

Aus dem
Institut für Tierpathologie
des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Freien Universität Berlin
und dem
Julius Wolff Institut, Charité-Universitätsmedizin Berlin

**Rekonstruktion segmentaler Knochendefekte durch
mechanobiologisch modulierte, Laser-gesinterte
Titan Mesh Scaffolds im Großtiermodell**

Radiologische und histologische Evaluation im Schaf

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Veterinärmedizin
an der
Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Claudia Patrycja El-Rawas (geb. Roth)
Tierärztin aus Łódź (Polen)

Berlin 2019
Journal-Nr.: 4145

Aus dem

Institut für Tierpathologie

des Fachbereichs Veterinärmedizin

der Freien Universität Berlin

und dem

Julius Wolff Institut, Charité-Universitätsmedizin Berlin

**Rekonstruktion segmentaler Knochendefekte durch mechanobiologisch modulierte,
Laser-gesinterte Titan Mesh Scaffolds im Großtiermodell**

Radiologische und histologische Evaluation im Schaf

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Grades eines

Doktors der Veterinärmedizin

an der

Freien Universität Berlin

vorgelegt von

Claudia Patrycja El-Rawas (geb. Roth)

Tierärztin aus Łódź (Polen)

Berlin 2019

Journal-Nr.: 4145

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Freien Universität Berlin

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Jürgen Zentek
Erster Gutachter: Univ.-Prof. Dr. Robert Klopffleisch
Zweiter Gutachter: Univ.-Prof. Dr. Georg Duda
Dritter Gutachter: Prof. Dr. Leo Brunnberg

Deskriptoren (nach CAB-Thesaurus):

animal models, sheep, surgical operations, bone fractures, fracture fixation,
implantation, histology, clinical trials

Tag der Promotion: 21.06.2019

Bibliografische Information der *Deutschen Nationalbibliothek*

Die Deutsche Nationalbibliothek verzeichnet diese Publikation in der Deutschen Nationalbibliografie; detaillierte bibliografische Daten sind im Internet über <<https://dnb.de>> abrufbar.

ISBN: 978-3-86387-988-4

Zugl.: Berlin, Freie Univ., Diss., 2019

Dissertation, Freie Universität Berlin

D188

Dieses Werk ist urheberrechtlich geschützt.

Alle Rechte, auch die der Übersetzung, des Nachdruckes und der Vervielfältigung des Buches, oder Teilen daraus, vorbehalten. Kein Teil des Werkes darf ohne schriftliche Genehmigung des Verlages in irgendeiner Form reproduziert oder unter Verwendung elektronischer Systeme verarbeitet, vervielfältigt oder verbreitet werden.

Die Wiedergabe von Gebrauchsnamen, Warenbezeichnungen, usw. in diesem Werk berechtigt auch ohne besondere Kennzeichnung nicht zu der Annahme, dass solche Namen im Sinne der Warenzeichen- und Markenschutz-Gesetzgebung als frei zu betrachten wären und daher von jedermann benutzt werden dürfen.

This document is protected by copyright law.

No part of this document may be reproduced in any form by any means without prior written authorization of the publisher.

Alle Rechte vorbehalten | all rights reserved

© Mensch und Buch Verlag 2019 Choriner Str. 85 - 10119 Berlin
verlag@menschundbuch.de – www.menschundbuch.de

Meinen Eltern

Michael

Sebastian

Gama

Bolek

und

13 Schafen

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	1
Abbildungsverzeichnis	5
Tabellenverzeichnis	9
Abkürzungsverzeichnis	10
1. Einleitung	13
2. Stand der Wissenschaft	15
2.1 Knochen	15
2.2 Knochenentstehung	16
2.3 Frakturen	18
2.3.1 Frakturheilungen	18
2.3.2 Biologie des Kallus	20
2.3.3 Frakturheilungsstörungen	21
2.4 Knochendefekte kritischer Größe	22
2.4.1 Definition	22
2.5 Aktuelle Therapiemöglichkeiten	23
2.5.1 Distractionsosteogenese	24
2.5.2 Autogene Knochentransplantate	24
2.5.3 Allogene Knochentransplantate	25
2.5.4 Vaskularisierte Knochentransplantate	25
2.5.5 Zementspacer und Masquelet-Technik	26
2.6 Tiermodell	26
2.6.1 Tiermodelle in der Knochenforschung	26
2.6.2 Das Schaf	27
2.6.3 Die Tibia	27
2.6.4 Das Osteotomiemodell	27
2.7 Titan Mesh Scaffold	28
2.8 Ziele und Hypothesen dieser Studie	29

Inhaltsverzeichnis

3. Material und Methoden.....	31
3.1 Versuchstiere	31
3.1.1 Haltung und Fütterung.....	31
3.1.2 Gruppeneinteilung	32
3.2 Operatives Vorgehen und Materialeinsatz	33
3.2.1 Titan Mesh Scaffold.....	33
3.2.2 AO-Platte.....	34
3.2.3 Narkose und Operationsvorbereitung	36
3.2.4 Operatives Vorgehen	37
3.3 Nachsorge	44
3.3.1 Röntgenkontrollen	45
3.4 Probengewinnung	46
3.4.1 Euthanasie und Probengewinnung	46
3.5 Präparataufbereitung für die histologische Auswertung.....	48
3.5.1 Fixierung und Aufbereitung	48
3.5.2 Sägen der Knochenproben	48
3.5.3 Aufbereitung für die Kunststoffeinbettung	51
3.5.4. Kunststoffeinbettung.....	51
3.5.5 Vorbereitung der Schliffpräparate	54
3.6 Histologische Färbungen der Gewebeschnitte.....	56
3.6.1 Safranin Orange/von Kossa-Färbung.....	56
3.7 Auswertung der Gewebeschnitte	56
3.7.1 Digitalisierung der histologischen Präparate	56
3.7.2 Histomorphologische Evaluation der histologischen Präparate	57
3.7.3 Definition der Region of Interest der Präparate	58
3.7.4 Histomorphometrische Analyse der histologischen Präparate	58
3.8 Statistik	61

4. Ergebnisse	62
4.1 Operations- und Standzeitbefunde.....	62
4.2 Ergebnisse der Radiologie	63
4.3 Ergebnisse der Histologie	75
4.3.1 Histomorphologische Evaluation	75
4.4 Ergebnisse der histomorphometrischen Analyse	83
4.4.1 Gewebeverteilung in der Gesamt-ROI	83
4.4.2 Mediale-ROI	87
4.4.3 Laterale-ROI	91
4.4.4 Markraum-ROI.....	95
4.4.5 Mediale Struts-ROI.....	98
4.4.6 Laterale Struts-ROI	101
4.5 Zusammenfassung der Ergebnisse.....	105
4.5.1 Operations- und Standzeitbefunde.....	105
4.5.2 Radiologie	105
4.5.3 Deskriptive Histologie	106
4.5.4 Histomorphometrie	106
5. Diskussion	108
5.1 Diskussion von Material und Methoden	109
5.1.1 Untersuchungsmodell.....	109
Tiermodell.....	109
Schafmodell.....	110
Heilungszeit.....	111
Kritischer Defekt	111
Osteosynthese- Technik.....	112
5.1.2 Titan Mesh Scaffold.....	113
5.1.3 Gewinnung und Applikation der autologen Spongiosa.....	115
5.1.4 Entnahme und Aufarbeitung der Proben	116

Inhaltsverzeichnis

5.1.5 Safranin Orange/von Kossa-Färbung	117
5.1.6 Histomorphologische Auswertung	118
5.1.7 Histomorphometrische Auswertung	118
5.2 Diskussion der Ergebnisse	118
5.2.1 Röntgen	118
5.2.2 Histomorphologie und Histomorphometrie	120
5.2.3 Vergleich mit anderen Studien	124
5.2.4 Schlussfolgerung	126
Zusammenfassung	129
Summary	131
Literaturverzeichnis	133
Anhang	143
Publikationen	144
Danksagung	145
Selbständigkeitserklärung	146

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Darstellung eines Schafes auf einem Heuballen im Gurtsystem post operationem.....	32
Abbildung 2: Darstellung eines Titan Mesh Scaffolds im Querschnitt.....	34
Abbildung 3: Darstellung des steifen (links) und des weichen (rechts) Titan Mesh Scaffolds.	34
Abbildung 4: Darstellung der AO-Platte.	35
Abbildung 5: Darstellung des Operationsfeldes am rechten Beckenkamm.	38
Abbildung 6: Darstellung der autologen Spongiosa nach dem Zermahlen in der Knochenmühle.....	39
Abbildung 7: Darstellung einer mit autologer Spongiosa befüllten Meshstruktur des Titan Mesh Scaffolds.	39
Abbildung 8: Mediale Darstellung der Schafstibia nach erfolgter Lagerung, Schur und Rasur.	40
Abbildung 9: Mediale Darstellung der rechten, freipräparierten Tibia.	41
Abbildung 10: Mediale Darstellung der eingesetzten AO-Platte mit aufgesetzter Sägeschablone.....	42
Abbildung 11: Mediale Darstellung des herausgesägten 40 mm großen Osteotomiefragments.	42
Abbildung 12: Mediale Darstellung des Osteotomiespalt. Osteotomiespalt nach Entfernung des herausgenommenen 40 mm Knochenfragments.....	42
Abbildung 13: Darstellung des entnommenen 40 mm großen Knochenfragments aus dem Tibiaschaft und des mit autologer Spongiosa befüllten Titan Mesh Scaffolds.	43
Abbildung 14: Aufsicht auf den Titan Mesh Scaffold.....	43
Abbildung 15: Mediale Darstellung des Osteotomiespalt mit eingesetzter AO-Platte und eingesetztem Titan Mesh Scaffold.	44
Abbildung 16: Röntgenaufnahmen der operierten Schafstibia in zwei Ebenen.	46
Abbildung 17: Freipräparierte Tibia post mortem mit entfernten, an den Defekt grenzenden Schrauben.	47
Abbildung 18: Fixierung der Tibia in der wassergekühlten Säge, zur Entfernung des proximalen und distalen Tibiaendes.	49
Abbildung 19: Aufsicht auf die proximo-kraniale Kortikalis mit medialem Orientierungspunkt.	49
Abbildung 20: Durchführung des Sägeschnitts von medial nach lateral.	50
Abbildung 21: Darstellung der beiden Titan Mesh Scaffoldhälften nach durchgeführtem zentralen Sägeschnitt.	50

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 22: Beispielhafte Darstellung eines histologischen Präparates in kombinierter Safranin Orange/von Kossa-Färbung in horizontaler Ausrichtung.	57
Abbildung 23: Darstellung der einzelnen ROIs eines in kombinierter Safranin Orange/von Kossa- Färbung angefärbten histologischen Präparates.	58
Abbildung 24: Darstellung eines histologischen in kombinierter Safranin Orange/von Kossa gefärbten Präparates mit Einzeichnen der Vektoren.....	59
Abbildung 25: Darstellung eines histologischen in kombinierter Safranin Orange/von Kossa gefärbten Präparates.....	60
Abbildung 26: Darstellung einer postoperativen röntgenologischen Aufnahme eines Tieres der Gruppe mit dem weichen Titan Mesh Scaffold.....	64
Abbildung 27: Röntgenologische Aufnahmen eines Tieres der Gruppe mit dem weichen Titan Mesh Scaffold.....	65
Abbildung 28: Röntgenologische Aufnahmen eines Tieres der Gruppe mit dem weichen Titan Mesh Scaffold.....	66
Abbildung 29: Röntgenologische Aufnahmen eines Tieres der Gruppe mit dem weichen Titan Mesh Scaffold.....	67
Abbildung 30: Röntgenologische Aufnahmen eines Tieres der Gruppe mit dem weichen Titan Mesh Scaffold.....	68
Abbildung 31: Röntgenologische Aufnahmen eines Tieres der Gruppe mit dem steifen Titan Mesh Scaffold.....	69
Abbildung 32: Röntgenologische Aufnahmen eines Tieres der Gruppe mit dem steifen Titan Mesh Scaffold.....	70
Abbildung 33: Röntgenologische Aufnahmen eines Tieres der Gruppe mit dem steifen Titan Mesh Scaffold.....	71
Abbildung 34: Röntgenologische Aufnahmen eines Tieres der Gruppe mit dem steifen Titan Mesh Scaffold.....	72
Abbildung 35: Röntgenologische Aufnahmen eines Tieres der Gruppe mit dem steifen Titan Mesh Scaffold.....	73
Abbildung 36: Röntgenologische Aufnahmen eines Tieres der Gruppe mit dem steifen Titan Mesh Scaffold.....	74
Abbildung 37: (A-F) Histologische Präparate in kombinierter Safranin Orange/von Kossa-Färbung (n=6), der Gruppe mit dem weichen Titan Mesh Scaffold nach 24 Wochen....	77
Abbildung 38: (A-F) Histologische Präparate in kombinierter Safranin Orange/von Kossa-Färbung (n=6), der Gruppe mit dem steifen Titan Mesh Scaffold nach 24 Wochen.	78
Abbildung 39: Mikroskopische Darstellung eines histologischen Präparates in kombinierter Safranin Orange/von Kossa-Färbung der Gruppe mit dem weichen Titan Mesh Scaffold.	79

Abbildung 40: Mikroskopische Darstellung eines histologischen Präparates in kombinierter Safranin Orange/von Kossa-Färbung der Gruppe mit dem weichen Titan Mesh Scaffold.	80
Abbildung 41: Histologisches Präparat einer Schafstibia in kombinierter Safranin Orange/von Kossa-Färbung eines Tieres der Gruppe mit dem weichen Titan Mesh Scaffold.	80
Abbildung 42: Histologisches Präparat einer Schafstibia in kombinierter Safranin Orange/von Kossa-Färbung eines Tieres der Gruppe mit dem weichen Titan Mesh Scaffold.	81
Abbildung 43: Histologisches Präparat einer Schafstibia in kombinierter Safranin Orange/von Kossa-Färbung eines Tieres der Gruppe mit dem weichen Titan Mesh Scaffold.	81
Abbildung 44: Histologisches Präparat einer Schafstibia in kombinierter Safranin Orange/von Kossa-Färbung der Gruppe mit dem weichen Titan Mesh Scaffold.	82
Abbildung 45: Beispielhafte Darstellung der Gesamt-ROI in einem histologischen Präparat in kombinierter Safranin Orange/von Kossa-Färbung eines Tieres der Gruppe mit dem steifen Titan Mesh Scaffold.	83
Abbildung 46: Darstellung des Anteils der Knochenfläche [%] in der Gesamt-ROI (n=6 pro Gruppe).	84
Abbildung 47: Darstellung des Anteils der Knorpelfläche [%] in der Gesamt-ROI (n=6 pro Gruppe).	85
Abbildung 48: Darstellung des Anteils der Bindegewebsfläche [%] in der Gesamt-ROI (n=6 pro Gruppe).	86
Abbildung 49: Beispielhafte Darstellung der Medialen-ROI in einem histologischen Präparat in kombinierter Safranin Orange/von Kossa-Färbung eines Tieres der Gruppe mit dem steifen Titan Mesh Scaffold.	87
Abbildung 50: Darstellung des Anteils der Knochenfläche [%] in der Medialen-ROI (n=6 pro Gruppe).	88
Abbildung 51: Darstellung des Anteils der Knorpelfläche [%] in der Medialen-ROI (n=6 pro Gruppe).	89
Abbildung 52: Darstellung des Anteils der Bindegewebsfläche [%] in der Medialen-ROI (n=6 pro Gruppe).	90
Abbildung 53: Beispielhafte Darstellung der Lateralen-ROI in einem histologischen Präparat in kombinierter Safranin Orange/von Kossa-Färbung eines Tieres der Gruppe mit dem steifen Titan Mesh Scaffold.	91
Abbildung 54: Darstellung des Anteils der Knochenfläche [%] in der Lateralen-ROI (n=6 pro Gruppe).	92
Abbildung 55: Darstellung des Anteils der Knorpelfläche [%] in der Lateralen-ROI (n=6 pro Gruppe).	93

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 56: Darstellung des Anteils der Bindegewebsfläche [%] in der Lateralen-ROI (n=6 pro Gruppe).	94
Abbildung 57: Beispielhafte Darstellung der Markraum-ROI in einem histologischen Präparat in kombinierter Safranin Orange/von Kossa-Färbung eines Tieres der Gruppe mit dem steifen Titan Mesh Scaffold.	95
Abbildung 58: Darstellung des Anteils der Knochenfläche [%] in der Markraum-ROI (n=6 pro Gruppe).	96
Abbildung 59: Darstellung des Anteils der Bindegewebsfläche [%] in der Markraum-ROI (n=6 pro Gruppe).	97
Abbildung 60: Beispielhafte Darstellung der Medialen Struts-ROI in einem histologischen Präparat in kombinierter Safranin Orange/von Kossa-Färbung eines Tieres der Gruppe mit dem steifen Titan Mesh Scaffold.	98
Abbildung 61: Darstellung des Anteils der Knochenfläche [%] in der Medialen Struts-ROI (n=6 pro Gruppe).	99
Abbildung 62: Darstellung des Anteils der Bindegewebsfläche [%] in der Medialen Struts-ROI (n=6 pro Gruppe).	100
Abbildung 63: Beispielhafte Darstellung der Lateralen Struts-ROI in einem histologischen Präparat in kombinierter Safranin Orange/von Kossa-Färbung eines Tieres der Gruppe mit dem steifen Titan Mesh Scaffold.	101
Abbildung 64: Darstellung des Anteils der Knochenfläche [%] in der Lateralen Struts-ROI (n=6 pro Gruppe).	102
Abbildung 65: Darstellung des Anteils der Knorpelfläche [%] in der Lateralen Struts-ROI (n=6 pro Gruppe).	103
Abbildung 66: Darstellung des Anteils der Bindegewebsfläche [%] in der Lateralen Struts-ROI (n=6 pro Gruppe).....	104

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Gruppeneinteilung mit dazugehörigem Titan Mesh Scaffold.....	33
Tabelle 2: Aufsteigende Alkoholreihe.....	51
Tabelle 3: Übersicht der Lösungskomponenten.....	54
Tabelle 4: Darstellung der Gewebeanteile in der Gesamt-ROI in relativen Zahlen (%).	86
Tabelle 5: Darstellung der Gewebeanteile in der Medialen-ROI in relativen Zahlen (%).	90
Tabelle 6: Darstellung der Gewebeanteile in der Lateralen-ROI in relativen Zahlen (%).	94
Tabelle 7: Darstellung der Gewebeanteile in der Markraum-ROI in relativen Zahlen (%).	97
Tabelle 8: Darstellung der Gewebeanteile in der Medialen Struts-ROI in relativen Zahlen (%).	100
Tabelle 9: Darstellung der Gewebeanteile in der Lateralen Struts-ROI in relativen Zahlen (%).	104
Tabelle 10: Färbeprotokoll Safranin Orange/von Kossa-Färbung.....	143

Abkürzungsverzeichnis

A.	Arteria
Abb.	Abbildung
AG	Arbeitsgemeinschaft
Aqua dest.	Aqua destilata
AO	Gesellschaft mit beschränkter Haftung
C	Celsius
ca.	circa
cm	Centimeter
CSD	Critical Size Defect
D	Dynamisierungsschraube
EMB	Electron Beam Melting
FEM	Finite-Element-Methode
Fi	Fixierungsschraube
et al.	et alii
g	Gramm
GfKn	Geflechtknochen
GmbH	Gesellschaft mit beschränkter Haftung
GPa	Gigapascal
h	Stunde
i.v.	intravenös
KoKn	kortikaler Knochen
Kno	hyaliner Knorpel

kV	Kilovolt
l	Liter
LCP	Locking Compression Plate
mA	Milliampere
max	Maximum
MPa	Megapascal
MTL	Medizinisch-Technischen-Labor
mg	Milligramm
ml	Milliliter
min	Minimum
mm	Millimeter
mm ²	Quadratmillimeter
MSD	Merck Sharp & Dohme
μ	mikro
μm	Mikrometer
n	Anzahl
Na	Natrium
NaCl	Natriumchlorid
OP	Operation
PMMA	Polymethylmethacrylat
pH	potentia Hydrogenii
p	p-Wert, Signifikanzwert
ROI	Region of Interest, Region von Interesse
s.c.	subcutan
Std.	Stunde

Abkürzungsverzeichnis

Tab.	Tabelle
TV	Technovit®
V.	Vena
Vol.-%	Volumenprozent
°	Grad
%	Prozent
z.B.	zum Beispiel

1. Einleitung

Segmentale Knochendefekte werden durch Traumata, die durch starke Kräfte, wie hohe Geschwindigkeiten entstehen, Infektionen, Tumordestruktion und –resektion verursacht (Reichert 2009; Schmidt-Bleek 2012). Die Rekonstruktion und eine ausreichende Wiederherstellung der biomechanischen meta- und diaphysären Kontinuität stellen eine der größten chirurgischen Herausforderungen dar (Blick 1989; Berner 2012; Razi 2015; König 2016). Dabei besitzt der Erhalt der Gliedmaße und deren Funktionalität die oberste Priorität. Bei einer ungestörten Frakturheilung kommt es zur kompletten Wiederherstellung der Form und Funktion des betroffenen Knochens. Da die Frakturheilung ein multifaktorieller Prozess ist, können Störungen im Heilungsverlauf zu verzögerter oder fehlender Heilung führen (Haas 2000, Peters 2010). Knochendefekte kritischer Größe werden definiert als Defekte, bei denen der Knochenverlust zwei- bis zweieinhalb Mal größer ist als der Durchmesser des betroffenen Knochens (Schmitz 1986, Gugala 1999, Gugala Z.; Lindsey RW; S. 2007, Gugala 2007, Reichert 2009). Dieser heilt nicht zu Lebzeiten des Individuums bzw. es treten weniger als 10% knöcherner Regeneration auf (Schmitz 1986, Hollinger 1990). Zu den möglichen Verfahren der Behandlung von Knochendefekten kritischer Größe, zählen die Distractionsosteogenese (Ilizarov 1989, Cierny 1994), Endoprothesen sowie die Masquelettechnik mit Einsatz eines Zementspacers (Ilizarov 1989, Masquelet 2010, Chadayammuri 2015). Autogene, allogene Knochentransplantate und autogene vaskularisierte Transplantate stellen die Methoden der Wahl dar und gelten als „Gold Standard“ bei der Behandlung von Defekten in gewichttragenden Knochen (Hollinger 1990; Gugala 2002; Attias 2005; Keating 2005; Gugala Z.; Lindsey RW; S. 2007; Domic-Cule 2015). Zusätzlich werden bei der Behandlung kritischer Knochendefekte interne und externe Stabilisierungsverfahren eingesetzt (Stürmer 1984). Laut klinischer Erfahrung sind Knochendefekte kritischer Größe durch die vorliegenden Verfahren unzureichend behandelbar (Perry 1999, Reichert 2009). Faktoren, wie die Graftverfügbarkeit und die herausfordernden zusätzlichen chirurgischen Eingriffe, sowie die Entnahmemorbidität stellen limitierende Faktoren dar (Hertel 1994). Um die klinische Herausforderung der Behandlung von Defekten kritischer Größe zu beheben, werden neue, zuverlässige Methoden entwickelt (Giannoudis 2008; Schell 2008). Das Implantieren von dreidimensionalen und patientenspezifischen Titan Mesh Scaffolds stellt eine erfolgsversprechende Behandlungsmethode dar (Cobos 2000). Dabei wird die 3D Struktur des Knochendefektes zunächst computertomografisch erfasst und der Defekt rekonstruiert. Anschließend wird der Titan Mesh Scaffold mit Hilfe der erfassten Daten erstellt und mittels Laser-Sinterungstechnik hergestellt. Somit dient jener als ein patientenspezifischer, maßgeschneiderter und defektfüllender Titanspacer (Razi 2012). Der Einsatz des patientenspezifischen Titan Mesh

Einleitung

Scaffolds an humanen Patienten wurde in der Unfallchirurgie der Charité bereits durchgeführt (Pobloth 2018). Die Ergebnisse der Studie bezüglich der bemessenen Knochendicke auf der Scaffoldoberfläche in bildgebenden Verfahren waren erfolgsversprechend. Der Einsatz des Titan Mesh Scaffolds am humanen Patienten erlaubte jedoch keine standardisierten Aussagen, da die Patienten verschiedene Defektgrößen und verschiedene Knochenbeschaffenheiten, abhängig von der Ursache des Defektes, wie Infektion, Tumor oder Unfall, aufwiesen. Zudem unterschieden sich die betroffenen Knochen. Die vorliegende Studie prüft, ob der Einsatz eines Titan Mesh Scaffolds in Kombination mit einem experimentellen winkelstabilen Plattensystem für einen kritischen Defekt von 40 mm Größe als Stabilisierungstechnik geeignet ist. Zudem soll der Einsatz zweier Titan Mesh Scaffolds mit unterschiedlichen Steifigkeiten evaluiert werden. Dabei soll untersucht werden, ob eine geringere Steifigkeit den Regenerationsprozess zu einer fortgeschrittenen Knochenregeneration führt. Darüber hinaus kann die Untersuchung der Knochenbildung im Markraum des Titan Mesh Scaffolds nicht am humanen Patienten durchgeführt werden. Somit können zum einen keine detaillierten histologischen Aussagen getroffen werden, ob eine mechanobiologische Optimierung des Titan Mesh Scaffolds den Regenerationsprozess beeinflusst und ob der Titan Mesh Scaffold als Leitstruktur für eine Knochendurchwachsung durch den Scaffoldmarkraum dient. Aufgrund der vorliegenden offenen Fragen wurde das Schaf für diese Studie als Modelltier herangezogen. Das Schaf hat sich als Modelltier in der Erforschung der Knochenheilung etabliert. Die Schafstibia stellt einen langen Röhrenknochen mit gleichmäßiger Oberfläche dar, die dem Menschen ähnliche biomechanische Eigenschaften und Knochenheilungseigenschaften aufweist (Newman 1995; Pearce 2007; Hahn 2011). In dieser Studie wurden zwei strukturell gleiche, mechanisch stabile Titan Mesh Scaffolds mit unterschiedlichen Steifigkeiten in Kombination mit einem winkelstabilen experimentellen Plattensystem in einen kritischen 40 mm großen Osteotomiedefekt im standardisierten Versuchsmodell an der Schafstibia eingesetzt. Im Versuchsverlauf von 24 Wochen wurden an unterschiedlichen Heilungszeitpunkten röntgenologische Kontrollaufnahmen angefertigt, nach beendeter Versuchsdauer wurden histomorphologische, sowie histomorphometrische Untersuchungsergebnisse erfasst und ausgewertet.

2. Stand der Wissenschaft

2.1 Knochen

Das Skelettsystem setzt sich aus Knochen, Knorpeln, Bändern und Gelenken zusammen. Das Knochensystem erfüllt zum einen eine strukturelle Funktion, indem es als Schutz und Unterstützung sowohl für die inneren Organe als auch für das Knochenmark dient.

Des Weiteren bildet es den passiven Bewegungsapparat, da es aufgrund der Muskel- und Sehnenbefestigung mit dem aktiven Bewegungsapparat verknüpft ist und somit bei der Fortbewegung eine wichtige Rolle spielt. Zum anderen erfüllt es eine metabolische Funktion als Speicherort für Calcium und Phosphor (Liebich 1993; Remedios 1999; Webb 2000; Hadjidakis 2006). Knochen baut sich auf, wenn er belastet wird und nimmt an Festigkeit zu. Wohingegen er bei fehlender oder geringer Belastung abgebaut wird. Der Knochen passt demnach seine Form der Belastung an und degeneriert bei dauerhafter Entlastung (Simmons 1985; Wolff 1991; Wolf 1995; Webb 2000). Knochen hat im Gegensatz zum Knorpel eine gute Gefäßversorgung, Knorpel verfügt hingegen über keine und wird mittels Diffusion aus der Synovia erhalten (Shapiro 2008). Der Knochenumbau ist ein komplexer Vorgang. Altes Knochengewebe wird von Osteoklasten abgebaut und durch neues ersetzt. Der Vorgang obliegt sowohl zellulären, biochemischen als auch mechanischen Faktoren und findet das ganze Leben über statt (Noble 2000; Hadjidakis 2006; Oest 2007). Knochen (Ossa) bestehen aus dem Knochengewebe, welches das Knochenmark (Medulla ossium), Gefäße und Nerven beinhaltet und von der inneren Knochenhaut (Endost) sowie der äußeren Knochenhaut (Periost) umgeben wird. Das Periost fungiert zum einen als Schutz, zum anderen als Ursprung von Gefäßen und Nerven. Es besteht aus zwei Schichten, der inneren kollagenen, gefäß- und nervenreichen Schicht (Stratum osteogenicum) und der äußeren Fibroblasten ähnlichen Schicht (Stratum fibrosum) (McKibbin 1978; Budras 1996; Rohen 2000). Die Zellen der äußeren Schicht proliferieren zu Osteoblasten und sind Ausgangspunkt der Knochenregeneration. Das Endost stellt eine dünne Schicht aus abgeflachten Bindegewebszellen, mit Vorläuferzellen von Osteoblasten, einigen Osteoblasten und -klasten dar, die in das retikuläre Bindegewebe des Knochenmarks übergeht. Der Gehalt an anorganischen Substanzen, wie Kalziumphosphat und Kalziumkarbonat mit geringem Gehalt an Natrium-, Magnesium- und Fluorsalzen im Knochen beträgt 60-70%. Der Gehalt an organischen Bestandteilen, wie kollagenen Fasern und spezifischen Proteoglykanen liegt bei 30-40% (Liebich 1993; Budras 1996; Rohen 2000; Webb 2000).

Zu den unterschiedlichen Knochenformen zählen die langen (Röhren), kurzen (Fuß- und Handwurzel), platten (Schädel) und irregulären Knochen (Wirbel) (Budras 1996). Die langen

Knochen werden auch als Röhrenknochen bezeichnet, zu ihnen gehört unter anderem die Tibia. Die Tibia besteht aus dem Knochenkörper (Corpus), der Diaphyse, welche innen eine Markhöhle (Cavum medullare) beinhaltet und von einem dichten Knochenmantel (Substantia compacta) umgeben wird. Die proximalen und distalen Endstücke (Epiphysen) beinhalten einen verknöcherten, porösen Schwamm (Substantia spongiosa), der von einer dünnen Knochenrinde überzogen wird (Substantia corticalis) (Liebich 1993; Budras 1996; Shapiro 2008). In der Substantia spongiosa lässt sich ein trajektorieller Aufbau erkennen. Die Spongiosabälkchen, -lamellen oder -tubuli verlaufen in Richtung von Druck- und Zuglinien (Wolff 1991; Wolf 1995; Budras 1996; Rohen 2000). Der Geflechtknochen (Os membranaceum reticulo fibrosum) stellt die einfachste Form von Knochen dar und entsteht, wenn Zug- und Druckeinflüsse über einen längeren Zeitraum auf Bindegewebe einwirken. Er ist reich an Osteozyten, deren Verteilung in der knöchernen Matrix ohne erkennbare Ordnung erfolgt und kann als verknöchertes Bindegewebe angesehen werden (Noble 2000; Shapiro 2008). Er entwickelt sich sowohl bei der embryonalen Knochenentwicklung als auch bei der Knochenneubildung und wird durch Lamellenknochen ersetzt (Os membranaceum lamellosum). Der Lamellenknochen ist deutlich an parallel verlaufenden kollagenen Fibrillen, die als Lamellen bezeichnet werden und sich mit Lagen von Osteozyten abwechseln, erkennbar. Er wird langsamer als Geflechtknochen gebildet und ist durch das Bauprinzip des Osteons gekennzeichnet. Das Osteon besteht aus einem Havers-Kanal, mit Havers-Gefäß und Nerven, der von konzentrisch geschichteten Lamellen umgeben wird. Die Gefäße der einzelnen Osteone stehen durch Volkmannsche Kanäle in Verbindung zueinander. Zwischen den Lamellen befinden sich Reste ehemaliger Osteone, die als Schalllamellen bezeichnet werden (Liebich 1993; Noble 2000; Rohen 2000; Webb 2000; Platzer 2009).

2.2 Knochenentstehung

Während der Embryogenese spricht man von einer desmalen (direkten) Ossifikation, wenn der Knochen ohne knorpelige Zwischenstufe direkt aus mesenchymalen Bindegewebszellen entsteht. Findet eine Knochenbildung mit knorpeliger Zwischenstufe statt, so spricht man von einer chondralen (indirekten) Ossifikation (Liebich 1993). Die mesenchymalen Osteoprogenitorzellen differenzieren während der direkten Ossifikation zu knochenbildenden Osteoblasten, diese sezernieren eine nicht verkalkte Vorstufe des Knochengewebes, das sog. Osteoid (Rohen 2000; Shapiro 2008). Das Osteoid besteht aus kollagenen Faserbündeln und einer spezifischen proteoglykanreichen, interzellulären Grundsubstanz. Das Osteoid wandelt sich durch Mineralisierung der Grundsubstanz zum verkalkten Ossein um. Die Osteoblasten werden von primären Knochenbälkchen aus

mineralisiertem Geflechtknorpel umgeben und durch diesen Prozess auseinander gedrängt. Sie reifen zu Osteozyten (Noble 2000; Rohen 2000; Shapiro 2008). Die Osteozyten befinden sich demnach zwischen den mineralisierten Faserbündeln, sie synthetisieren kollagene Bindegewebsfasern sowie ungeformte Interzellularsubstanzen als Zwischenmatrix und sind in Form eines zytoplasmatischen Netzwerkes miteinander verbunden. Osteoklasten, die sich in den Howship-Lakunen befinden, sind zuständig für den Knochenabbau. Durch das Einwandern von Blutgefäßen zwischen die Knochenbälkchen werden Knochenumbauvorgänge gewährleistet, wodurch das Knorpelgewebe funktionell anpassungs- und regenerationsfähig bleibt (Liebich 1993; Budras 1996; Rohen 2000).

Bei der indirekten Ossifikation findet der Umbau eines knorpelig vorgeformten Primordialskeletts zu Knochen statt. Der Knorpel dient zum einen als Platzhalter und zum anderen als Grundlage für das Längenwachstum (McKibbin 1978; Liebich 1993; Budras 1996). Es erfolgen zwei Differenzierungsphasen. Zuerst erfolgt die perichondrale Ossifikation im Bereich des Diaphysenschafts, dieser Schritt verläuft ähnlich der desmalen Ossifikation. Dabei entsteht unterhalb der Knorpelhaut (Perichondrium), die im Anschluss zum Periost wird, eine gürtelförmige Knochenmanschette. Das zuvor gebildete knorpelige Primordialskelett besteht aus säulenartig angeordnetem hyalinen Knorpel und wird von der Knochenmanschette umschlossen. Die Ernährung der Chondrozyten in dem Knorpelgerüst wird zum einen durch die Knochenmanschette und zum anderen durch Verkalkung der Knorpelmatrix erschwert, was Hypertrophie, Degeneration und Nekrose der Chondrozyten nach sich zieht (Liebich 1993). Durch die Knochenmanschette verlaufen Blutgefäße, über die Chondroblasten ankommen und den Knorpel abbauen. Es folgt die enchondrale Ossifikation, bei der Blutkapillaren und Bindegewebe in die entstandenen Freiräume gelangen und das primäre Knochenmark (primäre Knochenmarkshöhle) bilden. Der anschließende Umbau des Bindegewebes zu hämoretikulärem Gewebe führt zur Bildung des roten Knochenmarks (sekundäres Mark). Bei der enchondralen Ossifikation lässt sich ein primärer Verknöcherungsherd in der zentralen Diaphyse und zwei sekundäre Verknöcherungskerne in den Epiphysen erkennen (Liebich 1993). Prinzipiell findet die enchondrale Ossifikation in den Epiphysen statt, die perichondrale Ossifikation hat ihren Ausgang in der Diaphyse und beschränkt sich auf diese. Zwischen der Diaphyse und Epiphyse befindet sich der Epiphysenfugenknorpel, welcher für das Längenwachstum zuständig ist (Platzer 2009). An dem verkalkten Grundgerüst lagern Osteoblasten an und mauern sich unter Bildung von Knochenmatrix in primäre Knochenbälkchen, aus primitivem Geflechtknochen, ein. Osteoklasten und –blasten bauen dieses dann anschließend in sekundäre Knochenbälkchen (Lamellenknochen) um (Budras 1996).

2.3 Frakturen

Von einer Fraktur spricht man, wenn die Kontinuität des Knochens oder Knorpels durch eine Belastung, die über dessen Elastizitätsgrenze hinausgeht, vollständig unterbrochen wird und dabei ein Funktionsverlust und eine Schädigung des Weichteilgewebes einhergehen (Niemand 2012). Eine Fraktur tritt auf, wenn die Grenze der Knochenbelastung überschritten wird und diese Verletzung eine Kaskade an Reaktionen zur Wiederherstellung des Gewebes hervorruft (Simmons 1985). Von einer direkten Fraktur spricht man, wenn der Knochen durch eine äußere Gewalteinwirkung im Bereich der Krafteinwirkung bricht. Findet der Bruch hingegen entfernt von der Krafteinwirkung statt, verursacht von internen Hebelkräften wie Drehung, Stauchung, Abriss oder Biegung, so spricht man von einer indirekten Fraktur. Pathologische Frakturen entstehen ohne Gewalteinwirkung bei Osteoporose, Osteogenesis imperfecta, Knochentumoren, Metastasen und krankhaften Knochen. Hinzu kommen Ermüdungsfrakturen, die bei gleichförmigen, persistierenden, mechanischen Überbeanspruchungen auftreten. Müller entwickelte eine einheitliche und systematische Einteilung von Frakturen, diese ist heutzutage als „AO/OTA Classification of Fractures and Dislocations“ bekannt (Müller 1990; Niethard 2014).

2.3.1 Frakturheilungen

Bei der Knochenheilung findet eine Regeneration des Gewebes statt, dabei kommt es zur vollständigen strukturellen und funktionellen Wiederherstellung durch Bildung der ursprünglichen Gewebeform ohne Narbenbildung (Marsell 2011; Schmidt-Bleek 2015). Die Frakturheilung ist eine lokale Reaktion, die zur Wiederherstellung der Gewichtstragbarkeit führt und sowohl eine generalisierte als auch zelluläre Reaktion umfasst (Simmons 1985). Im Prinzip finden die gleichen Mechanismen wie bei der Knochenentstehung statt, mit dem Unterschied, dass die Frakturheilung abhängig von den biomechanischen Gegebenheiten ist (Shapiro 2008; Cipitria 2012). Der geschädigte Knochen wird durch Bildung von neuem Knochen, sowohl strukturell als auch funktionell wiederhergestellt. Grundsätzlich besitzt das Knochengewebe eine gute Heilungstendenz und heilt unter günstigen Umständen spontan (Perry 1999; Giannoudis 2007). Dennoch tritt bei 5-10% der klinischen Fälle eine Verzögerung oder ein Ausbleiben der Knochenheilung auf. Der Schlüssel zu einer erfolgreichen Heilung und Regeneration ist die Revaskularisierung und Zellkommunikation. Das Umbilden von vorläufigem Geflechtknochen zu Lamellenknochen, um die maximale Knochenstärke zu erreichen spielt ebenfalls eine große Rolle (McKibbin 1978; Einhorn 1998; Einhorn 1998; Giannoudis 2007; Shapiro 2008; Marsell 2011; Schmidt-Bleek 2015).

Es können zwei Arten der Frakturheilung unterschieden werden: die direkte und die indirekte Knochenheilung (Giannoudis 2007). Laut Urist ist die Heilungsdauer je nach Heilungsart und Defektgröße unterschiedlich. Bei direktem Kontakt (Defektgröße unter 0,5 cm) dauert die Heilung zwischen sechs und neun Monaten. Liegt ein Defekt vor, der größer als 0,5 cm ist,

so beträgt die Heilungsdauer zwischen 12 und 18 Monaten. Ein Defekt über 1 cm nimmt laut Urist zwischen 18 und 24 Monaten in Anspruch (Urist 1954).

Bei der direkten Frakturheilung findet eine Kontaktheilung ohne eine knorpelige Zwischenstufe und ohne Kallusbildung statt. Dies tritt in zwei Fällen auf: erstens bei einer korrekten anatomischen Repositionierung und absoluten Stabilisierung der Fraktur, sowie zweitens bei Frakturen am Schädelknochen, wo ohnehin eine limitierte Bewegung der knöchernen Struktur stattfindet. Neben der Plattenosteosynthese, kann eine Stabilität durch eine Fixateur-extern-Osteosynthese mit interfragmentären Zugschrauben oder eine stabile Zugschraubenosteosynthese erreicht werden (Stürmer 1984; Simmons 1985; Shapiro 2008). Werden die Fragmente mit einer hohen Kompressionskraft aufeinandergepresst, sodass keine Bewegung stattfindet, wandern Osteoklasten durch den Frakturspalt und erzeugen Hohlräume. Diese werden von Osteoblasten besiedelt, es entstehen überbrückende Osteone, die zu lamellären Knochen reifen (Simmons 1985; Schmidt-Bleek 2014). Bedeutend hierbei ist die Gewährleistung einer stabilen Fixation und einer uneingeschränkten Durchblutung der Fragmente (Claes 2002; Giannoudis 2008). Diese Art der Knochenheilung findet bei der natürlichen Knochenheilung äußerst selten statt (McKibbin 1978; Stürmer 1984; Simmons 1985; Liebich 1993; Stürmer 1996; Einhorn 1998; Marsell 2011; Niethard 2014). Wenn der Frakturspalt oder die interfragmentäre Beweglichkeit zwischen den Frakturrenden zu groß ist, findet die indirekte Knochenheilung statt (Simmons 1985; Moulder 2008). Die indirekte Knochenheilung stellt im Grunde den physiologischen Heilungsprozess dar, dieser geht vom Periost oder Endost der Frakturstelle aus (McKibbin 1978; Einhorn 1998). Prinzipiell ist die Dauer der Frakturheilung von der auf den Knochen einwirkenden Energie abhängig (Urist 1954; Blick 1989). Die konservative Frakturbehandlung, die Marknagelosteosynthese, die Fixateur-externe-Osteosynthese und die elastische Plattenosteosynthese stellen mögliche Behandlungsmethoden dar (Stürmer 1984). Eine Einteilung der ablaufenden Phasen kann wie folgt aussehen: Entzündungsphase, weicher-Kallus-Phase und harter-Kallus-Phase bzw. die Pro- und Antiinflammatorische Phase, die Granulationsphase, die Hartkallusphase und die Remodellierungsphase (Schmidt-Bleek 2015). Folgende Heilungsschritte können beobachtet werden: eine Hämatombildung, gefolgt von einer akuten Entzündungsphase und Reparatur, mit anschließender Remodellierung und anschließendem Verschluss (Einhorn 1995; Webb 2000; Moulder 2008). Der Heilungsprozess beginnt im Periost und expandiert dann über die gesamte Verletzung (McKibbin 1978; Simmons 1985). Innerhalb der ersten Stunden nach der Verletzung entsteht zwischen den Frakturfragmenten ein Hämatom und leitet die Heilungskaskade ein (Einhorn 1998; Webb 2000). Eine adäquate Entzündungsphase ist die Voraussetzung für eine erfolgreiche Knochenheilung (Einhorn 1995). Blut tritt aus den Knochenenden und dem verletzten, umgebenden Weichteilgewebe aus, zwischen den Frakturrenden entsteht ein Koagulat (Shapiro 2008). Die Knochenenden weisen keine

proliferativen Aktivitäten auf, es lassen sich Anzeichen von Nekrose, wie leere Osteozytenlakunen, beobachten. Die Blutzellen treten, ebenso wie Knochenmarkszellen peripher und intramedullär in den Frakturspalt ein. Das Einwandern von Entzündungszellen und Signalmolekülen führt zu einer Zellerhöhung im Frakturspalt und leitet die Entzündungsphase ein. Sowohl die Entzündungsphase als auch das Koagulat sind grundlegend dafür verantwortlich, eine korrekte Heilung zu gewährleisten. Durch auftretende typische Entzündungsanzeichen, wie Vasodilatation im umliegenden Weichgewebe und das Vorkommen von Leukozyten, Thrombozyten, Makrophagen, Granulozyten, Lymphozyten und Monozyten, wird das Infektionsrisiko vermindert (McKibbin 1978; Einhorn 1998; Webb 2000; Shapiro 2008). 60 Stunden nach der Verletzung kommt es durch die Bildung von angiogenetischen Faktoren zu einer Revaskularisierung (Schmidt-Bleek 2012, Schmidt-Bleek 2014b). Es kommt zur Kapillareinsprossung und zum Eintritt von kollagenen Fasern in den Frakturspalt, sowie zur Differenzierung von mesenchymalen Stammzellen zu Fibroblasten. Es findet eine Hämatomorganisation zum zellulären, weichen Kallus statt. Er bewirkt eine Stabilität zwischen den Frakturrenden und wird im weiteren Verlauf von mineralisiertem Geflechtknochen ersetzt (McKibbin 1978; Shapiro 2008). Mit dem Beginn der Kalzifizierung des Knorpelgerüsts, wachsen Blutgefäße ein, die das Einwandern von kollagenen Fasern veranlassen und die Bildung eines fibrinreichen Gewebes bewirken, welches anschließend zu Osteoblasten differenziert (Urist 1954). Der gebildete Knorpel dient als Scaffold für die spätere Knochenbildung (Urist 1954; Einhorn 1998; Shapiro 2008). Neue Kapillaren ziehen durch den Knorpelkallus und die Knochenformation beginnt, nachdem eine Verbindung zwischen Knorpel und jungem perivaskulärem Bindegewebe entstanden ist (Urist 1954). Die Chondrozyten im Kallus proliferieren, sie werden hypertroph und die extrazelluläre Matrix wird kalzifiziert. Der mineralisierte Kallus wird von Geflechtknochen ersetzt (McKibbin 1978; Stürmer 1984; Moulder 2008; Shapiro 2008; Marsell 2011). Dieser dient sowohl dem Ersatz, als auch dem Wiederaufbau und ebenso der Remodellierung des neuen Knochens (Goodship 1993; Einhorn 1998). Anschließend findet eine funktionelle Adaptation und ein Umbau des Geflechtknochens zu Lamellenknochen statt.

2.3.2 Biologie des Kallus

Die Kallusbildung stellt die natürliche Stabilisierung von Knochenfragmenten dar und tritt bei der sekundären Frakturheilung auf (McKibbin 1978). Er stabilisiert die Frakturrenden soweit, dass eine knöcherne Überbrückung stattfinden kann (Claes 1999). Der Kallus wächst nicht unwillkürlich in alle Richtungen, sondern wächst in Richtung des gegenüberliegenden Knochenfragments (McKibbin 1978). Die Kallusbildung wird durch kleine interfragmentäre Bewegungen stimuliert, durch zu große Bewegungen jedoch gestört (Claes 2000). Die Mikromotion in experimentellen Tibiafrakturen beim Schaf dient als Stimulant für die Heilung und hat eine erhöhte Kallusbildung zur Folge (McKibbin 1978; Liebich 1993; Budras 1996;

Stürmer 1996; Rohen 2000; Marsell 2011; Schmidt-Bleek 2015). Bei Bewegung zwischen den Frakturrenden differenzieren die Osteoprogenitorzellen zu hyalinem Knorpel oder fibroknorpeligem Kallus und stabilisieren so den Frakturspalt (Cohen 1956; Shapiro 2008). Die temporäre mechanische Überbrückung findet zunächst durch ein weiches, noch nicht verkalktes Kallusgewebe statt, welches Bewegung zwischen den Frakturrenden erlaubt und somit eine geringe Stabilität aufweist (Marsell 2011). Der weiche Kallus wird an der periostalen und endostalen Oberfläche beginnend, fern von der Fraktur, durch Querschnittsvergrößerung zu einem knöchernen, stabilen Kallus umgebaut. Dabei wird die vorhandene Knorpelbrücke zu Geflechtknochen kalzifiziert und anschließend durch Lamellenknochen ersetzt (Stürmer 1984; Claes 1999; Noble 2000; Webb 2000; Hadjidakis 2006). Die Frakturvereinigung findet an der Frakturlinie statt (Urist 1954; Claes 2000). Zusammenfassend kann gesagt werden, dass eine starke Kallusbildung zum einen durch eine intakte Durchblutung und zum anderen durch eine interfragmentäre Bewegung gefördert wird. Des Weiteren spielen die Art der Fraktur, das aufgetretene Trauma, das Alter, die Größe des Frakturspaltes und die Tragfähigkeit des Knochens eine immense Rolle (Stürmer 1996; Claes 1997; Marsell 2011). Eine Gewebedehnung bis zu 5% und hydrostatische Drücke bis zu 0,15 MPa wirken sich positiv auf die Proliferation und somit auf die Kallusbildung aus (Claes 1999). Die axiale Belastung des Kallus führt zu einer höheren biomechanischen Belastung und dadurch zu einer beschleunigten Kallusdifferenzierung. In den ersten zwei Wochen sollte jedoch auf eine gute Stabilität geachtet werden, da bei zu frühzeitig eingesetzter Belastung quantitativ viel, jedoch qualitativ minderwertiger Kallus gebildet wird (Augat 1996). Claes et al. fanden heraus, dass sowohl konstanter Druck als auch eine langsame Distraction die Frakturheilung beschleunigen (Claes 2008). Eine Dynamisierung durch zusätzliche axiale Bewegung wirkt sich positiv auf die Frakturheilung aus, da es zum einen zum Verschluss der Frakturspalten und zum anderen zur Erhöhung des Reizes der Kallusdifferenzierung kommt (Claes 2000).

2.3.3 Frakturheilungsstörungen

Das Knochengewebe weist eine gute Heilungstendenz auf und heilt unter günstigen Umständen spontan (Perry 1999; Reichert 2009). Entscheidende Faktoren für eine erfolgreiche Knochenheilung sind die Entzündungsphase, die Knorpelformation, das Gefäß- und Zelleinwachsen sowie die mechanische Stabilisierung (Schmidt-Bleek 2014). Bedauerlicherweise kommt es nicht in allen Fällen zu einer schnellen und ungestörten Kallusbildung. Generell können bei der Frakturheilung diverse Komplikationen auftreten, 5-10% der Patienten zeigen eine verzögerte (delayed-union) oder eine ausbleibende Frakturheilung (non-union; Pseudoarthrose) (Einhorn 1998; Runkel 2000; Schell 2008; Peters 2010; Schmidt-Bleek 2015). Trotz der Regenerationsfähigkeit des Knochens, kann es zu Komplikationen, wie unvollständiger Knochenheilung, einer ungewünschten

anatomischen Position oder Pseudoarthrose kommen (Runkel 2000; Marsell 2011). Unter Umständen können Wundheilungsstörungen, Infektionen, Fehlstellung, Verkürzung, Arthrose, Instabilität, Implantatversagen und totales Ausbleiben der Heilung auftreten (Claes 2000; Webb 2000; Niethard 2014). Komplikationen können durch bestehende Erkrankungen, Revaskularisationsprobleme, Medikation, Alter und mechanische Instabilität hervorgerufen werden (Schmidt-Bleek 2012; Schmidt-Bleek 2015). Von einer verzögerten Knochenheilung (delayed-union) spricht man, wenn es nach sechs Monaten zu keinem Frakturschluss gekommen ist und von einer ausbleibenden Knochenheilung (non-union), wenn nach fünf bis acht Monaten kein Verschluss zu beobachten ist (Blick 1989; Schell 2008). Aufgrund dessen werden Defekte kritischer Größe mit verzögerten oder nicht heilenden Frakturen assoziiert (König 2016). Mögliche Ursachen sind eine fehlende Blutversorgung, Zerstörung des Periosteums, fehlerhafte Immobilisation und Infektionen (Schell 2008). Die Behandlung einer verzögerten Knochenheilung ist schmerzhaft, risikoreich, kostenintensiv und zeitaufwändig (Schmidt-Bleek 2015). Ein 25%-iger Misserfolg der Knochenheilung, ebenso wie eine 30-60%-ige Komplikationsrate bei Allografteinsatz, kann auf eine reduzierte Revaskularisation und Remodellierung zurückgeführt werden (Oest 2007). Die Gefahr einer Pseudoarthrose besteht bei zu großer Instabilität im Frakturspalt (Claes 2000). Bei der hypertrophen Pseudoarthrose erfolgt eine erhebliche Kallusbildung, jedoch ohne Frakturschluss (Müller 1990; Claes 1997).

2.4 Knochendefekte kritischer Größe

2.4.1 Definition

Bei einer experimentellen Knochenheilung ist es wichtig einen Defekt zu erzeugen, der nicht in der Lage ist spontan zu heilen (Schmitz 1986; Einhorn 1999). Ein Defekt kritischer Größe entspricht dem zwei- bis zweieinhalbfachen Durchmesser des betroffenen Knochens (Reichert 2009). Große segmentale Knochendefekte stellen nach wie vor eine der größten Herausforderungen in der Orthopädie dar und benötigen geeignete Behandlungsmethoden. Sie sind mit einer hohen Rate an verzögerter oder ausbleibender Frakturheilung verbunden (König 2016). Sie verheilen nicht spontan und benötigen eine chirurgische Intervention, wie das Auffüllen des Defekts mit geeignetem Material (Dumic-Cule 2015). Knochendefekte kritischer Größe (engl. Critical Size Defect, CSD) sind kleinste Defekte, die zu Lebzeiten des Individuums nicht spontan heilen werden (Schmitz 1986; Gugala 1999; Keating 2005). Eine weitere Definition besagt, dass es sich um einen Defekt handelt, der weniger als 10% an Knochenheilung zu Lebzeiten des Tieres aufweist (Hollinger 1990; Gugala Z.; Lindsey RW; S. 2007). Jedoch kann ein solcher Defekt nicht ausschließlich anhand seiner Größe definiert werden. Der phylogenetische Umfang, die anatomische Lokalisation, die Beteiligung des

Weichteilgewebes sowie der Blutversorgung und die Kraft- bzw. Gewichtseinwirkung auf die betroffene Gliedmaße spielen ebenso wie das Alter, Geschlecht, die Mortalität, die metabolischen und systemischen Voraussetzungen eine entscheidende Rolle (Blick 1989; Rimondini 2005; Lindsey 2006). Neben der Wundgröße stellt die Größe der einwirkenden und absorbierten Energie ebenfalls einen wichtigen Faktor dar (Simmons 1985; Blick 1989). Bei Defekten ab 1 cm spricht man von einer Frakturheilungsdauer von mindestens 12 Monaten (Urist 1954). Aufgrund der anatomischen Gegebenheiten, befinden sich Defekte kritischer Größe häufig am Femur und aufgrund der schwachen Gewebebedeckung bevorzugt an der Tibia (DeCoster 2004; Reichert 2009; Molina 2014).

