Zum Zeitpunkt 6 Wochen wurde das Signifikanzniveau nur knapp nicht erreicht, so dass von einer deutlich stärkeren Sensibilisierung nach Transplantation von allogenen frischem Knochen auszugehen ist.

Nach Transplantation von autogen hitzesterilisierter Kortikalis fand sich im LMI-Test lediglich zum Zeitpunkt 12 Wochen, nach Transplantation von allo-gen hitzesterilisierter Kortikalis lediglich zum Zeitpunkt 3 und 9 Wochen, ein positiver Befund im Sinne einer Sensibilisierung. Deshalb kann davon ausgegangen werden, dass der hitzesterilisierte Knochen in diesem Test weniger immunogen ist. Auch bei den jeweils mitgeführten Kontrollen bestätigte sich dieser Effekt durch deutlich weniger positive Befunde.

e) Welche Schlüsse lassen sich daraus für den klinischen Einsatz hitzesterilisierten kortikalen Knochentransplantaten ziehen ?

Aus den oben dargestellten Befunden ergibt sich, dass hitzesterilisierte Kortikalis (unabhängig davon ob autogen oder allo-gen) im Vergleich zu allo-gen frischer Kortikalis sowohl bei der Untersuchung der Lymphknoten, als auch beim LMI-Test deutlich schwächer immunogen ist.

Bei der Untersuchung auf präzipitierende Antikörper konnten nach Transplantation von autogen frischer Kortikalis nur selten Präzipitationsreaktionen nachgewiesen werden. Häufiger fanden sich Präzipitationsreaktionen nach Transplantation von allo-gen frischer, autogen oder allo-gen hitzesterilisierte Kortikalis, wobei sich kaum Unterschiede zwischen allo-gen frisch, autogen und allo-gen dampfsterilisierter Kortikalis nachweisen ließen.

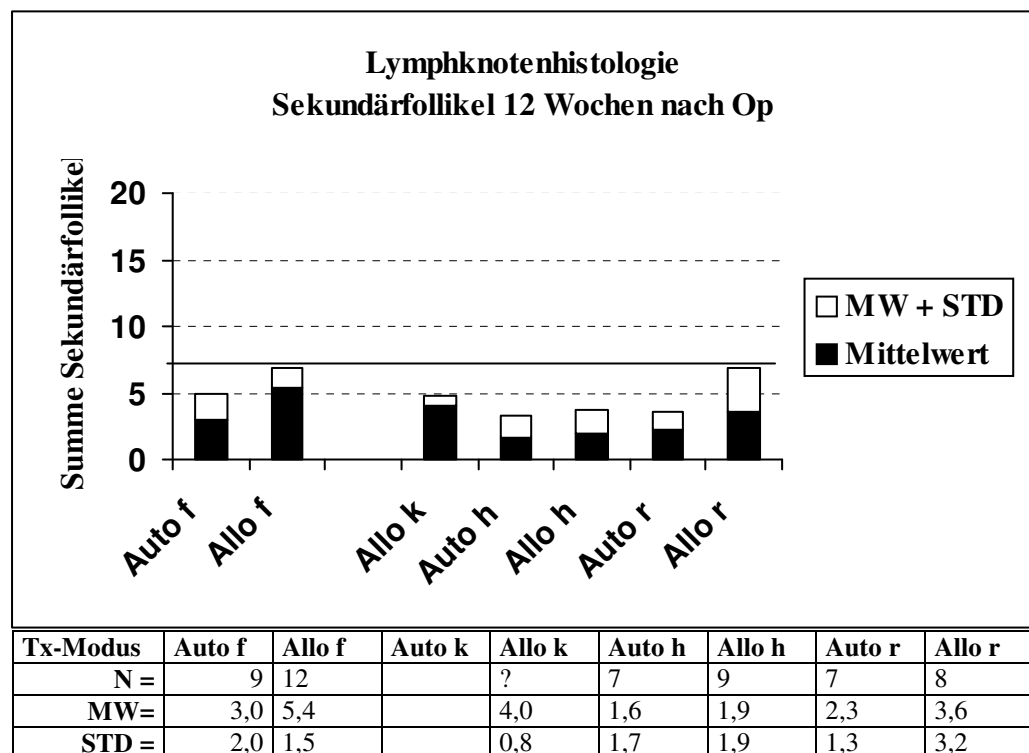
Ebenso war die Vermehrung der weißen Pulpa bei der Untersuchung der Milzen für allo-gen frische-, autogen- und allo-gen hitzesterilisierte Transplantate in etwa gleich.

Aus den oben Dargestellten immunologischen Untersuchungsergebnissen sollte sich ein günstigeres Einheilungsverhalten für hitzesterilisierte Transplantate im Vergleich zu allo-gen frischen Transplantaten ableiten lassen.

BARCA (1998) stellte für die hitzesterilisierten Transplantate jedoch ein deutlich schlechteres Einheilungsverhalten im Vergleich zu allo-gen frischen Transplantaten in histologischen und radiologischen Untersuchungen feststellen.

Dieser Widerspruch und die Beurteilung der klinischen Wertigkeit soll durch weitere experimentellen Befunde zu Transplantationsversuchen mit verschiedenen behandelten Rattenkortikalis im Folgenden kritisch beleuchtet werden.

Bei den vorgestellten Untersuchungen wurden jeweils das gleiche Tiermodell, sowie die gleichen Untersuchungstechniken benutzt. Da die Daten nicht vollständig zu jedem Zeitpunkt vorliegen, wurden die Ergebnisse für den Zeitpunkt 12 Wochen dargestellt. Bei der Darstellung von „Mittelwert + 2 STD“ (horizontale Linie) als Grenzen, wurden jeweils die in den eigenen Untersuchungen gewonnenen Daten verwendet (siehe auch 7.2.4 Tabelle 9)

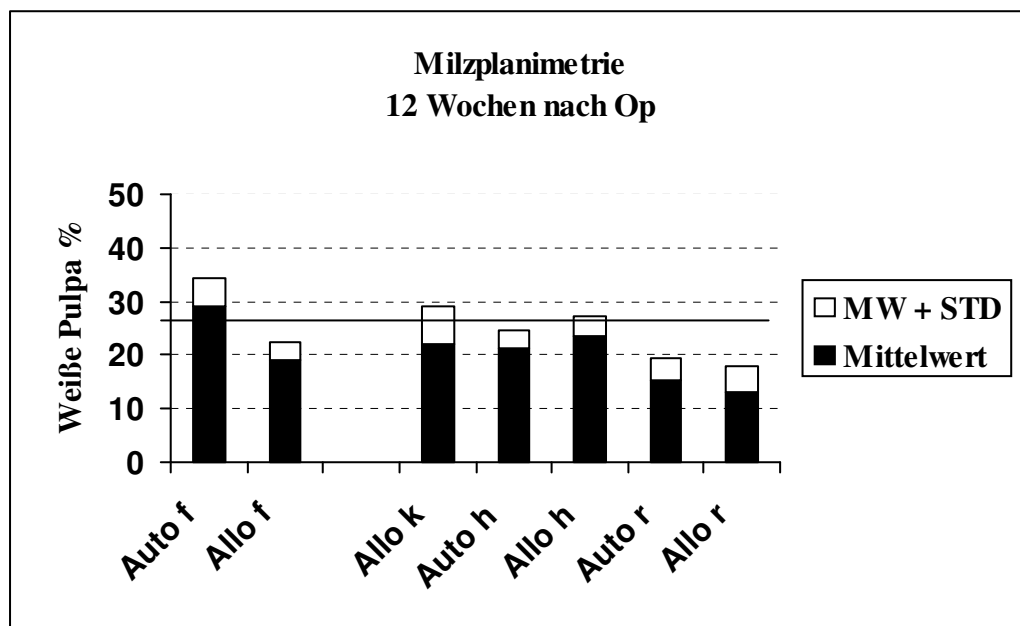


Allo k: Allogen kältekonserviert ( -70°C) Werte von SCHRATT (1990) übernommen  
 Auto r: Autogen strahlensterilisiert (25 kGy) Werte von BARCA (1998) übernommen  
 Allo r: Allogen strahlensterilisiert ( 25 kGy) Werte von BARCA (1998) übernommen

**Abb. 33: Lymphknotenhistologie, 12 Wochen nach Op bei unterschiedlichem Transplantationsmodus**

Nach Transplantation von allogen frischem Knochen ist die Summe der Sekundärfollikel nach 12 Wochen Versuchsdauer am größten. Bemerkenswert hoch liegt auch der Meßwert für den allogen kältekonservierten Knochen. Die Mittelwerte überschreiten jedoch nicht den Normwert (autogen frisch 0-Wochen + 2 STD)



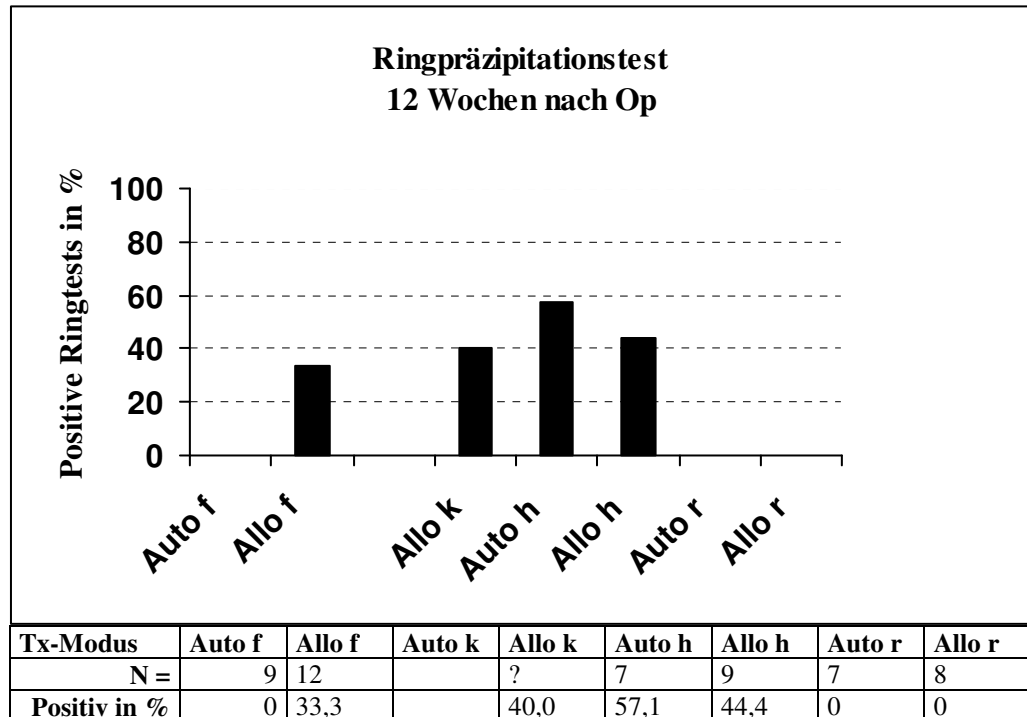


Tx-Modus	Auto f	Allo f	Auto k	Allo k	Auto h	Allo h	Auto r	Allo r
N =	9	12		?	7	9	7	8
MW =	29,2	18,9		22,2	21,1	23,5	15,3	12,9
STD =	5,2	3,5		6,9	3,7	3,8	4,2	4,9

