

Aus dem
Centrum für Muskuloskeletale Chirurgie
Klinik für Orthopädie und
Klinik für Unfall- und Wiederherstellungschirurgie

DISSERTATION

Rekonstruktion von segmentalen Knochendefekten mittels
3D-Laser-gesinterten Titanimplantaten (rapid prototyping) in
einem Schafsmodell

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae dentariae (Dr. med. dent.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

András Áron Tatai
aus Vác / Ungarn

Datum der Promotion: 21.06.2020

Vorwort zur Sicherung der Grundsätze der guten wissenschaftlichen Praxis in der vorliegenden Promotionsarbeit

Mit diesem Vorwort möchte ich darauf hinweisen, dass die vorgenommenen Ausführungen und/oder aufgeführten Daten meiner Promotionsarbeit in den Kapiteln „Abstrakt“, „Einleitung“ (Kapitel 1), „Material und Methoden“ (Kapitel 2), „Ergebnisse“ (Kapitel 3) und „Diskussion“ (Kapitel 4) zum Teil aus der Publikation [1] zitiert wurden. Sie wurden insoweit dargestellt, wie es von mir für das Verständnis des Gesamtzusammenhangs als notwendig erachtet wurde.

INHALTSVERZEICHNIS

Inhaltsverzeichnis	I
Abbildungsverzeichnis.....	IV
Tabellenverzeichnis.....	VI
Abkürzungsverzeichnis.....	VII
Abstrakt (Deutsch)	1
Abstract (English)	2
1 Einleitung	3
1.1 Definition von kritischen Knochendefekten (critical-sized defect, CSD).....	3
1.2 Epidemiologie segmentaler Knochendefekte.....	4
1.3 Derzeitige Therapieoptionen von segmentalen Knochendefekten	4
1.3.1 Kallusdistraktion nach Ilizarov.....	5
1.3.2 Endoprothesen.....	5
1.3.3 Biologische Rekonstruktionsverfahren	5
1.3.3.1 Allograft (Fremdknochen)	6
1.3.3.2 Autograft (Eigenknochen)	6
1.4 Entwicklung von Titan-Mesh-Scaffolds	8
1.5 Kritische Knochendefektmodelle.....	9
1.6 Zielstellung.....	11
1.7 Hypothesen.....	11
2 Material und Methoden	12
2.1 Tiermodell.....	12
2.2 Das Titan-Mesh-Scaffold Design	12
2.3 Fixateur interne	14
2.4 Gruppeneinteilung	16

2.5	Tierhaltung	17
2.6	Operatives Vorgehen	18
2.6.1	Operationsvorbereitung und Narkose	18
2.6.2	Die Gewinnung der autologen Spongiosa	19
2.6.3	Defektsetzung, Stabilisierung.....	21
2.6.4	Narkoseausleitung und postoperative Versorgung.....	24
2.7	Nachsorge	25
2.8	Euthanasie und Gewinnung der Präparate	25
2.9	Histologische Aufarbeitung der Präparate	27
2.9.1	Fixierung und Sägen der Präparate	27
2.9.2	Aufbereitung für die Kunststoffhistologie.....	30
2.9.3	Herstellung der Schliffpräparate	33
2.9.4	Histologische Färbung der Gewebeschliffe	34
2.10	Auswertung	36
2.10.1	Deskriptiv	36
2.10.2	Röntgenologische Auswertung	36
2.10.3	Vorbereitung für die histomorphometrische Auswertung und Festlegung der Regions of Interest (ROIs)	37
2.10.4	Histomorphometrische Bildanalyse	38
2.10.5	Statistik.....	39
3	Ergebnisse	41
3.1	Postoperative Phase	41
3.2	Röntgenologische Ergebnisse	42
3.3	Histologische Ergebnisse	46
3.3.1	Deskriptive Histologie	46
3.4	Ergebnisse der Histomorphometrie	52

3.4.1	Gewebeverteilung in der Total ROI	52
3.4.2	Verteilung des mineralisierten Knochengewebes innerhalb der fünf verschiedenen ROIs.....	54
3.4.3	Mineralisierte Knochengewebeverteilung in der medialen und lateralen ROIs 55	
3.4.4	Mineralisierte Knochengewebeverteilung in der Proximalen Centralen ROI und Distalen Centralen ROI	58
3.5	Zusammenfassung der Ergebnisse	60
4	Diskussion	62
4.1	Beantwortung der Hypothesen	62
4.2	Relevanz des Tiermodells	62
4.3	Diskussion der Ergebnisse	63
4.4	Vergleich mit weiteren Studien	66
4.4.1	Studien mit segmentalen Knochendefekten im Schafsmodell.....	66
4.4.2	Studien mit vorgefertigten zylindrischen Titan-Mesh-Scaffolds	68
4.4.3	Studien mit mechanisch veränderten zylindrischen Titan-Mesh-Scaffolds	69
4.5	Zusammenfassung	71
5	Literaturverzeichnis	74
6	Lebenslauf	82
7	vollständige Publikationsliste	83
8	Preise	84
9	Eidesstattliche Versicherung und Anteilserklärung	85
10	Danksagung	87

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 1: Darstellung der beiden verwendeten Titan-Mesh-Scaffolds.	14
Abbildung 2: Schematische Darstellung der Plattenosteosynthese ohne und mit dynamischer Kopfverriegelungsschraube (A-D):.....	16
Abbildung 3: Darstellung der Gewinnung der autologen Spongiosa (A-C):.....	20
Abbildung 4: Darstellung über die Lagerung des Schafes:.....	21
Abbildung 5: Darstellung des Operationsablaufes (A-F):.....	23
Abbildung 6: Darstellung des Plattenspanners: Der Plattenspanner wird angezogen.....	23
Abbildung 7: Darstellung des befestigten Titan-Mesh-Scaffolds und der aufliegenden LCP mit den DLS Schrauben.....	23
Abbildung 8: Darstellung des Schafs nach der Operation: Das Schaf befindet sich im Gurtsystem und wird unterstützend auf einem Heuballen gelagert.	24
Abbildung 9: Exemplarische Darstellung eines Präparates: Die Tibia wurde abgetrennt und es wurden zwei, dem Osteotomiedefekt angrenzende, DLS Schrauben entfernt.	26
Abbildung 10: Darstellung der zu entfernende Schrauben:	27
Abbildung 11: Exemplarische Darstellung über das Präparat beim Absägen der Tibia Enden:	28
Abbildung 12: Schematische Aufsicht des Sägeschnittes und Beschriftung der Blöcke:	28
Abbildung 13: Exemplarische Einspannungsdarstellung der Probe in dem Halter.....	29
Abbildung 14: Exemplarische Darstellung der entstandenen zwei Blöcke nach dem mediolateralen Sägeschnitt.....	29
Abbildung 15: Exemplarische Darstellung eines Schliffes gefärbt nach Safranin-O/von Kossa aus der Gruppe des harten Titan-Mesh-Scaffolds	36
Abbildung 16: Exemplarische Darstellung des Bridging - Scores:	37
Abbildung 17: Abbildung von der Festlegung der ROIs für die Histomorphometrie.....	38
Abbildung 18: Darstellung eines Boxplots.....	40
Abbildung 19: Röntgenologisches Bild der Aufhellungen um die proximalen Kleinfragmentschrauben zum Zeitpunkt von acht Wochen postoperativ (im lateromedialen Strahlengang).....	43

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 20:Exemplarische Röntgendarstellung (im anteroposterioren Strahlengang) von jeweils einem Tier aus der Gruppe 1 und 2	44
Abbildung 21:Röntgendarstellung des Kontrolltieres im anteroposterioren Strahlengang.....	45
Abbildung 22:Darstellung von längs angeschnittenen Havers-Kanälen (Pfeile) und einem Volkmann-Kanal (Dreieck) bei kombinierter Safranin Orange/von Kossa-Färbung.....	48
Abbildung 23:Darstellung eines Osteons aus dem lateral - proximalen knöchernen Kallusgewebe:.....	48
Abbildung 24:Darstellung der Mineralisationsfront: Aufnahme aus dem distal-lateralen neu gebildeten Geflechtknochen.....	49
Abbildung 25:Aufnahme eines Struts aus dem Scaffold mit umgebendem knöchernen Kallusgewebe.....	50
Abbildung 26:Schliff gefärbt nach Safranin-O/von Kossa (Tier der Gruppe 2)..	50
Abbildung 27:Schliffe gefärbt nach Safranin-O/von Kossa, drei Präparate pro Gruppe.	51
Abbildung 28:Darstellung der min. Knochen-, Knorpel- und Bindegewebefläche in der Total ROI in relativen Zahlen [%];	53
Abbildung 29:Darstellung der min. Knochengewebeverteilung in fünf verschiedene ROIs in relativen Zahlen [%];	55
Abbildung 30:Darstellung der min. Knochengewebeverteilung in Medialer und Lateral ROI in relativen Zahlen [%];	57
Abbildung 31:Darstellung der min. Knochengewebeverteilung in der Proximalen Centralen ROI und Distalen Centralen ROI in relativen Zahlen [%];.....	59

TABELLENVERZEICHNIS

Tabelle 1:	Gruppeneinteilung.....	17
Tabelle 2:	Entwässerungsschema.....	30
Tabelle 3:	Übersichtstabelle von Lösungsansetzungen in der Kunststoffhistologie	31
Tabelle 4:	Färbeprotokoll kombinierte Safranin Orange/von Kossa-Färbung.....	35
Tabelle 5:	Zusammenfassung der klinischen Befunde (modifizierte Darstellung nach Pobloth et al. 2018).....	42
Tabelle 6:	Darstellung des Erwerbes von Bridging -Score B1 und B2 in den zwei Gruppen	46
Tabelle 7:	Darstellung der min. Knochen-, Knorpel- und Bindegewebefläche in der Total ROI; p-Wert: Wilcoxon-Mann-Whitney-Test ($p \leq 0,05$).....	52
Tabelle 8:	Darstellung der min. Knochengewebeverteilung in fünf verschiedene ROIs in relativen Zahlen [%]; p-Wert: Wilcoxon-Mann-Whitney-Test ($p \leq 0,05$)	54
Tabelle 9:	Darstellung der min. Knochengewebeverteilung in Medialer und Lateraler ROI in relativen Zahlen [%]; p-Wert bezieht sich auf Wilcoxon-Mann-Whitney-Test ($p \leq 0,05$).....	56
Tabelle 10:	Darstellung der min. Knochengewebeverteilung in der Proximalen Centralen ROI und Distalen Centralen ROI in relativen Zahlen [%]; p-Wert: Wilcoxon-Mann-Whitney-Test ($p \leq 0,05$).....	58

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

AO	Arbeitsgemeinschaft für Osteosynthesefragen
BMP-2	Bone Morphogenetic Protein- 2
DLS	Dynamic Locking Screw
IQR	Interquartilsabstand
LCP	Locking Compression Plate
NaCl	Natriumchlorid
PTH	Parathormon
ROI	Region of Interest

ABSTRAKT (DEUTSCH)

Die Regeneration von ausgedehnten Knochendefekten nach Tumorresektion, Trauma oder Infektion stellt eine große Herausforderung dar. Momentan ist ein patientenindividuelles Verfahren zur Augmentation von Knochendefekten mit 3D Titan-Gitterstruktur (Titan-Mesh-Scaffold) als Alternative zur autologen Knochen transplantation in klinischer Erprobung. Es ist bekannt, dass die mechanische Umgebung eine bedeutende Rolle bei der Knochenneubildung spielt. Es ist jedoch unklar, ob die Steifigkeit eines soliden Titan-Mesh-Scaffolds in der Art optimiert werden kann, dass es den Regenerationsprozess positiv unterstützt. In dieser Studie untersuchten wir das Potenzial zweier mechanisch optimierter Titan-Mesh-Scaffolds, bezogen auf eine Knochenneubildung in einem segmentalen Knochendefektmodell im Schaf. Unter dem Einsatz der Finite-Element-Analyse wurden zwei Titan-Mesh-Scaffolds mit gleichem Design, aber mit unterschiedlichen Steifigkeiten entworfen. Das 3D Titan-Mesh Herstellungsverfahren wurde angewandt, um zwei individuell angepasste Titan-Mesh-Scaffolds (d.h. ein „weiches“ und ein 3,5-mal härteres Titan-Mesh-Scaffold) herzustellen. Die Titan-Mesh-Scaffolds wurden mit autologem spongiösem Beckenkammknochen befüllt und in 4 cm lange mid-diaphysäre Tibiaostetomiedefekte bei insgesamt zwölf Schafen eingesetzt. Nach 24 Wochen zeigten die radiologischen und histologischen Auswertungen eine dominierende asymmetrische laterale knöcherne Überbrückung, was die vorhergesagten höheren Spannungen beider Gruppen auf der lateralen Seite widerspiegelt. Das knöcherne Kallusgewebe zeigte sich sowohl lateral, als auch innerhalb des Scaffolds. Innerhalb der Gruppe mit den weicheren Titan-Mesh-Scaffolds kam es zu einer stärkeren enchondralen Ossifikation und zu einer früheren radiologischen, knöchernen Überbrückung, als in der Gruppe mit den härteren Titan-Mesh-Scaffolds. Mit diesem Modell wurde erstmals die Fähigkeit zur Regeneration von Defekten kritischer Größe, durch 3D-Laser-gesinterte Titan-Mesh-Scaffolds mit unterschiedlich mechanischen Steifigkeiten dargestellt und es konnte die Überlegenheit einer weicheren Scaffoldstruktur veranschaulicht werden.

ABSTRACT (ENGLISH)

The regeneration of large bone defects after trauma, tumor resection, or infection is one of the remaining challenges in orthopedic surgery. Currently, 3D added manufacturing of Titan-Mesh-Scaffolds is under clinical evaluation as an alternative to autologous bone grafting. Although it is known that the mechanical environment influences bone regeneration, it remains unknown if the mechanical properties of rigid Titan-Mesh-Scaffolds can be tuned to faster bone regeneration. In this study, we investigated the potential of tuning Titanium-Mesh-Scaffold stiffness to promote bone regeneration in a large bone defect in a sheep model by optimizing the scaffolds rigidity. We used finite element techniques to design two Titan-Mesh-Scaffolds that, while having the same geometry, presented with significant differences in Titan-Mesh-Scaffold stiffness. 3D added manufacturing was employed to create two types of customized Titan-Mesh-Scaffolds (i.e., a soft and a 3.5 times stiffer Titan-Mesh-Scaffold), which were filled with cancellous bone graft and implanted in a 4 cm mid-diaphyseal tibia defect in twelve sheep. At 24 weeks, radiological and histological analysis showed that an asymmetrical callus formation that dominated the lateral defect bridging, reflecting the strain patterns predicted for both Titan-Mesh-Scaffold groups. Bone grew on the outer Titan-Mesh-Scaffold surface and directly through the inside mesh structure of the scaffold. The soft Titan-Mesh-Scaffold showed increased endochondral bone formation and earlier radiological bone bridging, as compared to the stiffer Titan-Mesh-Scaffold. This study is the first to illustrate the potential of mechanically optimized Titan-Mesh-Scaffolds to enhance bone regeneration in large bone defects.

1 EINLEITUNG

1.1 Definition von kritischen Knochendefekten (critical-sized defect, CSD)

Segmentale Knochendefekte, die aufgrund ihrer Größe ohne operativen Eingriff innerhalb der Lebenszeit eines Patienten und trotz physiologischer Umgebungsbedingungen nicht knöchern durchbaut werden, werden als Defekte kritischer Größe (critical-sized defect, CSD) bezeichnet [2, 3]. In experimentellen Studien wurden Knochenverletzungen untersucht und es wurde postuliert, dass ab einer bestimmten Defektgröße kein spontaner Selbstheilungsprozess stattfindet [4]. Mit einer Vielzahl von tierexperimentellen Studien wurde versucht, den nicht regenerativen Schwellenwert zu ermitteln, der schließlich als kritischer Knochendefekt definiert werden sollte. Ein kritischer Knochendefekt kann somit als der kleinste intraossale Defekt, in einem bestimmten Knochen eines Tieres, der während der Lebenszeit des Tieres nicht spontan heilt, definiert werden [5-7]. Eine andere Definition sagt, dass es sich um solche Defekte handelt, bei denen zu Lebzeiten des Tieres weniger als 10% knöcherne Regeneration stattgefunden hat [5]. Nach Lindsey et al. geht es dann um einen segmentalen Knochendefekt, wenn dieser in seiner Länge 2-2,5 fach den Durchmesser des betroffenen Knochens überschreitet [8, 9]. Allerdings kann das kritische am Defekt auch von der phylogenetischen Art der Spezies, der anatomischen Lage des Defektes, dem angehängten Weichteilgewebe, den biomechanischen Konditionen der betroffenen Gliedmaßen, sowie von den metabolischen und systemischen Konditionen und von den einhergehenden Krankheiten abhängen [6, 8].

CSDs werden durch fibröses Bindegewebe und nicht durch Knochenwebe ersetzt. Schmitz et al. haben einen Mechanismus vorgestellt, welcher die zellulären Heilungsvorgänge der CSD erklärt [10]. Sie behaupten, dass u.a. mit Hilfe von BMPs oder Osteogenin, aus dem umliegenden Wundengebiet, auf die Osteoblasten und Chondroblasten eine Differenzierung bewirkt wird [11]. Diese Zellen mineralisieren die Extrazelluläre Matrix und bilden knöcherne Inseln. Diese Inseln bieten eine Leitstruktur für das neue Knochenwachstum. Die Gewebefaktoren sind knapp in dem Zentrum von CSD vorhanden, was zu einer niedrigen Differenzierung führt. Den Chondrozyten und

Osteoblasten misslingt die Mineralisation der Matrix, wodurch schließlich der Defekt durch fibröses Bindegewebe ersetzt wird [12].

1.2 Epidemiologie segmentaler Knochendefekte

Die häufigsten Knochendefekte nach einer Fraktur finden sich an der Tibia, was daran liegt, dass der geringe Weichteilmantel für offene Frakturen und Knochenverluste prädisponiert [13-16]. Offene Frakturen an den oberen Extremitäten und im Stammskelett sind weniger häufig [17, 18]. Die offenen Frakturen der Tibia führen in 17%-40% der Fälle zu einem relevanten Knochendefekt [19]. In der Studie von Keating et al. waren Frakturen mit Knochenverlust zu 68% an der Tibia und zu 22% am Femur lokalisiert [17]. Bei 69% aller Frakturen mit Knochenverlust lagen die Defekte diaphysär und zu den übrigen Teilen metaphysär oder artikulär [17].

Betroffen sind vorwiegend jüngere Männer nach Hochrasanztraumata [17, 19]. Menschen im höheren Alter erleiden seltener solche Verletzungen [20]. Das Durchschnittsalter der Patienten mit Knochendefekten war 37 Jahre und 71% der Patienten waren männlich [17].

Die Infektsanierung bei chronischer Osteomyelitis kann eine weitere Ursache für Defekte an den langen Röhrenknochen darstellen [21]. Im Vergleich zu geschlossenen Frakturen, liegt bei offenen Frakturen mit bis zu 40% das posttraumatische Infektionsrisiko deutlich höher [22, 23]. Insbesondere an der Tibia besteht aufgrund des geringen Weichteilmantels ein überaus erhöhtes Infektionsrisiko [23, 24].

1.3 Derzeitige Therapieoptionen von segmentalen Knochendefekten

Die Rekonstruktion von ausgedehnten Knochendefekten nach Tumorresektion, Trauma oder Infektion stellt weiterhin ein bedeutsames klinisches Problem dar. Die Rekonstruierbarkeit von segmentalen Knochendefekten hängt u.a. von deren Lokalisation, Größe, Durchblutung und letztlich auch von der Compliance des Patienten ab. Neben der Kallusdistraction nach Ilizarov gibt es noch weitere Verfahren zur Rekonstruktion von segmentalen Knochendefekten. Darunter zählt z.B. der endoprothetische Ersatz, die Masquelet-Technik und die Transplantation von autologer Spongiosa oder von autologen, vaskularisierten Knochengrafts, welche den

"Goldstandard" in dem gewichtstragenden Knochen darstellen [25-28]. Diese Verfahren werden im Folgenden erläutert.

1.3.1 Kallusdistraktion nach Ilizarov

Die Kallusdistraktion mit einem Fixateur externe bietet einige Vorteile. Vor allem hervorzuheben sind die minimale Invasivität und die niedrigen Implantatkosten. Vorteile bietet auch die Option einer abgestimmten Kompression an der Dockingstelle beim Segmenttransport und die Korrektur von etwaigen Fehlstellungen [29-31].

Negativ zu erachten sind die prolongierte Therapiezeit und Rehabilitation, die Bildung von Irritationen und Infektionen an den Eintrittsstellen der Drähte und Pins, sowie die Entstehung von optisch auffälligen Narben. Die bedingte Bewegungseinschränkung und die schmerzhaft Transfixation der Weichteile, führen zu einem geringen Tragekomfort [29, 32].

1.3.2 Endoprothesen

Eine endoprothetische Versorgung führt zu einer verhältnismäßig schnellen Wiederherstellung der vollständigen Belastbarkeit mit bedingt einschätzbarer Funktion. Im Umgang mit Endoprothesen wird v.a. die hohe Kosteneffektivität und die freie Verfügbarkeit wertgeschätzt [33].

Die Möglichkeit von auftretenden Infektionen, Lockerungen und Frakturen durch die Nutzung von Endoprothesen, beeinflussen das Heilungsergebnis negativ [34].

1.3.3 Biologische Rekonstruktionsverfahren

Für die biologische Rekonstruktion von Knochendefekten wird in der Praxis oftmals die Kombination von allogenen und autologen Knochentransplantaten eingesetzt. Bei der Indikationsstellung sind mehrere Faktoren wie Alter, Lokalisation, Vaskularisierung im Bereich des Knochendefektes, Belastbarkeit und andere Gegebenheiten zu berücksichtigen. Die biologisch kombinierte Rekonstruktion aus Allograft und Endoprothese bietet die Vorteile der sicheren Lastübertragung und die Möglichkeit der Weichteilinsertion des Allografts. Dahingegen benötigt ein nicht-vaskularisiertes

Transplantat Zeit um eingebaut zu werden, und birgt dazu auch ein hohes Risiko für Komplikationen, einschließlich Atrophie, Fraktur und Nonunion. [35, 36].

1.3.3.1 Allograft (Fremdknochen)

Mit dem Einsetzen allogener Transplantate ist eine Regeneration der Weichteile und ein knöchernes Einwachsen in das Wirtskelett möglich. Dadurch kann eine Rekonstruktion normaler anatomischer Strukturen mit vergleichbaren biomechanischen Eigenschaften erfolgen [35, 37]. Bei großen Knochendefekten werden allogene Knochentransplantate hingegen nur noch bedingt angewendet.

Komplikationen bestehen v.a. in Ermüdungsbrüche, Resorptionen und Infektionen [38].

1.3.3.2 Autograft (Eigenknochen)

Die Verwendung von autologen Knochentransplantaten, kann in Form von strukturellen oder spongiösen Transplantaten erfolgen [35].

Bei den strukturellen Transplantaten wird zwischen zwei verschiedenen Verfahren unterschieden – zum einen die vaskularisierte Methode mit Gefäßanschluss des Grafts und die nicht-vaskuläre Methode, wo das Graft ohne Gefäßanschluss in den entsprechenden Defekt eingesetzt wird.

Bei der nicht vaskularisierten Knochentransplantation hat der verbliebende Knochen die Möglichkeit, bei Erhalt des Periostschlauchs, vollständig remodelliert zu werden. Auch die kurze Operationsdauer und die verhältnismäßig niedrige technische Herausforderung sprechen für dieses Verfahren [39].

Dahingegen kommt es vergleichsweise zu einer verzögerten Defektheilung im Empfänger Knochen. Im Empfängergebiet kommt es vermehrt zu einer niedrigeren Neovaskularisierungspotenz für den minderdurchbluteten Knochen [40-42].

Bei der vaskularisierten Knochentransplantation ist durch die bessere Blutversorgung eine höhere Vitalität des Knochens gegeben, was zu einem geringeren Gewebeuntergang nach dem Eingriff führt. Dadurch ist eine erhöhte Resistenz gegen

Infektionen und Bestrahlungstherapien vorhanden. Im Empfänger Knochen ist mit Hilfe dieser Methode eine bessere knöcherne Einheilung möglich [43, 44].

Nachteilig ist die aufwendige Operationstechnik und die Möglichkeit eines Verschlusses der Gefäßanastomose, welches dann wiederum einen nicht-vaskularisierten Graft gleicht. Die schwerwiegendste Komplikation im Empfängergebiet stellt der Verschluss der Vene oder Arterie dar. In allen Fällen kommt diese Komplikation in 3-5% und bei chronischen Entzündungszuständen in 7% vor [43, 44].

