

3 Material und Methoden

3.1 Wahl des Modells

Aus früheren Arbeiten geht hervor, dass sich das Schaf bezüglich seiner knöchernen Dimensionen für die traumatologische und orthopädische Forschung als bewährtes Versuchstier eignet (Moroni *et al.*, 1998; Claes *et al.*, 1997; Hyldahl *et al.*, 1991).

Trotz geometrischer Unterschiede der Tibiaform zu derjenigen des Menschen wird das Schaf als Versuchstier verwendet, da die ovine Tibia anatomisch und biomechanisch zur Tibia des Menschen große Ähnlichkeiten aufweist (Finlay *et al.*, 1995). Wenn die Voraussetzungen für eine korrekte Versuchsdurchführung mit den zu beachtenden Maßnahmen (wie z. B. das korrekte plazieren der Schrauben) geschaffen sind, steht einer Verwendung des Schafes als geeignetes Model hinsichtlich der biologischen Antwort auf eine Fixateur externe-Montage nichts im Wege (Finlay *et al.*, 1995). So zeigten auch in vivo- Studien an humanen und ovinen Tibiae, dass ähnliche Maximalbelastungen während der normalen Laufphase auftreten (Lanyon *et al.*, 1975; Lanyon *et al.*, 1979).

Um standardisierte Voraussetzungen zu schaffen, ist eine Tiergruppe gewählt worden, welche in ihrem Knochenbau und Habitus gleich entwickelt sind und vor allem deren Gesundheitszustand medizinisch als unbedenklich zu beurteilen ist. Um eine repräsentative Anzahl an Untersuchungsproben zu erhalten, wurden 16 weibliche Merinoschafe im Alter von zwei Jahren und einem Gewicht von durchschnittlich 75 kg (\pm 10 kg) nach eingehender tierärztlicher Untersuchung in die tierexperimentelle Einrichtung der Charité eingestellt. Die Altersbestimmung wurde anhand des Zahnbildes durchgeführt. Es wurden weibliche Tiere bevorzugt, um das Aggressionspotential aufgrund hormoneller Einflüsse untereinander und somit übermäßige Belastungen durch die Gruppenhaltung möglichst gering zu halten.

Die tierärztliche Untersuchung umfasste die übliche klinische Untersuchung, um Vorerkrankungen auszuschließen. Die Schafe waren bei der Einstellung nicht trächtig und wurden prophylaktisch mit dem Präparat ILIREN[®] (PGF 2 ?) behandelt, um eine nicht erkannte Frühträchtigkeit abubrechen. Zudem erhielten sie eine Paramunisierung durch das Präparat BAYPAMUNE[®] (Paramunitätsinducer). Außerdem erfolgte eine Entwurmung durch die subkutane Applikation von 1,5 ml IVOMECS[?] (Ivermectin) pro 50 kg KGW.

Die Schafe wurden in einer Gruppe auf Einstreu und Stroh gehalten und zweimal täglich mit Heu gefüttert. Wasser stand den Tieren ad libitum zur Verfügung. Es herrschten somit für alle Schafe dieser Versuchsgruppe gleiche Versuchsbedingungen.

Die vorliegende Arbeit wurde im Rahmen des Forschungsprojektes „Entwicklung und Testung eines biomechanischen Modells für das Schafsbein zur Reduzierung und Optimierung von Tierversuchen zur Frakturheilung“ (Amtliche Tierversuchsnummer G 0188/99) durchgeführt.

3.2 Versuchsaufbau

3.2.1 Aufbau, Operation

Als Fixateursystem wird ein AO (Arbeitsgemeinschaft für Osteosynthesefragen)- unilateraler Fixateur (unilaterale Bauweise in einer Ebene, nach medial ausgerichtet) verwendet. Dieses System (Abb. 4) besteht aus sechs gewindeschneidenden Schanz´Schrauben mit Dreikantspitze und einem äußeren Durchmesser von 5 mm (Material-Nr. 294.530, Synthes, Schweiz), zwei die Schrauben verbindenden Karbonfaserstäben mit einem Durchmesser von 10 mm (Material-Nr. 394.83, Synthes, Schweiz) und sechs Verbindungsbacken (Material-Nr. 393.44/393.45, Synthes, Schweiz). Die Schanz´ Schraubengewinde werden, dem Knochendurchmesser entsprechend, möglichst passend gekürzt, da herausragende Schraubengewinde die Pinpflege (tägliche Reinigung der Schrauben) erschweren und weiterleitende Infektionen in den Knochen begünstigen können. Sechs Schrauben (3 Schrauben proximal und 3 Schrauben distal der zukünftigen Querosteotomie) werden standardisiert in den Knochen eingebracht. Eine Schablone wird ca. 1 cm oberhalb des medialen Malleolus der Tibia positioniert und sorgt für einen konstanten Schraubenabstand von 2,2 cm zwischen den Schrauben in dem proximalen und distalen Fragment und 3,0 cm zwischen den frakturnahesten Schrauben. Die Bohrungen (Spiralbohrer, Material-Nr.310.350, Synthes, Schweiz) werden mit einer druckluftgetriebenen AO-Pistole ausgeführt.

Nachdem ein knöcherner Defekt der Tibiadiaphyse mittels oszillierender Knochensäge gesetzt wird, werden neben diesen Schrauben zum Vergleich zwei zusätzliche Schanz´Schrauben mit einem äußeren Durchmesser von 4 mm (Material-Nr. 294.430, Synthes, Schweiz) jeweils proximal und distal des Frakturspaltes dorsal im Knochen verankert. Diese Schrauben sind

zwischen den proximalen Schrauben „2“ und „3“ und zwischen den distalen Schrauben „4“ und „5“ positioniert und stehen mit dem Fixateurkonstrukt nicht in Verbindung. An diesen werden für die Messungen der Frakturfragmentbewegungen, die mit dem Infrarot-Meßsystem (PCReflex, Qualisys, Schweden) erfolgen, reflektierende Marker angebracht.

Die die Schrauben und Karbonfaserstäbe verbindenden Backen weisen einen Abstand von 5 mm zur äußeren Haut auf.

Von den **128** Schrauben der 16 Tiere, abzüglich der jeweils proximalsten und distalsten Schraube und der proximalen und distalen frakturnahen Schrauben, gehen insgesamt **64** Schrauben (bzw. die entsprechenden schraubenumgebenden Knochenpräparate) in die weiteren Analysen mit ein. **29** Schrauben werden mit einem Poly(D,L-Lactid) beschichtet. Die Verteilung der beschichteten oder unbeschichteten Schrauben in den Knochen ist randomisiert worden. Dabei sind **16** beschichtete Schrauben, die mit dem Fixateurkonstrukt in Verbindung stehen, und **13** beschichtete, die freistehend im Knochen verblieben, in den Knochen eingebracht worden.

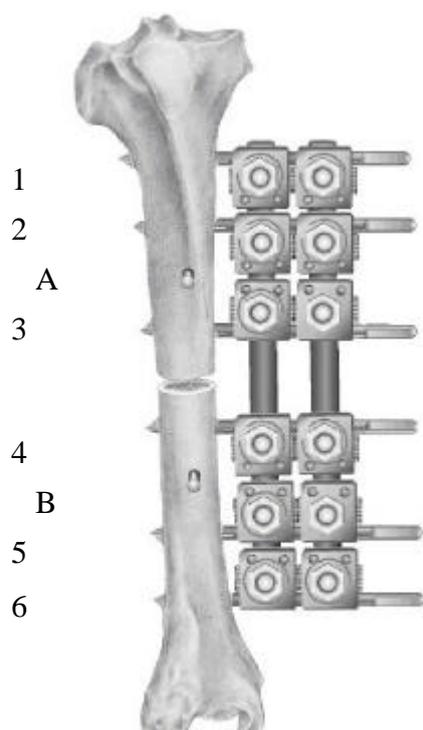


Abb. 4: Modell einer Schafstibia mit medial montiertem Fixateur und zwei zusätzlich eingebrachten Schrauben in kranialer Ausrichtung (1 – 6 = Fixateurschrauben; A, B = freie Schrauben)

Beschichtungsverfahren:

Das Poly(D,L-Lactid) (PDLLA) wurde in flüchtigem Ethylacetat bei Raumtemperatur gelöst und anschließend steril filtriert. Sterilisierte Schanz´Schrauben wurden zweimal im Abstand

von ca. 10 sec. in die Lösung getaucht, um eine ausreichende, gleichmäßig verteilte Menge auf die Implantate zu bringen (Schichtdicke 10 - 14 μm).