Allo k: Allogen kältekonserviert (-70°C) Werte von SCHRATT (1990) übernommen  
 Auto r: Autogen strahlensterilisiert (25 kGy) Werte von BARCA (1998) übernommen  
 Allo r: Allogen strahlensterilisiert (25 kGy) Werte von BARCA (1998) übernommen

**Abb. 34: Milzplanimetrie, 12 Wochen nach Op bei unterschiedlichem Transplantationsmodus**

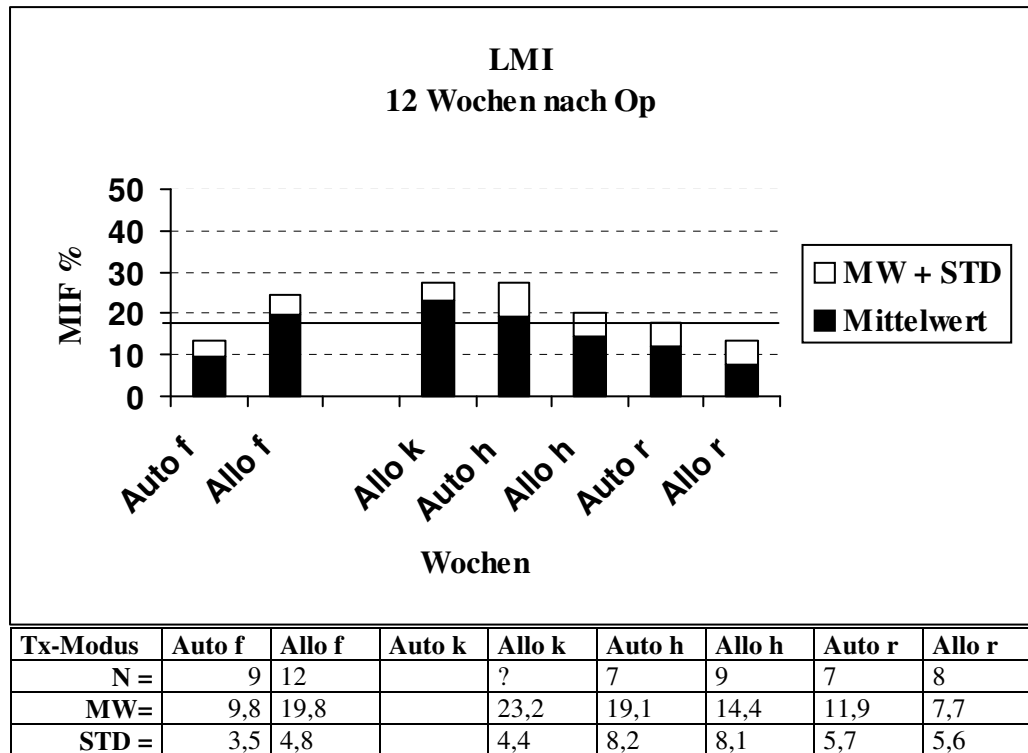
Bei der histologischen Untersuchung der Milz zum Zeitpunkt 12 Wochen zeigt sich, dass bis auf den Wert der Versuchsgruppe autogen frisch alle Mittelwerte der übrigen Versuchsreihen den Normwert (autogen frisch 0 Wochen + 2 STD) nicht übersteigen.



Allo k: Allogen kältekonserviert ( -70<sup>0</sup>C) Werte von SCHRATT (1990) übernommen  
 Auto r: Autogen strahlensterilisiert (25 kGy) Werte von BARCA (1998) übernommen  
 Allo r: Allogen strahlensterilisiert ( 25 kGy) Werte von BARCA (1998) übernommen

**Abb. 35: Ringpräzipitationstest, 12 Wochen nach Op bei unterschiedlichem Transplantationsmodus**

Bei der Untersuchung der präzipitierenden Antikörper zeigt sich ein ähnliches Verhalten nach Transplantation von allogen kältekonservierter Kortikalis wie nach Transplantation von allogen frischer, autogen und allogen hitzesterilisierter Kortikalis. Es finden sich sowohl Präzipitate gegen das Transplantat, als auch gegen die mitgeführten Kontrollknochen. Abweichend davon fanden sich nach Strahlensterilisation keine Präzipitate gegen das Transplantat. Auch gegen die mituntersuchten Kontrollen zeigte sich keine Reaktivität. Eine Ausnahme bildet nach Transplantation von allogen strahlensterilisierter Kortikalis ein positiver Ansatz (1 von 8) bei Verwendung von Extrakt aus strahlensterilisierten Kontrollknochen.

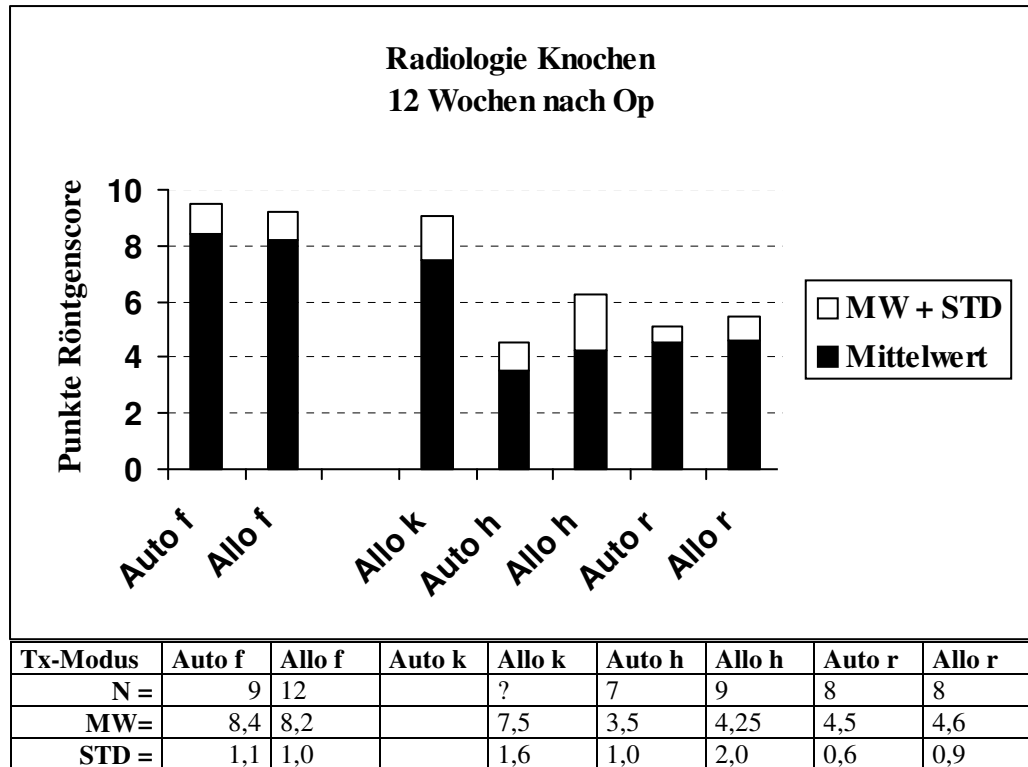


Allo k: Allogen kältekonserviert ( -70°C) Werte von SCHRATT (1990) übernommen  
 Auto r: Autogen strahlensterilisiert (25 kGy) Werte von BARCA (1998) übernommen  
 Allo r: Allogen strahlensterilisiert ( 25 kGy) Werte von BARCA (1998) übernommen

**Abb. 36: LMI, 12 Wochen nach Op bei unterschiedlichem Transplantationsmodus**

Wie bereits oben beschrieben, finden sich nach Transplantation von allogen frischem Knochen deutlich mehr positive Reaktionen im LMI-Test als nach Transplantation von autogen frischem, autogen und allogen hitzesterilisiertem Knochen. Nach Transplantation von autogen frischem Knochen fanden sich deutlich mehr positive Reaktionen im LMI-Test als nach Transplantation von autogen oder allogen hitzesterilisiertem Knochen. SCHRATT (1990) beschreibt konstant hohe Werte im LMI-Test nach Transplantation von allogener kältekonservierter Kortikalis bis zur Woche 12. Auch für die mitgeführten Testansätze wird eine hohe Reaktivität beschrieben. Nach Strahlensterilisation des Transplantates fanden sich im LMI-Test zum Zeitpunkt 12 Wochen im Vergleich zum Bezugswert (0 Wochen Tx autogen frisch) sowohl für autogene, als auch für allogene Transplantate eine signifikant reduzierte Reaktion gegen das Transplantat. Zum 12-Wochen-Zeitpunkt war die Reaktion gegen das Transplantat nach Strahlensterilisation (autogen und allogen) signifikant kleiner als nach Transplantation von allogem Frischknochen. Die 12-Wochen-

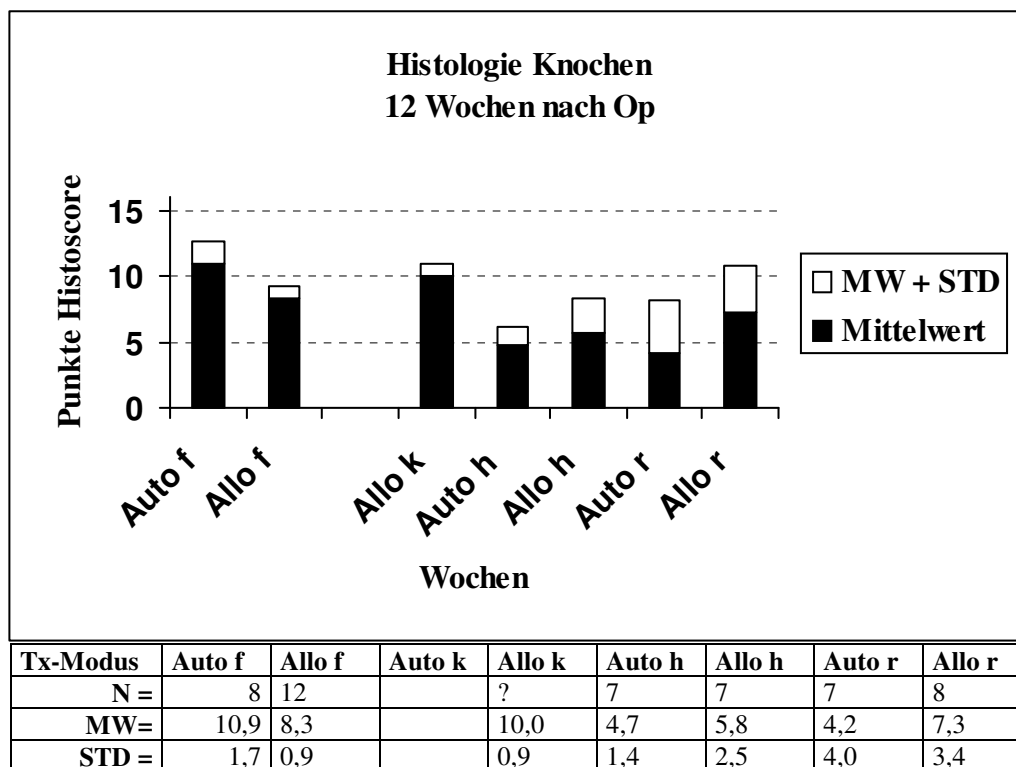
Reaktion nach Transplantation von allogenen strahlensterilisiertem Knochen war auch signifikant kleiner als nach Transplantation von autogen hitzesterilisiertem Knochen. Bei den mitgeführten Kontrollknochen fanden sich keine signifikanten Wanderungshemmungen nach Transplantation von autogen oder allogenen strahlensterilisierten Kortikalis. Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass nach Transplantation von allogenen frischer Kortikalis kräftige zelluläre Immunreaktionen nachweisbar sind. Etwas schwächere, jedoch signifikant positive Befunde, ergeben sich nach Transplantation von allogenen kältekonservierter- und autogen frischer Kortikalis. Die Reaktivität von hitzesterilisierten und strahlensterilisierten Transplantaten ist im LMI-Test reduziert. Die Untersuchungsergebnisse für die radiologischen Untersuchungen stammen für die Meßwerte auto f, allo f, Auto h, Allo h, auto r und allo r von BARCA (1998), der Meßwert allo k wurde aus der Arbeit von SCHRATT (1990) entnommen. Zur Beurteilung der Röntgenbefunde wurde dabei ein semiquantitativer Punktescore verwendet (SCHRATT 1990). Aussagen zur statistischen Signifikanz können bei dieser Graphik nicht gemacht werden, da lediglich der Mittelwert und die Standardabweichung, nicht jedoch die Einzelwerte mitgeteilt wurden.