Die osteogene Potenz von autologer Spongiosa ist hinreichend bekannt und gilt immer noch als Goldstandard in Bezug auf Osteoinduktion und Remodellierung [35, 45].

Allerdings erfordert die Gewinnung von autologer Spongiosa und vor allem eine vaskularisierten Grafts einen zusätzlichen chirurgischen Eingriff und dies ist oft mit einer nicht unbeträchtlichen Entahmemorbidität verbunden. Außerdem ist die verwendbare Menge an autologem Knochen schon aus anatomischen Gesichtspunkten limitiert [35, 45].

Bei größeren Defekten, wie den kritischen Knochendefekten, wurden in den letzten Jahren Knochenersatzstoffe zum Spongiosamaterial hinzugemischt. Die Zusammensetzung der Knochenersatzstoffe kann sich in verschiedenen Parametern unterscheiden. Es muss die Herkunft, Vitalität und die biologische Wertigkeit der Knochenersatzstoffe berücksichtigt werden. Abgesehen von autologem Knochenmarkaspirat, der Spongiosaplastik und verschiedenen Knochentransplantaten, können u.a. auch alloplastische, xenogene Materialien, demineralisierte Knochenmatrix, Biogläser, Keramiken und resorbierbare/nichtresorbierbare Polymere eingesetzt werden. Den „perfekten“ Knochenersatzstoff gibt es zum gegenwärtigen Zeitpunkt allerdings noch nicht [46, 47].

Bei der Masquelet-Technik handelt es sich um eine Modifizierung der Spongiosaplastik, wobei in das Defektlager vorübergehend ein Zementplatzhalter eingesetzt wird [48]. Um den Zementblock bildet sich im Verlauf eine Membran aus, die als Transplantatlager für die transplantierende Spongiosa nach ca. sechs bis 16 Wochen fungiert. In dieser Membran wurden Knochenwachstumsfaktoren in hoher Konzentration nachgewiesen [49]. Es müssen meist zusätzlich interne Osteosynthesen oder ein Fixateur externe zur

Stabilisierung angewendet werden [48, 50]. Die Osteosynthese erfolgt vorwiegend mit einer Marknagelung, einer Platte oder einem Ringfixateur [22, 23, 51].

1.4 Entwicklung von Titan-Mesh-Scaffolds

1986 wurde erstmals ein Titan-Mesh-Scaffold von Harms und Biedermann für die Anwendung in der Wirbelsäulenchirurgie entwickelt. Das ovalförmige Mesh-Cage wurde als intravertebraler Platzhalter eingesetzt und später kommerziell vertrieben [52, 53]. Im Weiteren wurden die Titan-Mesh-Scaffolds auch für Defekte in Röhrenknochen eingesetzt. Cobos et al. beschrieb im Jahr 2000 zwei Fälle, in welchen die durchschnittlichen Tibiadefekte neun Zentimeter lang waren und in einem Schritt anatomisch rekonstruiert werden konnten, sodass die betroffenen Extremitäten unmittelbar nach der Operation bereits belastbar waren [52]. In beiden Fällen wurde eine knöcherne Überbrückung beobachtet und keine weiteren Operationen waren notwendig. Die Implantate mussten die mechanische Stabilität der physiologischen Belastungen widerstehen können und gleichzeitig die Aufnahme des Knochentransplantatmaterials ermöglichen. Die Implantate wurden mit autologen und/oder mit allogenen Knochentransplantaten aufgefüllt und der Knochen mit Marknägeln stabilisiert [52, 54, 55]. Diese einfachen rhombischen Titan-Mesh-Scaffolds wurden im Gegensatz zu den 3D-Laser-gesinterten Titanimplantaten der vorliegenden Studie weder in Ihrer Form, ihrer Größe, noch in Ihrer Gesamtsteifigkeit patientenspezifisch hergestellt [56]. Die Struktur eines Titannetzwerkes beeinflusst die Steifigkeit und diese hat wiederum eine wesentliche Auswirkung auf die knöcherne Integration [57]. Die poröse Struktur des Titan-Mesh-Scaffolds ermöglicht die Diffusion von Flüssigkeit und die Revaskularisierung aus den benachbarten Geweben. Der Titan-Mesh-Scaffold muss die folgenden Voraussetzungen erfüllen: Platzhalterfunktion, Anregung der Geweberegeneration, Biokompatibilität, hohe Primärstabilität und Sterilisierbarkeit [58]. Ob die Steifigkeit und Härte des Titan-Mesh-Scaffolds ähnlich zu dem zu ersetzenden Gewebe sein sollte, ist noch unklar und wird debattiert. Die Meinungen stimmen aber in der Hinsicht miteinander überein, dass die Porengröße und Poreninterkonnektivität die Zelleinwanderung und den Stoffaustausch nicht hindern soll, vielmehr soll es eine unterstützende Funktion einnehmen [59-61]. Mit Hilfe neuer Technologien (dreidimensionale

Fertigungsstrategien) ist die Herstellung von Titanimplantaten (sog. Titan-Mesh-Scaffolds), nach patientenindividuellen Maßstäben, mit den genannten Anforderungen möglich. Mittels Computertomographie kann der Knochendefekt dreidimensional visualisiert und basierend auf diesem Datensatz kann ein Titan-Mesh-Scaffold entworfen werden. Anschließend erfolgt die Herstellung im Sinterungsverfahren. Der Titan-Mesh-Scaffold besteht aus makroporösen, untereinander stark vernetzten Balkenelementen, die je nach Anforderung zusammengestellt werden können. Durch Verändern der Konfiguration der Balkenelemente ist es möglich, die mechanische Umgebung einzustellen [57]. Unter Berücksichtigung der bekannten mechano-biologischen Steuerung der Knochenneubildung können so Titan-Mesh-Scaffolds hergestellt werden, die ein lokales mechano-biologisches Profil aufweisen. Dieses Profil ermöglicht optimale Konditionen für das Einwachsen und für den Erhalt des Knochens [62-64]. Die Behandlung von großen Knochendefekten kann durch die Integration der Knochentransplantate in den Poren des Titan-Mesh-Scaffolds gefördert werden. Die Bereiche der mechanischen Beanspruchungen für eine komplikationslose Bildung der Knochensubstanz wurden zuvor festgelegt [65]. Große Knochendefekte führen jedoch zu einer signifikanten Reduktion des mechanischen Belastungsbereiches, wo der Knochenheilungsprozess stattfindet [66]. Es ist zu erwarten, dass das Knochentransplantatmaterial die notwendigen biologischen Signale liefert, die den Knochenheilungsprozess einleiten. Es bleibt jedoch unklar, ob die mechanische Umgebung eine bedeutende Rolle bei der Knochenneubildung spielt. Solche Kenntnisse sind der Schlüssel bei der Gestaltung des Titan-Mesh-Scaffolds als Alternative zu derzeitigen und mitunter suboptimalen Behandlungsstrategien.

1.5 Kritische Knochendefektmodelle

Bei der Auswahl einer bestimmten Tierart zur Verwendung in einem kritischen Knochendefektmodell (Critical Size Defect - CSD) muss eine Reihe an Faktoren berücksichtigt werden. Im Vergleich zum Menschen sollte das gewählte Tiermodell sowohl signifikant physiologische, als auch pathophysiologische Ähnlichkeiten zeigen. Mehrere Veröffentlichungen der letzten Jahrzehnte haben Hunde als ein geeignetes Modell für die Forschung im Zusammenhang mit menschlichen orthopädischen Bedingungen beschrieben [67-70]. Calhoun et al. war der erste, der eine gut kontrollierte

Untersuchung von CSDs in den Mandibeln von Mischlingshunden vorstellte. Defekte wurden durch die einseitige Entfernung des vierten Prämolaren und seines zugehörigen Knochens (ca. 15 mm) präpariert. Intraorale und extraorale Zugänge zum Unterkiefer wurden angewandt, während die Fixierung entweder mit einer extraoralen Schiene aus rostfreiem Stahl oder einer internen Fixierungsplatte erreicht wurde [71, 72]. Die Vorteile des Hundemodells sind dadurch geprägt, dass sie eine menschenähnliche Knochenmineraldichte besitzen und über eine fügsame Natur verfügen [67-70].

Niederlohmann hat ein kritisches Knochendefektmodell in der Maus entwickelt. Er hat einen externen Fixateur (MouseExFix, RISystem, AO Research Institute Davos, Schweiz) verwendet, welcher am rechten Femur angebracht wurde. Mit dem verwendeten MouseExFix-System konnte man einen 3 mm großen Defekt erzeugen, welcher die präklinische Begutachtung von Konzepten zur lokalen Knochenregeneration ermöglichte [73].

Anderson et al. zeigten in ihrer Studie, dass mittels eines einfachen und reproduzierbaren chirurgischen Verfahrens, in den Darmbeinflügeln ausgewachsener Ziegen, kritische Knochendefekte erzeugt werden können, um Knochentransplantate und Knochenersatzmaterialien zu evaluieren. Die Ziege wurde ausgewählt, weil sie ein großes Tier ist und im Vergleich zu Ratten oder Kaninchen, die in anderen kritischen Defektstudien untersucht wurden, eine Knochenbildungsrate aufweist, die mit der des Menschen ähnlicher und damit vergleichbarer ist. In dieser Studie wurden kritische Knochendefekte mit einem Durchmesser von 17 mm erzeugt. [74].

Das kritische Knochendefektmodell im Schaf hat die Vorteile, dass die Schafe ein ähnliches Körpergewicht entsprechend dem Menschen besitzen und dass sie fügsame Tiere sind. Zusätzlich erlaubt die Dimension des Röhrenknochens das Einsetzen menschlicher Implantate [68-70, 75]. Mastrogiacomo et al. verwendete in seinem kritischen Defektmodell 18 Schafe im Alter von zwei Jahren. Der Defekt wurde auf der medialen Seite der Tibia in einer Größe von 4,8 cm geschaffen. Eine Stahlplatte (10-12 Löcher von 4 mm Durchmesser für 4,5 mm Schrauben) wurde auf dem Knochen angebracht, um die erforderliche mechanische Stabilität zu erhalten [76].

1.6 Zielstellung

- Das Ziel der Arbeit war zu untersuchen, ob die Stabilisierung eines kritischen, segmentalen Knochendefekts von 4 cm Ausdehnung in der Schafstibia mit der Kombination aus einem Titan-Mesh-Scaffold und einer winkelstabilen Platte erfolgreich zu rekonstruieren und dauerhaft zu stabilisieren ist.
- Als weiteres Ziel galt es in diesem Modell zu analysieren, ob die Modifikation des Titan-Mesh-Scaffolds hinsichtlich seiner Steifigkeit einen Einfluss auf die Knochenregeneration hat.

1.7 Hypothesen

- Vier Zentimeter messende segmentale Knochendefekten in der Schafstibia können durch das Einbringen eines angepassten und mit autologer Spongiosa gefüllten Titan Mesh Scaffolds und der zusätzlichen Stabilisierung mit einer winkelstabilen Platte zur Ausheilung gebracht werden.
- Die unterschiedlichen Steifigkeiten der 3D-Laser-gesinterten Titan-Mesh-Scaffolds zeigen bei großen segmentalen Knochendefekten im Schafsmodell einen unterschiedlichen radiologischen Heilungsprozess bzw. ein unterschiedliches radiologisches und histologisches Heilungsergebnis.

2 MATERIAL UND METHODEN

2.1 Tiermodell

Das Großtiermodell mit Schafen wurde für klinisch realistische Knochendefekte an Femur und Tibia bereits entwickelt und validiert [70, 77, 78]. Dadurch wird ein klinisch relevanter Vergleich etablierter Materialien, Methoden sowie die Untersuchung neuer Verfahren ermöglicht [79]. Für die Studie wurde ein Großtiermodell mit Schafen gewählt, aufgrund ihres menschenähnlichen Körpergewichts, Knochen-Dimensionen und Knochenumbau [68]. Hiermit wurde eine Studie von Defekten kritischer Größe (d.h. die Defektgröße übersteigt zweifach den Durchmesser des betroffenen Knochens) im Großtiermodell durchgeführt, die den anspruchsvollen klinischen Situationen ähneln. Das verwendete Großtiermodell bestand aus 15 weiblichen Merino-Mix-Schafen mit einer Defektgröße von 4 cm. Die Defekte wurden mittels Kombination aus Titan Mesh Scaffold und winkelstabiler Plattenosteosynthese rekonstruiert.

2.2 Das Titan-Mesh-Scaffold Design

In dieser Studie wurde mittels der Technologie des Laser Sinterings (Rapid Manufacturing) ein defektfüllender Titan-Mesh-Scaffold verwendet.

Im Rahmen der individualisierten Behandlung von Patienten mit großen Knochendefekten können heute individuelle, dem Defekt angepasste Titan-Mesh-Scaffolds konstruiert werden. Insbesondere in der Neurochirurgie als auch in der Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie finden diese Implantate bereits verbreiteten Einsatz. Der klinische Einsatz zur Rekonstruktion von segmentalen Knochendefekten bei unfallchirurgisch-orthopädischen Patienten ist von großer Bedeutung und hat ein bedeutendes Entwicklungspotential. Zur Evaluation dieses Potentials und derjenigen Parameter, die im Resultat zu einer besseren Performance der Technik führen könnten, haben wir Titan-Mesh-Scaffold in standardisierter Größe und Form verwendet. Für die Überprüfung des biomechanischen Aspektes der Studie ist es notwendig, dass standardisierte Untersuchungsbedingungen hinsichtlich der Defektgröße, -lokalisierung und der Titan-Mesh-Scaffold Größe vorliegen. Diese zeigten, bezogen auf die Schafstibia, eine nahezu anatomische Passform. Die Länge des Titan-Mesh-Scaffolds

betrug 40 mm und der Durchmesser des runden Querschnitts 20 mm (Abbildung 1). Im zentralen Anteil des Titan-Mesh-Scaffolds wurde ein Kanal belassen. Der Kanal hatte einen Durchmesser von 10 mm. Um eine knöcherne Integration zu erlauben, bestand der Titan-Mesh-Scaffold aus einem definiertem hochporösen Gitternetzwerk mit größtmöglicher Interkonnektivität der Poren. Dieses Netzwerk hatte eine klassische Honigwabenstruktur. Diese Gestaltung wurde wegen ihrer günstigen Elastizitätseigenschaften und wegen ihrem guten Widerstand gegen Druck und gegen Biegebelastungen gewählt [57]. Das Gitternetzwerk (mesh) erlaubte die Befüllung mit autogener Spongiosa, die in diesem Falle aus den beiden Beckenkämmen der Schafe gewonnen wurde. Durch die mechanische Modifikation der Gitternetzstreben (struts) konnte die biomechanische Steifigkeit des Konstruktes modifiziert werden. Insgesamt wurden in dieser Studie zwei Titan-Mesh-Scaffolds mit unterschiedlicher Steifigkeit verwendet. Beide Titan-Mesh-Scaffolds wurden so entwickelt, dass die mechanische Stabilität im Rahmen der physiologischen Belastungen war. Je rigider das Titan-Mesh-Scaffold im Verhältnis zum Knochen ist, desto stärker ausgeprägt findet eine Inaktivitätsatrophie (stress-shielding) und folglich ein Knochenabbau statt [80]. Bei der Konstruktion der Titan-Mesh-Scaffolds wurde darauf geachtet, dass der weichere Titan-Mesh-Scaffold eine minimale Inaktivitätsatrophie (stress-shielding) aufweist, während der härtere Titan-Mesh-Scaffold durch die verkleinerte Fenestrierung immer noch eine unkomplizierte Aufnahme des Knochentransplantatmaterials ermöglicht. Zu diesem Zweck wurde einmal 1,2 mm für den weicheren - und einmal 1,6 mm für den steiferen Titan-Mesh-Scaffold als Strebendurchmesser (beam diameter) gewählt (Abbildung 1). Daraus resultiert eine Steifigkeit von 0,84 GPa (weich), 2,88 GPa (hart) und eine Porosität von 82% (weich), 73% (hart). Finite Element Berechnungen zeigten, dass in beiden Titan-Mesh-Scaffolds die höchsten Spannungen auf der lateralen Seite, gegenüberliegend der Fixierplatte auftreten [1]. Dazu passend wurden die höchsten Spannungen innerhalb des Kallusgewebes ebenfalls auf der lateralen Seite des Konstruktes festgestellt. Die maximale Von-Mises-Spannung liegt, bei kombinierter Biegezug- und Druckfestigkeit, in beiden Titan-Mesh-Scaffolds mit Plattenosteosynthese (LCP) unter der Streckgrenze des Werkstoffes (weicher Titan-Mesh-Scaffold + LCP: 350 MPa, harter Titan-Mesh-Scaffold + LCP: 200 MPa, Streckgrenze des Werkstoffes 600 MPa) [1].

Die mechanische Kompetenz des Titan-Mesh-Scaffolds in Kombination mit Plattenosteosynthese erlaubte die postoperative Belastung des Konstruktes.

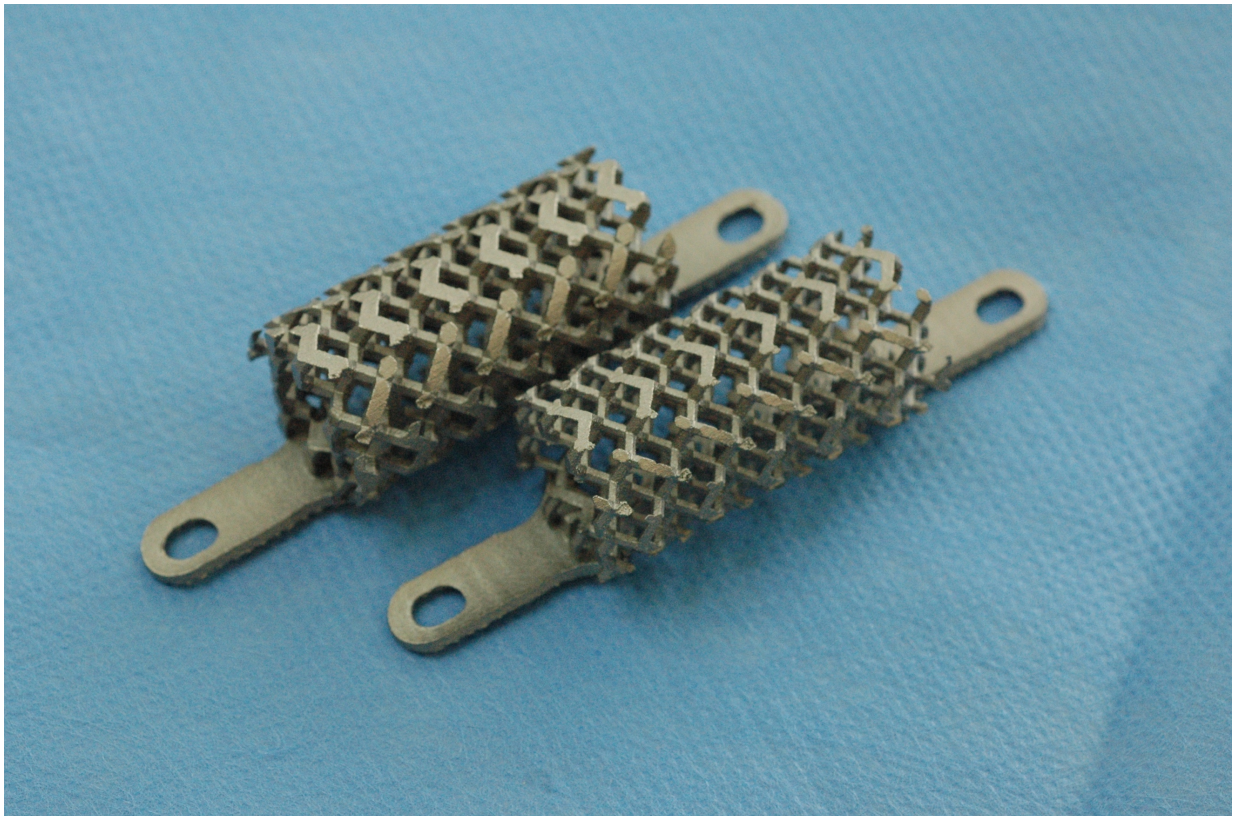


Abbildung 1: Darstellung der beiden verwendeten Titan-Mesh-Scaffolds. Der Titan-Mesh-Scaffold besaß eine Strebendicke von 1,6 mm (linker Titan-Mesh-Scaffold) bzw. eine Strebendicke von 1,2 mm (rechter Titan-Mesh-Scaffold).

2.3 Fixateur interne

In dieser Studie wurde ein interner Plattenfixateur (Stahl, Breite der Locking Compression Plate - LCP 4,5 mm, 9 Loch, DePuy Synthes, Salzburg, Austria) mit dynamischen Kopfverriegelungsschrauben verwendet (5.0 DLS, DePuy Synthes, Salzburg, Austria). Der Einsatz von winkelstabilen Plattenosteosynthesen (LCP) gehört heute zum absoluten Standard in der Unfallchirurgie. Die Platten können minimalinvasiv eingebracht werden [81] und der Frakturspalt bleibt von der Platte überbrückt und unangetastet. Es wird in der Regel eine indirekte Frakturposition angewendet, demzufolge schont man die Blutversorgung, Weichteile und die mikrovaskulären Strukturen. Aus diesem Grund wurde diese minimalinvasive Operationstechnik in der Kombination mit der Plattenkonstruktion (LCP+DLS), als biologische Plattenosteosynthese benannt [82].

Die dynamische Kopfverriegelungsschraube (Dynamic Locking Screw – DLS) behält die Vorteile der üblichen Winkelstabilität bzw. wird durch dynamische Komponenten ergänzt [83]. Der Schraubenkopf (Platten-Schrauben-Interface) ist über einen Stift mit einer Gewindehülse (Schrauben-Knochen-Interface) verbunden. Durch das Spiel zwischen Gewinde und Stift wird eine zusätzliche Bewegung zwischen Knochen und Platte ermöglicht (Abbildung 2) [84].

Bei einer konventionellen Plattenosteosynthese kommt es zu einer asymmetrischen Frakturbewegung, die dynamische Kopfverriegelungsschraube lässt eine gleichmäßige Frakturbewegung an der Gegenkortikalis und zugewandten Kortikalis zu (trans- und ciscortex).

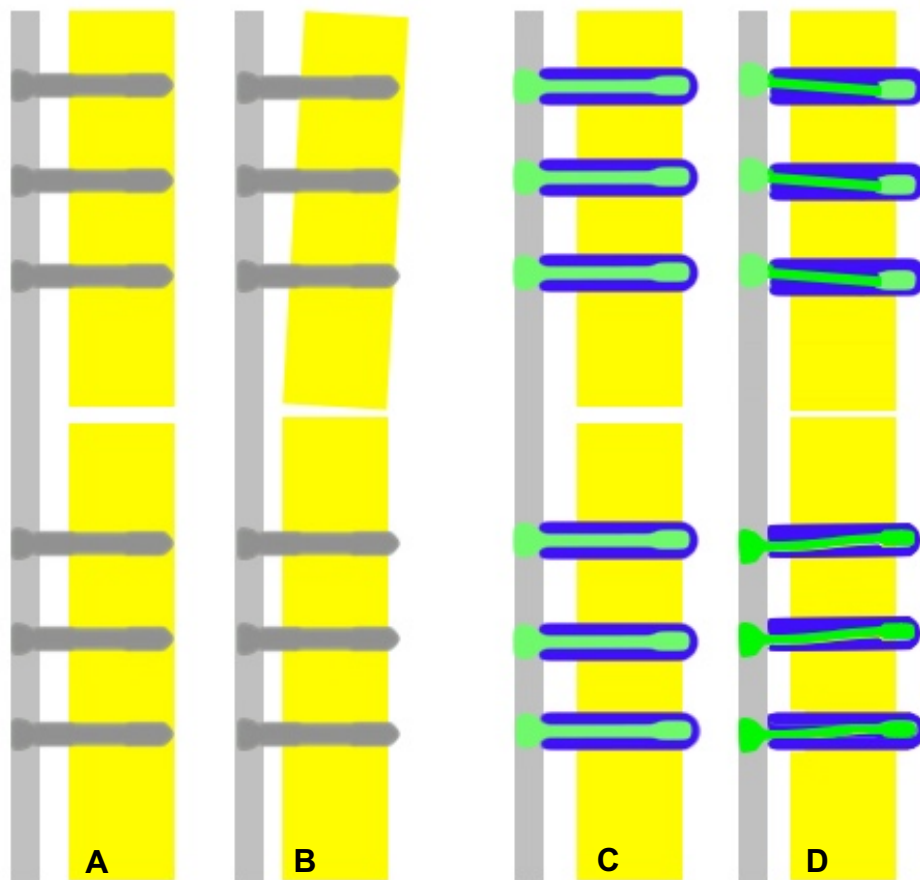


Abbildung 2: Schematische Darstellung der Plattenosteosynthese ohne und mit dynamischer Kopfverriegelungsschraube (A-D): Osteosynthese mit Kopfverriegelungsschraube ohne (A) und mit axialer Belastung (B), Osteosynthese mit dynamischer Kopfverriegelungsschraube (DLS) ohne (C) und mit axialer Belastung (D). Modifiziert nach Döbele, S. et al. [83, 84].