Abb. 5: Mediale Ansicht der Tibia: Eindrehen der Schanz`Schrauben mit Universalbohrfutter in vorgebohrte Löcher

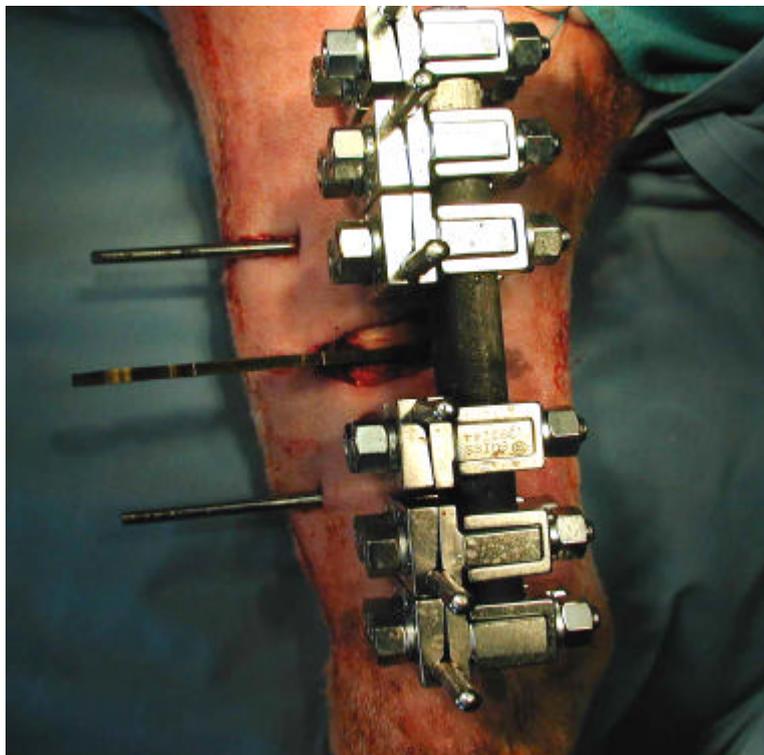


Abb. 6: Fixateurmontage intra operationem, mediale Ansicht. Mitte: platzierter Distanzhalter nach Distraction der osteotomierten Tibia

Nach einer Versuchsdauer von neun Wochen, werden die Schafe für die notwendige Entnahme der Versuchsproben zur Beurteilung des Heilungsverlaufes euthanasiert.

Operation:

Nachdem die notwendigen Operationsvorbereitungen getroffen waren, erfolgte in rechter Seitenlage des Schafes, nach vorhergehender Sedation mittels TRAPANAL[®] (Wirkstoff: Thiopental) und anschließender Intubationsnarkose (Isofluran, N₂O, O₂), das Scheren des rechten Unterschenkels. Perioperativ wurde eine antibiotische Prophylaxe mit AUGMENTAN 2,2 g[®] i. v. (Wirkstoff: Amoxicillin) durchgeführt.

Der Zugang zur rechten Tibia erfolgte von medial über das Planum cutaneum cruris, da hier keine Muskulatur den Zugang zur Tibia behindert. Zur Verankerung des Fixationssystems im Knochen, wurden sechs gewindeschneidende Schrauben (5 mm Ø, durchnummeriert von proximal nach distal mit „1“ bis „6“) pro Schaf nach einer Hautinzision und Vorbohren des Knochens (3,2 mm Ø Bohrer) in beide Kortizes mittels Universalbohrfutter eingebracht. Das Vorbohren erfolgte unter ständiger Spülung mit steriler Kochsalzlösung durch die Bohrhülse, die durch die standardisiert positionierte Schablone eingebracht wurde und gleichermaßen als Führung und Gewebeschutz diente. Vor dem Eindrehen der Schrauben wurde die Vorbohrung des Knochens bzw. der Knochendurchmesser mit Hilfe eines Tiefenmessers bestimmt und die entsprechende Gewindelänge ausgewählt.

Mit einem Drehmomentschraubenschlüssel (small Paddy, BMS, Ireland) wurden bei allen Schrauben die Eindrehmomente gemessen.

Im Folgenden wurde mit einer oszillierenden Säge die Diaphyse der Tibia zwischen den mittleren Schrauben vollständig durchtrennt. Ein Distanzhalter stellte sicher, dass die beiden Knochenfragmente nach voriger Distraction um 3 mm distrahiert blieben. Nun wurden die Klemmbacken an zwei, parallel zur Tibia und die Schrauben verbindenden, Karbonfaserstäben festgezogen, um das System bei einem 3 mm weitem Spalt zu fixieren. Zusätzlich wurde nach Vorbohren (3,2 mm Ø) je eine gewindeschneidende Schanz´Schraube (4 mm Ø, proximal= „A“, distal= „B“) im proximalen und distalen Fragment eingebracht, die nicht im Fixateurverbund stand. Nach abschließender Röntgenkontrolle, erfolgte der Wundverschluss.

3.2.2 Postoperative Nachbetreuung der Tiere und Datenerhebung

Unter tierärztlicher Aufsicht wurden die Schafe nach Extubation bis zum vollständigen Erwachen und Aufstehen in ihrem Stall beobachtet. Alle Schafe haben sich ohne Komplikationen von der Operation erholt. Es wurde eine Schmerzbehandlung mit FINADYNE® (Wirkstoff: Flunixin) (1 x tägl. 1,5 ml i. m., 3 Tage) durchgeführt. Die Tiere durften sich postoperativ frei in ihrem Gehege von ca. 13 m² bewegen.

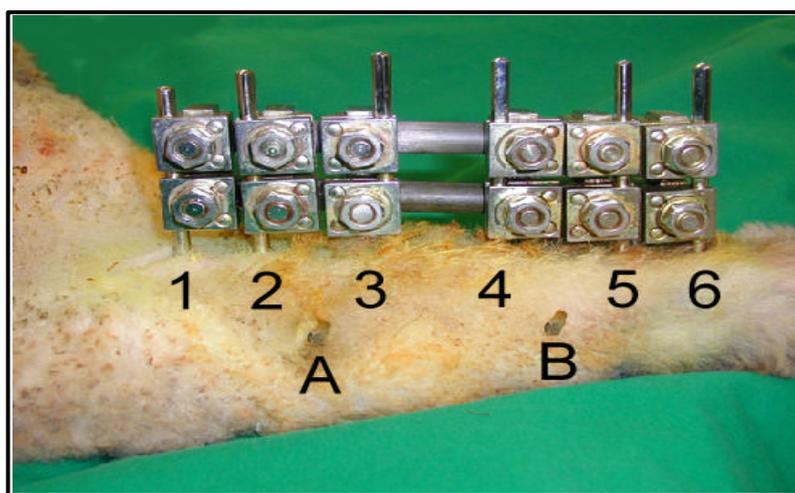


Abb. 7: montierter Fixateur an Tibia nach neun Wochen

Prae- und postoperativ wurden der **Allgemeinzustand** der Tiere täglich durch Tierärzte beobachtet und untersucht. Die Befunde wurden in einem Protokoll (Protokoll 1, Anhang) festgehalten.

Eine regelmäßige Pflege der Haut an den Eintrittsstellen der Schrauben und eine Pflege der Schrauben wurde mittels RIVANOL 5 %[®] (Wirkstoff: Ethacridinlactate) zur Vorbeugung einer externen Kontamination mit Keimen durchgeführt. Darüber hinaus wurde auch ein **Pinpflegeprotokoll** geführt (Protokoll 2, Anhang). Dieses diente dem späteren Vergleich der klinischen Ergebnisse mit denen der histologischen und mikrobiologischen Befunde.

Um den Sitz der Schrauben zu kontrollieren, wurden noch am narkotisierten Schaf **Röntgenkontrollaufnahmen** in zwei Ebenen (kraniokaudal, mediolateral) angefertigt. Zudem war dieses der Anfang einer radiologischen Verlaufskontrolle, die daraufhin am stehenden Tier in wöchentlichen Abständen durchgeführt wurde.

Neben der radiologischen Kontrolle wurden postmortal computertomographische Aufnahmen der Tibiae zur dreidimensionalen Darstellung des Frakturkallus angefertigt und mit der intakten Gegenseite verglichen. Im Rahmen des Versuchsverlaufs wurden wöchentlich Blutentnahmen und ganganalytische Messungen durchgeführt sowie Belastungen der Tierextremität gemessen, die für weitergehende Untersuchungen benötigt wurden.

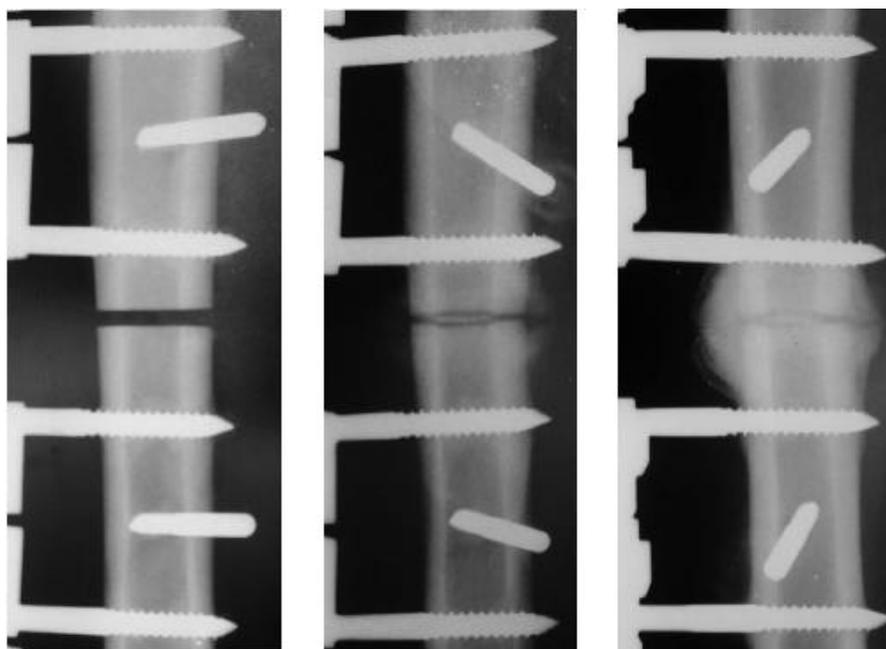


Abb. 8: Radiologischer Heilungsverlauf eines Tieres: von links: direkt postoperationem, drei und sechs Wochen p. o., kraniokaudale Aufnahmen.