Allo k: Allogen kältekonserviert ( -70<sup>0</sup>C) Werte von SCHRATT (1990) übernommen  
 Auto r: Autogen strahlensterilisiert (25 kGy) Werte von BARCA (1998) übernommen  
 Allo r: Allogen strahlensterilisiert ( 25 kGy) Werte von BARCA (1998) übernommen

**Abb. 37: Radiologie Knochen, 12 Wochen nach Op bei unterschiedlichem Transplantationsmodus**

Die radiologische Beurteilung ergibt ein günstiges Einheilungsergebnis für die autogen und allogen frischen, sowie für die allogen kältekonservierten Knochen. Deutlich schlechtere Einheilungsergebnisse zeigten sich für die strahlen- und hitzesterilisierten Knochen.

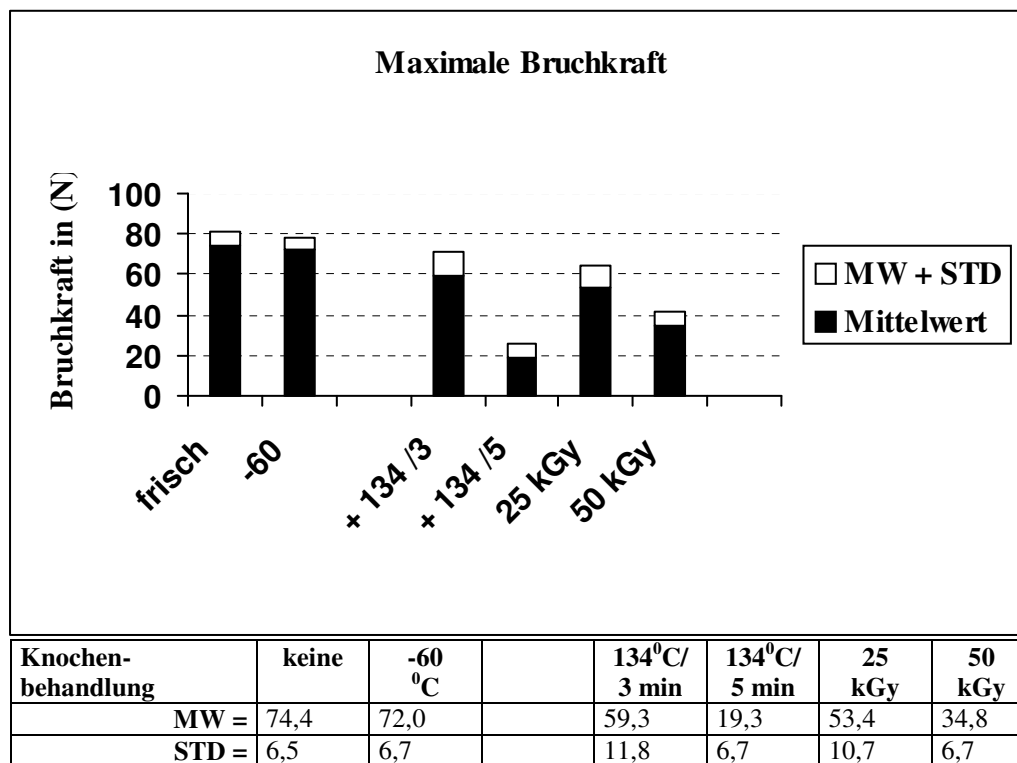


Allo k: Allogen kältekonserviert (-70°C) Werte von SCHRATT (1990) übernommen  
 Auto r: Autogen strahlensterilisiert (25 kGy) Werte von BARCA (1998) übernommen  
 Allo r: Allogen strahlensterilisiert (25 kGy) Werte von BARCA (1998) übernommen

**Abb. 38: Knochenhistologie, 12 Wochen nach Op bei unterschiedlichem Transplantationsmodus**

Wie bei den radiologischen Untersuchungsergebnissen stammen die Meßwerte auto f, allo f, Auto h, Allo h, auto r und allo r von BARCA (1998), der Meßwert allo k wurde aus der Arbeit von SCHRATT (1990) entnommen. Die histologischen Präparate wurden ebenfalls nach einem semiquantitativen Punktescore (SCHRATT 1990) beurteilt. Auch hier findet sich ein deutlich günstigeres Einheilungsergebnis für die autogenen und allogen frischen sowie für die allogen kältekonservierten Knochen im Gegensatz zu den strahlen- und hitzesterilisierten Knochen.

VOGGENREITER (1992) untersuchte verschiedene sterilisierte bzw. konservierten Knochen. Bei seinen biomechanischen Untersuchungen zeigt sich, abhängig von der Dauer der Temperatureinwirkung bzw. Strahleneinwirkung, eine deutliche Einschränkung der biomechanischen Eigenschaften (Steifigkeit, Durchbiegung, Bruchenergie, elastisches Limit), für die exemplarisch die maximale Bruchkraft als Graphik dargestellt ist.



Alle Werte von VOGGENREITER (1992) übernommen

**Abb. 39: Maximale Bruchkraft bei unterschiedlicher Knochenbehandlung**

Aus den dargestellten Befunden ergibt sich eine Verschlechterung der biomechanischen Eigenschaften nach Kältekonserverung und Strahlen- bzw. Hitze-sterilisation. Dabei erreicht der kältekonservierte Knochen noch annähernd die Werte des frischen Knochens, während bei den sterilisierten Knochen mit Zunahme der Hitze-sterilisationsdauer bzw. Zunahme der Strahlendosis eine Verschlechterung der biomechanischen Eigenschaften zu beobachten ist. Nach URIST et al. (1967) ist temperaturabhängig ab einer Temperatur von 60<sup>0</sup> C mit einer Einschränkung der osteoinduktiven Potenz des Knochens zu rechnen, die mit einer zunehmenden Schrumpfung des Kollagens einhergeht. Ab einer Temperatur von ca. 100<sup>0</sup>C kommt es zu einer Transformation der Knochenmatrix in Gelform, die osteoinduktive Potenz des Knochens kommt vollständig zum Erliegen. VOGGENREITER (1992) konnte bei elektronenmikroskopischen Untersuchungen keine strukturellen Veränderungen am kältekonservierten und am strahlensterilisierten Knochen feststellen, wohingegen nach Hitze-sterilisation (3 min. 134<sup>0</sup> C) bereits eine beginnende Verklumpung der feinfibrillären Matrix festzustellen war. Der Einheilungsprozeß der hitze-sterilisierten Kortikalis ist histologisch vor allem dadurch gekennzeichnet, dass die

osteoklastäre Resorption des transplantierten Knochens fast immer vollständig fehlt. Die Osteotomiestelle wird durch einen vom Lagerknochen ausgehenden Kallus überbrückt, zwischen Kallus und hitzesterilisiertem Transplantat besteht bis zum Zeitpunkt 12 Wochen nahezu immer nur ein bindegewebiges Interface. CHAMBERS (1981) unterscheidet zwei Phasen der Knochenresorption. Zum einen die gibt es die Phase der Anlagerung von resorbiven Zellen an den Knochen die eine Erkennung des Knochens voraussetzt, zum anderen die eigentliche Resorption. Bei seinen Versuchen mit verschiedenen Knochenpräparationen zeigte er, dass synthetische Hydroxylapatitkristalle und deproteinisierter Knochen rasch erkannt und abgebaut werden, während „whole bone“, entkalkter Knochen und synthetische Hydroxylapatitkristalle unter Zugabe von Albumin verzögert abgebaut werden. Er schließt daraus, dass die organischen Komponenten des Knochens die Erkennung des Knochens durch Makrophagen verhindern (CHAMBERS 1981). Wahrscheinlich wird also die mineralische Struktur des hitzesterilisierten Knochens durch die in Gelform übergeführte Knochenmatrix derart verändert, dass die Erkennung des Knochens durch Makrophagen verhindert wird. Daraus resultiert letztlich die fehlende Aktivierung bzw. Differenzierung der Osteoklasten, die durch ein komplexes Zusammenwirken von Zytokinen und „colony-stimulating factors“ (MANOLAGAS und JILKA 1995) ermöglicht wird. Überträgt man nun die oben zusammengestellten experimentellen Befunde auf die klinische Situation, so muß gesagt werden, dass die immunologischen Ergebnisse wenig hilfreich sind in der Argumentation für oder gegen hitzesterilisierte bzw. strahlensterilisierte Knochentransplantate, da sie die lokal ablaufenden, immunologisch gesteuerten Phänomene (Erkennung, Steuerung des Abbaus/Umbaus) nicht erfassen. Die radiologischen, histologischen und biomechanischen Untersuchungsbefunde hingegen zeigen eindeutig eine Verschlechterung der biologischen Eigenschaften von hitzesterilisierten bzw. strahlensterilisierten Knochen. Sie sind in diesen Gesichtspunkten den frischen und auch den kryokonservierten Knochen eindeutig unterlegen.

Des weiteren darf nicht unberücksichtigt bleiben, dass auch die Hitzesterilisation nicht alle humanpathogenen Infektauslöser abzutöten vermag, wie die neu entflammte Diskussion um die Prionerkrankungen belegt.



Folgende Sterilisationsmaßnahmen werden bei Prionmaterial als ineffektiv angesehen (KRETZSCHMAR und DAHME 1990):

Ethylenoxid, UV, Ethanol, Formalin,  $\gamma$ -Propiolakton, Bleiche (Na-Hypochlorid), Kochen, Detergentien, Säuren, ionisierende Strahlen und Azeton.

Empfohlen werden:

Autoklavieren 4,5 h, 121<sup>0</sup> C, 1N NaOH-Lauge danach autoklavieren 1,5 h, dreimalig 1N NaOH-Lauge bei 25<sup>0</sup> C für 30 min.