2.5 Aktuelle Therapiemöglichkeiten

Die Behandlung von Knochendefekten kritischer Größe stellt nach wie vor eine Herausforderung dar. Das Ziel ist die Wiederherstellung der Funktion mit physiologischer Knochenstellung (Reichert 2009). Es gibt eine Vielzahl von Therapiemöglichkeiten. Dazu gehören die Distriktionsosteogenese sowie autogene, allogene und vaskularisierte Knochentransplantate, ebenso wie Zementspacer und die Masquelet-Technik (Ilizarov 1969; Ilizarov 1969; Ilizarov 1971; Gugala 2002; Attias 2005; Hierner 2009). Cobos et al. erforschten einen mit Spongiosa befüllten Titanspacer, der mit einem Marknagel stabilisiert wurde (Cobos 2000).

2.5.1 Distractionsosteogenese

Die Technik, bei der eine "Knochenneubildung durch Auseinanderziehen" stattfindet, wurde von dem Orthopäden Gavril Ilizarov entwickelt. Die Ilizarovtechnik nutzt das Potential der Knochenheilung, indem zuerst eine Osteotomie der Kortikalis ohne Beschädigung der umliegenden Gefäße und im Anschluss eine Distraction durchgeführt wird, um die Knochenformation zu stimulieren (Perry 1999; Reichert 2009; Berner 2012). Auf das Einführen eines Transplantats wird verzichtet. Ein externer Fixateur wird eingesetzt und der Knochen anschließend auseinandergezogen, sodass im Spalt Kallus gebildet wird. Pro Tag kann der Defekt um 1 mm gefüllt werden, dabei wird die Distraction von 0,25 mm vier Mal am Tag durchgeführt. Im Schafmodell konnten mehr als 1 cm des Schaftdurchmessers in 2 Jahren oder länger erreicht werden (Urist 1954; Ilizarov 1989; Ilizarov 1989; Ilizarov 1990; Raschke 2000; Lasanianos 2009; Berner 2012). Diese Technik wird bei großen Knochendefekten, bei infektiös bedingtem Ausbleiben der Heilung und bei Gliedmaßenlängendiskrepanz eingesetzt. Der Fixateur hat den Vorteil, dass der Patient ambulant behandelt werden kann (Perry 1999). Die Nachteile dieser Prozedur sind die Langwierigkeit und die Unbequemheit für den Patienten, mit dem Risiko für rezidivierende Infektionen an den Pins (Ilizarov 1989; Reichert 2009).

2.5.2 Autogene Knochentransplantate

Der Einsatz von autogenem Knochenmaterial gilt als „Gold Standard“, da die Knochenregeneration gefördert wird (Blick 1989). Autogene Spongiosa besitzt sowohl osteokonduktive als auch osteoinduktive Eigenschaften, des Weiteren besitzt das Transplantat eine gute Blutzufuhr. Die Knochentransplantate werden unter anderem aus dem Beckenkamm des Patienten gewonnen und in den Defekt implantiert (Berner 2012; König 2016). Eine autogene Knochen transplantation wird bei Tibiafrakturen mit hoher Energieeinwirkung, bei denen eine Reposition nicht möglich ist und eine verzögerte Knochenheilung vermutet wird, durchgeführt (Blick 1989). Diese Methode der Defektüberbrückung weist jedoch nachteilige Aspekte auf, wie die geringe Materialverfügbarkeit, die unvollständige Transplantatintegration sowie die Entnahmemorbidity. Zusätzlich besteht ein Risiko für Infektionen. Bei der Entnahme können unzureichende Mengen an Knochenmaterial gewonnen werden und die Entnahme kann mit möglichen Schmerzen sowie Blutungen einhergehen. Da das Material aus dem Beckenkamm gewonnen wird, unterliegt der Patient zusätzlichen Eingriffen (König 2016). Transplantatausfälle und eine Verminderung der Gliedmaßenstabilität sind das Resultat von unvollständiger Transplantatintegration und –resorption, besonders bei großen Defekten reichen autologe Knochen transplantate als alleiniges Implantat häufig nicht aus (Berner 2012; Reichert 2012; König 2016).

2.5.3 Allogene Kochentransplantate

Allogene Knochentransplantate sind Transplantate aus Zellen, Geweben oder Organen, die zwischen genetisch unterschiedlichen Individuen übertragen werden. Sie werden in Gewebebanken aus kortikalem oder spongiossem Knochen fertig gestellt und sollen als Ersatz für autogene Knochentransplantate dienen (König 2016). Der Knochen wird zunächst tiefgefroren und anschließend weiterbearbeitet. Dadurch sollen zum einen das Infektionsrisiko und zum anderen die Immunantwort des Empfängers minimiert werden. Die immunbedingte Abstoßung durch den Empfänger sowie die Infektionsgefahr werden dennoch nicht zu 100% vermieden. Es besteht nach wie vor ein Risiko der Abstoßung und der Infektionsübertragung (Reichert 2009; Berner 2012; Reichert 2012). Diese Art der Defektüberbrückung ist häufig nicht in der Lage den Knochenmangel zu ersetzen (König 2016). Durch die dabei stattfindende Zellzerstörung weisen allogene Knochentransplantate ausschließlich osteokonduktive Eigenschaften auf (Giannoudis 2005).

2.5.4 Vaskularisierte Knochentransplantate

Der Unterschied zu anderen Transplantaten ist die Tatsache, dass bei der vaskularisierten Knochentransplantation der Transfer eines lebenden Knochenstücks stattfindet (Perry 1999). Vaskularisierte Knochentransplantate sind sehr anspruchsvoll und stellen eine chirurgische Herausforderung dar (Reichert 2009; Berner 2012). Bevorzugte Entnahmeorte für die Transplantate sind die Fibula, die Rippen und der Beckenkamm (Lin 1999). Sie werden mit ihrer eigenen Blutversorgung in den Empfängerknochen integriert, was eine schnelle Einheilung zur Folge hat. Eine zusätzliche adäquate Fixation führt zu einer guten Anpassung an die auftretenden mechanischen Belastungen und eine frühzeitige mechanische Belastbarkeit wird möglich (Hierner 2009). Defekte unter 4 cm, die mit der Spongiosaplastik behandelt werden, weisen eine ähnlich gute Heilungstendenz auf, wie bei einer Behandlung mit vaskularisiertem Knochentransfer. Bei Defekten ab 4 cm sollte nach einer Osteomyelitis oder einem Trauma, aufgrund der schlechten Vaskularisierung im Empfängerlager, ein vaskularisierter Knochentransfer als Therapie gewählt werden. Mögliche Komplikationen wie Wundheilungsstörungen, eine Bauchwandhernie, ein Verschluss der Blutgefäße, eine Transplantathypertrophie sowie eine Achsenfehlstellung können auftreten. Wichtig bei der Methode ist die Sanierung des bestehenden Weichteildefekts. Die Rekonstruktion des Knochens sollte erst danach stattfinden. Eine verzögerte Heilung und Pseudoarthrose wird bei 10% der Patienten nach einem Trauma beobachtet. Bei 40-60% der Patienten treten Komplikationen bei Knochen-Weichteil-Defekten auf (Hierner 2009). Zusammenfassend kann erwartet werden, dass vaskularisierte Knochentransplantate zu weniger Resorption des kortikalen Knochens, einer höheren Infektionsresistenz und weniger Ermüdungsbrüchen führen, sowie die Heilung und die Hypertrophie des Knochens beschleunigen. Jedoch findet

nicht immer ein Verschluss zwischen dem Transplantat und dem Knochen statt und die Ergänzung mit autologen Transplantaten ist vonnöten (Han 1992; Perry 1999).

2.5.5 Zementspacer und Masquelet-Technik

Die Masquelet-Technik ist eine längen-unabhängige und in zwei Schritten ablaufende Technik zur Rekonstruktion des Knochens (Chadayammuri 2015). Masquelet et al. berichteten von der Zwei-Stufen-Methode, bei der es im ersten Schritt zum Einsatz eines Zementspacers kommt. Der Zementspacer füllt den Defekt, sodass das Weichteilgewebe nicht vorfällt. Darüber hinaus wird um den Zementspacer eine Membran gebildet, die im weiteren Verlauf zum Einsatz von autogenem Material genutzt wird und ferner eine Resorption des Materials verhindert (Chadayammuri 2015). Somit wird im zweiten Schritt der Zementspacer entfernt und die gebildete Membran mit autogenem Material gefüllt (Masquelet 2000; Masquelet 2010). Die Technik wird bevorzugt bei Infektionen des Knochens und bei Osteomyelitis eingesetzt. Dem Zement (PMMA) können Antibiotika beigemischt werden, welche anschließend in die Infektionsstelle freigesetzt werden. So setzten Biau et al. einen Zementspacer nach einer Tumorresektion in einen 16 cm Defekt ein. Nach 7 Monaten wurde der Zement entfernt und ein Autograft in die gebildete Membran eingesetzt. Es zeigte sich eine gute Heilung des Defektes (Biau 2009).

Die aufgeführten Therapiemethoden sind nicht optimal, um Defekte kritischer Größe zu behandeln, sodass nach weiteren Behandlungsmethoden geforscht wird.

2.6 Tiermodell

2.6.1 Tiermodelle in der Knochenforschung

In vitro können bereits wichtige Informationen bei der Testung neuer Materialien gewonnen werden. Bevor jedoch eine in vivo Evaluierung am Menschen stattfindet, werden zunächst Tests am Tiermodell, darunter auch am Schaf, durchgeführt (Hahn 2011). Das Tiermodell gilt als fester Bestandteil bei der Erforschung der Frakturheilung. Es wurden zahlreiche Klein- und Großtiermodelle entwickelt, um die Knochenentwicklung zu erforschen (Stürmer 1980; Peters 2010). Sie werden häufig genutzt, um die Anpassungsfähigkeit an externe Lasten und die Antwort des Knochens auf mechanische Veränderungen zu untersuchen (Razi 2015). Bei der Wahl des geeigneten Tiermodells sollten im Vorfeld diverse Faktoren, wie Anschaffungs- und Betreuungskosten, Verfügbarkeit, gesellschaftliche Akzeptanz und einfaches Handling in Betracht gezogen werden. Das gewählte Modell sollte sowohl die signifikanten physiologischen als auch pathophysiologischen Analogien bezüglich der wissenschaftlichen Fragen aufweisen (Pearce 2007; Reichert 2009).

2.6.2 Das Schaf

In vivo Modelle ermöglichen die Erforschung diverser Einflussfaktoren, die eine Knochenreaktion auf Veränderungen der mechanischen Umgebung bewirken. Das Schafmodell an Defekten kritischer Größe besitzt diverse positive Eigenschaften, die eine Übertragung auf den Menschen ermöglichen. Ausgewachsene Schafe weisen sowohl ein, dem Menschen vergleichbares Körpergewicht, als auch lange Röhrenknochen auf (Newman 1995). Des Weiteren besitzen die Knochen ein dem Menschen ähnliches Oberflächen- und Volumen-Verhältnis sowie entsprechende Knochenumbauereigenschaften. Biomechanische und Knochenheilungseigenschaften beim Schaf sind dem Menschen ähnlicher und vergleichbarer als bei anderen Spezies (Pearce 2007; Hahn 2011). Es bestehen keine wesentlichen Unterschiede in der mineralisierten Zusammensetzung und der metabolischen Knochenremodellingsrate (den Boer 1999). Instrumente wie Nägel, Platten und externe Fixateure sind gut einsetzbar und mit dem Menschen vergleichbarer als bei Nagern (Decker 2014). Weitere Vorteile stellen Eigenschaften wie das leichte Handling und die kostengünstige Haltung dar. Der Einsatz von Schafen wird ethisch weniger kritisch bedacht, da jene nicht als Haustiere gelten (Hahn 2011). Dennoch können Schlussfolgerungen vom Schaf nicht direkt auf den Menschen übertragen werden, da die biochemischen, physiologischen und biologischen Gegebenheiten zwar ähnlich, jedoch nicht identisch sind. Zur Beantwortung standardisierter Fragestellungen über Defekte kritischer Größe ist das Schafmodell unverzichtbar, es ersetzt dennoch nicht die klinische Studie (Martini 2001).

2.6.3 Die Tibia

Knochendefekte treten üblicherweise an der anfälligen Tibia auf. Dies ist auf die geringe weiche Gewebeabdeckung sowie auf eine geringe vaskuläre Versorgung zurückzuführen (DeCoster 2004; Moulder 2008). Somit lässt sich die Aussage treffen, dass die Tibia als gewichttragender Knochen für eine langsame und unvollständige Frakturheilung prädisponiert ist (Urist 1954; Blick 1989; Moulder 2008). Die meisten Tibiafrakturen heilen über drei Monate nach konservativer oder unkomplizierter chirurgischer Therapie, wobei die Heilungszeit bei verzögerter Heilung bis zu sechs Monate betragen kann (Blick 1989; Moulder 2008). Urist et al. sprachen von einer zwölf monatigen Heilungszeit ab einer Defektgröße von mehr als 1 cm (Urist 1954).

2.6.4 Das Osteotomiemodell

Das Osteotomiemodell wurde für die aktuelle Studie gewählt, da es standardisiert ist und somit bei jedem Tier reproduziert werden kann. Dumont et al. verglichen monokortikale Osteotomien am Schafmodell und fanden lediglich geringgradige Unterschiede bei der Blutzufuhr, der Resorption, sowie bei dem Fragment- und Kallusremodelling. Der Vorteil des Modells ist vor allem die Schnittkantensetzung, wodurch eine glatte Osteotomiekante entsteht

und das Implantat optimal eingepasst werden kann. Bei einem Frakturmodell liegt vergleichsweise kein standardisierter Defekt vor (Dumont 2009; Decker 2014).

2.7 Titan Mesh Scaffold

Die vorliegenden Verfahren stellen aufgrund limitierender Faktoren, wie zum Beispiel der Graftverfügbarkeit, der Entnahmemorbidität oder der schlechten Einheilungsrate, keine ausreichenden Methoden zur Behandlung von Knochendefekten kritischer Größe dar (Perry 1999, Mahendra 2007). Aufgrund dessen schreiten die Forschung und die Entwicklung von Alternativmethoden zur Knochenrekonstruktion voran. Unter anderem wurde an der Entwicklung zylindrischer Scaffolds aus unterschiedlichen Materialien geforscht (Hutmacher 2007; Reichert 2012). Titan-Implantate, die eine Gitterstruktur besitzen und in Kombination mit einem Marknagel oder einer Platte eingesetzt werden, wurden bereits erfolgreich bei humanen Patienten, in der Unfallchirurgie der Charité, eingesetzt. Präoperative CT-Scans gewährleisten eine dreidimensionale Rekonstruktion des Knochens und erlauben die Konstruktion von kompatiblen Titan-Implantaten. Mit Hilfe der Laser-Sinterungstechnik (Electron Beam Melting, EMB, Arcam AB, Schweden) können präoperativ gefensterter 3D-Titanscaffolds hergestellt werden, die genau in den Defekt passen (Razi 2012). Da Titan eine ca. viermal so hohe Steifigkeit besitzt wie Knochen, werden Titanimplantate porös hergestellt. Generell soll sich das Scaffolddesign der Stärke und der Steifigkeit des gesunden Gewebes anpassen. Es soll durch ein zyklisches, poröses Netzwerk die Zelleinwanderung von Osteoprogenitorzellen und Osteoblasten erlauben, sowie den Transport von Nährstoffen und das Einwachsen von Blutgefäßen gewährleisten (González-Torres 2010, Cipitria 2012). Durch die genaue Passform, wird nicht nur der Defekt ausgefüllt und die Ausrichtung der Gliedmaße wiederhergestellt, es wird zudem auch die Stabilität und die uneingeschränkte Funktionalität sowie Belastbarkeit zugelassen. Die Scaffoldporen können mit körpereigenen Zellen, wie Spongiosa oder mit Wachstumsfaktoren befüllt werden (Wendt 2005; Mahendra 2007; Reichert 2011; Razi 2012; Khodaei 2016). Poröse Körper wurden von Gibson et al. in eine Schaum- und Wabenform unterteilt (Gibson 1997). Die Wabenform besteht aus hexagonalen und zweidimensionalen Reihen, es soll das Zellenwachstum als Leitstruktur unterstützen (Hutmacher 2007). Hertlein et al. setzten Titan Mesh Scaffolds in der Wirbelsäulen Chirurgie ein, um entfernte Wirbelkörper zu ersetzen. Das Implantat erwies sich als sicher, mechanisch stabil und effektiv in der Wirbelsäule, sodass die Methode weiterentwickelt und in Defekte kritischer Größe eingesetzt wurde. Das Implantat vergrößert zum einen die Stabilität der Gliedmaße und kann zum anderen mit Spongiosa statt mit kortikalem Knochen befüllt werden, da die strukturellen Gegebenheiten durch den Titan Mesh Scaffold gewährleistet werden (Cipitria 2012). Hertlein et al. zeigten,

dass die Gliedmaße durch die hohe Stabilität des Titan Mesh Scaffolds in Kombination mit einem Marknagel frühzeitig wieder belastet werden kann, was den Vorteil der Beschleunigung der Frakturheilung nach sich zieht. Zu Beginn wurden einheitliche Implantate eingesetzt, die um 1 cm größer als der Defekt waren und mit zwei Ringen befestigt wurden (Hertlein 1992). Mit dem Fortschritt der Technik ist es heutzutage möglich den Defekt mittels CT-Scan darzustellen und zu übertragen, sodass ein individueller Titan Mesh Scaffold mit Hilfe der Laser-Sinterungstechnik hergestellt werden kann (Hertlein 1992; Cobos 2000; Attias 2005). Mechanische Einflüsse, die durch die Aktivität und Belastung der Gliedmaße bestimmt werden, werden ergänzend durch die Fixationsmethode und durch die mechanischen Eigenschaften des Implantats bestimmt. Sie haben eine Auswirkung auf die Knochenheilung und haben in der Unfallchirurgie der Charité Einzug gehalten. Die eingesetzten Implantate waren jedoch mechanisch nicht optimiert, sodass die vorliegende Studie erforschen soll, welche Steifigkeit optimal für den klinischen Einsatz ist. Die mechanische Integrität wird als Steifigkeit oder Stärke innerhalb des Defektes beschrieben (Giannoudis 2008; Fountain 2016). Die Vorteile dieser Methode sind die biologische Verträglichkeit des Materials, die fenestrierte Form und die Fähigkeit autologe Spongiosa sowie andere unterstützende Materialien zu enthalten (Lindsey 2006). Zusammenfassend lässt sich sagen, dass gitterförmige Titanimplantate in Kombination mit einer schnellen technologischen Entwicklung eine gute Alternativmethode bei der Behandlung von großen segmentalen Defekten repräsentieren und eine gute Ergänzung zu Knochenbanken, besonders bei Tumorresektionen, darstellen (Razi 2012).

2.8 Ziele und Hypothesen dieser Studie

Mechanisch stabile 3D Titan Mesh Scaffolds bieten bei der Behandlung von großen segmentalen Knochendefekten eine zuverlässige Alternative zu autologen Knochengrafts. Sie bestehen aus Titan Strut Elementen, die eine Honigwabenform besitzen und ein makroporöses Netzwerk bilden. Sie dienen zudem als Träger für auto- und allogene Knochen oder Knochensubstitute. Der Einsatz des patientenspezifischen Titan Mesh Scaffolds hat in der Unfallchirurgie der Charité Einzug gehalten und wurde an einigen Patienten evaluiert. Die röntgenologischen Patientendaten ließen erfolgversprechende Schlussfolgerung vermuten. Histologische Untersuchungen der Knochenbildungen in der zentralen Pore des Titan Mesh Scaffolds waren aus ethischen und praktischen Gründen nicht möglich. Mit dem Resultat, dass zum einen keine detaillierten Aussagen über die Knochenbildung innerhalb des Titan Mesh Scaffolds und zum anderen über eine Beeinflussung des Regenerationsprozesses durch eine mechanobiologische Optimierung des Titan Mesh Scaffolds getroffen werden konnten (Windolf M 2014). Zudem erlaubt der Einsatz des Titan Mesh Scaffolds am

humanen Patienten keine standardisierten Aussagen, da die Patienten verschiedene Defektgrößen sowie verschiedene Knochenbeschaffenheiten, abhängig von der Ursache des Defektes, wie Infektion, Tumor oder Unfall, aufweisen. Darüber hinaus sind bei den verschiedenen humanen Patienten unterschiedliche Knochen betroffen. Zudem erwiesen sich die eingesetzten Titan Mesh Scaffolds als zu steif, sodass nach einer optimalen und weicheren Steifigkeit gesucht wird, die eine lokale mechanische Stimulation zulässt. Mit Hilfe der Laser-Sinterungstechnik wurden zwei strukturell gleiche Titan Mesh Scaffolds mit unterschiedlichen mechanischen Steifigkeiten angefertigt, die in Kombination mit einer experimentellen Platte (AO-Platte) in vivo untersucht wurden. Razi et al. erforschten in FE-Analysen die Möglichkeit der Veränderung der Steifigkeit von Titan Mesh Scaffolds. Die Scaffolds bestanden aus Titan Strut Elementen, deren Anordnungsveränderung zur Bildung von unterschiedlichen Meshstrukturen führte. Ausschlaggebend für die mechanischen Eigenschaften der Titan Mesh Scaffolds war der Strebendurchmesser, dessen Modifikation zu einer Veränderung der Scaffoldsteifigkeit führte. Bei der Gruppe mit dem weichen Titan Mesh Scaffold betrug der Strebendiameter 1.2 mm mit 0,84 GPA und bei der Gruppe mit dem steifen Titan Mesh Scaffold 1.6 mm mit 2,88 GPa. Ziel der Studie war die Prüfung, ob der Einsatz eines Titan Mesh Scaffolds in Kombination mit einem experimentellen winkelstabilen Plattensystem eine adäquate Behandlungsmethode für einen 40 mm großen kritischen Defekt darstellt. Die vorliegende Studie untersuchte darüber hinaus, ob eine mechanobiologische Optimierung des Titan Mesh Scaffolds zu einer Förderung der endogenen Knochendefektregeneration führt. Der weiche Titan Mesh Scaffold und der 3,5-fach steifere Titan Mesh Scaffold wurden in Kombination mit einem experimentellen winkelstabilen Plattensystem in einen kritischen 40 mm großen Osteotomiedefekt der Schafstibia eingesetzt. Um zu beweisen, dass die lokale Steifigkeit die Heilung fördern kann, war die eingesetzte experimentelle Platte allgemein arretierend und ließ eine dynamische Belastung zu. Röntgenologischen Kontrollaufnahmen wurden während der Versuchszeit von 24 Wochen, im Abstand von vier Wochen, angefertigt. In der 24. Woche wurden ex vivo zusätzlich Aufnahmen im Faxitron erstellt, sowie histologische und histomorphometrische Untersuchungsergebnisse erfasst und evaluiert.

3. Material und Methoden

3.1 Versuchstiere

3.1.1 Haltung und Fütterung

In der Forschungseinrichtung für Experimentelle Medizin (FEM) der Charité, Campus Virchow Klinikum, Augustenburger Platz 1, 13353 Berlin, wurden zwölf Merino-Mix Schafe mit Tageslichtzufuhr gehalten. Die mindestens zwei Jahre alten weiblichen Schafe stammten aus einer kommerziellen Schäferei und hatten ein durchschnittliches Gewicht von 60 ± 5 kg. Der Schafstall wurde regelmäßig gereinigt und mit Einstreu und Stroh eingestreut. Das Stallklima betrug 20°C , die Tiere wurden zwei Mal täglich mit Heu gefüttert. Wasser sowie ein Mineral- und Salzleckstein standen ihnen ad libitum zur Verfügung. Zusätzlich erhielten die Tiere bei den täglichen Kontrollen und bei den, in bestimmten Zeitabständen stattfindenden, Röntgenkontrollen Krafffutter, Äpfel und Möhren. Die Tiere wurden nach ihrer Ankunft in der Einrichtung gründlich tierärztlich untersucht, das Zahnalter wurde bestimmt und prophylaktische Entwurmung mit $0,2$ mg/kg Körpergewicht Ivermectin (Ivomec®, Biokema SA, Crissier, Schweiz), 12 mg/kg Körpergewicht Triclabendazolum (Fasinex®, Elanco Animal Health, Groß Britannien) und 5 mg/kg Körpergewicht Fenbendazol (Panacur, MSD Tiergesundheit, Unterschleißheim, Deutschland) durchgeführt. Trotz der Bestellung nicht-trächtiger Tiere, wurden jedem Schaf prophylaktisch zur Kontrazeption $0,25$ mg/kg Körpergewicht Cloprostenol (Estrumate®, MSA Tiergesundheit, Unterschleißheim, Deutschland) zwei Mal im Abstand von sieben bis zehn Tagen injiziert. Die Einstellung erfolgte drei Wochen vor der Operation in zweier bis vierer Gruppen, wobei verträgliche Paare gebildet wurden, die über den Versuchszeitraum stabil zusammenblieben. Die Tiere hatten zum einen Kontakt zueinander und zum anderen Zeit zum Akklimatisieren. Zur Gewöhnung, an die Mitarbeiter der Arbeitsgruppe und die Experimentatoren, bekamen die Schafe jeden Tag Möhren und Äpfel angeboten. Nach einer Woche erfolgte mit jedem Schaf ein Training, zur Gewöhnung an das vom Centrum Wissenschaftliche Werkstätten (CMM der Charité, Berlin) speziell für die Schafe konstruierte Gurtsystem. Es bestand aus einem Patientenlift (Patientenlift Birdi, Invacare, Isny, Deutschland) und einem Gurtsystem zum Einhängen der Schafe. Dazu wurde das entsprechende Schaf in das Gurtsystem eingehängt und langsam mit Hilfe des elektrischen Antriebs einige Zentimeter über den Boden gehoben. Diese Schritte erfolgten langsam und stressarm unter ständiger Beobachtung und positiver Konditionierung mittels Krafffutter-, Äpfeln- und Möhrengabe. Die Tiere sollten so an den Aufenthalt im Gurtsystem in der postoperativen Aufwachphase sowie im Versuchsverlauf während des Röntgen und Verbandwechsels gewöhnt werden. Während der postoperativen

Material und Methoden

Aufwachphase wurde das operierte Tier im Stall in das speziell für die Schafe konstruierte Gurtsystem bis zur alleinigen Stehfähigkeit eingehängt und in Brust-Bauch-Lage auf einen Heuballen gelagert (Abb. 1). Sowohl das Gurtsystem als auch der Heuballen dienten dazu, dass das Tier in seiner physiologischen Haltung stand, jedoch ohne die Gliedmaßen mit dem gesamten Körpergewicht zu belasteten. Durch die Gurte wirkte zudem nur ein geringer Druck auf den Pansen.



Abbildung 1: Darstellung eines Schafes auf einem Heuballen im Gurtsystem post operationem.

3.1.2 Gruppeneinteilung

Es fand eine randomisierte Verteilung der zwölf Tiere auf zwei Gruppen mit jeweils sechs Tieren statt (Tabelle 1). Bei den Tieren der ersten Gruppe wurde, nach einer 40 mm Osteotomie, ein weicher und bei der zweiten Gruppe ein steifer Titan Mesh Scaffold eingesetzt, der mit einer vom AO Forschungsinstitut (Davos, Schweiz) entwickelten experimentellen Tibiaplatte aus Stahl (AO-Platte) stabilisiert wurde (Windolf 2014).

Tabelle 1: Gruppeneinteilung mit dazugehörigem Titan Mesh Scaffold.

Gruppe	Anzahl	Titan Mesh Scaffold	Mechanische Eigenschaften
1	n= 6	Weicher Titan Mesh Scaffold	Strebendurchmesser 1,2 mm Steifigkeit 0,84 GPa
2	n=6	Steifer Titan Mesh Scaffold	Strebendurchmesser 1,6 mm Steifigkeit 2,88 GPa

3.2 Operatives Vorgehen und Materialeinsatz

3.2.1 Titan Mesh Scaffold

Razi et al. erstellten einen CT-Scan einer Tibia, woraufhin die DePuy Synthes GmbH (DePuy Synthes GmbH, Salzburg, Österreich) mit dem Laser-Sinterungsverfahren einen standardisierten, dreidimensionalen Titan Mesh Cage von einer definierten Höhe von 4 cm und einer Breite von 2 cm herstellte. Die Titan Mesh Scaffolds stellen einen fenestrierten Hohlzylinder mit einem Außendurchmesser von 2 cm und einer zentralen Cage Pore mit einem Durchmesser von 1 cm. Außen besitzt der Scaffold eine bienenwabenartige Meshstruktur und zentral einen Kanal für den Markraum (Abb. 2). Zusätzlich besaßen die Scaffolds distal und proximal eine Lasche, um eine Fixation zu gewährleisten (Abb. 3).

Die Tiere der ersten Gruppe erhielten den weichen (0,84 GPa, n=6) und die Tiere der zweiten Gruppe den steifen (2,88 GPa, n=6) Titan Mesh Scaffold. Zur Unterstützung der Knochenheilung wurde die Meshstruktur des Scaffolds beider Gruppen (n=12) mit der gleichen Menge an autologer Spongiosa aus dem Beckenkamm befüllt.



Abbildung 2: Darstellung eines Titan Mesh Scaffolds im Querschnitt. Innen mit der zentralen Pore und Außen mit der bienenwabenartigen Meshstruktur.

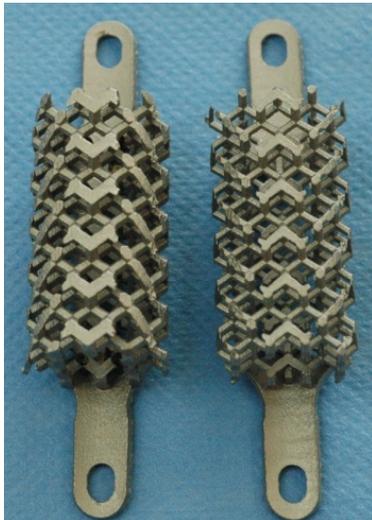


Abbildung 3: Darstellung des steifen (links) und des weichen (rechts) Titan Mesh Scaffolds.

3.2.2 AO-Platte

Den Tieren wurde eine von dem AO Research Institute Davos (Arbeitsgemeinschaft für Osteosynthesefragen, Schweiz) entwickelte experimentelle Tibiaplatte aus Stahl eingesetzt (Windolf 2014) (Abb. 4A). Nach Einsetzen der AO Platte, wurden alle Torsionsbewegungen im Frakturspalt unterbunden, es erfolgte ausschließlich eine axiale Bewegung. Die Platte besaß eine Fixierungsschraube (links) und eine Dynamisierungsschraube (rechts) (Abb. 4B). Die Fixierungsschraube stabilisierte den eingesetzten Titan Mesh Scaffold, wodurch der Scaffold einen permanenten Kontakt zu den Osteotomieenden erfuhr. Die Dynamisierungsschraube ermöglichte eine variable Einstellung der axialen Beweglichkeit der Platte, welche in beiden Gruppen auf 3 mm eingestellt wurde. Die AO-Platte besaß somit die

Eigenschaft das Gewicht zu übernehmen, sollte der Titan Mesh Scaffold mehr als 3 mm nachgeben.



Abbildung 4: Darstellung der AO-Platte. Mediale Ansicht (A) und proximale Ansicht (B), mit der Fixierungsschraube (Fi) und der Dynamisierungsschraube (D).

Material und Methoden

3.2.3 Narkose und Operationsvorbereitung

Das nüchtern Halten der Tiere zwölf Stunden vor der Operation war notwendig, um das Risiko einer Pansentympanie während der Operation aufgrund einer gesteigerten Gasansammlung im Pansen gering zu halten. Die Tiere erhielten aufgrund dessen einen Tag vor der Operation, nach der Fütterung am Vorabend, kein Heu mehr. Wasser stand den Tieren ad libitum zur Verfügung. Das Fixieren des zu operierenden Tieres im Stall erfolgte durch zwei Personen. Über einen grauen Venenverweilkatheter (Größe 1,3 x 32 mm, BD Venflon™ Pro Safety, Becton Dickinson Infusions Therapy, Helsingborg, Schweden), in der V. cephalica antebrachii an der rechten Gliedmaße, wurde zur Narkoseeinleitung je nach Wirkung 0,5 bis 1,5 g Thiopental-Natrium (Trapanal® Altana Pharma GmbH, Konstanz, Deutschland) intravenös verabreicht. Anschließend folgte der Transport des Tieres in den OP-Saal, dort wurde das Tier mit Hilfe eines Kaltlicht-Laryngoskops (Laryngoskopgriff Mc. Intosh, Freiburger Model, Sonderlaryngoskop Model Foregger 30 cm für Tiere, RGW, Tuttlingen, Deutschland) und eines Trachealtubus (Hi-Contour™, 9 mm Breite, 33 mm Länge, Mallinckrodt Medical, Athlone, Irland) intubiert. Der Cuff des Tubus wurde mit ca. 15 ml Luft geblockt, mit einem Klebeband (Leukoplast®, 1,25 cm Breite, BSN Medical GmbH & Co. KG, Hamburg, Deutschland) fixiert und an die Beatmungsschläuche angeschlossen. Zwischen dem Tubus und den am Narkosegerät (Inhalationsgerät Ventilator 711, Siemens, Berlin, Deutschland) angeschlossenen Schläuchen befand sich ein Klimatisierungsfilter (Pall Ultipor 25, Pall GmbH Medical, Dreieich, Deutschland). Die Narkose bestand aus einem Gemisch aus Sauerstoff (ca. 50% medizinischer Sauerstoff, O2 Linde® Gas Therapeutics GmbH & Co. KG, Unterschleißheim, Deutschland), ca. 1,5-2,5% Isofloran (Forene®, Abbott GmbH & Co. KG, Wiesbaden, Deutschland) und Lachgas (ca. 20-50% medizinisches Lachgas N2O, O2 Linde® Gas Therapeutics GmbH & Co. KG, Unterschleißheim, Deutschland). Das Aufrechterhalten der Narkose gewährleistete ein Atemzugvolumen von 6-10 ml/kg Körpermaße und 14-20 Atemzügen/min (im Verhältnis In- und Expiration 1:2). Das Monitoring der Anästhesiegase Lachgas und Isofluran erfolgte kontinuierlich, ebenso die Überwachung des expiratorischen CO₂-Partialdrucks (von 35-40 mm Hg), welcher mit einem Kapnographen gemessen und in einer Kurve permanent graphisch dargestellt (Anästhesiemonitor NGM 1000, F. Stephan GmbH, Medizintechnik, Gackenbach, Deutschland) wurde. Das Legen eines rosa Verweilkatheters (Größe 1,1 x 32 mm, BD Venflon™ Pro Safety, Becton Dickinson Infusions Therapy, Helsingborg, Schweden) am Ohr ermöglichte Blutgasanalysen (Blutgasanalysator ABL 700 Series®, ©Drott Medizintechnik GmbH, Wiener Neudorf, Österreich) während der Operation. Die Messung des Blutdrucks erfolgte über eine Blutdruckmanschette an der linken Vordergliedmaße, des Weiteren wurde die Herzaktivität über die bipolare Extremitäten Ableitung nach Einthoven I überwacht. Das Einführen einer Pansenschlundsonde (Durchmesser 14 mm, Willy Rüscher AG, Deutschland)

verhinderte das Aufgasen durch Pansengas und das Auftragen einer Augensalbe (Dexpanthenol, Bepanthen, Bayer, Leverkusen, Deutschland) die Austrocknung der Cornea. Das Tier wurde während der Operation mit insgesamt ca. 3000 ml Jonosteril (Jodosteril®, Fresenius Kabi, Bad Homburg v.d.H., Deutschland) und 500 ml Voloyte (Voloyte®, Fresenius Kabi, Bad Homburg v.d.H., Deutschland) infundiert. Als Antibiose erhielt das Tier 3 g Ampicillin-Natrium und Sulbactam-Natrium (Unacid®, Pfizer Pharma GmbH, Karlsruhe, Deutschland) intravenös, sowie 3 ml/50 kg Körpergewicht Veracin compositum® (Benzathin-Benzylpenicillin, Benzylpenicillin-Procaïn, Dihydrostreptomycinsulfat, Procainhydrochlorid, Albrecht GmbH, Aulendorf, Deutschland) subkutan verabreicht. Zur Analgesie wurden jedem Tier 2,2 ml/50 kg Körpergewicht Finadyne® (Flunixin-Meglumin, MSD Tiergesundheit, Intervet Deutschland GmbH, Unterschleißheim Deutschland) verabreicht. Das Tier lag während der ersten Vorbereitungen auf der rechten Körperseite. Zuerst wurden die Klauen gereinigt und mit sterilen Tüchern bis zum Tarsalgelenk abgedeckt, um eine Sauberkeit des Operationsfeldes zu gewährleisten. Der linke Vorderarm wurde ca. 10 cm geschoren, rasiert und die Haut anschließend mit Alkohol entfettet. Ein Fentanyl-Pflaster (Durogesic® 75 µg/h, Janssen-Cilag GmbH, Neuss, Deutschland), welches 75 µg Fentanyl pro Stunde transdermal abgab, wurde aufgetragen und mit einem Klebeband am Bein fixiert. Zur Vorbereitung des Operationsfeldes wurde die rechte Hintergliedmaße geschoren, rasiert, mit Jodseife (Jodosept®, Vetquinol, Ravensburg, Deutschland) gewaschen und mit Braunoderm (Braunoderm®, B.Braun Melsungen AG, Deutschland) desinfiziert. Nach der Lagerung des Tieres in Brust-Bauch-Lage erfolgte die Vorbereitung des Operationsfeldes des Beckenkammes auf die gleiche Weise. Daraufhin folgte die sterile Abdeckung des Beckenkammes mit Operationstüchern (steriles Basispaket, Steri-Drape™, Firma 3M Health Care, Neuss, Deutschland) und deren Befestigung mit einem Einweg-Hautklammergerät (Manipler® AZ, B.Braun Melsungen AG, Deutschland) an der Haut des Tieres.

Zur Analgesie erhielt das Tier vor dem Hautschnitt und vor den Sägeschnitten während der Osteotomie 3 ml Fentanyl (Fentanyl® 0,5 mg/10 ml, Janssen-Cilag GmbH, Neuss, Deutschland) wiederholt intravenös im Bolus. Des Weiteren wurde Fentanyl ca. alle 30 Minuten zur Vertiefung der Narkose verabreicht und bei Anstieg der Herzfrequenz nachdosiert.

3.2.4 Operatives Vorgehen

Die Eröffnung der Haut des Beckenkammes über 5 cm erfolgte unter Verwendung eines Skalpell (Größe 21, B.Braun Melsungen AG, Deutschland). Das Fettgewebe wurde mit Hilfe eines Elektrokauters bis auf den Beckenkamm gespalten und die ansetzende Muskulatur mit Hilfe des Elektrokauters gelöst. Der Beckenkamm wurde mit Hammer und Meißel gefensternt und insgesamt 7,5 ml Spongiosa mit einem scharfen Löffel nach Volkmann entnommen (Abb. 5). Die Zerkleinerung der gewonnenen Spongiosa erfolgte mit Hilfe einer

Material und Methoden

Knochenmühle (Aesculap Micro Bone Mill®, Aesculap AG & Co.KG, Tuttlingen, Deutschland) (Abb. 6), mit anschließender Lagerung in einer sterilen Spritze (10 ml), zum Schutz vor Austrocknung, bis zur Implantation. Daraufhin erfolgte das Befüllen der Meshstruktur des Titan Mesh Scaffolds mit der gewonnenen Spongiosa (Abb. 7). Der operative Wundverschluss erfolgte, nach der Zurückverlagerung der gelösten Kortikalis in ihre Ausgangsposition, unter Verwendung eines Vicryl Fadens (Einzelhefte, Vicryl®-Faden 1-0, Ethicon, ©Johnson & Johnson Medical GmbH, Norderstedt, Deutschland). Anschließend erfolgte der Verschluss der Unterhaut (Kürschner-Naht, Vicryl®-Faden 3-0, Ethicon, ©Johnson & Johnson Medical GmbH, Norderstedt, Deutschland) und der Haut (Fortlaufende Naht nach Reverdin, Prolene®-Faden 3-0, Ethicon, ©Johnson & Johnson Medical GmbH, Norderstedt, Deutschland).

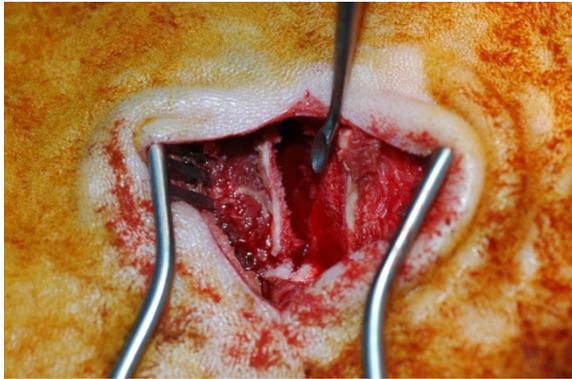


Abbildung 5: Darstellung des Operationsfeldes am rechten Beckenkamm. Eröffneter rechter Beckenkamm und die Entnahme der Spongiosa mit einem scharfen Löffel nach Volkmann.



Abbildung 6: Darstellung der autologen Spongiosa nach dem Zermahlen in der Knochenmühle.



Abbildung 7: Darstellung einer mit autologer Spongiosa befüllten Meshstruktur des Titan Mesh Scaffolds.
Distal und proximal befindet sich eine Lasche für die Fixation.

Anschließend erfolgte die Umlagerung des Tieres auf die rechte Körperseite. Das Fixieren der linken Hintergliedmaße über den Rücken nach kranial gewährleistete den freien Zugang zum Operationsfeld der rechten Tibia von medial aus. Das Operationsfeld, welches sich vom Knie- bis zum Tarsalgelenk erstreckte (Abb. 8), wurde nach dem gleichen Schema wie der Beckenkamm zuvor vorbereitet. Die Lagerung des zu operierenden Beines erfolgte mit der medialen Seite nach oben auf einem zusätzlichen Tisch, um einen stabilen Zugriff während der Operation zu erlangen. Die Wahl des Planum cutaneum cruris als Lokalisation für den Eingriff resultierte aus den anatomischen Gegebenheiten, da die Tibia medial nur von der Haut umgeben wird und somit aufgrund eines geringen Weichteiltraumas einen nicht traumatischen Zugang gewährleistet.



Abbildung 8: Mediale Darstellung der Schafstibia nach erfolgter Lagerung, Schur und Rasur.

Die ca. 15 cm lange Incision der Haut erfolgte mit einem Skalpell (Größe 21, B.Braun® Melsungen AG, Deutschland) medial entlang der Tibia am Planum cutaneum cruris. Mit Hilfe eines Elektrokauters und eines Raspatoriums wurde der Knochen von der Muskulatur und dem Periost stumpf frei präpariert (Abb. 9). Zuerst erfolgte die Positionierung der AO-Platte in der Mitte der Diaphyse, sodass die Platte gleichmäßig auflag (Abb. 10). Die LCP Bohrbüchse (5,0 mm Durchmesser, DePuy Synthes GmbH, Salzburg, Österreich) wurde zunächst auf die osteotomienahen Löcher geschraubt bis das Gewinde vollständig griff. Mit Hilfe einer druckluftbetriebenen Bohrmaschine, mit einem Bohrerdurchmesser von 4,3 mm (Compact Air Drive II®, DePuy Synthes GmbH, Salzburg, Österreich) wurden zuerst die osteotomienahen Bohrlöcher gesetzt. Auf das Entfernen der Bohrbüchse folgte die Bestimmung der Schraubenlänge mit Hilfe eines Tiefenmessgerätes (DePuy Synthes GmbH, Salzburg, Österreich). Die Länge der selbstschneidenden DL Verriegelungsschrauben (5,0 mm Durchmesser, DePuy Synthes GmbH, Umkirch, Deutschland) variierte je nach Schraubenposition zwischen 32 mm und 40 mm. Anschließend wurden zuerst die osteotomienahen Schrauben und daraufhin die osteotomiefernen DL Verriegelungsschrauben unter Verwendung eines Sechskantschraubenziehers mit Drehmomentbegrenzung (DePuy Synthes GmbH, Salzburg, Österreich) eingebracht, um die AO-Platte auf dem Knochen zu fixieren. Vor der Osteotomie erfolgte die Fixierung einer Sägeschablone (AO Research Institute, Davos, Schweiz) unikortikal mit einer selbstschneidenden DL Verriegelungsschraube (Abb. 10) (DePuy Synthes GmbH, Umkirch, Deutschland). Den Schutz des umliegenden Gewebes gewährleisteten zwei unter die Tibia eingesetzten Retraktoren nach Hohmann. Der darauffolgende Sägeschnitt wurde zunächst

distal und anschließend proximal mittels einer druckluftbetriebenen Säge (DePuy Synthes GmbH, Umkirch, Deutschland) und eines Sägeblatts, mit einer Schnittdicke von 0,6 mm und einer Breite von 14 mm, gesetzt. Nach der Entfernung der Schablone folgte die Entnahme des 40 mm großen Tibiafragments (Abb. 11). Es erfolgte eine kontinuierliche Spülung, während der gesamten Bohrung, der Schraubensetzung und der Osteotomie, mit steriler 0,9%-iger Kochsalzlösung (NaCl, B.Braun Melsungen AG, Deutschland). Ein Wirbelsäulendistraktor wurde anstelle der Bohrschablone eingeführt, um das proximale und distale Plattenende zum leichteren Einsetzen des Titan Mesh Scaffolds zu distrahieren. Die Implantation des mit autologer Spongiosa befüllten Titan Mesh Scaffolds (Abb. 13 und Abb. 14) erfolgte von posterior, sodass die Laschen des Titan Mesh Scaffolds ebenfalls posterior positioniert waren. Um die Stabilisierung des Titan Mesh Scaffolds zu gewährleisten, wurde die Plattenlänge durch anschließendes Anziehen der Fixierungsschraube um 3 mm verkürzt, wodurch der Titan Mesh Scaffold zwischen den Osteotomieenden unter Vorspannung pressfit adaptiert wurde. Das gewährleistete einen permanenten Kontakt zwischen dem Titan Mesh Scaffold und den Osteotomieenden. Um die axiale Beweglichkeit der AO-Platte zu ermöglichen, wurde die Dynamisierungsschraube mit sechs Umdrehungen rausgedreht, was einem Nachgeben der Platte bei Belastung, um maximal 3 mm entsprach (Abb. 15). Die AO-Platte besaß somit die Eigenschaft 3 mm nachzugeben, wodurch der Titan Mesh Scaffold die gesamte Last erfuhr, bevor die Platte arretierte. Der Wundverschluss erfolgte nach dem gleichen Schema, wie bei Entnahme der Spongiosa am Beckenkamm.



Abbildung 9: Mediale Darstellung der rechten, freipräparierten Tibia.

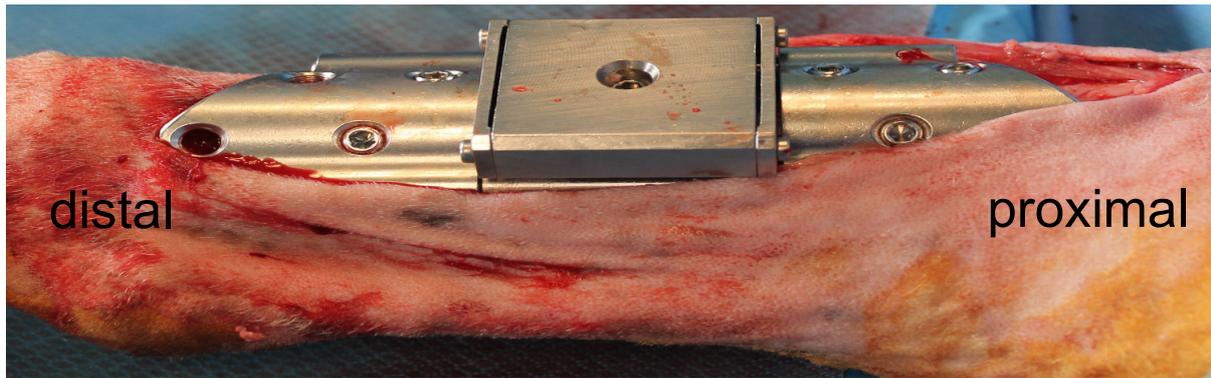


Abbildung 10: Mediale Darstellung der eingesetzten AO-Platte mit aufgesetzter Sägeschablone.

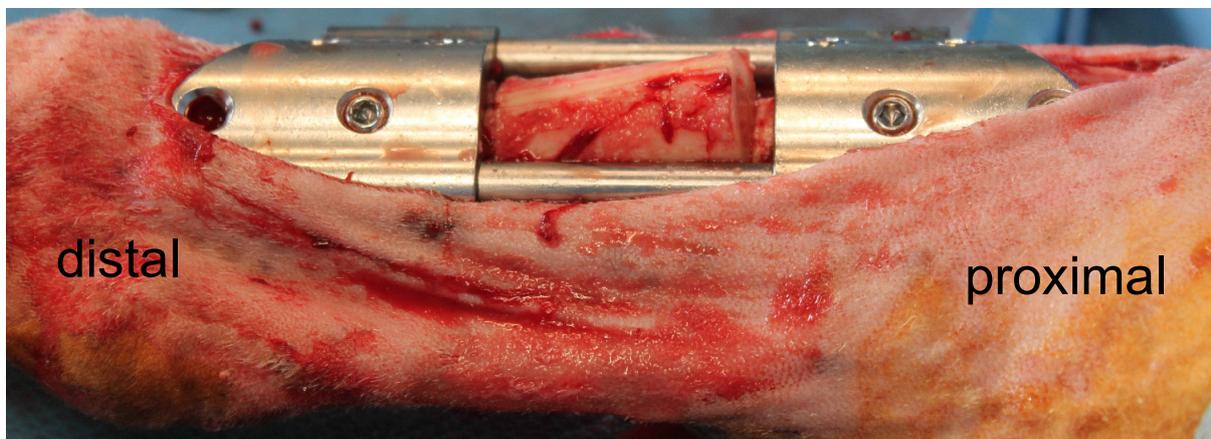


Abbildung 11: Mediale Darstellung des herausgesägten 40 mm großen Osteotomiefragments.

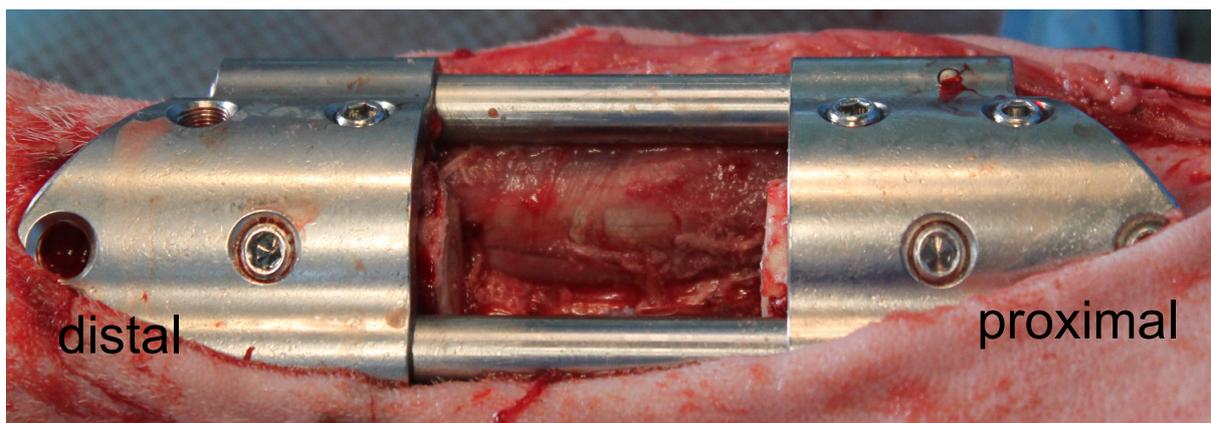


Abbildung 12: Mediale Darstellung des Osteotomiespalt. Osteotomiespalt nach Entfernung des herausgenommenen 40 mm Knochenfragments.

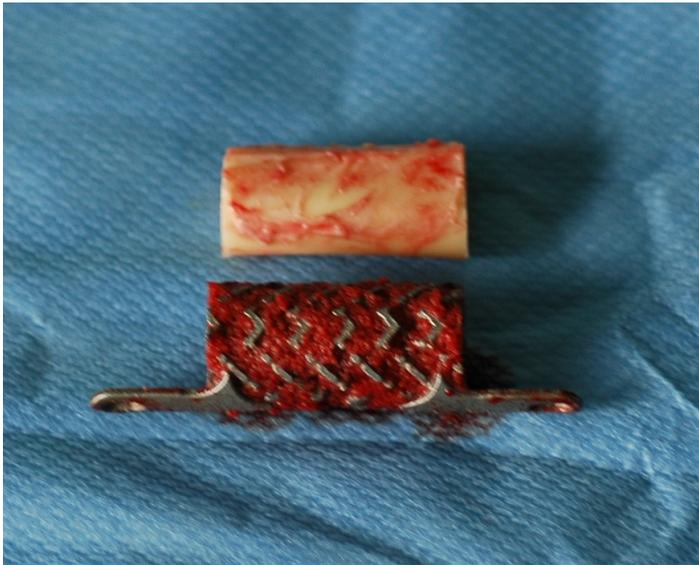


Abbildung 13: Darstellung des entnommenen 40 mm großen Knochenfragments aus dem Tibiaschaft und des mit autologer Spongiosa befüllten Titan Mesh Scaffolds.