2.4 Gruppeneinteilung

Die Tiere wurden in zwei Gruppen mit jeweils sieben Schafen eingeteilt. Eine zusätzliche Gruppe mit einem Schaf diente als Positivkontrolle, in welchem der Defekt mit einem um 180 Grad gedrehten autologen Knochentransplantat gefüllt wurde (Tabelle 1).

Tabelle 1: Gruppeneinteilung

Gruppe	Defektfüllung	Stabilisierung	Titan-Mesh-Scaffold Füllung	Anzahl Tiere
1	Strebendicke: 1,2 mm Steifigkeit: 0,84 GPa	4,5 mm LCP + 5.0 DLS	7,5 ml autologe Spongiosa	7
2	Strebendicke: 1,6 mm Steifigkeit: 2,88 GPa	4,5 mm LCP + 5.0 DLS	7,5 ml autologe Spongiosa	7
3 (Kontrolle)	Autologes Knochentransplantat	4,5 mm LCP + 5.0 DLS	Autologes Knochentransplantat	1

2.5 Tierhaltung

In der Untersuchung (Tierversuchsantragsnummer G0172/12, Landesamt für Gesundheit und Soziales/Abteilung Veterinärwesen Berlin) wurden 15 weibliche Merino-Mix-Schafe (mittleres Gewicht 61 kg; Standardabweichung ± 6 kg; Alter $\geq 2,5$ Jahren) herangezogen. Die Tiere wurden im Laufe des Versuchs in der Tierexperimentellen Einrichtung der Charité, Campus Virchow-Klinikum untergebracht. Während der gesamten Untersuchungsdauer wurden die Ställe klimatisiert. Die durchschnittliche Raumtemperatur betrug zwischen 17 und 20 °C. Die Tiere wurden in Kleingruppen gehalten.

Der Gesundheitszustand der Tiere wurde nach der Anlieferung überprüft. Die Ställe wurden mit Stroh und Hobelspänen eingestreut. Der Einstreu wurde einmal wöchentlich erneuert. Die Schafe wurden zweimal täglich mit Heu gefüttert. Die Tiere bekamen Wasser ad libitum aus den Selbsttränken. Um die Schafe durch positive Konditionierung an die Experimentatoren, sowie das Handling während des Versuches zu gewöhnen wurden Äpfel, Möhren und Kraftfutter verfüttert. Die Tiere wurden präoperativ sukzessive an das Gurtsystem sowie an den Verbandswechsel gewöhnt, bis diese die Maßnahmen stressfrei tolerierten.

2.6 Operatives Vorgehen

2.6.1 Operationsvorbereitung und Narkose

Die Tiere wurden ca. 12 Stunden vor der Narkose nüchtern gehalten. Wasser wurde in diesem Zeitraum weiterhin ad libitum zur Verfügung gestellt.

Der Gesundheitszustand der Schafe wurde vor Narkoseeinleitung überprüft. Über eine Venenverweilkanüle (Größe 1.3 x 45 mm, 18 GA, BD Venflon™ Pro, Becton Dickinson Therapy, Helsingborg, Schweden) in der V. cephalica antebrachii der rechten Vordergliedmaße, wurde je nach Körpergewicht und Wirkung zwischen 0,5 und 1,5 mg Thiopental- Natrium (Trapanal® Altana Pharma GmbH, Konstanz, Deutschland) injiziert. Während der Applikation wurden die Reflexe der Tiere kontrolliert. Mithilfe eines Laryngoskops (Laryngoskopgriff Mc. Intosh, Freiburger Model, Sonderlaryngoskopspatel Modell Foregger 30 cm für Tiere, RGQ, Tuttlingen, Deutschland) und eines Trachealtubus (Hi- Contour™, 9,0 mm Breite, 33 mm Länge, Mallinckrodt Medical, Athlone, Ireland), wurden die sedierten Schafe intubiert. Der Cuff wurde geblockt und das Tubusende wurde im linken Maulwinkel mittels Klebeband (Leukoplast®, 1,25 cm Breite, BSN medical GmbH & Co. KG, Hamburg, Germany) befestigt. Eine Magen-Schlundsonde (Willy Rüschi AG, Kernen, Deutschland, Durchmesser 14 mm) diente zum Ablassen des entstandenen Gases aus dem Pansen. Die Augen der Tiere wurden unter der Verwendung von Bepanthen® Augensalbe (Je-napharm®, Jena, Deutschland) vor dem Austrocknen geschützt. Während der Operation, wurden die Schafe mit einem Inhalationsnarkosegerät (Ventilator 711, Siemens, Berlin, Deutschland) beatmet, welches aus einer Gasmischung mit Lachgas (20-40 % N₂O, O₂Linde® Gas Therapeutics GmbH & Co. KG, Unterschleißheim, Deutschland), 2 % Isofluran, Forene®, Abbott GmbH & Co. KG, Wiesbaden, Deutschland) und Sauerstoff (ca. 50 % O₂ Linde® Gas Therapeutics GmbH & Co. KG, Unterschleißheim, Deutschland) bestand. Das Atemzugvolumen betrug ca. 10 - 15 ml/kg Körpergewicht, bei einer eingestellten Atemfrequenz von ca. 14 - 20 Atemzügen pro Minute. Während des gesamten Operationsverlauf, wurde ein Monitoring der Herzfrequenz, des Blutdrucks und der peripheren Sauerstoffsättigung durchgeführt. Als antibiotische Abschirmung wurden Sulbactam-Natrium (1094 mg), Ampicillin-Natrium (2128 mg) (3 g Unacid®, Pfizer Pharma GmbH, Karlsruhe, Deutschland), als Flüssigkeits- und Elektrolytersatz 1000 - 3000 ml Infusionslösung (Jonosteril®, Fresenius Kabi, Bad Homburg v.d.H., Deutschland)

und Volulyte 6% 500 ml (Fresenius Kabi Deutschland GmbH D-61346 Bad Homburg) intravenös verabreicht.

Das Schaf wurde auf dem Operationstisch mit Gurten fixiert und mit Kissen gepolstert. Im Bereich des linken Vorderbeins wurde die Haut rasiert und mit Alkohol entfettet bevor ein Durogesic SMAT 75ug/h Fentanyl® Pflaster (Janssen-Cilag GmbH, Neuss, Deutschland) mittels Pflasterklebestreifen auf der Haut fixiert wurde. Die Operationsfelder wurden rasiert, desinfiziert (Polividon-Iod, B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland) und mit sterilen Operationstüchern (Steri-Drape™, Firma 3M Health Care, Neuss, Germany) abgedeckt. Vor dem ersten Hautschnitt bekam das Tier zur Analgesie im Bolus i.v. 2 - 3 ml Fentanyl®- Janssen 0,5 mg (Janssen-Cilag GmbH, Neuss, Deutschland). Die Analgesie wurde durch wiederholte Bolusgaben während der Narkose aufrechterhalten.

2.6.2 Die Gewinnung der autologen Spongiosa

Die Tiere wurden in der Brust-Bauch-Lage zur Gewinnung der autologen Spongiosa gelagert. Steriles Abwaschen und steriles Abdecken der Operationsfelder mittels Skalpell (21er Klinge, FEATHER SAFETY RAZOR Co., LTD, Osaka, Japan) wurde die Haut jeweils über dem Beckenkamm geöffnet. Die Crista iliaca wurde über den ca. 7 cm langen Hautschnitt frei präpariert. Die ansetzenden Muskeln wurden von Beckenkämmen abgelöst und der Knochen wurde mithilfe von Hammer und Meißel aufgespreizt. Als nächstes wurde die Spongiosa mit einem scharfen Löffel entnommen und in eine Knochenmühle eingefüllt (Abbildung 3 A-B). Die Spongiosa wurde mithilfe der Knochenmühle zerkleinert (Abbildung 3 C) und in den Titan-Mesh-Scaffold eingesetzt. Die geöffnete Kortikalis wurde mit Einzelhäften adaptiert (VICRYL Plus 1, Polyglactin, JOHNSON & JOHNSON Medical Products Wien, Österreich). Es wurde ein schrittweiser Wundverschluss durchgeführt. Zunächst wurde die Unterhaut (VICRYL Plus 3-0, Polyglactin, JOHNSON & JOHNSON Medical Products Wien, Österreich) und anschließend die Haut (Prolene 3-0, Ethicon GmbH, Norderstedt, Deutschland) fortlaufend genäht.

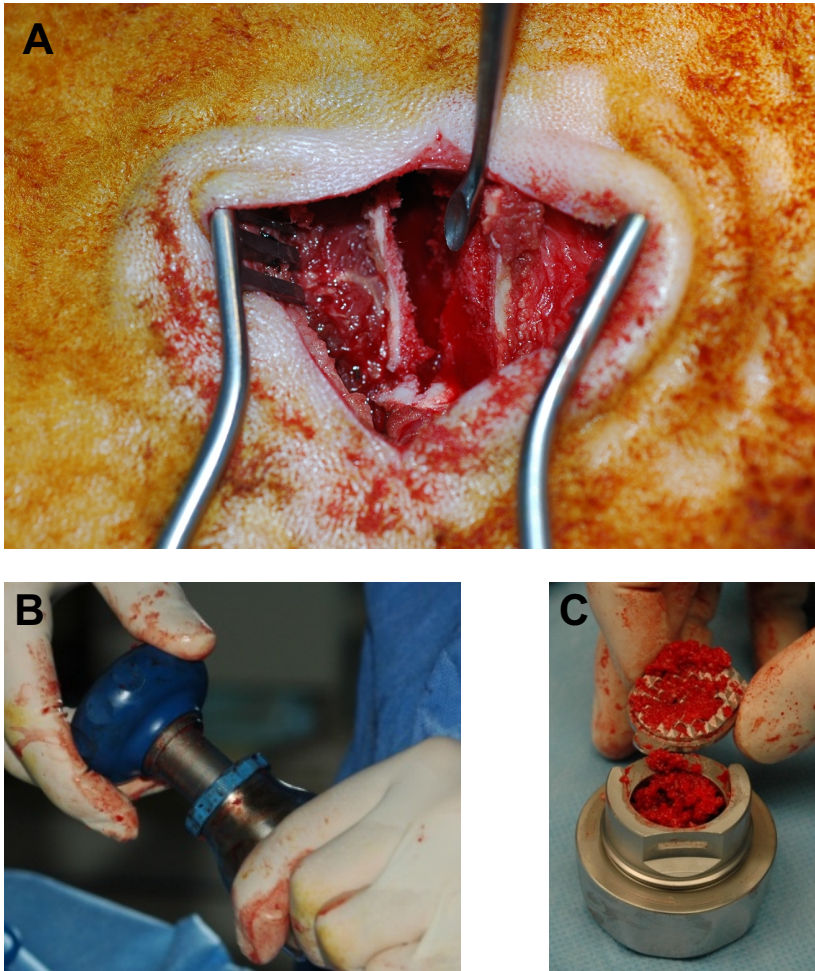


Abbildung 3: Darstellung der Gewinnung der autologen Spongiosa (A-C): Entnahme der Spongiosa (A). Befüllung der Knochenmühle mit dem Knochenmaterial (B). Darstellung der gemahlene Spongiosa (C).

2.6.3 Defektsetzung, Stabilisierung

Nach Gewinnung der autologen Spongiosa erfolgte eine Umlagerung des Tiers auf die rechte Körperseite. Dabei wurde das linke Bein nach vorne angebunden. Das zu operierende rechte Bein wurde mit der medialen Seite nach oben auf einen Tisch gelagert, um einen stabileren Zugriff zu ermöglichen (Abbildung 4).



Abbildung 4: Darstellung über die Lagerung des Schafes:
Das Tier liegt auf der rechten Körperhälfte.

Steriles Abwaschen und Abdecken des gesamten linken Hinterlaufes. Die Haut über der Tibia wurde mit einem Skalpell (21er Klinge, FEATHER SAFETY RAZOR Co., LTD, Osaka, Japan) in der Länge von einem zehn Zentimeter langen Hautschnitt geöffnet und subkutane Gewebe mittels eines Elektrokauters bis zur Tibia frei präpariert (Abbildung 5 A). Die neun Loch Stahl-Platte wurde mit Hilfe einer Biegepresse (Gebrüder Martin GmbH & Co. KG, 78532 Tuttlingen, Deutschland) durch ein leichtes Biegen an die anatomische Form der Tibia angepasst. Die ersten zwei DLS-Schrauben (von distal nach proximal zählend das zweite und dritte Loch auf der LCP Platte) wurden auf dem distalen Knochen befestigt. Dazu wurde ein Spiralbohrer (Durchmesser: 4,3 mm), eine Druckluft betriebene Bohrmaschine (Fa. DePuy Synthes, Schweiz) und eine Führungsbüchse verwendet. Als

Nächstes wurde (von distal nach proximal zählend das achte Loch der LCP) zur temporären Fixation von Bruchfragmenten der Kirschner-Draht gesetzt (Abbildung 5 B). Durch die stabile Fixierung der Sägeschablone mit einer Schraube am Knochen, wurde es ermöglicht, einen exakt vier Zentimeter großen Knochendefekt zu setzen (Abbildung 5 C). Dabei wurden eine oszillierende Säge unter Wasserkühlung sowie zwei Homann-Haken zum Schutz des Weichteilgewebes verwendet. Danach wurde der Titan-Mesh-Scaffold (Abbildung 5 D-F) mit den Laschen nach kaudal in den entstandenen Knochendefekt eingesetzt. Anschließend wurde mittels eines Spiralbohrers (Durchmesser: 3,5 mm) der Plattenspanner proximal befestigt (von distal nach proximal zählend in dem neunten Loch der LCP). Die LCP wurde damit distal fixiert und der Plattenspanner proximal fixiert. Der Plattenspanner wurde angezogen und bewirkte damit eine Vorspannung auf den Titan-Mesh-Scaffold (Press-Fit Implantation) aus (Abbildung 6). Die folgende DLS wurde in das siebte Schraubenloch eingesetzt (von distal nach proximal zählend das siebte Loch auf der LCP Platte). Als Nächstes wurde der Kirschner-Draht entfernt und durch eine Schraube ersetzt (von distal nach proximal zählend das achte Loch der LCP). und der anschließend entfernte Plattenspanner wurde durch eine DLS ersetzt. Als Letztes wurde die DLS in das erste Loch gesetzt (von distal nach proximal zählend das erste Loch der LCP). Erst nachdem alle sechs DLS- Schrauben festgezogen waren, wurde die Titan-Mesh-Scaffold mit Kleinfragmentschrauben (Durchmesser: 3,5 mm) befestigt (Abbildung 7).

Die Defektsetzung bei dem Tier aus Gruppe 3 erfolgte grundsätzlich in gleicher Weise. Allerdings erfolgte die Füllung des 4 cm Defektes durch das Resektat, welches um 180 Grad gedreht in den Defekt wieder eingesetzt wurde. Nach dem Einsetzen wurde das Resektat mit einer DLS Schraube stabilisiert und die zusätzliche Fixierung des Beins erfolgte wie in den anderen Gruppen mit der LCP Platte und weiteren sechs DLS Schrauben.

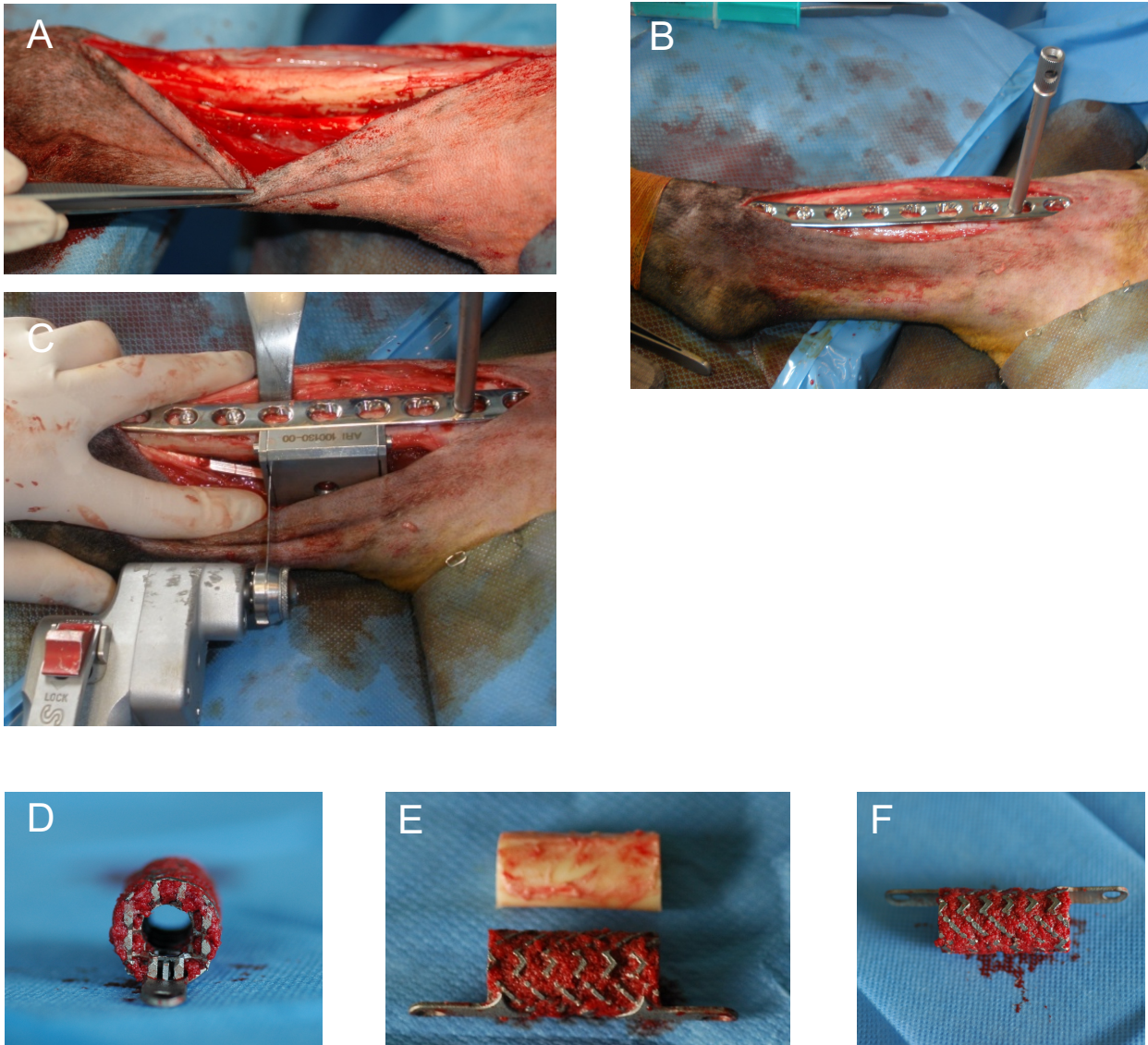


Abbildung 5: Darstellung des Operationsablaufes (A-F): Tibia wurde vom Gewebe befreit (A). Der Kirschner-Draht wird eingesetzt (B). Die Sägeschablone wird eingesetzt (C). Sicht durch die Pore (D). Der gefüllter Titan-Mesh-Scaffold und entnommenes Knochenfragment werden vergleichend dargestellt (E). Darstellung des gefüllten Titan-Mesh-Scaffolds (F).



Abbildung 6: Darstellung des Plattenspanners: Der Plattenspanner wird angezogen.

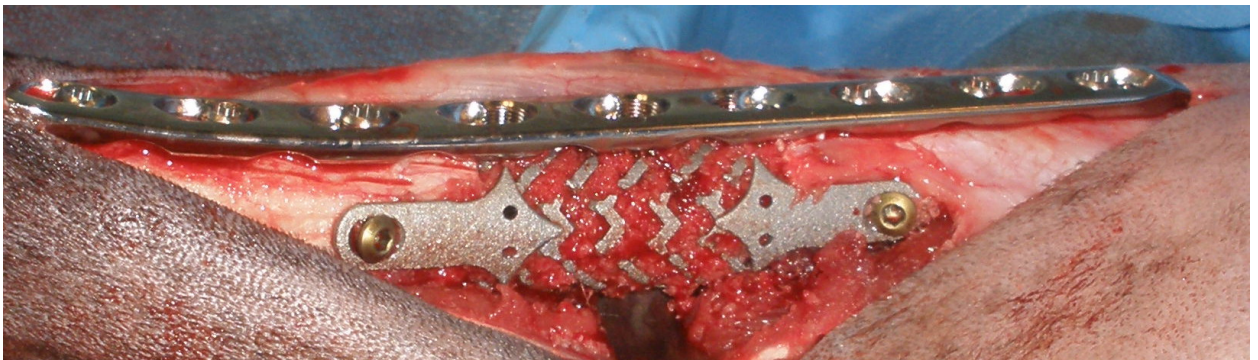


Abbildung 7: Darstellung des befestigten Titan-Mesh-Scaffolds und der aufliegenden LCP mit den DLS Schrauben

2.6.4 Narkoseausleitung und postoperative Versorgung

Nach der Anfertigung von Röntgenaufnahmen im mediolateralen und anteroposterioren Strahlengang, wurde für das rechte Hinterbein ein Halbschalencastverband aus Gips angefertigt. Zur Narkoseausleitung wurde das Tier mit reinem Sauerstoff beatmet. Das Monitoring erfolgte unter permanenter Beobachtung während der Operation, bis das Tier selbständig stabil atmete. Nachdem der Tubus gezogen wurde, wurde das Tier in den Stall überführt. Dort wurde das Tier auf einem Heuballen, mit einem unterstützenden Gurtsystem, gelagert (Abbildung 8). Nach der weiteren Beobachtung der Nahrungsaufnahme im Gurtsystem, konnte das Tier nach ca. 2 Stunden wieder ohne Hilfe stehen und wurde daraufhin in die Einzelbox entlassen.



Abbildung 8: Darstellung des Schafs nach der Operation: Das Schaf befindet sich im Gurtsystem und wird unterstützend auf einem Heuballen gelagert.

2.7 Nachsorge

In den darauffolgenden sieben Tagen erhielten die Tiere täglich s.c. Finadyne 2,2ml/50kg (Finadyne[®], RP, Flunixin-Meglumin, Essex Pharma GmbH, München, Deutschland) zur Analgesie. Zusätzlich wurden bis zum Fadenzug (14 Tage nach dem Eingriff) alle zwei Tage s.c. Veracin RS 3ml/50kg (Albrecht GmbH 88323 Aulendorf) als Antibiose verabreicht. Drei Tage nach dem Eingriff wurde dem Tier ein weiteres Fentanyl- Pflaster (Durogesic[®] SMAT, 75 µg/ h, Janssen- Cilag GmbH, Neuss, Deutschland) zugeführt. Der Verband wurde wöchentlich erneuert. Zur Kontrolle des Heilungsverlaufes wurden im monatlichen Abstand Röntgenaufnahmen in zwei Ebenen (anteroposterior und mediolateral) angefertigt.

2.8 Euthanasie und Gewinnung der Präparate

Nach einer Standzeit von 24 Wochen wurden die Tiere getötet. Dazu wurden jeweils 2,5 g Thiopental- Natrium über einen venösen Zugang verabreicht, wodurch die Schafe in eine tiefe Narkose versetzt wurden bis zum Ausfall der Reflexe und der Atmung. Anschließend erhielten die Tiere 100 ml Kaliumchlorid i.v. (7,45 %, B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland), was den Herzstillstand verursachte. Der Tod des jeweiligen Tieres wurde durch Auskultation überprüft. Anschließend wurden im Sektionsraum die Tibiae vorsichtig von Muskeln und Fettgewebe frei präpariert und vom Kniegelenk und Tarsokruralgelenk abgetrennt (Abbildung 9) Anschließend wurden Röntgenaufnahmen mit dem Implantat in zwei Ebenen (anteroposterior und mediolateral) angefertigt. Dann wurden die Metaphysen abgesetzt.