3.3 Probenentnahme und Aufbereitung

3.3.1 Tötung

Nach neun Wochen Standzeit der Schafe erfolgte die **Euthanasie** der Tiere durch die überdosierte Gabe von TRAPANAL[®] (Wirkstoff: Thiopental) und Kaliumchlorid (7,5 %). Der Tod wurde auskultatorisch festgestellt. Anschließend erfolgte die Entnahme der rechten Tibia. Das **Drehmoment** der Schrauben, mit dem diese intraoperativ eingedreht bzw. mit dem sie postmortem wieder herausgedreht wurden, wurde gemessen und in „Newton-Zentimeter“ angegeben. Dazu wurde der Drehmomentschlüssel eingesetzt.

Von der die Schrauben umgebenden Haut wurden Abstriche mittels sterilem Tupfer genommen. Anschließend wurden die Schrauben mit einem Universalbohrfutter ausgedreht. Um zu ermitteln, ob eine oberflächliche Keimbeseidlung der kortikal integrierten Schrauben-Implantate vorliegt, und ob diese möglicherweise von gewissen Faktoren (z. B. Beschichtung, Belastung) beeinflusst wird, wurden die herausgedrehten Schrauben auf **mikrobiologischen** Blutagar-Platten ausgerollt und auf pathogene Bakterien untersucht.

3.3.2 Entnahme der Knochenproben

Für die histologischen, histochemischen und histomorphometrischen Untersuchungen wurden Knochenscheiben einschließlich einer Hälfte des Bohrkanals aus der Tibia entnommen. Die von Haut und Weichteilgewebe größtenteils freipräparierten Unterschenkelknochen der Schafe mussten hierfür horizontal in eine Haltevorrichtung gespannt werden, sodass sie mit einer Bandsäge (Exakt-Trennschleifsystern mit einzuspannendem Trennband, Exakt-Apparatebau GmbH) in gleichmäßig große Scheiben gesägt werden konnten. Die Bandsäge ist unter Wasserkühlung senkrecht zur Tibialängsachse vom ehemaligen Schraubeneintritt bis zum Schraubenaustritt geführt worden, sodass transversale, 4 mm dünne Knochenscheiben entnommen werden konnten (Abb. 9 und 10).

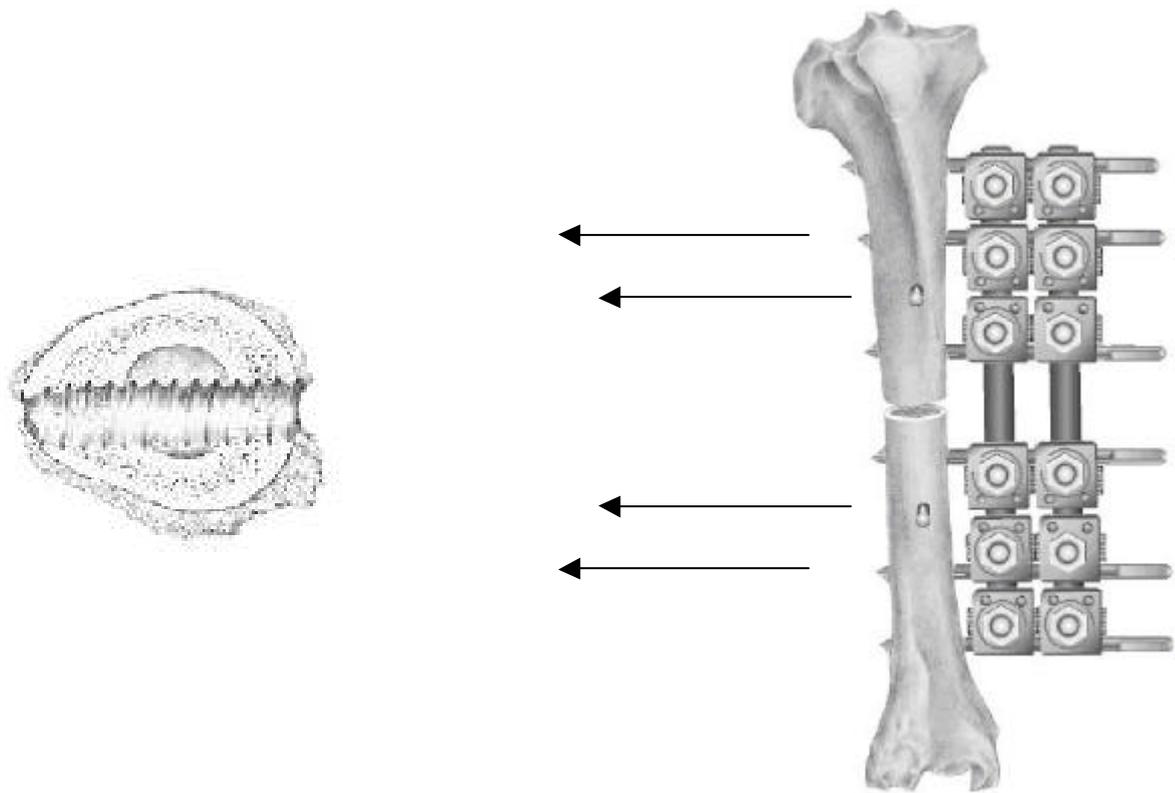


Abb. 9: rechts: Schafstibia mit Fixateurkonstrukt, links: Knochenscheibe ohne Schraube



Abb. 10: 4 mm dicke Knochenscheibe mit Schraubenkanal in Kunststoff eingebettet
(rechts - Eingangskortikalis der Schraube mit hellgrauem Punkt markiert)

3.3.3 Fixieren und Einbetten der Proben

Den ersten Schritt der Knochenaufbereitung stellt die Fixierung dar. Dabei werden die komplexen intra- oder supravitalen Stoffwechselprozesse unterbrochen und die postmortalen

Zerfallserscheinungen gestoppt. Die Fixierdauer ist abhängig von der Objektbeschaffenheit und sollte möglichst rasch nach der Tötung erfolgen.

Eine 10 %ige gepufferte Formalinlösung (die Lösung enthielt zusätzlich neben Formalin Natriumbarbital, Glukose und Natriumchlorid) sorgte für eine gleichmäßige Fixierung der dünnen Knochenscheiben bis zur weiteren Verarbeitung. Diese Fixierung dauerte gewöhnlich einen Tag an. Die Präparate, welche sich in Gläsern auf einem Schüttler (HS 501 digital, KIKA Labortechnik) befanden, wurden für die konventionelle Histologie in einer aufsteigenden Alkoholreihe entwässert. Hierbei waren folgende Alkoholkonzentrationen zu durchlaufen:

3 Tage	70 %
2 x 3 Tage	80 %
2 x 3 Tage	96 %
3 x 7 Tage	100 %

Um Schrumpfungen oder Zerreißen der Präparate zu verhindern, erfolgt dieser Vorgang stufenweise, indem man von schwach- zu hochprozentigem Alkohol übergeht. Der Prozess führt zu einer Verdichtung und somit zu einer Härtung des Gewebes. Anschließend müssen die Präparate zur Entfettung einen Tag in ein Intermedium überführt werden (Xylol). Diese Intermedien verdrängen den Alkohol aus dem Gewebe und mischen sich mit dem nachfolgenden Einbettmedium (Kunststoff), welches wiederum das Intermedium Xylol letztendlich vollständig ersetzt.

Die fixierten Knochenproben werden nun in ein speziell für mineralisierte Gewebe entwickeltes Kunststoffpolymerisationssystem (TECHNOVIT[®] 9100 NEU, Heraeus Kulzer) eingebettet. Dieses System hat neben einem Katalysatorensystem aus Peroxid und Amin als Grundlage den Kunststoff Methylmethacrylat. Ein das Gewebe vollständig durchdringendes Einbetten der Proben erfolgte durch eine eintägige Präinfiltration und eine darauffolgende Infiltration für ca. zwei Tage im Kühlschrank mit den entsprechenden Lösungen. Davor wurde allerdings die Basislösung des Einbettmediums mittels Chromatographiesäule mit Al₂O₃ entstabilisiert. Gemäß Anleitung des Herstellers garantiert das entstabilisierte TECHNOVIT[®] 9100 ein gleichmäßiges Ergebnis für alle immunhistochemischen Untersuchungen analog der Paraffinhistologie. (Stabilisatoren, welche in der Lösung normalerweise enthalten sind, sind Moleküle, die eine Polymerisierung verhindern oder extrem verlangsamen, indem sie vorzeitig entstehende Radikale abfangen.)