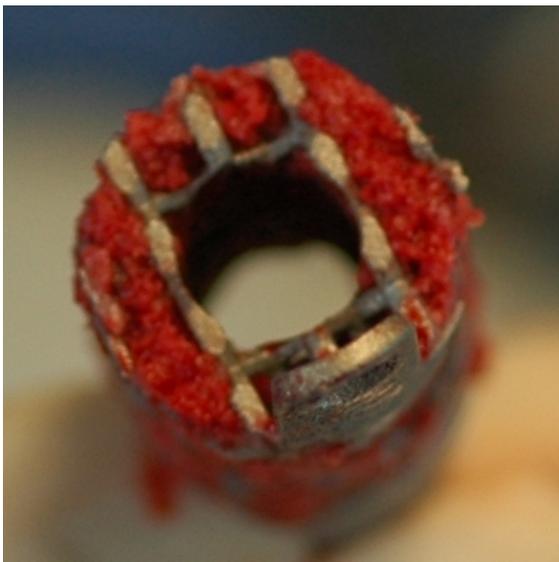


Abbildung 14: Aufsicht auf den Titan Mesh Scaffold.
Mit autologer Spongiosa gefüllte Meshstruktur und zentrale Pore für den Markraum.

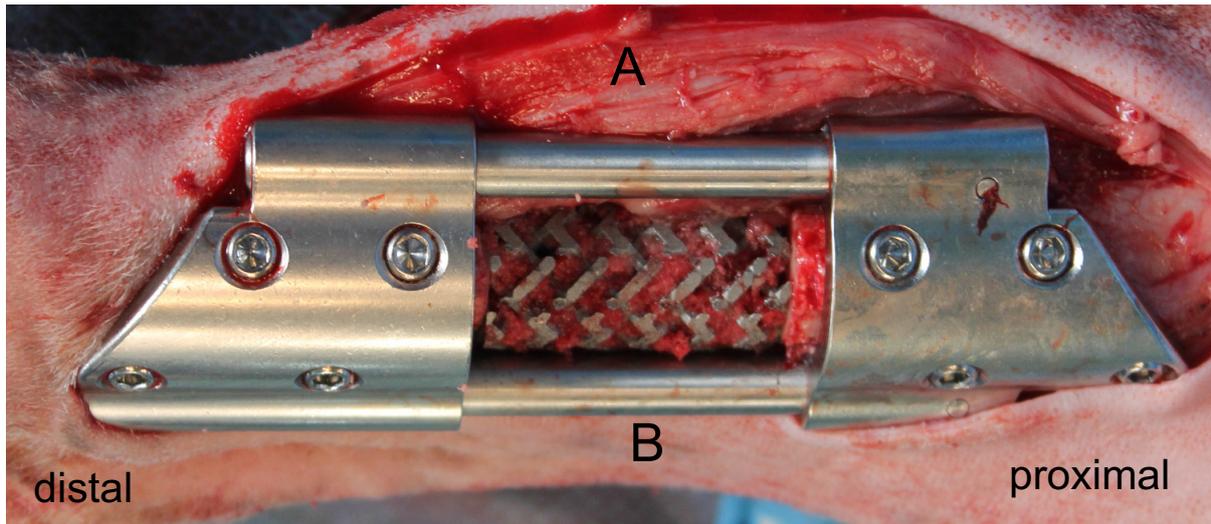


Abbildung 15: Mediale Darstellung des Osteotomiespaltes mit eingesetzter AO-Platte und eingesetztem Titan Mesh Scaffold.

Sowohl proximal als auch distal befinden sich jeweils vier selbstschneidende DL Verriegelungsschrauben, sowie eine Fixierungsschraube (A) und eine Dynamisierungsschraube (B).

3.3 Nachsorge

Nach dem Anfertigen einer latero-lateralen und einer antero-posterioren Röntgenaufnahme mit einer Strahlung von 73 kV und 2,5 mAs mit einem mobilen Röntgengerät (Siemens Mobilett Plus E®, Siemens, Erlangen, Deutschland), folgte das Anbringen eines Verbandes zur Stabilisierung der operierten Gliedmaße. Der Verband bestand aus drei Polsterwatten (Rolta® Soft Polsterwatte 3 m x 6 cm, Paul Hartmann AG, Heidenheim, Deutschland), 2 Gipsbinden (10 x 300 cm Gipsbinden, Comfort®, Deutschland) und einer Mullbinde (Temedia GmbH, Schönbach, Deutschland). Zur Narkoseausleitung erfolgte eine Versorgung des Tieres mit reinem Sauerstoff, bis das Schaf in der Lage war selbständig zu atmen. Daraufhin konnten die Beatmungsschläuche entfernt werden. Das Tier wurde in die Brust-Bauchlage gebracht, über Druck auf den Pansen entgast und im Anschluss die Magenschlundsonde und der venöse Zugang entfernt. Das Monitoring erfolgte unter permanenter Beobachtung im OP bis das Tier einen Schluckreflex zeigte und selbständig atmete, anschließend konnte der Trachealtubus entfernt werden. Daraufhin folgte der Transport auf einer Liege in den Stall. Im Stall wurde das Tier in das, speziell für die Schafe konstruierte Gurtsystem eingehängt. Das Tier befand sich in dieser Position für ein bis zwei Stunden unter ständiger Beobachtung bis es vollkommen wach war. Anschließend erfolgte die Entlassung in eine zwei Quadratmeter große Einzelbox. Am zweiten Tag nach der Operation wurde das Tier in die Kleingruppenhaltung, die in einer vier Quadratmeter großen Box war, zusammengestellt.

An den folgenden sieben Tagen erhielt das Tier 2,2 ml/50 kg Körpergewicht Finadyne® (Flunixin-Meglumin, MSD Tiergesundheit, Intervet Deutschland GmbH, Unterschleißheim Deutschland) zur Analgesie und 3 ml/50 kg Körpergewicht Veracin compositum® (Benzathin-Benzylpenicillin, Benzylpenicillin-Procaïn, Dihydrostreptomycinsulfat, Procainhydrochlorid, Albrecht GmbH, Aulendorf, Deutschland) im Abstand von zwei Tagen als Antibiose. Drei Tage nach der Operation erhielt das Tier ein neues Fentanyl-Pflaster (Durogesic® 75 µg/h, Janssen-Cilag GmbH, Neuss, Deutschland). Das Allgemeinbefinden, die Futteraufnahme, das Verhalten und die Belastung der vier Gliedmaßen wurden täglich beurteilt und dokumentiert. Die Beurteilung der Wundnaht an der Tibia fand bei dem, im Abstand von zwei Tagen stattfindenden Verbandswechsel, auf Entzündungserscheinungen wie Wärme, Sekretion, Schmerzhaftigkeit und Rötung statt, ebenso die Wundnähte an den Beckenkämmen. Eine Woche nach der Operation erfolgte das Abnehmen des Gipscasts. Die Fäden wurden nach zehn Tagen entfernt.

3.3.1 Röntgenkontrollen

Mit der radiologischen Dokumentation wurde direkt nach der Operation, noch vor dem Anlegen des Gipsverbandes, begonnen. Die Anfertigung der Röntgenaufnahmen erfolgte daraufhin im Abstand von vier Wochen, zu den Zeitpunkten 4., 8., 12., 16., 20. und 24. Woche post operationem, im Gurtsystem. Die Röntgenplatte wurde in einem Abstand von 1 m hinter der Tibia des Tieres positioniert und die Aufnahmen im antero-posterioren und latero-lateralen Strahlengang mit 73 kV und 2,5 mA, mit einem mobilen Röntgengerät (Siemens Mobilett Plus E®, Siemens, Erlangen, Deutschland) angefertigt (Abb. 16). Die Aufnahmen ermöglichten die Kontrolle der Position der AO-Platte, des Titan Mesh Scaffolds und der Schrauben. Dabei wurde auf die Entwicklung von Schraubenlysen geachtet. Darüber hinaus sollte die sekundäre Knochenheilung anhand der Kallusbildung im Osteotomiespalt beurteilt werden. Zusätzlich zu den konventionellen Röntgenaufnahmen wurden in der 24. Woche Aufnahmen der, nach erfolgter Euthanasie, entnommenen Tibia im Faxitron (Faxitron Bioptics, LLC, Arizona, USA) mit einer Bestrahlung von 35 kV über 25 s angefertigt. Die Aufnahmen der Bilder mit dem Faxitron erfolgten ebenfalls in zwei Vergrößerungen.

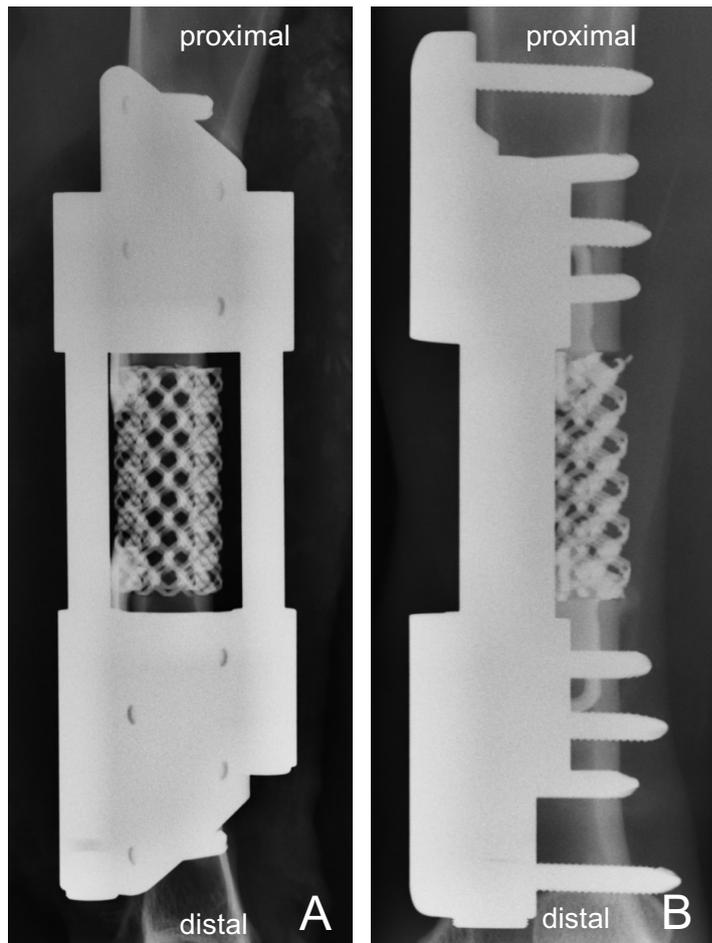


Abbildung 16: Röntgenaufnahmen der operierten Schafstibia in zwei Ebenen. A: Latero-lateraler Strahlengang. B: Anterio-posteriorer Strahlengang.

3.4 Probengewinnung

3.4.1 Euthanasie und Probengewinnung

Nach einer Standzeit von 24 Wochen erfolgte die Euthanasie. Das Tier wurde aus dem Stall gebracht, fixiert und ein grauer Venenverweilkatheter in die V. cephalica (Größe 1,3 x 32 mm, BD Venflon™ Pro Safety, Becton Dickinson Infusions Therapy, Helsingborg, Schweden) gelegt. Die Verabreichung von 2,5 g Thiopental-Natrium (Trapanal®, Altana, Pharma Deutschland GmbH, Konstanz, Deutschland) erfolgte über den Venenzugang bis zum Ausfall der Reflexe und der Atmung. Aus der darauffolgenden Injektion von 100 ml 7,45%-iger Kaliumchloridlösung (B. Braun Melsungen AG, Deutschland) resultierte der Herzstillstand. Im Sektionsraum fand die Entnahme der Tibia statt. Das rechte Hinterbein wurde enthäutet. Dazu wurde medial die Haut, kranial, kaudal und lateral zusätzlich der Weichteilmantel entfernt. Darauf folgte proximal das Durchtrennen des Kniegelenks und distal das Durchtrennen des Tarsokruralgelenks. Die Muskelbäuche des Musculus

gastrocnemius wurden größtenteils entfernt. Das Absetzen der Metaphysen erfolgte mit Hilfe einer druckluftbetriebenen Säge (DePuy Synthes GmbH, Salzburg, Österreich) und eines Sägeblatts, mit einer Schnittdicke von 0,6 mm und einer Breite von 14 mm. Nach dem Absetzen der Tuberositas tibiae, ebenfalls mit der druckluftbetriebenen Säge, wurde kranio-medial ein Orientierungspunkt mit einem Bleistift auf die Kortikalis gesetzt. Der Sitz der AO-Platte wurde nicht verändert, lediglich die beiden an den Defekt angrenzenden Schrauben wurden entfernt (Abb. 17). Durch das Absägen der Knochenenden und durch das Entfernen der beiden Schrauben wurde ein schnelleres Durchdringen der Fixierungslösung durch das Gewebe gewährleistet.



Abbildung 17: Freipräparierte Tibia post mortem mit entfernten, an den Defekt grenzenden Schrauben.

3.5 Präparataufbereitung für die histologische Auswertung

3.5.1 Fixierung und Aufbereitung

Nach der Entnahme der Tibia und der Anfertigung der Röntgenaufnahmen wurden die Proben in einer isotonen Formaldehyd-Alkohol-Lösung im Verhältnis 1:10 (Zusammensetzung: 324 ml 34% Formol, 540 ml 100% Ethanol, 130 ml 0,1 molarer Barbitol-Natrium-Puffer, pH 7,4 und 6 g Glukose) fixiert und zur Benetzung der Proben für 24 Stunden auf einen Schüttler (HS 501 digital, IKA Labortechnik, Staufen, Deutschland) gelagert. Auf diese Weise fand ein Aufhalten der Autolyse statt.

3.5.2 Sägen der Knochenproben

Nach erfolgter viertägiger Fixierung wurde die Probe eine Stunde unter fließendem Leitungswasser gewässert. Daraufhin erfolgten zunächst die Entfernung der Schrauben mit Hilfe eines Sechskantschraubenziehers mit Drehmomentbegrenzung (DePuy Synthes GmbH, Salzburg, Österreich) und anschließend die Entfernung der Platte. Alle Arbeitsschritte fanden unter dem Abzug und mit ständiger Befeuchtung der Probe durch Verwendung von Kochsalzlösung statt. Mit Hilfe eines Sägeschnittes durch die ehemaligen Schraubenkanäle wurde sowohl das proximale als auch distale Tibiaende unter Benutzung einer wassergekühlten Säge (Exakt Diamant Bandsäge® 300, Exakt Apparatebau GmbH, Norderstedt, Deutschland) entfernt (Abb. 18). Um eine spätere Orientierung an der Probe zu gewährleisten, wurde die proximo-kraniale Kortikalis medial mit einem Bleistift markiert (Abb. 19). Ein weiterer Sägeschnitt erfolgte von medial nach lateral, ebenfalls unter Benutzung der wassergekühlten Säge (Abb. 20). Die entstandenen Titan Mesh Scaffoldhälften wurden in S1 und S2 unterschieden und mit einem (S1) bzw. zwei Punkten (S2) mit einem Bleistift auf der proximo-medialen Kortikalis gekennzeichnet (Abb. 21).

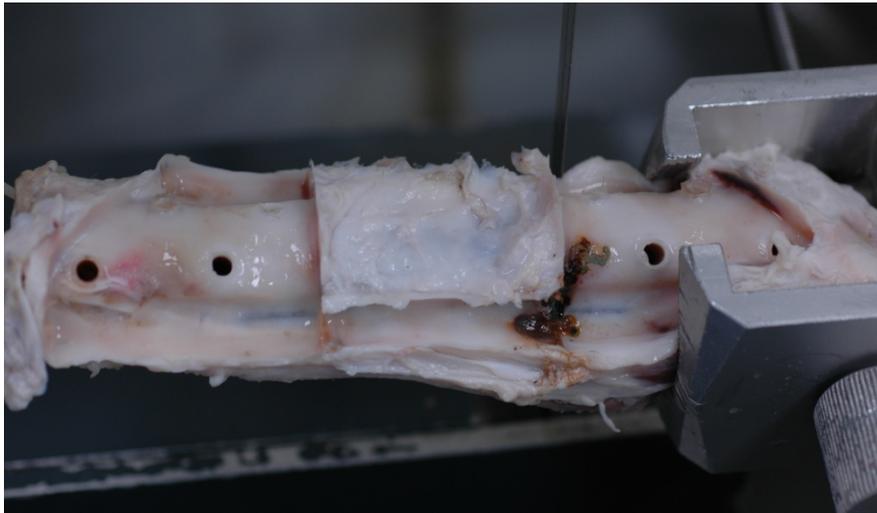


Abbildung 18: Fixierung der Tibia in der wassergekühlten Säge, zur Entfernung des proximalen und distalen Tibiaendes.

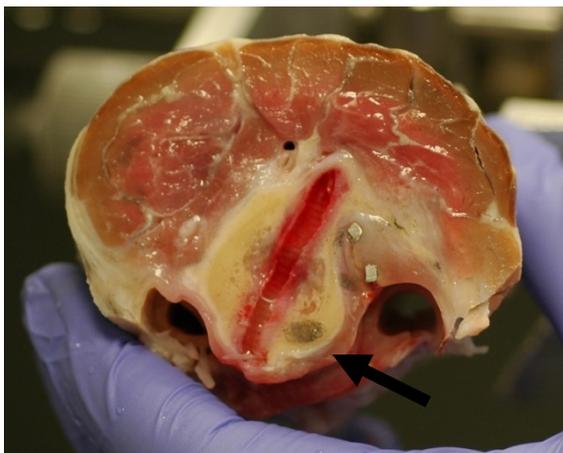


Abbildung 19: Aufsicht auf die proximo-kraniale Kortikalis mit medialem Orientierungspunkt.

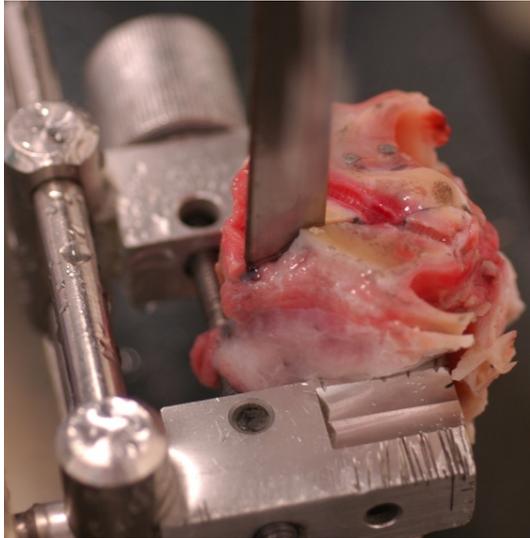


Abbildung 20: Durchführung des Sägeschnitts von medial nach lateral.

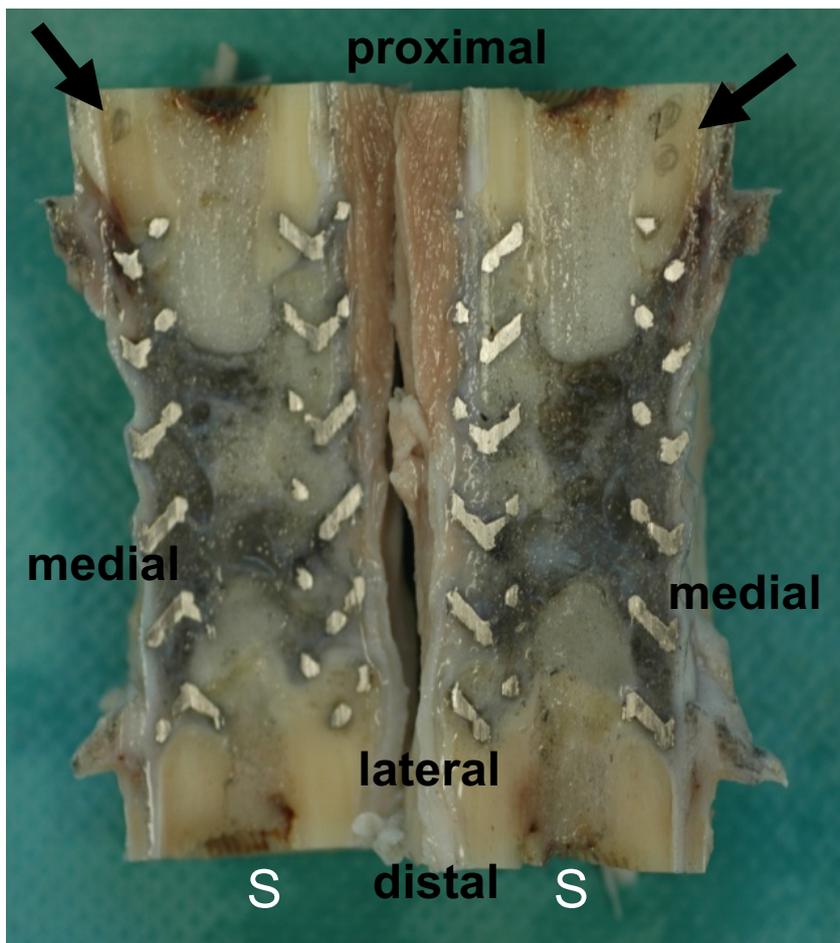


Abbildung 21: Darstellung der beiden Titan Mesh Scaffoldhälften nach durchgeführtem zentralen Sägeschnitt.

Beide Titan Mesh Scaffoldhälften (links S1 und rechts S2) besitzen eine Bleistiftmarkierung auf der proximo-medialen Kortikalis (schwarze Pfeile).

Anschließend wurde übermäßiges Muskelgewebe entfernt, die beiden Scaffoldhälften in Mullbinden verpackt und zur weiteren Fixierung für vier Tage auf einem Laborschüttler (HS 501 digital, IKA®-Werke GmbH & Co. KG, Staufen, Deutschland) in isotoner Formaldehyd-Alkohol-Lösung gelagert.

3.5.3 Aufbereitung für die Kunststoffeinbettung

Nach einer vier tägigen Fixierung der Proben fand die Entwässerung der Proben in aufsteigender Alkoholreihe in luftdicht verschlossenen Gläsern statt. Der Wechsel des Alkohols erfolgte nach einem festgelegten Schema (Tabelle 2). Die Herstellung des verdünnten Alkohols erfolgte aus 100%-igem Alkohol (Ethanol 100 Vol.-%, denaturiert mit Ethylmethylketon, Herbata-Arzneimittel, Berlin) und der, dem Verdünnungsgrad entsprechenden Aqua destillata Menge. Während der gesamten Entwässerung wurden die Proben weiterhin auf einem Laborschüttler (HS 501 digital, IKA®-Werke GmbH & Co. KG, Staufen, Deutschland) gelagert.

Tabelle 2: Aufsteigende Alkoholreihe.

Konzentration Ethanol in %	Zeit	Lagerungstemperatur
70	7 Tage	Raumtemperatur
80	7 Tage	Raumtemperatur
80	7 Tage	Raumtemperatur
96	7 Tage	Raumtemperatur
96	7 Tage	Raumtemperatur
100	7 Tage	Raumtemperatur
100	7 Tage	Raumtemperatur
100	7 Tage	Raumtemperatur

3.5.4. Kunststoffeinbettung

Nach abgeschlossener Entwässerung erfolgte die Vorbereitung der Proben für die Kunststoffeinbettung. Zuerst standen die Proben für vier Stunden in Xylol (J.T. Baker, Griesheim, Deutschland) bei Raumtemperatur auf einem Schüttler. Anschließend wurde eine Präinfiltrationslösung hergestellt. Dazu wurden 200 ml Basislösung (Technovit® 9100 NEU, Kaltpolymerisierender Kunststoff, Heraeus Kulzer GmbH, Wehrheim, Deutschland) mit Hilfe einer Aluminiumoxid-Ionenaustauschsäule (Aluminiumoxid 90 aktiv neutral, Merck KGaA, Darmstadt, Germany) entstabilisiert und auf einem Rührer mit 1g Härter 1 (Technovit® Härter 1 NEU, Dibenzylperoxid, Heraeus Kulzer GmbH, Wehrheim, Deutschland) vermischt.

Material und Methoden

Die Lösung wurde ca. zwei Stunden verrührt, bis eine klare homogene Lösung entstand. Die Proben wurden für 24 Stunden bei 4°C im Kühlschrank präinfiltriert. Die darauffolgende Infiltration erfolgte für insgesamt 14 Tage in einem Kühlschrank mit 4°C in einer Infiltrationslösung, wobei die Lösung nach sieben Tagen gewechselt wurde. Zur Herstellung der Infiltrationslösung wurden 400 ml entstabilisierter Basislösung (Technovit® 9100 NEU, Kaltpolymerisierender Kunststoff, Heraeus Kulzer GmbH, Wehrheim, Deutschland) mit 40 g PMMA-Pulver (Technovit® 9100 NEU, Kaltpolymerisierender Kunststoff, Heraeus Kulzer GmbH, Wehrheim, Deutschland) ca. zwei bis drei Stunden auf einem Rührer vermischt, bis eine klare homogene Lösung entstand. Anschließend wurden 2 g Härter 1 (Technovit® Härter 1 NEU, Dibenzylperoxid, Heraeus Kulzer GmbH, Wehrheim, Deutschland) hinzugegeben und weitere zwei Stunden gerührt, bis eine klare homogene Lösung entstand. Diese Lösung wurde mit entstabilisierter Basislösung auf 500 ml aufgefüllt. Nach der Infiltration erfolgte die Einbettung in Methylmethacrylat (Technovit® 9100 NEU, Heraeus Kulzer GmbH, Wehrheim, Deutschland), dazu wurden eine Stammlösung A und B hergestellt und in einem Verhältnis von 9:1 gemischt.

Zur Herstellung der Stammlösung A stellte man ca. 350 ml entstabilisierte Basislösung in einem Erlenmeyerkolben auf ein Magnetrührgerät und rührte es mit Hilfe eines Rührfisches. Anschließend wurden 80 g PMMA Pulver hinzugegeben und die Lösung auf 500 ml mit entstabilisierter Basislösung aufgefüllt. Die Lösung befand sich ca. zwei Stunden auf dem Magnetrührgerät, bis sich das PMMA Pulver aufgelöst hatte und die Flüssigkeit klar wurde. Daraufhin wurden 3 g Härter 1 hinzugegeben und die Stammlösung A für weitere 20 Minuten auf das Magnetrührgerät gestellt. Zur Herstellung der Lösung B gab man 44 ml entstabilisierter Basislösung in ein Erlenmeyerkolben und stellte sie auf ein Magnetrührgerät. Anschließend wurden 4 ml Härter 2 (Technovit® Härter 2, Tetramethylanilin, Heraeus Kulzer GmbH, Wehrheim, Deutschland) und 2 ml Regler (Technovit® Regler NEU, Decanthiol, Heraeus Kulzer GmbH, Wehrheim, Deutschland) hinzugegeben und ca. zwei Minuten weitergerührt. Um das Polymerisationsgemisch herzustellen, wurden neun Volumenanteile der Stammlösung A mit einem Volumenanteil Stammlösung B in einen Messzylinder gegeben (Tabelle 3). Mit einem Parafilm (Parafilm M®, Pechiney Plastic Packaging Inc., Chicago, USA) wurde der Messzylinder verschlossen und ca. eine Minute vorsichtig geschwenkt, sodass keine Luftbläschen entstanden und die beiden Stammlösungen dennoch gut durchmischt waren. Aufgrund der Probengröße konnten keine Spezialformen zur Einbettung verwendet werden. Daher wurden herkömmliche Honiggläser für die Einbettung herangezogen. Um die Bodenwölbung auszugleichen, wurden die Gläser mit einem lichthärtenden Einkomponentenkleber (Technovit® 7230, Heraeus Kulzer GmbH, Wehrheim, Deutschland) ca. 0,8 mm ausgegossen und zwei bis drei Tage verschlossen bei Tageslicht stehen gelassen. Die vorbereiteten Honiggläser wurden bis zur Hälfte mit dem

Polymerisationsgemisch gefüllt. Auf das Auswickeln der infiltrierten Proben aus den Mullbinden folgte ein vorsichtiges Eintauchen der Proben in das Polymerisationsgemisch mit einer Pinzette. Die Proben wurden mit der zuvor gesägten Präparatfläche nach unten auf den Glasboden gelegt, um eine gleichmäßige Verteilung des Polymerisationsgemisches zu gewährleisten. Nach jedem Flüssigkeitswechsel wurden die Proben für fünf bis zehn Minuten zur Evakuierung in einen vorgekühlten Exikkator mit extern angeschlossener Vakuumpumpe (400-600 mbar) gestellt. Die Polymerisation erfolgte ohne Verschluss der Gläser innerhalb von 24 Stunden in einem Kühlschrank bei -4°C . Es entstand eine untere harte Schicht, in der sich die Probe befand und eine darüberliegende weiche Schicht. Die weiche Schicht wurde abgetragen und die Proben ohne Verschluss zum Nachhärten für weitere 24 Stunden unter dem Abzug stehen gelassen. Anschließend erfolgte die Lagerung des herausgelösten Kunststoffblocks für weitere 24 Stunden unter dem Abzug.

Tabelle 3: Übersicht der Lösungskomponenten.

Bezeichnung	Basislösung	PMMA Pulver	Härter 1	Härter 2	Polymerisations- regler	Lager- fähigkeit
Prä- infiltration	200 ml		1 g			½ Jahr bei -20°C
Infiltration	500 ml	40 g	2 g			½ Jahr bei -20°C
Stamm- lösung A	500 ml	80 g	3 g			½ Jahr bei -20°C
Stamm- lösung B	50 ml			4 ml	2 ml	½ Jahr bei -20°C

3.5.5 Vorbereitung der Schliifpräparate

Nach dem Herauslösen des S1 Kunststoffblocks aus dem Honigglas, erfolgte das Abschleifen des überstehenden Kunststoffs mit Hilfe der wassergekühlten Säge (Exakt Diamant Bandsäge® 300, Exakt Apparatebau GmbH, Norderstedt, Deutschland). Sowohl proximal als auch distal wurde ein Kunststoffüberstand von ca. 0,5 mm stehen gelassen. Durch weiteres Schleifen wurde mit einem Schleifpapier der Körnung P 1200 an dem Exakt-Mikro Schleifsystem (Exakt 400 CS®, Micro Grinding System, Exakt Apparatebau GmbH, Norderstedt, Deutschland) ein gleichmäßiger, ca. 1-1,5 cm dicker Kunststoffblock hergestellt. Das Anrauen zweier Objektträger mit dem Schleifpapier der Körnung P 1200 an dem Exakt-Mikro Schleifsystem, gewährleistete eine bessere Haftoberfläche bei den folgenden Arbeitsschritten. Ein Objektträger wurde mit Petrolbenzin gereinigt und mit der angerauten Seite nach unten in die Vakuumklebepresse (Exakt Vakuumklebepresse® 401, Exakt Apparatebau GmbH, Norderstedt, Deutschland) eingeführt. Daraufhin folgte das Einlegen des mit Petrolbenzin gereinigten Kunststoffblocks in die Klebepresse mit der Präparatoberfläche nach unten.

Das Anmischen des Kunststoffklebers (Technovit® 4000, Heraeus Kulzer GmbH, Wehrheim, Deutschland) erfolgte mit Hilfe eines Metallspatels und bestand aus zwei Teilen des Sirup I (Technovit® 4000, Heraeus Kulzer GmbH, Wehrheim, Deutschland) und einem Teil des

Sirup II (Technovit® 4000, Heraeus Kulzer GmbH, Wehrheim, Deutschland). Ein kleines Kunststoffgefäß wurde ca. 50% mit dem Pulver TV 4000 (Technovit® 4000, Heraeus Kulzer GmbH, Wehrheim, Deutschland) gefüllt, mit der Sirupmischung unter ständigem Umrühren aufgefüllt, bis eine homogene Masse entstand. Anschließend erfolgte das gleichmäßige Auftragen des Kunststoffklebers auf den Kunststoffblock. Es folgte das Absenken und die Arretierung des durch das Vakuum der Klebepresse gehaltenen Objektträgers auf den Kunststoffblock. Die darauffolgende Polymerisation dauerte zehn Minuten. Der nächste Schritt bestand aus dem Abschleifen des Kunststoffs auf der Präparatoberfläche mit Hilfe des Exakt-Mikro Schleifsystems und eines Schleifpapiers P 800, bis die vier Kortikales freilagen. Der zweite Objektträger wurde mit Petrolbenzin gereinigt und in die Präzisionsklebepresse (Exakt Präzisionsklebepresse® 402, Exakt Apparatebau GmbH, Norderstedt, Deutschland) eingeführt. Auf die ebenfalls mit Petrolbenzin gereinigte Präparatoberfläche wurde ein lichthärtender Präzisionskleber (Technovit® 7210, Heraeus Kulzer GmbH, Wehrheim, Deutschland) aufgetragen, die Probe in die Präzisionsklebepresse gelegt und vorsichtig in Richtung des zuvor eingespannten Objektträgers gehoben. Nach dem Erreichen der gewünschten Position wirkte das UV-Licht über ca. 20 Minuten, bis zur Aushärtung des Klebstoffs, auf das Präparat ein. Das entstandene Sandwich wurde anschließend mit Hilfe der wassergekühlten Bandsäge (Exakt Diamant Bandsäge® 300, Exakt Apparatebau GmbH, Norderstedt, Deutschland) bearbeitet, indem der Objektträger mit der Präparatoberfläche an das Trennband herangeführt, auf einen Abstand von ca. 500 µm eingestellt und abgesägt wurde. Daraufhin erfolgte das Schleifen des Präparats im Exakt-Mikro Schleifsystem (Exakt 400 CS®, Micro Grinding System, Exakt Apparatebau GmbH, Norderstedt, Deutschland) mit den Schleifpapieren der Körnung P 800, P 1000 und P 1200, mit abschließendem Polieren mit P 2500 und P 4000. Ziel war es ein gleichmäßiges Präparat mit einer Dicke von ca. 100 µm zu erreichen.

3.6 Histologische Färbungen der Gewebeschnitte

Die in Kunststoff eingebetteten und geschliffenen Präparate wurden mit der Safranin-Orange/von Kossa-Färbung angefärbt (Tabelle 10). Eine histologische Färbung wird angefertigt, um die versuchsrelevanten Gewebe- und Zellstrukturen im histologischen Schnitt darzustellen und somit eine differenzierte Auswertung zu gewährleisten.

3.6.1 Safranin Orange/von Kossa-Färbung

Die Safranin Orange/von Kossa-Färbung ermöglicht eine Differenzierung von mineralisiertem und nicht-mineralisiertem Gewebe und wurde für die deskriptive Histologie und histomorphometrische Auswertung verwendet. Bei dieser Färbemethode lassen sich Knochen- und Knorpelgewebe schwarz und Mineralisationsfronten schwarz granuliert anfärben. Unmineralisierte Osteoidschichten können auf mineralisiertem Knochen (schwarz) als eine dünne rote Schicht differenziert werden. Hyaliner Knorpel, der während der endochondralen Knochenbildung entsteht, kann anhand seiner Morphologie mit enthaltenen Chondroblasten, Chondrozyten und Chondrone mit dazwischenliegender Matrix in dunkleren Rottönen dargestellt werden. Binde- und Muskelgewebe erscheinen davon gut abgrenzbar in helleren Rottönen.

3.7 Auswertung der Gewebeschnitte

3.7.1 Digitalisierung der histologischen Präparate

Die 12 mit Safranin Orange/von Kossa gefärbten Präparate wurden für die histomorphometrische Auswertung mit Hilfe des Mikroskops (Axioskop 40 Carl Zeiss Micro Imaging GmbH, Göttingen, Deutschland) und des Computerprogramms AxioVision (Carl Zeiss Micro Imaging GmbH, Göttingen, Deutschland) digitalisiert. Die Orientierung sämtlicher Präparate unter dem Mikroskop erfolgte in horizontaler Ausrichtung, mit dem Maßstabsbalken standardmäßig im medial-distalen Bildrand (Abb. 22). In dem Fotobearbeitungsprogramm Adobe Photoshop 7 (Adobe Systems GmbH, München, Deutschland) erfolgte die weitere Bearbeitung der Bilder, wie die Verkleinerung auf 2500 Pixel, sowie die Drehung in eine horizontale Ausrichtung.

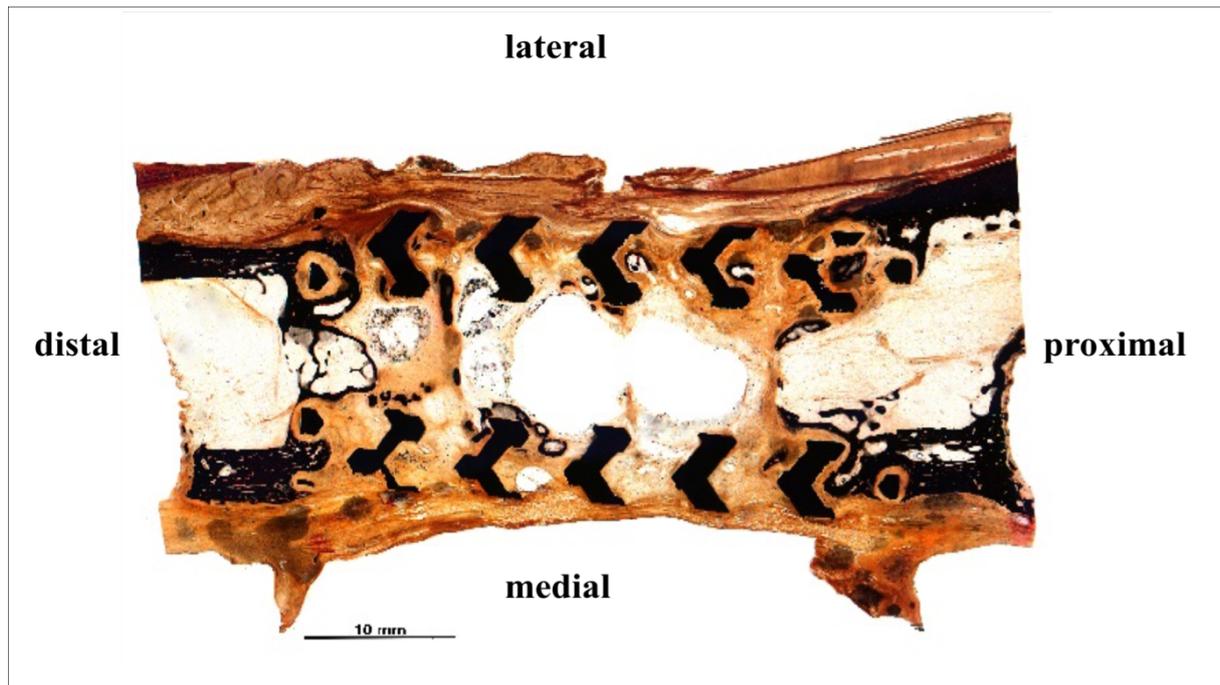


Abbildung 22: Beispielhafte Darstellung eines histologischen Präparates in kombinierter Safranin Orange/von Kossa-Färbung in horizontaler Ausrichtung. Der Maßstabsbalken befindet sich medio-distal. Die Titanstruts des Titan Mesh Scaffolds sind medial und lateral als schwarze Streifen erkennbar.

3.7.2 Histomorphologische Evaluation der histologischen Präparate

Für die histomorphologische Auswertung wurden die 12, mit Safranin-Orange/von Kossa-Färbung angefärbten, Präparate unter dem Mikroskop (Axioskop 40 Carl Zeiss Micro Imaging GmbH, Göttingen, Deutschland) bei aufsteigender Vergrößerung durchgemustert. Die histologische Evaluation erfolgte nach einem einheitlichen Schema mit zuvor festgelegten Kriterien. Zunächst wurde die Position des Titan Mesh Scaffolds im Osteotomiedefekt beurteilt. Die Bewertung der Gewebezusammensetzung und -verteilung im Osteotomiedefekt erfolgte, zum einen zwischen den Titanstruts, zum anderen zentral in der Scaffoldpore, sowie lateral und medial außerhalb des Titan Mesh Scaffolds. Dabei wurde die Neubildung von mineralisiertem Knochen und hyalinen Knorpel nach Form und Struktur beurteilt. Anhand des Auftretens von Osteoblasten und Osteoklasten konnte eine Aussage über die Form der Knochenbildung getroffen werden. Der Knochentyp und das Vorliegen einer direkten oder indirekten Knochenbildung wurden bestimmt. Die Beurteilung der Kortikales erfolgte mit Augenmerk auf eine Abrundung der Ränder, eine Osteolyse oder einen Markraumschluss. Das Auftreten von Bindegewebe wurde ebenfalls beschrieben. Anzeichen einer Non-Union, wie ein Muskelprolaps in den Osteotomiespalt und Atrophie der Tibiaenden, wurden ausgewertet. Eine Ansammlung von Entzündungszellen und Gefäßen wurden als ein Zeichen für eine entzündliche Reaktion gewertet. Das histologische Präparat

Material und Methoden

des Tieres, das nach der ersten Woche ausgeschlossen wurde, diente histomorphologisch als Vergleichsprobe.

3.7.3 Definition der Region of Interest der Präparate

Die Festlegung der Region of Interest (ROI, Region von Interesse) gewährleistete einen einheitlichen und standardisierten Vergleich aller Präparate in ihrem Heilungsprozess. Die Festlegung der Region of Interest (ROI, Region von Interesse) gewährleistete einen einheitlichen und standardisierten Vergleich aller Präparate in dem Heilungsprozess. Die Gesamt-ROI, sowie die darin liegenden ROIs wurden separat betrachtet und ausgewertet. Die Gesamt-ROI beinhaltete zum einen die Laterale-ROI, die Mediale-ROI, die Laterale Struts-ROI, die Mediale Struts-ROI und die Markraum-ROI (Abb. 23).

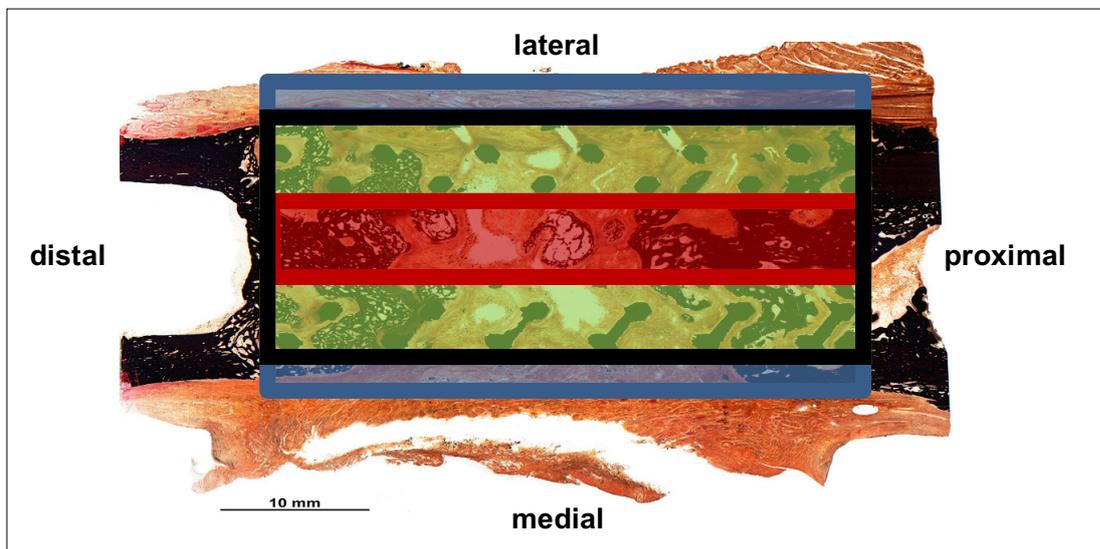


Abbildung 23: Darstellung der einzelnen ROIs eines in kombinierter Safranin Orange/von Kossa-Färbung angefärbten histologischen Präparates.

Dargestellt sind: Die Gesamt-ROI (schwarz), die Laterale-ROI (blau), die Mediale-ROI (blau), die Laterale Struts-ROI (grün), die Mediale Struts-ROI (grün) und die Markraum-ROI (rot).

3.7.4 Histomorphometrische Analyse der histologischen Präparate

Die Festlegung wie auch die qualitative und quantitative Messung der Gewebearten in den einzelnen ROIs wurden mit der Auswertungssoftware Image J (Rasband, W.S., U.S. National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA) erfasst. Dazu wurden mit Hilfe der Software gleiche Farbpixel gemessen und als Flächen in mm^2 angegeben. Die Flächenangaben in mm^2 wurden anschließend in prozentuale Werte umgerechnet. Somit konnten Gewebeflächen wie die Knochen-, Knorpel- und Bindegewebsfläche ermittelt werden. Leerflächen, die Artefakte der Gewebeaufbereitung und Bereiche ohne Gewebe waren,

sowie die Titanflächen gingen nicht in die Berechnung der Grundfläche mit ein. Das Markieren der genannten Bereiche erfolgte stets mit gleichzeitiger Kontrolle unter dem Mikroskop. Zu Beginn wurde das histologische Präparat mit dem Maßstabsbalken von 10 mm kalibriert. Bei der Erfassung der Daten diente der 40 mm große Osteotomiespalt als Orientierungspunkt, alle Präparate hatten somit eine standardisierte Länge von 40 mm. Im nächsten Schritt erfolgte das Einzeichnen der Präparatbreite, die bei jedem Präparat individuell anhand der Kallusdicke festgelegt wurde. Dazu wurde ein Vektor vom lateralen Kallus zum medialen Kallus gezogen (Abb. 24).

Im nächsten Schritt wurde ein weiterer Vektor, der von der Mitte der lateralen Titan Struts bis zur Mitte der distalen Titan Struts zog, eingezeichnet. Das Programm berechnete daraufhin die Gesamt-ROI, welche sich als ein Rechteck darstellte und dem 40 mm großen Frakturspalt entsprach. Für die Festlegung der Lateralen Struts-ROI und der Medialen Struts-ROIs wurden zwei Rechtecke eingezeichnet (Abb. 25). Die vier Kortikales wurden mit vier Rechtecken, mit einem festgelegten Standardmittelwert von 3 mm Breite, welcher zuvor anhand der Tibiabreite eines nativen Knochenpräparats bestimmt wurde, markiert. Die Kortikales gingen nicht in die Bewertung ein. Im Anschluss erfolgte das Einzeichnen der Gewebeflächen. Als erstes wurden die Leerflächen und die Titanflächen eingezeichnet. Als nächstes erfolgte das Markieren von Knochen- und Knorpelgewebe, zur Ermittlung der mineralisierten Knochenfläche und der hyalinen Knorpelfläche. Das Bindegewebe wurde von dem Computerprogramm nach Subtraktion aller zuvor eingezeichneten Flächen errechnet. Im letzten Schritt wurde die Titan-Knochen-Kontaktfläche markiert, um ein direktes Heranwachsen des Knochens in direktem Kontakt zum Titan Mesh Scaffold zu untersuchen.

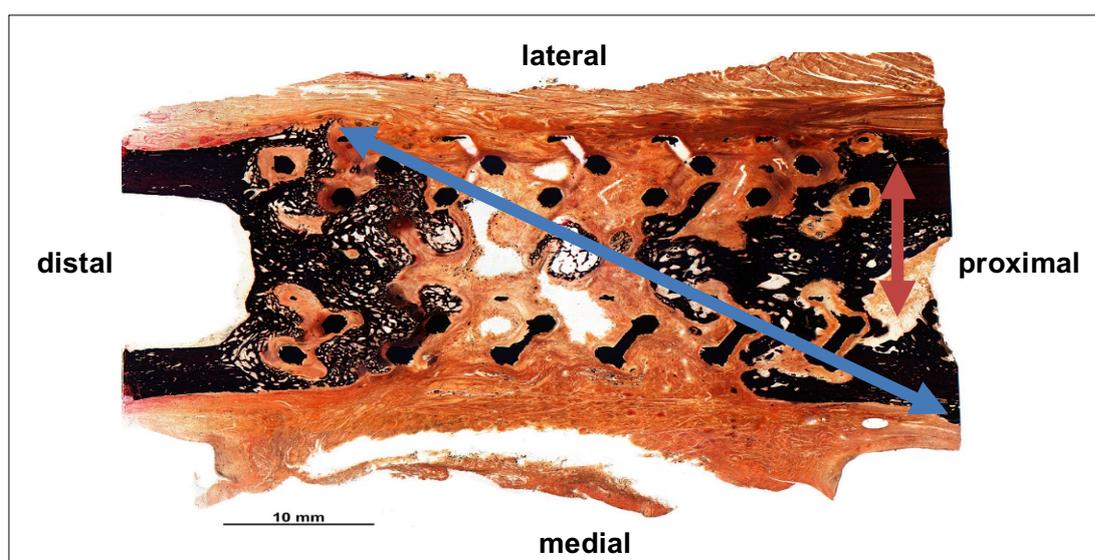


Abbildung 24: Darstellung eines histologischen in kombinierter Safranin Orange/von Kossa gefärbten Präparates mit Einzeichnen der Vektoren.

Material und Methoden

Blau zeigt das Einzeichnen des Vektors von lateral nach medial. Rot zeigt das Einzeichnen der Vektors von der Mitte der lateralen Titan Struts bis zur Mitte der medialen Titan Struts.

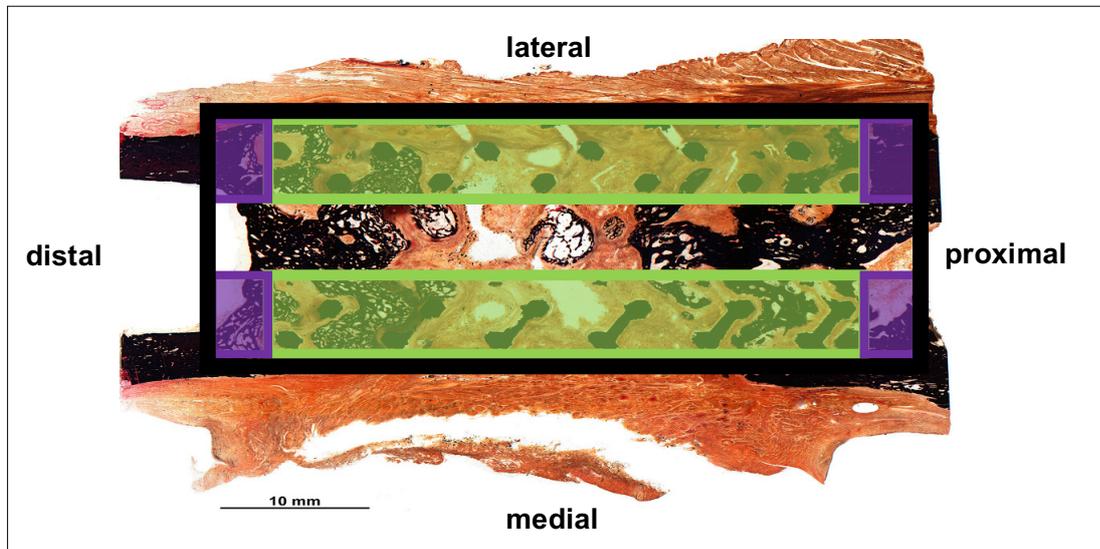


Abbildung 25: Darstellung eines histologischen in kombinierter Safranin Orange/von Kossa gefärbten Präparates.

Die Gesamt-ROI beinhaltet die Laterale Struts-ROI (grün) und die Mediale Struts-ROI (grün), sowie die vier Rechtecke der vier Kortikales.

3.8 Statistik

Die statistische Auswertung wurde mit dem Computerprogramm SPSS Statistics® 18 (SPSS GmbH Software, München, Deutschland) vorgenommen. Nach dem Kolmogorov-Smirnov-Test liegt mit 95%-iger Wahrscheinlichkeit keine Normalverteilung der Daten vor. Daher und aufgrund der geringen Gruppengröße ($n=6$) erfolgte die Anwendung von nicht parametrischen Tests. Der Mann-Whitney-U-Test ist ein nicht parametrischer Zwei-Stichproben-Test für unabhängige Parameter und wurde zum Vergleich beider Gruppen verwendet. Ein signifikanter Unterschied in den Gruppen lag bei einem festgelegten Signifikanzniveau (α) von 5% vor, daraus folgt, dass die Irrtumswahrscheinlichkeit (p) bei 0,05 liegt. Der Vergleich der unterschiedlichen Parameter beider Gruppen, erfolgte in einer graphischen Darstellung über Boxplots. Anhand der Boxplots werden der Median (50-Prozentquartil), das 25- und 75-Prozentquartil, der Minimum- und Maximumwert, ebenso wie Ausreißer (\cdot) und Extremwerte ($*$) dargestellt. Der Boxplotkörper wird zum einen von dem 25- und 75-Prozentquartil begrenzt und enthält zum anderen den Median. Die Whisker, die sich sowohl oben als auch unten an den Boxplotkörper anschließen, umfassen Werte oberhalb des 75-Prozentquartils und unterhalb des 25-Prozentquartils. Die Länge des Whiskers kann höchstens das 1,5-fache der Länge des Boxplotkörpers betragen. Werte, die außerhalb dieses Bereichs liegen werden als Ausreißer bzw. Extremwerte bezeichnet. Die eckigen Klammern über den Boxplots stellen die signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen dar.