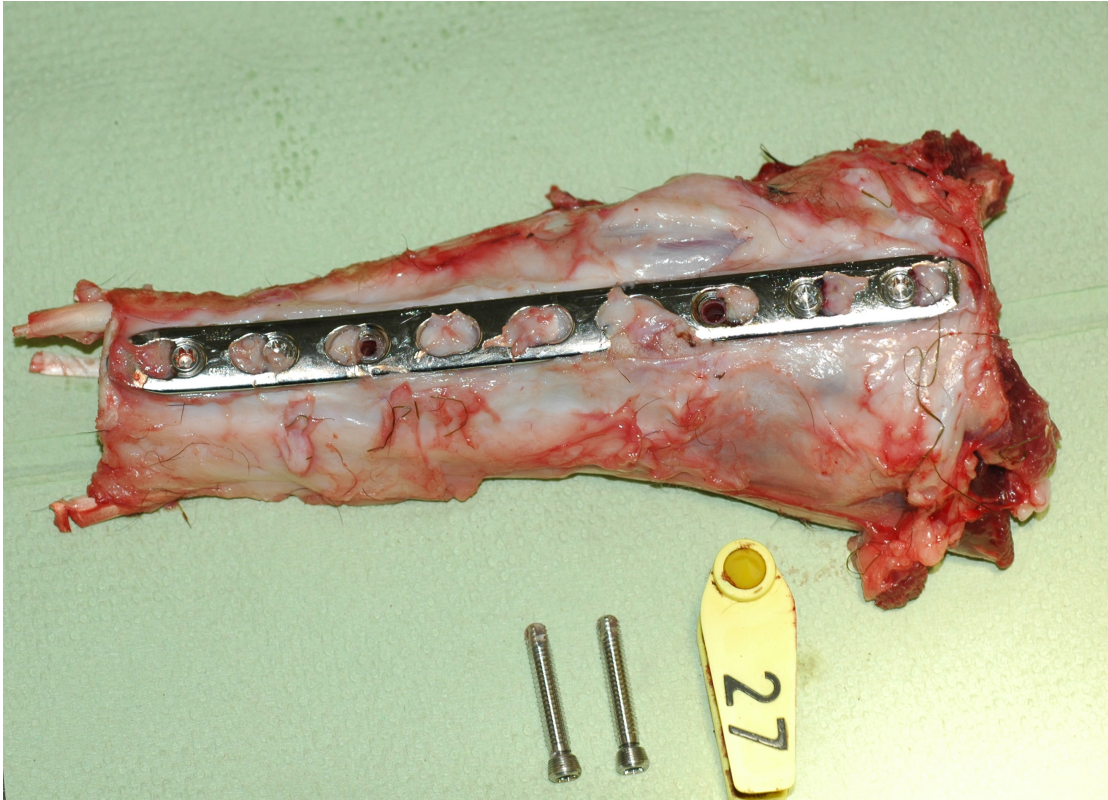


Abbildung 9: Exemplarische Darstellung eines Präparates: Die Tibia wurde abgetrennt und es wurden zwei, dem Osteotomiedefekt angrenzende, DLS Schrauben entfernt.

2.9 Histologische Aufarbeitung der Präparate

2.9.1 Fixierung und Sägen der Präparate

Damit das Kallusgewebe bis zu dem Tag des Sägens ausreichend in dem Titan-Mesh-Scaffold fixiert blieb, wurden zwei dem Osteotomiedefekt angrenzende DLS Schrauben entfernt (Abbildung 10). Die Tibiae wurden in eine 10 %iges Formaldehyd-Alkohol-Lösung (Zusammensetzung: 324 ml 37 %iges Formaldehydlösung, 550 ml 100 %iges Ethanol, 130 ml 0,1 molarer Barbitol- Natrium-Puffer, und 6g Glukose) für einen Tag im Kühlschrank bei 4°C fixiert. Am nächsten Tag wurde das Präparat vor dem Sägen eine Stunde lang mittels Leitungswasser gewässert. Anschließend wurden vorsichtig die DLS Schrauben und die LCP Platte entfernt und die proximalen und distalen Tibiaenden mit Hilfe einer Säge (Makrotrennschleifsystem, Exakt, Norderstedt, Deutschland) abgesägt. Der Sägeschnitt wurde senkrecht zur Tibialängsachse durch den ehemaligen Schraubenkanal, der jeweils proximal und distal dem Scaffold angrenzenden Schraube, durchgeführt (Abbildung 11). Dann wurden die anterioren und posterioren Tibiahälften cranial mit Bleistiftmarkierungen versehen, damit die Tibiahälften auseinandergehalten werden können (Abbildung 12). Als Nächstes wurde die Tibia parallel zur Tibialängsachse, von medial nach lateral, entlang der ehemaligen Schraubenkanäle, halbiert (Abbildung 13 und Abbildung 14). Damit entstanden die nachfolgenden zwei Blöcke: anteriorer Block S1 und posteriorer Block S2. Nicht mehr benötigtes Muskelgewebe und Bindegewebe wurde vorsichtig lateral, kranial und kaudal entfernt. Die gewonnenen Präparate, wurden für weitere fünf Tage in frisch angesetzter Fixierlösung gelagert.

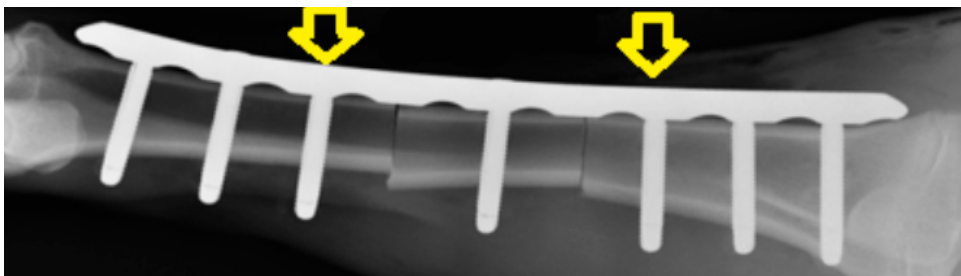


Abbildung 10: Darstellung der zu entfernende Schrauben:
Vor der Fixation wurden zwei dem Osteotomiedefekt angrenzende DLS Schrauben (gelbe Pfeile) entfernt (Tier aus der Gruppe 3; postoperative anteroposteriore Röntgenaufnahme).

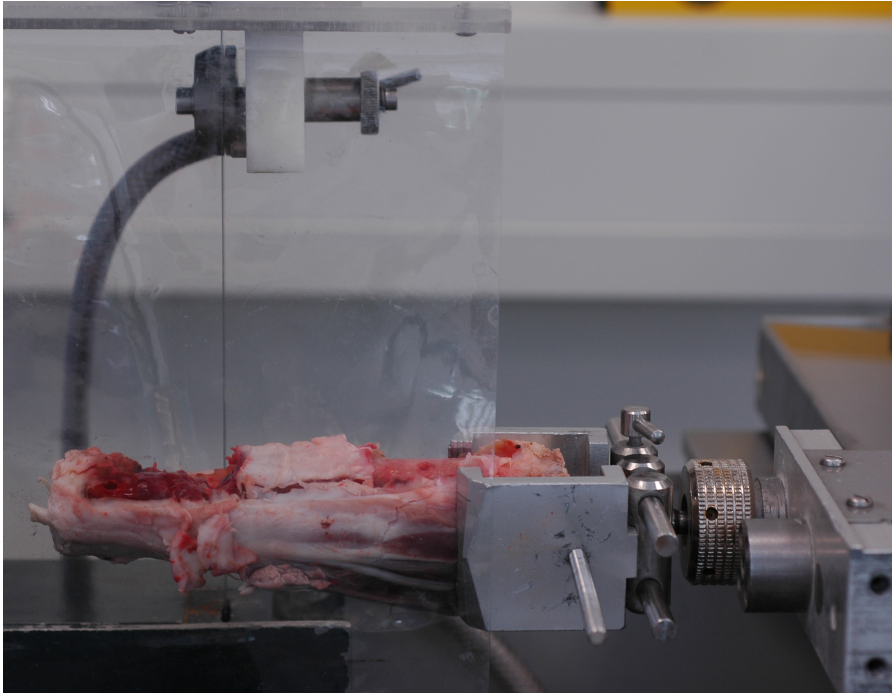


Abbildung 11: Exemplarische Darstellung über das Präparat beim Absägen der Tibia Enden: Die Tibia wurde von seitlich eingespannt und der Sägeschnitt erfolgte senkrecht zur Tibialängsachse durch den ehemaligen Schraubenkanal.

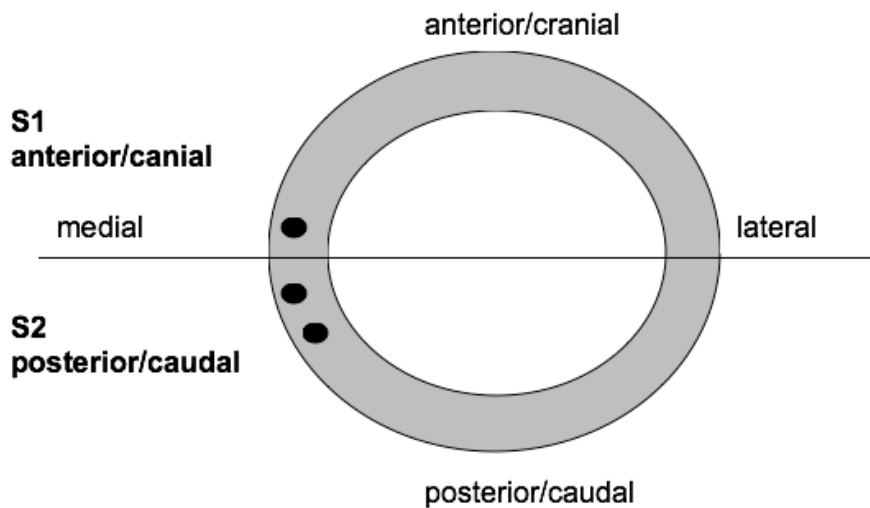


Abbildung 12: Schematische Aufsicht des Sägeschnittes und Beschriftung der Blöcke: Die entstandenen anteriore und posteriore Tibiahälften wurden cranial mit Bleistiftmarkierungen versehen. Die anteriore Hälfte S1 wurde mit einem Punkt und die posteriore Hälfte S2 wurde mit zwei Punkten gekennzeichnet.

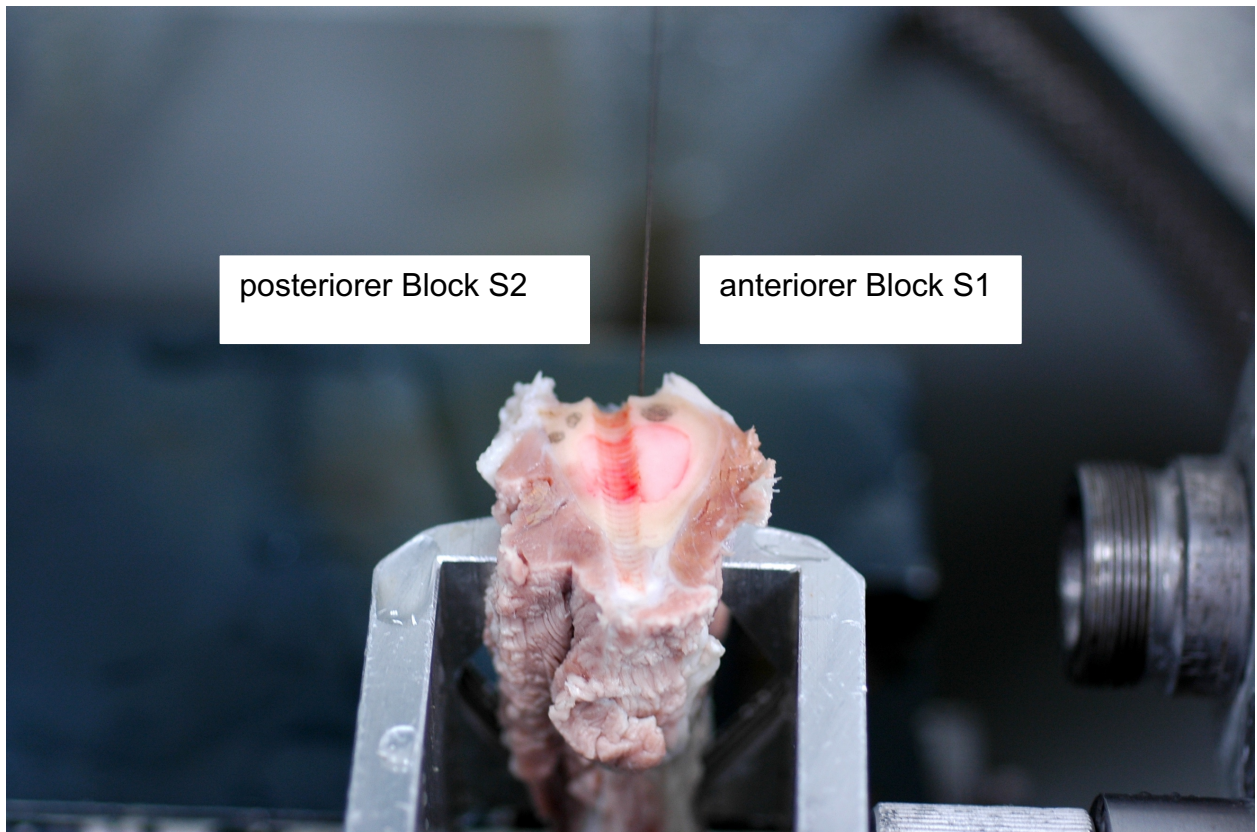


Abbildung 13: Exemparische Einspannungsdarstellung der Probe in dem Halter. Das Präparat wurde so eingespannt, dass nach dem mediolateralen Sägeschnitt zwei gleich große Titan-Mesh-Scaffoldhälften entstehen können. Es sind die Bleistiftmarkierungen S1 und S2 cranial zu sehen.

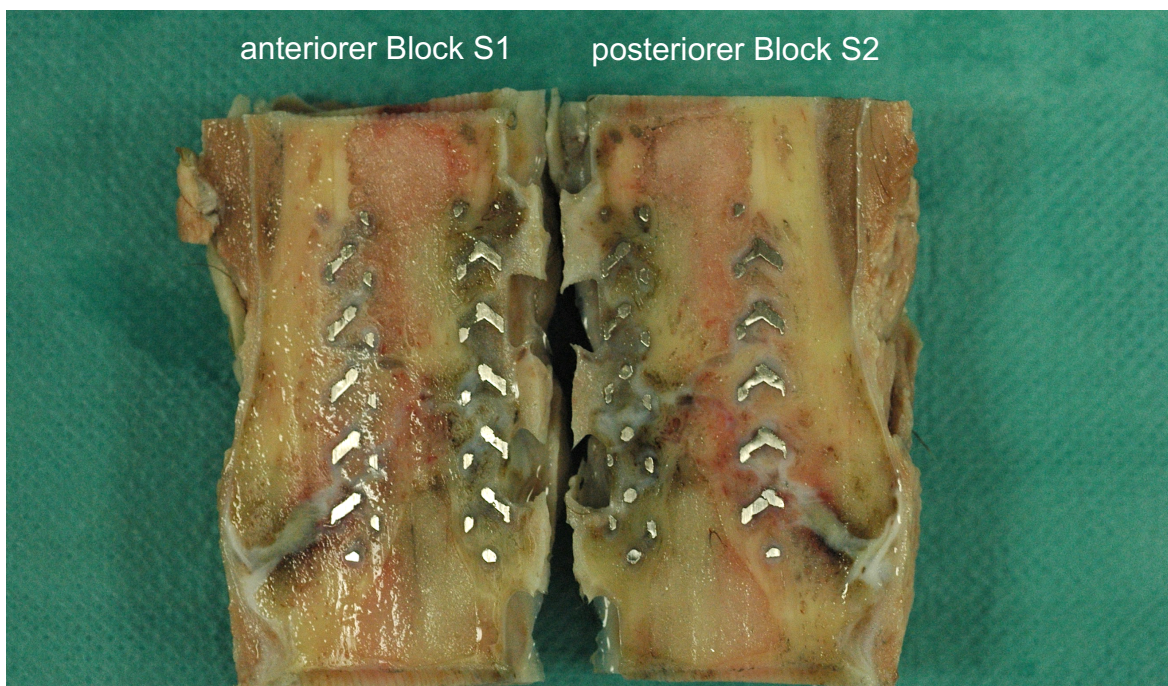


Abbildung 14: Exemparische Darstellung der entstandenen zwei Blöcke nach dem mediolateralen Sägeschnitt. Es sind der anteriorer Block S1 (links) und posteriorer Block S2 (rechts) zu sehen.

2.9.2 Aufbereitung für die Kunststoffhistologie

Nach dem Auswaschen der Fixierflüssigkeit wurden die Präparate in einer aufsteigenden Alkoholreihe entwässert (Tabelle 2). Die Proben wurden nach jedem Alkoholwechsel für 15 min. in den Exsikkator gestellt und evakuiert (400-600 mbar). Die Evakuierung wurde für 15 min. im Exsikkator (Vacuubrand, Wertheim, Deutschland) mit extern angeschlossener Vakuumpumpe durchgeführt. Der Exsikkator mit der angeschlossenen Vakuumpumpe diente dazu, die Luftblasen aus den Proben und der PMMA Lösung zu entfernen.

Tabelle 2: Entwässerungsschema

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

Um den Benetzungsgrad der Präparate zu erhöhen und den Entwässerungsprozess zu beschleunigen, wurde ein Schüttler verwendet (HS 501 digital, IKA Labortechnik, Staufen, Deutschland). Nach der Entwässerung wurden die Proben vier Stunden lang in 100 %igem Xylol (J.T. Baker, Deventer, Holland) unter der Anwendung des Exsikkators (Vacuubrand, Wertheim, Deutschland) entfettet. Anschließend fand der viertägige Präinfiltrationsprozess lichtgeschützt im Kühlschrank bei 4°C, statt. Die Präinfiltrationslösung bestand aus einer Basislösung (Technovit® 9100 NEU, Heraeus Kulzer GmbH, Wehrheim, Deutschland) und aus einem "Härter 1" (Technovit®, Heraeus Kulzer GmbH, Wehrheim, Deutschland). Die Basislösung wurde mittels einer mit 50g

Aluminiumoxid (Merck KGaA, Darmstadt, Germany) gefüllten Chromatographiesäule (Eckart & Ziegler Eurotop GmbH, Berlin, Deutschland) hergestellt. Die Säulefüllung mit 50g Aluminiumoxid konnte für die Entstabilisierung von 3 l Basislösung verwendet werden.

Tabelle 3: Übersichtstabelle von Lösungsansetzungen in der Kunststoffhistologie

	Basislösung	PMMA Pulver	Härter 1	Härter 2	Regler
Präinfiltration	200 ml		1 g		
Infiltration	pro 250 ml	20 g	1 g		
Stammlösung A	pro 500 ml	80 g	3 g		
Stammlösung B	pro 50 ml			4 ml	2 ml
Polymerisations- gemisch	9 Volumenteile Stammlösung A + 1 Volumenteil Stammlösung B				

Für die Herstellung von ca. 250 ml Infiltrationslösung, wurde 200 ml entstabilisierte Basislösung (Technovit® 9100 NEU, Heraeus Kulzer GmbH, Wehrheim, Deutschland) in einen Erlenmeyerkolben gegeben (DURAN Group GmbH., Wertheim/Main, Deutschland) und auf den Magnetrührer gestellt (Heidolph Instruments GmbH & Co.KG, Schwabach, Deutschland). Mit Hilfe eines Rührfisches wurde die Lösung mechanisch gerührt. Unterdessen wurde 20 g PMMA Pulver (Technovit® 9100 NEU, Heraeus Kulzer GmbH, Wehrheim, Deutschland) in die Basislösung (Technovit® 9100 NEU, Heraeus Kulzer GmbH, Wehrheim, Deutschland) gegeben und auf insgesamt 250 ml aufgefüllt. Nach ca. zwei Stunden hatte sich das PMMA Pulver (Technovit® 9100 NEU, Heraeus Kulzer GmbH, Wehrheim, Deutschland) vollständig aufgelöst und die Lösung wurde klar. Anschließend wurde 1g "Härter 1" (Technovit®, Firma Heraeus Kulzer GmbH, Wehrheim, Deutschland) hinzugegeben und erneute 20 Min. mit Hilfe des Magnetrührers vermischt (Tabelle 3).

Die Proben wurden vier Tage in einer Präinfiltrationslösung im Kühlschrank bei 4°C belassen. Nach der Präinfiltration wurden die Präparate für vierzehn Tage, vor Licht geschützt, im Kühlschrank bei 4°C, in der Infiltrationslösung aufbewahrt. Nach sieben Tagen wurden die Präparate in eine frische Infiltrationslösung, unter der Verwendung des Exsikkators, bei einem Druck von mind. 600 mbar, für 10 Minuten (Vacuubrand, Wertheim, Deutschland), gestellt.

Zur Einbettung wurden zwei verschiedene Lösungen angewendet: Die Stammlösung A und die Stammlösung B. Beide Lösungen wurden frisch, kurz vor dem Gebrauch angesetzt. Bei der Herstellung von Stammlösung A, wurde 350 ml entstabilisierte Basislösung (Technovit® 9100 NEU, Wehrheim, Deutschland) in einen Erlenmeyerkolben gegeben (DURAN Group GmbH., Wertheim/Main, Deutschland), auf den Magnetrührer gestellt (Heidolph Instruments GmbH & Co.KG, Schwabach, Deutschland) und mittels eines Rührfisches gerührt. Dann wurde 80 g PMMA Pulver (Technovit® 9100 NEU, Wehrheim, Deutschland) in die Basislösung (Technovit® 9100 NEU, Wehrheim, Deutschland) gegeben und auf 500 ml mit entstabilisierter Basislösung aufgefüllt. Die Stammlösung wurde zwei Stunden lang gerührt, bis das PMMA Pulver (Technovit® 9100 NEU, Wehrheim, Deutschland) vollständig aufgelöst war. Abschließend wurden 3 g "Härter 1" hinzugegeben und die Stammlösung A wurde 20 min. weiter gerührt. Bei der Herstellung von Stammlösung B wurden 44 ml entstabilisierte Basislösung (Technovit® 9100 NEU, Wehrheim, Deutschland) in einen Erlenmeyerkolben gegeben (DURAN Group GmbH., Wertheim/Main, Deutschland). Dieser wurde auf dem Magnetrührer gestellt (Heidolph Instruments GmbH & Co.KG, Schwabach, Deutschland) und es wurde mittels eines Rührfisches gerührt. Inzwischen wurden 4 ml "Härter 2" (Heraeus Kulzer GmbH, Wehrheim, Deutschland) und 2 ml Regler (Heraeus Kulzer GmbH, Wehrheim, Deutschland) in die Basislösung gegeben und weitere 2 min. gerührt. Vor dem Einbetten wurde die Beschriftung der Präparate kontrolliert (Gruppe, Schafsnummer und Blocknummer) und mit der später zu schleifenden Seite nach unten auf dem Boden der Gläser platziert. Die Stammlösungen A und B wurden im Verhältnis 9:1 gemischt und mit den Präparaten in Gläser gefüllt. Die anschließend schnellere Evakuierung, wurde durch die Nutzung eines vorgekühlten Exsikkators, mit extern angeschlossener Vakuumpumpe, für 15 min durchgeführt (400-600 mbar, Vacuubrand, Wertheim, Deutschland). Zur Aushärtung wurden die Proben 72 Stunden lang im Kühlschrank bei ca. - 4°C und weiteren 24 Stunden unter dem Abzug gehalten.

2.9.3 Herstellung der Schliﬀpräparate

Die Kunststoffblöcke wurden mit einer Schleifmaschine (Phoenix 3000, EXAKT Apparatebau GmbH, Norderstedt, Deutschland) zurechtgeschliﬀen. In der Schleifmaschine wurden Schleifpapiere (Hermes Schleifmittel GmbH Hamburg, Deutschland) mit unterschiedlichen Körnungen (grob nach fein, Größe: 80, 1000, 1200, 2500, 4000) verwendet. Die Kunststoffobjektträger (patho-service GmbH, Oststeinbek, Deutschland) wurden ebenfalls durch das Schleifsystem mit dem Schleifpapier P 1200 angeschliﬀen und beschriftet (Gruppe, Schafsnummer und Blocknummer). Die Präparate wurden in der Art angeschliﬀen (BUEHLER MetaServ™ 250, Esslingen, Deutschland), dass das Präparat nur noch von einem dünnen Kunststoffrand umgeben war. Dann wurde auf der nicht gekennzeichneten Seite des Präparates Technovit 4000 (Heraeus Kulzer GmbH, Wehrheim, Deutschland) aufgetragen und anschließend in die Klebpresse gegeben (Exakt Apparatebau GmbH, Norderstedt, Deutschland). Dabei wurde die zu untersuchende Seite nach unten gelegt. Der Kunststoffobjektträger (patho-service GmbH, Oststeinbek, Deutschland) wurde im Oberteil der Presse (Exakt 401 Apparatebau GmbH, Norderstedt, Deutschland) mit Vakuum gehalten und anschließend auf das Präparat abgesenkt. Der Polymerisationsprozess betrug etwa zehn Minuten. Das aufgeblockte, angeschliﬀene Präparat, wurde mit Petrolbenzin (Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland) gereinigt und die Dicke des Präparates wurde vermessen. Mit Hilfe eines Licht-Polymerisationsgeräts (Exakt 402 Apparatebau GmbH, Norderstedt, Deutschland) und einer Vakuumpumpe (Exakt 398 Apparatebau GmbH, Norderstedt, Deutschland) wurde das Präparat zu einem „Sandwich“ erzeugt. Zwischen dem Präparat und dem Kunststoffobjektträger, wurde ein Präzisionskleber (Technovit VLC 7210 Heraeus Kulzer GmbH, Wehrheim, Deutschland) aufgetragen, welcher nach acht Minuten im Blaulicht auspolymerisiert. Das hergestellte „Sandwich“ wurde im Dunkeln sechs Stunden lang ausgehärtet, erneut gemessen und die Kleberschicht berechnet, um so die genaue Dicke des Schliﬀes zu erhalten. Dann erfolgte das Sägen (Makrotrennschleifsystem, Exakt Apparatebau GmbH, Norderstedt, Deutschland) des „Sandwiches“. Es wurde ein 500 µm großes Stück aus dem „Sandwich“ abgesägt. Der hergestellte Schnitt wurden mit einer Schleifmaschine (Phoenix 3000, EXAKT Apparatebau GmbH, Norderstedt, Deutschland) und mit 1000 - 4000er Schleifpapieren (Hermes Schleifmittel GmbH Hamburg,

Deutschland) bis hin zur gewünschten Dicke runtergeschliffen. Die endgültige Dicke nach der Politur der Präparate betrug, bei der kombinierte Safranin Orange/von Kossa-Färbung, 100 µm.