Die nun unter Sauerstoffausschluss stattfindende chemische Polymerisation erfolgte in unseren Versuchen bei Temperaturen um den Gefrierpunkt. Somit wird die Ableitung der Polymerisationswärme gewährleistet. Die Dauer der Polymerisation betrug etwa 12 Stunden. Die in verschleißbare gläserne Probegefäße nun ausgehärteten Kunststoffblöcke mit darin enthaltenen Knochenproben wurden anschließend wieder entnommen und weiterverarbeitet.

3.3.4 Schneiden am Mikrotom

Die in Technovit-Kunststoffblöcke eingebetteten Knochenproben wurden mit einem weiteren Kunststoff (TECHNOVIT® 3040) an der Unterseite ummantelt, um den Blöcken eine höhere Stabilität und größere Oberfläche, die beim Einspannen in das Mikrotom von Vorteil war, zu verleihen. Bei dem Mikrotom handelte es sich um ein mikroprozessorgesteuertes Hart- und Großschnittmikrotom (SM 2500 Polycut S, Leica Microsystems, Nussloch GmbH, Germany) mit elektrischem Antrieb. In das Mikrotom war ein Hartmetallmesser (Leica Microsystems, Nussloch GmbH, Germany) eingespannt. Es sind anschließend gleichmäßige Serienschnitte mit einer Schichtdicke von 6 µm angefertigt worden. Die Serienschnitte sind daraufhin auf Standardobjektträger aufgezogen worden, die vorher mit Alkohol gereinigt und 2 min mit 50 °C warme Chromalaun-Gelatinelösung beschichtet waren. Die zum Schutz vor Austrocknung und Faltenbildung mit 100 % Alkohol beträufelten Schnitte wurden zunächst mit einer Streckflüssigkeit (70 Teile 70 % Alkohol, 30 Teile Butoxyethylacetat) und einem Pinsel geebnet, bevor sie mit einer Plastik-(Polyäthylen-) Schutzfolie (Kisolfolie) abgedeckt wurden und einem Glasstab möglichst faltenfrei vorsichtig geglättet wurden.

Um in den Färbelösungen ein späteres Abschwemmen der Schnitte von den Objektträgern zu verhindern, verblieben sie zum Trocknen über Nacht in einer Presse in einem Brutschrank bei 59 °C.

3.3.5 Histologische Färbungen

3.3.5.1 Kombinierte Safranin-Orange/von Kossa-Färbung

Zur Färbung der verschiedenen Gewebeanteile wurde ein nach von Kossa (1901) und Winiwarter (1908) modifiziertes Färbeprotokoll verwendet. Die einheitliche Schwärzung aller

mineralisierten (v.a. kalziumphosphathaltigen) Gewebeanteile und die Rotfärbung anderer Anteile ergibt sehr kontrastreiche Bilder zur histomorphometrischen Analyse.

Mineralisiertes Knorpel- und Knochengewebe sind schwarz gefärbt, Mineralisationsfronten (z. B. unter Osteoidsäumen) schwarz granuliert hervorgehoben. Eine Kombinationsfärbung mit Safranin-Orange führt zu einer weiteren kontrastreichen speziellen Darstellung von Osteoidsäumen, Zellen und Weichteilgewebe, welche rot dargestellt werden. Das hyaline Knorpelgewebe färbt sich leicht rot an.

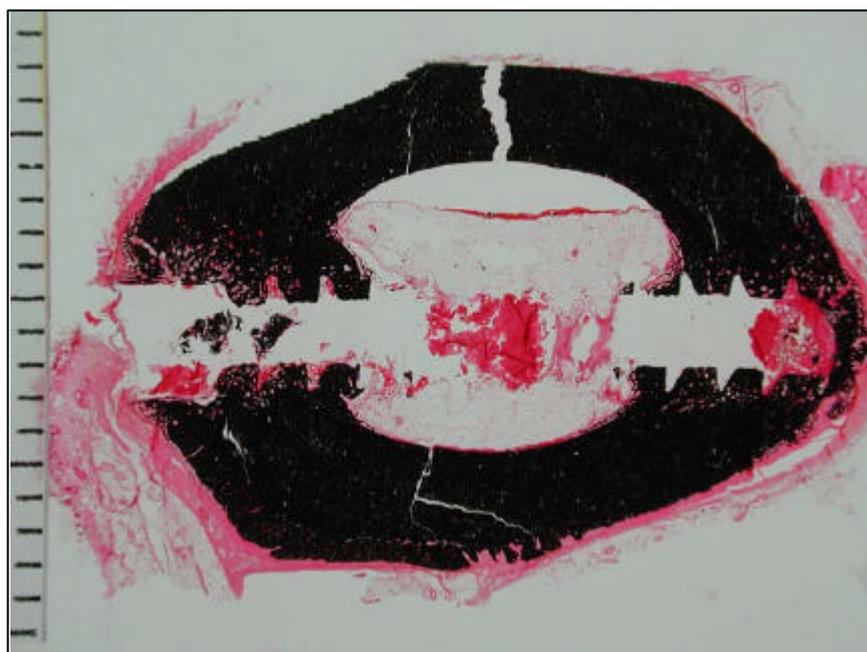


Abb. 11: Safranin-Orange/von Kossa-Färbung eines in Methylmethacrylat eingebetteten Knochenschnittes mit Bohrkanal

3.3.5.2 Masson- Goldner Trichrom-Färbung

Die histologische Färbung nach einem Protokoll von Goldner (1938) hebt die folgenden Zell- und Gewebeanteile hervor. Die Zellkerne färben sich bräunlich-schwarz an, während sich das Zytoplasma ziegelrot hervorhebt. Die kernlosen Erythrozyten unterscheiden sich von den kernhaltigen Zellen in ihrer orangegelben Farbe. Bindegewebe und saure Mukosubstanzen stellen sich blaßgrün im Gegensatz zu mineralisiertem Knochengewebe dar, welches leuchtend grün hervorsteicht. Verkalktes Knochengewebe nimmt eine hellgrüne Farbe an. Die unverkalkten Osteoidsäume werden rot gefärbt.



Abb. 12: Trichrom-Färbung nach Masson-Goldner eines in Methylmethacrylat eingebetteten Knochenschnittes mit Bohrkanal

3.3.5.3 Enzymhistochemische Darstellung der Osteoklasten

Das Enzym Saure Phosphatase wird von aktiven Osteoklasten synthetisiert. Dieses Enzym wurde nach der Methode von Barka (1962) in den entplasteten MMA-Präparaten nach Vorbehandlung mit einer Reaktionslösung dargestellt. Durch dieses Nachweisverfahren wird dieses intrazelluläre Enzym durch Naphthol-AS-BI-Phosphat rot angefärbt und somit die Osteoklasten identifiziert (siehe Färbeprotokoll im Anhang, Protokoll 7).



Abb. 13: Osteoklasten in einer Howshipschen Lakune, Primärvergrößerung (100x) eines histologischen Präparates

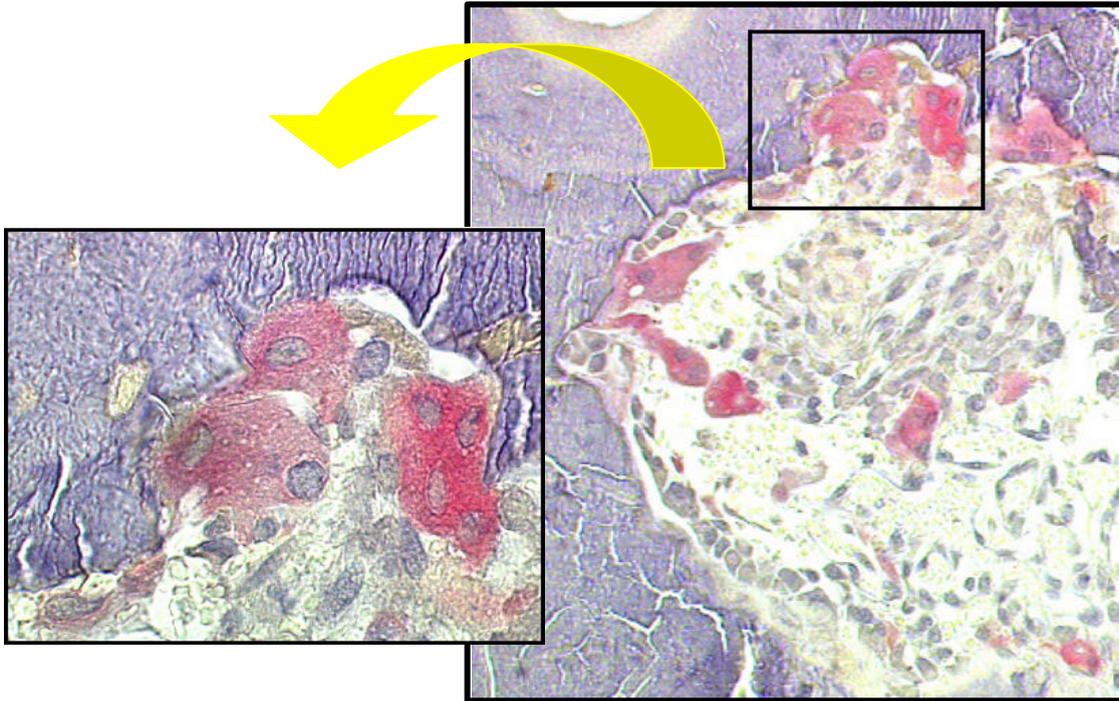


Abb. 14: Osteoklasten in einer Resorptionslakune, Primärvergrößerungen (40x und 100x) eines histologischen Präparates

3.4 Analyse - in vivo

In den folgenden zwei Kapiteln des Methodenteils werden die Analyseverfahren (in vivo, ex vivo) erläutert, die sowohl für die Tiere als auch für die später aufgearbeiteten Proben genutzt wurden.