4. Ergebnisse

4.1 Operations- und Standzeitbefunde

Die Narkose und der operative Eingriff an der Tibia und dem Beckenkamm wurden von den Schafen gut toleriert. Bei einem Tier der Gruppe mit dem weichen Titan Mesh Scaffold trat aufgrund eines Traumas im Stall, innerhalb der ersten Woche, eine Fraktur der operierten Gliedmaße auf. Das Tier wurde vorzeitig aus dem Versuch genommen und durch ein neues Tier ersetzt. Insgesamt gingen zwölf Tiere (n=6) nach einer Versuchszeit von 24 Wochen in die Auswertung ein. Alle Tiere tolerierten während der Aufwachphase den Aufenthalt im Gurtsystem post operativ gut. Nach der Entlassung aus dem Gurtsystem in die Einzelbox, mit Sicht und Körperkontakt zu den Artgenossen, waren die Tiere in der Lage die operierte Gliedmaße voll zu belasten. Zwei Tage nach der Operation konnte jedes Tier in die Kleingruppenhaltung entlassen werden. Bei der täglichen Untersuchung der Tiere trat bei zwei Tieren der Gruppe mit dem weichen Titan Mesh Scaffold und bei fünf Tieren der Gruppe mit dem steifen Titan Mesh Scaffold innerhalb der ersten drei Wochen nach der Operation ein Serom am Wundrand auf. Alle sieben Tiere erhielten einen leichten Polsterverband (Rolta® Soft Polsterwatte 3 m x 6 cm, Paul Hartmann AG, Heidenheim, Deutschland) und 3 ml/50 kg Körpergewicht Veracin Compositum® (Benzathin-Benzylpenicillin, Benzylpenicillin-Procaïn, Dihydrostreptomycinsulfat, Procainhydrochlorid, Albrecht GmbH, Aulendorf, Deutschland) als Antibiotikum. Das Serom bildete sich bei allen Tieren innerhalb von drei Wochen zurück. Ein Tier der Gruppe mit dem steifen Titan Mesh Scaffold zeigte im ersten Viertel der Versuchszeit eine vorübergehende mittelgradige Stützbeinlahmheit. Bei jeweils einem Tier beider Gruppen trat im ersten Viertel bzw. nach der Hälfte der Standzeit eine länger anhaltende, mittelgradige Stützbeinlahmheit auf. Die Tiere erhielten bis zur Besserung täglich 2,2 ml/50 kg Körpergewicht Finadyne® (Flunixin-Meglumin, MSD Tiergesundheit, Intervet Deutschland GmbH, Unterschleißheim Deutschland) zur analgetischen Versorgung. Bei einem Tier der Gruppe mit dem steifen Titan Mesh Scaffold trat in der 4. Woche post OP eine Infektion des Beckenkammes auf, welche täglich lokal mit einer Jodlösung (Prontosan®, B. Braun, Melsungen, Deutschland) gespült wurde. Zusätzlich erfolgte eine antibiotische Behandlung des Tieres mit Veracin Compositum® und eine analgetische Behandlung mit 2,2 ml/50 kg Körpergewicht Finadyne® (Flunixin-Meglumin, MSD Tiergesundheit, Intervet Deutschland GmbH, Unterschleißheim Deutschland).

4.2 Ergebnisse der Radiologie

Standardisierte latero-laterale und anterior-posteriore Röntgenaufnahmen beider Gruppen wurden zur Beurteilung des Heilungsverlaufs monatlich angefertigt. Auf der latero-lateralen Röntgenaufnahme konnte der eingesetzte Titan Mesh Scaffold durch das Plattenfenster, die AO-Platte und sowohl Anteile der am weitesten proximal und der am weitesten distal sitzenden DL Verriegelungsschraube beurteilt werden. Auf der anterior-posterioren Röntgenaufnahme waren ebenfalls der Sitz der AO-Platte und des Titan Mesh Scaffolds sowie der Sitz der acht DL Verriegelungsschrauben in der Tibia beurteilbar. Aufgrund der Röntgendichte der AO-Platte in Kombination mit dem Titan Mesh Scaffold konnte der Verlauf der Kallusformation in der zentralen Pore des Titan Mesh Scaffolds nicht zuverlässig röntgenologisch beurteilt werden. Das Auftreten von Osteolysen konnte hingegen beurteilt werden. Die postoperativen Aufnahmen bestätigten bei sämtlichen Tieren eine korrekte Positionierung des Titan Mesh Scaffolds und der AO-Platte (Abb. 26).

Insgesamt konnte in beiden Gruppen sowohl kein Versagen des Titan Mesh Scaffolds als auch kein AO-Plattenversagen während der gesamten 24-wöchigen Versuchszeit beobachtet werden. Bei insgesamt drei Tieren beider Gruppen wurde auf den anterior-posterioren Röntgenaufnahmen in der 8. Woche eine geringgradige Aufhellung der Kortikalis an der ersten proximalen Schraube der AO-Platte sichtbar, welche eine Osteolyse vermuten ließ. Im weiteren Verlauf wurde die Aufhellung zwar deutlicher, jedoch ohne das Auftreten einer Lockerung, sowie ohne Verlust der Schraube (Abb. 27-36). Auf den anterior-posterioren Röntgenaufnahmen konnte bei zwei Tieren der Gruppe mit dem weichen Titan Mesh Scaffold, eine Kallusbildung ab der 12. Woche, bei einem Tier proximal und bei dem anderen Tier distal, vermutet werden (Abb. 27 und Abb. 28). Ab der 20. Woche konnte bei zwei weiteren Tieren der Gruppe mit dem weichen Titan Mesh Scaffold, bei einem proximal und bei dem anderen distal, eine Kallusbildung auf der Oberfläche des Titan Mesh Scaffolds festgestellt werden (Abb. 29 und Abb. 30). In der Gruppe mit dem steifen Titan Mesh Scaffold konnte die Kallusformation bei einem Tier ab der 4. und bei einem anderen Tier ab der 8. Woche vermutet werden (Abb. 31 und Abb. 32). Bei einem weiteren Tier der Gruppe mit dem steifen Titan Mesh Scaffold konnte, sowohl proximal als auch distal, ab der 16. Woche eine Kallusbildung beobachtet werden (Abb. 33). Die röntgendichte Verschattung lag bei allen Tieren auf der lateralen Seite. Die in der 24. Woche zusätzlich zu den konventionellen Röntgenaufnahmen in anterior-posteriorer und latero-lateraler Lage angefertigten Aufnahmen im Faxitron bestätigten die Ergebnisse des konventionellen Röntgens, es konnten jedoch aufgrund der Röntgendichte des Titan Mesh Scaffolds in Kombination mit der AO-Platte keine weiteren Informationen in Erfahrung gebracht werden. Aufgrund der auftretenden Auslöschung konnten die Faxitronaufnahmen nicht für eine Auswertung der Kallusformation herangezogen werden.

Ergebnisse

Es folgen die röntgenologischen Aufnahmen mit eingezeichneten Veränderungen.

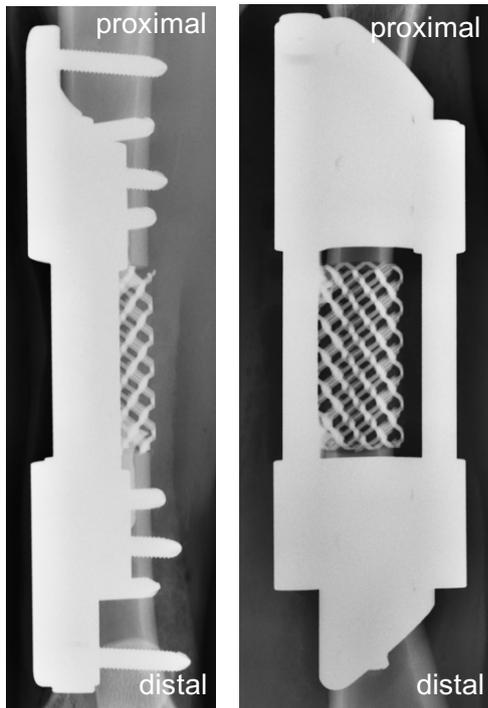


Abbildung 26: Darstellung einer postoperativen röntgenologischen Aufnahme eines Tieres der Gruppe mit dem weichen Titan Mesh Scaffold.
Zur Beurteilung der Positionierung des Titan Mesh Scaffolds und der AO-Platte. Anterio-posteriorer und latero-lateraler Strahlengang.

Ergebnisse

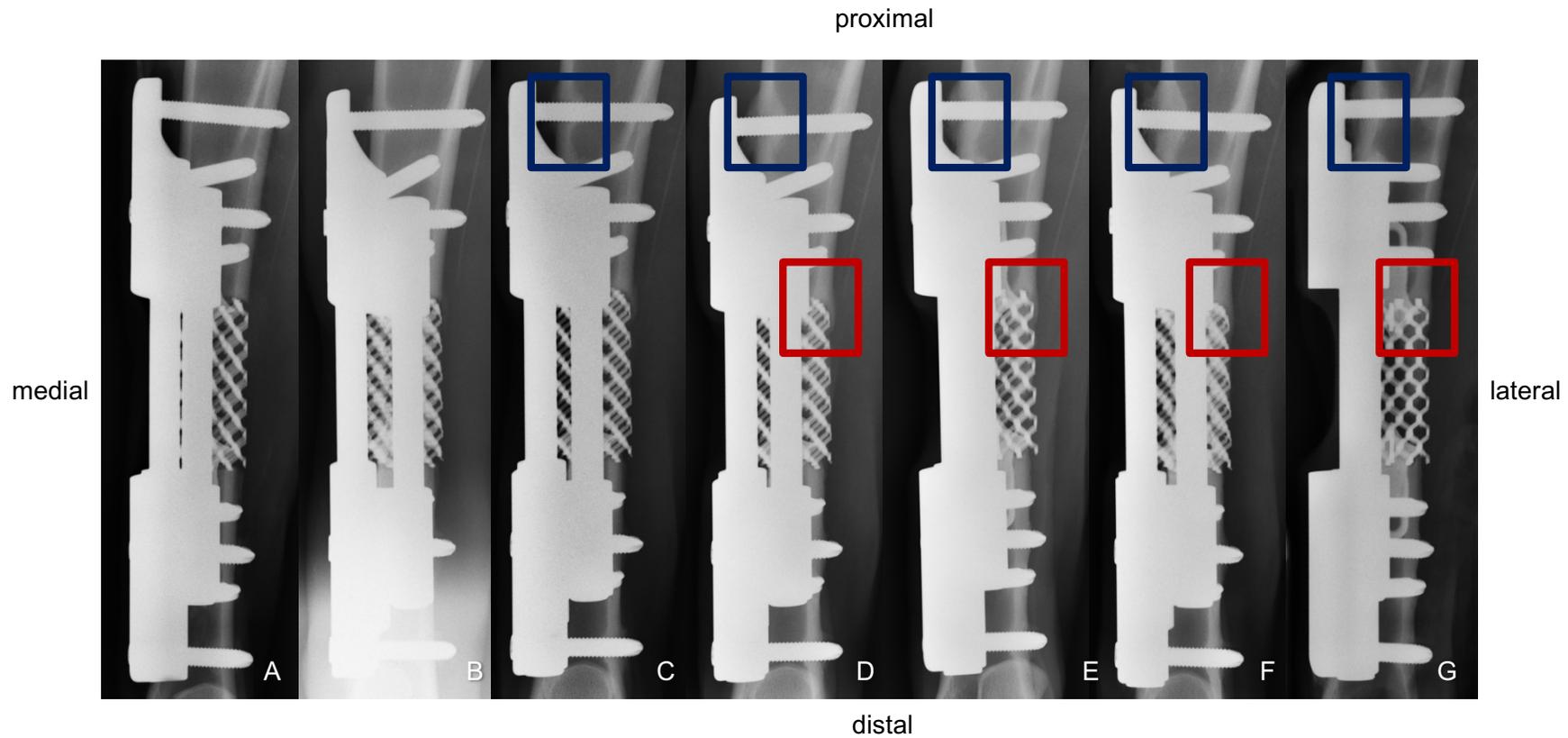


Abbildung 27: Röntgenologische Aufnahmen eines Tieres der Gruppe mit dem weichen Titan Mesh Scaffold.

Tier D der Gruppe mit dem weichen Titan Mesh Scaffold: (A) post OP; (B) 4. Woche; (C) 8. Woche; (D) 12. Woche (E) 16. Woche; (F) 20. Woche; (G) 24. Woche. Die roten Quadrate weisen auf die proximale Kallusbildung ab der 12. Woche hin. Die blauen Quadrate zeigen die proximale röntgenologische Aufhellung ab der 8. Woche. Anterio-posteriorer Strahlengang.

Ergebnisse

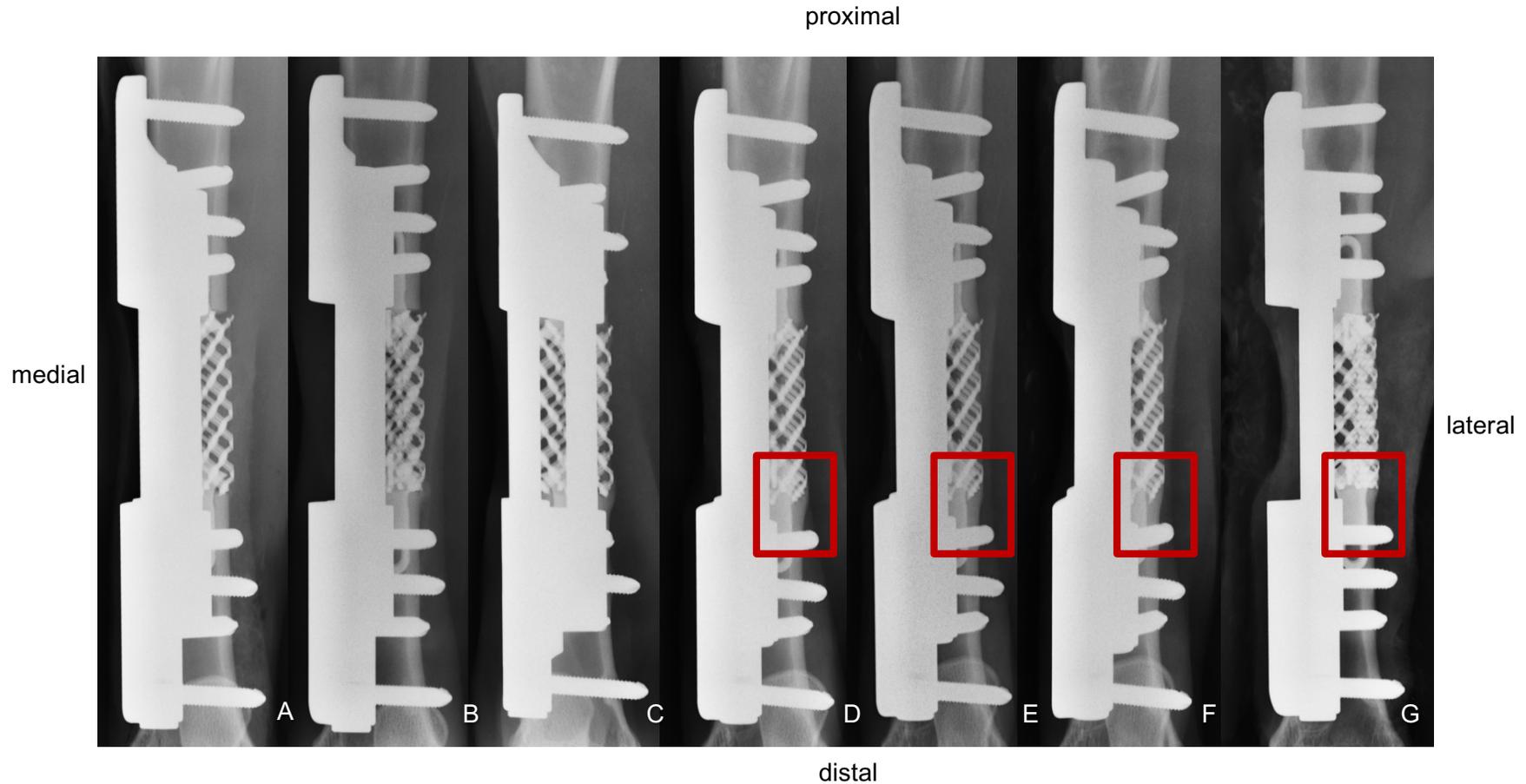


Abbildung 28: Röntgenologische Aufnahmen eines Tieres der Gruppe mit dem weichen Titan Mesh Scaffold.

Tier F der Gruppe mit dem weichen Titan Mesh Scaffold: (A) post OP; (B) 4. Woche; (C) 8. Woche; (D) 12. Woche (E) 16. Woche; (F) 20. Woche; (G) 24. Woche.

Die roten Quadrate weisen auf die distale Kallusbildung ab der 12. Woche hin. Anterio-posteriorer Strahlengang.

Ergebnisse

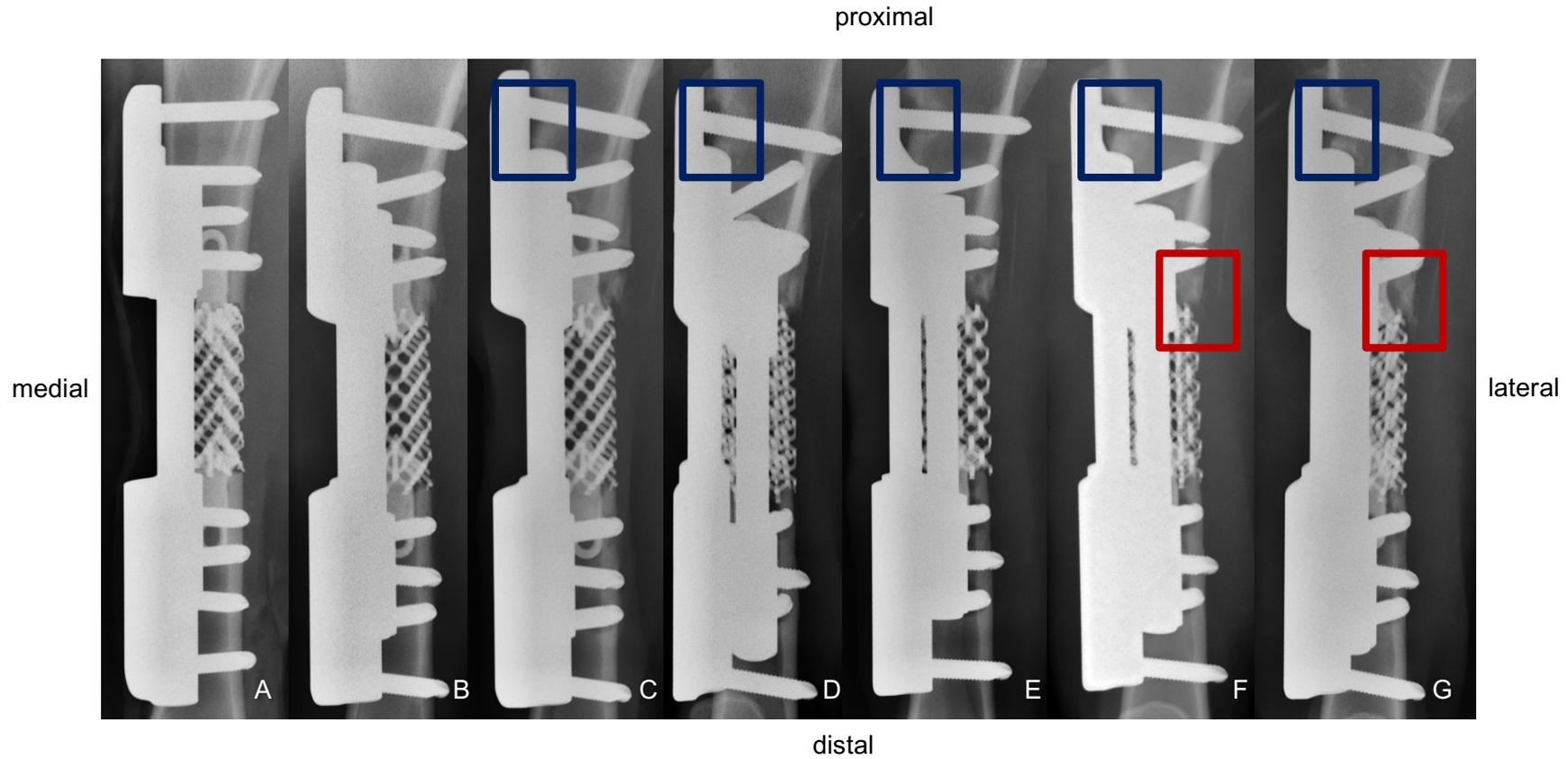


Abbildung 29: Röntgenologische Aufnahmen eines Tieres der Gruppe mit dem weichen Titan Mesh Scaffold.

Tier A der Gruppe mit dem weichen Titan Mesh Scaffold: (A) post OP; (B) 4. Woche; (C) 8. Woche; (D) 12. Woche (E) 16. Woche; (F) 20. Woche; (G) 24. Woche. Die roten Quadrate weisen auf die proximale Kallusbildung ab der 20. Woche hin. Die blauen Quadrate zeigen die proximale röntgenologische Aufhellung ab der 8. Woche. Anterio-posteriorer Strahlengang.

Ergebnisse

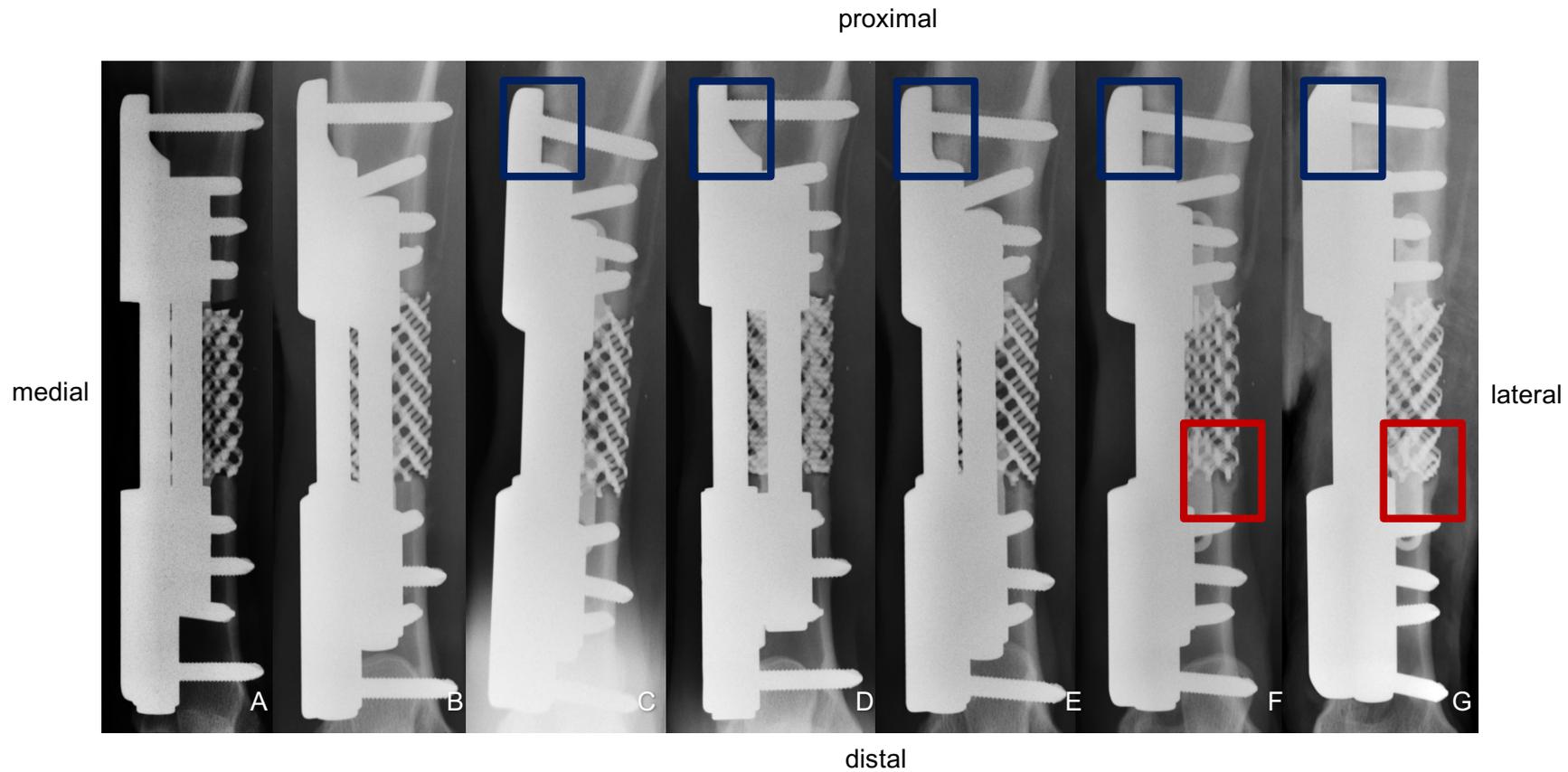


Abbildung 30: Röntgenologische Aufnahmen eines Tieres der Gruppe mit dem weichen Titan Mesh Scaffold.

Tier B der Gruppe mit dem weichen Titan Mesh Scaffold: (A) post OP; (B) 4. Woche; (C) 8. Woche; (D) 12. Woche (E) 16. Woche; (F) 20. Woche; (G) 24. Woche. Die roten Quadrate weisen auf die distale Kallusbildung ab der 20. Woche hin. Die blauen Quadrate zeigen die proximale röntgenologische Aufhellung ab der 8. Woche. Anterio-posteriorer Strahlengang.

Ergebnisse

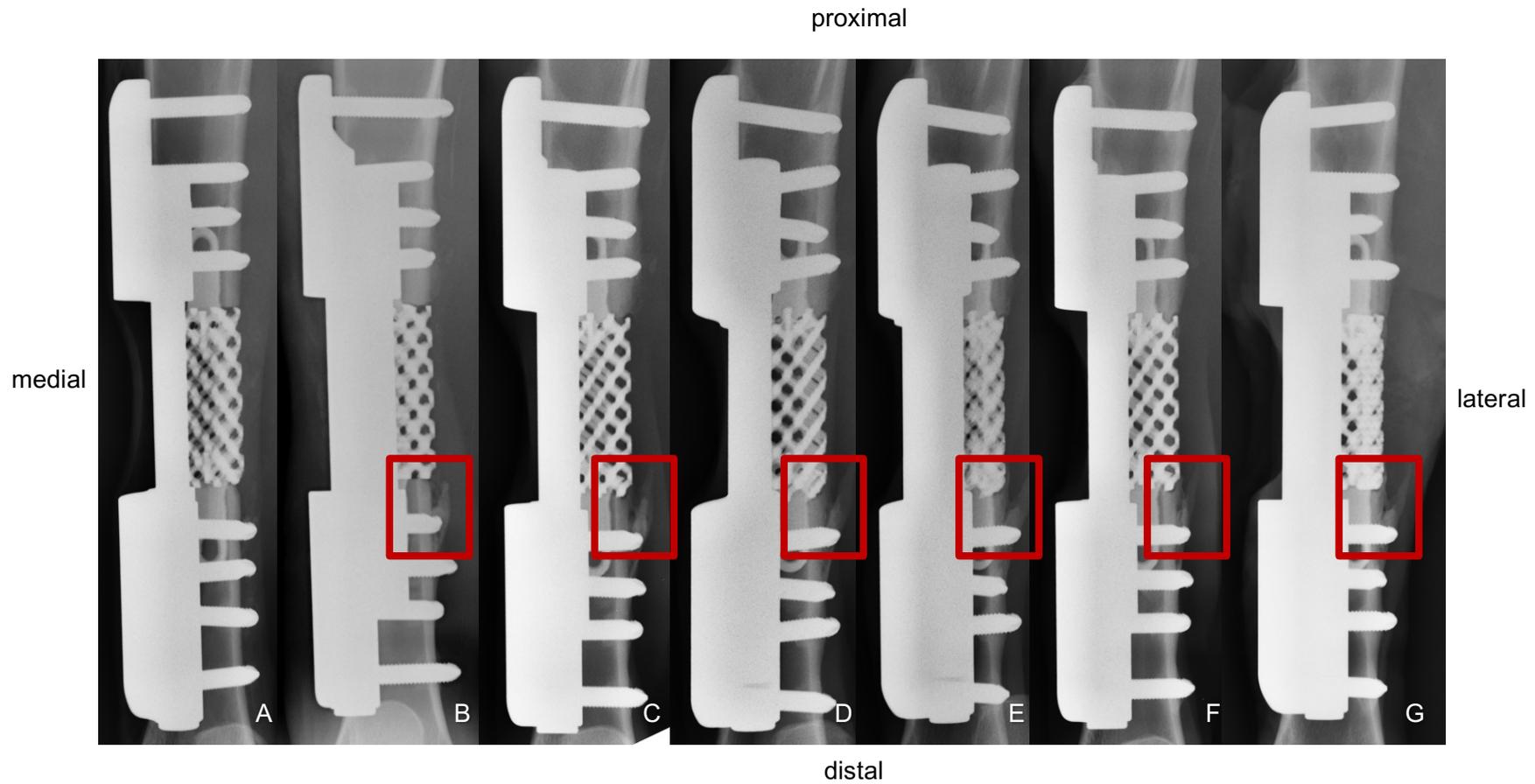


Abbildung 31: Röntgenologische Aufnahmen eines Tieres der Gruppe mit dem steifen Titan Mesh Scaffold.
Tier F der Gruppe mit dem steifen Titan Mesh Scaffold: (A) post OP; (B) 4. Woche; (C) 8. Woche; (D) 12. Woche (E) 16. Woche; (F) 20. Woche; (G) 24. Woche.
Die roten Quadrate weisen auf die distale Kallusbildung ab der 4. Woche hin. Anterio-posteriorer Strahlengang.

Ergebnisse

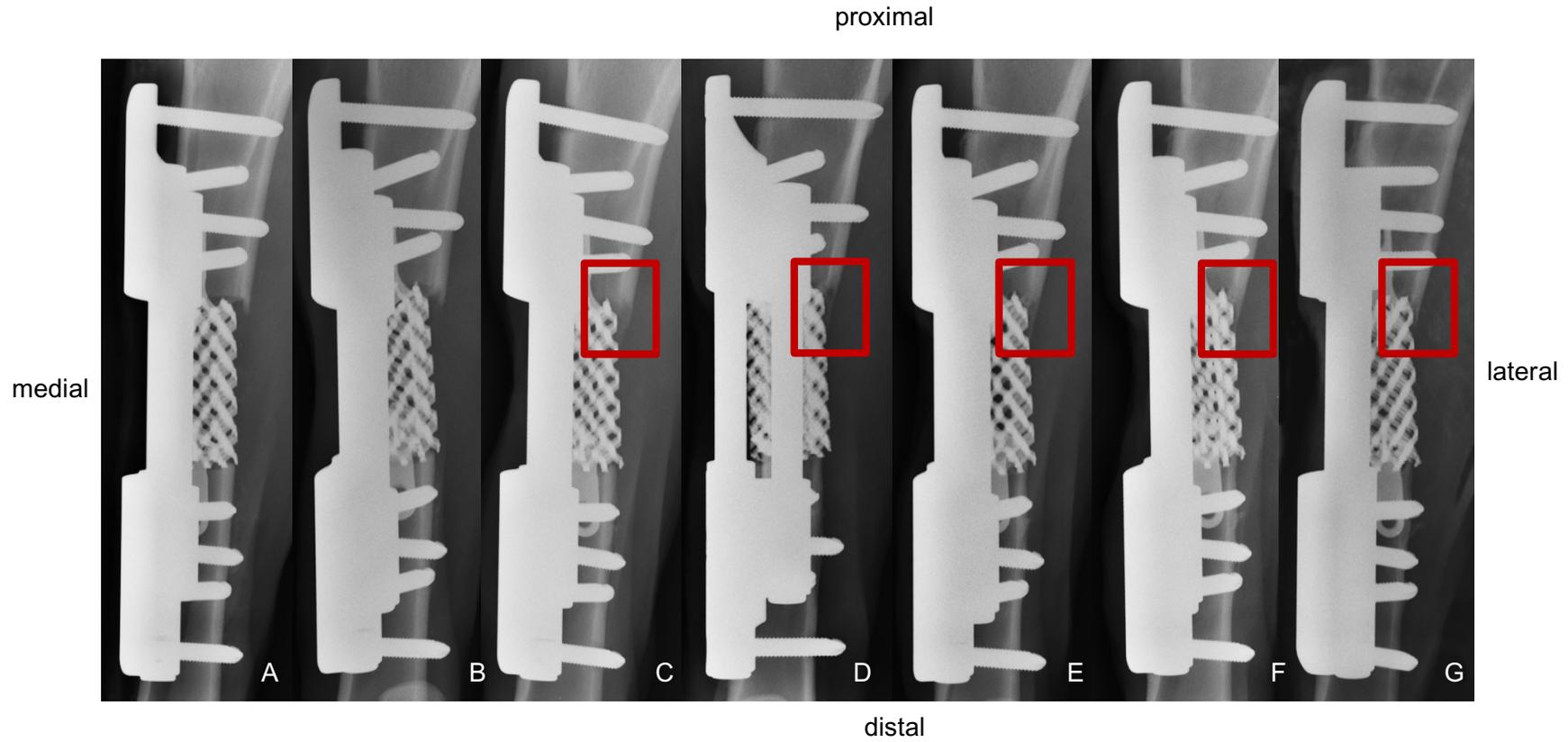


Abbildung 32: Röntgenologische Aufnahmen eines Tieres der Gruppe mit dem steifen Titan Mesh Scaffold.
Tier C der Gruppe mit dem steifen Titan Mesh Scaffold: (A) post OP; (B) 4. Woche; (C) 8. Woche; (D) 12. Woche (E) 16. Woche; (F) 20. Woche; (G) 24. Woche.
Die roten Quadrate weisen auf die proximale Kallusbildung ab der 8. Woche hin. Anterio-posteriorer Strahlengang.

Ergebnisse

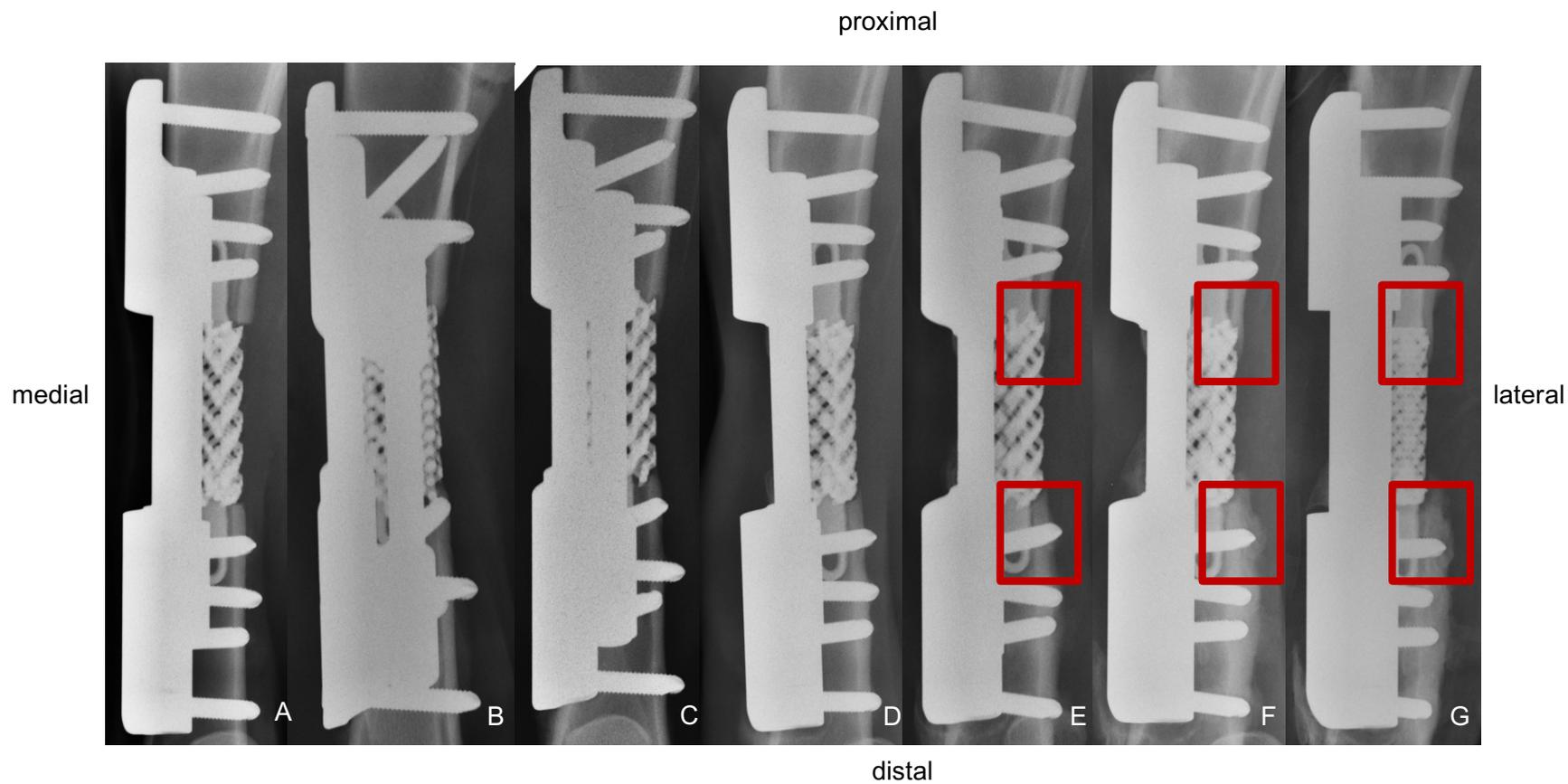


Abbildung 33: Röntgenologische Aufnahmen eines Tieres der Gruppe mit dem steifen Titan Mesh Scaffold.
Tier A der Gruppe mit dem steifen Titan Mesh Scaffold: (A) post OP; (B) 4. Woche; (C) 8. Woche; (D) 12. Woche (E) 16. Woche; (F) 20. Woche; (G) 24. Woche.
Die roten Quadrate weisen auf die proximale und distale Kallusbildung ab der 16. Woche hin. Anterio-posteriorer Strahlengang.

Ergebnisse

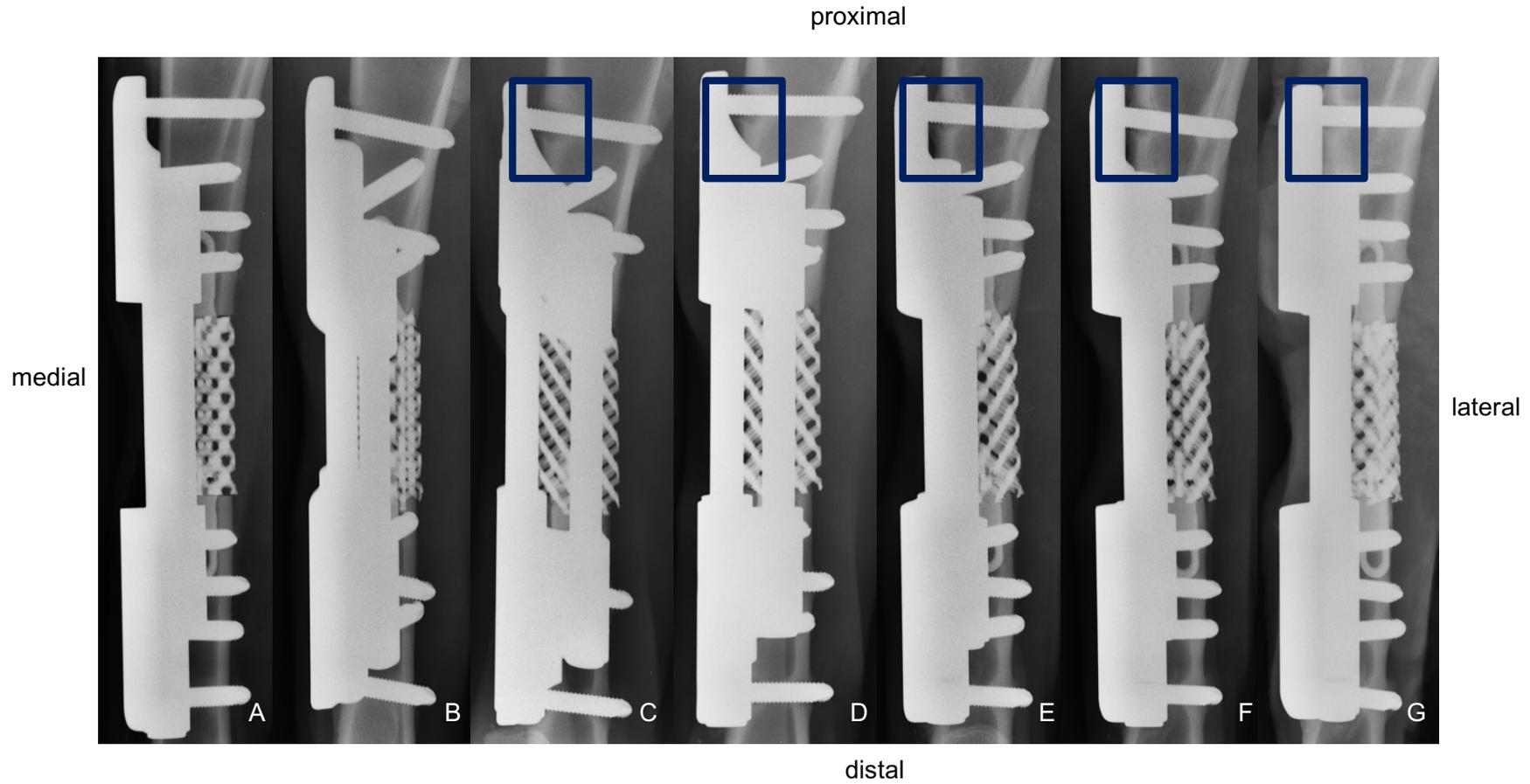


Abbildung 34: Röntgenologische Aufnahmen eines Tieres der Gruppe mit dem steifen Titan Mesh Scaffold.

Tier B der Gruppe mit dem steifen Titan Mesh Scaffold: (A) post OP; (B) 4. Woche; (C) 8. Woche; (D) 12. Woche (E) 16. Woche; (F) 20. Woche; (G) 24. Woche. Die blauen Quadrate zeigen die proximale röntgenologische Aufhellung ab der 8. Woche. Anterio-posteriorer Strahlengang.

Ergebnisse

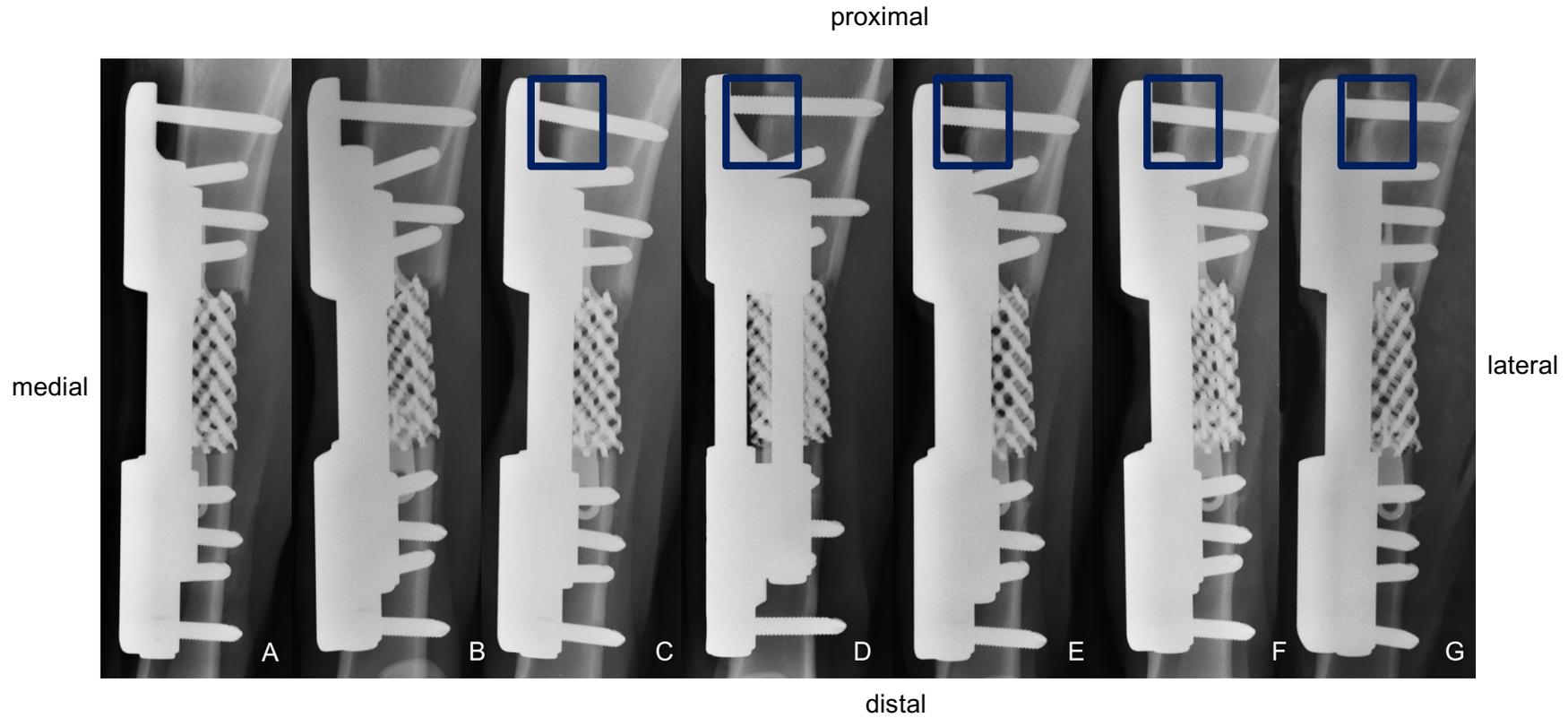


Abbildung 35: Röntgenologische Aufnahmen eines Tieres der Gruppe mit dem steifen Titan Mesh Scaffold.

Tier C der Gruppe mit dem steifen Titan Mesh Scaffold: (A) post OP; (B) 4. Woche; (C) 8. Woche; (D) 12. Woche (E) 16. Woche; (F) 20. Woche; (G) 24. Woche. Die blauen Quadrate zeigen die proximale röntgenologische Aufhellung ab der 8. Woche. Anterio-posteriorer Strahlengang.

Ergebnisse

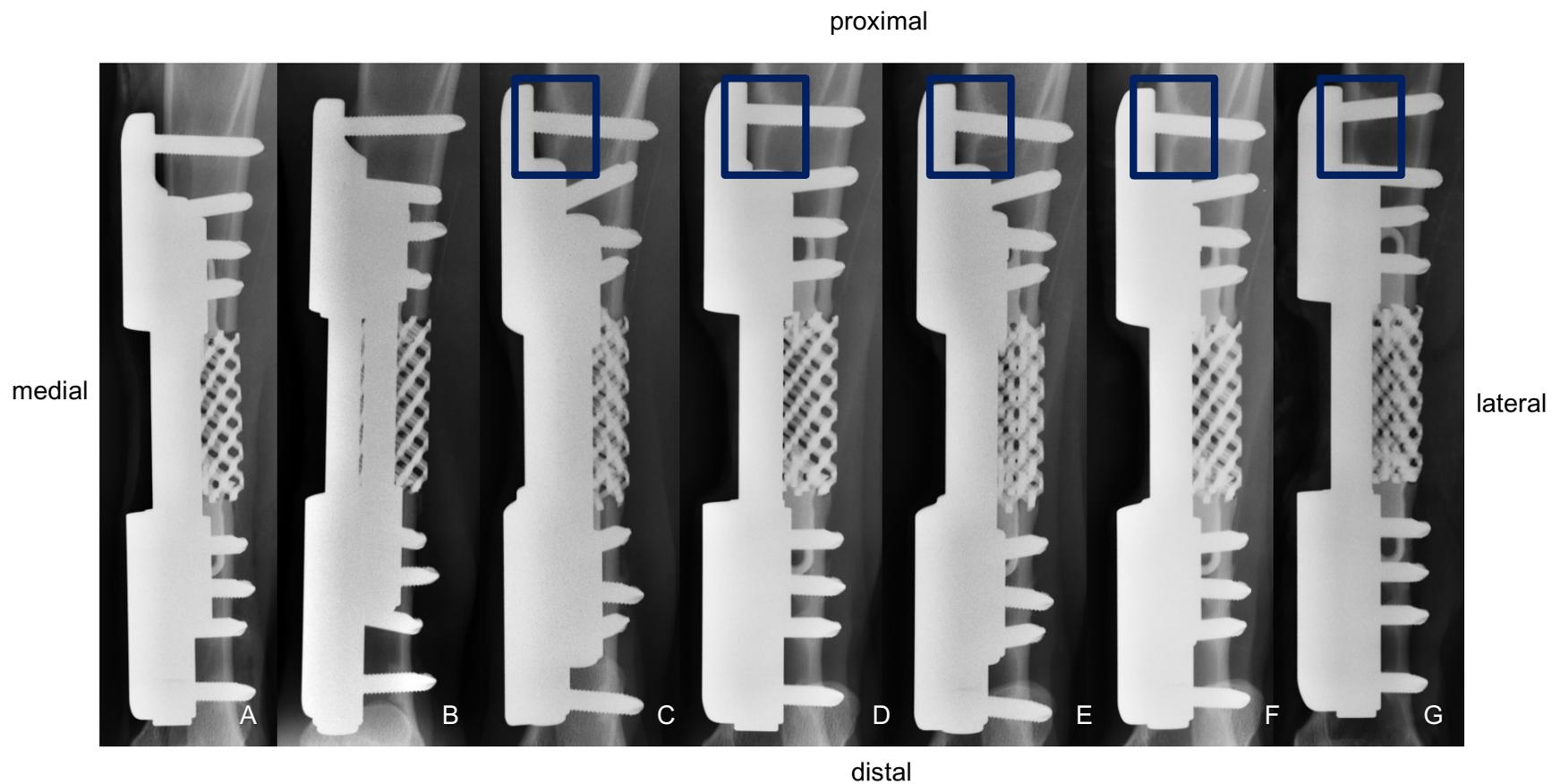


Abbildung 36: Röntgenologische Aufnahmen eines Tieres der Gruppe mit dem steifen Titan Mesh Scaffold.
Tier E der Gruppe mit dem steifen Titan Mesh Scaffold: (A) post OP; (B) 4. Woche; (C) 8. Woche; (D) 12. Woche (E) 16. Woche; (F) 20. Woche; (G) 24. Woche.
Die blauen Quadrate zeigen die proximale röntgenologische Aufhellung ab der 8. Woche. Anterio-posteriorer Strahlengang.

4.3 Ergebnisse der Histologie

4.3.1 Histomorphologische Evaluation

Die histomorphologische Auswertung wurde an den zwölf longitudinal und mid-diaphysär, durch die Schafstibia verlaufenden, in kombinierter Safranin Orange/von Kossa gefärbten, Präparate durchgeführt. Der 40 mm große Osteotomiedefekt wurde zum einen lateral und medial durch den Titan Mesh Scaffold, zum anderen proximal und distal durch die Kortikalen begrenzt (Abb. 37 und Abb. 38). Innerhalb der 24-wöchigen Versuchszeit konnte bei keinem Tier ein Bruch oder Versagen des Titan Mesh Scaffolds festgestellt werden. Der Titan Mesh Scaffold war intakt und befand sich bei allen zwölf Präparaten zentral zwischen dem distalen und proximalen Tibiaende. Das Titan des Titan Mesh Scaffolds war neben dem mineralisierten Knochengewebe, dem Knorpelgewebe und dem Bindegewebe deutlich erkennbar. In beiden Gruppen war die mineralisierte Knochenbildung 24 Wochen post operativ in Form von intramembraner Ossifikation aktiv. Auf der mineralisierten Knochenoberfläche traten Osteoblasten in gehäufter Zahl auf und synthetisierten eine neue Schicht von Osteoid auf dem Geflechtknochen, welches sich als rote Schicht auf dem mineralisierten Knochen darstellte. Eine enchondrale Ossifikation konnte bei fünf Tieren der Gruppe mit dem weichen und vier Tieren der Gruppe mit dem steifen Titan Mesh Scaffold beobachtet werden. Hyaliner Knorpel trat in geringer Menge in beiden Gruppen vorwiegend distal auf der lateralen Titan Mesh Seite nahe der Titanstruts auf und war gut vom umliegenden Bindegewebe abgrenzbar. Er kam in Form von Inseln, in der die Chondrozyten hypertroph und teilweise von mineralisierten Interterritorien umgeben waren, im Geflechtknochen vor (Abb. 39 und 40). Eine Vaskularisierung wurde in den Präparaten erkannt, jedoch nicht weiter differenziert und dokumentiert. Im segmentalen Defekt zeigte sich ein Unterschied in der Verteilung des neu gebildeten Knochens. Insgesamt war die Bildung von mineralisiertem Knochengewebe in der Lateralen Struts-ROI deutlich ausgeprägter als in der Medialen Struts-ROI. In beiden Gruppen trat bei jeweils zwei Tieren eine laterale Überbrückung mit mineralisiertem Knochengewebe des Defektes, durch die Titanstruts, auf (Abb. 41). Dabei stellte lockerer Geflechtknochen den Hauptgewebeanteil dar, dieser schien überwiegend entlang der Meshoberfläche des Titan Mesh Scaffolds zu wachsen. Bei zwei Tieren der Gruppe mit dem weichen Titan Mesh Scaffold und bei einem Tier der Gruppe mit dem steifen Titan Mesh Scaffold hatte sich Knochengewebe großflächig gebildet, ohne jedoch den Defekt vollständig zu überbrücken. Bei insgesamt zwei Tieren der Gruppe mit dem weichen Titan Mesh Scaffold und zwei Tieren der Gruppe mit dem steifen Titan Mesh Scaffold wuchs das Knochengewebe großflächig in den Markraum. Vier Tiere der Gruppe mit dem weichen Titan Mesh Scaffold zeigten einen Markraumschluss an den Kortikales. Bei zwei Tieren befand sich der Markraumschluss sowohl distal als auch proximal

Ergebnisse

(Abb. 42), bei den anderen zwei Tieren ausschließlich distal. In der Gruppe mit dem steifen Titan Mesh Scaffold konnte bei drei Tieren distal ein Markraumschluss beobachtet werden. In beiden Gruppen stellte lockeres Bindegewebe den Hauptgewebeanteil dar und wuchs sowohl zwischen den Struts als auch im Markraum. Kollagenfasern dienten als Leitstruktur für den wachsenden Knochen und konnten entlang der Titanstruts lokalisiert werden. In jeder Gruppe trat bei jeweils einem Tier auf der medialen Titan Mesh Scaffoldseite ausschließlich lockeres Bindegewebe, ohne das Auftreten von Knochen- und Knorpelgewebe, auf (Abb. 43). Merkmale einer auf die Osteotomie und Fixierung des Titan Mesh Scaffolds zurückzuführende Entzündungsreaktion konnten nicht festgestellt werden. Es konnte lediglich eine Reduktion der Kortikalisdicke im benachbarten Kortikalenknochen als eine Reaktion auf die Osteotomie und die Fixation, bei jeweils zwei Tieren jeder Gruppe festgestellt werden. Alle Präparate zeigten nur eine limitierte Anzahl an Osteoklasten. Bei dem nach einer Woche ausgeschiedenen Tier konnte autologe Spongiosa deutlich erkannt werden (Abb. 44). Dieses Präparat wurde als Vergleichspräparat bei der Auswertung herangezogen.