Sollten die empfohlenen Sterilisationsmaßnahmen bei der Knochentransplantation angewendet werden, ist jedoch ebenfalls eine massive Einschränkung der biologischen Eigenschaften zu erwarten.

KNAEPLER et al. (1994) beschreiben eine modifizierte thermische Behandlung mit 80<sup>0</sup> C zur Desinfektion, bei besseren biologischen Ergebnissen und insbesondere geringeren Infektionsraten bei den so behandelten Transplantaten in der klinischen Anwendung. MANABE et al. (2001) berichten über gute Erfolge mit pasteurisierten ( 60<sup>0</sup>C, 30 min) Knochen in der Tumorchirurgie. Allerdings werden bei diesen Temperaturen, abhängig von der Einwirkzeit, nicht alle humanpathogenen Erreger (insbesondere Hepatitis-B-Viren) inaktiviert. Nach wie vor bestehen vielseitige nicht gelöste Probleme bei der allogenen Knochentransplantation und -konservierung.

Nach AEBI und GANZ (1989) verdient die wieder entdeckte ILIZAROV-Technik (MACHAN 1991) mit guten klinischen Ergebnissen (DAGHER und ROUKOZ 1991), zum Teil auch bei komplizierten Situationen (ZHANG et al. 2007), mehr Beachtung. Mit dieser Technik, wo sinnvoll einsetzbar, lassen sich viele Schwierigkeiten der allogenen Knochentransplantation umgehen, wobei dieser Technik wiederum selbst spezielle Probleme innewohnen (Liegezeit, lokale Infekte).

Die Auswahl der richtigen Methode, wie ein knöcherner Defekt zu rekonstruieren ist, bleibt die verantwortungsvolle Aufgabe des erfahrenen Arztes. Dieser muß unter Berücksichtigung der Patientensituation, der Defektsituation bzw. der Wundverhältnisse und der technischen Gegebenheiten am Krankenhaus den Patienten beraten.

## 9 Zusammenfassung

Unter dem Aktenzeichen (211–2531–24/88) wurde das Versuchsvorhaben: „Untersuchung zur Einheilung und Immunogenität von extrakorporal behandelten Knochentransplantaten – Erforschung eines neuen Therapiekonzeptes“ von der Regierung von Oberbayern genehmigt.

Als Teil des 1990 von der DFG geförderten Projektes „Transplantation von Bankknochen – Grundlagen – Konservierungsmethoden – Virussicherheit“ (AS 60/1-1) wurde in der vorliegenden Arbeit an Hand eines Transplantationsmodells an der Ratte mit den Methoden Lymphknotenhistologie, Milzplanimetrie, Ringpräzipitationstest und Leukozyten-Migrations-Inhibitions-Test Immunphänomene bei der Einheilung hitzesterilisierter kortikaler Knochentransplantate untersucht.

Nachfolgende Aussagen lassen sich signifikant aus den erarbeiteten Meßergebnissen ableiten.

Als Hinweis auf eine Immunreaktion nach Transplantation von allogenen frischem Knochen wurde eine signifikante Lymphknotenreaktion nachgewiesen. Dies wurde zwischenzeitlich auch bei anderen Autoren beschrieben. Nach Transplantation von autogen frischer, autogen hitzesterilisierter und allogenen hitzesterilisierter Kortikalis ist eine signifikante Lymphknotenreaktion nicht nachweisbar. Als Ausnahme fanden sich eine signifikante Reaktion zum Meßzeitpunkt 3 Wochen nach Transplantation von allogenen hitzesterilisierter Kortikalis, sowie ein signifikanter Reaktionsabfall nach Transplantation von autogen frischer Kortikalis zum Meßzeitpunkt 6-Wochen.

Nach Transplantation von autogen frischer Kortikalis kommt es zu einer signifikanten Vermehrung der Fläche der weißen Pulpa über den gesamten Versuchszeitraum in der Milzplanimetrie. Nach Transplantation von allogenen frischer, autogen hitzesterilisierter und allogenen hitzesterilisierter Kortikalis ist außer einer signifikanten Reaktion zum 3-Wochen-Zeitpunkt im Sinne eines Operationseffektes keine signifikante Reaktion festzustellen. Als Ausnahmen fanden sich signifikant erniedrigte Werte nach Transplantation von allogenen frischem Knochen zum Zeitpunkt 12 Wochen, sowie nach Transplantation von autogen hitzesterilisiertem Knochen zum Zeitpunkt 9 Wochen.

Nach Transplantation von autogen frischem Knochen wurden bei 2 von 50 Tieren präzipitierende Antikörper gegen Präparationen des eigenen frischen

bzw. frischen Kontrollknochens festgestellt. Nach Transplantation von allogenen frischem, autogen und allogenen hitzesterilisiertem Knochen fanden sich Präzipitationsreaktionen in verschiedener Häufigkeit gegen verschiedene Knochenpräparationen. Dies spricht dafür, dass durch Transplantation von autogenem frischem Knochen kaum präzipitierende Antikörper induziert werden, während bei den übrigen Operationsgruppen die Bildung von präzipitierenden Antikörpern verschiedener Spezifität in wechselnder Häufigkeit angeregt wird.

In Übereinstimmung mit anderen Arbeiten findet sich im Leukozyten-Migrations-Inhibitions-Test eine zelluläre Immunreaktion nach Transplantation von autogen frischer Kortikalis. Nach Transplantation allogener frischer Kortikalis war die zelluläre Immunreaktion deutlich stärker ausgeprägt als nach Transplantation autogen frischer Kortikalis. Nach Transplantation autogen bzw. allogener hitzesterilisierter Kortikalis waren deutlich weniger positive Befunde auch bei den mitgeführten Kontrollknochen festzustellen, so dass davon auszugehen ist, dass der hitzesterilisierte Knochen in diesem Test deutlich weniger immunogen ist.

Trotz reduzierter Immunität heilen die hitzesterilisierten Transplantate nach Untersuchungen anderer Autoren deutlich schlechter als frische und kryokonservierte Transplantate ein. Dies ist zum einen auf die Zerstörung kollagener Strukturen, Inaktivierung osteoinduktiver Proteine wie z.B. BMP und möglicherweise auf eine Maskierung des hitzesterilisierten Knochens bzw. von Knochenbestandteilen durch denaturierte Knochenproteine zurückzuführen.

Hitzesterilisierte Transplantate zeigen im Vergleich zu frischen oder kältekonservierten Transplantaten schlechtere biomechanische Eigenschaften.

Auf Grund der hier dargestellten Daten kann die Transplantation von hitzesterilisierten kortikalen Knochentransplantaten nicht empfohlen werden.

## 10 Appendix

Durch verschiedene widrige Umstände, hat sich die endgültige Fertigstellung der Promotionsarbeit stark verzögert. Hauptsächlich lag das an mehreren Umzügen des Betreuers und mir selbst. Das notwendige Engagement an den neuen Arbeitsstellen führte dazu, dass die in Inhalt und Form weitgehend fertige Arbeit mit Stand 1999 nicht eingereicht wurde.

Auch wenn in dieser Arbeit keine richtungsweisenden „positive“ Ergebnisse gefunden werden konnten, trägt sie vor allem in der Zusammenschau mit den Arbeiten von SCHRATT (1990), VOGGENREITHER (1992) und BARCA (1998) in der Grundlagenforschung zur Ergänzung und Abrundung des Gesamtbildes - Einheilung und Immunologie von Knochentransplantaten - bei. Ein wesentlicher Gesichtspunkt ist, dass die Untersuchungen, wie die oben aufgeführten, unter gleichen Bedingungen (Rattenstamm, Haltung, OP-Technik, Narkose, Testsysteme...) durchgeführt wurden. Die Ergebnisse bauen also zum Einen auf die Vorarbeiten von Schrott und Spyra auf, ergänzen zum Anderen die Arbeiten von Barca und Voggenreither.

Ein zweiter wesentlicher Gesichtspunkt ist, dass solche Untersuchungen nach meinem Wissensstand nicht durchgeführt wurden.

Um diese Arbeit zu aktualisieren wurde im Januar 2008 folgende Literatur-Recherche im „National Center for Biotechnology“

(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) durchgeführt und teilweise in die Arbeit eingearbeitet:

„Cortical Bone Transplantation“	862 Einträge
„Cortical Bone Transplantation Immune“	14 Einträge
„Cortical Bone Transplantation Immunology“	23 Einträge
„Cortical Bone Transplantation Immunosuppression“	6 Einträge
„Cortical Bone autoclaved“	15 Einträge
„Cortical Bone autoclaved Transplantation“	9 Einträge
„Cortical Bone irradiated“	97 Einträge
„Bone banking autoclaved“	1 Einträge
„Leukocyte Migration inhibition“	308 Einträge
„Leukocyte Migration inhibition Transplantation“	305 Einträge
„Bone Transplantation Leukocyte Migration inhibition“	2 Einträge

Nach Durchsicht der aktuellen Literatur ist festzustellen, dass es für das Problem „Knochenersatz“ immer noch keine optimale Lösung gibt.

Die Forschungsrichtung hat sich deutlich geändert, immunologische Fragestellungen werden im Zusammenhang mit der Knochentransplantation kaum mehr bearbeitet. Der Schwerpunkt der Forschung liegt derzeit eindeutig beim „tissue-engineering“. Diese Technik hat jedoch für die Klinik bisher keine Änderung der etablierten Therapiekonzepte erbracht. Bei der Durchsicht der Literatur gewinnt man den Eindruck, dass die einzelnen Eigenschaften, die ein Knochentransplantat haben soll, isoliert betrachtet, beforscht, optimiert und dann je nach Bedarf wieder kombiniert werden.

**Osteogenität** im Sinne von Vorhandensein pluripotenter Stammzellen gab es bisher eigentlich nur bei der Transplantation von autogenem frischem Knochen.

Jetzt werden kultivierte Stammzellen, die aus verschiedenen Quellen gewonnen wurden (FOLLMAR et al. 2007, ZHOU et al. 2007) mit unterschiedlichsten Transplantaten kombiniert.

**Osteokonduktivität** im Sinne von Leitschiene und Struktur für einwandernde Zellen gab es bereits in den verschiedensten Variationen anorganischer Bestandteile wie Calciumphosphate, Tricalciumphosphate, Coralline hydroxyapatite und anderen. Neben neueren Entwicklungen bei synthetischen Produkten wurden die Bearbeitungsprozesse für allogenen Knochen verbessert. Veränderte und optimierte Sterilisations- und Desinfektionsverfahren wurden zwischenzeitlich vorgestellt. (Pruss et al 2003, Draenert 2007)

**Osteoinduktivität** im Sinne der Induktion des Prozesses der Differenzierung von mesenchymalen Stammzellen in Osteoblasten wurde seit der Entdeckung vom BMP durch Urist 1965 beforscht. Im klinischen Einsatz befand sich vor allem demineralisierte Knochenmatrix. Seitdem wurden 20 verschiedene BMP's identifiziert und charakterisiert (DE BIASE und CAPANNA 2005). BMP-2 und BMP-7 sind mittlerweile von der amerikanischen Zulassungsbehörde als Medikamente zu Beschleunigung der Knochenheilung (KHAN und LANE 2004, CARANO und FIVAROFF 2003) zugelassen.