3.4.1 Allgemeinprotokoll / Score

Täglich wurde der Allgemeinzustand der Tiere im Rahmen einer klinischen Allgemeinuntersuchung beurteilt. Es wurde ein modifizierter Score von Wolfensohn und Lloyd (1994) zur Abschätzung von Schmerzen, Leiden und Schäden bei Versuchstieren eingesetzt und unter anderem Körperhaltung, Verhalten, Futter- und Wasseraufnahme, Urin- und Kotabsatz überprüft (Morton u. Griffiths, 1985).

3.4.2 Pinpflegeprotokoll / Score

Die erforderliche tägliche Pinpflege erfolgte an den Untersuchungstagen immer im Anschluss an die ganganalytischen Messungen, radiologischen Kontrollaufnahmen und Blutentnahmen.

1. Reinigung der Schanz-Schrauben des Fixateurs mit H₂O₂ (3 %ig),
Überprüfen der Schanz-Schrauben auf Beweglichkeit.
2. Entfernung der Krusten mit steriler Pinzette,
Reinigung der Schrauben-Eintrittsstelle mit sterilem NaCl (0,9 %ig).
3. Spülen der Eintrittsstelle der Schrauben mit Rivanol (0,1 %ig)
„Druckspülung“, 20 ml Spritze, gelbe Kanüle.
4. modifizierter Score (Grade 1 - 4) nach Mahan (1991),
eingeschlossene Parameter: Spannung, Rötung, Wärme und purulenten Ausfluss

Bei den Schraubenaustrittsstellen wurde makroskopisch auf Anzeichen von Entzündung wie Rötung, Wärme, Schmerzhaftigkeit und seröse/eitrige Sekretion geachtet. Die Befunde wurden mit einem modifizierten Score nach Mahan von „0“ bis „3“ bewertet. Der Score ist eine Methode zur objektiven Beurteilung der Gewebereaktionen an den Schraubenaustrittsstellen.

?? Keine Reaktion [0]
?? Leichte Entzündungserscheinungen [1]: Eintrittsstelle vermehrt warm oder schmerzhaft, wenig seröses Exsudat
?? Mäßige Entzündungserscheinungen [2]: Eintrittsstelle vermehrt warm und schmerzhaft, mäßig bis viel seröses Exsudat oder wenig eitriges Exsudat
?? Starke Entzündungserscheinungen [3]: Eintrittsstelle vermehrt warm und schmerzhaft, gerötet, mäßig bis viel eitriges Exsudat

Tab. 1: modifizierte Pin-Haut Reaktionen nach der Bewertung von Mahan et al. (1991)

Pinlockerungen wurden nicht im modifizierten Score berücksichtigt, sondern unter Besonderheiten vermerkt.

Bei infizierten Pineintrittsstellen wurden sterile, mit Rivanol getränkte, Kompressen um die entsprechende Schanz´Schraube gewickelt und gegebenenfalls LEUKASE N KEGEL® (Wirkstoff: Framycetinsulfat) lokal appliziert.

Zum Schutz vor groben Verunreinigungen wurde täglich ein neuer Schlauchverband über den Unterschenkel und den Fixateur gestreift.

3.4.3 Radiologie

Die wöchentliche radiologische Verlaufskontrolle fand mit den Röntgenaufnahmen in der neunten Woche ihren Abschluss. Im Folgenden wurde der Eintritt in den Knochen, der Austritt sowie der Verlauf der Schraube im Knochen anhand der Röntgenaufnahmen ausgewertet. Dazu wurde ein Mikroradiographie-Score (Kay *et al.*, 1998) verwendet, der osteolytische Veränderungen des die Schrauben umhüllenden Knochens in Form von Aufhellungen des Knochengewebes mit Grad 1 bis Grad 4 bewertet (Tab. 2).

Score-Punkte	Bewertung
1	keine Lysen
2	Lysen in Eingangskortex- oder Ausgangskortex
3	mittelschwere Lysen der Eingangskortex
4	Lysen entlang des gesamten Pintrakts

Tab. 2: Radiologie-Score nach Kay *et al.* (1998)

3.5 Analyse - ex vivo

3.5.1 Ein- und Ausdrehmomente

Nachdem die rechtsdrehenden Eindrehmomente für die Schanz´Schrauben während der Operation bzw. während des Einbringens in den Knochen gemessen wurden, ist nach der Tötung bzw. vor dem Herausdrehen der Schrauben der gleiche Drehmomentschlüssel wieder

aufgesetzt worden. Der Drehmomentschlüssel wurde auf eine Vierkantmutter aufgesteckt, welche wiederum mit einer kleinen Schraube am obersten Ende der Schanz´Schraube befestigt war. Beim Ausdrehen wurden linksdrehend die Drehmomente immer von der selben Person gemessen. Diese Drehmomente sind von klinischer Relevanz, da die Drehmomente zum Zeitpunkt des Versuchsbeginns und zum Versuchsende miteinander verglichen werden können und die Unterschiede dieser Drehmomente die biomechanische Festigkeit der implantierten Schraube widerspiegeln.

3.5.2 Mikrobiologie

Mit einem sterilen Tupfer wurde an der umgebenden Haut der Schraubeneintritte ein Abstrich genommen und in ein Transportmedium (TRANSWAB[®]) verbracht. Anschließend erfolgte ein Ausstrich der Probe auf eine mikrobiologische Blutagar-Platte (Columbia-Agar mit 5% Schafblut, Becton Dickinson, Heidelberg, Germany). Die Pinumgebung wurde anschließend mit BRAUNOL[®] (Polyvidoniod) getränkt, um Keime der Hautflora zu eliminieren. Nach fünf Minuten wurden die Schrauben schließlich unter Spreizung der die Schrauben umgebenden Haut aus dem Knochen gedreht und die Schraubenspitzen vorsichtig auf Blutagar ausgerollt (Abb. 14).



Abb. 14: Abrollen der herausgedrehten und gekürzten Schraube auf Blutagarplatte

Anschließend wurden die Platten für die mikrobiologischen Untersuchungen für 24 h bei 37 °C inkubiert. Es wurden folgende Erregerkolonien identifiziert: *Staphylococcus aureus*, *Corynebacterium* sp., vergrünende Streptokokken, gramnegative Stäbchen, β -hämolyisierende Streptokokken. *Staphylococcus aureus* wurde mittels Agglutinations-Schnelltest (Slidex Staph Plus Reagenz, bioMerieux, Marcy.l'Etoile, France) nachgewiesen. Mit diesem Test werden blaue Latexpartikel mit humanem Fibrinogen und monoklonalen Antikörpern sensibilisiert und weisen gleichzeitig den Clumpingfactor Protein A und *S. aureus*-spezifische Oberflächenantigene nach. Bei Anwesenheit von *S. aureus* kommt es zu einer mit bloßem Auge sichtbarer Agglutination. Eine Infektion mit β -hämolyisierenden Streptokokken konnte über eine einfache Enzymextraktion (Streptex, Remel Inc., Lenexa, USA) identifiziert werden. Dabei werden von Streptokokken produzierte Antigene im endgültigen Extrakt mit spezifischen Antikörpern beschichteten Latexpartikeln zusammengebracht, welches zu einer deutlichen Agglutination führt.

Gramnegative Stäbchen wurden über biochemische Methoden (sog. „Bunte Reihe“) identifiziert, während die Erreger *Corynebacterium* und *Bacillus* sp. durch ihre spezies-spezifische Kolonieform und -farbe bestimmt wurden.

Es erfolgte ein semiquantitatives Scoring koloniebildender Einheiten. Diese Einheiten wurden in einem Scoring-System festgehalten. Bewertet wurde das Vorkommen der koloniebildenden Einheiten (KbE): 1 = vereinzelte, 2 = mäßige, 3 = zahlreiche Kolonien.

Da der Erreger *Staphylococcus aureus* bei einer Pintrakt-Infektion am häufigsten beobachtet wird und den häufigsten postoperativen Wundinfektionserreger darstellt, der zu einer Osteomyelitis führen kann, wurde diesem gram-positiven Bakterium die meiste Bedeutung beigemessen (Clasper *et al.*, 2001). Sein Anhaften im Gewebe wird durch Matrixproteine (Fibronectin, Kollagen und Laminin) und Plasmaproteine (Fibrinogen, Fibrin und Vitronectin) begünstigt (Anderson, 1993).