Ergebnisse

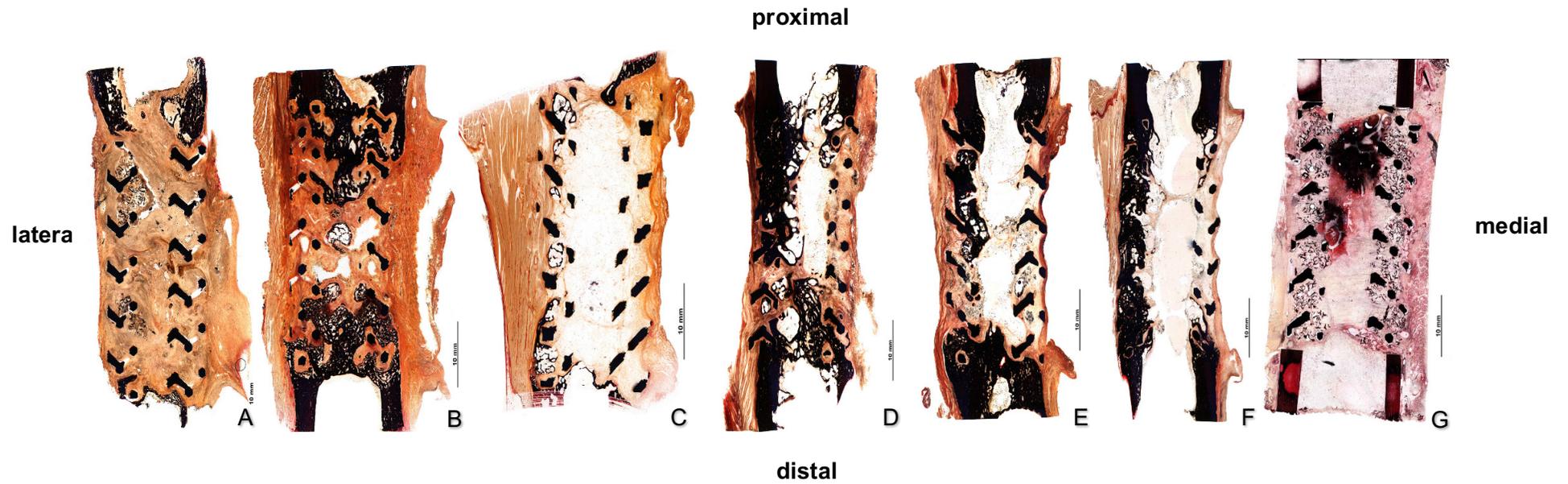


Abbildung 37: (A-F) Histologische Präparate in kombinierter Safranin Orange/von Kossa-Färbung (n=6), der Gruppe mit dem weichen Titan Mesh Scaffold nach 24 Wochen. (G) Ausgeschiedenes Tier eine Woche post OP.

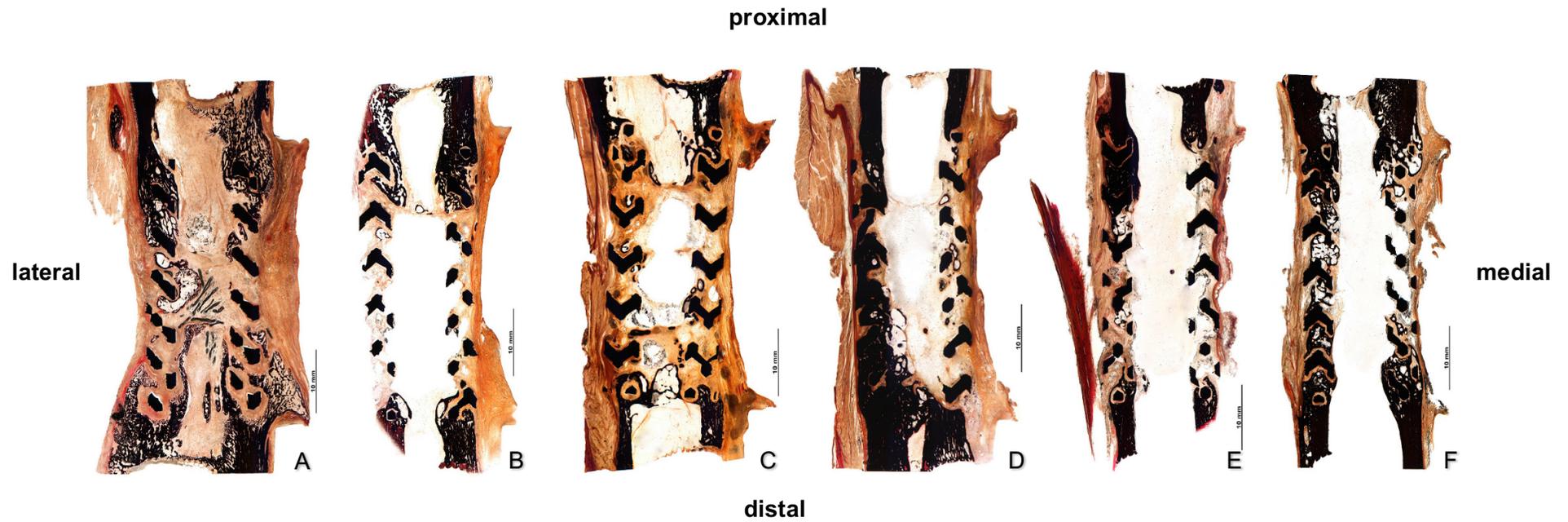


Abbildung 38: (A-F) Histologische Präparate in kombinierter Safranin Orange/von Kossa-Färbung (n=6), der Gruppe mit dem steifen Titan Mesh Scaffold nach 24 Wochen.

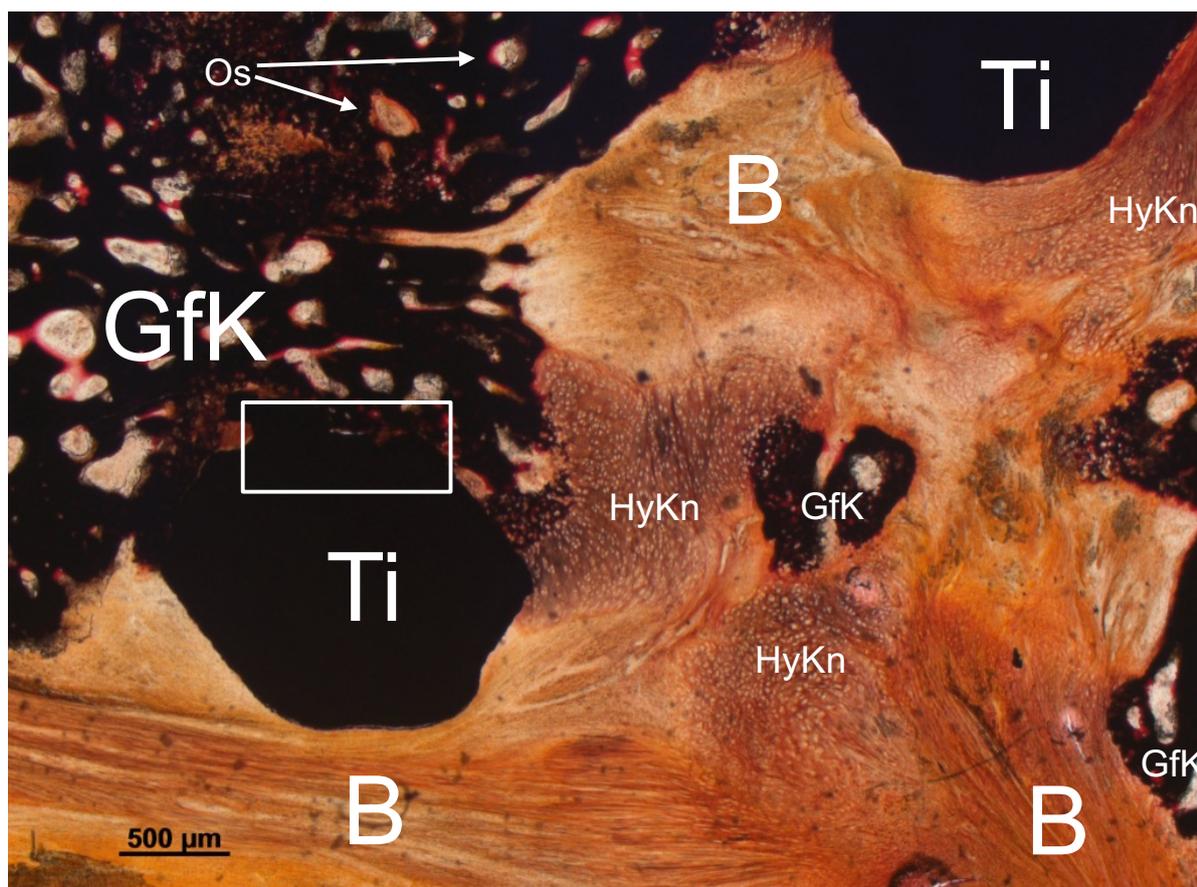


Abbildung 39: Mikroskopische Darstellung eines histologischen Präparates in kombinierter Safranin Orange/von Kossa-Färbung der Gruppe mit dem weichen Titan Mesh Scaffold. Die Übersicht zeigt Geflechtknochen (GfK), Hyalinen Knorpel (HyKn), Bindegewebe (B), Titan (Ti) und Osteoid (Os). Darstellung von Geflechtknochen in Kontakt zum Titan (weißes Quadrat).

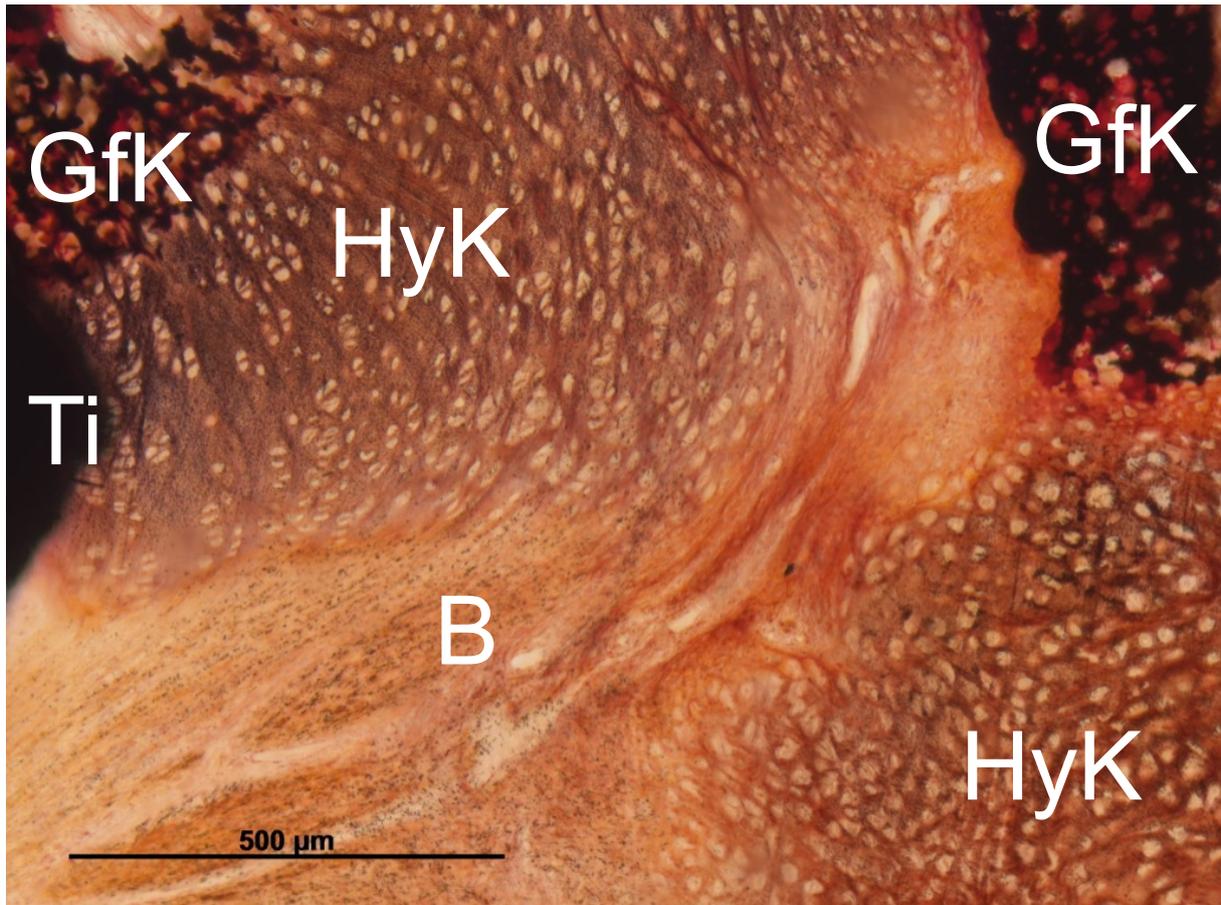


Abbildung 40: Mikroskopische Darstellung eines histologischen Präparates in kombinierter Safranin Orange/von Kossa-Färbung der Gruppe mit dem weichen Titan Mesh Scaffold. Die Übersicht zeigt Geflechtknochen (GfK), Hyalinen Knorpel (HyKn), Bindegewebe (B) und Titan (Ti).

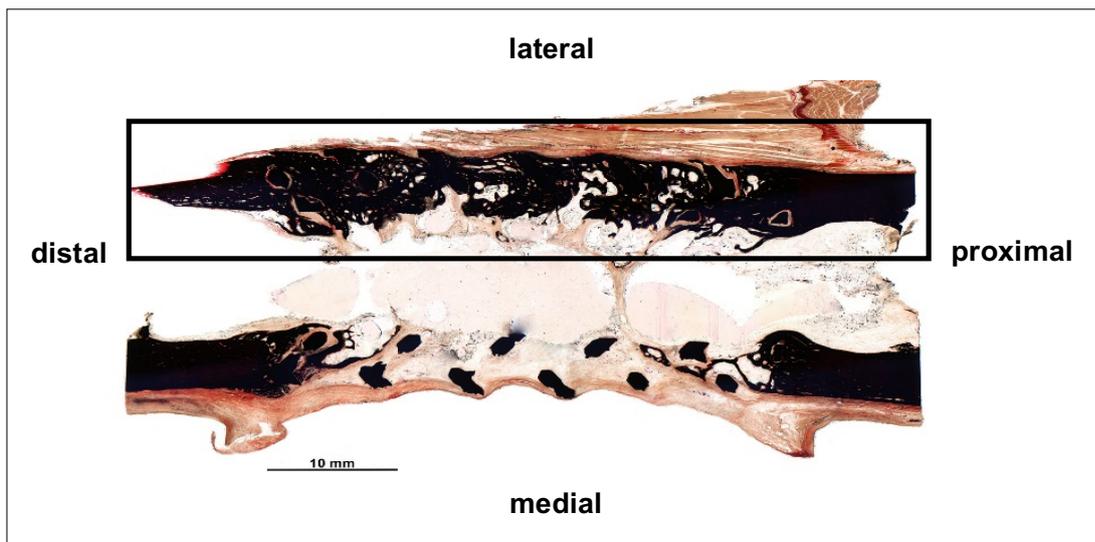


Abbildung 41: Histologisches Präparat einer Schafstibia in kombinierter Safranin Orange/von Kossa-Färbung eines Tieres der Gruppe mit dem weichen Titan Mesh Scaffold. Eine unilaterale knöcherner Defektüberbrückung ist auf der lateralen Präparatseite erkennbar (schwarze Markierung).

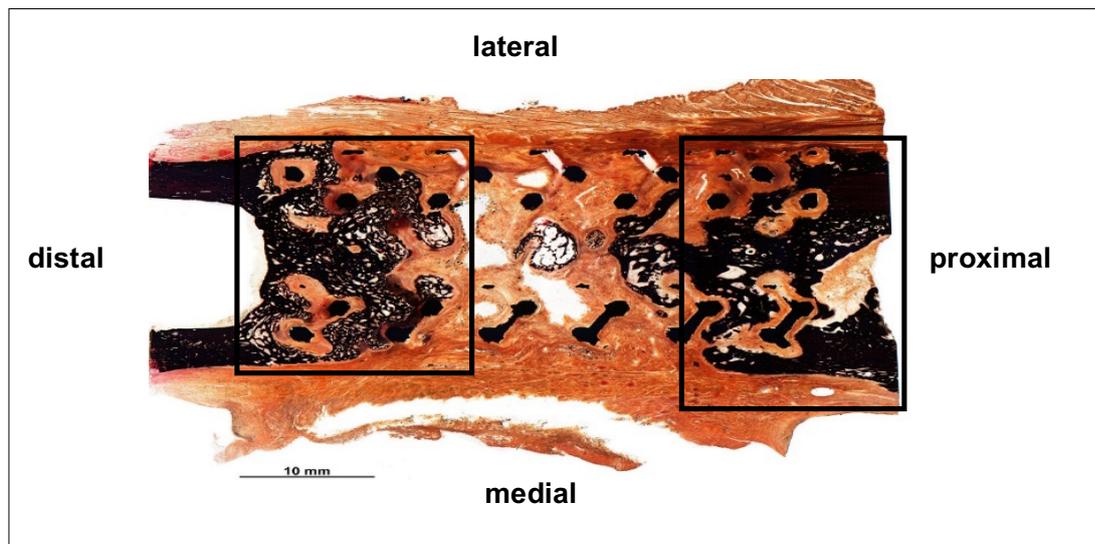


Abbildung 42: Histologisches Präparat einer Schafstibia in kombinierter Safranin Orange/von Kossa-Färbung eines Tieres der Gruppe mit dem weichen Titan Mesh Scaffold. Der beidseitige Markraumschluss ist sowohl distal als auch proximal erkennbar (schwarze Markierung).

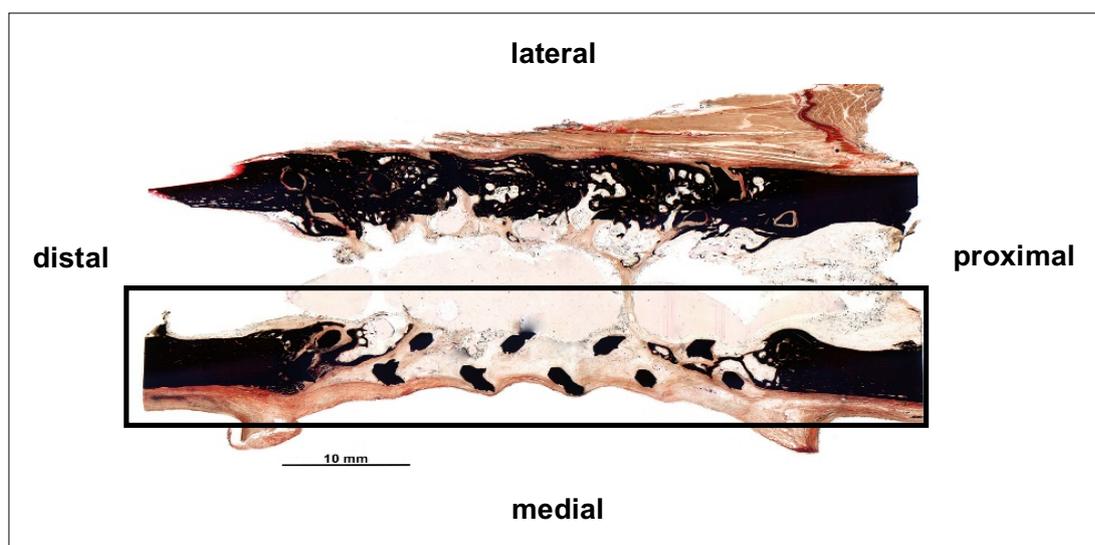


Abbildung 43: Histologisches Präparat einer Schafstibia in kombinierter Safranin Orange/von Kossa-Färbung eines Tieres der Gruppe mit dem weichen Titan Mesh Scaffold. Auf der medialen Präparatseite ist ausschließlich lockeres Bindegewebe, ohne das Auftreten von Knochen- und Knorpelgewebe, erkennbar.

Ergebnisse

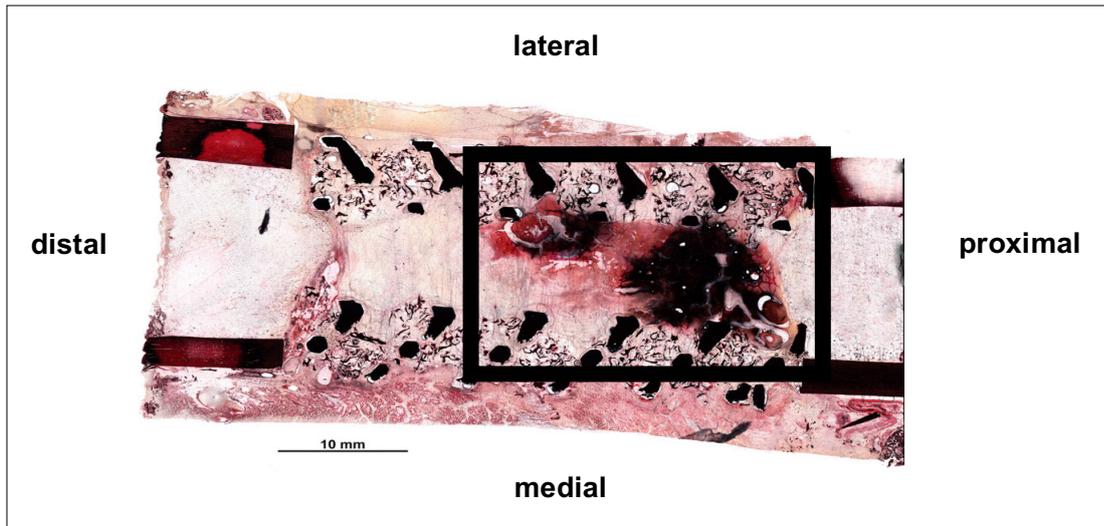


Abbildung 44: Histologisches Präparat einer Schafstibia in kombinierter Safranin Orange/von Kossa-Färbung der Gruppe mit dem weichen Titan Mesh Scaffold. In dem Präparat des in der ersten Woche ausgeschiedenen Tieres erkennt man deutlich ein Hämatom (schwarze Markierung).

4.4 Ergebnisse der histomorphometrischen Analyse

In die bildanalytische Auswertung gingen zwölf Safranin Orange/von Kossa gefärbte Gewebeschnitte beider Gruppen (n=6) ein. Die Darstellung der Gewebeflächen des mineralisierten Knochens (Total Bone Area), des Knorpels (Total Cartilage Area) und des Bindegewebes (Total Connective Tissue Area) erfolgte in relativen Zahlen (%). Gewebeflächen in der Gesamt-ROI (Abb. 45) sowie der darin liegenden Lateralen-ROI (Abb. 49) und Medialen-ROI (Abb. 53) gingen in die Auswertung ein. Die Markraum-ROI (Abb. 57) sowie die Laterale Struts-ROI (Abb. 60) und die Mediale Struts-ROI (Abb. 63) wurden ebenfalls ausgewertet.

4.4.1 Gewebeverteilung in der Gesamt-ROI

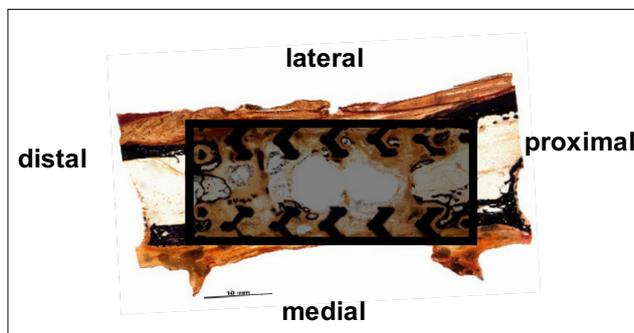


Abbildung 45: Beispielhafte Darstellung der Gesamt-ROI in einem histologischen Präparat in kombinierter Safranin Orange/von Kossa-Färbung eines Tieres der Gruppe mit dem steifen Titan Mesh Scaffold.

Die Gesamt-ROI wurde betrachtet, um ein Gesamtbild der Gewebeverteilung in den zwölf histologischen Präparaten zu erhalten. In der Gruppe mit dem weichen Titan Mesh Scaffold war der Anteil der mineralisierten Knochenfläche in der Gesamt-ROI (Abb. 45) deutlich größer und erreichte im Median 26,93%. Im Vergleich zur Gruppe mit dem steifen Titan Mesh Scaffold, die einen Median von 12,36% erreichte (Abb. 46). Die Streuung in der Gruppe mit dem weichen Titan Mesh Scaffold war größer als in der Gruppe mit dem steifen Titan Mesh Scaffold. Der durchgeführte Mann-Whitney-U-Test wies mit einem p-Wert von 0,394 jedoch keinen signifikanten Unterschied auf (Tabelle 4). Der Median der Knorpelfläche erreichte in beiden Gruppen ähnlich geringe Werte, mit einer größeren Streuung in der Gruppe mit dem weichen Titan Mesh Scaffold. Die Knorpelfläche lag bei beiden Gruppen unter 1% (Abb. 47). Der Median der Bindegewebsfläche in der Gesamt-ROI war in der Gruppe mit dem steifen Titan Mesh Scaffold mit 87,32% höher als in der Gruppe mit dem weichen Titan Mesh Scaffold mit 73,05%, jedoch ohne statistische Signifikanz (Abb. 48). Die

Ergebnisse

Streuung war in der Gruppe mit dem weichen Titan Mesh Scaffold größer als in der Gruppe mit dem steifen Titan Mesh Scaffold (Tabelle 4). Den Hauptgewebeanteil stellte somit in der Gesamt-ROI beider Gruppen das Bindegewebe dar, wobei der Bindegewebsanteil in der Gruppe mit dem steifen Titan Mesh Scaffold höher war, jedoch ohne eine statistische Signifikanz vorzuweisen. Der Knochengewebsanteil hingegen lag in der Gruppe mit dem weichen Titan Mesh Scaffold mit einem höheren Wert im Median als in der Gruppe mit dem steifen Titan Mesh Scaffold, wohingegen der Knorpelanteil vergleichbar gering war.

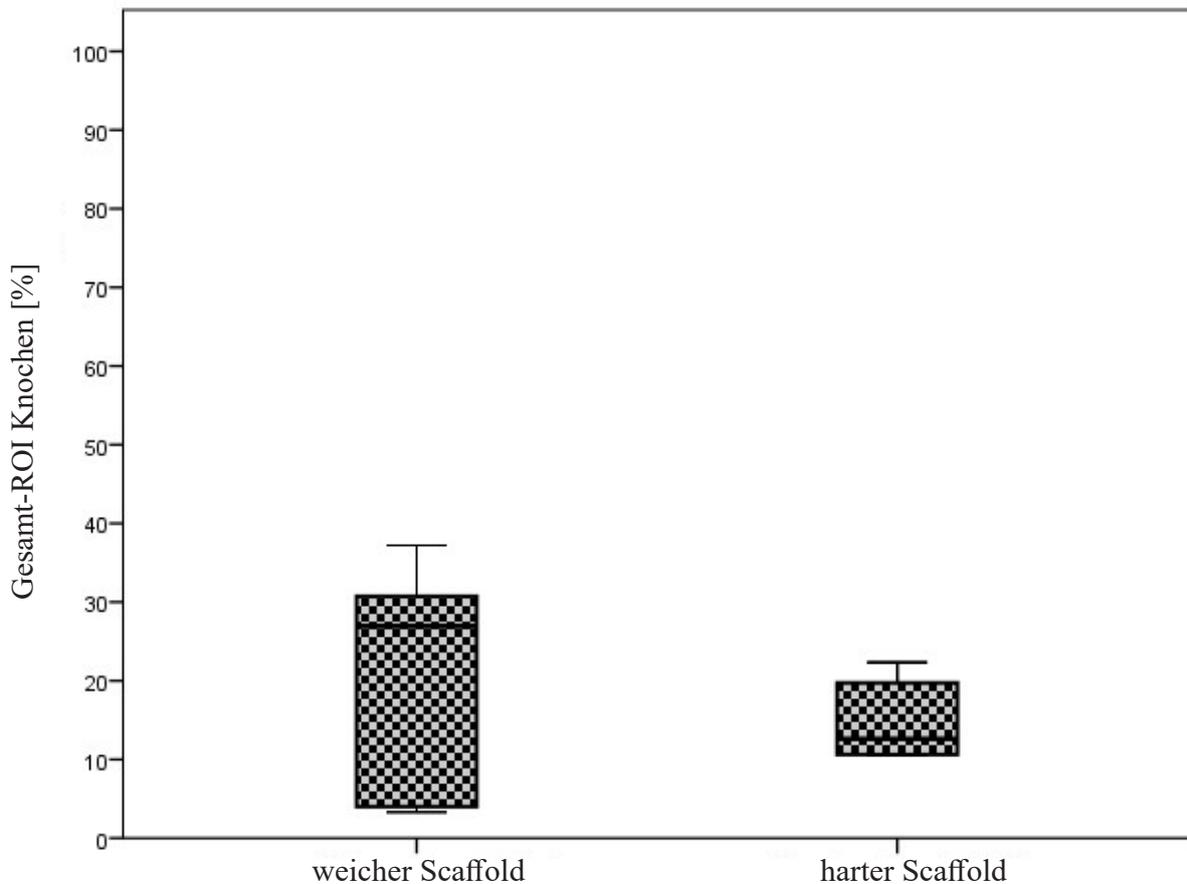


Abbildung 46: Darstellung des Anteils der Knochenfläche [%] in der Gesamt-ROI (n=6 pro Gruppe). Der p-Wert (0,394) bezieht sich auf den U-Test nach Mann-Whitney ($p \leq 0,05$). Die Gruppe mit dem weichen Titan Mesh Scaffold weist einen höheren Anteil an Knochengewebe im Median auf als die Gruppe mit dem steifen Titan Mesh Scaffold, jedoch ohne eine statistische Signifikanz.

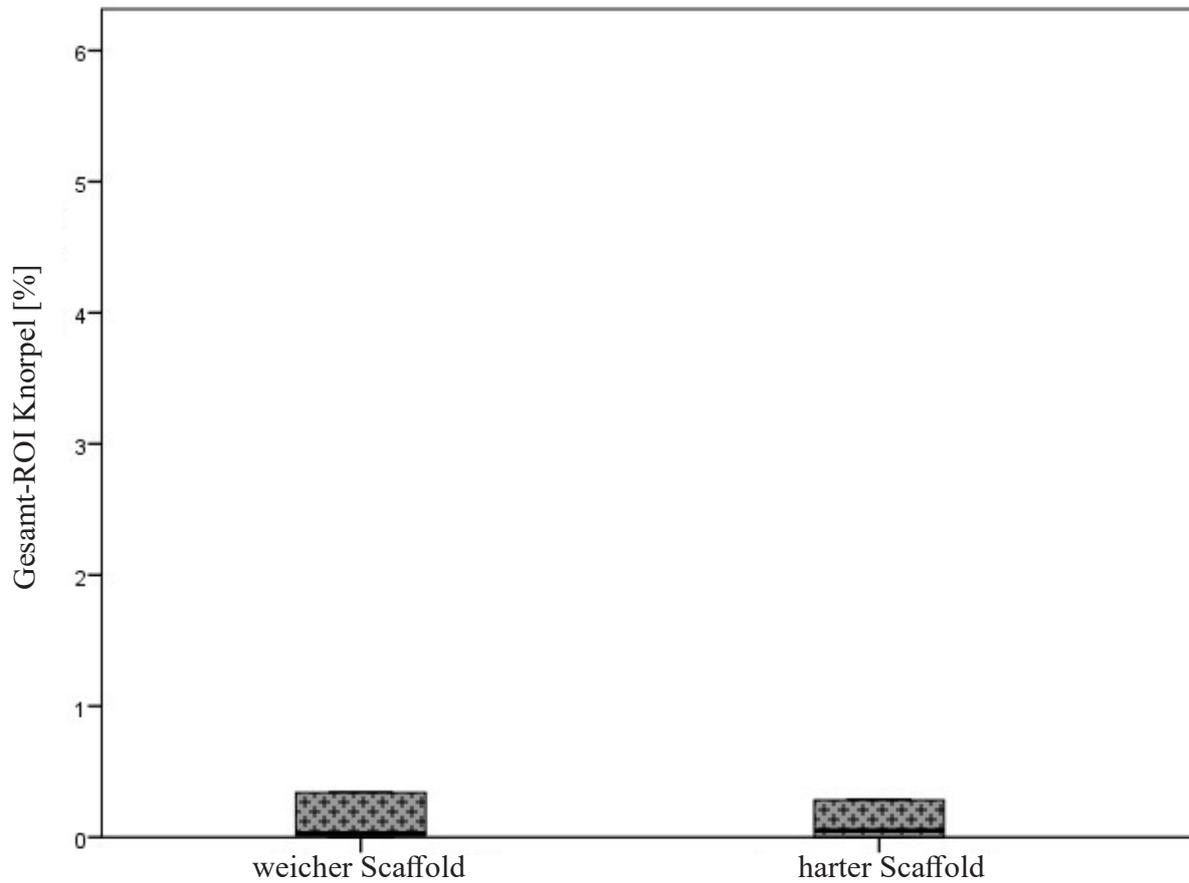


Abbildung 47: Darstellung des Anteils der Knorpelfläche [%] in der Gesamt-ROI (n=6 pro Gruppe). Der p-Wert (0,937) bezieht sich auf den U-Test nach Mann-Whitney ($p \leq 0,05$). Der Anteil an Knorpelgewebe ist bei beiden Gruppen vergleichbar gering.

Ergebnisse

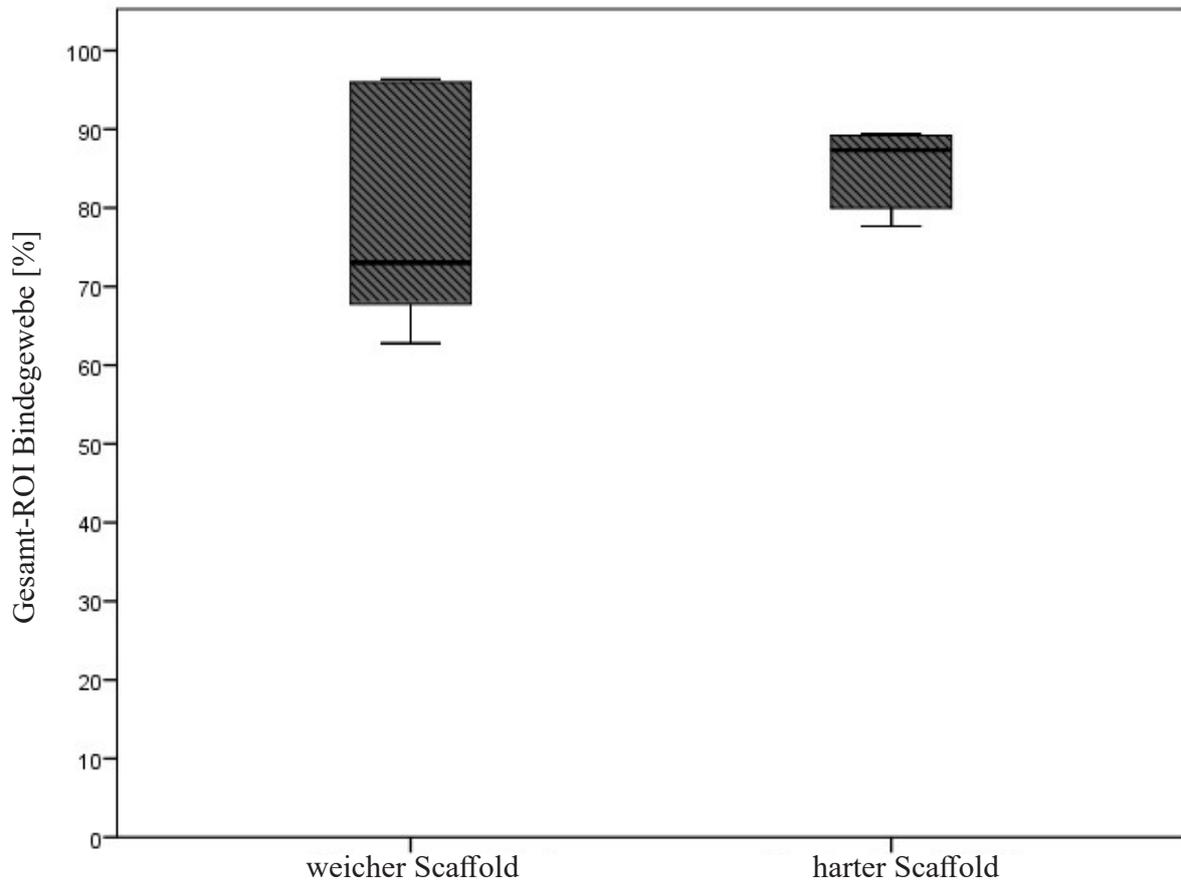


Abbildung 48: Darstellung des Anteils der Bindegewebsfläche [%] in der Gesamt-ROI (n=6 pro Gruppe).

Der p-Wert (0,394) bezieht sich auf den U-Test nach Mann-Whitney ($p \leq 0,05$). Die Gruppe mit dem steifen Titan Mesh Scaffold weist im Median einen höheren Bindegewebsanteil auf als die Gruppe mit dem weichen Titan Mesh Scaffold, jedoch ohne statistische Signifikanz.

Tabelle 4: Darstellung der Gewebeanteile in der Gesamt-ROI in relativen Zahlen (%).

Der p-Wert bezieht sich auf den U-Test nach Mann-Whitney, ohne statistische Signifikanz ($p \leq 0,05$).

Parameter	weicher Titan Mesh Scaffold		steifer Titan Mesh Scaffold		p-Wert
	Median	Min-Max	Median	Min-Max	
Knochenfläche (%)	26,93	3,31-37,20	12,62	10,53-22,34	0,394
Knorpelfläche (%)	0,03	0,00-1,47	0,05	0,00-0,29	0,937
Bindegewebsfläche (%)	73,05	62,79-96,35	87,32	77,66-89,39	0,394

4.4.2 Mediale-ROI

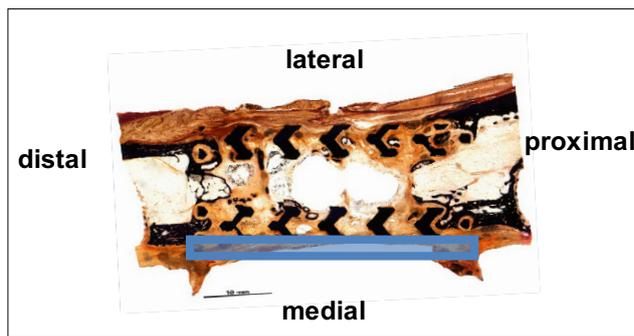


Abbildung 49: Beispielhafte Darstellung der Medialen-ROI in einem histologischen Präparat in kombinierter Safranin Orange/von Kossa-Färbung eines Tieres der Gruppe mit dem steifen Titan Mesh Scaffold.

Die Mediale-ROI wurde nach ihrer Lage im Gewebeschnitt bezeichnet und betrachtet, um einen Zusammenhang zwischen der medial eingesetzten AO-Platte und der Gewebeverteilung zu bestimmen. In der Medialen-ROI (Abb. 49) wiesen beide Gruppen eine vergleichbar geringe mineralisierte Knochenfläche, mit einer ähnlich hohen Streuung auf. Der Median lag in der Gruppe mit dem weichen Titan Mesh Scaffold bei 1,34%. Im Vergleich zu dem Median von 1,48% der Gruppe mit dem steifen Titan Mesh Scaffold (Abb. 50). Beide Gruppen wiesen eine geringe Knorpelfläche auf. Der Median der Knorpelfläche lag in beiden Gruppen bei 0,01%, mit einer vergleichbaren Streuung (Abb. 51). Den Hauptgewebeanteil der Medialen-ROI stellte in beiden Gruppen Bindegewebe dar. Die Bindegewebsfläche erreichte einen Median von 98,64% in der Gruppe mit dem weichen Titan Mesh Scaffold und einen Median von 98,48% in der Gruppe mit dem steifen Titan Mesh Scaffold, wobei die Streuung in beiden Gruppen ähnlich hoch war. (Abb. 52). Um die Abhängigkeit der Gewebeverteilung von der eingesetzten AO-Platte vergleichen zu können, wurde anschließend die Laterale-ROI betrachtet und ausgewertet.

Ergebnisse

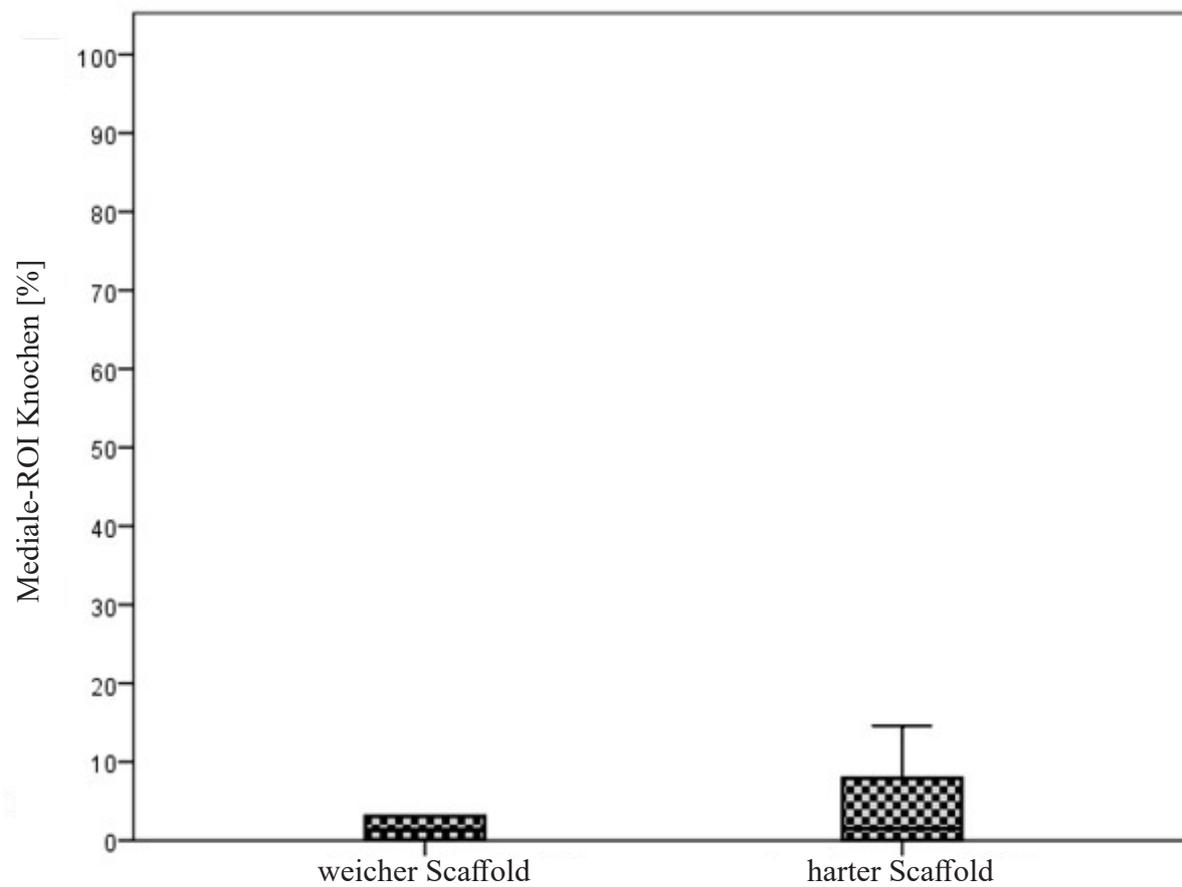


Abbildung 50: Darstellung des Anteils der Knochenfläche [%] in der Medialen-ROI (n=6 pro Gruppe). Der p-Wert (1,000) bezieht sich auf den U-Test nach Mann-Whitney ($p \leq 0,05$).

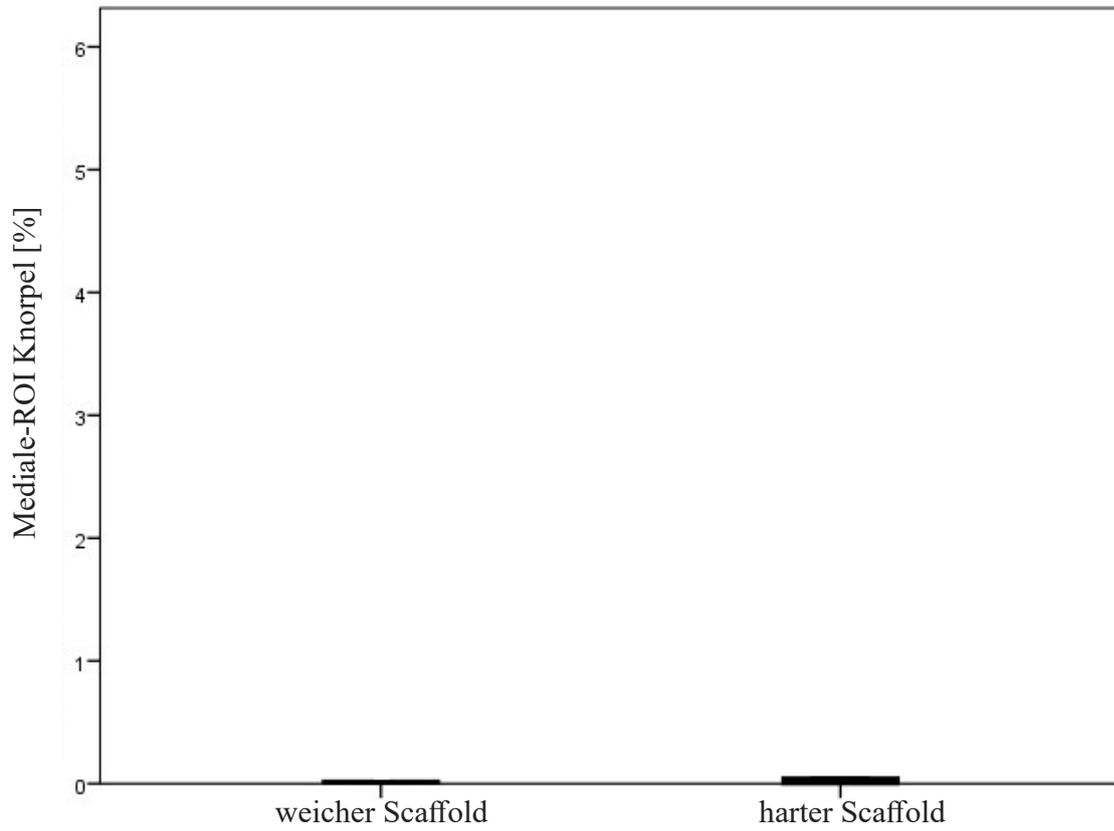


Abbildung 51: Darstellung des Anteils der Knorpelfläche [%] in der Medialen-ROI (n=6 pro Gruppe). Der p-Wert (0,818) bezieht sich auf den U-Test nach Mann-Whitney ($p \leq 0,05$).

Ergebnisse

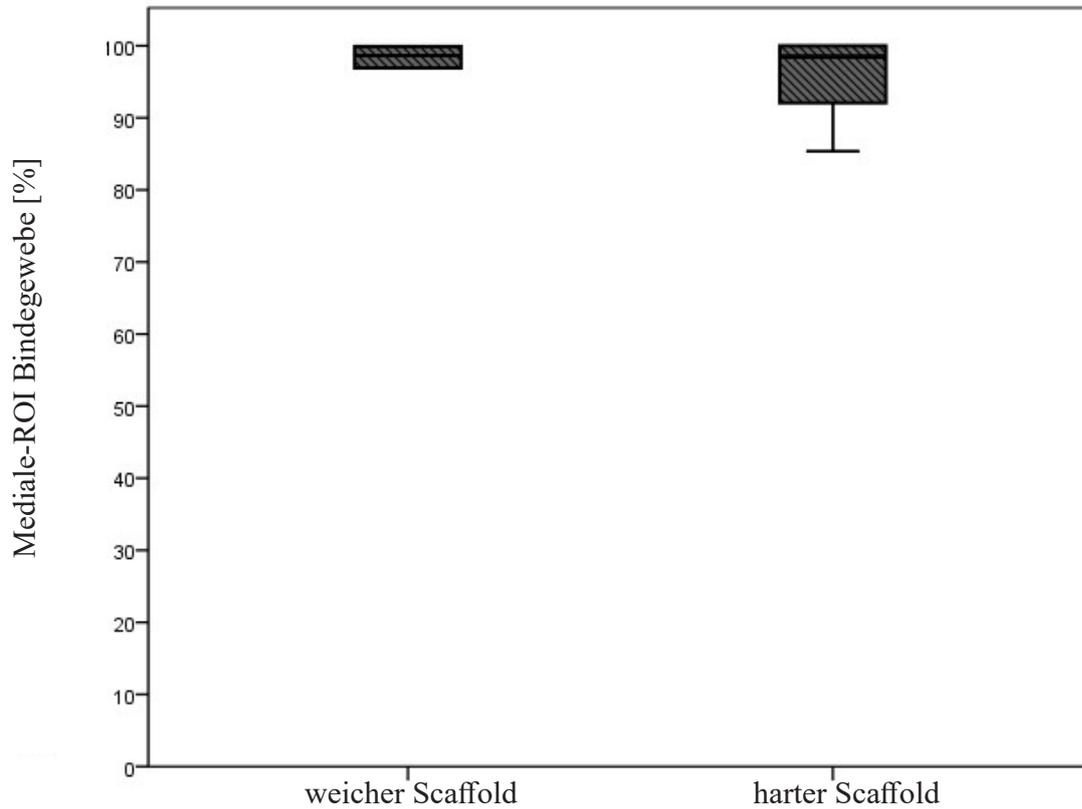


Abbildung 52: Darstellung des Anteils der Bindegewebsfläche [%] in der Medialen-ROI (n=6 pro Gruppe). Der p-Wert (0,937) bezieht sich auf den U-Test nach Mann-Whitney ($p \leq 0,05$).

Tabelle 5: Darstellung der Gewebeanteile in der Medialen-ROI in relativen Zahlen (%).

Der p-Wert bezieht sich auf den U-Test nach Mann-Whitney, ohne statistische Signifikanz ($p \leq 0,05$).

Parameter	weicher Titan Mesh Scaffold		steifer Titan Mesh Scaffold		p-Wert
	Median	Min-Max	Median	Min-Max	
Knochenfläche (%)	1,34	0,01-28,45	1,48	0,01-14,58	1,000
Knorpelfläche (%)	0,01	0,00-0,08	0,01	0,00-0,05	0,818
Bindegewebsfläche (%)	98,64	71,47-99,98	98,48	85,37-99,99	0,937

4.4.3 Laterale-ROI

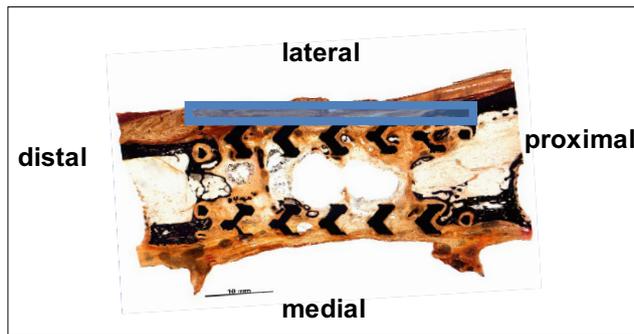


Abbildung 53: Beispielhafte Darstellung der Lateralen-ROI in einem histologischen Präparat in kombinierter Safranin Orange/von Kossa-Färbung eines Tieres der Gruppe mit dem steifen Titan Mesh Scaffold.

Die Laterale-ROI wurde nach der Ausrichtung im Gewebeschnitt bezeichnet und stellte zugleich die AO-Platte-freie Seite dar. Die mineralisierte Knochenfläche in der Lateralen-ROI (Abb. 53) war in beiden Gruppen ähnlich gering. Die Gruppe mit dem weichen Titan Mesh Scaffold erreichte einen Median von 2,19% und die Gruppe mit dem steifen Titan Mesh Scaffold einen Median von 3,32% (Abb. 54). Die Streuung in der Gruppe mit dem weichen Titan Mesh Scaffold war geringgradig höher als in der Gruppe mit dem steifen Titan Mesh Scaffold. Die Knorpelfläche war in beiden Gruppen ähnlich gering. Der Median der Knorpelfläche wies in der Gruppe mit dem weichen Titan Mesh Scaffold einen Wert von 0,50% und bei dem steifen Titan Mesh Scaffold 0,21% mit einer ähnlichen Streuung auf (Abb. 55). Den Hauptgewebeanteil stellte in beiden Gruppen die Bindegewebsfläche mit einem ähnlich hohen Median von 97,41% in der Gruppe mit dem weichen Titan Mesh Scaffold und einer etwas höheren Streuung (Abb. 56) sowie einem Median von 94,77% in der Gruppe mit dem steifen Titan Mesh Scaffold dar (Tabelle 6). Sowohl in der Medialen-ROI als auch in der Lateralen-ROI handelte es sich beim Hauptgewebeanteil in beiden Gruppen um Bindegewebe. Der Anteil an Knochengewebe war in beiden Gruppen gering, wobei er in der Medialen-ROI bei ca. 1% und in der Lateralen-ROI bei 2-3% lag.