Nach wie vor bleibt die Auswahl der richtigen Methode, wie ein knöcherner Defekt zu rekonstruieren ist, die verantwortungsvolle Aufgabe des erfahrenen Arztes. Dieser muss unter Berücksichtigung der Patientensituation, der Defektsituation bzw. der Wundverhältnisse und der technischen Gegebenheiten am Krankenhaus den Patienten beraten. Erschwert wird die Auswahl dadurch, dass es kaum kontrollierte, prospektive, randomisierte Studien gibt (WILLIAM et al 2007) die verlässliche Daten für den Einsatz von Knochenersatzmaterialien und Wachstumsfaktoren in den verschiedenen klinischen Situationen liefern.

## 11 Abkürzungen

$\alpha$	Irrtumswahrscheinlichkeit
$\mu\text{g/ml}$	Mikrogramm/Milliliter
$\mu\text{m}$	Mikrometer
®	Eingetragenes Warenzeichen
$^{\circ}\text{C}$	Grad Celsius
$^3\text{H}$	Radioaktives Wasserstoffisotop (Tritium)
$^{51}\text{Cr}$	Radioaktives Chromisotop
a	Prüfgröße beim Test nach DAVID, PEARSON und STEPHENS
AIDS	acquired immunodeficiency syndrome
Allo h	allogen damfsterilisiert
Allo f	allogen frisch
Allo k	allogen kältekonserviert
Allo r	allogen strahlensterilisiert
Al	Aluminium
AO	Arbeitsgemeinschaft für Osteosynthesefragen
Art.Nr.	Artikel Numer
Auto h	autogen hitzesterilisiert
Auto f	autogen frisch
Auto k	autogen kältekonserviert
Auto r	autogen strahlensterilisiert
bar	Maßeinheit Druck
B-Lymphozyten	bursaabhängige Lymphozyten
BMP	bone morphogenetic protein
B-Zellen	bursaabhängige Zellen
bzw.	beziehungsweise
C2	Komplementfaktor 2
C4-A	Komplementfaktor 4a
C4-B	Komplementfaktor 4b
ca.	circa
CFA	complete freud adjuvans
cm	Zentimeter
$d_i$	Differenz des Wertepaares i beim WILCOXON Test
DNA-se	Desoxyribonuclease
EDTA	Ethylendiamidtetraacetat
et al.	et alii (=und andere)
g	Gramm
GB	Great Britain (=England)
G-CSF	Granulozyte colony stimulating factor
gefrierget.	gefriergetrocknet
GM-CSF	Granulozyte-Macrophage colony stimulating factor
h	hora (Stunde/n))
H.E.	Hämatoxilin-Eosin
H-2	Haupthistokompatibilitätskomplex der Maus
HLA	Human leucoxyte antigen
HLA-A	Human leucoxyte antigen-A
HLA-B	Human leucoxyte antigen-B
HLA-C	Human leucoxyte antigen-C
HLA-D	Human leucoxyte antigen-D

i.m.	intramuskulär
IFN $\alpha$	Interferon $\alpha$
IFN $\beta$	Interferon $\beta$
IFN $\gamma$	Interferon $\gamma$
IgG	Immunglobulin G
IgM	Immunglobulin M
IL	Interleukin
IL 1 $\alpha$	Interleukin $\alpha$
IL 1 $\beta$	Interleukin $\beta$
IL 2-6	Interleukin
K <sup>+</sup>	Kaliumion
kältekons.	kältekonserviert
Kat.Nr.	Katalog Numer
KCL	Kaliumchlorid
KG	Körpergewicht
kg	Kilogramm
kGy	Kilogray
Kontrolle d	Kontrolle hitzesterilisiert
Kontrolle f	Kontrolle frisch
kV	Kilovolt
LMI	Leukozyten-Migrations-Inhibitions-Test
LMU	Ludwig Maximilian Universität/ München
LRZ	Leibnitz Rechenzentrum
mA	Milliampere
MAI	metabolic activity index
M-CSF	macrophage colony stimulating factor
mg	Milligramm
MG	Molekulargewicht
mg/kg KG	Milligramm pro Kilogramm Körpergewicht
mg/ml	Milligramm pro Milliliter
MHC	major histocompatibility complex
MIF	macrophage inhibition faktor
min	Minuten
ML	mixed lymphocyte
ml	Milliliter
MLC	mixed lymphocyte culture reaction
mm	Millimeter
MW	Mittelwert
N	Stichprobenumfang/ Anzahl der Tiere
N	Newton
n <sub>1</sub>	Stichprobenumfang 1 beim U-Test nach WILCOXON, MANN und WHITNEY
n <sub>2</sub>	Stichprobenumfang 2 beim U-Test nach WILCOXON, MANN und WHITNEY
Na <sup>+</sup>	Natriumion
NaCl	Natriumchlorid
neg.	negativ
Nr.	Nummer
Op	Operation
pos.	positiv



R	Variationsbreite (Rang) beim Test nach DAVID, PEARSON und STEPHENS
R.d.I.	Rechts der Isar
R <sub>0</sub>	Tabellenwert beim WILCOXON Test
R <sub>1</sub>	Rangzahlensumme 1 beim U-Tests nach WILCOXON, MANN und WHITNEY
R <sub>2</sub>	Rangzahlensumme 2 beim U-Tests nach WILCOXON, MANN und WHITNEY
R <sub>n</sub>	Summe der Rangzahlen der negativen Differenzen beim WILCOXON Test
RNA-se	Ribonuclease
R <sub>p</sub>	Summe der Rangzahlen der positiven Differenzen beim WILCOXON Test
RPMI-	Roswell park memorial institute
sec	Sekunden
s.o.	siehe oben
Spender h	Spender hitzesterilisiert
Spender f	Spender frisch
STD	Standardabweichung
Sx	Standardabweichung der Einzelwerte beim Test nach DAVID, PEARSON und STEPHENS
T-Lymphozyten	thymusabhängige Lymphozyten
TNF $\alpha$	Tumornekrosefaktor $\alpha$
TNF $\beta$	Tumornekrosefaktor $\beta$
TUM	Technische Universität München
Tx	Transplantat, Transplantation
T-Zellen	thymusabhängige Zellen
U/min	Umdrehungen pro Minute
U <sub>1</sub>	Prüfgröße 1 beim U-Test nach WILCOXON, MANN und WHITNEY
U <sub>2</sub>	Prüfgröße 2 beim U-Test nach WILCOXON, MANN und WHITNEY
US \$	US Dollar
UV	ultraviolett
X`	X Minuten
X <sub>i1</sub>	Wert 1 des Wertepaares beim WILCOXON Test
X <sub>i2</sub>	Wert 2 des Wertepaares beim WILCOXON Test
z.B.	zum Beispiel
z.T.	zum Teil

## 12 Literaturverzeichnis

1. Abel CF:  
Extrusion of femoral shaft fragment by trauma and successful replacement  
J Bone Joint Surg Am 48, 537-541 (1966)
2. Aebi M, Ganz R:  
Further directions in research: Outlook  
In: Aebi M, Regazzoni P (Eds.):  
Bone Transplantation  
Springer, Berlin, 351-355 (1989)
3. Albert A, Leemrijse T, Druez V, Delloye C, Cornu O:  
Are bone autografts still necessary in 2006? A three-year retrospective study  
of bone grafting  
Acta Orthop Belg. 72, 734-40 (2006)
4. Ascherl R, Lechner F, Blümel G:  
Zur Wertigkeit allogener kältekonservierter Spongiosa bei Wiederherstellungseingriffen in der Traumatologie und Endoprothetik  
Hefte Unfallheilkd 189, 1042-1044 (1987)
5. Barca R.  
Zur Immunologie sterilisierter Bankknochen (processed grafts)  
Experimentelle und klinische Untersuchungen  
Med Dis Lübeck 1998
6. Bendixon G:  
Specific inhibition of the in vitro migration of leucocytes in ulcerative colitis  
and Crohn`s disease  
Scand J Gastroenterol 2, 214-221 (1967)
7. Bendixon G, Egeberg J, Nerup J:  
The fate of corpuscular antigen in leucocyte migration cultures  
Transplant Proc 4, 253-258 (1972)
8. Bergstrand H, Köllen B:  
On the statistical evaluation of the macrophage migration inhibition assay  
Scand J Immunol 2, 173-187 (1973)
9. Bernstein I, Wright P:  
In vitro detection of enhancing antibodies by the macrophage migration test  
Nature New Biol 231, 25-26 (1971)
10. Bodie AW, Holmes CE, Roth JA, Morton DL:  
Inhibition of human leukocyte migration in agarose by KCl extracts of carcinoma of the lung  
Int J Cancer 15, 823-829 (1975)

11. Bonfiglio M, Jeter WS:  
Immunological response to bone  
Clin Orthop Rel Res 87, 19-27 (1972)
12. Bos GD, Goldberg VM, Zika JM, Heiple KG, Powell AE:  
Immune response of rats to frozen bone allografts  
J Bone Joint Surg Am 65, 239-246 (1983)
13. Brown FG, Nikolic-Paterson DJ, Chadban SJ, Dowling J, Jose M, Metz CN, Bucala R, Atkins RC:  
Urine macrophage migration inhibitory factor concentrations as a diagnostic tool in human renal allograft rejection  
Transplantation 71, 1777-83 (2001)
14. Bundschuh G, Schneeweis B, Bräuer H (Hrsg.)  
Lexikon der Immunologie  
Medical Service, München, 577 (1988)
15. Burchard H:  
Biology of bone transplantation  
Orthop Clin North Am 18, 187-196 (1987)
16. Burwell RG, Gowland G:  
Lymph node reactivity to homografts of cancellous bone  
Nature 188, 159 (1960)
17. Burwell RG, Gowland G:  
Studies in the transplantation of bone.  
1st Assessment of antigenicity  
J Bone Joint Surg Br 43, 814-819 (1961a)
18. Burwell RG, Gowland G.  
Studies in the transplantation of bone.  
2nd The changes occurring in the lymphoid tissue after homografts and auto-grafts of fresh cancellous bone  
J Bone Joint Surg Br 43, 820-843 (1961b)
19. Burwell RG, Gowland G:  
Studies in the transplantation of bone.  
3rd The immune response of lymph nodes draining components of fresh homologous cancellous bone and bone treated by different methods  
J Bone Joint Surg Br 44, 131-148 (1962a)
20. Burwell RG:  
Studies in the transplantation of bone.  
4th The immune response of lymph nodes draining second set homografts of fresh cancellous bone  
J Bone Joint Surg Br 44, 688-710 (1962b)