2.9.4 Histologische Färbung der Gewebeschliffe

An allen aufbereiteten Präparaten wurde eine kombinierte Safranin Orange/von Kossa-Färbung durchgeführt (Tabelle 4). Diese Färbung erlaubt, dank ihres hohen Kontrasts zwischen mineralisiertem und nicht mineralisiertem Gewebe, die histomorphometrische Auswertung der einzelnen Präparate. Das mineralisierte Knorpel- und Knochengewebe erscheint nach der Färbung schwarz und das Bindegewebe, Muskelgewebe, hyaliner Knorpel und nicht mineralisierter Knochen rötlich (Abbildung 15).

Tabelle 4: Färbeprotokoll kombinierte Safranin Orange/von Kossa-Färbung

	Arbeitsschritt	Zeit
1 .	Entplasten mit MEA (bzw. Xylol) (J.T. Baker, Deventer, Holland)	3x 30 min.
2.	Absteigende Alkoholreihe (100->70%), Aqua dest.	Je 2 min.
3.	3 % wässrige Silbernitratlösung (Merck, Darmstadt, Deutschland)	10 min.
4.	Aqua dest.	3x spülen (in zwei Küvetten)
5.	Natriumcarbonat-Formaldehyd-Lösung	2 min.
6.	In Leitungswasser wässern	10 min.
7.	5 % Natriumthiosulfat-Lösung (Merck, Darmstadt, Deutschland)	5 min.
8.	In Leitungswasser wässern	10 min.
9.	Aqua dest.	5 x eintauchen
10.	Safranin-O (Merck, Darmstadt, Deutschland)	8 min.
11.	Aqua dest.	5 x eintauchen
12.	96 % Alkohol	2 x 2 min.
13.	100 % Alkohol	2 x 2 min.
14.	Entfetten in Xylol (J.T. Baker, Deventer, Holland)	2 x 2 min.
15.	Eindecken mit Vitro-Clud® (R. Langenbrinck GmbH, Emmendingen, Deutschland)	

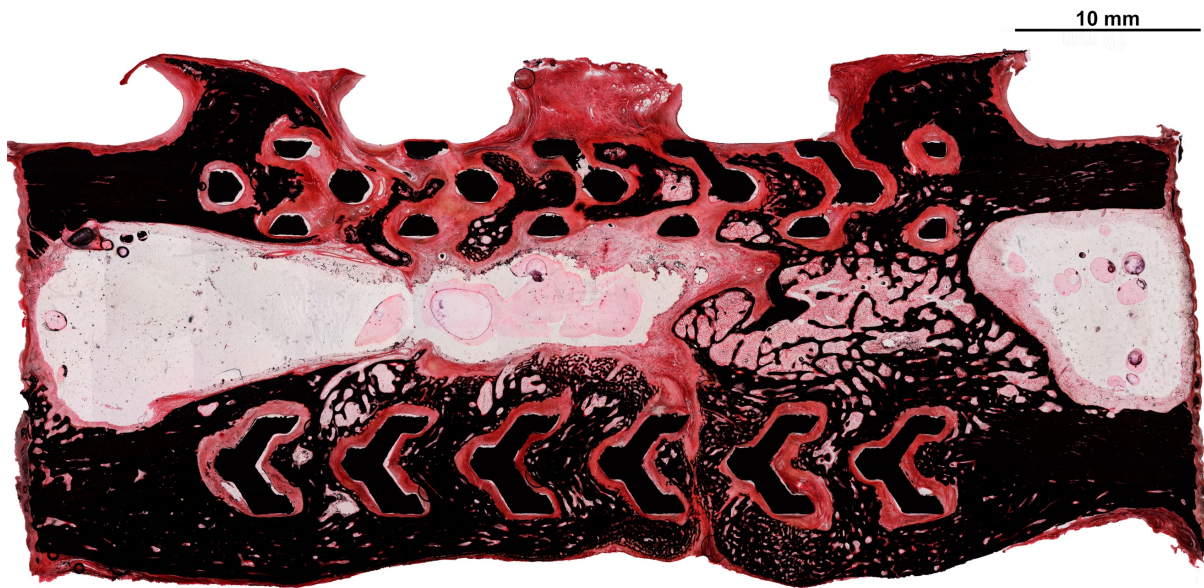


Abbildung 15: Exemplarische Darstellung eines Schliffes gefärbt nach Safranin-O/von Kossa aus der Gruppe des harten Titan-Mesh-Scaffolds

2.10 Auswertung

2.10.1 Deskriptiv

Die Präparate wurden mithilfe eines Lichtmikroskops (DM300, Leica© Microsystems, Wetzlar, Deutschland), bei aufsteigender Vergrößerung untersucht. Bei der Untersuchung wurde auf die nachfolgenden Gesichtspunkte geachtet: die Lage des Titan-Mesh-Scaffolds innerhalb des Defektes, Gewebezusammensetzung innerhalb des Osteotomiedefektes, Gewebeverteilung, knöcherne Kallusausprägung und die kortikale Knochenstruktur.

2.10.2 Röntgenologische Auswertung

Es wurde von allen Tieren monatlich standardisierte anteroposteriore und lateromediale Röntgenaufnahmen angefertigt, um den Heilungsprozess zu verfolgen und zu bewerten. Es wurden zusätzlich die Position der Platte, der Schrauben und des Titan-Mesh-Gerüsts sowie mögliche Fehler und das Auftreten von Aufhellungen um die Schrauben, beurteilt. Für die röntgenologische Beurteilung der Überbrückung des Osteotomiedefektes wurde das Bridging - Score (B-Score) zur Hilfe genommen. Die

Einteilung des B-Scores stellte in zwei Kategorien das Ausmaß der knöchernen Überbrückung dar. Eine komplette Überbrückung (B1) lag vor, wenn der Osteotomiedefekt vollständig knöchern überbrückt war. Keine Überbrückung (B2) lag vor, wenn keine knöchernen Überbrückung innerhalb des Osteotomiedefektes stattfand (Abbildung 16)

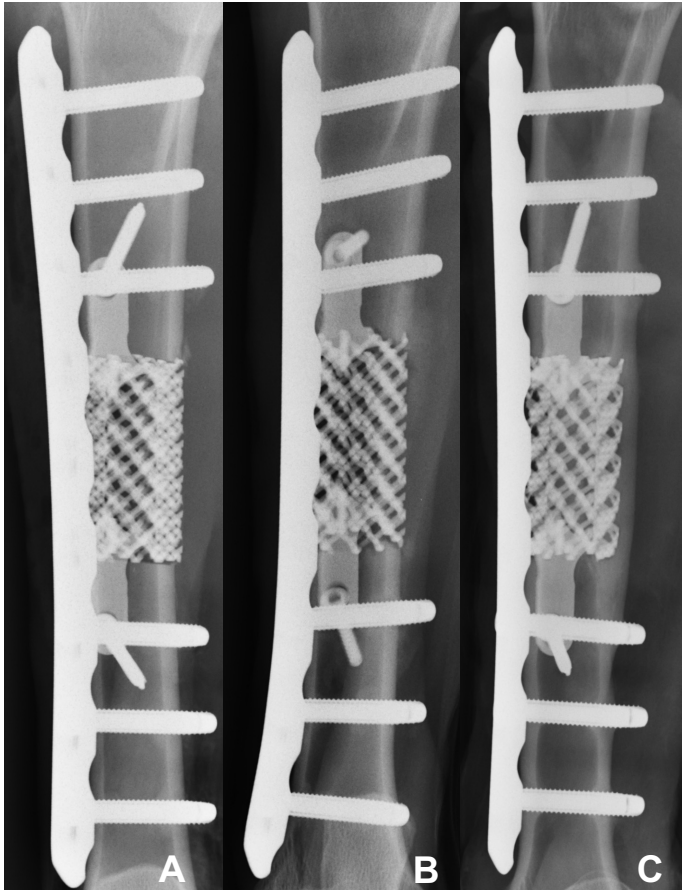


Abbildung 16: Exemplarische Darstellung des Bridging - Scores: Röntgenologische Kontroll-Bildgebung (im anteroposterioren Strahlengang) von einem Tier aus der Gruppe des weichen Titan-Mesh-Scaffolds nach 0 (A), 4 (B) und 24 (C) Wochen postoperativ. Das Tier erhielt B2 (A) nach 0 Wochen und B1 (C) nach 24 Wochen postoperativ.

2.10.3 Vorbereitung für die histomorphometrische Auswertung und Festlegung der Regions of Interest (ROIs)

Um eine einheitliche Auswertung der Präparate zu ermöglichen, wurden Regions of Interest (ROIs) festgelegt (Abbildung 17) Die gefärbten Präparate wurden mithilfe eines Mikroskops (Axioskop 40, Carl Zeiss MicroImaging GmbH, Göttingen, Deutschland) und einer Computersoftware (AxioVision, Carl Zeiss MicroImaging GmbH, Göttingen, Deutschland) digitalisiert. Das Objekt wurde mit 1.6-facher Vergrößerung

aufgenommen. Zum Größenvergleich wurden Maßstabsbalken mit Längenangaben von 10 mm auf dem Bild platziert. Nach dem Digitalisieren wurden die Bilder in JPEG Format abgespeichert. Das digitalisierte Präparat wurde mit dem Bildbearbeitungsprogramm (Adobe Photoshop CC 2014, Adobe Systems GmbH, München, Deutschland) horizontal ausgerichtet und unter Berücksichtigung des Seitenverhältnisses verkleinert (lange Seite 4000 Pixel).

Es wurden zehn ROIs angelegt: Die Mediale ROI besteht aus der Periostalen Medialen ROI und aus der Medialen Struts ROI. Auf der gegenüberliegenden Seite befindet sich die Laterale ROI, welche die Laterale Struts ROI und die Periostale Laterale ROI beinhaltet. Weiterhin ist im Bereich der Pore die Endostale ROI zu erkennen. Die Centrale ROI besteht aus der Proximalen Centralen ROI und aus der Distalen Centralen ROI (Abbildung 17).

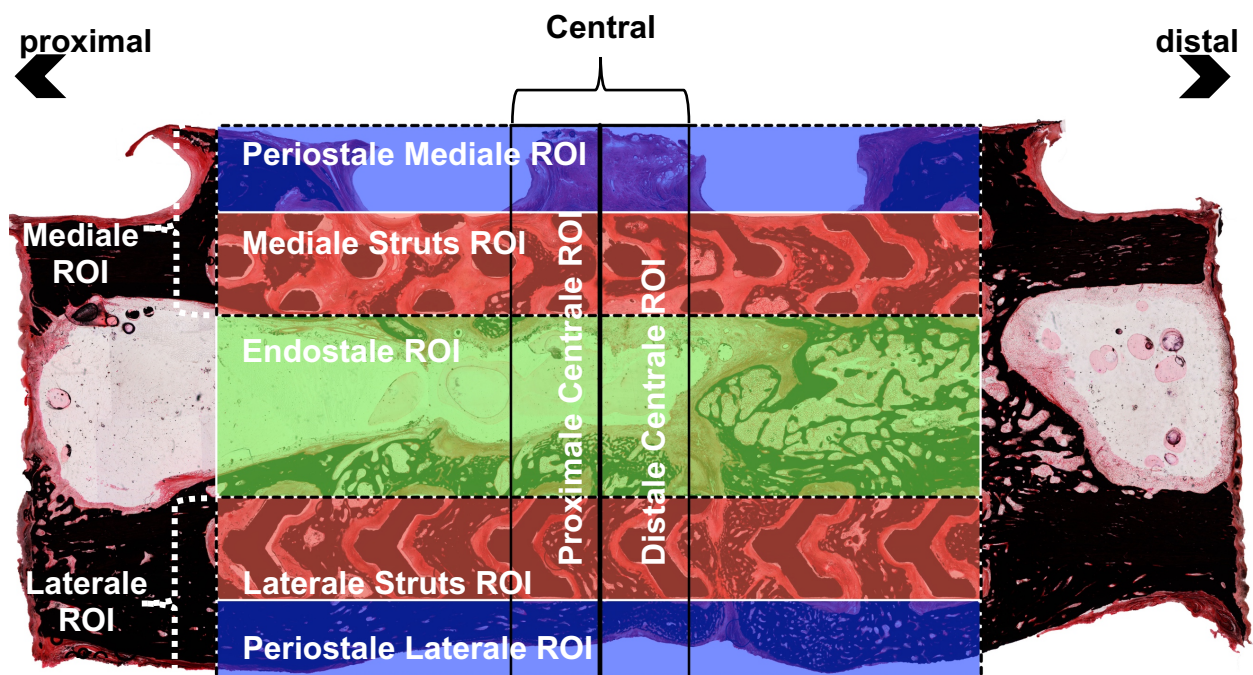


Abbildung 17: Abbildung von der Festlegung der ROIs für die Histomorphometrie

2.10.4 Histomorphometrische Bildanalyse

Die bearbeiteten Bilder der Gewebeschliffe von 12 Schafen wurden mithilfe eines individualisierten Computerprogramms (Makro, ImageJ Version 1.50, Image Processing and Analysis in Java [85]) ausgewertet. Das Kontrolltier mit autologem Knochentransplantat wurde nicht in die histomorphometrische Bildanalyse einbezogen.

Die kombinierte Safranin Orange/von Kossa-Färbung wurde zur Messung der Knochen- und Bindegewebefläche verwendet. Das Makro konnte die mineralisierte (schwarz gefärbt), von der nicht-mineralisierten Knochenfläche (rot gefärbt) unterscheiden. Mit dieser Software konnten die ROIs halbautomatisch gezeichnet und anhand unterschiedlicher Farbpixel, die Flächen errechnet werden. Um die Gewebetypen zu verifizieren, wurde parallel zu dem Computerprogramm mit einem Lichtmikroskop (DM300, © Leica Microsystems, Wetzlar, Deutschland) bei Bedarf noch manuell korrigiert. Die Leerflächen, in denen kein Gewebe zu sehen war, wurden auf dem Präparat anhand unterschiedlicher Farbpixel errechnet und anschließend manuell verbessert. Die Knorpelflächen wurden im gesamten Kallusgewebe geortet und manuell ausgewählt. Die Ergebnisse der histomorphometrischen Auswertung wurden in relativen Zahlen (%) dargestellt. Die Absolutwerte bezogen sich auf eine ROI-Fläche. Titanflächen und Leerflächen zählten nicht mit in die Grundfläche. Das Makro hat die folgenden Parameter pro ROI errechnet:

- 1. Leerfläche [mm²]**
- 2. Titanfläche [mm²]**
- 3. Fläche des mineralisierten Knochens [mm²]**
- 4. Knorpelfläche [mm²],**
- 5. Bindegewebefläche [mm²]**

2.10.5 Statistik

Die Messwerte der histomorphometrischen Bildanalyse wurden in Excel (Version 15.20, Microsoft Corporation, Redmond, Vereinigte Staaten) zusammengeführt und anschließend in SPSS (IBM Corporation SPSS Statistics 24, Armonk, Vereinigte Staaten) importiert und ausgewertet. Die zwölf Tiere wurden in zwei Gruppen ausgewertet. Es handelt sich um qualitative, voneinander unabhängige Merkmale: Gruppe 1 stand für den weichen Titan-Mesh-Scaffold und Gruppe 2 für den harten Titan-Mesh-Scaffold. Es konnten nur nicht parametrische Tests durchgeführt werden, da keine Normalverteilung vorlag. Da die Gruppen unverbunden und die Werte nicht normalverteilt waren, wurde der Wilcoxon-Mann-Whitney-Test durchgeführt. Für alle Vergleiche wurde ein Signifikanzniveau (α) von 5 % bestimmt und demzufolge lag die Irrtumswahrscheinlichkeit (p) bei 0,05.

Die Ergebnisse werden in Boxplots präsentiert. Mittels Boxplots wurden 75-Prozentquartil, 50-Prozentquartil (Median) und 25- Prozentquartil dargestellt. Weiterhin werden der Maximumwert, der Minimumwert, Ausreißer und der Extremwert dargestellt. Der Interquartilsabstand (IQR) bezieht sich auf den Abstand zwischen 75-Prozentquartil und 25- Prozentquartil. Der Median liegt genau in der Mitte des Interquartilsabstandes. Dieser teilt die Box in zwei Hälften, in denen jeweils 50 % der Daten liegen. Unterhalb der Whisker bis 75-Prozentquartil bzw. bis 25- Prozentquartil (bis zur Box) liegen die Datenwerte, die sich in dem äußeren 50 % der Daten befinden (Abbildung 18). Die Länge der Whisker ist auf das 1,5-fache des Interquartilsabstandes limitiert. Die Datenwerte, die außerhalb der Spannweite liegen, werden als Ausreißer bzw. Extremwerte bezeichnet. Datenwerte zwischen 1,5x IQR und 3x IQR werden als Ausreißer und Datenwerte über 3x IQR als Extremwerte genannt [86, 87]. Die statistisch signifikanten Unterschiede werden im Text erläutert.

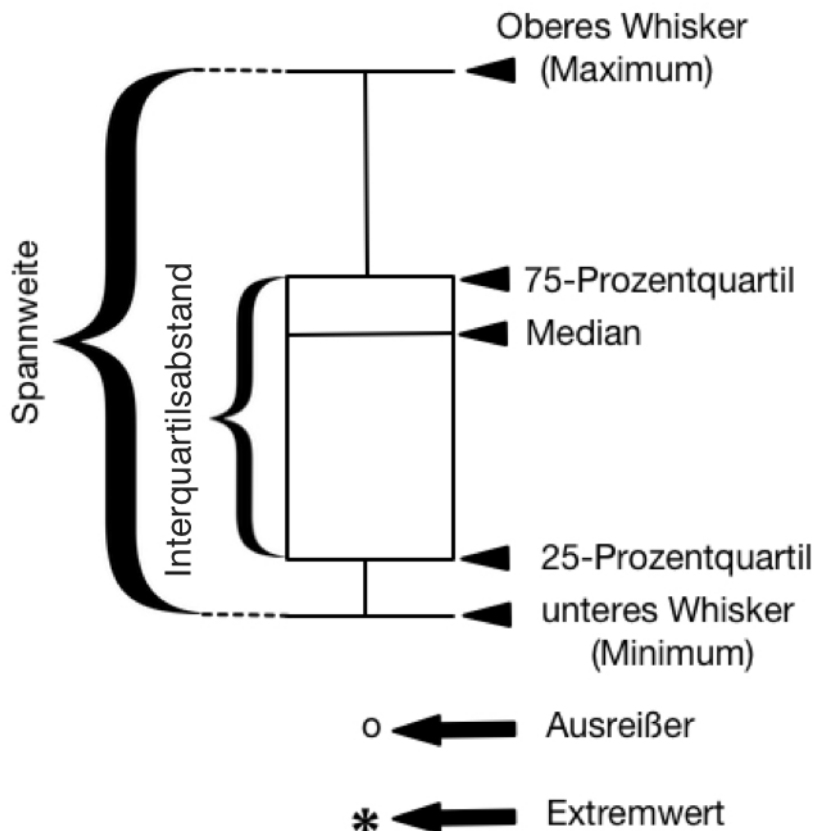


Abbildung 18: Darstellung eines Boxplots

3 ERGEBNISSE

3.1 Postoperative Phase

Alle Tiere belasteten die operierte Gliedmaße vollständig. Es zeigte sich eine volle Gewichtsbelastung an den rechten, operierten Hintergliedmaßen. Zwei Tiere mussten vorzeitig aus dem Versuch ausgeschlossen werden. Ein Schaf ist im Stall nach vier Tagen postoperativ ausgerutscht und erlitt dabei eine proximale Tibiafraktur durch das erste Schraubenloch (Schaf 28, Gruppe 2) und ein weiteres Tier ist in der Aufwachphase verstorben (Schaf 1, Gruppe 1). Drei Tiere aus der Gruppe des weichen- und ein Tier aus der Gruppe des harten Titan-Mesh-Scaffolds erlitten Druckstellen im Sprunggelenkbereich, aufgrund des Gipsverbandes. Der Gipsverband fand Anwendung zur Vermeidung einer Überlastung der Tibia. Zur Behandlung wurde Hydrokolloidverband (Hydrocoll, HARTMANN AG, Heidenheim, Deutschland), Penicillin (Benzylpenicillin-Procaïn-1H₂O, bela-pharm GmbH & Co. KG, Vechta, Deutschland), Schmerzmittel (Finadyne[®], RP, Flunixin-Meglumin, Essex Pharma GmbH, München, Deutschland) und häufigeren Verbandwechsel, bis hin zur Heilung, angewendet (Tabelle 5).

Ergebnisse

Tabelle 5: Zusammenfassung der klinischen Befunde (modifizierte Darstellung nach Pobloth et al. 2018)

Gruppe (n=7)	Ausgeschlossen aus der Studie	Beobachtungen während der Heilungszeit				Behandlung		
		Druckstellen	Lahmheit	Serom	Entzündung des Beckenkamms	Flunixin- Meglumin	Antibiotika	lokales Wund- management
weich	X (Anästhesie)							
		X				X	X	X
		X				X	X	X
		X				X	X	X
hart		X				X	X	X
	X (Fraktur)							

3.2 Röntgenologische Ergebnisse

Keines der Tiere zeigte während des gesamten Studienverlaufs ein Versagen des Titan-Mesh-Scaffold oder der eingebrachten Platten. Zum Zeitpunkt von acht Wochen nach den operativen Eingriffen wurden bei zwei Tieren Aufhellungen um die proximalen Kleinfragmentschrauben des Titan-Mesh-Scaffolds festgestellt, was auf eine Lockerung der Schrauben hingedeutet hat (Abbildung 19). Allerdings zeigte keines der Tiere Zeichen einer Instabilität des Implantat-Systems. Die weiche Titan-Mesh-Scaffold Gruppe zeigte eine frühere Überbrückung des Osteotomiedefektes. Bereits acht Wochen postoperativ zeigten zwei Tiere dieser Gruppe, eine vollständige knöcherne Überbrückung (Kategorie B1 des B-Scores) auf der Außenfläche des Titan-Mesh-Scaffolds, auf. Zwölf Wochen postoperativ erreichten drei Schafe aus der "weichen Titan-Mesh-Scaffold Gruppe" den B1 (im Vergleich dazu war zum selben Zeitpunkt kein Tier aus der „harten Titan-Mesh-Scaffold Gruppe“ in der Kategorie B1 aufzufinden).

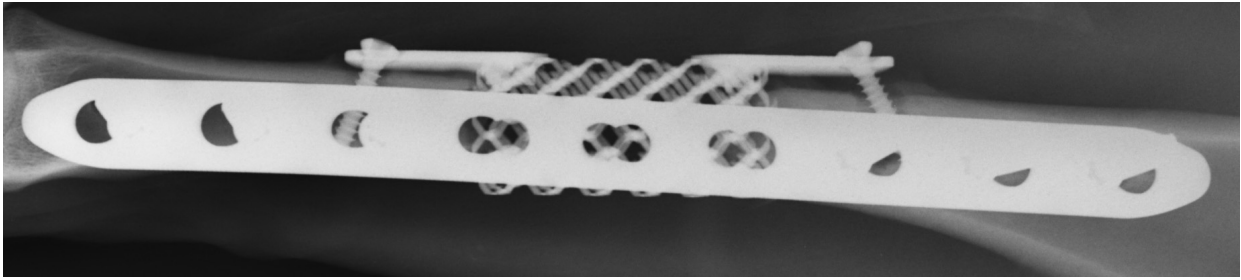


Abbildung 19: Röntgenologisches Bild der Aufhellungen um die proximalen Kleinfragmentschrauben zum Zeitpunkt von acht Wochen postoperativ (im lateromedialen Strahlengang).