Ergebnisse

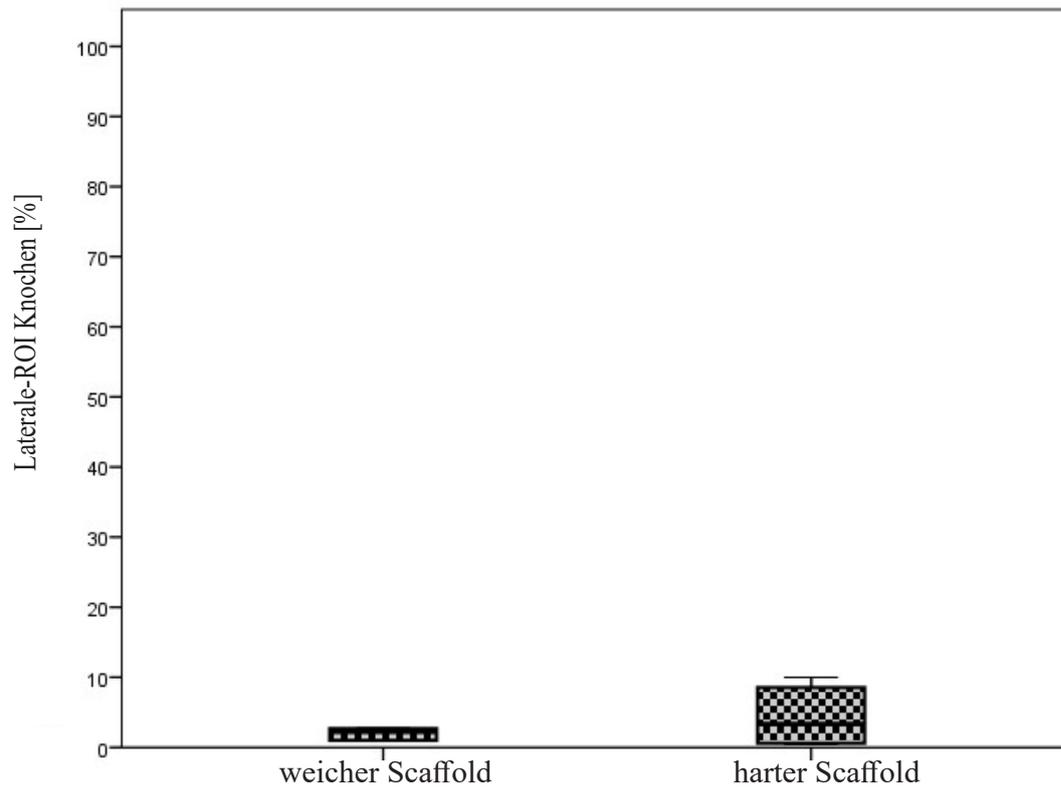


Abbildung 54: Darstellung des Anteils der Knochenfläche [%] in der Lateralen-ROI (n=6 pro Gruppe). Der p-Wert (1,000) bezieht sich auf den U-Test nach Mann-Whitney ($p \leq 0,05$).

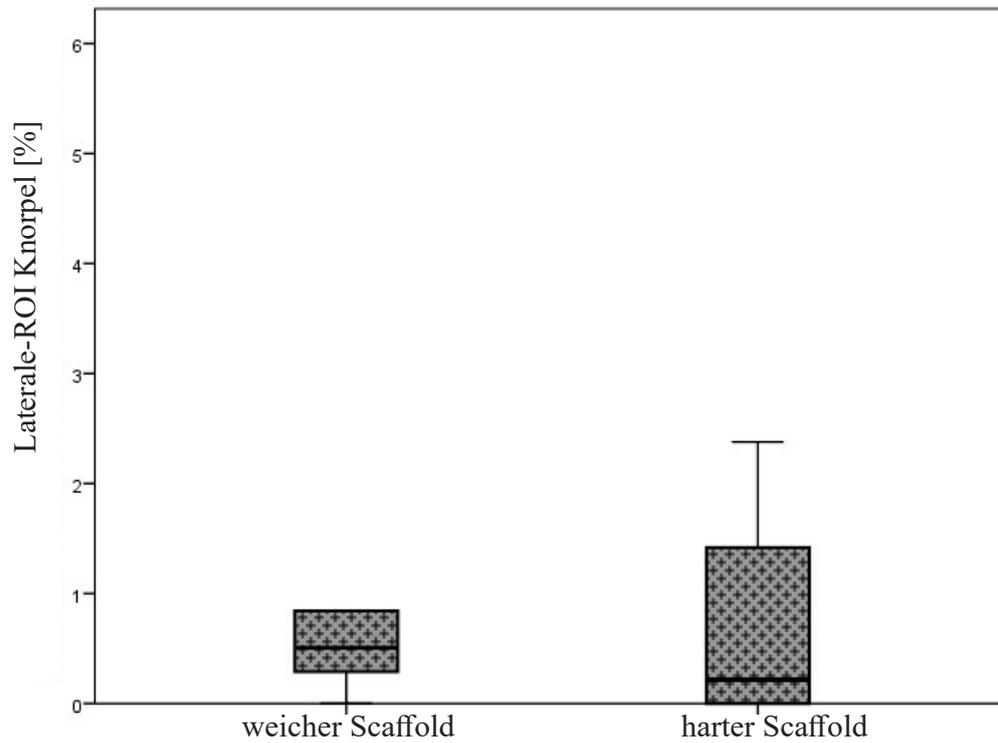


Abbildung 55: Darstellung des Anteils der Knorpelfläche [%] in der Lateralen-ROI (n=6 pro Gruppe). Der p-Wert (0,589) bezieht sich auf den U-Test nach Mann-Whitney ($p \leq 0,05$).

Ergebnisse

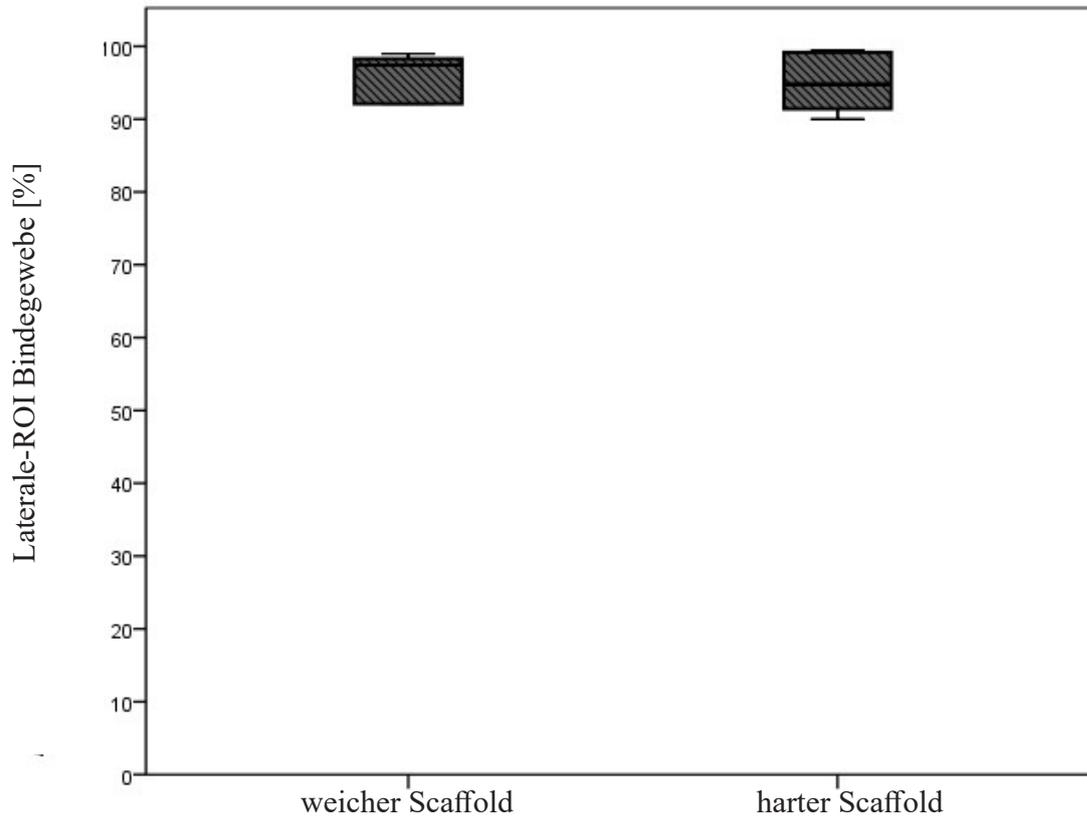


Abbildung 56: Darstellung des Anteils der Bindegewebsfläche [%] in der Lateralen-ROI (n=6 pro Gruppe). Der p-Wert (1,000) bezieht sich auf den U-Test nach Mann-Whitney ($p \leq 0,05$).

Tabelle 6: Darstellung der Gewebeanteile in der Lateralen-ROI in relativen Zahlen (%).

Der p-Wert bezieht sich auf den U-Test nach Mann-Whitney, ohne statistische Signifikanz ($p \leq 0,05$).

Parameter	weicher Titan Mesh Scaffold		steifer Titan Mesh Scaffold		p-Wert
	Median	Min-Max	Median	Min-Max	
Knochenfläche (%)	2,19	0,89-20,30	3,32	0,48-9,99	1,000
Knorpelfläche (%)	0,50	0,00-5,23	0,21	0,00-2,38	0,589
Bindegewebsfläche (%)	97,41	79,17-98,99	94,77	90,01-99,41	1,000

4.4.4 Markraum-ROI

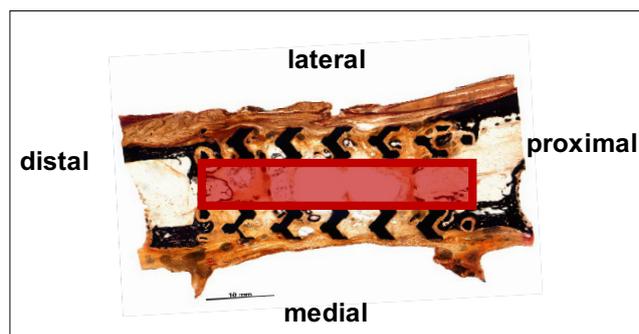


Abbildung 57: Beispielhafte Darstellung der Markraum-ROI in einem histologischen Präparat in kombinierter Safranin Orange/von Kossa-Färbung eines Tieres der Gruppe mit dem steifen Titan Mesh Scaffold.

Die Markraum-ROI stellte die Gewebezusammensetzung des Inneren des Titan Mesh Scaffolds dar. In der Markraum-ROI (Abb. 57) war in der Gruppe mit dem weichen Titan Mesh Scaffold mit dem Erreichen des Medians von 12,53% ca. doppelt so viel mineralisierte Knochenfläche vorhanden, wie in der Gruppe mit dem steifen Titan Mesh Scaffold, mit einem Median von 6,85% (Abb. 58). Mit einer größeren Streuung in der Gruppe mit dem weichen Titan Mesh Scaffold und ohne das Auftreten einer statistischen Signifikanz. Die Knorpelfläche betrug in beiden Gruppen 0% (Tabelle 7). Wie auch in den zuvor genannten ROIs stellte das Bindegewebe den Hauptgewebeanteil dar. Die Bindegewebsfläche erreichte in der Gruppe mit dem weichen Titan Mesh Scaffold einen Median von 87,46% mit einer höheren Streuung, wohingegen die Gruppe mit dem steifen Titan Mesh Scaffold einen Median von 93,14% erreichte (Abb. 59). Es lag keine statistische Signifikanz vor. Die Markraum-ROI wies somit als Hauptgewebe, ebenfalls das Bindegewebe auf. Der Bindegewebsanteil war im Vergleich zu der Medialen-ROI und der Lateralen-ROI geringer, ohne das Auftreten einer statistischen Signifikanz. Der Anteil an Knochengewebe zeigte in der Markraum-ROI höhere Werte als in den vorangegangenen ROIs, jedoch ohne statistische Signifikanz. Knorpelgewebe konnte in der Medialen-ROI und der Lateralen-ROI identifiziert werden, wohingegen in der Markraum-ROI kein Knorpelgewebe auftrat.

Ergebnisse

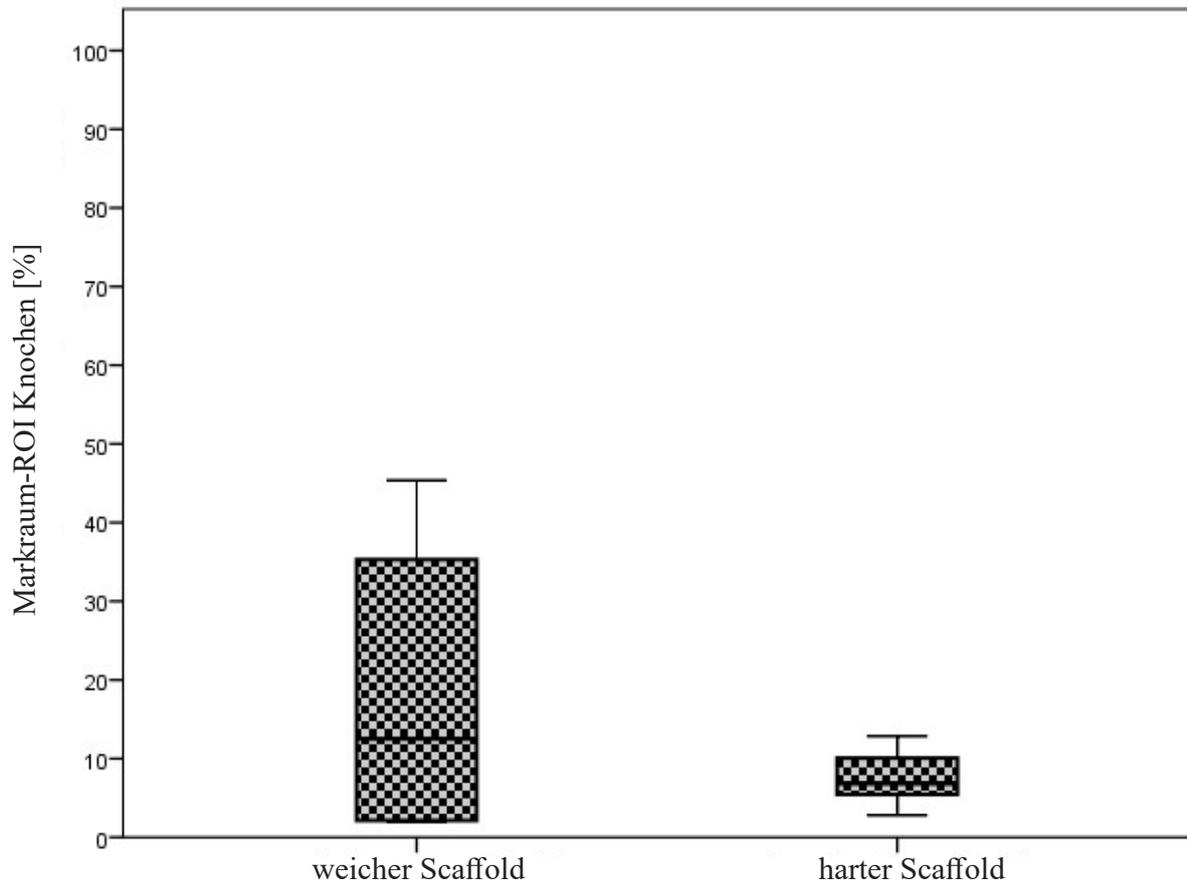


Abbildung 58: Darstellung des Anteils der Knochenfläche [%] in der Markraum-ROI (n=6 pro Gruppe). Der p-Wert (0,937) bezieht sich auf den U-Test nach Mann-Whitney ($p \leq 0,05$).

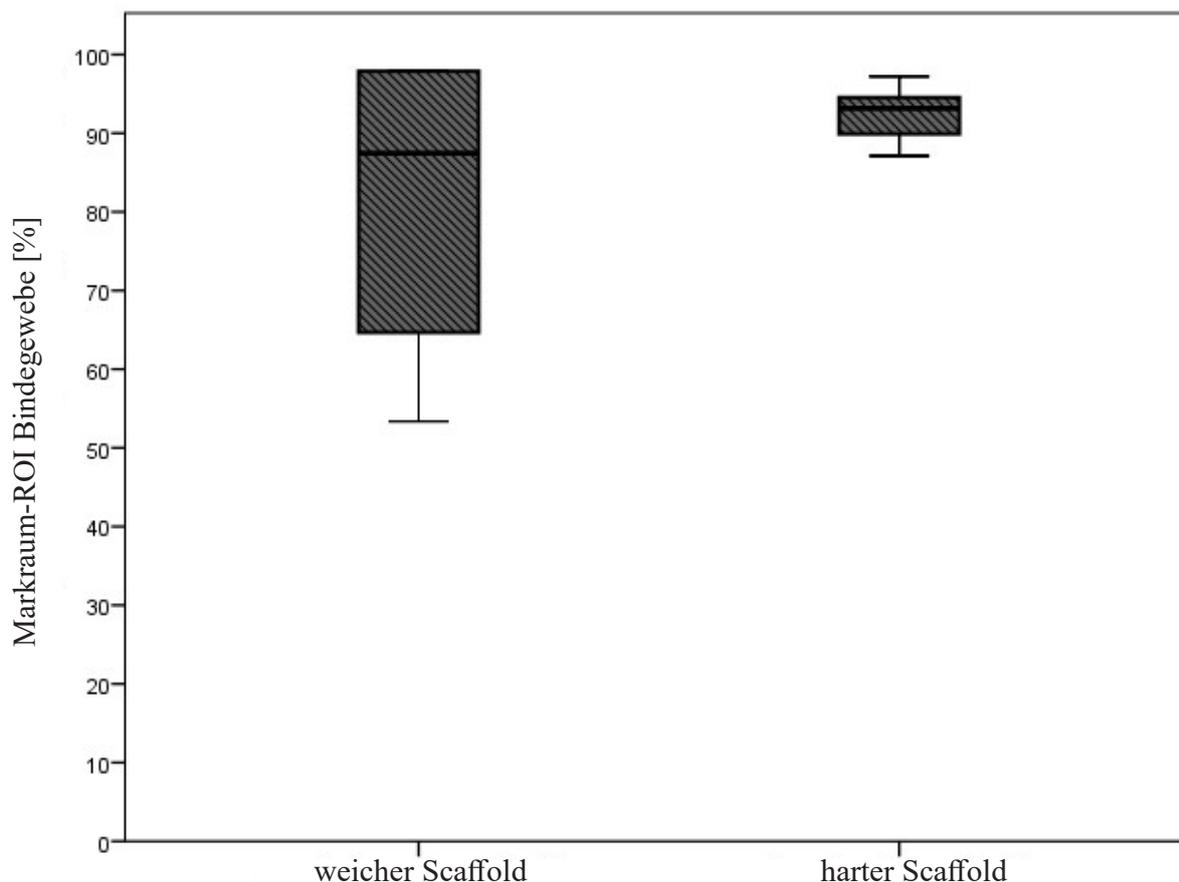


Abbildung 59: Darstellung des Anteils der Bindegewebsfläche [%] in der Markraum-ROI (n=6 pro Gruppe). Der p-Wert (0,937) bezieht sich auf den U-Test nach Mann-Whitney ($p \leq 0,05$).

Tabelle 7: Darstellung der Gewebeanteile in der Markraum-ROI in relativen Zahlen (%).

Der p-Wert bezieht sich auf den U-Test nach Mann-Whitney, ohne signifikante Signifikanz ($p \leq 0,05$).

Parameter	weicher Titan Mesh Scaffold		steifer Titan Mesh Scaffold		p-Wert
	Median	Min-Max	Median	Min-Max	
Knochenfläche (%)	12,53	1,97-45,35	6,85	2,80-12,87	0,937
Knorpelfläche (%)	0,00	0,00-1,28	0,00	0,00-1,28	0,394
Bindegewebsfläche (%)	87,46	53,37-98,03	93,14	87,13-97,20	0,937

Ergebnisse

4.4.5 Mediale Struts-ROI

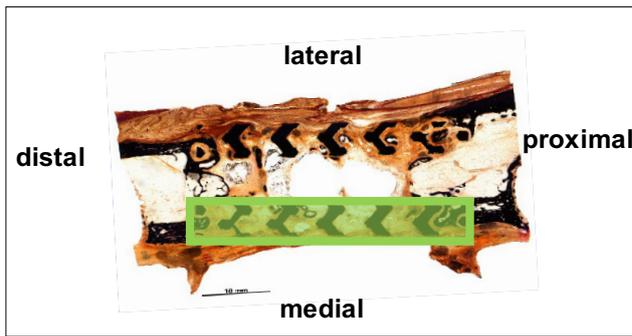


Abbildung 60: Beispielhafte Darstellung der Medialen Struts-ROI in einem histologischen Präparat in kombinierter Safranin Orange/von Kossa-Färbung eines Tieres der Gruppe mit dem steifen Titan Mesh Scaffold.

Die Gewebeverteilung innerhalb der Titanstruts wurde untersucht, um die Möglichkeit auszuwerten, ob die Struts des Titan Mesh Scaffolds als Leitstruktur für das neu gebildete Knochengewebe genutzt werden. Anhand der Medialen Struts-ROI wurde darüber hinaus untersucht, ob der Sitz der AO-Platte, die auf der medialen Tibiaseite eingesetzt wurde, einen Einfluss auf die Gewebebildung im Zusammenhang zur AO-Platte hatte. Die Gruppe mit dem steifen Titan Mesh Scaffold wies in der Medialen Struts-ROI (Abb. 60) mit einem Median von 14,35% mehr mineralisiertes Knochengewebe auf, als in der Gruppe mit dem weichen Titan Mesh Scaffold, mit einem Median von 8,98% (Abb. 61). Die Werte der Streuung waren in beiden Gruppen vergleichbar hoch. In beiden Gruppen kam keine Knorpelfläche vor, der Median erreichte 0% (Tabelle 8). Die Bindegewebsfläche war bei der Gruppe mit dem weichen Titan Mesh Scaffold mit einem Median von 91,01% höher als in der Gruppe mit dem steifen Titan Mesh Scaffold mit einem Median von 85,64%, ohne eine statistische Signifikanz (Abb. 62). Auch hier war die Streuung in beiden Gruppen ähnlich hoch.

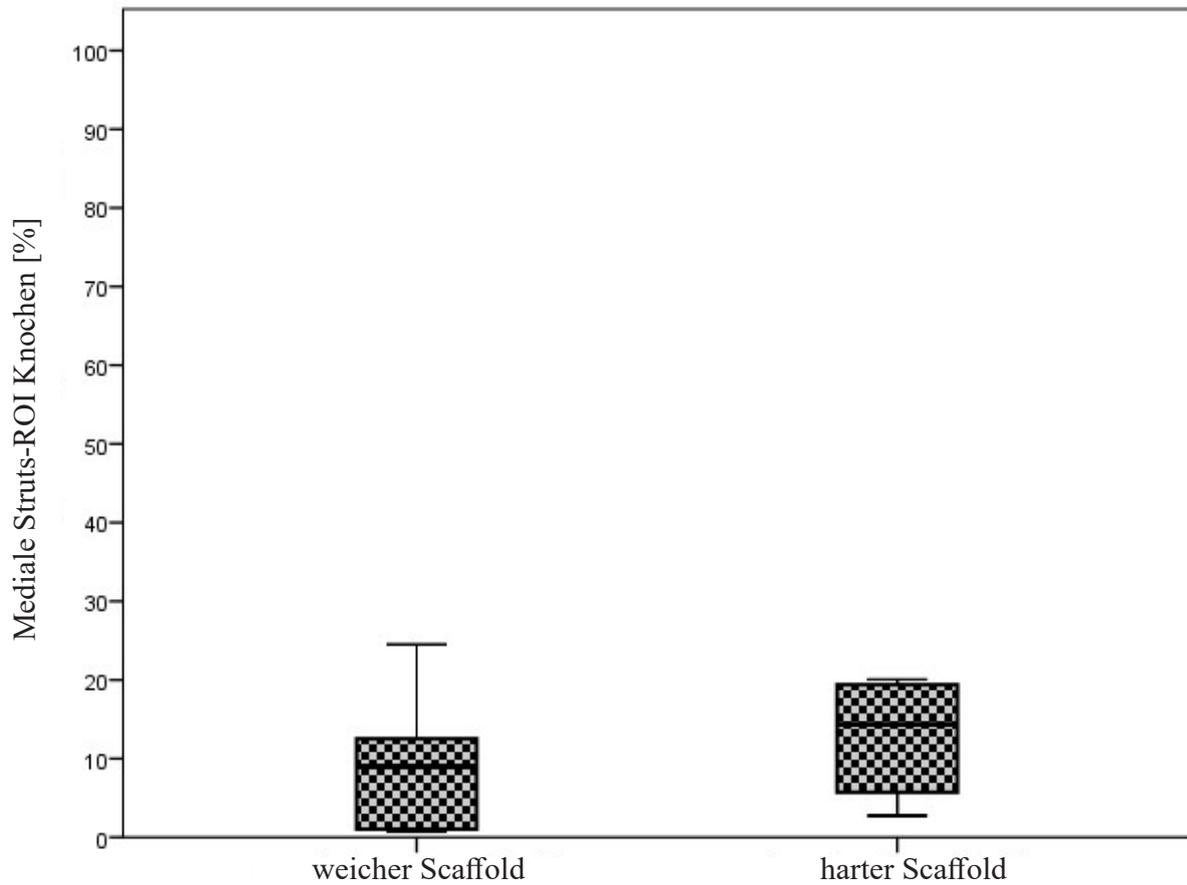


Abbildung 61: Darstellung des Anteils der Knochenfläche [%] in der Medialen Struts-ROI (n=6 pro Gruppe). Der p-Wert (0,485) bezieht sich auf den U-Test nach Mann-Whitney ($p \leq 0,05$).

Ergebnisse

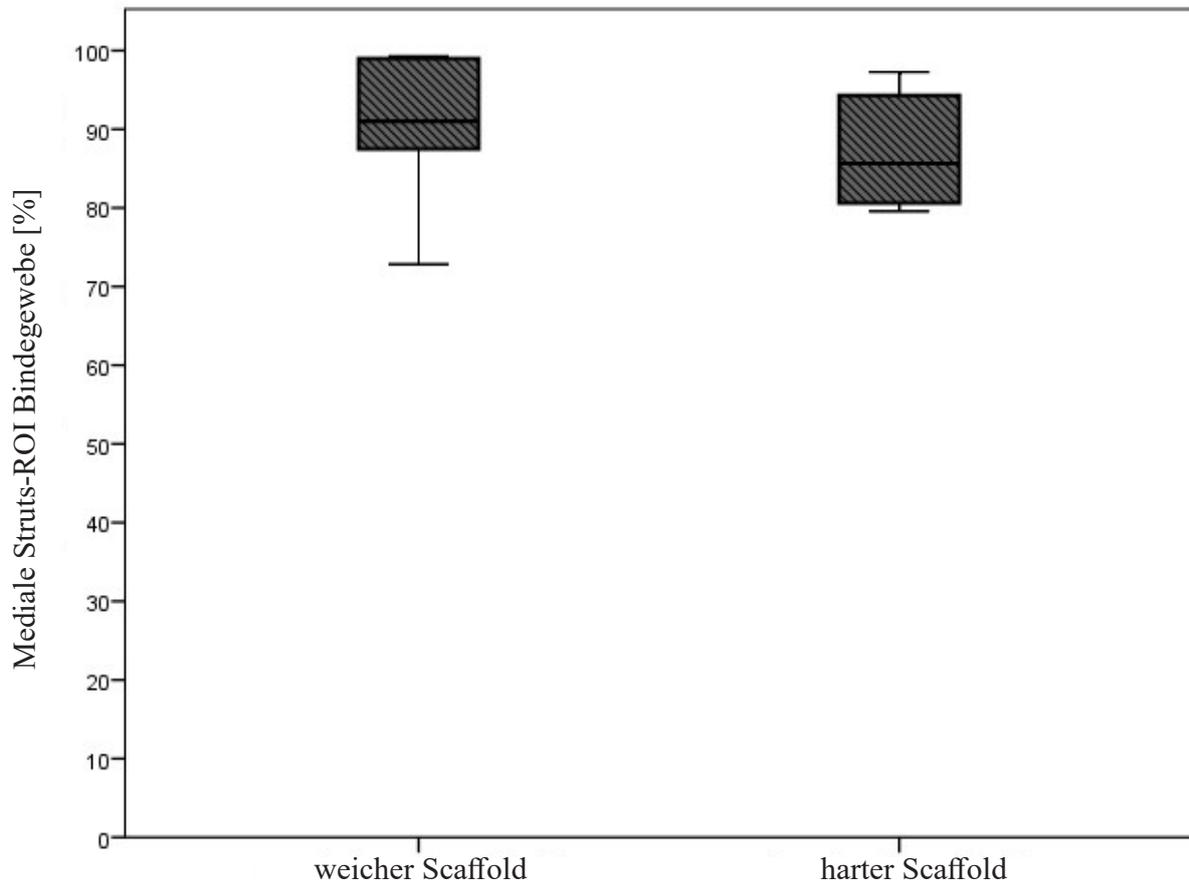


Abbildung 62: Darstellung des Anteils der Bindegewebsfläche [%] in der Medialen Struts-ROI (n=6 pro Gruppe). Der p-Wert (0,485) bezieht sich auf den U-Test nach Mann-Whitney ($p \leq 0,05$).

Tabelle 8: Darstellung der Gewebeanteile in der Medialen Struts-ROI in relativen Zahlen (%). Der p-Wert bezieht sich auf den U-Test nach Mann-Whitney, ohne statistische Signifikanz ($p \leq 0,05$).

Parameter	weicher Titan Mesh Scaffold		steifer Titan Mesh Scaffold		p-Wert
	Median	Min-Max	Median	Min-Max	
Knochenfläche (%)	8,98	0,72-24,51	14,35	2,75-20,07	0,485
Knorpelfläche (%)	0,00	0,00-2,67	0,00	0,00-0,37	0,937
Bindegewebsfläche (%)	91,01	72,82-99,28	85,64	79,57-97,25	0,485

4.4.6 Laterale Struts-ROI

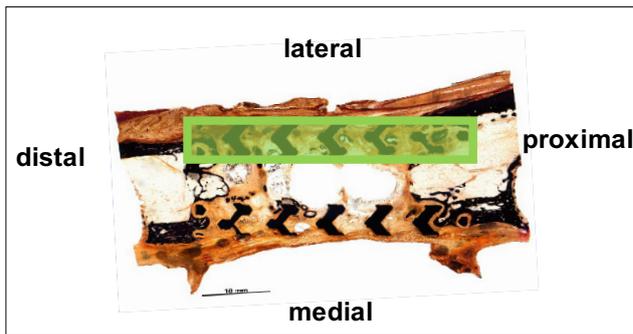


Abbildung 63: Beispielhafte Darstellung der Lateralen Struts-ROI in einem histologischen Präparat in kombinierter Safranin Orange/von Kossa-Färbung eines Tieres der Gruppe mit dem steifen Titan Mesh Scaffold.

In der Lateralen Struts-ROI (Abb. 63) wiesen beide Gruppen einen ähnlich hohen Anteil an mineralisierter Knochenfläche auf. Die Gruppe mit dem weichen Titan Mesh Scaffold erreichte einen Median von 28,19% und die Gruppe mit dem steifen Titan Mesh Scaffold einen Median von 24,31%. Die Streuung war in der Gruppe mit dem weichen Titan Mesh Scaffold höher. Es lag keine statistische Signifikanz vor (Abb. 64). Die Knorpelfläche in der Lateralen Struts-ROI war in beiden Gruppen nachweisbar, jedoch niedrig. Mit einem Median von 0,11% in der Gruppe mit dem weichen Titan Mesh Scaffold, sowie mit 0,20% in der Gruppe mit dem steifen Titan Mesh Scaffold und einer ähnlich hohen Streuung (Abb. 65). Der Vergleich der beiden Struts-ROIs zeigte hingegen mehr Knochengewebe in der Medialen Struts-ROI der Gruppe mit dem steifen Titan Mesh Scaffold. Knorpelgewebe war in der Medialen Struts-ROI nicht nachweisbar. Die Bindegewebsfläche in der Lateralen Struts-ROI war in beiden Gruppen ähnlich hoch. Mit einem Median von 70,89% und einer höheren Streuung in der Gruppe mit dem weichen Titan Mesh Scaffold sowie einem Median von 75,47% in der Gruppe mit dem steifen Titan Mesh Scaffold, jedoch ohne statistische Signifikanz (Abb. 66 und Tabelle 9). Somit zeigte sich eine fast doppelt so große Knochenfläche in der Lateralen Struts-ROI im Vergleich zu der Medialen Struts-ROI, jedoch war dieser Unterschied nicht statistisch signifikant.

Ergebnisse

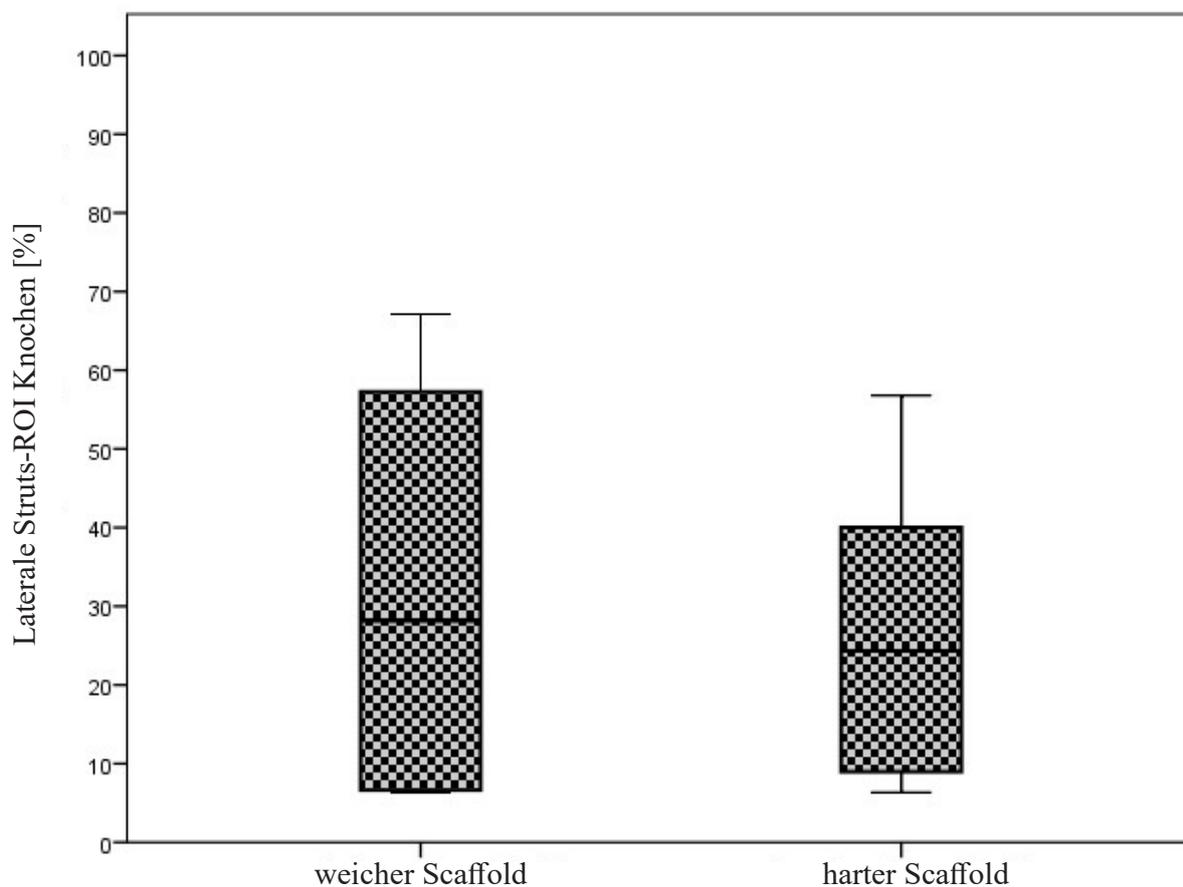


Abbildung 64: Darstellung des Anteils der Knochenfläche [%] in der Lateralen Struts-ROI (n=6 pro Gruppe). Der p-Wert (0,818) bezieht sich auf den U-Test nach Mann-Whitney ($p \leq 0,05$).

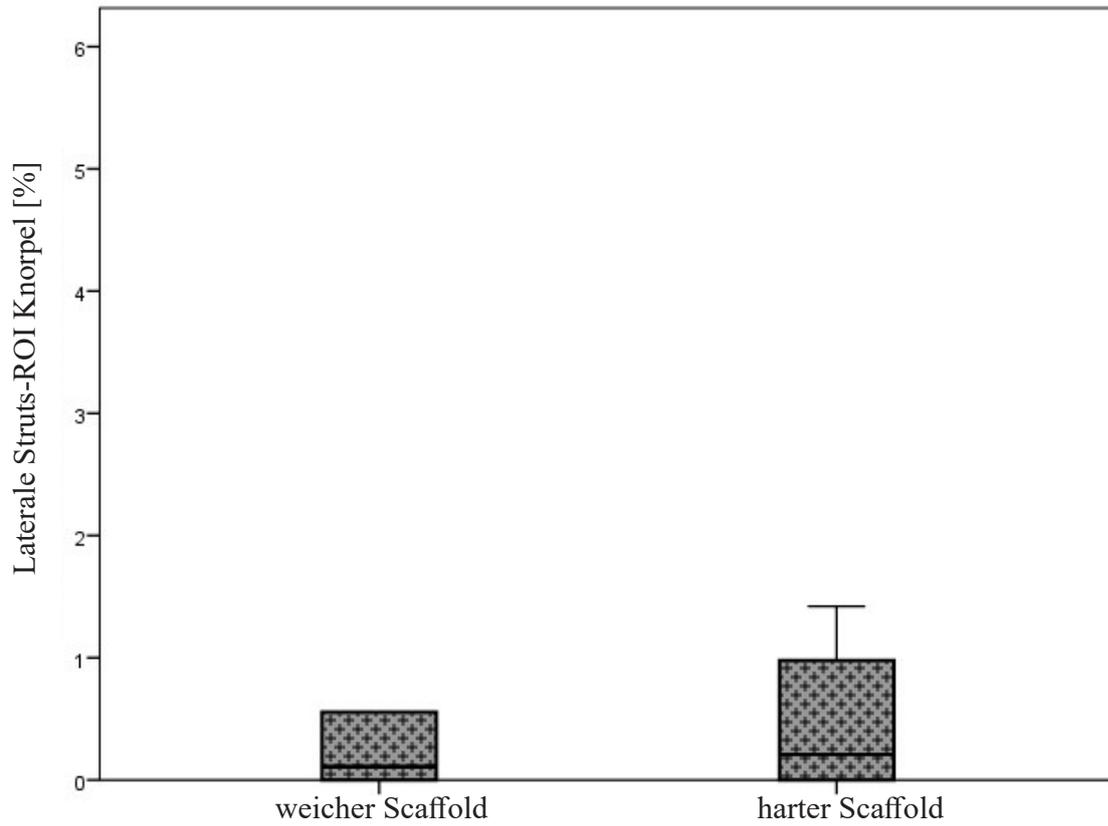


Abbildung 65: Darstellung des Anteils der Knorpelfläche [%] in der Lateralen Struts-ROI (n=6 pro Gruppe). Der p-Wert (1,000) bezieht sich auf den U-Test nach Mann-Whitney ($p \leq 0,05$).

Ergebnisse

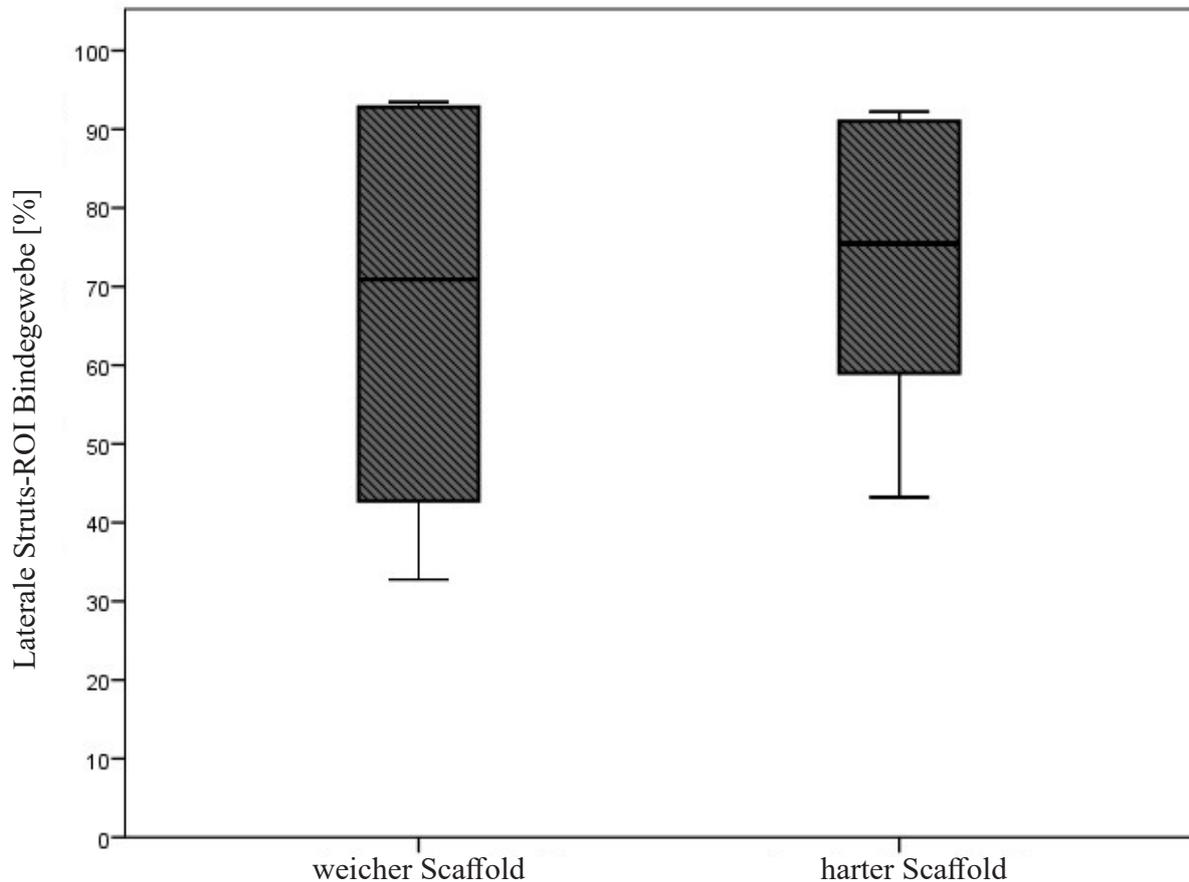


Abbildung 66: Darstellung des Anteils der Bindegewebsfläche [%] in der Lateralen Struts-ROI (n=6 pro Gruppe). Der p-Wert (1,000) bezieht sich auf den U-Test nach Mann-Whitney ($p \leq 0,05$).

Tabelle 9: Darstellung der Gewebeanteile in der Lateralen Struts-ROI in relativen Zahlen (%).

Der p-Wert bezieht sich auf den U-Test nach Mann-Whitney, ohne statistische Signifikanz ($p \leq 0,05$).

Parameter	weicher Titan Mesh Scaffold		steifer Titan Mesh Scaffold		p-Wert
	Median	Min-Max	Median	Min-Max	
Knochenfläche (%)	28,19	6,43-67,13	24,31	6,34-56,80	0,818
Knorpelfläche (%)	0,11	0,00-1,82	0,20	0,00-1,42	1,000
Bindegewebsfläche (%)	70,89	32,77-93,45	75,47	43,20-92,24	1,000

4.5 Zusammenfassung der Ergebnisse

4.5.1 Operations- und Standzeitbefunde

Sowohl die Operation als auch die Narkose wurden von den insgesamt dreizehn Schafen gut toleriert. Alle Tiere waren nach dem Eingriff in der Lage in einer Einzelbox selbständig zu stehen und konnten bereits zwei Tage nach der Operation mit einem weiteren Tier in die Kleingruppenhaltung entlassen werden. Ein Tier der Gruppe mit dem weichen Titan Mesh Scaffold erlitt aufgrund eines Traumas eine Fraktur der operierten Tibia und musste ersetzt werden. Innerhalb der ersten drei Versuchswochen trat bei zwei Tieren der Gruppe mit dem weichen Titan Mesh Scaffold und bei fünf Tieren der Gruppe mit dem steifen Titan Mesh Scaffold ein Serom am Wundrand auf, welches mit einem leichten Polsterverband und einer antibiotischen Versorgung erfolgreich behandelt wurde. Bei einem Tier der Gruppe mit dem weichen Titan Mesh Scaffold und zwei Tieren der Gruppe mit dem steifen Titan Mesh Scaffold wurde eine mittelgradige Stützbeinlahmheit dokumentiert, die analgetisch behandelt wurde. Eine auftretende Infektion des operierten Beckenkammes bei einem Tier der Gruppe mit dem steifen Titan Mesh Scaffold wurde durch lokale Desinfektion, Antibiose und Analgesie erfolgreich kuriert.

4.5.2 Radiologie

Innerhalb der 24-wöchigen Versuchszeit wurden monatlich standardisierte latero-laterale und anterior-posteriore Röntgenbilder zur Kontrolle des eingesetzten Titan Mesh Scaffolds, der AO-Platte und der Schrauben angefertigt. Es konnte weder ein Bruch noch ein Versagen beobachtet werden. Die korrekte Position des Titan Mesh Scaffolds, der AO-Platte und der Schrauben wurde dokumentiert. Das Titan Mesh Scaffold und die AO-Platte trugen zur Entstehung von Streustrahlung bei, sodass röntgenologisch keine zuverlässigen Aussagen über die Kallusformation innerhalb der zentralen Titan Mesh Scaffoldpore gemacht werden konnten. Bewertet wurden die Positionen der AO-Platte, des Titan Mesh Scaffolds sowie der Schrauben, als auch das Vorkommen von Osteolysen. Eine korrekte Positionierung des Titan Mesh Scaffolds, der AO-Platte und der Schrauben konnte bei allen zwölf Versuchstieren bestätigt werden. Eine geringgradige Aufhellung der Kortikalis an der ersten proximalen Schraube der AO-Platte konnte bei jeweils drei Tieren beider Gruppen dokumentiert werden, jedoch ohne eine Lockerung und einen Verlust der Schraube. Bei insgesamt vier Tieren der Gruppe mit dem weichen Titan Mesh Scaffold konnte eine Bildung von mineralisiertem Knochen auf der Titan Mesh Scaffoldoberfläche auf der lateralen Seite vermutet werden. In der Gruppe mit dem steifen Titan Mesh Scaffold ließ sich bei insgesamt drei Tieren eine Kallusbildung, ebenfalls auf der lateralen Seite, vermuten. In beiden Gruppen kam es bei keinem Tier zu einer vollständigen Überbrückung des Osteotomiespaltes. In der 24. Woche wurden zu den konventionellen Röntgenaufnahmen,

Ergebnisse

Aufnahmen im Faxitron angefertigt, die jedoch aufgrund der Röntgendichte des Titans zu keinen weiteren Erkenntnissen beitrugen. Insgesamt erwies sich eine aussagekräftige röntgenologische Beurteilung der Kallusbildung aufgrund der Titaneigenschaften als schwierig, dennoch konnte bei insgesamt sieben Tieren eine Kallusbildung vermutet werden. Diese Vermutung konnte im Folgenden histologisch bestätigt werden.

4.5.3 Deskriptive Histologie

Die zwölf longitudinal und mid-diaphysär durch die Schafstibia verlaufenden Präparate wurden in kombinierter Safranin Orange/von Kossa-Färbung gefärbt und histomorphologisch ausgewertet. Der Osteotomiedefekt wies eine Größe von 40 mm auf und wurde sowohl von dem Titan Mesh Scaffold als auch durch die Kortikales begrenzt. Der Titan Mesh Scaffold war deutlich durch die Titanstruts differenzierbar und bei allen Proben intakt. Lockeres Bindegewebe stellte bei allen Tieren beider Gruppen den Hauptgewebeanteil dar und konnte als ein Zeichen für eine nicht optimale Knochenheilung gedeutet werden. Bei jeweils einem Tier jeder Gruppe war auf der medialen Defektseite ausschließlich Bindegewebe, ohne Anzeichen von Knochen- und Knorpelgewebe, erkennbar. Jedoch trat bei jeweils zwei Tieren beider Gruppen auf der lateralen Präparatseite eine Überbrückung des Defektes mit mineralisiertem Geflechtknochen entlang der Titanstruts auf. Eine großflächige Knochenbildung ohne Defektüberbrückung fand bei zwei Tieren der Gruppe mit dem weichen Titan Mesh Scaffold und bei einem Tier der Gruppe mit dem steifen Titan Mesh Scaffold statt. Ein Wachstum des Knochengewebes in den Markraum konnte bei jeweils drei Tieren beider Gruppen beobachtet werden. Insgesamt fünf Tiere zeigten distal einen Markraumschluss an den Kortikales. Bei insgesamt zwei Tieren befand sich der Markraumschluss sowohl distal als auch proximal. Der mineralisierte Knochen wuchs in beiden Gruppen mit direktem Kontakt zu den Titanstruts. Die Knochenbildung, die in Form von intramembraner Ossifikation stattfand, war bei allen zwölf Tieren aktiv. Osteoid war überwiegend auf der mineralisierten Knochenoberfläche als eine rote Schicht erkennbar. Hyaliner Knorpel trat in geringer Menge bei insgesamt neun Tieren, vorwiegend auf der lateralen Defektseite, auf und deutete ebenfalls auf einen aktiven Knochenheilungsprozess hin. Entzündungsreaktionen als Reaktion auf die Osteotomie konnten bei keinem Tier festgestellt werden. Das Präparat, des nach einer Woche ausgeschiedenen Tieres zeigte deutlich die eingesetzte autologe Spongiosa und wurde als Vergleichspräparat für die deskriptive Auswertung herangezogen.

4.5.4 Histomorphometrie

Aus der deskriptiven Histologie resultierte, dass das Bindegewebe den Hauptgewebeanteil darstellte. Die bildanalytische Auswertung, in relativen Zahlen (%), der zwölf Safranin Orange/von Kossa gefärbten Präparate beider Gruppen (n=6) bestätigte dieses Resultat und

somit auch die Vermutung einer nicht optimalen Knochenheilung. Der Bindegewebsanteil war in der Gruppe mit dem steifen Titan Mesh Scaffold höher als in der Gruppe mit dem weichen Titan Mesh Scaffold, jedoch ohne statistische Signifikanz. Eine Knochenbildung konnte in beiden Gruppen beobachtet werden, die Knochenfläche wies in der Gesamt-ROI in der Gruppe mit dem weichen Titan Mesh Scaffold mehr mineralisiertes Knochengewebe auf, als in der Gruppe mit dem steifen Titan Mesh Scaffold. Bei Betrachtung der medialen und lateralen Präparatseite, konnte eine stärkere Knochenformation in der Gruppe mit dem weichen Titan Mesh Scaffold auf der lateralen AO-Platte-freien Seite beobachtet werden, wohingegen die Gruppe mit dem steifen Titan Mesh Scaffold eine höhere Knochenformation auf der medialen Präparatseite aufwies. Bei gesonderter Betrachtung der Teil-ROIs zeigte sich die Knochenformation in beiden Gruppen an der Struktur des Scaffolds orientiert und zwischen den Titanstruts verlaufend. Knorpelgewebe, als Zeichen einer enchondralen Ossifikation, konnte in beiden Gruppen histologisch beschrieben werden, lag jedoch prozentual in beiden Gruppen unter einem Prozent. In beiden Gruppen zeigte sich eine Knorpelbildung auf der lateralen Präparatseite, wohingegen die Werte des Knorpels auf der medialen Präparatseite bei 0 % lagen. Der Markraum wurde hauptsächlich von Bindegewebe gefüllt, wobei der Bindegewebsanteil in der Gruppe mit dem steifen Titan Mesh Scaffold höher lag. Die mineralisierte Knochenfläche wies in der Markraum-ROI im Median in der Gruppe mit dem weichen Titan Mesh Scaffold einen beinahe doppelt so hohen prozentualen Anteil auf, als in der Gruppe mit dem steifen Titan Mesh Scaffold. Knorpelgewebe war im Markraum in beiden Gruppen mit einem Median von 0% nicht vorhanden. Die genannten Unterschiede waren statistisch nicht signifikant.