21. Burwell RG, Gowland G, Dexter F:  
Studies in the transplantation of bone.  
6th Further observations concerning the antigenicity of homologous cortical  
and cancellous bone  
J Bone Joint Surg Br 45, 597-608 (1963)
22. Carano RA, Filvaroff EH:  
Angiogenesis and bone repair  
Drug Discov Today 8, 980-9 (2003)
23. Chase SW, Herndon CH:  
The fate of autogenous and homogenous bone grafts  
A historical review  
J Bone Joint Surg Am 37, 809-841 (1955)
24. Chambers TJ:  
Phagocytic recognition of bone by macrophages  
J Pathol 135, 1-7 (1981)
25. Clausen J E:  
Tuberculin-induced migration inhibition of human peripheral leucocytes in  
agarosemedium  
Acta Allergol 26, 56-80 (1971)
26. Curtiss PH, Herndon CH:  
Immunological factors in homogenous bone transplantation.  
1st Serological studies.  
J Bone Joint Surg Am 38, 103-110 (1956)
27. Dagher F, Roukoz S:  
Compound tibial fractures with bone loss treated by the Ilizarov technique  
J Bone Joint Surg Br 73, 316-321 (1991)
28. DeBiase P, Capanna R:  
Clinical applications of BMP's  
Injury 36, 43-6 (2005)
29. DeBoer H  
Early research on bone transplantation In:  
Aebi M, Reggazoni P (Eds.):  
Bone transplantation  
Springer, Berlin, 7-19 (1989)
30. DeLong WG, Einhorn TA, Koval K, McKee M, Smith W, Sanders R, Watson T:  
Bone grafts and bone substitutes in orthopaedic trauma surgery. A critical analysis  
J Bone Joint Surg Am 89, 649-658 (2007)

31. Diefenbeck M, Wagner F, Kirschner MH, Nerlich A, Mückley T, Hofmann GO:  
Outcome of allogeneic vascularized knee transplants  
Transpl Int 20, 410-8 (2007)
32. Doppelt SH, Tomford WW, Lucas AD, Mankin HJ:  
Operational and financial aspects of a hospital bone bank  
J Bone Joint Surg Am 63; 1472-1481 (1981)
33. Draenert GF, Delius M:  
The mechanically stable steam sterilization of bone grafts  
Biomaterials 28, 1531-8 (2007)
34. Duffy P, Wolf J, Collins G, DeVoe AG, Streeten B, Cowen D:  
Possible person to person transmission of creutzfeldt-jakob disease  
N Engl J Med 290; 692-693 (1974)
35. Elves MW:  
Humoral immune response to allografts of bone  
Int Arch Allergy 47, 708-715 (1974)
36. Elves MW, Salama R:  
A study of the development of cytotoxic antibodies produced in the recipients  
of xenografts (heterografts) of iliac bone  
J Bone Joint Surg Br 56, 331-339 (1974)
37. Elves MW:  
Newer knowledge of the immunology of bone and cartilage  
Clin Orthop Rel Res 120, 232-259 (1976)
38. Elves MW:  
Cell mediated immunity to allografts of fresh and treated bone  
Int Orthop 2, 171-175 (1978)
39. Erhard W, Geisdörfer K, Schindele M, Stephan M, Blümel G:  
Die Anästhesie bei Hasen und Nagetieren  
Kleintierpraxis 31, 333-342 (1986)
40. Evans JE, Harvey PJ, Nickel VL:  
Follow up notes on articles previously published in the journal.  
A nineteen-year follow up of chondrosarcoma of the proximal portion of the  
femur treated by resection, autoclaving and bone replacement  
J Bone Joint Surg Am 51, 598-600 (1969)
41. Ewers R, Wagering K:  
The autoclaved autogenous reimplant, an immediately replaced mineral frame  
J Maxillofac Surg 14; 138-142 (1986)

42. Falk RE, Thorsby E, Möller E, Möller G:  
In vitro assay of cell-mediated immunity:  
Inhibition of migration of sensitized human lymphocytes by HL-A antigens  
Clin Exp Immunol 6, 445-455 (1970)
43. Feher GY, Nagy ZA:  
Histometric analysis of the chicken spleen during primary immune response to  
soluble bovin serum albumine  
2nd Mathematic-histometric method for assessment of quantitative changes of  
thymus-type and bursa-type lymphocytes.  
Z Immun Forsch 143, 245-251 (1972)
44. Fishman JA  
Infection in solid-organ transplant recipients  
N Engl J Med 357, 2601-14 (2007)
45. Follmar KE, Prichard HL, DeCrossFC, Wang HAT, Levis LS, Klitzman B,  
Olbrich KC, ErdmannD:  
Combined bone Allograft and adipose-derived stem cell autograft in a rabbit  
model  
An Plast Surg 58, 561-5 (2007)
46. Friemel H:  
Migrations-Hemmungs-Test (Kapillartechnik)  
In: Friemel H. (Hrsg.): Immunologische Arbeitsmethoden  
Fischer, Stuttgart, 3., 345 (1984)
47. Friedlaender GE, Strong DM, Sell KW:  
Studies in the antigenicity of bone  
1st Freeze-dried and frozen bone allografts in rabbit  
J Bone Joint Surg Am 58, 854-858 (1976)
48. Friedlaender GE:  
Current concepts review  
Bone Grafts  
J Bone Joint Surg Am 69, 786-788 (1987a)
49. Friedlaender GE:  
Preface  
Orthop Clin North Am 18, XIII-XIV (1987b)
50. Garrel von T, Wilke A, Gotzen L:  
Ist die allogene Fenurkopf-Bank noch bezahlbar  
68. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Unfallchirurgie  
19. bis 23.10.2004 Berlin  
German Medical Science Doc04dguB1, 649 (2004)

51. Goodman JW:  
Immunogenicity and antigen specificity  
In: Sites DP, Stobo JD, Wells JV (Eds.):  
Basic and clinical immunology  
Appelton & Lange, Norwalk, 6, 20-26 (1987)
52. Gotfried Y, Yaremchuk MJ, Randolph MA, Weiland AJ:  
Histologic characteristics of acute rejection in vascularized allografts  
J Bone Joint Surg Am 69, 410-425 (1987)
53. Grogan THM, Jolley MT, Rangel HTL:  
Immunoarchitecture of the human spleen  
Lymphology 16, 72-82 (1983)
54. Grundmann E:  
Blut, Knochenmark und lymphatische Gewebe  
In: Grundmann E. (Hrsg.):  
Spezielle Pathologie  
Urban & Schwarzenberg, München, 7., 54-114 (1986)
55. Harding RL:  
Replantation of the andible in cancer surgery  
Plast Reconstr Surg 19, 373-383 (1957)
56. Harper MC:  
Storage of an autogenous cortical bone graft in a subcutaneous pouch with subsequent transplantation  
Clin Orthop Rel Res 163, 113-119 (1982)
57. Hoppe J, Sewing K:  
Wissenschaftlicher Beirat der Bundesärztekammer  
Richtlinien zum Führen einer Knochenbank  
Dt Ärztebl A 98, 1011-1016 (2001)
58. Houff SA, Burton RC, Wilson RW, Henson TE, London WT, Baer GM, Anderson LJ, Winkler WG, Madden DL, Sever JL:  
Human to human transmission of rabies virus by corneal transplant  
N Engl J Med 300, 603-604 (1979)
59. Jacobs RL, Ray RD:  
The effect of heat on bone healing  
A disadvantage in the use of power tools  
Arch Surg 104, 687-691 (1972)
60. Jahn K:  
Die Einheilung allogener Kompakta nach Vorbehandlung des Empfängers mit Knochengewebe (im Tierversuch)  
Nova Acta Leopoldina 12 Supp, 1-142 (1980)

61. James JIP:  
Tuberculosis transmitted by banked bone.  
J Bone Joint Surg Br 35, 578 (1953)
62. Johnston JO, Harries TJ, Alexander CE, Alexander AH:  
Limb salvage procedure for neoplasms about the knee by spherocentric total knee arthroplasty and autogenous autoclaved bone grafting  
Clin Orthop Rel Res 181, 137-145 (1983)
63. Jones NF, Hebebrand D, Buttemeyer R, Zhao M, Benhaim P, Rao U:  
Comparison of long-term immunosuppression for limb transplantation using cyclosporine, tacrolimus and mycophenolate mofetil: implications for clinical composite tissue transplantation  
Plast Reconstr Surg 107, 777-84 (2001)
64. Khan SN, Lane JM:  
The use of recombinant human morphogenetic protein-2 (rhBMP-2) in orthopaedic applications  
Expert Opin Biol Ther 4, 741-8 (2004)
65. Khan SN, Cammisa FP, Sandhu HS, Diwan AD, Girardi FP, Lane JM:  
The biology of bone grafting  
J Am Acad Orthop Surg 13, 77-86 (2005)
66. Knaepler H, Garrel T, Gürtler L:  
Die allogene Knochentransplantation - eine aktuelle Standortbestimmung  
Dt Arztebl 15A, 1052-1057 (1994)
67. Köhler P, Kreicbergs A, Ströberg L:  
Physical properties of autoclaved bone  
Torsion tests of rabbit diaphyseal bone  
Acta Orthop Scand 57, 141-145 (1986)
68. Köhler P, Kreicbergs A:  
Incorporation of autoclaved autogenic bone supplemented with allogenic demineralized bone matrix  
Clin Orthop Rel Res 218, 247-258 (1987)
69. Kraus AL:  
II. Handling and restraint  
In: Baker HJ, Lindsey JR, Weisbroth SH (Eds.):  
The Laboratory Rat Volume II  
Academic Press, New York, 6-7 (1980)
70. Kreicbergs A, Köhler P:  
Diaphyseal reconstruction by autoclaved bone  
Reimplantation experiments in rabbits  
Acta Orthop Scand 58, 61-65 (1987)



71. Kretzschmar HA, Dahme E:  
BSE: Die spongiformen Enzephalopathien und die Prionhypothese  
Dt. Ärztebl. C 38, 1681-1685 (1990)
72. Ku JL, Smith PA, Goldstein SA, Matthews LS:  
An experimental investigation of the fate of autogenous autoclaved bone grafts  
Orthop Trans 9, 340 (1985)
73. Kumar R, Shrestha D, Bajracharya S:  
Replacement of an extruded segment of radius after autoclaving and sterilising  
with gentamicin  
J Hand Surg Br 31, 616-8 (2006)
74. Kuner EH, Hendrich V:  
Die allogene Knochentransplantation  
Indikation-Konservierung-Ergebnisse  
Chirurg 55, 704-709 (1984)
75. Kwapinski G:  
The methodology of investigative and clinical immunology  
Robert E. Krieg Publishing Company Malabar-Florida 2, 183 (1982)
76. Langer F, Czitrom A, Pritzker K, Gross A:  
The immunogenicity of fresh and frozen allogeneic bone  
J Bone Joint Surg Am 57, 216-220 (1975)
77. L'age-Stehr J, Schwarz A, Offermann G, Langmaack H, Bennhold I, Nierig  
M, Koch MA:  
HTLV-III infection in kidney transplant recipients  
Lancet 2, 1361 (1985)
78. Lentz W, Wanke R:  
Die Grundlagen der Transplantation von fremden Knochengewebe  
Thieme, Stuttgart, 1 (1955)
79. Lenz E, Ascherl R, Knaepler H, Claudi B, Blümel G:  
Eignet sich Autoklavierung zur Sterilisierung von Bankknochen ?  
Experimentelle Untersuchungen  
Hefte Unfallheilkd 207, 262 (1989)
80. List  
Arzneiformlehre  
Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft, Stuttgart, 4.; 389-396 (1985)
81. Machan F.G:  
Die Ilisarov-Methode in der Orthopädie und Traumatologie  
Chir Praxis 43, 85-91 (1991)