Andere pathogene Keime wurden in dieser Studie nicht weiter berücksichtigt, da solche selten oder nie als Ursachen für Heilungsstörungen in Frage kommen.

3.5.3 Histologie

Die mit Safranin Orange/von Kossa gefärbten histologischen Präparate wurden lichtmikroskopisch auf Färbefekte, schnittbedingte Zusammenhangstrennungen oder sonstige Artefakte untersucht.

Diejenigen Präparate, bei denen makroskopisch oder mikroskopisch eine mittel- bis hochgradige Infektion in Form von Pinauslockerungen oder knöcherner Destruktion vorlag, wurden von der Auswertung ausgeschlossen. Es war nicht möglich diese Proben durch eine vollständige histologische oder histomorphometrische Analyse auszuwerten, weil die Schrauben-Knochen-Kontaktfläche zerstört war.

Als infiziert gelten die Bohrkanalpräparate, die histologisch aufgrund einer Osteomyelitis als nekrotisch zu beurteilen waren und somit histomorphometrisch nicht auswertbar erschienen. Von den dazugehörigen Schraubenoberflächen wurden mikrobiologische Proben entnommen. Eine mäßig bis reichliche Besiedlung der Blutplatten mit pathogenen Bakterien (*Staphylococcus aureus*, *Corynebacterium* sp.) war ein weiterer Hinweis für eine Pintrakt-Infektion und stimmte überwiegend mit dem pathohistologischen Befund überein.



Abb. 15: Safranin Orange/von Kossa gefärbter Schraubenkanal, schwere Osteolyse mit überschießender Kallusreaktion im Eintrittsbereich (linker Bildrand) der Schraube

Da die Kallusbildung im Osteotomiebereich einen zu hohen Einfluss auf die knöchernen Strukturen der frakturnahen Schraubenkanäle „3“ und „4“ hinsichtlich Knochenneubildungen und Knochenresorptionen nehmen würde, wurden nur die knöchernen Schraubenkanäle „2“ und „5“ (belastet) und „A“ und „B“ (unbelastet) in die Auswertung mit eingeschlossen.

Insgesamt konnten **64** Präparate ausgewertet werden. Die Auswertung erfolgte zum einen semiquantitativ mittels „Scoring“, zum anderen quantitativ anhand computergestützter Bildanalyse.

3.5.4 Histologische Auswertung

3.5.4.1 Semiquantitative Methode

Zur Beurteilung der Schrauben-Knochen-Reaktionen wurde ein histologisch-histochemischer „Grading Score“ in Anlehnung an Petty und Mitarbeiter (1985) entwickelt. Dazu wurden die unten aufgelisteten Parameter ausgewählt und nach einer Wertetabelle klassifiziert, um die Osteointegrität der Implantate zu bewerten (siehe Tab. 3).

1. Ausmaß des Remodelings der die Schrauben umgebenden Kortikalis
2. Ausdehnung der Resorptionszonen im Knochengewebe des Bohrkanals
3. Osteoklastenaktivität (Häufigkeit des Vorkommens entlang des Bohrkanals)
4. Auftreten von hyalinem Knorpelgewebe
5. Ausdehnung periostalen zugebildeten Knochens
6. Ausdehnung endostalen zugebildeten Knochens
7. Vorhandensein einer fibrösen Zwischenschicht zwischen Schraube und Knochen
8. Ausmaß der bindegewebigen Proliferation am Schraubeneintritt
9. Ausmaß der Fremdkörperreaktionen am Schraubeneintritt (Fremdkörperriesenzellen, Hypervaskularisierung, Entzündungszellen)

Es wurde die Abhängigkeit der einzelnen Parameter zueinander hergestellt und die Punktebeurteilung wurde für die später zu untersuchenden Gruppen zusammengefasst.

Um sich einen Überblick zu verschaffen, wurde das histologische Präparat (Safranin-O./von Kossa-gefärbt) mit einer 2,5-fachen Vergrößerung lichtmikroskopisch betrachtet. Mit dieser Übersichtsvergrößerung konnten somit die knöchernen Kallusanteile, die Knorpelanteile und die bindegewebigen Proliferationen bewertet werden. Daraufhin wurde mit einer 40-fachen Vergrößerung der Pineintritt auf Fremdkörperreaktionen untersucht. Diese wurden durch Fremdkörperriesenzellen, Entzündungszellen, Zellanhäufungen und durch eine eventuell vorliegenden Hypervaskularisierung charakterisiert. Es mussten mindestens zwei dieser Merkmale als Zeichen für eine Fremdkörperreaktion vorhanden sein. Die Knochendichte der Kortikalis musste im Folgenden am Pineintritt und –austritt eingeschätzt und mittels Punktetabelle benotet werden. Beim Durchmustern des gesamten Präparates wurde ein Eindruck über das Ausmaß der Resorptionszonen gewonnen. Die nach Masson-Goldner gefärbten Schnitte wurden auf eine mesenchymale Implantat-Knochen-Zwischenschicht untersucht. Ebenso wurde anhand dieser Färbung die Beurteilung der Fremdkörperreaktionen noch

einmal vorgenommen. Abschließend wurde auf einem weiteren Schnitt aus der selben Ebene mittels histochemischer Darstellung des Enzyms saure Phosphatase die Anzahl der Osteoklasten ermittelt. Das Vorkommen dieser Zellen wurde auf die Anzahl der ausgewerteten Schraubenzacken im Bohrkanal bezogen. Zum Auswertungsbereich zählte nur die unmittelbare Umgebung (diese wurde durch Abfahren der Zacke mit einem Gesichtsfeld in 40-facher Vergrößerung begrenzt) einschließlich der Schrauben-Knochen-Kontaktfläche. Die kortikalen Anteile der Proben und die Kallusbereiche wurden getrennt voneinander beurteilt.

Die möglichen Grading-Score-Werte reichen von 0 bis maximal 2,2. Dieser Wert errechnete sich aus den zu vergebenen Punkten (aus Tabelle 3 zu entnehmen) geteilt durch die Anzahl der ausgewerteten Parameter (mindestens sechs von neun) (Beispiel: insgesamt 16 Punkte für 8 ausgewertete Parameter vergeben = Wert 2). Anschließend wurde der Mittelwert der berechneten Werte beider Untersucher errechnet

Histologischer Grading Score zur Beurteilung von Schrauben - Knochen Reaktionen			
I	Resorptionszonen (entlang des Pinkanals)	wenig	4
		mäßig	2
		viel	0
II	Osteoklasten (Pinkanal- Umgebung)	Zellen 0-5	2
		Zellen 5-10	1
		Zellen >10	0
III	Remodelling (Pinkanal- Umgebung) Knochendichte/ Osteonendurchmesser	wenig	2
		mäßig	1
		viel	0
IV	Knorpelanteile (Pinkanal- Umgebung)	wenig	2
		mäßig	1
		viel	0
V	Periostaler Kallus	wenig	0
		mäßig	1
		viel	2
VI	Endostaler Kallus	wenig	0
		mäßig	1
		viel	2
VII	Mesenchymale Zwischenschicht (mit Masson-Goldner zu Beurteilen)	fehlt	2
		schmal	1
		breit	0
VIII	Bindegewebige Proliferation (Pineintritt-Bereich)	wenig	2
		mäßig	1
		viel	0
IX	Fremdkörper- Reaktionen (Pineintritt- Bereich) FKRZ, Entzündungszellen/ Zellanhäufung	normale Zellularität	2
		mäßige Hyperzellularität	1
		schwere Hyperzellularität	0

Tab. 3: modifizierter histologischer Grading Score (nach Petty *et al.*, 1985)

3.5.4.2 Quantitative Methode

Ein computergestütztes Auswertungssystem bietet eine weitere Möglichkeit, um die histologischen Knochenschnitte zu analysieren und quantitativ zu beurteilen. Das System besteht in diesem Falle aus einer Morphometrie-Software (KS 400 Version 3.0, Carl Zeiss Vision GmbH, Eching), einem Personalcomputer und Monitor. Die histologischen Schnittpräparate wurden per hochauflösender Digitalkamera (Nikon Superhigh-Performance 3xZoom Cool Pix 990, Japan) in Verbindung mit einem Leuchttisch digitalisiert (Einstellungen: Portrait, Blitz aus, 5,3 - 5,9 F, P1:125, Fine 8). Routinemäßig wurde hierbei ein Millimetermaß, das an die Lokalisation der jeweiligen Pineintrittsstelle gelegt wurde, für die später notwendige Kalibrierung im digitalen Bild festgehalten (Abb. 16a). Der Rechner bietet die Möglichkeit, die digitalen Bilder mit einem eigens für die versuchsspezifischen Anforderungen festgelegten Programm zu bearbeiten. Die problemorientierten Programm-Algorithmen sind vor allem zur Identifizierung spezifischer Strukturen codiert worden. Dieses Programm vereinfacht die Erfassung von Distanzen und Flächen in Abhängigkeit von deren unterschiedlicher Anfärbbarkeit. Dadurch werden die Berechnungen und Auswertungen vereinfacht und beschleunigt.

Um das System auf eine einheitliche Maßeinheit bei allen Präparaten anzugleichen, wurde von den jeweils darauffolgenden Arbeitsschritten bei den digitalen, über den Rechner eingelesenen Präparaten die Millimeterangaben verwendet und bei jedem neu eingelesenen Präparat mittels manueller Distanzeingabe kalibriert.