Die Gruppe des harten Titan-Mesh-Scaffolds, zeigte nach vier Wochen entlang der Außenfläche des Titan-Mesh-Scaffolds eine leichte knöcherne Kallusbildung, welche sich kontinuierlich über die 24 Wochen vergrößerte. Allerdings erreichte diese Gruppe den Bridging - Score B1 später, als die Gruppe des weichen Titan-Mesh-Scaffolds. Erst nach 24 Wochen erhielten 50 % der Tiere den Bridging -Score B1, wobei die Gruppe des weichen Titan-Mesh-Scaffolds das gleiche Ergebnis schon nach 12 Wochen postoperativ erreichte. In beiden Gruppen wurde das Knochenwachstum überwiegend auf der kontralateralen Seite des Plattenfixiersystems beobachtet (Abbildung 20).

Das Kontrolltier (Schaf 6, Gruppe 3: Autograft + LCP + DLS) zeigte einen Heilungsverlauf, in dem der Osteotomiedefekt nach 24 Wochen vollständig verknöchert war. Durch das Implantieren des Autografts, wurde der Osteotomiedefekt von den Kortices röntgenologisch nachweisbar postoperativ unterbrochen. Die Osteotomiekannte war bis acht Wochen postoperativ sowohl proximal als auch distal sichtbar und man konnte bereits eine knöcherne Kallusbildung auf der lateralen Seite beobachten. Nach 12 Wochen postoperativ war die proximale Osteotomiekannte nicht mehr röntgenologisch nachweisbar. Nach 24 Wochen postoperativ war die distale Osteotomiekannte immer noch sichtbar, wobei die logitudinale Kontinuität der Kortikalis, auf der lateralen Seite, deutlich ausgeprägter war (Abbildung 21).

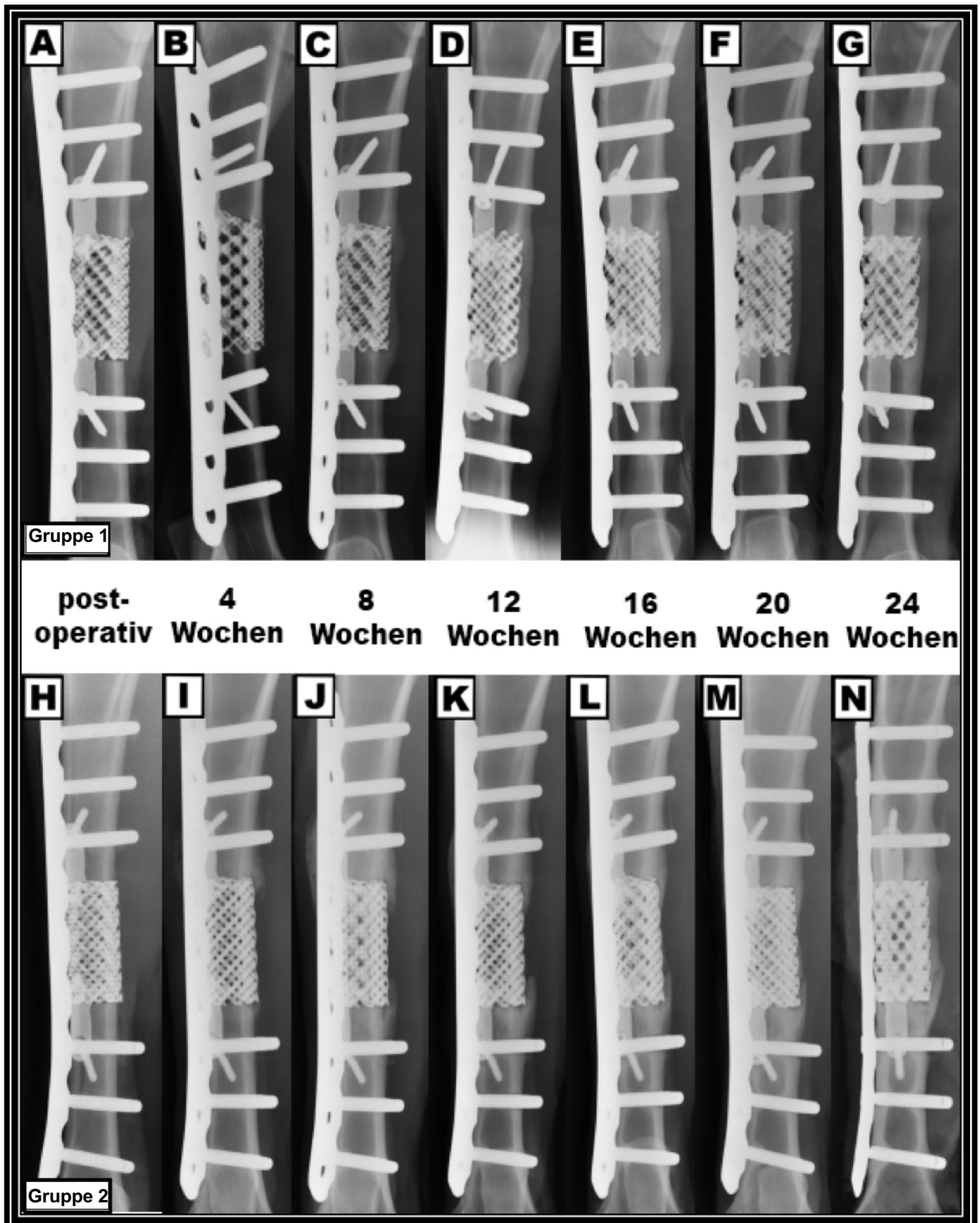


Abbildung 20: Exemplarische Röntgendarstellung (im anteroposterioren Strahlengang) von jeweils einem Tier aus der Gruppe 1 und 2 (Gruppe 1: 0,84 GPa, A-G; Gruppe 2: 2,88 GPa, H-N) nach 0, 4, 8, 12, 16 und 24 Wochen postoperativ. Beide Tiere erhielten B1-Score, wobei das Schaf der Gruppe 1 bereits nach 8 Wochen (C) und das Schaf der Gruppe 2 erst nach 24 Wochen (N) eine vollständige knöchernen Überbrückung aufzeigte. In beiden Gruppen wurde das Knochenwachstum überwiegend auf der kontralateralen Seite des LCP-Plattensystems beobachtet.

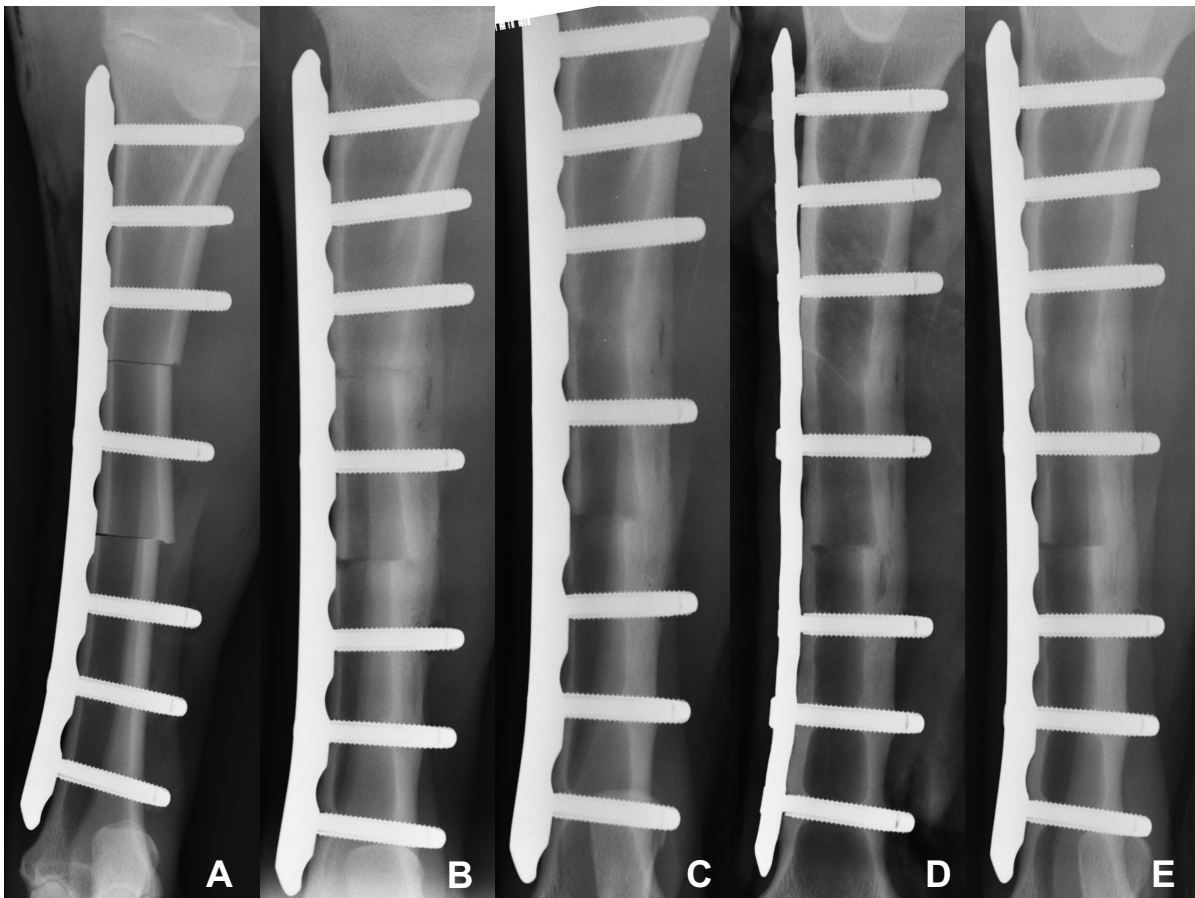


Abbildung 21: Röntgendarstellung des Kontrolltieres im anteroposterioren Strahlengang (Gruppe 3: autograft + LCP & DLS, A-E) nach 0, 8, 12, 20 und 24 Wochen postoperativ. Das Kontrolltier zeigte postoperativ eine vollständige Verknöcherung nach 24 Wochen.

Tabelle 6: Darstellung des Erwerbes von Bridging -Score B1 und B2 in den zwei Gruppen

Zeit post OP [Wochen]	Gruppe 1 (n=6)				Gruppe 2 (n=6)			
	B-Score	Prozent	B-Score	Prozent	B-Score	Prozent	B-Score	Prozent
	B1		B2		B1		B2	
0	0	0,0%	6	100,0%	0	0,0%	6	100,0%
4	0	0,0%	6	100,0%	0	0,0%	6	100,0%
8	2	33,3%	4	66,7%	0	0,0%	6	100,0%
12	3	50,0%	3	50,0%	0	0,0%	6	100,0%
16	3	50,0%	3	50,0%	0	0,0%	6	100,0%
20	3	50,0%	3	50,0%	0	0,0%	6	100,0%
24	4	66,7%	2	33,3%	3	50,0%	3	50,0%
Gesamt:	4	66,7%	2	33,3%	3	50,0%	3	50,0%

3.3 Histologische Ergebnisse

3.3.1 Deskriptive Histologie

Bei der histologischen Auswertung wurden in den Präparaten die folgenden Gewebetypen unterschieden: das knöcherne Kallusgewebe, das Bindegewebe, das Knorpelgewebe und das Kortikalisgewebe.

Durch den mediolateralen Sägeschnitt der Tibia erschienen die Kortikalis als vier durch den Markraum getrennte Vierecke. Die Kortikalis wurde in proximodistaler Richtung, durch den 40 mm langen Osteotomiedefekt, gespalten. Nach der Standzeit von 24 Wochen war die Osteotomiekannte in den histologischen Präparaten schelcht zu erkennen. Drei Präparate beider Gruppen zeigten nahe zur Osteotomie eine verminderte Gewebedichte in dem kortikalen Knochen. Das Kortikalisgewebe beinhaltete abwechselnd längs angeschnittene Havers-Kanäle und vereinzelt Volkmann-Kanäle, die sich mit den Havers-Kanälen verbunden hatten (Abbildung 22). Das knöcherne Kallusgewebe wuchs auf der Außenseite des Titan-Mesh-Scaffolds, interkortikal durch

die Struts endostal in die Pore herein. Fünf von sechs Präparaten zeigten in beiden Gruppen lateral eine knöcherne Überbrückung. Bis auf zwei Präparate (jeweils ein Präparat aus jeder Gruppe) konnte ein knöcherner Markraumschluss beobachtet werden. Im knöchernen Kallusgewebe konnten verschiedene Knochenstrukturen festgestellt werden. Es konnten u.a. quer getroffene Osteone beobachtet werden (Abbildung 23). Weiterhin konnten in den Knochenlamellen eingemauerte Osteozyten festgestellt werden. Mit zunehmendem Abstand vom Kortikalisgewebe, bildete das knöcherne Kallusgewebe ein lockeres Netzwerk. In diesem Bereich, vor allem in der Pore, bestand das knöcherne Kallusgewebe in erster Linie aus Geflechtknochen. Das wenig anzutreffende Knorpelgewebe bildete kleine Inseln, die unterschiedliche Mineralisationsphasen aufzeigten (Abbildung 24). In fünf Präparaten (drei Präparate aus der Gruppe 1 und zwei Präparate aus der Gruppe 2) konnte hyaliner Knorpel angetroffen werden. Das Knorpelgewebe war vor allem distal-lateral auffindbar und hatte immer Kontakt zum Knochen (Abbildung 25).

In den Gruppen des harten- und des weichen Titan-Mesh-Scaffolds erfolgte auf der medialen Seite jeweils keine knöcherne Überbrückung, außer bei einem Präparat aus der Gruppe 1. Nur ein Präparat aus der Gruppe 2 bildete in der zentralen Pore vergleichbar so viel Geflechtknochen wie die meisten Präparate aus der Gruppe 1 (Abbildung 26). Zur Übersicht werden aus der Gruppe des weichen- und des harten Titan-Mesh-Scaffolds jeweils drei Schiffe dargestellt (Abbildung 27).

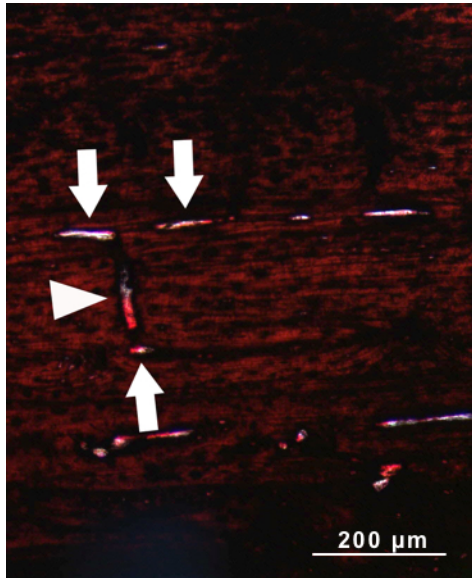


Abbildung 22: Darstellung von längs angeschnittenen Havers-Kanälen (Pfeile) und einem Volkmann-Kanal (Dreieck) bei kombinierter Safranin Orange/von Kossa-Färbung (Tier der Gruppe 1).

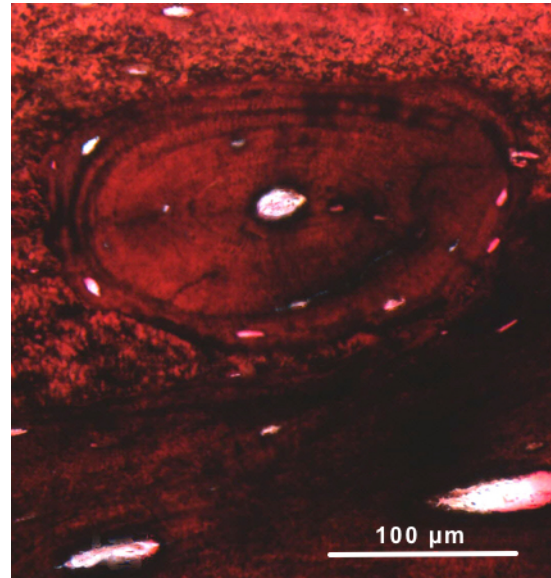


Abbildung 23: Darstellung eines Osteons aus dem lateral - proximalen knöchernen Kallusgewebe: konzentrisch angeordnete Osteozyten, deren Zellfortsätze mit dem Havers-Kanal verbunden sind (kombinierte Safranin Orange/von Kossa-Färbung, Tier der Gruppe 1).

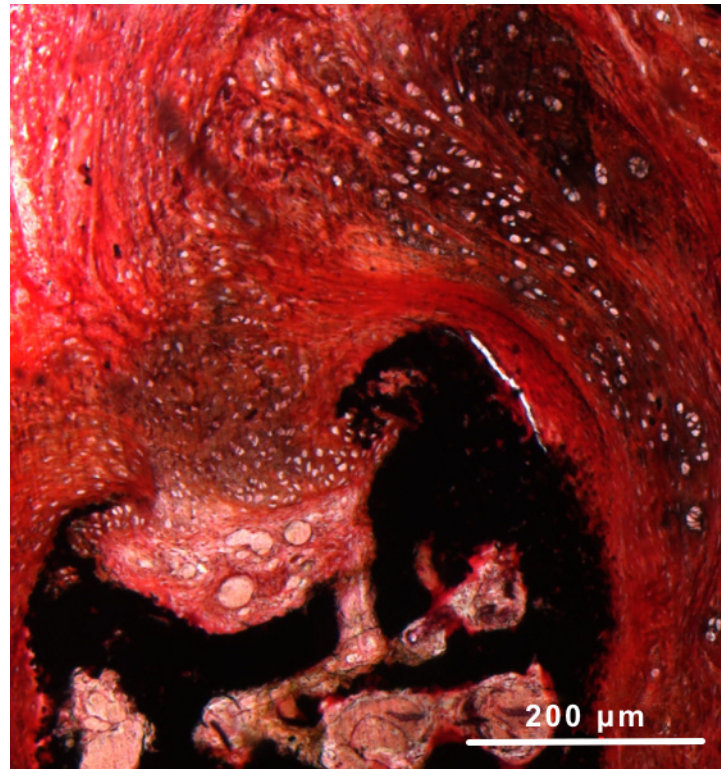


Abbildung 24: Darstellung der Mineralisationsfront: Aufnahme aus dem distal-lateralen neu gebildeten Geflechtknochen. Hyaliner Knorpel säulenartig angeordnet mit Kontakt zum knöchernen Kallusgewebe (kombinierte Safranin Orange/von Kossa-Färbung, Tier der Gruppe 1).

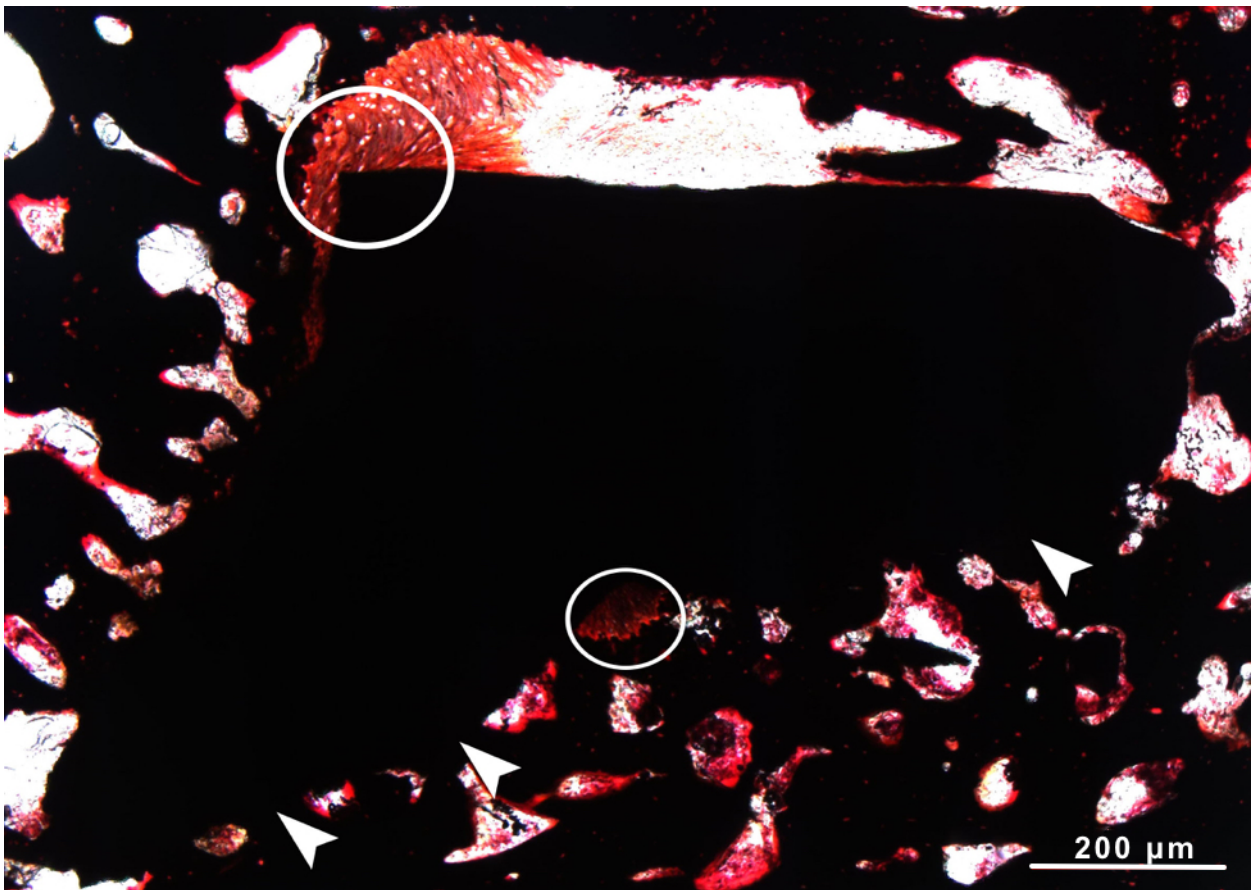


Abbildung 25: Aufnahme eines Struts aus dem Scaffold mit umgebendem knöchernem Kallusgewebe. Sichtbare Knochenverbindungen zum Titan (Pfeile) und Hyaliner Knorpel (Kreise) in Kontakt zum Titan (kombinierte Safranin Orange/von Kossa-Färbung, Tier der Gruppe 1).

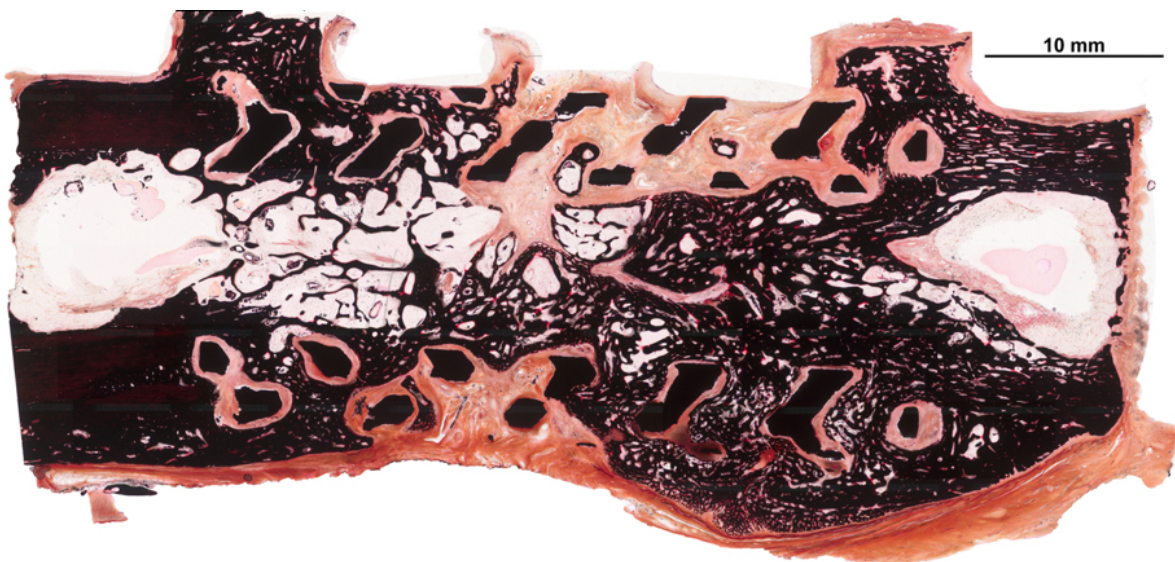


Abbildung 26: Schliff gefärbt nach Safranin-O/von Kossa (Tier der Gruppe 2). Dieses Tier bildete in der zentralen Pore vergleichbar so viel Geflechtknochen wie die meisten Präparate aus der Gruppe 1.