5. Diskussion

Ausgedehnte, segmentale Knochendefekte, die durch Traumen, Infektionen und tumoröse Resektion hervorgerufen werden, zählen zu den komplizierten chirurgischen Herausforderungen (Naggar 1993, Cierny 1994, Prokuski 1994, Georgiadis 1995, Chadayammuri 2015). Beim Menschen ist die Tibia ein langer Röhrenknochen, an dem häufig Frakturen auftreten. Aufgrund ihrer Anatomie besitzt die Tibia nur wenig Weichteilabdeckung, sodass hohe Raten an verzögerter Heilung auftreten (Urist 1954, DeCoster 2004). Die Distractionsosteogenese stellt eine Behandlungsmöglichkeit einer Tibiafraktur dar (Ilizarov 1989, Ilizarov 1989, Hertel 1994). Die Masquelet-Technik sowie der Einsatz von Endoprothesen zählen zu innovativen Verfahren bei der Behandlung von Defekten kritischer Größe (Masquelet 2000, Chadayammuri 2015). Der Einsatz von autogenen, allogenen und autogenen vaskularisierten Knochentransplantaten stellen die Methoden der Wahl dar und werden als „Gold Standard“ angesehen (Green 1994). Knochentransplantate bieten zwar eine gute strukturelle Unterstützung, das Einwachsen des Transplantats kann jedoch ausbleiben und das Infektionsrisiko hoch sein (Chmell 1995). Bei den genannten Methoden stellen die Spendermorbidity, der Materialmangel und der zusätzliche operative Eingriff mögliche Probleme dar, daher wird zunehmend nach Alternativmethoden gesucht (Cipitria 2013, Berner 2014). Der Bedarf an Alternativmethoden führt dazu, dass verschiedene Scaffolds aus unterschiedlichen Materialien, wie zum Beispiel der Einsatz eines Kompositscaffolds aus Poly-Lactid-co- ϵ -Caprolacton und β -Trikalziumphosphat, zunehmend erforscht werden (Pobloth 2017). Der Einsatz von patientenspezifischen Titan Mesh Scaffolds erfolgte bereits vielversprechend in der Unfallchirurgie der Charité, jedoch können neben bildgebenden Verfahren, bis auf wenige Ausnahmen, keine weiteren Untersuchungen am humanen Patienten durchgeführt werden. Eine Patientin, bei der ein Titan Mesh Scaffold eingesetzt wurde, stürzte in der 28. Woche post OP und wurde erneut operiert. Dabei konnte dokumentiert werden, dass sich auf der Oberfläche des Titan Mesh Scaffolds eine Kallusschicht gebildet hatte. Aus ethischen Gründen gestalten sich Probeentnahmen in der Regel beim humanen Patienten schwierig, sodass die Möglichkeit, Aussagen zum Knochenwachstum innerhalb des eingesetzten Titan Mesh Scaffolds sowie über die Optimierung seiner Eigenschaften zutreffen nicht gegeben ist und folglich Untersuchungen am Tiermodell notwendig sind (Pobloth 2018). Die Mechanik der klinisch eingesetzten Titan Mesh Scaffolds erwies sich als zu steif, wodurch eine Osteoinduktion nicht mehr erfolgte. Für die vorliegende Studie wurden zwei weichere Titan Mesh Scaffolds mit zwei unterschiedlichen Steifigkeiten entwickelt. Sie wurden zusammen mit einer speziell für das Schaf entwickelten AO-Platte genutzt, die eine axiale Dynamisierung erlaubte, um die mechanische Stimulation auf den Knochen zu übertragen.

Die vorliegende Studie prüfte, ob der Einsatz der zwei strukturell gleichen, jedoch in ihrer Steifigkeit unterschiedlichen Titan Mesh Scaffolds in Kombination mit dem experimentellen, winkelstabilen Plattensystem für einen kritischen Defekt von 40 mm Größe als adäquate Behandlungsmethode geeignet ist. Des Weiteren wurde evaluiert, ob eine mechanisch-biologische Optimierung des Titan Mesh Scaffolds zu einer Förderung der Knochendefektregeneration führt.

5.1 Diskussion von Material und Methoden

5.1.1 Untersuchungsmodell

Tiermodell

In vivo Tiermodelle bieten die Möglichkeit, die Knochenantwort auf verschiedene Einflussfaktoren, wie zum Beispiel eine Veränderung der mechanischen Einflüsse, zu untersuchen (Razi 2015). Titan Mesh Scaffolds, die bei humanen Patienten eingesetzt wurden, brachten diverse Komplikationen bei der Evaluierung mit sich, da bei unterschiedlichen humanen Patienten verschiedene Faktoren auftreten, die zu einer fortschreitenden oder ausbleibenden Knochenheilung führen können (Moulder 2008). Bei humanen Patienten sind bei der Knochenheilung unter anderem das Alter, das Geschlecht sowie der allgemeine Gesundheitszustand von Bedeutung. Hinzu kommen limitierende Faktoren bei der standardisierten Evaluierung, sodass diverse Tiermodelle eingesetzt werden können (Pearce 2007, Reichert 2009, Decker 2014). Tiermodelle sind ein fester Bestandteil bei der Erforschung der Frakturheilung (Stürmer 1980). Bei in vivo eingesetzten Titan Mesh Scaffolds stehen bei der Untersuchung der Knochenheilung und der auftretenden Gewebereaktionen auf das eingesetzte Material nur beschränkte Untersuchungsmöglichkeiten zur Verfügung (Hahn 2011). Die Möglichkeit histologische Untersuchungen in Form von Biopsien am humanen Patienten durchführen zu können, sind zwar gegeben, sie lassen jedoch keine befriedigende Evaluierung zu. Einmalig durchgeführte Biopsien zeigen nur einen kleinen Ausschnitt der Heilungsphase, was eine unzureichende Beurteilung der Osseointegration und der Biokompatibilität der eingesetzten Implantate nach sich zieht. Häufig angefertigte Biopsien stellen aus ethischen Gründen ein Problem dar. Dadurch sind die Möglichkeiten ausgiebige histologische Untersuchungen am humanen Patienten durchzuführen, ausschließlich auf das Auftreten eines Versagens des Titan Mesh Scaffolds oder einer Refraktur beschränkt. Aufgrund dessen werden, um die Durchführbarkeit von neuen Methoden zu überprüfen, Tiermodelle eingesetzt (Cancedda 2007). Eine Vielzahl von Tiermodellen wurde bereits in der Traumaforschung genutzt. Decker et al. verglichen durchgeführte Tiermodelle miteinander und kamen zu dem Entschluss, dass Schafe aufgrund vergleichbarer Eigenschaften bevorzugt zur Erforschung von humanen

Diskussion

Frakturheilungen zum Einsatz kommen (Decker 2014). In der vorliegenden Studie wurde zur Evaluierung ebenfalls ein Tiermodell gewählt, da es die beste Alternative darstellte, um zwei unterschiedliche mechanische Eigenschaften unter standardisierten Bedingungen zu vergleichen und die vorliegenden Fragestellungen zu beantworten. Auf der Grundlage der Ergebnisse von Razi et al., über die Möglichkeit der Veränderung der Steifigkeit von Titan Mesh Scaffolds, wurden zwei im Vergleich zu den klinischen Titan Mesh Scaffolds weichere Titan Mesh Scaffolds mit unterschiedlichen Steifigkeiten entwickelt. Diese unterschieden sich strukturell nicht voneinander und wurden in das vorliegende Tiermodell eingesetzt sowie evaluiert (Razi 2012).

Schafmodell

Das Schaf hat sich als Modelltier in der Erforschung der Knochenheilung etabliert, da es dem menschlichen Knochen im Volumenverhältnis und in den Umbaueigenschaften gleicht, ähnliche biomechanische Eigenschaften sowie Knochenheilungseigenschaften aufweist (Newman 1995; Pearce 2007). Die Knochen von Nagern unterscheiden sich nicht nur durch die Größe des Knochens von denen des Menschen, histologisch gesehen besitzen sie eine primitive Knochenstruktur und zeichnen sich durch das Fehlen eines Haverschen Systems aus (Nunamaker 1998). Darüber hinaus ist die Gewichtsbelastung der Gliedmaßen beim Schaf vergleichbar mit der eines adulten Menschen (Reichert 2009). Insgesamt ist die Aussagekraft der Ergebnisse von Großtiermodellen besser interpretierbar im Vergleich zu Nagetiermodellen (Hahn 2011). Dennoch dürfen Unterschiede im Vergleich zum humanen Patienten, die einen Einfluss auf die Knochenheilung haben können, nicht außer Acht gelassen werden. In der Humanmedizin entstehen Defekte kritischer Größe, die mit einem vorangegangenen Trauma einhergehen, mit einer größeren Schädigung des umgebenden Weichgewebes als bei einem experimentell gesetzten Defekt kritischer Größe. Hinzu kommt, dass die humanen Patienten häufig alt oder krank sind (Auer 2007, Muschler 2010). Ein weiterer Vorteil des Schafes ist das komplikationsfreie Handling, welches durch ein vorangehendes Training erreicht wird sowie die einfache Versorgung der Tiere und die unproblematischen Unterbringungseigenschaften (Roach 1989). Hinzu kommen geringe Morbiditäts- und Komplikationsraten, sodass das Schafmodell bevorzugt als Standardmodell bei der Evaluierung der Knochenheilung bei Defekten langer Röhrenknochen gewählt wird (Decker 2014). Neben der Knochenzusammensetzung und der Knochenbiologie besteht die Möglichkeit humane Defektgrößen zu untersuchen (Muschler 2010). Durch die Größe der Tiere und das vergleichbare Körpergewicht können humanmedizinische Implantate und Instrumente direkt eingesetzt und beurteilt werden (Decker 2014). Hinzukommt die Eigenschaft der Schafe, operierte Gliedmaßen nicht zu entlasten, sodass eine für den Versuchsaufbau notwendige Vollbelastung der operierten Gliedmaße gewährleistet wird (Nunamaker 1998). In der vorliegenden Studie wurde das

Schaf aufgrund der Möglichkeit einen Defekt kritischer Größe zu untersuchen, mit den vergleichbaren Titan Mesh Scaffolddimensionen, der vergleichbaren Heilungszeit und dem translationalen Ansatz, als Versuchstier gewählt. Die Entnahme der autologen Spongiosa aus dem Beckenkamm und das anschließende Befüllen des Titan Mesh Scaffolds sind im Gegensatz zum Nagetier möglich und ebenfalls als vorteilhaft zu werten.

Heilungszeit

Ein Vergleich verschiedener Versuchstierspezies hat gezeigt, dass das Schaf eine dem Menschen vergleichbare Knochendefektheilungszeit aufweist, im Gegensatz zu Nagern, bei denen aufgrund des Fehlens der Haversschen Kanäle eine schnellere Knochenheilung stattfindet (Stürmer 1980, Metak 1998). Schafe besitzen lange Röhrenknochen, die in der mineralisierten Zusammensetzung und der metabolischen Knochenremodellingsphase, denen des Menschen ähnlich sind (Newman 1995, Den Boer 1999). Zwar enthält der kortikale Knochen der Schafe im Vergleich zum humanen Knochen weniger Haverssche Kanäle, dennoch ist die Heilungszeit mit der des Menschen vergleichbar (Wissing 1990). Die Versuchszeit sollte so gewählt werden, dass bei einem Defekt von 40 mm Größe zwischen einer vollständigen knöchernen Überbrückung und einer Non-union klassifiziert werden kann. Die Frakturheilungszeit beim Schaf beträgt laut anderer Studien, abhängig von der Defektgröße und der Behandlungsart, zwischen sechs bis acht Wochen (Wu 1984, Goodship 1993). Peters et al. sprachen bei großen segmentalen Defekten von einer verzögerten Heilungszeit, wenn das Remodelling erst ab der sechsten bis neunten Woche beginnt (Peters 2010). Bei Ausbleiben der Knochenbildung nach sechs bis neun Monaten spricht man von einer Non-Union (Rodriguez-Merchan 2004). In der vorliegenden Studie wurde das Schafmodell mit einer Standzeit von 24 Wochen gewählt, um die Defektheilung zu beurteilen, da nach diesem Zeitraum die Aktivität der Knochenheilung beurteilt und eine Non-Union klassifiziert werden kann. Eine Knochenbildung konnte in beiden Gruppen ohne vollständige Überbrückung des Defekts beobachtet werden. Den Hauptgewebeanteil machte jedoch das Bindegewebe aus. Somit handelte es sich in beiden Gruppen um eine deutlich verzögerte Heilung.

Kritischer Defekt

Ein Defekt kritischer Größe liegt vor, wenn der Defekt zwei bis zweieinhalb mal so groß ist, wie der Durchmesser des betroffenen Knochens (Reichert 2009) und der unbehandelt, zu Lebzeiten des Tieres nicht heilen wird (Schmitz 1986). In der Schafstibia wird ein Defekt kritischer Größe häufig als 3 bis 4 cm definiert und bevorzugt als Modell in Studien, die Knochenersatzmaterial untersuchen, eingesetzt (Den Boer 1999, Wippermann 1999, Cipitria 2012). Defekte kritischer Größe in langen Röhrenknochen werden durch komplexe Bedingungen charakterisiert, die unter Umständen zu einer Non-Union oder einer

Diskussion

verlangsamten Heilung führen können (Hollister 2011). Der Defekt von 40 mm in der vorliegenden Studie entsprach laut Definition einem Defekt kritischer Größe, da der gesetzte Defekt den Durchmesser der Tibia zweifach überschritt und zu Lebzeiten des Tieres unbehandelt nicht geheilt wäre. Des Weiteren konnte nach einer Versuchszeit von 24 Wochen keine vollständige Defektüberbrückung beobachtet werden.

Osteosynthese- Technik

Platten werden prinzipiell zur Stabilisierung und Kompression von Knochendefekten genutzt (Perry 1999), da flexible interne Fixierungsmethoden heutzutage ein essentieller Bestandteil bei den Behandlungen von Frakturen sind. Sie fördern die sekundäre Knochenheilung durch beschränkte mechanische Stimuli im Frakturspalt, mit gleichzeitiger Fähigkeit des frühzeitigen Erlangens der Gliedmaßenfunktion (Windolf M 2014). Die eingesetzten Platten können dem Knochengewebe außerdem, neben dem eingesetzten Scaffold, als Leitstruktur dienen (Cipitria 2012, Rentsch 2014). Dabei gibt es die Möglichkeit unterschiedliche Platten einzusetzen. Lohfeld 2012 et al. beispielsweise stabilisierten einen 20 mm großen Tibiadefekt im Schafmodell mit einer winkelstabilen Kompressionsplatte (LCP) in Kombination mit zwei unterschiedlichen Scaffolds und beobachteten eine Kallusbildung zwischen der 8. und 14. Woche (Lohfeld 2012). Reichert et al. nutzten in einem 30 mm großen Tibiadefekt, ebenfalls im Schafmodell, eine dynamische Kompressionsplatte. Sie untersuchten einen Leerdefekt, einen Defekt gefüllt mit autologer Spongiosa aus dem Beckenkamm und zwei Defekte gefüllt mit zwei unterschiedlichen Scaffolds. Der Versuchszeitraum betrug zwölf Wochen (Reichert 2012). Die Platten erwiesen sich in beiden Studien als eine gute Fixationsmethode. In der vorliegenden Studie wurde eine experimentelle AO-Platte eingesetzt, die zum einen die Stabilisierung des Frakturspalt und zum anderen eine ausschließlich axiale Gewichtsbelastung gewährleistete, mit gleichzeitiger Ausschaltung von Torsions- und Scherkräften. Die Platte besaß ein experimentelles Design und wurde speziell auf das Schaf zugeschnitten. Wie auch im Vorversuch von Windolf et al. boten die Vorteile des Einsetzens der AO-Platte die Möglichkeit, die Gliedmaße nach der Operation vollständig zu belasten, ohne dass ein langfristiger Verband nötig war und die Tiere zwei Tage nach der Operation bereits in Kleingruppen mit direktem Kontakt zu Artgenossen untergebracht werden konnten (Windolf M 2014). Nach der Tierschutz-Versuchstierverordnung und den von William M. S. Russel und Rex L. Burch eingeführten Reduce-Replace-Refine Grundsätzen ist das Leiden der Tiere auf ein unerlässliches Maß zu beschränken. In der vorliegenden Studie beziehen sich die Grundsätze auf die Gruppenhaltung, da Schafe Herdentiere sind und mindestens in einer Kleingruppe gehalten werden sollten (Knothe 2007, Richter 2015). Die Tiere in der vorliegenden Studie konnten aufgrund der Eigenschaften der AO-Platte bereits direkt nach der Operation alle vier Gliedmaßen vollständig physiologisch belasten und innerhalb kürzester Zeit in Kleingruppen

gehalten werden. Des Weiteren erwies sich die AO-Platte als eine stabile und adäquate Behandlungsmethode für einen Defekt von 40 mm Größe, da bei keinem der Tiere ein Plattenversagen während der 24 Wochen auftrat. Die AO-Platte stabilisierte den Defekt und erlaubte darüber hinaus eine axiale Belastung des Defektspaltes. Aus anderen Studien ist bereits bekannt, dass mechanische Eigenschaften einen Einfluss auf die Knochenheilung haben (Claes 1999, Klein 2003). Der Frakturspalt sollte demnach stabil sein, gleichzeitig aber einen gewissen Grad an Unruhe im Frakturspalt zulassen (Stürmer 1984). Für eine optimale Kallusbildung ist eine schonende Operationstechnik notwendig, zusammen mit einer guten Reposition sowie einer stabilen und gleichzeitig flexiblen Osteosynthese. Die Dynamisierung durch axiale Bewegungen führt zu einem Verschluss der Frakturspalten und zum anderen durch Erhöhung des Reizes im Frakturspalt zur Kallusdifferenzierung (Claes 2000). Klinischen Erfahrungen zu Folge haben axiale Bewegungen eher eine positive und Scherbewegungen eher eine negative Auswirkung auf die Knochenheilung. Dennoch konnte in der vorliegenden Studie bei keinem der zwölf Versuchstiere ein kompletter Verschluss der Markhöhle beobachtet werden. Aus anderen Studien ging hervor, dass eine ungenügende Gewichtsbelastung zu einer verzögerten Heilung und in einigen Fällen zu einer Non-Union führte (Schell 2008). In der vorliegenden Studie lag eine stabile Osteosynthesemethode mit ausreichender Gewichtsbelastung vor, die ausschließlich eine axiale Bewegung zuließ. Durch die ausschließlich axiale Belastung wurde der Einfluss von Torsions- und Scherbewegungen auf den Frakturspalt verhindert, sodass beide eingesetzten Titan Mesh Scaffolds der gleichen Belastung unterlagen. Jedoch führte die unterschiedliche Steifigkeit der Titan Mesh Scaffolds zu einer unterschiedlichen mechanischen Belastung im Defektspalt und somit zu einer unterschiedlichen Stimulation der Knochenformation. Andere Studien zeigten, dass Gruppen mit mehr Bewegung im 2 mm großen Frakturspalt, im Vergleich zu Gruppen mit weniger Bewegung, mehr Knorpel- und Knochenbildung, nach der Versuchszeit von neun Wochen, aufwiesen (Claes 2002). Die mechanische Belastung in dem Frakturspalt mit dem weichen Titan Mesh Scaffold war im Vergleich zu der mechanischen Belastung des steifen Titan Mesh Scaffolds größer, d.h. es befand sich mehr Bewegung im Spalt und die Stimulierung der Knochenformation war größer. Dennoch lag bei allen zwölf Tieren eine verzögerte Knochenheilung vor. Des Weiteren konnte bei einigen Tieren das Auftreten von Seromen und Lahmheiten beobachtet werden, die antibiotisch und analgetisch gut behandelbar waren. Sie könnten als Reaktion des umgebenden Weichteilgewebes auf die Dimension der AO-Platte zurückgeführt werden.

5.1.2 Titan Mesh Scaffold

Titan Mesh Scaffolds, die mit Hilfe der Laser-Sinterungstechnik hergestellt werden und gefensterter, gitterförmige 3D-Strukturen darstellen, gelten als eine vielversprechende Alternative zu Knochentransplantationen. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass

Diskussion

gitterförmige Titanimplantate in Kombination mit einer schnellen technologischen Entwicklung eine gute Alternativmethode bei der Behandlung von großen segmentalen Defekten repräsentieren und eine gute Ergänzung zu Knochenbanken, besonders bei Tumorsektionen, darstellen (Razi 2012). Der Titan Mesh Scaffold sollte idealerweise den Gewebeverlust überbrücken, die mechanische Funktion zeitweise übernehmen und biologische Faktoren für die Heilung bereitstellen (Hollister 2011). Die in der vorliegenden Studie verwendeten Titan Mesh Scaffolds überbrückten den Frakturspalt und übernahmen die mechanische Funktion, jedoch ohne die Eigenschaft biologische Faktoren bereitzustellen. Sie entsprachen in ihrer Form dem Originalknochen, sie besaßen eine Porosität, die für das Gewebewachstum von Nutzen war und zeichneten sich durch eine hohe mechanische Belastbarkeit aus. Der Titan Mesh Scaffold agierte somit als Platzhalter und verhinderte einen Vorfall von Muskel- oder Weichgewebe aus der Umgebung in den Osteotomiespalt. Er agierte auch als Leitstruktur für das wachsende Gewebe. Gibson et al. stellten fest, dass die Steifigkeit des eingesetzten Materials von Bedeutung für die Frakturheilung ist (Gibson 1997). Laut Claes et al. wird die Stabilität einer Osteosynthese ebenfalls durch die Steifigkeit des Osteosynthesematerials und der Qualität der Implantat-Knochenverbindung bestimmt (Claes 2000). Der Titan Mesh Scaffold soll eine Stabilität in die Gliedmaße bringen, sodass zum einen eine frühzeitige Gewichtsbelastung und zum anderen eine frühzeitige Funktionalität ermöglicht wird. Darüber hinaus dient er als Träger für autologe Spongiosa (Cobos 2000). Das Erfüllen dieser Eigenschaften durch die eingesetzten Titan Mesh Scaffolds konnte bestätigt werden. Wendt et al. sprachen von porösen 3D-Strukturen, die in Kombination mit körpereigenen Zellen des Patienten, in Defekte eingesetzt werden können (Wendt 2005). Mit autologer Spongiosa gefüllte Titan Mesh Scaffolds wurden bereits vermehrt in der Wirbelsäulenchirurgie genutzt. Die Implantate erwiesen sich als effektiv, sicher und stabil (Hertlein 1992, Whitecloud 1998). Diese Eigenschaften konnten ebenfalls in der vorliegenden Studie bestätigt werden. Der Titan Mesh Scaffold erwies sich als stabil und effektiv. Das Ziel des Einsetzens des Titan Mesh Scaffolds und körpereigener Zellen ist das Ersetzen des fehlenden Gewebes. Der Titan Mesh Scaffold bot mit dem eingesetzten osteogenem Material eine Leitstruktur für den wachsenden Knochen, was deskriptiv durch das Durchwachsen mit Gewebe bestätigt werden konnte. Die eingesetzte autologe Spongiosa war in der histologischen Untersuchung nicht von dem neu gebildeten Knochen zu unterscheiden und wurde demnach zur Knochenbildung genutzt. Die winkelstabile AO-Platte erlaubte darüber hinaus eine axiale Belastung des Defektspaltes. Aus anderen Studien ist bereits bekannt, dass mechanische Eigenschaften einen Einfluss auf die Knochenheilung haben (Claes 1999, Klein 2003). Der Frakturspalt sollte demnach stabil sein, gleichzeitig aber einen bestimmten Grad an Unruhe im Frakturspalt zulassen (Stürmer 1984). In der vorliegenden Studie war der Frakturspalt stabil und ließ ausreichend

Bewegung für die Stimulierung der Frakturheilung zu, führte aber dennoch in beiden Gruppen zu einer verzögerten Knochenheilung. Bei den Tieren der aktuellen Studie hatte sich der Geflechtknochen an der äußeren Scaffoldoberfläche gebildet, der stellenweise in die zentrale Pore hineinwuchs und bei insgesamt sieben Tieren zu einem partiellen Markraumschluss führte, jedoch ohne kompletten Verschluss des Frakturspalt. Andere Studien zeigten, dass Gruppen mit mehr Bewegung in einem 2 mm großen Frakturspalt, im Vergleich zu Gruppen mit weniger Bewegung im Frakturspalt, mehr Knorpel- und Knochenbildung nach einer Versuchszeit von neun Wochen, aufwiesen (Claes 2002). Durch die ausschließlich axiale Belastung wurde in der vorliegenden Studie der Einfluss von Torsions- und Scherbewegungen auf den Frakturspalt verhindert. Beide Titan Mesh Scaffolds erfuhren die gleiche mechanische Belastung. Durch ihre unterschiedlichen Steifigkeiten, wirkte jedoch eine unterschiedliche mechanische Belastung in dem Defektpalt, sodass die Stimulation der Knochenformation in den beiden Gruppen unterschiedlich war. Die Untersuchung des Knochengewebes zeigte deskriptiv eine vermehrte Bildung in dem weichen Titan Mesh Scaffold, jedoch ohne statistische Signifikanz. Den Hauptgewebeanteil in beiden Gruppen stellte das Bindegewebe dar, was als Indiz für eine verzögerte Knochenheilung angesehen werden kann. Letztendlich kann davon ausgegangen werden, dass die mechanische Belastung innerhalb des Defektpaltes insgesamt zu gering war, um die Knochenheilung ausreichend zu stimulieren.

5.1.3 Gewinnung und Applikation der autologen Spongiosa

Autologe Spongiosa wird häufig als Biofaktor und als biologische initiale Stimulation in Knochendefekte eingefügt, da sie Osteoprogenitorzellen, Knochenmatrix und Wachstumsfaktoren enthält und die Knochenheilung fördert (Mahendra 2007). Das Einfügen von autologer Spongiosa aus dem Beckenkamm, gilt bei Defekten < 4 cm als Gold Standard, wohingegen bei Defekten > 4 cm die autologe Spongiosa nicht als alleiniges Füllmaterial ausreicht (Younger 1989, Bauer 2000, Hierner 2009). Die Entnahme der autologen Spongiosa erfolgte bei allen zwölf Tieren mit einem scharfen Löffel aus dem Beckenkamm. Die Entnahmetechnik gilt als standardisiert, sie wurde bereits in anderen Studien angewandt und gleicht der Entnahmetechnik beim humanen Patienten (Schell 2008, Pobloth 2015). Die 7,5 ml der gewonnenen autologen Spongiosa wurden mit einer Knochenmühle zerkleinert und zum Schutz vor Austrocknung in einer sterilen Spritze (10 ml) bis zum Befüllen der Meshstruktur des Titan Mesh Scaffolds aufbewahrt. Gugula et al. setzten in ihrer Studie entweder eine einfache oder eine doppelte Membran in einen 40 mm großen Tibiadefekt im Schafmodell ein. Die Membranen wiesen eine unterschiedliche Porosität auf und wurden bei zwei Gruppen mit autologer Spongiosa befüllt. Die Tiere wurden über die Versuchszeit von 16 Wochen in Gurtsystemen gehalten. Ausschließlich die Tiere, bei denen die autologe Spongiosa eingesetzt wurde, zeigten eine Frakturheilung. Im Gegensatz dazu trat bei den

Diskussion

Tieren ohne autologe Spongiosa eine Non-Union auf. Aufgrund dessen wird in Studien die autologe Spongiosa, mit ihrer osteogenetischen und osteoinduktiven Potenz, zur Unterstützung der Frakturheilung eingesetzt (Gugala 1999, Gugala 1999). In der vorliegenden Studie wurde ebenfalls autologe Spongiosa in beiden Gruppen eingesetzt. Dennoch wurde bei allen Tieren eine verzögerte Knochenheilung beobachtet. Ein komplettes Ausbleiben der Knochenformation kann beim Einsatz eines Titan Mesh Scaffolds ohne autologe Spongiosa vermutet werden. In der vorliegenden Studie wurde aus tierschutzbedingten Gründen auf eine Kontrollgruppe verzichtet. Bei der Gewinnung der Spongiosa riskiert man durch den zusätzlichen Eingriff eine zusätzliche Operationswunde mit möglicher Infektion (König 2016). In der vorliegenden Studie tolerierten die Tiere den zusätzlichen Eingriff insgesamt sehr gut. Bei einem Tier der Gruppe mit dem steifen Titan Mesh Scaffold trat im Heilungsverlauf eine Beckenkamminfektion auf, die jedoch nach lokaler Behandlung mit einem Antiseptikum sowie systemischer Behandlung, mit einem Antibiotikum und einem Schmerzmittel, verheilte.

5.1.4 Entnahme und Aufarbeitung der Proben

Nach der Standzeit von 24 Wochen erfolgte die Entnahme der Tibia, mit anschließender eintägiger Fixierung in 10%-iger isotoner Formaldehyd-Alkohol-Lösung. Die an den Defekt angrenzenden Schrauben wurden zuvor entfernt, um ein Eindringen der Flüssigkeit während der eintägigen Lagerung zu erleichtern. Der Sitz der AO-Platte durfte dabei nicht verändert werden, um das noch unfixierte Gewebe nicht zu beschädigen. Nach erfolgter Fixierung wurden die Schrauben und die AO-Platte problemlos entfernt. Im Anschluss erfolgte eine viertägige Lagerung in isotoner 10%-iger Formaldehyd-Alkohol-Lösung, mit anschließendem Zersägen der Proben. Der mid-sagittale Sägeschnitt konnte mühelos zentral durch die Tibiaachse gesetzt werden. Somit entstanden zwei Tibiahälften mit dem Querschnitt durch den Titan Mesh Scaffold, zur Beurteilung des Gewebes im Titan Mesh Scaffold. Das Anfertigen eines weiteren Sägeschnittes wäre zwar möglich gewesen, jedoch war ein zentraler Schnitt entscheidend, da die Gewebeverteilung, innerhalb der Scaffoldstruts und in der zentralen Pore ausgewertet werden sollte. Wohingegen weitere Schnitte keine zentrale Übersicht zulassen und somit die Fragestellung nicht beantworten würden. Die weitere Probenaufbereitung erfolgte mit einer aufsteigenden Alkoholreihe, mit anschließender Kunststoffeinfettung. Die Gewebearbeitungsmethoden nach den vorliegenden Protokollen erwiesen sich als gut geeignet, da die Gewebeproben ausreichend fixiert und entwässert waren. Wobei sich die Probenaufbereitungsmethoden aufgrund der Probengröße etwas aufwändiger gestalteten, z.B. mussten bei der Kunststoffeinfettung Honiggläser benutzt werden. Die Gläser wurden einige Tage vor der eigentlichen Probeneinfettung vorbereitet. Dabei erfolgte das Befüllen der Böden der Gläser mit einer ca. 2 cm dicken Kunststoffschicht, um den konkaven Grund der Gläser zu ebenen. Durch den geraden Boden

konnten die Proben korrekt in PMMA eingebettet werden. Das Einbetten erfolgte nicht wie üblich mit Technovit 7200, stattdessen wurde Technovit 9100, welches zum Einbetten von metallhaltigen Schliffpräparaten besser geeignet ist, verwendet (Willbold 2013). Der Vorteil lag in der Möglichkeit einer Rückführung in MEA, falls es bei der Einbettung durch den nicht 100%-igen Luftabschluss zur fehlenden oder unzureichenden Festigkeit des Kunststoffes gekommen wäre, bzw. die Proben aufgrund ihrer Größe nicht korrekt auf dem zuvor angefertigten Kunststoffboden aufliegen würden. Keine der zwölf Proben musste in der vorliegenden Studie zurückgeführt werden. Nach der Gewinnung der Proben aus den Honiggläsern erfolgte die weitere Bearbeitung, wobei der Kunststoffblock mit Hilfe einer Säge und eines Exakt-Mikro-Schleifsystems in eine regelmäßige, auf einen Objektträger passende Form, geschliffen werden musste. Nachdem der Kunststoffblock durch weitere Schritte auf dem Objektträger fest aufgetragen war, erfolgte die weitere Bearbeitung unter Verwendung des Schleifsystems mit Schleifpapieren unterschiedlicher Stärke. Ziel war ein gleichmäßiges Präparat mit einer ca. 100 µm Dicke. Von Bedeutung war in den einzelnen Schleifschritten das Herstellen einer gleichmäßigen Oberfläche, durch genaues Abmessen festgelegter Punkte auf der Probe. Durch das Titan in den Proben musste auf eine ausreichende Kühlung der Probe geachtet werden. Darüber hinaus kam es durch das Titan zu einem erhöhten Materialverbrauch, da während des Schleifvorgangs ein regelmäßiger Wechsel des Schleifpapiers nötig war. Die Bearbeitung der Proben erfolgte, trotz der Größe und der Titanhaltigkeit der Proben, sowohl an der Säge als auch an dem Schleifsystem, komplikationslos. Insgesamt war der zentrale Sägeschnitt durch die Tibia und die Qualität der zwölf Proben für die Auswertung sehr gut geeignet.

5.1.5 Safranin Orange/von Kossa-Färbung

Da nur ein zentraler Präparatschnitt pro Tier vorhanden war, musste eine Färbemethode gewählt werden, die die zu untersuchenden Gewebearten am besten differenzierte und eine problemlose Auswertung ermöglichte. Die in dieser Studie verwendete Färbemethode erwies sich für die Differenzierung von mineralisiertem und nicht-mineralisiertem Gewebe als geeignet. Die kombinierte Safranin Orange/von Kossa-Färbung ermöglichte eine Differenzierung zwischen Knochen-, Binde- und Knorpelgewebe, da der Kontrast zwischen den einzelnen Gewebearten gut erkennbar war. Knochengewebe ließ sich schwarz und Mineralisationsfronten schwarz granuliert anfärben. Zwar stellte sich das Titanmaterial, vergleichbar zum mineralisierten Knochengewebe ebenfalls schwarz dar, konnte jedoch mikroskopisch sehr gut differenziert werden. Weitere Färbemethoden, die z.B. eine Paraffineinbettung voraussetzen, waren aufgrund des Titans nicht möglich.

Diskussion

5.1.6 Histomorphologische Auswertung

Bei der histomorphologischen Auswertung wurden die zwölf in kombinierter Safranin-Orange/von Kossa-Färbung gefärbten Präparate betrachtet und bewertet. In der vorliegenden Studie konnten Bindegewebe, Knochengewebe und Knorpelgewebe differenziert und dokumentiert werden. Die Titan Mesh Scaffoldstruts waren problemlos identifizierbar und intakt. Eine Integration des eingesetzten Titan Mesh Scaffolds und eine Nutzung der Scaffoldstruts von dem Knochengewebe als Leitstruktur wurde beobachtet. Deshalb kann der Titan Mesh Scaffold als Leitstruktur in der Knochenheilung eingesetzt werden. Merkmale einer möglichen Infektion im Frakturspalt wurden in allen zwölf Präparaten ausgeschlossen.

5.1.7 Histomorphometrische Auswertung

Die histomorphometrische Betrachtung der Gewebeflächen des Osteotomiespaltess stellte eine Standardauswertung dar und wurde bereits in anderen Studien angewandt (Schell 2008, Peters 2010, Poblath 2016). Das Einzeichnen der einzelnen Gewebeflächen der zwölf in kombinierter Safranin Orange/von Kossa-Färbung gefärbten Präparate der vorliegenden Studie, erwies sich, ebenso wie das qualitative und quantitative Erfassen der Gewebearten mit Hilfe der Auswertungssoftware Image J, als problemlos. Die Software erfasste gleiche Farbpixel und gab jene als Flächen in mm², die anschließend in prozentuale Werte umgerechnet wurden, an. Die Methode erwies sich insgesamt als geeignet, da die zu untersuchenden Gewebeflächen ermittelt werden konnten, wohingegen Leerflächen, die Artefakte der Gewebeaufbereitung enthielten sowie Bereiche ohne Gewebe, ausgeschlossen werden konnten. Der Ausschluss der Titanfläche aus der Berechnung der Grundfläche erfolgte ebenfalls komplikationslos. Unter Verwendung der Auswertungssoftware (SPSS Statistics® 18) folgte anschließend die Digitalisierung der zwölf Präparate. Der Einsatz der Auswertungssoftware erwies sich ebenfalls als geeignet bei der Beurteilung der vorliegenden Präparate.

5.2 Diskussion der Ergebnisse

5.2.1 Röntgen

Röntgenaufnahmen werden standardmäßig in Studien durchgeführt und dienen zum einen der Kontrolle der eingesetzten Materialien und zum anderen der Beurteilung der Knochenformation (Schell 2008, Poblath 2015). In der vorliegenden Studie wurden die standardisierten Röntgenaufnahmen, während der 24-wöchigen Versuchszeit, monatlich in latero-lateraler und anterior-posteriorer Ausrichtung angefertigt. Cobos et al. untersuchten zwei klinische Tibiadeфекte, bei denen Titan Mesh Cages in Kombination mit einem

intramedullären Nagel eingesetzt wurden. Die einjährigen röntgenologischen Kontrollen zeigten in beiden Fällen eine hervorragende Ausrichtung der Gliedmaße, eine Stabilität und auch eine Knochenbildung (Cobos 2000). In der vorliegenden Studie dienten die Röntgenkontrollen ebenfalls der Kontrolle der Stabilität und der Ausrichtung der Gliedmaße sowie dem Sitz der AO-Platte, des Titan Mesh Scaffolds und der eingesetzten Schrauben. Die Röntgenaufnahmen wurden im Stall mit einem mobilen Röntgengerät angefertigt. Dabei erwies sich das vorherige Training und Handling der Schafe im Gurtsystem als obligatorisch, denn das Anfertigen der Röntgenaufnahmen verlief komplikationslos und stressfrei für die Tiere. Die Kallusformation war in den anterior-posterioren Aufnahmen als röntgendichte Verschattung auf der Oberfläche des Titan Mesh Scaffolds sichtbar. Mineralisierter Knochen ist röntgenologisch ab einer Dichte von 30 % darstellbar (Radasch 1999). Daraus lässt sich schließen, dass bei den Tieren der vorliegenden Studie, bei denen eine Kallusformation zu beobachten war, eine mindestens 30%-ige Knochendichte vorhanden sein musste und aufgrund dessen der Kallus trotz der Überstrahlung der Titanplatte zu erkennen war. Sie konnte jedoch aufgrund der Überstrahlung des Titans nicht zur Beurteilung der Kallusformation innerhalb der zentralen Scaffoldpore herangezogen werden. Ein ähnliches Ergebnis konnte auch bei Lindsey et al. beobachtet werden. Sechs unterschiedliche klinische Fälle, die jeweils mit einem Titan Mesh Scaffold behandelt wurden, zeigten in den Röntgenaufnahmen eine Kallusformation lediglich entlang der Titan Mesh Scaffoldoberfläche. Innerhalb des Cages wurde keine Kallusformation beobachtet, was sich in der histologischen Untersuchung widerlegen ließ (Lindsey 2006). Reynders et al. setzten einen Titan Mesh Scaffold in einen elf Zentimeter großen Femurdefekt ein und konnten eine Knochenformation entlang der Titan Mesh Struktur nachweisen, auch in diesem Fall konnte ein Knochenwachstum in der zentralen Pore röntgenologisch nicht beobachtet werden (Reynders 2003). Auch in der vorliegenden Studie war die Knochenbildung aufgrund der röntgenologischen Dichte des eingesetzten Materials nur eingeschränkt beurteilbar. Mineralisiertes Knochengewebe konnte dennoch bei insgesamt sieben Tieren vermutet werden, jedoch nur auf der lateralen Seite, da sich auf der medialen Seite die AO-Platte befand. Auf den latero-lateralen Röntgenaufnahmen konnten an der ersten proximalen Schraube bei jeweils drei Tieren jeder Gruppe, in der 8. Woche nach der Operation, eine geringgradige Aufhellung, die im weiteren Versuchsverlauf deutlicher wurde, dokumentiert werden. An der Schraube wurde eine Osteolyse vermutet, die jedoch zu keinem Verlust sowie zu keiner Lockerung der Schraube führte. Das in der ersten Woche gestürzte und ausgeschiedene Tier der Gruppe mit dem weichen Titan Mesh Scaffold erlitt einen Bruch an der ersten proximalen Schraube. Es könnte somit die Vermutung aufgestellt werden, dass die erste proximale Schraube insgesamt eine größere Gewichtsbelastung trägt und somit prädestiniert für mögliche Osteolysen oder Brüche war. Da die Aufhellung bei den anderen

Diskussion

Tieren ausblieb und bei keinem der zwölf Tiere eine Lockerung sowie ein Bruch der Schraube festgestellt worden ist, konnte die Vermutung nicht bestätigt werden. Die angefertigten Faxitronaufnahmen gingen nicht in die Bewertung ein, da die Knochenformation aufgrund der Überstrahlung des Titans nicht beurteilbar war. Insgesamt konnte in der vorliegenden Studie gezeigt werden, dass eine ausschließlich röntgenologische Auswertung nicht ausreicht, um die Knochenbildung innerhalb der zentralen Pore des Titan Mesh Scaffolds zu beurteilen, sodass die histologische Untersuchung unerlässlich war, um weitere Aussagen treffen zu können.

5.2.2 Histomorphologie und Histomorphometrie

Nach einer 24-wöchigen Standzeit konnte bei allen zwölf Tieren die Bildung von Geflechtknochen im Osteotomiedefekt dokumentiert werden. Eine unilaterale Überbrückung des Osteotomiespaltes mit mineralisiertem Knochengewebe trat bei jeweils zwei Tieren beider Gruppen auf. Histomorphologisch zeigte sich der neu gebildete Geflechtknochen bei allen vier Tieren auf der lateralen AO-Platte fern der Defektseite. Die mechanische Belastung auf den Defekt war auf der lateralen Defektseite höher als auf der medialen Defektseite, was lateral zu mehr Bewegung sowie zu einer stärkeren mechanischen Stimulation führte und damit die Kallusbildung verstärkte. Claes et al. untersuchten in einem 20 mm großen Defekt im rechten Metatarsus von zehn Schafen die Auswirkungen von axialer Bewegung in einem Versuchszeitraum von neun Wochen. Das Ergebnis zeigte eine vermehrte Faserknorpelbildung bei mehr Bewegung im Osteotomiespalt und mehr Knochenbildung mit größerer Vaskularisierung, bei weniger axialer Bewegung (Claes 2002). Auch in der vorliegenden Studie lag eine axiale Bewegung vor, dabei war die Bewegung ausreichend, um eine Knochenbildung in beiden Gruppen zu stimulieren. Durch die auftretende Unilateralität kann davon ausgegangen werden, dass die unterschiedliche Steifigkeit beider Titan Mesh Scaffolds zu einer unterschiedlichen mechanischen Belastung im Spalt und damit zu einer unterschiedlichen Stimulation der Kallusformation führte. Andere Versuche bestätigten ebenfalls eine Kallusbildung beim Einsatz eines Titan Mesh Scaffolds in Kombination mit autologer Spongiosa. Eine standardisierte Studie wurde von Teixeira et al. durchgeführt (Teixeira 2007). Sie setzten in einen 35 mm großen Tibiadeфекt bei vier bis fünf Monate alten Schafen einen, mit autologer Spongiosa oder Schafknochen zusammen mit morphogenetischen Proteinen, gefüllten Titancage ein. In beiden Gruppen konnte nach 60 bis 90 Tagen post operativ röntgenologisch eine Kallusformation festgestellt werden. Nach 90 Tagen durchgeführte histologische und histomorphologische Untersuchungen bestätigten die Kallusbildung, das eingesetzte Material überwog jedoch im Vergleich zum neu gebildeten mineralisierten Knochen. In der vorliegenden Studie fand ebenfalls eine Kallusbildung statt, das neu gebildete Knochengewebe konnte jedoch nicht von der autologen Spongiosa unterschieden werden. Des Weiteren hatte sich in der Gruppe mit dem weichen Titan Mesh

Scaffold im Vergleich zu der Gruppe mit dem steifen Titan Mesh Scaffold histomorphologisch mehr mineralisiertes Knochengewebe gebildet. Die histomorphometrische Auswertung hingegen bestätigte dieses Ergebnis nicht. Im Vergleich der Gesamt-ROIs beider Gruppen ergab sich kein statistisch signifikanter Unterschied. Aus der Literatur ist bekannt, dass die Steifigkeit des eingesetzten Implantats einen Einfluss auf die Knochenheilung hat (Wu 1984, Goodship 1993). Die Titan Mesh Scaffolds beider Gruppen waren strukturell gleich und erfuhren durch die AO-Platte die gleiche mechanische Belastung. Sie unterschieden sich jedoch in ihrer Steifigkeit. Unklar war, inwieweit die mechanischen Eigenschaften von Titan Mesh Scaffolds optimiert werden können, um das Gewebewachstum zu stimulieren und dennoch mechanisches Versagen zu verhindern. Andere Studien befassten sich ebenfalls mit den Steifigkeitsverhältnissen in Frakturspalten (Richardson 1992, Shah 1995, Claes 2002). Die Modifikation der Steifigkeit wurde von Razi et al. mit dem Ergebnis, dass eine Umwandlung des Strebendiameters zu einer Veränderung der mechanischen Eigenschaften führt, untersucht (Razi 2012). In der vorliegenden Studie bewirkte die unterschiedliche Steifigkeit der Titan Mesh Scaffolds, im Vergleich der beiden Gruppen, histomorphologisch einen Unterschied in der Gewebezusammensetzung im Defektspalt. Die Hypothese, dass eine mechanisch-biologische Optimierung des Titan Mesh Scaffolds zu einer Förderung der endogenen Knochendefektregeneration führt, konnte deskriptiv vermutet werden, da in der Gruppe mit dem weichen Titan Mesh Scaffold mehr Knochengewebe zu beobachten war, wohingegen in der Gruppe mit dem steifen Titan Mesh Scaffold die Knorpel- und Bindegewebsfläche größer war. Jedoch ließ sich diese Beobachtung histomorphometrisch nicht bestätigen. Die Knochenbildung innerhalb der zentralen Pore, die am humanen Patienten nicht problemlos untersuchbar ist, konnte histologisch bei jeweils zwei Tieren beider Gruppen großflächig in der zentralen Pore beschrieben werden. Die histomorphometrische Auswertung der Markraum-ROI zeigte jedoch keine statistisch signifikanten Unterschiede in beiden Gruppen. Der gebildete Kallus verlief in beiden Gruppen überwiegend zwischen den Titanstruts. Durch die so entstandene Integration der Titanstruts konnte die Funktion des Titan Mesh Scaffolds als Leitstruktur für die Knochenbildung bestätigt werden. Somit kann die Aussage getroffen werden, dass der Kallus bevorzugt den Titanstruts folgt, anstatt innerhalb der zentralen Pore ohne Leitstruktur zu wachsen.

Der Einsatz eines Titan Mesh Scaffolds erfolgte auch in einen 30 mm großen Defekt im Femur von adulten Hunden (Lindsey 2006). Der Titan Mesh Scaffold wurde sowohl mit autologer Spongiosa als auch mit demineralisierter Knochenmatrix gefüllt und mit einem intramedullären Titan Nagel stabilisiert. Die Kontrollgruppe bekam keinen Titan Mesh Scaffold eingesetzt. Bei den Tieren mit dem eingesetzten Titan Mesh Scaffold war im Gegensatz zur Kontrollgruppe eine biologische Aktivität im Cage und neuer Knochen im Defekt erkennbar. Der Titan Mesh Scaffold erwies sich, mit seinem porösen Design, seiner Stabilität und der

Diskussion

Fähigkeit Biomaterial zu beinhalten, als geeignetes biokompatibles Implantat. Hollister et al. untersuchten verschiedene poröse 3D Scaffolds bestehend aus unterschiedlichen Materialien und trafen die Aussage, dass ein idealer Scaffold die Funktionalität der weichen und der harten Gewebestrukturen gewährleisten sollte sowie für eingefügte Biofaktoren geeignet sein müsste (Hollister 2011). Auch in dieser Studie wurden die Eigenschaften der autologen Spongiosa, die Knochenbildung zu fördern genutzt und die Eigenschaft der eingesetzten Titan Mesh Scaffolds als Träger von Biofaktoren bestätigt. Das histologische Präparat des nach der ersten Woche ausgeschlossenen Tieres wurde als Vergleichsprobe herangezogen. In dem Präparat war neben der eingesetzten autologen Spongiosa ein Hämatom erkennbar. Das Auftreten des Hämatoms in dem Präparat sprach, wie aus anderen Studien bereits bekannt, für eine Immunantwort und zeigte deutlich den Anfang des Heilungsprozesses (Schmidt-Bleek 2009, Schmidt-Bleek 2012, Schmidt-Bleek 2015). Aus dem Hämatom entsteht anschließend granuliertes Gewebe (Willenegger 1971), welches den weichen Kallus darstellt, in dem sich das neu gebildete Kallusgewebe aus dem Periost und dem Endost entwickelt (Einhorn 1998).

Bei den anderen zwölf Präparaten war nach 24 Wochen kein Hämatom mehr vorhanden und eine Unterscheidung der eingesetzten autologen Spongiosa zum neu gebildeten Knochengewebe war ebenfalls nicht mehr möglich. Osteoblasten und Osteoid waren histologisch deutlich differenzierbar. Osteoblasten treten im Geflechtknochen auf und synthetisieren während der aktiven Knochenbildung eine neue Schicht von unmineralisiertem Osteoid (Noble 2000), welches sich histologisch als rote Schicht auf dem mineralisierten Knochen darstellte. Es kann die Aussage getroffen werden, dass die Knochenbildung in den Präparaten unter Nutzung der autologen Spongiosa zu dem Untersuchungszeitpunkt aktiv voranschritt. Ein weiteres Zeichen für die aktive Knochenheilung war das Auftreten von hyalinem Knorpel. Hyaliner Knorpel konnte in geringer Menge bei fünf Tieren der Gruppe mit dem weichen und vier Tieren der Gruppe mit dem steifen Titan Mesh Scaffold, als Zeichen einer aktiven enchondralen Ossifikation, beobachtet werden. Histologisch war er durch seine morphologische Erscheinung, wie auch von Marsell et al. beschrieben, mit der Gliederung in Chondrone und teilweise mineralisierte Interterritorien, gut vom umliegenden Knochen und Bindegewebe abgrenzbar (Marsell 2011). Der Knorpel trat in beiden Gruppen, ähnlich wie das Knochengewebe, vorwiegend auf der lateralen Präparatseite auf. Es wurde bereits beschrieben, dass die mechanische Eigenschaft des Knorpelgewebes stark bewegliche Frakturdefekte zu stabilisieren, auf seiner Druckfestigkeit und der entsprechenden Druckelastizität beruht (Weyrauch 1998). Da auf der lateralen Defektseite mehr Bewegung erzeugt wurde als auf der medialen Defektseite, befand sich folglich mehr Knorpelgewebe auf der lateralen Seite. Es fiel auf, dass das Knorpelgewebe bevorzugt zwischen den Titan Mesh Struts auftrat und im Markraum nicht

nachweisbar war. Daraus resultiert, dass die Knorpelformation ebenfalls dem Titan Mesh Scaffold als Leitstruktur folgte. Des Weiteren konnte beobachtet werden, dass der neu gebildete hyaline Knorpel histomorphologisch vermehrt in der Gruppe mit dem steifen Titan Mesh Scaffold auftrat, wahrscheinlich weil die Knochenformation in der Gruppe mit dem weichen Titan Mesh Scaffold aufgrund der höheren Bewegung im Fraktuspalt, vorangeschrittener war als in der Gruppe mit dem steifen Titan Mesh Scaffold. Dieses Ergebniss konnte jedoch nicht histomorphometrisch bestätigt werden.

Der Schlüssel zu einer erfolgreichen Heilung und Regeneration einer Fraktur ist die Revaskularisierung des Gewebes, da Gefäße während der Osteotomie beschädigt werden. Dazu zählt zum einen die Revaskularisierung im Osteotomiedefekt, aber auch die Vaskularisierung des, den Osteotomiespalt umgebenden Weichteilgewebes. Die medullären Gefäße, die bei der Osteotomie durchtrennt wurden, werden laut Stürmer et al. ab der vierten bis fünften Woche wiederhergestellt (Stürmer 1984). Eine Vaskularisierung innerhalb der Präparate war deskriptiv zu beobachten, was ein Zeichen einer erfolgreichen Regeneration ist, jedoch wurden sie aufgrund der Größe des Präparates nicht weiter dokumentiert und ausgewertet. Die vermehrte Kallusbildung auf der lateralen Defektseite der aktuellen Studie könnte wahrscheinlich durch die bessere Vaskularisierung des umgebenden Muskel- und Weichgewebes auf der AO-Platte-freien Tibiaseite bedingt sein. In der Studie von Gugula et al. zeigte sich ebenfalls eine verstärkte Kallusbildung an der lateralen Kortikalis. Sie gingen davon aus, dass dieser Effekt durch die bessere Vaskularisierung hervorgerufen wurde, bedingt durch die Abdeckung mit Weichgewebe an der lateral Seite der Gliedmaße, als durch einen mechanischen Stimulus in diesem Bereich (Gugala and Gogolewski 1999). In der vorliegenden Studie erwies sich der Einsatz eines Titan Mesh Scaffolds in Kombination mit einer AO-Platte für einen 40 mm großen Defekt als eine geeignete Methode, da sich das umliegende Weichteilgewebe optimal erholte und die Funktionalität der Tibia gewährleistet war. Das Weichteilgewebe bot zusätzlich eine Stabilität für den Titan Mesh Scaffold, der durch diese Stabilisierung in seiner Position im Defektbereich unterstützt wurde. Darüber hinaus liegt eine höhere Knochenheilung vor, je geringer die Beschädigung des umliegenden Weichteilgewebes ist, da dadurch die Infektionsrate reduziert wird (Perry 1999). Die in dieser Studie gesetzte Osteotomie besaß nur eine geringe Weichteilverletzung, was sich demnach positiv auf die Knochenheilung auswirkt. Rhineland et al. konnten zusätzlich zeigen, dass eine unzureichende Stabilität im Osteotomiespalt zur Zerstörung der Gefäße und folglich zu einer verzögerten Heilung mit vermehrter Bildung von Faserknorpel führt (Rhineland 1974). In der vorliegenden Studie wurde die Stabilität durch die auf der medialen Tibiaseite eingebrachte AO-Platte gewährleistet, sodass die Gefäße hineinwachsen konnten und nicht durch übermäßige interfragmentäre Bewegungen, vergleichbar mit der Studie von Schell et al.,

im Osteotomiespalt beschädigt wurden (Schell 2008). Dennoch kann aufgrund der verzögerten Heilung davon ausgegangen werden, dass die Aufhebung der Bewegung im Frakturspalt durch die AO-Platte insgesamt zu groß war. Lockeres Bindegewebe trat in beiden Gruppen sowohl zwischen den Struts als auch im Markraum auf und stellte in allen Präparaten den Hauptgewebeanteil dar und könnte als ein Hinweis auf eine Non-Union gedeutet werden. Eine komplette Defektüberbrückung konnte bei keinem der zwölf Tiere nach 24 Wochen dokumentiert werden. Eine vollständige Überbrückung des Osteotomiedefektes nach weiteren drei Monaten war in der vorliegenden Studie eher fraglich, sodass nach sechs bis neun Monaten von einer Non-Union ausgegangen werden kann (Rodriguez-Merchan 2004). In beiden Gruppen trat deskriptiv bei jeweils einem Tier auf der medialen Präparatseite ausschließlich lockeres Bindegewebe, als Zeichen einer Non-Union, auf. Eine histomorphometrische Bestätigung konnte jedoch nicht getroffen werden, da sowohl in der Lateralen ROI als auch der Lateralen Struts-ROI keine statistische Signifikanz vorlag. In der Literatur geht man beim Schaf von einer Knochenheilung innerhalb von sechs bis acht Wochen aus (Wu 1984). Beim Menschen spricht man laut Runkel et al. von einer verzögerten Heilung, die zu einer Pseudarthrose führen wird, wenn nach sechs Monaten keine knöcherne Überbrückung stattfindet und keine aktiven Heilungsprozesse nachweisbar sind (Runkel 2000). Die Definition von zeitlichen Abläufen ist zwar schwierig, jedoch sollte beim Schaf eine Knochenheilung mit kompletter Überbrückung nach 24 Wochen zu erwarten sein. In der vorliegenden Studie ist eine komplette Überbrückung nicht zu beobachten, sodass man von einer verzögerten Heilung sprechen kann. Dennoch sind im Kallusgewebe Anzeichen einer aktiven Knochenheilung erkennbar, sodass eine abschließende Aussage über den weiteren Heilungsverlauf nach einer längeren Versuchszeit nicht getroffen werden.