Zu quantifizierende Parameter:

1. Kortikale Knochendichte am Pineintritt
2. Kortikale Knochendichte am Pinaustritt
3. Periostale Knochenfläche am Pineintritt
4. Periostale Knochenfläche am Pinaustritt
5. Mineralisierte periostale Knochenfläche am Pineintritt
6. Mineralisierte periostale Knochenfläche am Pinaustritt
7. Periostale Knochendichte am Pineintritt
8. Periostale Knochendichte am Pinaustritt
9. Endostale Knochenfläche
10. Mineralisierte endostale Knochenfläche
11. Endostale Knochendichte

In den folgenden Schritten wurden bestimmte Bezugsgrößen für die quantitative Erfassung dieser Flächen festgesetzt. Da die Pinkanäle untereinander in ihrer medianen Schnittebene Abweichungen unterlegen sind (es war technisch nicht möglich, das Sägeblatt zentriert durch den Kanal zu führen), musste eine Standardisierung im Rahmen der Berechnung von Flächen erzielt werden. Je weiter die Schnitfführung vom Zentrum des Bohrkanals abwich, desto mehr Remodeling Vorgänge der umliegenden Kortikalis würden bei gleich zu verwendender Maske (Region of Interest: ROI) in die Auswertungen mit einbezogen werden. In die Auswertungsmaske würde also bei optisch verkleinerten Pinkanälen mehr Remodeling-Fläche als bei zentral geschnittenen, optisch größeren Pinkanälen, einbezogen werden.

Um dieses auszugleichen, wurde eingangs jeder Flächenmessung der mittlere Pinkanal-durchmesser als Bezugsmaß errechnet, damit es möglich war, eine dem Pinkanal angrenzende Fläche zu bestimmen. Das heißt also, je größer der angeschnittene Hohlraum im histologischen Präparat in der zentralen Schnitfführung war, desto größer war die später zu berechnende Fläche (ROI). Bei peripher durch den Schraubenkanal geführten Schnittpräparaten wurde im Ausgleich dazu eine kleinere Fläche der Kortikalis ausgewertet.

Eine dem Pindurchmesser entsprechende Fläche für die periostalen Kallusformationen wurde ebenfalls parallel bestimmt.

Eine Voraussetzung für die quantitative Erfassung der einzelnen Flächenanteile der verschiedenen Gewebe war, die Farbwerte (Pixel) für den Knochen zu segmentieren (Abb. 16b), um färbereich getreue Farb- und Kontrastunterschiede einzustellen. So wurden die nach von Kossa schwarz gefärbten knöchernen Anteile von dem System erkannt und die Hohlräume im Knochen ausgeschlossen. In Form einer binären Maske wird ein Abbild der detektierten Farbanteile erstellt, welches nun eine unabhängige Bearbeitung des Ausgangsbildes ermöglicht. Auf diese Weise konnten durch Markierung der Kortikalis und anderer knöcherner Anteile bestimmte Flächen und -relationen ermittelt werden.

Die für jeden Schnitt errechnete ROI wurde über jeweils beide kortikalen und periostalen Pineintritts- und Austrittsstellen einschließlich der Schraubeneinkerbungen im Knochen gelegt (Abb. 16d). Die **kortikale Knochendichte** wurde nach Eingrenzen der kortikalen Anteile innerhalb der Gesamt-ROI sowohl am Pineintritt als auch am Pinaustritt getrennt voneinander gemessen. Gleichermaßen wurde mit der **periostalen Kallusfläche**, die manuell innerhalb der ROI umgrenzt wurde, verfahren (Abb. 16e). Die **mineralisierte periostale Kallusfläche** errechnete das Programm aus der vorher gemessenen periostalen Kallusfläche durch Berechnen der geschwärzten Knochenanteile. Die **periostale Kallusdichte** wurde aus der

Kallusfläche und den mineralisierten Anteilen ermittelt. Ebenso wurde hier der Eintritt und Austritt der Implantate getrennt voneinander beurteilt.

Zum Abschluss erfolgte noch die Abgrenzung der Markraumfläche. Anfangs wurde durch manuelles Markieren die Fläche des Markraumes bestimmt (Abb. 16c), um im Folgenden die endostalen Kallusanteile zu ermitteln. Bei diesen Flächenberechnungen wurde als ein „Maß der Angleichung“ unterschiedlicher Schnittebenen die ROI im Markraum durch die mittlere Kortikalisbreite definiert. Anhand dieser Fläche konnte die **endostale Kallusfläche** abzüglich der Bohrkanalfläche errechnet werden (Abb. 16f). So liegt bei einem dünneren Kortex ein verhältnismäßig großer Markraum vor, was dazu führte, die Messregion kleiner zu wählen als bei Knochenschnitten, die einen breiteren Kortex und somit auch einen relativ kleineren Markraum aufweisen. Analog zu den periostalen Parametern errechnete das bildanalytische System aus der endostalen Kallusfläche die **mineralisierte endostale Kallusfläche** als auch die **endostale Kallusdichte**.

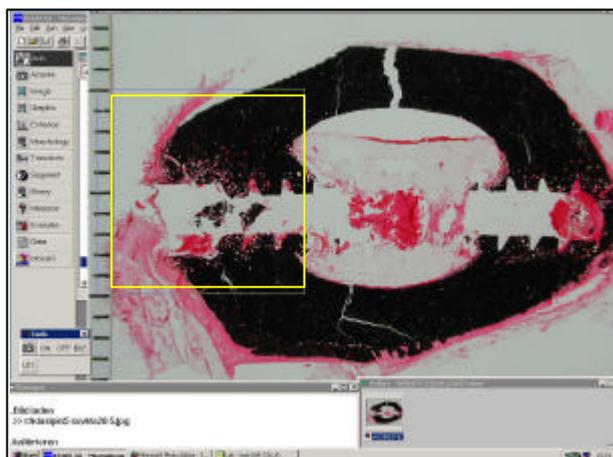


Abb. 16a: Kalibrierung des digitalen Bildes durch das Anlegen eines Referenz-Viereckes an ein eingelesenes Millimetermaß.

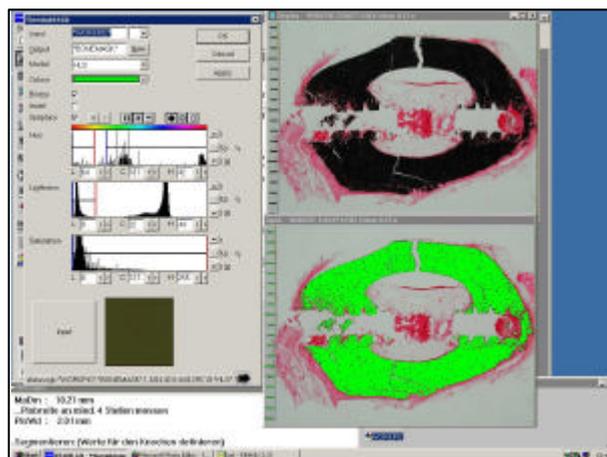


Abb. 16b: Schwarz gefärbte knöcherne Anteile des oberen Bildes werden im unteren Bild grün dargestellt.

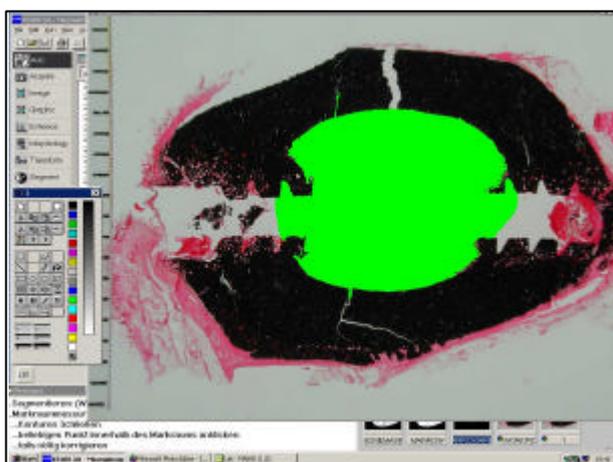


Abb. 16c: Der markierte Markraum wird in diesem Bild durch das Makro grün gefärbt.

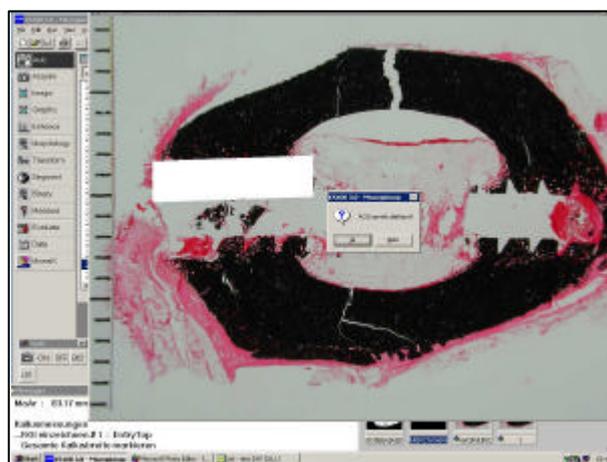


Abb. 16d: Das weiße Rechteck stellt eine von vier ROIs des auszuwertenden Kortex und der periostalen Anteile dar.