82. Malinin TI, Brown MD, Mnaymneh W, Martinez O, Marx RE, Kline SN:  
Bone banking - experience with 1175 donors  
In: Aebi M, Regazzoni P (Eds.):  
Bone transplantation  
Springer, Berlin, 170-171 (1989)
83. Manabe J, Kawaguchi N, Matsumoto S:  
Pasteurized autogenous bone graft for reconstruction after resection of malignant bone and soft tissue tumors: imaging features  
Semin Musculoskelet Radiol 5, 195-201 (2001)
84. Manabe J, Ahmed AR, Kawaguchi N, Matsumoto S, Kuroda H:  
Pasteurized autologous bone grafts in surgery for bone and soft tissue sarcoma  
Clin Orthop Rel Res 419, 258-66 (2004)
85. Mankin HJ, Gebhard MC, Tomford WW:  
The use of frozen cadaveric allografts in the management of patients with bone tumors of the extremities  
Orthop Clin North Am 18, 275-289 (1987)
86. Manolagas S, Jilka R:  
Bone marrow, cytokines, and bone remodeling  
New Engl J Med 332, 305-311 (1995)
87. Merker HJ:  
Knochengewebe  
In: Beninghoff, Goerttler:  
Lehrbuch der Anatomie des Menschen, Band I  
Urban & Schwarz, München, 13, 173-181 (1980)
88. Milgrom F, Tuggac ZM, Witebsky E:  
Organ-specific antigen of liver, testicle and pituitary  
J Immunol 94, 157-163 (1965)
89. Mischke R:  
Makrophagen migrationsinhibierender Faktor (MIF): Struktur und Aktivitätsstudien  
Rer Nat Dis Stuttgart (2000)
90. Mitscherlich A, Mielke F. (Hrsg.):  
Medizin ohne Menschlichkeit  
Fischer, Frankfurt a. M., 1 (1995)
91. Molster A, Gjerdet NR, Raugstad TS, Hvidsten K, Alho A, Bang G:  
Effects of instability on experimental fracture healing  
Acta Orthop Scand 53, 521-526 (1982)
92. Muscolo DL, Kawai S, Ray RD:  
Cellular and humoral immune response analysis of bone-allografted rats  
J Bone Joint Surg Am 58, 826-832 (1976)

93. Muscolo DL, Kawai S:  
Bone transplantation antigens  
Cellular and humoral immune response studies  
Int Orthop 1, 5-8 (1977)
94. Muscolo DL, Kawai S, Ray RD:  
In vitro studies of transplantation antigens present on bone cells in the rat  
J Bone Joint Surg Br 59, 342-348 (1977)
95. Nagy ZA, Fehr GY:  
Histometric analysis of the chicken spleen during primary immune response to  
soluble bovine serum albumine  
1st Relationship between quantitative changes of thymus-type and bursa type  
splenic lymphocytes and splenomegaly  
Z Immun Forsch 143, 223-244 (1972)
96. Nieuwenhuis P, Ford WL:  
Comparative migration of B- and T-lymphocytes in the rat spleen and lymph  
nodes  
Cell Immunol 23, 254-267 (1976)
97. Osawa M, Hara H, Ichinose Y, Koyana T, Kobayashi S, Sugita Y:  
Cranioplasty with a frozen and autoclaved bone flap  
Acta Neurochir (Wien) 102, 38-41 (1990)
98. Parikh SN:  
Bone graft substitutes: past, present, future  
J Postgrad Med 48, 142-148 (2002)
99. Pruss A, Seiblod M, Benedix F, Frommelt L, von Garrel T, Gürtler L,  
Dörffel Y, Pauli G, Göbel UB:  
Validation of the "Marburg bone bank system" for termodisinfektion of allogeneic  
femoral head transplants using selected bacteria, fungi and spores  
Biologicals 31, 287-94 (2003)
100. Pruss A, Knaepler H, Katthagen BD, Frommelt L:  
Consequences of european directive 2004/23/EC for bone banks in germany  
Orthopäde 34, 1160-8 (2005)
101. Puranen A:  
Reorganization of fresh and preserved bone transplants  
Acta Orth Scand Supp 92, 6-54 (1966)
102. Ramm B, Hoffmann G.:  
Biomathematik  
Enke, Stuttgart, 3, 158-181 (1987)
103. Read SE, Zabriskie JB:  
Cellular interactions in the leucocyte migration inhibition system  
Transplant Proc 4, 247-252 (1972)

104. Rogge D, Wilke R, Waidt P:  
Tierexperimentelle Untersuchungen zur Wertigkeit von Antigenitätsdifferenzen bei der Spongiosatransplantation  
Hefte Unfallheilkd 181, 279-283 (1986)
105. Rouvillain JL, Navarre T, Nosedo O, Garron E :  
Traumatic femoral bone defect reconstruction with an autoclaved autologous femur segment. A 10-year follow up  
Acta Orthop Belg 72, 229-33 (2006)
106. Sammarco VJ, Chang L:  
Modern issues in bone graft substitutes and advances in bone tissue technology  
Foot Ankle Clin 7, 19-41 (2002)
107. Sanjay BK:  
Review article limb salvage surgery in bone tumors  
Indian J Cancer 36, 1-17 (1999)
108. Scheu M:  
Zur weiteren Charakterisierung einer Dysgammaglobulinämie beim Huhn und einer möglichen T-Zellregulation durch B-Zellen am Vorgang der Allergie vom verzögerten Typ  
Vet Med Dis LMU, 7 (1978)
109. Scheu M, Fiedler H:  
An economic and simplified migration inhibition test in chicken  
Zbl Vet Med B 26; 843-844 (1979)
110. Schratt HE, Spyra JL, Ascherl R, Lechner F, Blümel G:  
Zur Antigenität von kältekonserviertem Knochen - Experimentelle und klinische Untersuchungen.  
In: K. H. Schriefers et al. (Hrsg.):  
Chirurgisches Forum `88 für Experimentelle und klinische Forschung  
Springer, Berlin, 131-136 (1988)
111. Schratt HE, Spyra L, Schindele M:  
Bankknochen - Immunologische Untersuchungen nach Prothesenwechsel  
In: Ascherl R, Lechner F, Siebels W, Tensi HM, Blümel G: (Hrsg.)  
Die gelockerte Hüftprothese  
Schattauer, Stuttgart, 74 (1990)
112. Schratt H.-E:  
Experimentelle und klinische Untersuchungen zur Antigenität von kältekonservierten Knochen-  
transplantaten  
Med Dis TUM (1990)
113. Schutt P, Gardner EC:  
An experimental study of the lymphatic pathway of bone, bone marrow, and joints  
J Bone Joint Surg Am 43, 605 (1961)

114. Shutkin NM:  
Homologous-serum hepatitis following the use of refrigerated bonebank bone  
J Bone Joint Surg Br 36, 160-162 (1954)
115. Sijbrandij S:  
Resection and reconstruction for bone tumors  
Acta Orth Scand 49, 249-254 (1978)
116. Smith PA, Ku JL, Goldstein SA, Mathews LS:  
A biomechanic study of autoclaved autogenous bone  
Orthop Trans 8, 495 (1984)
117. Soborg M:  
In vitro migration of peripheral human leucocytes in cellular hypersensitivity  
Acta Medica Scand 184; 135-139 (1968)
118. Soborg M, Bendixen G:  
Human lymphocyte migration as a parameter of hypersensitivity  
Acta Medica Scand 181, 247-256 (1967)
119. Spyra JL, Schrott HE, Ascherl R, Geißdörfer K, Blümel G:  
Kältekonservierung - Ein Weg zu Reduktion der Antigenität des Knochens ?  
Experimentelle Untersuchungen an der Ratte  
In: Hackenbroch MH, Refior HJ, Wirth CJ (Hrsg.):  
Knorpel - Knochentransplantation  
Thieme, Stuttgart, 50-53 (1988)
120. Steward M, Male D:  
Immunologische Testmethoden  
In: Roit IM, Brostoff J, Male DK (Eds.)  
Kurzes Lehrbuch der Immunologie  
Thieme, Stuttgart, 2, 328 (1991)
121. Tomford WW, Doppelt SH, Mankin HJ, Friedlaender GE:  
1983 Bone banking procedures  
Clin Orthop Rel Res 174, 15-20 (1983)
122. Tomford WW, Mankin HJ, Friedlaender GE, Doppelt SH, Gebhardt MC:  
Methods of banking bone and cartilage for allograft transplantation  
Orth Clin North Am 18, 241-247 (1987)
123. Tomford WW, Starkwether RJ, Goldman MH:  
A study of clinical incidence of infection in the use of banked bone  
J Bone Joint Surg Am 63, 244-248 (1981)
124. Triffitt JT:  
The spacial proteins of bone tissue  
Clin Science 72, 399-408 (1987)

125. Urist R, Silverman B, Brüning K, Dubuc F, Rosenberg J:  
The bone induction principle  
Clin Orthop Rel Res 53, 243-283 (1967)
126. Urist MR:  
Introduction to update on ostochondral allograft surgery  
In: Aebi M, Regazzoni P(Eds.):  
Bone Transplantation  
Springer, Berlin, 1-6 (1989)
127. Veerman AJP, van Ewijk W:  
White pulp compartments in the spleen of rats and mice  
Cell Tissue Res 156, 417-441 (1975)
128. Voggnereiter G:  
Sterilisation und Konservierung von Knochen („processed grafts“) unter besonderer Berücksichtigung der Tumorthherapie  
Experimentelle Untersuchungen an der Ratte  
Med Dis TUM 1992
129. Voggenreither G, Siozos P, Hunkemöller E, Heute S, Schwarz Am, Ober-tacke U:  
Immunosuppression with FK 506 has no influence on fracture healing in the rat  
Bone 37, 227-33 (2005)
130. Wagerin K, Ewers R, Kestel M:  
Interaction of bone resorption and bone synthesis using an autoclaved bone graft  
Proc Clin Biol Res 187, 343-351 (1985)
131. Watanuki M, Haga S:  
The statistical distribution of macrophage migration distance and its application to MIF test  
J. Immunol. Meth. 15, 331-341 (1977)
132. Werner H:  
Präparation von Gewebeextrakten (3-M-KCl-Methode). In:  
Friemel H. (Hrsg.)  
Immunologische Arbeitsmethoden  
Fischer, Stuttgart, 3, 490-499 (1984)
133. Wilson RE, Penn I:  
Fate of tumors transplanted with a renal allograft  
Trans Proc 7, 327-331 (1975)
134. Yao F, Seed C, Farrugia A, Morgan D, Corder S, Wood D, ZhengMH:  
The risk of HIV, HBV; HCV and HTLV infection among musculoskeletal tissue donors in Australia  
Am J Transplant 12, 2723-7 (2007)

135 Zhang X, Liu T, Li Z, Peng W:  
Reconstruction with callus distraction for nonunion with bone loss and leg  
shortening caused by suppurative osteomyelitis of the femur  
J Bone Joint Surg Br 89, 1509-14 (2007)

136 Zhou Y, Chen F, Ho ST, Woodruff AM, Lim Tm, Hutmacher DW:  
Combined marrow stromal cell-sheet techniques and high-strength biodegrad-  
able composite scaffolds for engineered functional bone grafts  
Biomaterials 28, 814-24 (2007)