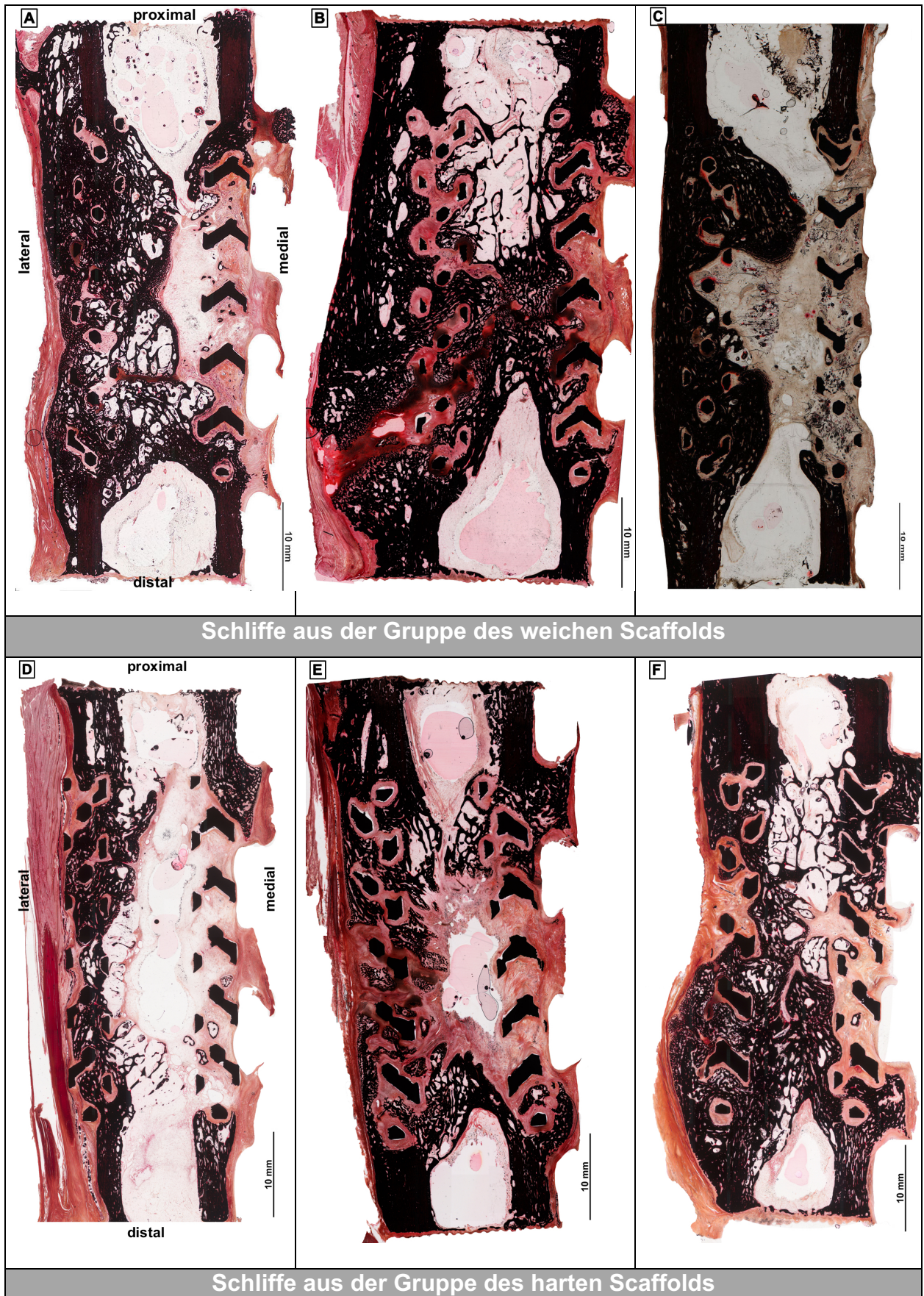


Abbildung 27: Schliffe gefärbt nach Safranin-O/von Kossa, drei Präparate pro Gruppe. Die Schliffe A-C entstammen aus der Gruppe des weichen und die Schliffe D-F aus der Gruppe des harten Titan-Mesh-Scaffolds.

3.4 Ergebnisse der Histomorphometrie

3.4.1 Gewebeverteilung in der Total ROI

Mineralisiertes Knochen-, Binde- und Knorpelgewebe wird ins Verhältnis zur Total ROI gesetzt. Die Gruppe 1 zeigte einen statistisch signifikant höheren Knorpelanteil mit 0,94% +/- 1,19% ($p=0,045$) als die Gruppe 2 (Tabelle 7 und Abbildung 28). Der Knorpelanteil in der Gruppe 2 lag lediglich bei 0,19 +/- 0,39%. In der Gruppe mit den weichen Titan-Mesh-Scaffolds (Gruppe 1) lag der min. Knochengewebeanteil in dieser ROI bei 37,02% +/- 9,63%. Die Gruppe 2 zeigte auch ein nahezu vergleichbares Resultat mit 34,01% +/- 7,57%. Der Bindegewebeanteil in der Gruppe 1 lag bei 61,26% +/- 9,34% und in der Gruppe 2 bei 65,24% +/- 7,53%. (Tabelle 7).

Tabelle 7: Darstellung der min. Knochen-, Knorpel- und Bindegewebe- fläche in der Total ROI; p-Wert: Wilcoxon-Mann-Whitney-Test ($p \leq 0,05$)

		Min. Knochen- fläche [%]	Knorpel- fläche [%]	Bindegewebe- fläche [%]
Gruppe 1 (n=6)	Median	37,02	0,94	61,26
	Mittelwert	34,58	1,29	64,12
	Standardabweichung	9,63	1,19	9,34
Gruppe 2 (n=6)	Median	34,10	0,19	65,24
	Mittelwert	32,02	0,31	67,68
	Standardabweichung	7,57	0,39	7,53
	p-Wert	0,242	0,045	0,197

Ergebnisse

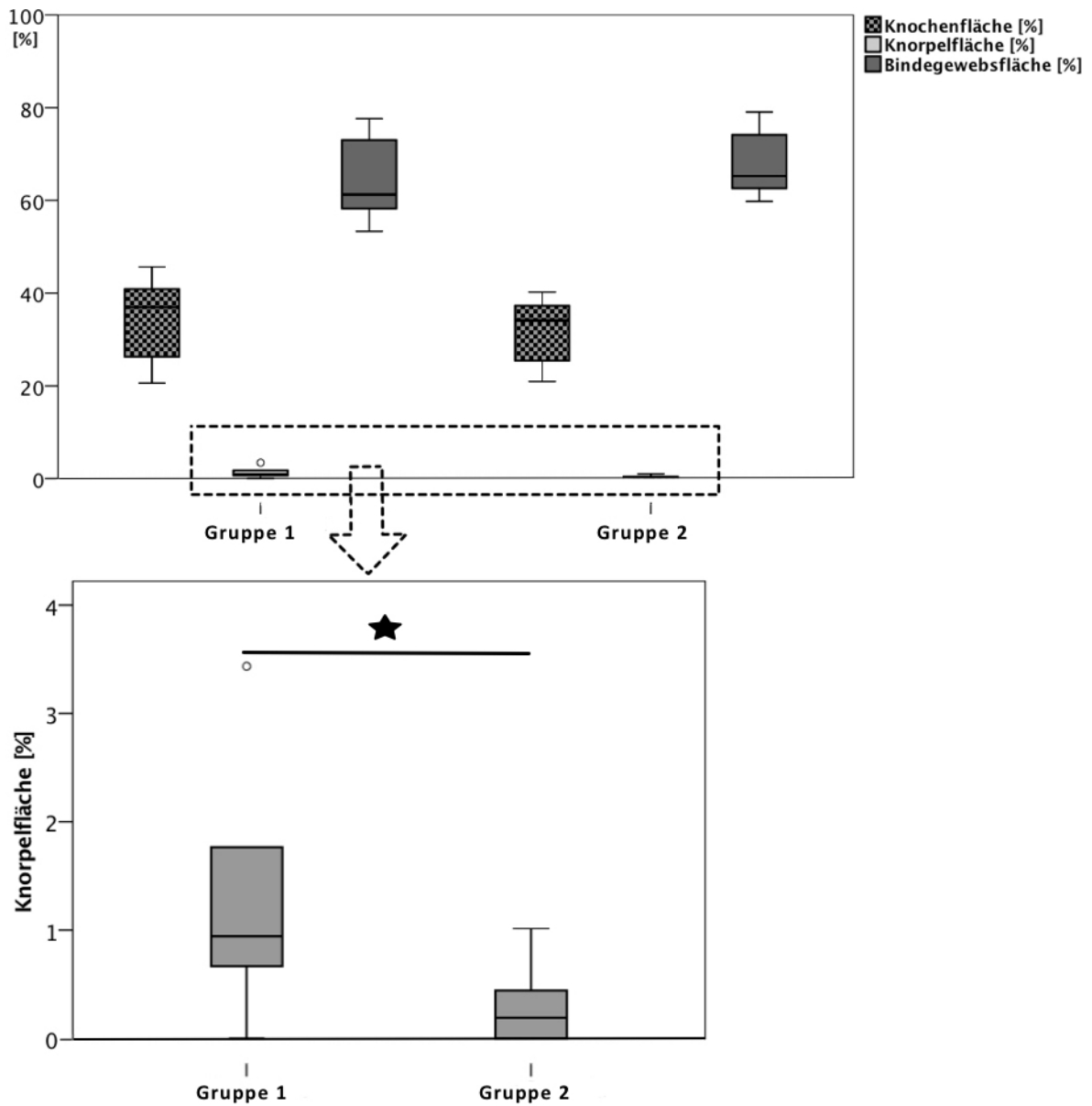


Abbildung 28: Darstellung der min. Knochen-, Knorpel- und Bindegewebebefläche in der Total ROI in relativen Zahlen [%]; pro Gruppe n=6, Wilcoxon-Mann-Whitney-Test ($p \leq 0,05$)

3.4.2 Verteilung des mineralisierten Knochengewebes innerhalb der fünf verschiedenen ROIs

Das mineralisierte Knochengewebe wird in Mediale Struts-, Laterale Struts-, Periostale Laterale-, Periostale Mediale - und Endostale ROIs präsentiert. Die Gruppe 2 zeigte in der Periostalen Medialen ROI einen statistisch signifikant höheren min. Knochenanteil mit 35,83% +/- 7,11% (p=0,008) als die Gruppe 1 (Tabelle 8 und Abbildung 29). Bis auf die Mediale Struts ROI und Periostale Mediale ROI zeigte die Gruppe 1 höhere min. Knochengewebeanteile. Der höchste min. Knochengewebeanteil lag in der Gruppe 1 in der Periostalen Lateralen ROI mit 47,24% +/- 24,78% und in der Gruppe 2 in der Laterale Struts ROI mit 40,52% +/- 6,76%.

Tabelle 8: Darstellung der min. Knochengewebeverteilung in fünf verschiedene ROIs in relativen Zahlen [%]; p-Wert: Wilcoxon-Mann-Whitney-Test (p≤0,05)

		Mediale Struts ROI [%]	Laterale Struts ROI [%]	Periostale Laterale ROI [%]	Periostale Mediale ROI [%]	Endostale ROI [%]
Gruppe 1 (n=6)	Median	17,08	41,25	47,24	12,24	35,75
	Mittelwert	17,59	43,48	43,27	13,65	36,11
	Standardabweichung	10,46	21,11	24,78	11,62	11,42
Gruppe 2 (n=6)	Median	23,24	40,52	35,71	35,83	27,66
	Mittelwert	21,85	41,26	34,59	32,64	27,75
	Standardabweichung	9,71	6,76	25,13	7,11	11,66
	p-Wert	0,294	0,409	0,155	0,008	0,155

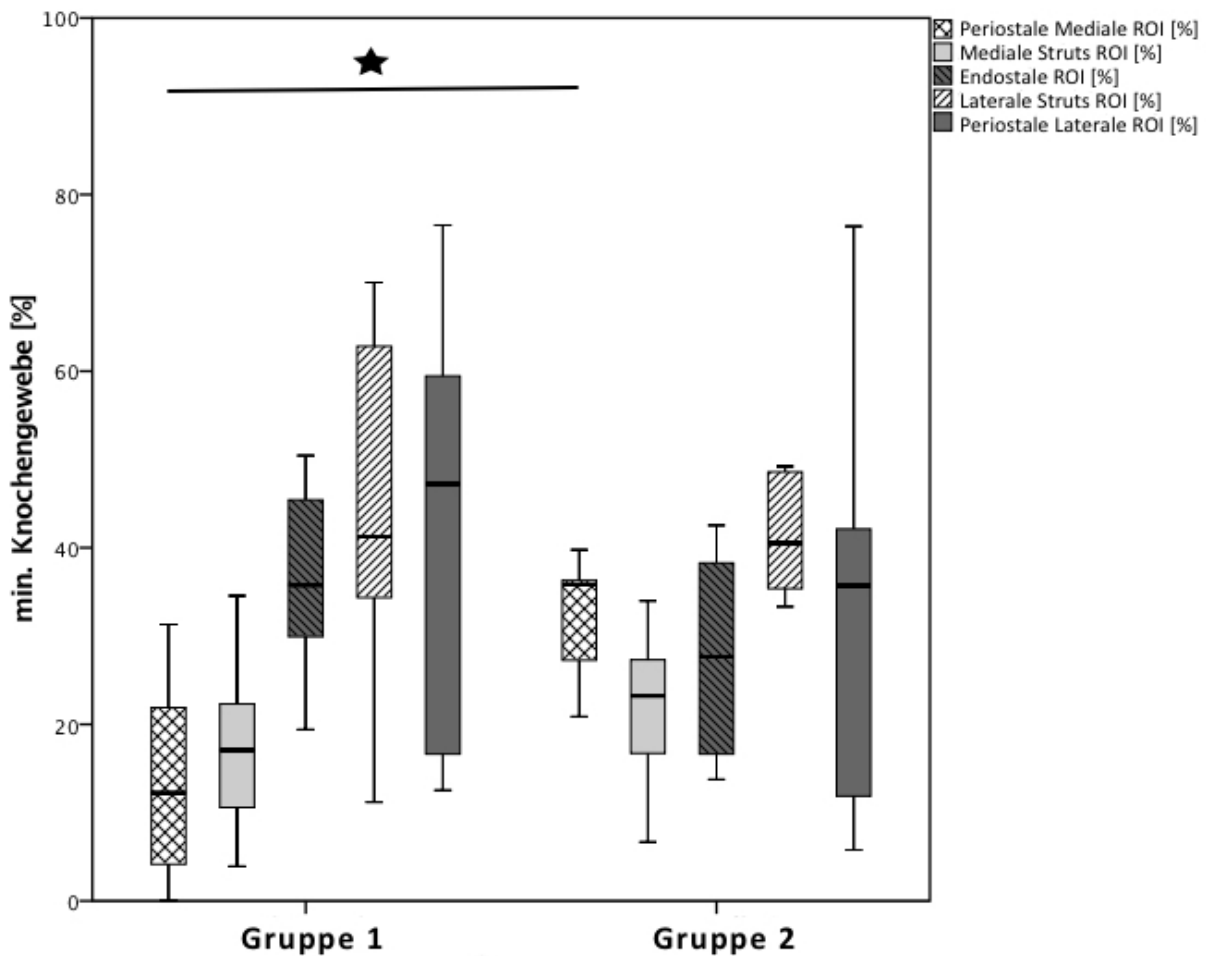


Abbildung 29: Darstellung der min. Knochengewebeverteilung in fünf verschiedene ROIs in relativen Zahlen [%]; pro Gruppe n=6; p-Wert: Wilcoxon-Mann-Whitney-Test ($p \leq 0,05$)

3.4.3 Mineralisierte Knochengewebeverteilung in der medialen und lateralen ROIs

In der medialen ROI konnte eine signifikant höhere Knochenbildung in der Gruppe 2 ($p=0,032$), im Vergleich zu der Gruppe 1 festgestellt werden. Das meiste knöcherne Kallusgewebe wurde in beiden Gruppen lateral gebildet (Tabelle 9 und Abbildung 30).

Ergebnisse

Tabelle 9: Darstellung der min. Knochengewebeverteilung in Medialer und Lateraler ROI in relativen Zahlen [%]; p-Wert bezieht sich auf Wilcoxon-Mann-Whitney-Test ($p \leq 0,05$)

		Laterale ROI [%]	Mediale ROI [%]
Gruppe 1 (n=6)	Median	46,21	16,72
	Mittelwert	45,64	16,24
	Standardabweichung	20,04	9,74
Gruppe 2 (n=6)	Median	38,74	29,71
	Mittelwert	41,69	26,32
	Standardabweichung	10,83	8,75
	p-Wert	0,294	0,032

Ergebnisse

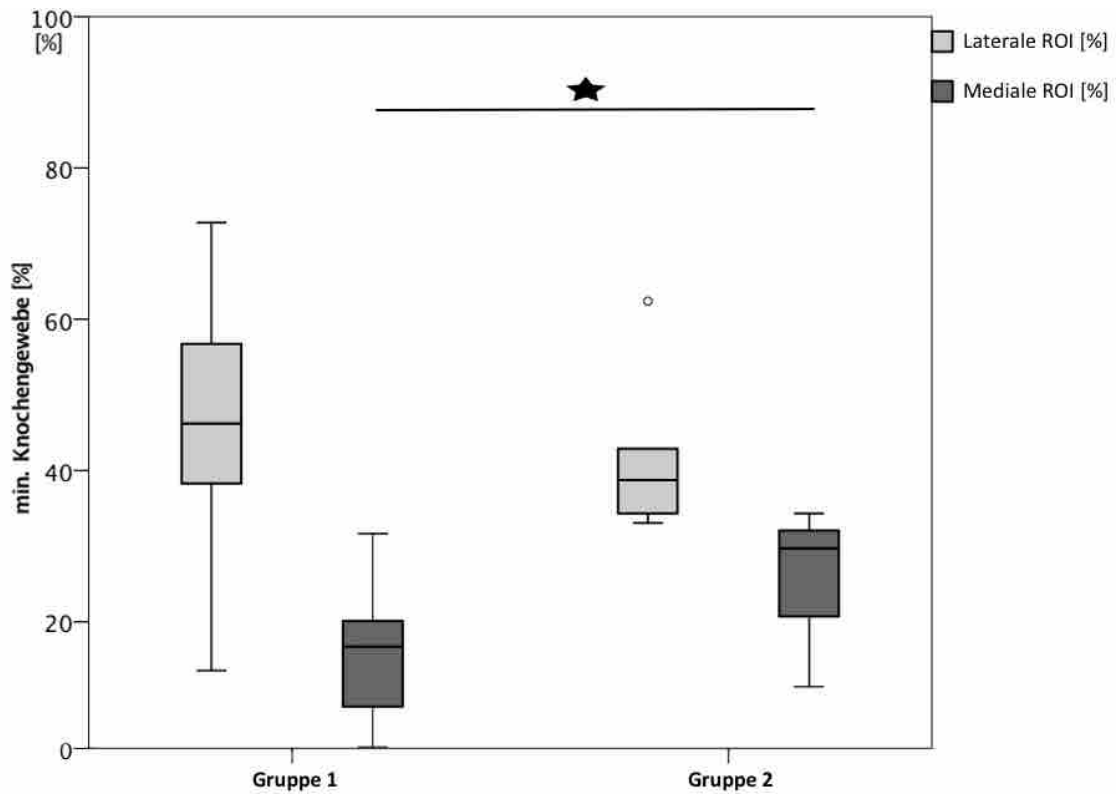


Abbildung 30: Darstellung der min. Knochengewebeverteilung in Medialer und Lateraler ROI in relativen Zahlen [%]; pro Gruppe n=6; p-Wert: Wilcoxon-Mann-Whitney-Test ($p \leq 0,05$)

3.4.4 Mineralisierte Knochengewebeverteilung in der Proximalen Centralen ROI und Distalen Centralen ROI

In der Proximalen Centralen ROI und in der Distalen Centralen ROI waren keine signifikanten Unterschiede in dem min. Knochengewebe zu beobachten. Die größten knöchernen Gewebeanteile, wurden jeweils in der Proximalen Centralen ROI mit 24,37% +/- 19,48% und in der Distalen Centralen ROI mit 25,50% +/- 15,88%, der Gruppe 1 beobachtet (Tabelle 10 und Abbildung 31).

Tabelle 10: Darstellung der min. Knochengewebeverteilung in der Proximalen Centralen ROI und Distalen Centralen ROI in relativen Zahlen [%]; p-Wert: Wilcoxon-Mann-Whitney-Test ($p \leq 0,05$)

		Proximale Centrale ROI [%]	Distale Centrale ROI [%]
Gruppe 1 (n=6)	Median	24,37	25,50
	Mittelwert	25,17	25,19
	Standardabweichung	19,48	15,88
Gruppe 2 (n=6)	Median	12,58	8,10
	Mittelwert	15,41	13,59
	Standardabweichung	7,46	9,43
	p-Wert	0,294	0,120

Ergebnisse

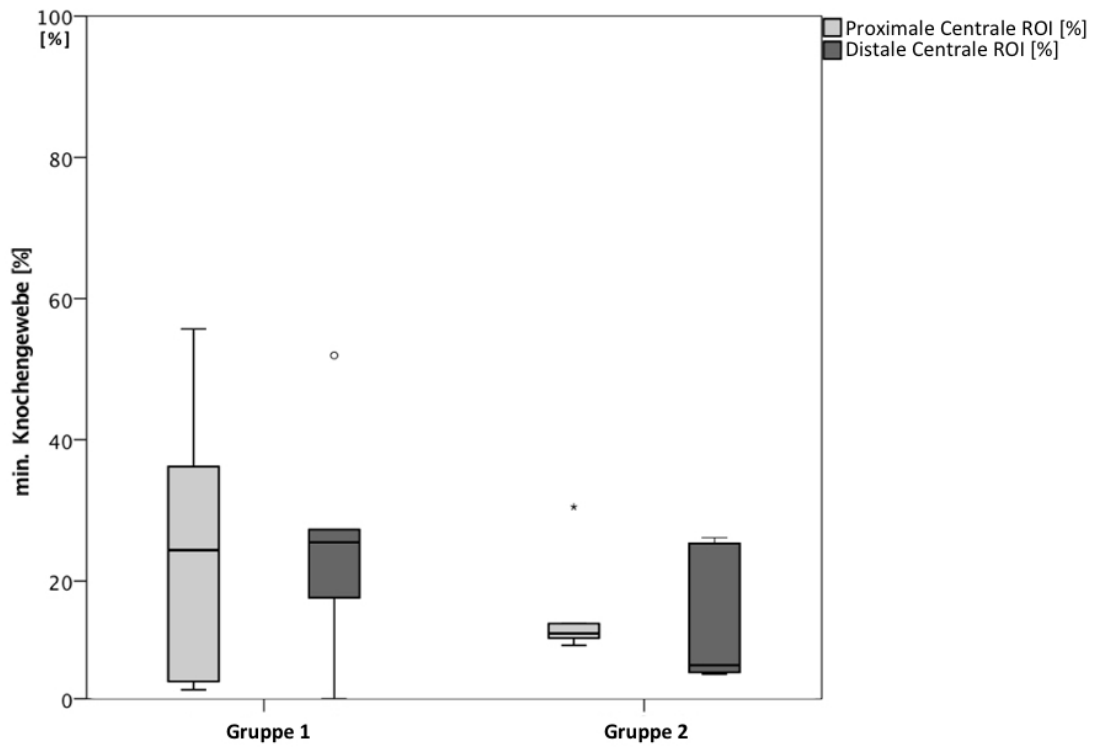


Abbildung 31: Darstellung der min. Knochengewebeverteilung in der Proximalen Centralen ROI und Distalen Centralen ROI in relativen Zahlen [%]; pro Gruppe n=6; p-Wert: Wilcoxon-Mann-Whitney-Test ($p \leq 0,05$)

3.5 Zusammenfassung der Ergebnisse

In der röntgenologischen Auswertung wurde festgestellt, dass die knöchernen Kallusbildung auf der kontralateralen Seite des Plattenfixiersystems (lateral) am stärksten ausgeprägt war. Die Osteotomiedefekte beider Gruppen zeigten dadurch ein asymmetrisches Heilungsergebnis. Dieses dominierende laterale knöchernen Kallusgewebe stammte von den angrenzenden proximalen und distalen Tibiaarealen. Das knöchernen Kallusgewebe wuchs auf der Außenseite des Titan-Mesh-Scaffolds, sowie durch die honigwabenförmigen Struts und füllte das zentrale Loch des Titan-Mesh-Scaffolds auf. Beide Gruppen zeigten ein frühes röntgenologisches Heilungsergebnis. In der Gruppe 1 war jedoch eine frühere vollständige knöchernen Überbrückung zu erkennen. Zwei Tiere aus der Gruppe 1 zeigten röntgenologisch bereits nach acht Wochen eine vollständige knöchernen Überbrückung (B1), wobei in der Gruppe 2 erst nach 24 Wochen erste Tiere eine vollständige knöchernen Überbrückung aufweisen konnten.