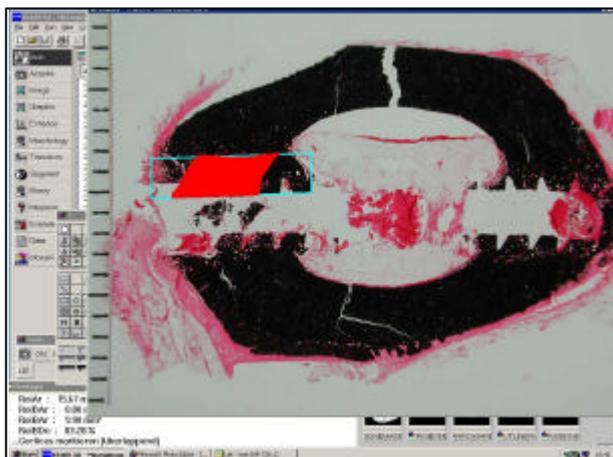


Abb. 16e: Das rot gefärbte Areal stellt die beispielhafte Markierung des auszuwertenden Kortex dar.

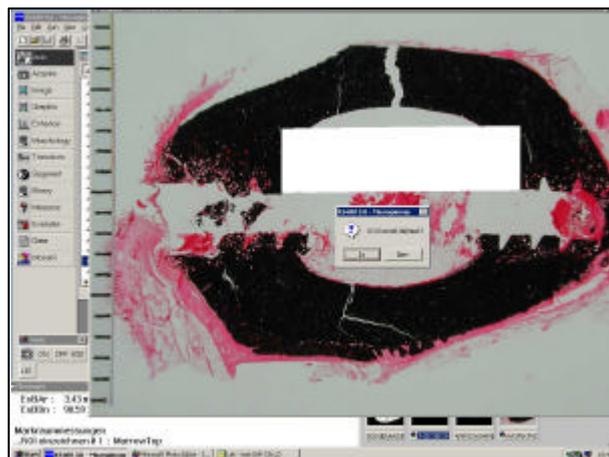


Abb. 16f: Die weiße Fläche schliesst die eine Hälfte der endostalen Kallusanteile für die folgenden Auswertungen mit ein.

Histochemie

Die Zählung der Osteoklasten, die über ihren Gehalt an dem Enzym saure Phosphatase histochemisch sichtbar gemacht wurden, erfolgte manuell unter dem Mikroskop. So war es möglich, die einzelnen Zellen gezielt entlang des Schraubenkanals zu erfassen. Die kortikalen und neuformierten Kallusbereiche (periostal und endostal) wurden getrennt voneinander hinsichtlich des Auftretens dieser mehrkernigen Riesenzellen beurteilt. Die Gesichtsfelder wurden entsprechend zum Scoring in 40-facher Vergrößerung gewählt und es wurden diejenigen Osteoklasten gezählt, die innerhalb der knöchernen Areale (Schraubenzacken und deren unmittelbare knöcherne Umgebung) zu sehen waren. Es wurde auf diese Weise sowohl die durch Osteoklasten gekennzeichnete lakunäre Resorption verkalkten Knochens als auch die durch diese speziellen Zellen bewirkte perforierende Resorption, die entlang der Gefäße im Knochen stattfindet, erfasst. Anschließend wurde die Anzahl der Zellen auf die Anzahl der ausgewerteten Schraubenzacken bezogen.

Diese Untersuchung am Mikroskop wurde von dem Autor dieser Arbeit und einem weiteren unabhängigen Untersucher durchgeführt und die Mittelwerte der Zellzahlen pro histologischem Präparat im untersuchten Areal wurden für die weiteren statistischen Auswertungen verwendet.

3.6 Statistik

Es wird davon ausgegangen, dass die Ergebnisse nicht von den Schraubenpositionen im Knochen abhängen, die einen beschichteten oder unbeschichteten Pin tragen. Der Versuchsaufbau war so angelegt, dass in jedem Versuchstier alle möglichen Kombinationen hinsichtlich der Belastung und Beschichtung der Implantate in dem Knochen gegeben war.

Bei den verschiedenen Analysen stand eine geringere Anzahl Proben zur Verfügung als ursprünglich vorgesehen, da es aufgrund schwieriger Probengewinnung und Aufarbeitungsprozesse zu einer Reihe von „missing data“ (fehlenden Werten) gekommen ist und einige Schraubenkanäle mikrobiologisch und histologisch nicht angemessen ausgewertet werden konnten. Die berechneten Werte der Analysen wurden abgesehen vom Autor von einer weiteren Person gegengemessen, um einen individuellen Messwertfehler auszuschließen. Bei allen Zweifach-Meßwerten wurde der Mittelwert genommen.

Die Evaluierung der **klinischen** und **röntgenologischen** Daten konnte an allen 64 zu untersuchenden Schraubenpositionen vollständig durchgeführt werden.

Mikrobiologische Befunde der Hautabstriche wurden an 43 von 64 möglichen Proben erhoben und die mikrobiologische Analyse der Schraubenoberfläche wurde an 58 von 64 möglichen Proben durchgeführt, die schließlich in die Auswertungen mit einfließen konnten. Sechs mikrobiologische Befunde konnten aufgrund von Pinverlusten während des Versuches (drei) und fehlenden Befundbögen (drei) nicht analysiert werden.

Zur graphischen Darstellung der Ergebnisse wurden die **histologischen**, **histochemischen** und **histomorphometrischen** Daten in das Datenverarbeitungsprogramm SPSS für Windows 10.0 (SPSS Deutschland GmbH, München) übertragen (Die Messungen von zwei voneinander unabhängigen Untersuchern wurden gemittelt).

Die Messergebnisse wurden anschließend in „Box-and-Whisker-Plot“-Graphiken dargestellt. Aus diesen Graphiken sind sowohl die Lage als auch die Streuung der Ergebnisse auf einen Blick ersichtlich. In den „Boxplots“ werden der Median als Querbalken und die Werte, die innerhalb des ersten und des dritten Quartils liegen, durch die Begrenzung der Box angegeben. Innerhalb dieser Perzentile liegen 50 % der gemessenen Werte. Diejenigen Werte, die innerhalb der 1,5-fachen Breite eines Boxplots liegen werden in Form von „Whiskers“ dargestellt. Ausreißer und Extremwerte werden in der Graphik als Kreise und Sterne markiert. Für die Ergebnisse der übrigen Analysen wurden Tabellen und Diagramme in dem Programm EXCEL 97 für Windows erstellt.

In die weitere Datenverarbeitung gingen die gemittelten Werte des histologischen Grading Scores, der histochemischen Osteoklastenidentifizierung und Mehrfachmesswerte einzelner Parameter der bildanalytischen, histomorphometrischen Berechnung in die statistischen Auswertungen ein, die anschließend mit SAS (Version 8.1, Cary NC, USA) berechnet wurden.

In dieser Studie stellen die Faktoren Beschichtung, Belastung und zufällig ausgewählte Schafe einer homogenen Gruppe die **unabhängigen Variablen** dar. Beschichtung und Belastung sind dabei als systematische Einflussfaktoren zu sehen, das individuelle Schaf dagegen als Faktor mit zufälligen Effekten. Da für jedes Tier mehrere Messungen unter den verschiedenen Bedingungen der beiden systematischen Faktoren durchgeführt wurden, ergibt sich innerhalb des zufälligen Faktors Schaf ein zweifaktorielles Design, das sich für den Betrachter in Form vier verschiedener Gruppen darstellt **(1)** unbeschichtet, unbelastet; **(2)** unbeschichtet, belastet; **(3)** beschichtet, unbelastet; **(4)** beschichtet, belastet.

Die zu untersuchenden Parameter der einzelnen Scores bzw. die histochemischen oder bildanalytischen Parameter bilden die **abhängigen Variablen**, die als Zielkriterien oder Zielmerkmale betrachtet werden.

Da sich die Annahme für eine Normalverteilung für die betrachteten Zielmerkmale schwer begründen lässt, wurde ein nichtparametrischer Ansatz nach Brunner (1999) gewählt und die Studie gemäß einer Versuchsanlage (LD-F2) mit longitudinalen Daten für eine homogene Gruppe von Individuen mit zwei „sub-plot“ Faktoren analysiert (Brunner 1999, Modell 2.2 auf S. 26 und Schema 2.2 auf S. 27). Dies entspricht einer zweifaktoriellen **nicht-parametrischen Varianzanalyse für Daten mit Messwiederholungen**. In dem somit verwendeten nicht-parametrischen Marginalmodell wurden Hypothesen über die Rangverteilungen der wiederholten Messungen formuliert und die Effekte der unabhängigen Variablen über eine ANOVA-ähnliche Statistik bewertet.

Die angegebenen p-Werte zeigen die signifikanten Unterschiede der untersuchten Präparatengruppen bei einem festgelegten Signifikanzniveau von 0,05 (5 %) an. Diese Unterschiede charakterisieren die im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Proben und stellen keine allgemein gültigen Aussagen dar.