137. Zylka-Menhorn V:  
Infektionen durch Organspende: Ein geringes Restrisiko bleibt bestehen  
Dt Ärztebl A102, 482-5 (2005)

138. Leads from the MMWR  
Transmission of HIV through bone transplantation  
Case report and public health recommendations  
MMWR 37, 597-599 (1988)

## 13 Tabellenverzeichnis:

TAB. 1: LITERATUR EINHEILUNGSVERHALTEN VON HITZESTERILISIERTEM KNOCHEN .....	5
TAB. 2 :LITERATUR ZU HUMORALEN IMMUNREAKTIONEN NACH ALLOGENER KNOCHENTRANS- PLANTATION.....	16
TAB. 3: LITERATUR ZU ZELLULÄREN IMMUNREAKTIONEN NACH ALLOGENER KNOCHENTRANS- PLANTATION.....	19
TAB. 4: ÜBERSICHT ZEITPLAN, VERSUCHSGRUPPEN UND TIERZAHLEN .....	20
TAB. 5: ZAHLENBEISPIEL MILZPLANIMETRIE.....	28
TAB. 6: WERTETABELLE ZUR BERECHNUNG DER MIF NORMGRENZE .....	34
TAB. 7: KOMPLIKATIONEN.....	38
TAB. 8: NACHWEISGRENZE HUMORALER TESTS .....	68
TAB. 9: LMI „NORMALWERT“ VERSCHIEDENER AUTOREN .....	71

## 14 Abbildungsverzeichnis

ABB. 1: KNOCHENBESTANDTEILE .....	12
ABB. 2: SCHEMA KAPILLARPRÄZIPITATION .....	15
ABB. 3: SCHEMA MIGRATIONSINHIBITION .....	18
ABB. 4: VERWENDETES INSTRUMENTARIUM .....	22
ABB. 5 : RÖNTGENBILD 3 WOCHEN NACH TRANSPLANTATION UND MARKNAGELUNG .....	23
ABB. 6: PHOTOGRAPHIE HISTOLOGIE SECUNDARFOLLIKEL IM LYMPHKNOTEN, FÄRBUNG H.E, VERGRÖßERUNG 25 X BZW. 60X.....	27
ABB. 7: PHOTOGRAPHIE HISTOLOGIE MILZ, FÄRBUNG H.E, VERGRÖßERUNG 20 X .....	28
ABB. 8 : ZEICHNUNG MILZ ZUR PLANIMETRIE .....	28
ABB. 9: SCHEMA ANSÄTZE RINGPRÄZIPITATIONSTEST .....	30
ABB. 10: BAU DER LMI-WANDERUNGSKAMMERN.....	31
ABB. 11: PHOTO LEUKOZYTEN-MIGRATIONS-INHIBITIONS-TEST .....	33
ABB. 12: SCHEMA ANSÄTZE LMI-TEST.....	34
ABB. 13: LYMPHKNOTENHISTOLOGIE, TX AUTOGEN FRISCH .....	39
ABB. 14: LYMPHKNOTENHISTOLOGIE, TX ALLOGEN FRISCH.....	40
ABB. 15: LYMPHKNOTENHISTOLOGIE, TX AUTOGEN HITZESTERIL.....	40
ABB. 16: LYMPHKNOTENHISTOLOGIE, TX ALLOGEN HITZESTERIL .....	41
ABB. 17: LYMPHKNOTENHISTOLOGIE, VERGLEICH DER GRUPPEN.....	41
ABB. 18: MILZPLANIMETRIE, TX AUTOGEN FRISCH .....	43
ABB. 19: MILZPLANIMETRIE, TX ALLOGEN FRISCH.....	44
ABB. 20: MILZPLANIMETRIE, TX AUTOGEN HITZESTERIL.....	44
ABB. 21: MILZPLANIMETRIE, TX ALLOGEN HITZESTERIL .....	45
ABB. 22: MILZPLANIMETRIE, VERGLEICH DER GRUPPEN.....	46
ABB. 23: RINGPRÄZIPITATIONSTEST, TX AUTOGEN FRISCH.....	48
ABB. 24: RINGPRÄZIPITATIONSTEST, TX ALLOGEN FRISCH.....	49
ABB. 25: RINGPRÄZIPITATIONSTEST, TX AUTOGEN HITZESTERIL.....	50
ABB. 26: RINGPRÄZIPITATIONSTEST, TX ALLOGEN HITZESTERIL .....	51
ABB. 27: RINGPRÄZIPITATIONSTESTS, VERGLEICH DER GRUPPEN.....	53
ABB. 28: LMI, TX AUTOGEN FRISCH.....	54
ABB. 29: LMI, TX ALLOGEN FRISCH .....	55
ABB. 30: LMI, TX AUTOGEN HITZESTERIL .....	57
ABB. 31: LMI, TX ALLOGEN HITZESTERIL .....	58
ABB. 32: LMI, VERGLEICH DER GRUPPEN UNTEREINANDER .....	59
ABB. 33: LYMPHKNOTENHISTOLOGIE, 12 WOCHEN NACH OP BEI UNTERSCHIEDLICHEM TRANSPLANTATIONSMODUS.....	77
ABB. 34: MILZPLANIMETRIE, 12 WOCHEN NACH OP BEI UNTERSCHIEDLICHEM TRANSPLANTATIONSMODUS.....	78
ABB. 35: RINGPRÄZIPITATIONSTEST, 12 WOCHEN NACH OP BEI UNTERSCHIEDLICHEM TRANSPLANTATIONSMODUS.....	79
ABB. 36: LMI, 12 WOCHEN NACH OP BEI UNTERSCHIEDLICHEM TRANSPLANTATIONSMODUS..	80
ABB. 37: RADIOLOGIE KNOCHEN, 12 WOCHEN NACH OP BEI UNTERSCHIEDLICHEM TRANSPLANTATIONSMODUS.....	82



ABB. 38: KNOCHENHISTOLOGIE, 12 WOCHEN NACH OP BEI UNTERSCHIEDLICHEM TRANSPLANTATIONSMODUS.....	83
ABB. 39: MAXIMALE BRUCHKRAFT BEI UNTERSCHIEDLICHER KNOCHENBEHANDLUNG.....	84

## 15 Gleichungsverzeichnis

GLEICHUNG 1: BERECHNUNG DES MIGRATIONSINHIBITIONSFAKTORS MIF.....	33
GLEICHUNG 2: BERECHNUNG DER PRÜFGRÖÙE A BEIM TEST AUF NORMALVERTEILUNG NACH DAVID, PEARSON UND STEPHENS .....	35
GLEICHUNG 3 UND GLEICHUNG 4: BERECHNUNG DER PRÜFGRÖÙEN U1 UND U2 BEIM U-TEST NACH WILCOXON, MANN UND WHITNEY .....	35
GLEICHUNG 5: BERECHNUNG DER WERTEPAARDIFFERENZ BEIM WILCOXON-TEST.....	36
GLEICHUNG 6: BERECHNUNG DES MIGRATIONSINDEX MI.....	71

## 16 Danksagung

Herrn Univ. Prof. Dr. med. G. Blümel, Direktor des Instituts für Experimentelle Chirurgie der Technischen Universität München, verstorben am 16.05.1995, danke ich für die Überlassung des Themas, die freundliche Bereitstellung des Arbeitsplatzes und die jederzeit gewährte großzügige Unterstützung.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. med. Gänsbacher dafür, dass er die Weiterbetreuung der Arbeit übernommen hat.

Sehr herzlich möchte ich mich auch bei Herrn Prof. Dr. med. R. Ascherl, bedanken der durch seine langjährige fachliche Unterstützung, seine stete Diskussionsbereitschaft und sein persönliches Engagement wesentlichen Anteil am Gelingen dieser Arbeit hatte.

Weiter möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. med. M.A Scherer für die kontinuierliche Betreuung und Unterstützung vor allem bei administrativen Belangen bedanken.

Ohne die großzügige Unterstützung von Herrn Prof. Dr. rer. nat. Dr. med. habil. Axel Stemmerger wäre mein Promotionsverfahren sicher entgültig gescheitert. Vielen Dank

Die dauernde Unterstützung der Mitarbeiter am Institut für Experimentelle Chirurgie, vor allem der Tierabteilung und der Operationsschwestern, war von herausragender Bedeutung. Ohne sie wären die Versuche nicht im gegebenen Rahmen durchführbar gewesen.

Zu großem Dank verpflichtet bin ich meinen Freunden Leopold Spyra und Eberhard Schratt, von denen ich von der Operationstechnik bis zur histologischen Auswertung, die für diese Arbeit grundlegenden Dinge lernen durfte.

Zuletzt, jedoch nicht weniger herzlich, möchte ich mich bei meinem Freund Raimondo Barca für die langjährige gute Zusammenarbeit auch in langen Labornächten, bedanken.

## 17 Lebenslauf

### Persönliche Daten:

Name	Klemens Dorr
geboren	01.05.1961 in Garmisch-Partenkirchen
Konfession	römisch-katholisch
Staatsangehörigkeit	deutsch
Familienstand	verheiratet
Ehefrau	Karin Dorr, geb. Grothkass, Krankenschwester
Kinder	Maximiliane, geb. 1992 Constanze, geb. 1994 Valentin, geb. 1996
Eltern	Anneliese Dorr, Hausfrau Willibald Dorr, Finanzbeamter i.R.
Geschwister	Nikolaus, geb. 1960, Diplomingenieur Lucia, geb. 1965, Arzthelferin, Hausfrau Beate, geb. 1968, Bürokauffrau, Hausfrau

### Ausbildung:

1967-1972	Grundschule Garmisch-Partenkirchen / Farchant
1972-1982	Werdenfelsgymnasium Garmisch-Partenkirchen
15.06.82	Abitur
1982-1984	Bundeswehr, Ausbildung zum Sanitätsunteroffizier
1984-1985	Studium Maschinenbau an der TUM
1985-1991	Studium Humanmedizin
1987	Beginn mit der Promotionsarbeit am Institut für Experimentelle Chirurgie der TUM
1990	Praktisches Jahr, Wahlfach Urologie
07.05.1991	Drittes Staatsexamen
1991-1993	AIP im Kreiskrankenhaus Garmisch-Partenkirchen, Innere Abteilung, Prof. Dr. Grunzt
1993- 1997	Assistent am Kreiskrankenhaus Neumarkt i.d.Opf. Innere Medizin I, CA Dr. med Pilgrim
1997-1999	Assistent am Kreiskrankenhaus Weissenburg, Innere Medizin, CA Dr. med Stoian
1999-2005	Assistent am Kreiskrankenhaus Neumarkt i.d.Opf. Innere Medizin I, CA Dr. med Pilgrim
15.11.2000	Facharztanerkennung Internist
03.04.2001	Erfolgreiche Teilnahme am Kolloquium zum Nachweis der fachlichen Befähigung zur Durchführung von Dialyseleistungen
01.01.2005	Assistent am KfH Nierenzentrum Neumarkt, Leitung Dr. med Müller, Dr. med Wopperer
01.10.2005	Schwerpunktbezeichnung Nephrologie
22.12.2005	Hypertensiologie DHL
01.09.2007	Niederlassung in der Nephrologischen Gemeinschaftspraxis Goldman/Dorr in Neunkirchen/ Saarland