5.2.3 Vergleich mit anderen Studien

Seit Jahren werden Alternativen bei der Behandlung von Defekten kritischer Größe in der Medizin erforscht und zunehmend genutzt (Lasanianos 2009). Dazu gehört auch der Einsatz von Titan Mesh Scaffolds. Cobos et al. setzten in zwei klinischen Fällen einen Titan Mesh Scaffold ein (Cobos 2000). Es handelte sich bei beiden Patienten um eine ca. 90 mm große Tibiafraktur. In beiden Fällen begann der Patient nach fünf Tagen die Gliedmaße mit Hilfe einer Stütze teilweise zu belasten. Nach sieben Tagen wurden die Patienten entlassen und konnten die Gliedmaße nach drei Monaten, mit Hilfe einer Schiene, voll belasten. Röntgenaufnahmen des ersten Patienten ein Jahr post operativ zeigten eine vollständige Integration des Titan Scaffolds und eine Kallusbildung auf der lateralen Seite. Rekonstruktionen, die anhand von computertomographischen Aufnahmen angefertigt wurden, zeigten regelmäßigen Kallus im Titan Mesh Scaffold. Der zweite Patient wurde nach fünf Monaten post OP erneut operiert, dabei konnte der eingesetzte Scaffold untersucht werden. Er war ebenfalls integriert und komplett mit Kallus durchwachsen. Bei beiden

Patienten war die operierte Gliedmaße vollkommen funktionsfähig und vollständig belastbar. In der klinischen Fallbeschreibung von Attias et al. wurde der Einsatz eines Titan Mesh Scaffolds in einen 80 mm großen Humerusdefekt beschrieben, mit dem Ergebnis, dass der eingesetzte Titan Mesh Scaffold zu einer guten Ausrichtung der Gliedmaße und zum Knochenwachstum entlang der Struktur führte (Attias 2005). Die Auswertungen der genannten Studien zeigten zwar positive Ergebnisse bei dem Einsatz von Titan Mesh Scaffolds, ließen jedoch keinen Verzicht der Durchführung einer standardisierten Kontrollstudie zu. Bei einer 61-Jährigen Patientin in der Unfallchirurgie der Charité wurde eine Non-Union einer Femurfraktur, die zuvor mit dem Einsatz eines intramedullären Nagels therapiert wurde, mit synthetischem Knochenmaterial in Kombination mit einem Plattensystem behandelt (Pobloth 2018, Pobloth 2018). Nach 16 Monaten lag dennoch eine Non-Union vor. Zunächst wurde, nach Durchführung einer Sequestrektomie, ein Cementspacer mit einer LISS Platte eingesetzt. Nach weiteren vier Monaten wurde schließlich ein patientenspezifischer Titan Mesh Scaffold mit autologer Spongiosa in Kombination mit einer Condylar Platte eingesetzt. Röntgenologische Kontrollen zeigten zwei Monate nach der Operation eine Knochenintegration in den Titan Mesh Scaffold und die Bildung von knöchernen Kallus auf der Scaffoldoberfläche. Zwölf Monate post operativ konnte eine dicke mineralisierte Kallusformation auf der Scaffoldoberfläche erkannt werden. Eine Knochenintegration in der zentralen Pore des Titan Mesh Scaffolds wurde vermutet. 28 Monate post operativ konnte eine knöcherne Überbrückung des Defektes auf der Scaffoldoberfläche dokumentiert werden. Die Knochenformation in der zentralen Pore konnte erneut nicht untersucht werden, die vorliegenden röntgenologischen Ergebnisse ließen jedoch eine verbesserte Kallusbildung in der zentralen Pore vermuten. Lindsey et al. beschrieben in sechs klinischen Fällen den Einsatz von patientenspezifischen Titan Mesh Scaffolds in unterschiedlich große Knochendefekte (Lindsey 2006). Sie schlussfolgerten, dass ein zylindrischer Titan Mesh Scaffold eine innovative und effiziente Methode zur Behandlung von großen Knochendefekten in langen Knochen darstellt. Neben der Wirtschaftlichkeit dieser Methode, wird eine sofortige Stabilität und eine sofortige Gewichtsbelastung der Gliedmaße erreicht. Die Wiederherstellung der Funktionalität und der Ausrichtung der Gliedmaßen sowie eine vorhandene Knochenheilung in großen Tibiadefekten wurde ebenfalls in vorherigen Befundberichten beschrieben (Cobos 2000). Die Ergebnisse wurden auch in späteren erfolgreichen Studien mit großen Tibiadefekten bestätigt (Ostermann 2002). In der Unfallchirurgie der Charité wurde bei einem männlichen 45-Jährigen Patienten ein patientenspezifischer Titan Mesh Scaffold nach einer Femurfraktur, mit vorherigem Einsatz eines Cementspacers, eingesetzt. Der Patient stürzte acht Monate nach der Operation und erlitt ein Scaffoldversagen, woraufhin der Titan Mesh Scaffold entfernt werden musste. Ein zentrales Schliffpräparat wurde daraufhin angefertigt

und untersucht. Auf der Titan Mesh Scaffoldoberfläche konnte mineralisierter Knochen festgestellt werden, jedoch nicht in der zentralen Pore des Titan Mesh Scaffolds. In der zentralen Pore des Titan Mesh Scaffolds waren vaskularisiertes Bindegewebe und Reste von autologer Spongiosa sichtbar (Pobloth 2018). Reynders et al. setzten einen Titan Mesh Scaffold in einen elf Zentimeter großen Femurdefekt ein und konnten eine Knochenformation entlang der Titan Struktur nachweisen, jedoch ebenfalls ohne Knochenwachstum in der zentralen Pore (Reynders 2003). In der vorliegenden Studie war eine Stabilität des Frakturspaltes, mit sofortiger und vollständiger Belastbarkeit der Gliedmaße, gegeben. Röntgenologisch ließ sich das Knochenwachstum auf der Titan Mesh Scaffoldoberfläche vermuten. Durch die Überstrahlung des Titans erwies sich eine Auswertung des Knochenwachstums innerhalb der Scaffoldpore als schwierig. Die histologische Auswertung bestätigte das Knochenwachstum bevorzugt entlang der Titanstruts und zeigte ebenfalls kein durchgängiges Knochenwachstum durch die zentrale Pore.

5.2.4 Schlussfolgerung

Der Einsatz eines weichen und eines 3,5-fach steiferen Titan Mesh Scaffolds in Kombination mit einem experimentellen winkelstabilen Plattensystem erwies sich als eine adäquate Behandlungsmethode für einen kritischen Defekt von 40 mm Größe im Schafmodell.

Die Platte hatte ein experimentelles Design, war allgemein arretierend, ließ eine axiale Belastung zu und war speziell für das Schaf entwickelt worden. Sie zeichnete sich darüber hinaus durch ihre Stabilität aus. Die Tiere waren in der Lage die Gliedmaße am Operationstag vollständig zu belasten und konnten durch das Vermeiden der Haltung in einem permanenten Gurtsystem sowie durch den Verzicht auf weitere Stabilisierungsmaßnahmen, wie einen langfristigen Verband, artgerecht in Kleingruppen gehalten werden. Bei keinem der zwölf Versuchstiere konnte ein Plattenversagen beobachtet werden. Das Auftreten eines Seroms bei insgesamt sieben Tieren ließ sich auf die Dimension der Platte zurückführen und war bei den Tieren rückläufig nach der Behandlung mit einem kurzzeitigen Verband in Kombination mit einem Analgetikum. Das Auftreten der Stützbeinlahmheiten bei insgesamt drei Tieren war ebenfalls auf die Dimension der AO-Platte zurückzuführen und wurde als Symptom der verzögerten bzw. der ausbleibenden Heilung gewertet. Sowohl die Serome als auch die Lahmheiten konnten erfolgreich behandelt werden. Das experimentelle Plattensystem kann in weiteren Modellen mit Knochendefekten kritischer Größe an Schafen eingesetzt werden, in denen Implantate mit einer axialen Belastung untersucht werden sollen.

Die vorliegende Studie untersuchte darüber hinaus, ob eine mechanisch-biologische Optimierung des Titan Mesh Scaffolds zu einer Förderung der endogenen Knochendefektregeneration führt. Insgesamt erwies sich die röntgenologische Bewertung der Kallusbildung und -entwicklung in dem Osteotomiedefekt, durch die hervorgerufene

Streustrahlung des eingesetzten Titans, als erschwert, dennoch sind röntgenologische Kontrollaufnahmen unerlässlich. Das Anfertigen der Röntgenaufnahmen wurde von den Tieren insgesamt gut toleriert. Die Anfertigungsmethode der histologischen Präparate sowie die eingesetzte Färbemethode erwies sich als geeignet für 40 mm große titanhaltige Proben. Die Integration der eingesetzten autologen Spongiosa bei der Kallusbildung konnte bestätigt werden. Von einer verzögerten Knochenheilung (delayed-union) spricht man, wenn es nach fünf bis acht Monaten zu keinem Frakturverschluss gekommen ist und von einem Ausbleiben der Defektheilung ausgegangen werden kann (Blick 1989; Schell 2008). Im Rahmen dieser Studie kam es demnach definitionsgemäß zu einer verzögerten Defektheilung im Osteotomiebereich, da eine Pseudarthrose beim Schaf durch das Ausbleiben einer Frakturüberbrückung nach sechs Monaten definiert ist (Schell, Thompson et al. 2008). Insgesamt kann in dieser Studie von einer verzögerten Defektheilung ausgegangen werden, da es bei allen Tieren histomorphometrisch zwar zu einer Kallusbildung kam, jedoch ohne kompletten Defektschluss. Die eingesetzte experimentelle Platte war zu rigide, wodurch Scher- und Torsionskräfte ausblieben, die neben einer erhöhten mechanischen Stimulation für die Knochenheilung notwendig sind. Den Hauptgewebeanteil stellte das Bindegewebe dar, welches ebenfalls für eine verzögerte Heilung sprach. Die histologische Beobachtung von Osteoblasten, Osteoid und hyalinem Knorpel sowie die Vaskularisierung deuteten auf eine weiterhin aktive Knochenheilung hin. Somit liegt zwar eine verzögerte Knochenheilung vor, die jedoch noch aktiv ist, sodass eventuell nach einem länger gewählten Versuchszeitpunkt eine komplette Defektüberbrückung denkbar wäre. Innerhalb des Defektes konnte die laterale und mediale Defektseite verglichen werden. Auf der lateralen AO-Platte fernen Seite konnte deskriptiv mehr Knochengewebe beobachtet werden, was aufgrund der höheren mechanischen Belastung auf der lateralen Seite zurückzuführen ist. Der Vergleich beider Titan Mesh Scaffolds zeigte deskriptiv mehr Knochenbildung in dem weichen Titan Mesh Scaffold, was ebenfalls durch die höhere Stimulation der Knochenformation durch die erheblichere mechanische Belastung im Implantat resultierte. Die Hypothese, dass eine Optimierung der mechanischen Eigenschaften zu einer vermehrten Kallusbildung führt, konnte histomorphologisch bestätigt werden, jedoch unterschieden sich die histomorphometrischen Ergebnisse beider Gruppen nicht statistisch signifikant. Beim Einsatz der in dieser Studie untersuchten Titan Mesh Scaffolds am humanen Patienten würde man ein anderes Plattenmodell wählen. Daher wurden die beiden Titan Mesh Scaffolds in Kombination mit einem klinischen Plattensystem im Schafmodell untersucht. In der Studie von Pobloth et al. erhielten die zwölf Versuchstiere einen Gipsverband, um die operierte Tibia zusätzlich zu immobilisieren und eine Teilbelastung zu simulieren (Pobloth 2018). Die radiologische und histologische Auswertung der Studie mit dem klinischen Plattensystem zeigte eine deutlich höhere endochondrale Ossifikation. Die

Diskussion

knöchernen Osteotomiedefektüberbrückung im Röntgen war im Heilungsverlauf zu einem früheren Zeitpunkt erkennbar. Histologisch wurde eine unilaterale knöchernen Defektüberbrückung bei deutlich mehr Tieren nach einer Versuchszeit von 24 Wochen bestätigt.

Zusammenfassung

Die Behandlung segmentaler Knochendefekte kritischer Größe, die durch Traumata, Tumorsektion oder Infektionen hervorgerufen werden, sowie die mechanobiologische Wiederherstellung der Gliedmaße, stellen nach wie vor eine Herausforderung in der Unfallchirurgie dar. Aufgrund dessen werden alternative Behandlungsmethoden von kritischen Knochendefekten zunehmend erforscht. Mit Hilfe der Laser-Sinterungstechnik hergestellte dreidimensionale Titan Mesh Scaffolds stellen eine vorteilhafte Alternativmethode zu den bekannten „Gold Standards“ dar und ließen beim klinischen Einsatz am humanen Patienten vielversprechende Rückschlüsse zu. In der vorliegenden Studie wurden mittels der Laser-Sinterungstechnik zwei Titan Mesh Scaffolds hergestellt, die strukturell gleich waren, sich jedoch in ihren Steifigkeiten voneinander unterschieden. Die Titan Mesh Scaffolds besaßen eine Honigwabenform und bildeten ein makro-poröses Netzwerk mit einer zentralen Pore. Durch die Veränderung des Strebendurchmessers der Titan Strut Elemente, entstanden zwei Titan Mesh Scaffolds mit unterschiedlichen Steifigkeiten. In der vorliegenden Studie erfolgte die Durchführung der 40 mm großen Osteotomie an der Tibia von zwölf Merino-Mix-Schafen. Es wurden zwei Gruppen mit jeweils sechs Tieren gebildet. In der einen Gruppe wurde der weiche Titan Mesh Scaffold mit einem Strebendiameter von 1.2 mm mit 0,84 GPA eingesetzt und bei der anderen Gruppe der 3,5-fach steife Titan Mesh Scaffold mit einem Strebendiameter von 1.6 mm mit 2,88 GPa eingesetzt. Die mit autologer Spongiosa befüllten Titan Mesh Scaffolds wurden in Kombination mit einem experimentellen winkelstabilen Plattensystem (AO-Platte), welches ausschließlich eine axiale Belastung der Gliedmaße zuließ, in den kritischen Osteotomiedefekt von 40 mm Größe in die Schafstibia eingesetzt. Während der Versuchszeit von 24 Wochen wurden monatliche Röntgenkontrollen durchgeführt. In der 24. Woche wurden ex vivo zusätzlich zu den konventionellen Röntgenaufnahmen, Aufnahmen im Faxitron angefertigt. Histologische und histomorphometrische Untersuchungsergebnisse wurden erfasst und evaluiert.

Der Einsatz des weichen und des 3,5-fach steiferen Titan Mesh Scaffolds in Kombination mit der experimentellen winkelstabilen AO-Platte erwies sich als eine adäquate Stabilisierungsmethode für einen kritischen Defekt von 40 mm Größe im Schafmodell. Die Hypothese, dass eine mechanisch-biologische Optimierung des Titan Mesh Scaffolds zu einer Förderung der endogenen Knochendefektregeneration führt, konnte histomorphologisch vermutet werden, da der Einsatz des weicheren Titan Mesh Scaffolds deskriptiv zu einer vermehrten Kallusbildung im Vergleich zu dem steiferen Titan Mesh Scaffold, zu beobachten war. Das Ergebnis konnte histomorphometrisch nicht bestätigt werden, da im Vergleich der beiden Gruppen kein statistisch signifikanter Unterschied vorlag.

Zusammenfassung

Die AO-Platte wurde speziell für das Schaf entwickelt, stabilisierte den Fakturspalt ohne den Einsatz weiterer Stabilisierungsverfahren und gewährleistete zusätzlich eine artgerechte Haltung der Schafe. Die Titan Mesh Scaffolds füllten den Defekt gut aus und erwiesen sich als stabil, sie verhinderten einen Muskel- und Weichteilprolaps in den Defekt und dienten darüberhinaus als Leitstruktur für das wachsende Gewebe. Da nach 24 Wochen keine komplette Überbrückung des Defektspaltes zu beobachten war, lag eine verzögerte Heilung vor. Die mechanische Belastung im Frakturspalt wurde durch die Titan Mesh Scaffolds in Kombination mit der AO-Platte minimiert, sodass die Kallusformatinon gering war. Dennoch zeigte die Gewebezusammensetzung eine noch aktive Knochenheilung. Die in dieser Studie gewonnenen Erkenntnisse können genutzt werden, um die Kombination des Titan Mesh Scaffolds mit einer anderen Platte, die mehr mechanische Bewegung im Frakturspalt ermöglicht und demnach zu einer vermehrten Kallusbildung führen könnte, zu untersuchen.

Summary

Reconstruction of large segmental bone defects with mechano-biologically optimized laser-sintered titanium mesh scaffolds in a translational large animal study

The treatment of segmental bone defects of critical size caused by trauma, tumor resection or infection, as well as the mechano-biological restoration of the limb, still pose a challenge in traumatology. As a result, alternative treatments for critical bone defects are increasingly being explored. Three-dimensional (3D) titanium mesh scaffolds produced by using finite element techniques represent an advantageous alternative method to the known "gold standards" and have given promising conclusions in clinical use on human patients. In our study, two titanium mesh scaffolds, with the same structure but different stiffness, were produced and inserted in a critical size bone defect model in vivo in sheep. In the present study, the 40 mm osteotomy was performed on the tibia of twelve merino-mix sheep. The titanium mesh scaffolds had honeycomb-like and a macro-porous network with a central pore. The stiffness was altered through small changes in the strut diameter. Two groups of six animals were formed. One group received the soft scaffold (0.84 GPa stiffness) and the other group received the 3.5-fold stiffer scaffold (2.88 GPa). The scaffolds of both groups were filled with the same amount of autologous cancellous bone graft (ABG; 7.5 ml) and were applied within the 40 mm defect. The defect was stabilized with a rigid custom made half shell steel plate (AO Research Institute Davos), which mechanically shielded the defect and allowed only an axial load on the limb. During the trial period of 24 weeks, monthly X-ray checks were performed. In the 24th week ex vivo, in addition to the conventional X-rays, Faxitron shots were taken. Histological and histomorphometric test results were recorded and evaluated. The use of the soft and the 3.5 times stiffer titanium mesh scaffold in combination with a rigid, custom-made shielding plate proved to be an adequate treatment method for a critical defect of 40 mm in the sheep model. The hypothesis that mechanical-biological optimization of the titanium mesh scaffold promotes endogenous bone defect regeneration could be assumed histomorphologically, as the use of the softer titanium mesh scaffold resulted in an increased callus formation compared to the more rigid titanium mesh scaffold. The result could not be confirmed histomorphometrically, the comparison of both groups showed no difference in the statistical evaluation. The rigid, custom-made shielding plate was specially designed for sheep. It stabilized the fracture gap without the need for other stabilization methods and allowing standard animal welfare. The titanium mesh scaffold filled out the fracture gap and proved to be a stable method. It prevented a prolapse of muscle and soft tissue into the gap and turned out to be a lead structure for the ingrowing bone. Since a complete bridging could not be seen after 24 weeks delayed healing could be identified. The titanium mesh scaffold in combination with the rigid, custom-made shielding

Summary

plate reduced the mechanical load in the fracture gap, so that the callus formation was limited, but still active. The results of this study can be used as a basic method for further research of a titanium mesh scaffold in combination with another plate system, which allows more mechanical load into the gap and leads to an increased callus formation.

Literaturverzeichnis

Attias, N. L., R. E. ; Bodell, L. S. ; Lindsey, R. W. (2005). "Surgical management of a long segmental defect of the humerus using a cylindrical titanium mesh cage and plates: a case report." J Orthop Trauma **19 (3)**: 211-216.

Auer, J. A. G., A.; Arnoczky ,S. (2007). "Refining animal models in fracture research: seeking consensus in optimising both animal welfare and scientific validity for appropriate biomedical use." BMC Musculoskelet Disord **8(1)**: 72.

Bauer, T. W. M., G. F. (2000). "Bone graft materials. An overview of the basic science." Clin Orthop Relat Res **371**: 10-27.

Berner, A. W., M.A.; Lam, C. X. F.; Arafat, M. T.; Saifzadeh, S. ; Steck, R. ; Ren, J. ; Nerlich, M.; Ekaputra, A. K.; Gibson, I. ; Hutmacher, D. W. (2014). "Effects of scaffold architecture on cranial bone healing." Int. J. Oral Maxillofac. Surg. **43**: 506–513.

Butler, D. L. G., S. A.; Guilak, F. (2000). "Functional Tissue Engineering: The Role of Biomechanics." Journal of Biomechanical Engineering **122**: 570-575.

Cancedda, R. G., P.; Mastrogiacomoa, M. (2007). "A tissue engineering approach to bone repair in large animal models and in clinical practice." Biomaterials **28**: 4240–4250.

Chadayammuri, V. H., M.; Mauffrey, C. (2015). "Innovative strategies for the management of long bone infection: a review of the Masquelet technique." Patient Safety in Surgery **9 (32)**: 1-10.

Chmell, M. J. M., M.P.; Thomas, R.; Schwartz, H.S. (1995). "Structural allografts for reconstruction of lower extremity open fractures with 10 centimeters or more of acute segmental defects." J Orthop Trauma **9(3)**: 222-226.

Ciorny, G. Z., K.E. (1994). "Segmental tibial defects. Comparing conventional and Ilizarov methodologies." Clin Orthop Relat Res **301**: 118.

Cipitria, A. L., C.; Schell, H.; Wagermaier, W.; Reichert, J. C.; Hutmacher, D. W.; Fratzl, P.; Duda, G. N (2012). "Porous scaffold architecture guides tissue formation." J Bone Miner Res **27(6)**: 1275-1288.

Cipitria, A. L., C.; Schell, H.; Wagermaier, W.; Reichert, J. C.; Hutmacher, D. W.; Fratzl, P.; Duda, G. N. (2012). "Porous scaffold architecture guides tissue formation." J Bone Miner Res **27(6)**: 1275-1288.

Cipitria, A. R., J. C.; Epari, D. R.; Saifzadeh, S.; Berner, A.; Schell, H.; Mehta, M.; Schuetz, M. A.; Duda, G. N.; Hutmacher, D. W. (2013). "Polycaprolactone scaffold and reduced rhBMP-7 dose for the regeneration of critical-sized defects in sheep tibiae." Biomaterials **34(38)**: 9960-9968.

Literaturverzeichnis

Claes, L. E.-H., K.; Augat, P. (2002). "The effect of mechanical stability on local vascularization and tissue differentiation in callus healing." J Orthop Res **20** (5): 1099-1105.

Claes, L. E.-H., K.; Augat, P. (2002). "The effect of mechanical stability on local vascularization and tissue differentiation in callus healing." J Orthop Res **20**(5): 1099-1105.

Claes, L. E. H., C. A. (1999). "Magnitudes of local stress and strain along bony surfaces predict the course and type of fracture healing." J Biomech **32**(3) **32**(3): 255-266.

Claes, L. W., S.; Augat, P. (2000). "Mechanical modification of callus healing." Chirurg **71**(9): 989-994.

Cobos, J. A. L., R. W.; Gugala, Z. (2000). "The cylindrical titanium mesh cage for treatment of a long bone segmental defect: description of a new technique and report of two cases." J Orthop Trauma **14**(1): 54-59.

Cobos, J. A. L., R. W.; Gugala, Z. (2000). "The cylindrical titanium mesh cage for treatment of a long bone segmental defect: description of a new technique and report of two cases." J Orthop Trauma **14** (1): 54-59.

Decker, S. R., J.; Omar, M.; Krettek, C.; Müller, C.W. (2014). "Non-osteotomy and osteotomy large animal fracture models in orthopedic trauma research." Orthopedic Reviews **6:5575**.

DeCoster, T. A. G., R. J.; Mikola, E. A.; Pirela-Cruz, M. A. (2004). "Management of posttraumatic segmental bone defects." J Am Acad Orthop Surg **12** (1): 28-38.

Den Boer, F. C. P., P.; Bakker, F. C.; Wippermann, B. W.; van Lingen, A.; Vink, G. Q.; Boshuizen, K.; Haarman, H. J. (1999). "New segmental long bone defect model in sheep: quantitative analysis of healing with dual energy x-ray absorptiometry." J Orthop Res **17** (5): 654-660.

Den Boer, F. C. P., P.; Bakker, F. C.; Wippermann, B. W.; van Lingen, A.; Vink, G. Q.; Boshuizen, K.; Haarman, H. J. (1999). "New segmental long bone defect model in sheep: quantitative analysis of healing with dual energy x-ray absorptiometry." J Orthop Res **17** (5): 654-660.

Einhorn, T. A. (1998). "The cell and molecular biology of fracture healing." Clin Orthop Relat Res **355 Suppl**: S7-21.

Georgiadis, G. M. D., S.P. (1995). "Reconstruction of skeletal defects in the forearm after trauma: treatment with cement spacer and delayed cancellous bone grafting." J Trauma **38**(6): 910-914.

Gibson, L. J. A., M.F. (1997). Cellular Solids Structure and Properties. New York.

González-Torres, L. A. D., M.; García-Aznar, J.M. (2010). "Influence of the frequency of the external mechanical stimulus on bone healing: A computational study." Med Eng Phys **32(4)**: 363–371.

Goodship, A. E. W., P. E.; Rigby, H. S.; Kenwright, J. (1993). "The role of fixator frame stiffness in the control of fracture healing. An experimental study." J Biomech **26(9)**: 1027-1035.

Goodship, A. E. W., P. E.; Rigby, H. S.; Kenwright, J. (1993). "The role of fixator frame stiffness in the control of fracture healing. An experimental study." J Biomech **26 (9)**: 1027-1035.

Green, S. A. (1994). "Skeletal defects. A comparison of bone grafting and bone transport for segmental skeletal defects." Clin Orthop Relat Res **301**: 111-117.

Gugala, Z. and S. Gogolewski (1999). "Regeneration of segmental diaphyseal defects in sheep tibiae using resorbable polymeric membranes: a preliminary study." J Orthop Trauma **13(3)**: 187-195.

Gugala Z.; Lindsey RW; S., G. (2007). "New approaches in the treatment of critical-size segmental defects in long bones." Macromol Symp. **253**: 147-161.

Gugala, Z. G., S. (1999). "Regeneration of Segmental Diaphyseal Defects in Sheep Tibiae Using Resorbable Polymeric Membranes: A Preliminary Study." J Orthop Trauma **13(3)**: 187-195.

Gugala, Z. G., S. (1999). "Regeneration of segmental diaphyseal defects in sheep tibiae using resorbable polymeric membranes: a preliminary study." J Orthop Trauma **13 (3)**: 187-195.

Gugala, Z. L. R. W. G., S. (2007). "New approaches in the treatment of critical-size segmental defects in long bones." Macromol Symp **253(1)**: 147-161.

Haas, N. P. (2000). "Callus modulation--fiction or reality?" Chirurg **71 (9)**: 987-988.

Hahn, J. A. W., T. S.; Arens, D.; Pearce, A.; Pearce, S. (2011). "Double-plating of ovine critical sized defects of the tibia: a low morbidity model enabling continuous in vivo monitoring of bone healing." BMC Musculoskelet Disord **12**: 214.

Hahn, J. A. W., T. S.; Arens, D.; Pearce, A.; Pearce, S. (2011). "Double-plating of ovine critical sized defects of the tibia: a low morbidity model enabling continuous in vivo monitoring of bone healing." BMC Musculoskeletal Disorders **12 : 214**.

Literaturverzeichnis

Hertel, R. G., A.; Schlegel, U.; Cordey, J.; Rügsegger, P.; Rahn, B. A. (1994). "Cancellous Bone Graft for Skeletal Reconstruction. Muscular Versus Periosteal Bed--Preliminary Report." Injury, Int. J. Care Injured **25**(1): A59-70.

Hertel, R. G., A.; Schlegel, U.; Cordey, J.; Rügsegger, P.; Rahn, B.A. (1994). "Cancellous bone graft for skeletal reconstruction. Muscular versus periosteal bed--preliminary report." Injury. **25** (1): A59-70.

Hertlein, H. M., T.; Piltz, S.; Schurmann, M.; Kauschke, T.; Lob, G. (1992). "Spinal stabilization for patients with metastatic lesions of the spine using a titanium spacer." Eur Spine J **1**: 131-136.

Hierner, R. T., G.; Nast-Kolb, D. (2009). "Vascularized bone transfer." Unfallchirurgie **112**(4): 405-416; quiz 417-408.

Hollinger, J. O. K., J. C. (1990). "The critical size defect as an experimental model to test bone repair materials." J Craniofac Surg **1** (1): 60-68.

Hollister, S. J. M., W. L. (2011). "Scaffold Translation: Barriers Between Concept and Clinic." TISSUE ENGINEERING: Part B **17** (6): 459-474.

Hollister, S. J. M., W. L. (2011). "Scaffold Translation: Barriers Between Concept and Clinic." Tissue Eng. Part B **17**(6): 459-474.

Hutmacher, D. W. (2000). "Scaffolds in tissue engineering bone and cartilage." Biomaterials **21** (24): 2529-2543.

Ilizarov, G. A. (1989). "The tension-stress effect on the genesis and growth of tissues: Part II. The influence of the rate and frequency of distraction." Clin Orthop Relat Res **239**: 263-285.

Ilizarov, G. A. (1989). "The tension-stress effect on the genesis and growth of tissues. Part I. The influence of stability of fixation and soft-tissue preservation." Clin Orthop Relat Res **238**: 249-281.

Klein, P. S., H.; Streitparth, F.; Heller, M.; Kassi, J.; Kandziora, F.; Bragulla, H.; Haas, N. P.; Duda, G. N. (2003). "The Initial Phase of Fracture Healing Is Specifically Sensitive to Mechanical Conditions." Journal of Orthopaedic Research **21**: 662-669.

Knothe, T. R., T.F.; Schneider, E.; Knothe, U.R. (2007). "Testing of a new one-stage bone-transport surgical procedure exploiting the periosteum for the repair of long-bone defects." J Bone Joint Surg Am **89**(2): 307-316.

König, M. A. C., D. D.; Cadosch, D.; Casanova, E.; Heinzelmann, M.; Rittirsch, D.; Plecko, M.; Hemmi, S.; Simmern, H.-P.; Cinelli, P.; Wanner, G. A. (2016). "Direct transplantation of native pericytes from adipose tissue: A new perspective to stimulate healing in critical size bone defects." Cytotherapy **18**: 41–52.

- Lasanianos, N. G. K., N. K.; Giannoudis, P. V. (2009). "Current management of long bone large segmental defects." ORTHOPAEDICS AND TRAUMA **24 (2)**: 149-163.
- Lindsey, R. W. G., Z.; Milne, E.; Sun, M.; Gannon, F. H.; Latta, L. L. (2006). "The efficacy of cylindrical titanium mesh cage for the reconstruction of a critical-size canine segmental femoral diaphyseal defect." J Orthop Res **24 (7)**: 1438-1453.
- Lindsey, R. W. G., Z.; Milne, E.; Sun, M.; Gannon, F. H.; Latta, L. L. (2006). "The Efficacy of Cylindrical Titanium Mesh Cage for the Reconstruction of a Critical-Size Canine Segmental Femoral Diaphyseal Defect." J Orthop Res **24(7)**: 1438-1453.
- Lohfeld, S. M. P. E. (2012). "Laser sintering for the fabrication of tissue engineering scaffolds." Methods Mol Bio **868**: 303-310.
- Mahendra, A. M., A. D. (2007). "Available biological treatments for complex non-unions." Injury **38 Suppl 4**: 7-12.
- Marsell, R. E., T. A. (2011). "The Biology of Fracture Healing." Injury, Int. J. Care Injured **42**: 551–555.
- Martini, L. F., M.; Giavaresi, G. (2001). "Sheep model in orthopedic research: a literature review." Comp Med **51**: 292-299.
- Masquelet, A. C. B., T. (2010). "The Concept of Induced Membrane for Reconstruction of Long Bone Defects." Orthopedic Clinics of North America **41 (1)**: 27-37.
- Masquelet, A. C. F., F.; Begue, T.; Muller, G.P. (2000). "Reconstruction of the Long Bones by the Induced Membrane and Spongy Autograft." Ann Chir Plast Esthet **45**: 346-353.
- Metak, G. G., A.; Wolter, W.; Barth, G.; Ascherl, R. (1998). "Interspecies comparison of healing standardized bone defects with and without autogenous bone transplantation." Langenbecks Arch Chir Suppl Kongressbd **115(Suppl I)**: 25-30.
- Moulder, E. S., H. K. (2008). "Tibial Non- Union: A Review of Current Practice." Current Orthopaedics **22**: 434-441.
- Muschler, G. F. R., V. P.; Patterson, T. E.; Wenke, J. C.; Hollinger, J. O. (2010). "The design and use of animal models for translational research in bone tissue engineering and regenerative medicine." TISSUE ENG. B **16**: 123-145.
- Naggar, L. C., F.; Blanc, C.H.; Livio, J.J. (1993). "Treatment of large bone defects with the Ilizarov technique." J Trauma **34(3)**: 390-393.

Literaturverzeichnis

Newman, E. T., A. S.; Wark, J. D. (1995). "The potential of sheep for the study of osteopenia: current status and comparison with other animal models." Bone **16 (4 Suppl)**: 277S-284S.

Noble, B. S. R., J. (2000). "Osteocyte function, osteocyte death and bone fracture resistance." Mol Cell Endocrinol **159 (1-2)**: 7-13.

Nunamaker, D. M. (1998). "Experimental models of fracture repair." Clin Orthop Relat Res: 56-65.

Ostermann, P. A. H., N.; Rubberdt, A.; Wich, M.; Ekkernkamp, A. (2002). "Management of a long segmental defect at the proximal meta-diaphyseal junction of the tibia using a cylindrical titanium mesh cage." J Orthop Trauma **16**: 597-601.

Pearce, A. I. R., R. G.; Milz, S.; Schneider, E.; Pearce, S. G. (2007). "Animal models for implant biomaterial research in bone: a review." Eur Cell Mater **13**: 1-10.

Perry, C. R. (1999). "Bone repair techniques, bone graft, and bone graft substitutes." Clin Orthop Relat Res **360**: 71-86.

Peters, A. S., H.; Bail, H. J.; Hannemann, M.; Schumann, T.; Duda, G. N.; Lienau, J. (2010). "Standard bone healing stages occur during delayed bone healing, albeit with a different temporal onset and spatial distribution of callus tissues." Histol Histopathol **25(9)**: 1149-1162.

Peters, A. S., H.; Bail, H. J.; Hannemann, M.; Schumann, T.; Duda, G. N.; Lienau, J. (2010). "Standard bone healing stages occur during delayed bone healing, albeit with a different temporal onset and spatial distribution of callus tissues." Histol Histopathol **25 (9)**: 1149-1162.

Pobloth, A.-M. C., S.; Razi, H.; Petersen, A.; Weaver, J. C.; Schmidt-Bleek, K. (2018). "Mechanobiologically optimized 3D titanium-mesh scaffolds enhance bone regeneration in critical segmental defects in sheep." Science Translational Medicine **10(423)**.

Pobloth, A. M. D., G. N.; Giesecke, M. T.; Dienelt, A.; Schwabe, P. (2015). "High-dose recombinant human bone morphogenetic protein-2 impacts histological and biomechanical properties of a cervical spine fusion segment: results from a sheep model." J Tissue Eng Regen Med.

Pobloth, A. M. J., K.A.; Schell, H.; Kolarczik, N.; Wulsten, D.; Duda, G.N.; Schmidt-Bleek, K. (2016). "Establishment of a preclinical ovine screening model for the investigation of bone tissue engineering strategies in cancellous and cortical bone defects." BMC Musculoskelet Disord **17(016)**.

Pobloth, A. M. S., H.; Petersen, A.; Beierlein, K.; Kleber, C.; Schmidt-Bleek, K.; Duda, G.N. (2017). "Tubular open-porous β -tricalcium phosphate polycaprolactone scaffolds as guiding structure for segmental bone defect regeneration in a novel sheep model." J Tissue Eng Regen Med **8**.

Pobloth, A. M. S., H.; Petersen, A.; Beierlein, K.; Kleber, C.; Schmidt-Bleek, K.; Duda, G.N. ". 8 (2017) (2018). "Tubular Open-Porous B-Tricalcium Phosphate Polycaprolactone Scaffolds as Guiding Structure for Segmental Bone Defect Regeneration in a Novel Sheep Model." J Tissue Eng Regen Med **12**(4): 897-911.

Prokuski, L. J. M., h J.L. (1994). "Segmental bone deficiency after acute trauma. The role of bone transport." Orthop Clin North Am **25**(4): 753-763.

Radasch, R. M. (1999). "Biomechanics of bone and fractures." Vet Clin North Am Small Anim Pract **29**(5): 1045-1082, v-vi.

Razi, H. B., A. I.; Zaslansky, P.; Weinkamer, R.; Duda, G. N.; Willie, B. M.; Checa, S. (2015). "Skeletal maturity leads to a reduction in the strain magnitudes induced within the bone: a murine tibia study." Acta Biomater **13**: 301-310.

Razi, H. C., S.; Schaser, K. D.; Duda, G. N. (2012). "Shaping scaffold structures in rapid manufacturing implants: a modeling approach toward mechano-biologically optimized configurations for large bone defect." J Biomed Mater Res B Appl Biomater **100** (7): 1736-1745.

Reichert, J. C. C., A.; Epari, D. R.; Saifzadeh, S.; Krishnakanth, P.; Berner, A.; Woodruff, M. A.; Schell, H.; Mehta, M.; Schuetz, M. A.; Duda, G. N.; Hutmacher, D. W. (2012). "A tissue engineering solution for segmental defect regeneration in load-bearing long bones." Sci Transl Med **4**(141): 141ra193.

Reichert, J. C. S., S.; Wullschleger, M. E.; Epari, D. R.; Schuetz, M. A.; Duda, G. N.; Schell, H.; van Griensven, M.; Redl, H.; Hutmacher, D. W. (2009). "The challenge of establishing preclinical models for segmental bone defect research." Biomaterials **30**: 2149–2163.

Rentsch, C. S., W.; Hess, R.; Rentsch, B.; Bernhardt, R.; Spekl, K.; Schneider, K.; Scharnweber, D.; Biewener, A.; Rammelt, S. (2014). "Healing properties of surface-coated polycaprolactone-co-lactide scaffolds: A pilot study in sheep." J Biomater Appl **28**(5): 654-666.

Reynders, P. B., P. L. O.; Stoffelen, D. (2003). "The use of cylindrical titanium mesh cages in the treatment of post-traumatic segmental bone loss of the femur." Osteo Trauma Care **11**: 99-104.

Rhineland, F. W. (1974). "Tibia blood supply in relation to fracture healing." Clin Orthop Relat Res **105**(34): 81.

Richardson, J. B. K., J.; Cunningham, J.L. (1992). "Fracture stiffness measurement in the assessment and management of tibial fractures." Clinical Biomechanics **7** (2): 75-79.

Richter, H. P., M.; Andermatt, D.; Frigg, R.; Kronen, P.W.; Klein, K.; Nuss, K.; Ferguson, S.J.; Stöckle, U.; von Rechenberg, B. (2015). "Dynamization at the near cortex in locking plate

Literaturverzeichnis

osteosynthesis by means of dynamic locking screws: an experimental study of transverse tibial osteotomies in sheep." J Bone Joint Surg Am. **97(3)**: 208-215.

Roach, H. I. S., J. R.; Archer, C. (1989). "The choice of an experimental model. A guide for research workers." J Bone Joint Surg Br **71(4)**: 549-553.

Rodriguez-Merchan, E. C. F., F. (2004). "Nonunion: general principles and experimental data." Clinical Orthopaedics and Related Research **419**: 4–12.

Runkel, M. R., P. M. (2000). "Pseudoarthrosis." Unfallchirurg **103(1)**: 51-63; quiz 63.

Schell, H., et al. (2008). "Mechanical induction of critically delayed bone healing in sheep: radiological and biomechanical results." J Biomech **41(14)**: 3066-3072.

Schell, H. T., M. S.; Bail, H. J.; Hoffmann, J. E.; Schill, A.; Duda, G. N.; Lienau, J. (2008). "Mechanical induction of critically delayed bone healing in sheep: radiological and biomechanical results." J Biomech **41 (14)**: 3066-3072.

Schell, H. T., M. S.; Bail, H. J.; Hoffmann, J. E.; Schill, A.; Duda, G. N.; Lienau, J. (2008). "Mechanical Induction of Critically Delayed Bone Healing in Sheep: Radiological and Biomechanical Results." J Biomech **41(14)**: 3066-3072.

Schmidt-Bleek, K. K., B. J.; Mooney, D. J.; Duda, G. N. (2015). "Boon and Bane of Inflammation in Bone Tissue Regeneration and Its Link with Angiogenesis." Tissue Eng Part B Rev. **21 (4)**: 354-364.

Schmidt-Bleek, K. S., H.; Kolar, P.; Pfaff, M.; Perka, C.; Buttgerit, F.; Duda, G.; Lienau, J. (2009). "Cellular composition of the initial fracture hematoma compared to a muscle hematoma: a study in sheep." J Orthop Res **27(9)** **27 (9)**: 1147-1151.

Schmidt-Bleek, K. S., H.; Lienau, J.; Schulz, N.; Hoff, P.; Pfaff, M.; Schmidt, G.; Martin, C.; Perka, C.; Buttgerit, F.; Volk, H. D.; Duda, G. (2012). "Initial immune reaction and angiogenesis in bone healing." J Tissue Eng Regen Med **8 (2)**: 120-130.

Schmidt-Bleek, K. S., H.; Lienau, J.; Schulz, N.; Hoff, P.; Pfaff, M.; Schmidt, G.; Martin, C.; Perka, C.; Buttgerit, F.; Volk, H. D.; Duda, G. (2014b). "Initial immune reaction and angiogenesis in bone healing." J Tissue Eng Regen Med **8(2)**: 120-130.

Schmidt-Bleek, K. S., H.; Schulz, N.; Hoff, P.; Perka, C.; Buttgerit, F.; Volk, H. D.; Lienau, J.; Duda, G. N. (2012). "Inflammatory phase of bone healing initiates the regenerative healing cascade." Cell Tissue Res **347(3)**: 567-573.

Schmitz, J. P. H., J. O. (1986). "The critical size defect as an experimental model for craniomandibulofacial nonunions." Clin Orthop Relat Res **205**: 299-308.

Schmitz, J. P. H., J. O. (1986). "The critical size defect as an experimental model for craniomandibulofacial nonunions." Clin Orthop Relat Res **(205)**: 299-308.

Shah, K. M. N., A.C.; Hamblen, D.L. (1995). "Fracture stiffness measurement in tibial shaft fractures: a non-invasive method." Clin Biomech **10(8)**: 395–400.

Stürmer, K. M. (1984). "Histologische Befunde der Frakturheilung unter Fixateur externe und ihre klinische Bedeutung." Unfallchirurgie **10(3)**: 110-122.

Stürmer, K. M., Schuchardt, W., (1980). "New aspects of closed intramedullary nailing and marrow cavity reaming in animal experiments. I. The tibia of the sheep, as a model for intramedullary nailing (author's transl)." Unfallheilkunde **83**: 341–345.

Stürmer, K. M. S., W. (1980). "New aspects of closed intramedullary nailing and marrow cavity reaming in animal experiments. I. The tibia of the sheep, as a model for intramedullary nailing (author's transl)." Unfallheilkunde **83**: 341-345.

Teixeira, C. R. R., S.C.; Volpi, R.S.; Taga, R.; Cestari, T.M.; Granjeiro, J.M. (2007). "Tibial segmental bone defect treated with bone plate and cage filled with either xenogeneic composite or autologous cortical bone graft." Vet Comp Orthop Traumatol **20 (4)**: 269-276.

Urist, M. R. M., R.; McLean, F. (1954). "The pathogenesis and treatment of delayed union and non-union." The Journal of Bone and Joint Surgery **36 A (5)**: 931-980.

Wendt, D. J., M.; Martin, I. (2005). "Bioreactor-Based Engineering of Osteochondral Grafts: from Model Systems to Tissue Manufacturing." JOURNAL OF BIOSCIENCE AND BIOENGINEERING **100 (5)**: 489–494.

Weyrauch, K. D. S., A.; Schnorr, B. (1998). Histologie-Kurs für Veterinärmediziner. Stuttgart, Enke-Verlag.

Whitecloud, T. S. C., F.PJr.; Brinker M.R.; Hartzog, C.WJr.; Ricciardi, J.E.; Hill, C. (1998). "Degenerative conditions of the lumbar spine treated with intervertebral titanium cages and posterior instrumentation for circumferential fusion." J Spinal Disord **11(6)**: 479-486.

Willbold, E. R., M.; Jeffries, R.; Witte, F. (2013). "Electrochemical removal of metallic implants from Technovit 9100 New embedded hard and soft tissues prior to histological sectioning." Histochem Cell Biol **140(5)**: 585-593.

Willenegger, H. P., S. M.; Schenk, R. (1971). "Primary and secondary healing of bone fractures." Chirurg **42(6)**: 241-252.

Windolf M, E. M. S., R.; Perren S. M.; Mathis, H.; Wilke M.; Richards R. G. (2014). "A Biofeedback System for Continuous Monitoring of Bone Healing." International Conference on Biomedical Electronics and Devices: 243-248.

Literaturverzeichnis

Wippermann, B. D., C.; Schrott, H.E.; den Boer, F.C.; Blokhuis, T.; Patka, P. (1999). "The influence of hydroxyapatite granules on the healing of a segmental defect filled with autologous bone marrow." Ann Chir Gynaecol **88**: 194-197.

Wissing, H. S., K. M.; Breidenstein, G. (1990). "Die Wertigkeit verschiedener Versuchstierspecies für experimentelle Untersuchungen am Knochen." Hefte Unfallheilkunde **212**: 479-488.

Wu, J. J. S., H. S.; Chao, E. Y.; Kelly, P. J. (1984). "Comparison of osteotomy healing under external fixation devices with different stiffness characteristics." J Bone Joint Surg Am **66**(8): 1258-1264.

Wu, J. J. S., H. S.; Chao, E. Y.; Kelly, P. J. (1984). "Comparison of osteotomy healing under external fixation devices with different stiffness characteristics. ." J Bone Joint Surg Am **66**(8): 1258-1264.

Yaszemski, M. J. P., R.G.; Hayes, W.C.; Langer, R.; Mikos, A.G. (1996). "In vitro degradation of a poly(propylene fumarate)-based composite material." Biomaterials **17**(22): 2127-2130.

Younger, E. M. C., M. W. (1989). "Morbidity at bone graft donor sites." J Orthop Trauma **3**(3): 192-195.

Anhang

Tabelle 10: Färbeprotokoll Safranin Orange/von Kossa-Färbung

Entplasten in MEA	3 x 30 Minuten
Absteigende Alkoholreihe	Je 2 Minuten
100%- Alkohol, 96%-Alkohol, 80%- Alkohol, 70%- Alkohol	
Aqua dest.	2 Minuten
3% wässrige Silbernitratlösung	10 Minuten
(Merck 1512; Merck, Darmstadt, Deutschland)	
Aqua dest.	3 x spülen
Natriumcarbonat-Formaldehyd-Lösung	2 Minuten
(Merck 6392 (wasserfrei) bzw. Merck 6391 (Dekahydrat); Merck, Darmstadt, Deutschland)	
Leitungswasser	10 Minuten
Natriumthiosulfat-Lösung 5%	5 Minuten
(Merck 6516; Merck, Darmstadt, Deutschland)	
Leitungswasser	10 Minuten
Aqua dest.	5 x eintauchen
Safranin-O	8 Minuten
(Merck 1382, Merck Darmstadt, Deutschland)	
Aqua dest.	5x eintauchen
96% Alkohol	2 x 2 Minuten
100% Alkohol	2 x 2 Minuten
Entfetten in Xylol	2 x 5 Minuten
Eindecken mit Vitro-clud®	

Publikationen

Science Translational Medicine 10 Jan 2018:

Vol 10, Issue 423, eaam8828

DOI: 10. 1126/scitranslmed. aam8828.

Mechano-biologically optimized 3D titanium-mesh scaffolds enhance regeneration in large segmental bone defects

Authors: A. Pobloth¹, S. Checa¹, H. Razi^{1,4}, A. Petersen^{1,2}, James C. Weaver⁷, K. Schmidt- Bleek¹, M. Windolf⁵, A. Á. Tatai³, C. P. Roth¹, K. D. Schaser^{3,6}, G. N. Duda^{1,2*+}, P. Schwabe³⁺

+ These authors contributed equally to this work.

39. Berliner Chirurgentreffen, 2.-4. September 2014,

1. Preis Vortrag Junges Forum Traumatologie/Orthopädie

A.-M. Pobloth, H. Razi, K. Schmidt-Bleek, C.P. Roth, A. Á. Tatai, K.-D. Schaser, G. N. Duda, P. Schwabe

Rekonstruktion segmentaler Knochendefekte durch mechanobiologisch modulierte, Laser-gesinterte Titan-Mesh-Scaffolds

Danksagung

Ich danke sehr herzlich meinem Doktorvater Herrn Professor Dr. Robert Klopffleisch für die freundliche, motivierende und warmherzige Betreuung der externen Doktorarbeit. Vielen Dank für die Durchsicht und Begutachtung meiner Arbeit als Erstgutachter.

Ich bedanke mich ebenfalls sehr herzlich bei Herrn Professor Georg N. Duda für die Möglichkeit, an dem spannenden Thema in der Forschung arbeiten zu dürfen. Ich danke Ihnen für die Bereitstellung sowie die Überlassung des interessanten Themas.

Des Weiteren gilt ein besonderer Dank Frau Dr. Anne-Marie Pobloth für die uneingeschränkte und nette Unterstützung während der Erarbeitung meiner Dissertation. Du hast mir stets mit konstruktiven Gesprächen und wissenschaftlichem Rat zur Seite gestanden. Danke auch für die nette und vor allem heitere Zusammenarbeit während der praktischen Arbeit mit den Schafen. Ich danke dir für die sachkundige Betreuung während der Planung und der Auswertung. Aber vor allem für die gründliche und geduldige Beurteilung der Konzepte meiner Arbeit. Ich danke ebenso Frau Dr. Katharina Schmidt-Bleek für die motivierenden Worte und die bereichernden Gespräche während der Bearbeitung dieser Arbeit. Vielen Dank für die Durchsicht und für die Denkanstöße.

Außerdem bedanke ich mich bei den Mitarbeiterinnen des Forschungslabors Marzena Princ und Sabine Stumpp. Danke für die stetige Geduld und jeden guten Rat während meiner Laborarbeiten. Ebenso danke ich ganz herzlich Mario Thiele für die technische Unterstützung in der Bildanalyse und die geduldige Beantwortung aller meiner IT-Fragen.

Bedanken möchte ich mich auch bei meinen Mitdoktoranden Nicolai Kolarczik, Elisabeth Huber und allen sympathischen Menschen im Julius Wolff Institut. Besonders danke ich Katleen Beierlein für den Beistand während der Arbeit und vor allem für die Freundschaft. Danke für die gute und humorvolle Zusammenarbeit sowie für die ermutigenden Worte und die interessanten Gespräche. Ich danke auch meinem Mitstreiter Aron Tatai. Danke auch dir lieber Aron Tatai für die zahlreichen harten, aber vor allem witzigen und chaotischen Situationen, die wir lachend zusammen erlebt und gemeistert haben.

Des Weiteren bedanke ich mich bei allen meinen Freunden, die mir immer ein unterstützendes und aufbauendes Gefühl gegeben haben. Ein besonderer Dank gilt meiner Familie, vor allem meinen Eltern Sylwia und Leszek. Danke für die Möglichkeit Veterinärmedizin studiert zu haben und den Beistand während des gesamten Studiums sowie der Doktorarbeit. Außerdem danke ich ganz herzlich meinem lieben Bruder Michael für die unbegrenzte Unterstützung und Motivation während aller Projekte in meinem Leben. Danke, dass du immer an meiner Seite bist, seit 25 Jahren. Danke auch an meinen liebevollen und motivierenden Ehemann Sebastian. Danke, dass du immer an mich glaubst, mich unterstützt und es immer schaffst mich aufzuheitern.

Selbständigkeitserklärung

Selbständigkeitserklärung

Hiermit bestätige ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig angefertigt habe. Ich versichere, dass ich ausschließlich die angegebenen Quellen und Hilfen in Anspruch genommen habe.

Berlin, den 21.06.2019

Claudia El-Rawas



9 783863 879884

mbvberlin mensch und buch verlag

49,90 Euro | ISBN: 978-3-86387-988-4