Fünf aus sechs Proben beider Gruppen zeigten histologisch eine vollständige knöchernen Überbrückung, sowohl durch die Wabenstruktur als auch über die Außenfläche des Titan-Mesh-Scaffolds. In der Gruppe des weichen Titan-Mesh-Scaffolds wurde in diesen fünf Proben die zentrale Pore (Endostale ROI) mit einer großen Menge an Geflechtknochen gefüllt, wodurch beide Markräume verschlossen wurden. In der Total-ROI zeigte die Gruppe des weichen Titan-Mesh-Scaffolds (Gruppe 1 mit 37,02 [%]), die größte Menge an Knochen, im Vergleich zur Gruppe des harten Titan-Mesh-Scaffolds. Im Vergleich zu der Gruppe des harten Titan-Mesh-Scaffolds, wies die Gruppe des weichen Titan-Mesh-Scaffolds in der Total-ROI signifikant höhere Anteile an Knorpel auf (Gruppe 1 mit 0,94 [%]). In der histomorphometrischen Analyse konnte eine fortgeschrittene Knochenbildung, auf der lateralen Seite und ein geringerer min. Knochengewebeanteil, auf der medialen Seite, beobachtet werden. Die Tibia zeigte in beiden Gruppen einen größeren periostalen lateralen min. Knochengewebeanteil, als in der Endostalen ROI. In beiden Gruppen wurde am meisten min. Knochengewebe in der Endostalen ROI, der Lateralen Struts ROI und in der Periostalen Lateralen ROI gebildet. Es wurde in beiden Gruppen in der Lateralen ROI mehr knöchernes Kallusgewebe gebildet, als in der Medialen ROI (Gruppe 1 mit 46,21 [%], Gruppe 2 mit 38,74 [%]). Die Untersuchungen zeigten, dass in der Mitte des Osteotomiedefektes, in Gruppe des weichen Titan-Mesh-

Scaffolds, mehr knöchernes Kallusgewebe auffindbar war, als in der Gruppe des harten Titan-Mesh-Scaffolds. In dem Vergleich zwischen den Proximalen- und Distalen Centralen ROIs wies die Gruppe des weichen Titan-Mesh-Scaffolds in beiden ROIs mehr gebildetes knöchernes Kallusgewebe auf (Gruppe 1 in Proximale Centrale ROI mit 24,37 [%] und in der Distalen Centralen ROI mit 25,50 [%]) als die Gruppe des harten Titan-Mesh-Scaffolds. In der deskriptiven Histologie und in der histomorphometrischen Auswertung wurde festgestellt, dass die Gruppe des weichen Titan-Mesh-Scaffolds größere min. Knochen- und Knorpelgewebeanteile als die Gruppe des harten Titan-Mesh-Scaffolds aufweist. Auch die röntgenologische Analyse zeigte eine schnellere Knochenregeneration zu Gunsten der Gruppe des weichen Titan-Mesh-Scaffolds.

4 DISKUSSION

4.1 Beantwortung der Hypothesen

Es konnte in dieser Studie nachgewiesen werden, dass die Rekonstruktion eines 4 cm messenden segmentalen Knochendefektes der Schafstibia mittels eines Titan-Mesh-Scaffolds, in Kombination mit einer winkelstabilen Plattenosteosynthese mit Dynamic Locking Screws suffizient, stabilisiert werden kann und hierdurch eine Heilung des Defektes ermöglicht wird.

Weiterhin konnte gezeigt werden, dass eine Modulation der Steifigkeit des Titan-Mesh Cages in dem vorgestellten Tibiadefektmodell im Schaf einen relevanten Einfluss auf das knöcherne Einwachsverhalten hat. Durch den Einsatz des „weicheren“ Scaffolds (0,84 GPa) konnte im Vergleich zum „härteren“ Scaffold (2,88 GPa) ein signifikant besseres Heilungsergebnis nachgewiesen werden.

4.2 Relevanz des Tiermodells

In dieser Studie wurde ein Großtiermodell mit 15 weiblichen Merino-Mix-Schafen angewendet, da der Knochenaufbau des Schafes sehr ähnlich zu dem menschlichen Knochen ist [70, 88, 89]. Für zahlreiche Fragestellungen im Bereich der ossären Regeneration haben sich die Schafe als bewährtes Versuchstier herausgestellt [68, 89]. Schafe sind Fluchttiere, weshalb diese nach einer Operation ihre Gliedmaßen viel schneller mit einer höheren Last belasten, als das beim Menschen der Fall ist. Es kann also davon ausgegangen werden, dass eine erfolgreiche Stabilisierung eines segmentalen Knochendefektes kritischer Größe beim Schaf, mit dem gleichen Konstrukt wie beim Menschen erst recht erfolgreich sein wird, da eine bewusste Entlastung der Extremität durchgeführt werden kann. Ausgewachsene Schafe haben zusätzlich die Vorteile, dass sie ein dem Menschen ähnliches Körpergewicht besitzen und die Dimension ihrer Röhrenknochen die Implantation von Osteosynthesematerial ermöglicht, welches beim Menschen Anwendung findet [69, 70].

4.3 Diskussion der Ergebnisse

Gegenüber der Distraktionsosteogenese oder der Übertragung vaskularisierter kortikaler Knochen, belegen die Resultate der vorliegenden Studie den Vorteil der Rekonstruktion von großen segmentalen Knochendefekten durch winkelstabile Platte-Schrauben-Titan-Mesh-Scaffold-Konstrukten im Schafsmodell. Diese Rekonstruktion erlaubt die ursprüngliche Gliederlängenwiederherstellung und die unmittelbare Gliedmaßenstabilität, was mit endoprothetischen Lösungen vergleichbar ist. Zusätzlich bietet die Rekonstruktion alle Vorteile der biologischen Wiederherstellung [1, 55]. Beide Titan-Mesh-Scaffolds (weich und hart) zeigten in der röntgenologischen Analyse eine frühe Knochenbildung auf der Implantatoberfläche. Das Knochenwachstum auf der Außenseite des Titan-Mesh-Scaffolds führte zu einer vollständigen knöchernen Überbrückung über den Defekt. Die prognostizierte höhere mechanische Stimulation auf der lateralen Defektseite, deckte sich mit dem ausgeprägten Einwachsen von Knochen, auf der lateralen Defektseite [1].

Eine knöcherne Überbrückung in der Gruppe des harten Titan-Mesh-Scaffolds war erst nach 24 Wochen röntgenologisch nachweisbar. Die Gruppe des weichen Titan-Mesh-Scaffolds zeigte eine schnellere Knochenregeneration, im Vergleich zur Gruppe des harten Titan-Mesh-Scaffolds. Bereits nach acht Wochen war hier eine knöcherne Überbrückung, über den Defekt in kritischer Größe zu erkennen. Dieser schnellere Regenerationsprozess kann mit der höheren mechanischen Stimulation des weichen Titan-Mesh-Scaffolds erklärt werden [1]

Als Vorstudie wurde eine Finite-Element-Analyse durchgeführt, um die Widerstandsfähigkeit des Titan-Mesh-Scaffolds gegen mechanisches Versagen zu überprüfen, bzw. die Spannungsverteilungen innerhalb des Konstruktes zu detektieren [1]. Durch die mediale Verankerung des Plattenfixiersystems wurden in der Finite-Element-Analyse die höheren Spannungen auf der lateralen Seite vorhergesagt, was das asymmetrische Heilungsergebnis widerspiegelt. Niedrigere Spannungen wurden nahe zur Fixationsplatte (medial) prognostiziert [1]. Dementsprechend entwickelte sich auf dieser Defektseite weniger knöchernes Kallusgewebe.

Fünf aus sechs Präparaten beider Gruppen zeigten 24 Wochen nach der Operation in der histologischen Analyse einen fortgeschrittenen Heilungsprozess mit unilateraler knöcherner Überbrückung über dem Osteotomiedefekt. In den Präparaten konnten auch

radiologisch die asymmetrische laterale knöchernen Kallusbildung nachgewiesen werden. Jedoch führte die Verwendung vom weichen Titan-Mesh-Scaffold in der zentralen Titan-Mesh-Scaffoldpore zu einem größeren Knochenwachstum und zu einem fortgeschrittenen Lamellenknochenremodelling im Vergleich zu den Präparaten aus der Gruppe des harten Titan-Mesh-Scaffolds. Neben dem Knochen auf der Außenfläche des lateralen Titan-Mesh-Scaffolds wuchs das knöchernen Kallusgewebe auch in die honigwabeförmige Struktur (entlang der Struts) hinein. Die mediale Defektseite spiegelte in beiden Gruppen ein früheres Heilungsstadium, im Gegensatz zur lateralen Defektseite wider.

Es konnte gezeigt werden, dass durch die mechanische Optimierung hin zum weichen Scaffold die Inaktivitätsatrophie minimiert wurde (stress-shielding), was wiederum die Knochenheilung gefördert haben könnte [1]. Es ist bekannt, dass mechanische Belastungen in einer bestimmten Größenordnung die Gewebemineralisierung und knöchernen Kallusbildung unterstützen [90, 91].

In dieser Studie konnte gezeigt werden, dass die mechanischen Spannungen innerhalb des weichen Titan-Mesh-Scaffolds vorteilhafter waren, was zu größeren Anteilen an Knorpel und höheren Anteilen an knöchernem Kallus, im Vergleich zu den harten Titan-Mesh-Scaffolds, führte. Thompson et al. beschreiben, dass die Zellen chondrogener Abstammung Knorpelgewebe sezernieren und dieses Gewebe als Vorlage für die Kallusbildung dient [92]. Hypertrophe Knorpelzellen können angiogenetische und osteogene Faktoren sezernieren, welches eine entscheidende Rolle in der Vaskularisierung des Defektes und bei der Ablagerung der mineralisierten extrazellulären Matrix spielt, welches einem knöchernen Kallus entspricht [93]. Es wurde gezeigt, dass niedrige mechanische Spannungen die desmale Ossifikation und die intermediären Spannungen der enchondrale Ossifikation fördern [94, 95]. Übereinstimmend damit wurde in unserer Studie gezeigt, dass der enchondrale Ossifikationsprozess durch höhere mechanische Spannungen innerhalb des weichen Titan-Mesh-Scaffolds stimuliert wurde. M Mehta et al. konnten mit ihrer Studie nachweisen, dass große Knochendefekte zur Verringerung der mechanischen Spannungen führen [66]. In der vorliegenden Arbeit wurden durch die Aufnahme des Titan-Mesh-Scaffolds die mechanischen Spannungen innerhalb der regenerierenden Region weiter herabgesetzt. Die Titan-Mesh-Scaffolds sind steife Strukturen, welche den großen Knochendefekten eine hervorragende mechanische Stabilität verleihen. Allerdings

übertragen diese nicht die hohen mechanischen Spannungen auf die betroffene Frakturstelle. Dank der mechanischen Modifikation der Gitternetzstreben (struts) konnte die mechanische Steifigkeit minimiert werden und trotzdem verleiht gleichzeitig der Titan-Mesh-Scaffold eine ausreichende Stabilität für die Frakturstelle. Es konnte in dieser Studie gezeigt werden, dass die Feineinstellung der mechanischen Eigenschaften des Titan-Mesh-Scaffolds den Knochenheilungsprozess positiv beeinflusst [66]. Die autologe Spongiosa-Füllung verschaffte einen ausreichend biologischen Anreiz zur Einleitung der Knochenheilungsreaktion. Hingegen ist bekannt, dass dies allein nicht ausreichend ist, um einen Defekt kritischer Größe zu heilen [96, 97].

4.4 Vergleich mit weiteren Studien

Bisher haben sich nur wenige Studien mit Knochendefektregeneration durch Titan-Mesh-Scaffolds beschäftigt. In diesen Studien wurden hingegen zylindrische Titan-Mesh-Scaffolds (in Harms design) angewendet. Das Potential für die Knochenregeneration in großen Knochendefekten durch einen 3D-Laser-gesinterten Titan-Mesh-Scaffold wurde noch in keiner Studie untersucht. Insbesondere gibt es bisher keine vergleichbare Untersuchung, die sich mit der Modulation der Steifigkeiten des Scaffolds zur Defektüberbrückung und die damit verbundenen Folgen auf das knöcherne Einwachsverhalten beschäftigt haben.

4.4.1 Studien mit segmentalen Knochendefekten im Schafsmodell

Die Mehrzahl der Studien müssen als Kurzzeitstudie betrachtet werden, bei der innerhalb des Versuchszeitraums kein vollständiger Knochenumbau zu erwarten ist. In vielen Fällen geben die Autoren keine wichtigen Informationen über das Alter der Tiere, die Unterbringung und die unterstützenden Fixationsmethoden an. In der Literatur findet man wenig Studien, in denen Defekte kritischer Größe in Höhe von 30 mm im Schafsmodell überschritten werden [5, 68, 98].

Gao et al. verwendete in seiner Studie eine Defektgröße von 16 mm und die Beobachtungszeit betrug nur vier Monate. Über das Alter der Tiere und der Tierhaltung wurden keine Informationen von den Autoren zur Verfügung gestellt. Die Fixierung erfolgte durch überlappende Autokompressionsplatten mit 8 und 6 Löchern. Es wurden Biocoral und Tricalcium Phosphat-Zylinder Implantate miteinander verglichen. Im Vergleich zu TCP zeigte die Gruppe der biokoralen Implantaten eine deutliche Zunahme an äußeren Kallus, eine höhere Dichte bereits nach drei Wochen und eine Erhöhung der Drehmomentkapazität. Seine Fixierungsmethode mit überlappenden Platten nicht lege artis und wird klinisch nicht angewendet im Gegensatz zu unserem Fixationssystem (LCP), was heute zum absoluten Standard in der Unfallchirurgie gehört [68, 99].

Die Knochenheilung bei segmentalen Diaphysendefekten kritischer Größe bei Schafstibiae wurde ebenfalls von Gugala et al. untersucht. Defekte wurden mit einer einzigen, porösen, röhrenförmigen Membran oder mit anatomisch geformten, porösen Doppelrohr-in-Rohr-Membranen überbrückt. Membranen mit unterschiedlichen Porenstrukturen wurden allein und / oder in Kombination mit autologem

Knochenransplantat appliziert. Die diaphysären Defekte waren 40 mm lang und wurden mit einem bilateralen AO-Fixateur externe stabilisiert. Die operierten Tiere waren 6-7 Jahre alt. Die Kontrollgruppe, in der autologes Knochenransplantat ohne irgendeine Membran verabreicht wurde, wurde nicht beschrieben. Eine Defektheilung wurde nur bei Tieren beobachtet, bei denen ein autogenes Knochenransplantat zusammen mit perforierten Membranen verwendet wurde. Es wurde mehr Knochen in den mit Doppelrohr-in-Rohr bedeckten Defekten gebildet, als in der einzigen, röhrenförmigen Membran Gruppe. Der knöcherne Kallus wurde bevorzugt innerhalb des Raums zwischen den Röhren gebildet, was ein radiographisch und histologisch dichteres Erscheinungsbild ergab. Die Dicke des neuen Knochens zwischen den Röhren hatte eine Dicke, die der des intakten Cortex entsprach. Dadurch, dass die Gruppe mit dem autologen Knochenransplantat ohne Membran nicht beschrieben wurde, lässt sich dies mit unserer Studie auch schwer vergleichen. Es lässt sich jedoch beobachten, dass in unserer Studie die knöcherne Kallusbildung in beiden Gruppen sichtbar war und die Dicke des neugebildeten Knochens bei den meisten Präparaten den Cortex überstieg [5, 68, 100].

Wefer et al. führten eine Studie zur Entwicklung und Erprobung eines auf Echtzeitsonographie basierenden Scoringsystems durch, um die Heilung eines Knochendefekts mit einem porösen Hydroxylapatit-Knochenersatzmaterial oder spongiossem Knochenransplantat aus dem Beckenkamm vorherzusagen und durch eine anterolaterale Platte zu stabilisieren. Obwohl die Autoren ihren 20-mm-Defekt als ein Modell mit kritischer Größe beschrieben, wurde keine Vergleichsgruppe herangezogen. Die Definition einer kritischen Defektgröße, die per Definition mindestens das 2-2,5-fache des Durchmessers des Knochens betragen soll, ist im Rahmen dieser Studie somit nicht erfüllt. Ein Vergleich fällt daher schwer. [68, 101].

Variationen in Defektgrößen und Methoden der Defektfixierung (Externer Fixateur, Marknagelung, Plattenfixierung), sowie postoperative Behandlungs- und Managementkonzepte erschweren den Vergleich von Studien und erlauben keine verlässlichen Schlussfolgerungen. Gegenwärtige therapeutische Ansätze umfassen die Anwendung von Knochenransplantaten (autolog, allogene, xenogen), sowie Implantaten aus verschiedenen synthetischen und natürlichen Biomaterialien oder beinhalten einen segmentalen Knochenransport. Keine der beschriebenen Therapien hat sich jedoch als voll befriedigend erwiesen. Die Optimierung von Zell-Gerüst-Kombinationen und lokal

oder systemisch aktive Stimuli bleibt ein komplexer Prozess, der durch eine stark voneinander abhängige Menge charakterisiert ist. Folglich müssen diese Entwicklungen durch klinische Erfahrungswerte, sowie durch Kenntnisse der biologischen Grundlagen gepflegt und bewertet werden. Um die großen Probleme des Knochengewebes zu lösen, müssen sich die Forscher auf die funktionale Beurteilung von biologischen und biomechanischen Parametern der Konstrukte verlassen. Um jedoch einen Vergleich zwischen verschiedenen Studien und ihren Ergebnissen zu ermöglichen ist es wichtig, dass Tiermodelle, Fixiergeräte, chirurgische Verfahren und Messmethoden standardisiert sind. Nur dadurch kann eine Sammlung von einem zuverlässigen Datenpool erreicht werden, was als Basis für weitere orthopädische- und Tissue-Engineering Entwicklungen dienen kann [68].

4.4.2 Studien mit vorgefertigten zylindrischen Titan-Mesh-Scaffolds

Fujibayashi et al. untersuchte die chemische und thermische Oberflächenbehandlung von steifen zylindrischen Titan-Mesh-Scaffolds bei einem 10 mm großen mid-diaphysären Femurdefekt im Kaninchenmodell. Dabei wurde ebenfalls die Entstehung von Kallus auf der Oberfläche des Titan-Mesh-Scaffolds beobachtet. Des Weiteren war der knöcherne Einwuchs in die Netzstruktur mit einer ineinander greifenden Verzahnung zwischen Titan-Mesh-Scaffold und Knochen auf der Mikroradiographie zu erkennen. Im Gegensatz zu den Titan-Mesh-Scaffold unserer Studie, waren diese einfach konzipierten Titan-Mesh-Scaffolds hinsichtlich ihrer Steifigkeit nicht mechanisch optimiert [102].

Lindsey et al. füllten die Titan-Mesh-Scaffolds mit demineralisierter Knochenmatrix bevor sie in einen 3 cm großen mid-diaphysären Osteotomiedefekt der Hundefemur eingesetzt wurden. Zusätzlich erfolgte die osteosynthetische Stabilisierung mittels Marknagel als zentralem Kraftträger. Obgleich hier allein schon aufgrund der mechanischen Differenz zwischen der Marknagelstabilisierung und der additiven Plattenosteosynthese in unserer Studie kein direkter Vergleich angestrebt werden kann, konnte dennoch ein ähnliches Knochenwachstum auf der Außenfläche und innerhalb der Fenestration des Titan-Mesh-Scaffolds bei jedoch fehlenden Zeichen einer enchondralen Ossifikation nachgewiesen werden [8].

Durch die dargestellten Differenzen in den jeweiligen Studien hinsichtlich deren Gesamtdesign, der unterschiedlichen Tiermodelle und Stabilisierungsprinzipien bis hin zum Cagedesign und deren differente Füllung mit Knochen oder

Knochenersatzmaterialien ist ein Vergleich zu unserem Modell schwierig, bzw. nur ansatzweise möglich.

4.4.3 Studien mit mechanisch veränderten zylindrischen Titan-Mesh-Scaffolds

Eine etwas bessere Vergleichbarkeit ließe sich mit Studien erwarten, die zumindest ebenso eine Modulation der Steifigkeit des Cagekonstruktes zum Inhalt haben.

Es wurde in verschiedenen Studien unter dem Einsatz der Finite-Element-Analyse, das Design des konventionellen Harms-Mesh-Scaffolds durch eine Änderung, der Titan-Mesh-Scaffold-Geometrie und / oder die Porengröße untersucht. Wieding, J., et al. haben festgestellt, dass die Minimierung der Materialmenge des inneren Strebendurchmessers einen geringeren Einfluss hat als die Erhöhung der Porosität, wenn die Gerüste unter biomechanischer Belastung belastet werden. Die Verwendung eines numerischen Optimierungsprozesses erwies sich als praktikables Mittel, um die Menge des benötigten Titanmaterials zu reduzieren, ohne die biomechanische Leistung des Gerüsts negativ zu beeinflussen (Steifigkeit 3,5 GPa – 19,1 GPa). Wir haben in unserer Studie auch ein poröses Scaffolddesign verwendet, wobei die Steifigkeit unserer Scaffolds noch niedriger lagen (0,84 GPa und 2,88 GPa) und trotzdem eine Resistenz gegen mechanisches Versagen gewährleistet haben [103, 104].

In einer weiteren Studie wurden zwei poröse Titan-Mesh-Scaffolds, mit verschiedenen geometrischen Formgebungen und mit einer relativ steifen Struktur (E-Modul 8.22 ± 0.53 und 5.9 ± 0.4 GPa) im Schafsmodell untersucht. Das erste Scaffolddesign wurde durch selektives Laserschmelzen (SLM Solutions GmbH, Lübeck), basierend auf den CAD-Daten eines biomechanisch optimierten Gerüstdesign, hergestellt. Dieser Scaffold wies eine Höhe und einen Durchmesser von 20 und 17 mm auf. Das zweite Scaffolddesign ("Flex-Cage") bestand aus einer perforierten Titanplatte mit einer Dicke von 0,7 mm (bereitgestellt von DOT GmbH, Rostock, Deutschland). Die Höhe und der Durchmesser des Scaffolds betragen 22 bzw. 17 mm. In dieser Studie wurde die Stabilität der Titan-Scaffolds in segmentalen mid-diaphysären metatarsalen Knochendefekten (20 mm), im Vergleich zu kontralateralen unbehandelten (intakter) Knochen für zwei verschiedene Zeiträume (12 und 24 Wochen postoperativ) untersucht. Die Tiere wurden in vier zufällige Gruppen eingeteilt. Tiere aus den Gruppen I und II wurden mit dem SLM-Scaffold für 12 (n = 10) und 24 Wochen (n = 4) behandelt. Tiere der Gruppe III und IV wurden mit

Flex-Cage-Scaffold für 12 (n =7) bzw. 24 Wochen (n =4) behandelt. Die SLM-Scaffolds wurden zusätzlich mit Calciumphosphat beschichtet. Der innere Kern der Flex-Scaffolds wurde mit BONITmatrix® (CaP-Granulat mit einer Größe von ca. 0,6 x 4 mm) gefüllt und in eine Kollagenmatrix eingebettet. Das Granulat bestand aus einer Mischung der beiden Calciumphosphate (Teilchengröße von etwa 90 nm) und b-TCP (Teilchengröße von etwa 400 nm) im Verhältnis 60:40. Anschließend wurde es in eine biologisch aktive Siliziumdioxidmatrix eingebettet. Bei beiden Implantattypen bildete sich an der lateralen Seite neuer Knochen. Auf der medialen Seite, wo die Plattenkonstruktion angebracht wurde, wurde bei beiden Implantattypen eine minimale Knochenbildung festgestellt. Die Knochenbildung um die Scaffolds war bei weniger steifen Implantaten höher.

Ein direkter Vergleich zwischen beiden Studien ist nicht möglich, da die mechanischen Gegebenheiten, wie Steifigkeit und Scaffolddesign unterschiedlich sind. Das asymmetrische Heilungsergebnis auf der kontralateralen Seite des Plattenfixiersystems, war mit unserer Studie vergleichbar, was die die höheren Spannungen auf der lateralen Seite widerspiegelt. Niedrigere Spannungen traten nahe zur Fixationsplatte (medial) auf. Des Weiteren zeigen unsere histomorphometrischen Ergebnisse in der Gruppe des weicheren Scaffolds auch eine größere Menge an knöchernen Kallus [105].

4.5 Zusammenfassung

Die Rekonstruktion von segmentalen Knochendefekten stellt in der unfallchirurgisch/orthopädischen Praxis eine große Herausforderung dar. Es gibt derzeit verschiedene Methoden zur Defektüberbrückung, die ihrerseits verschiedene Vor- und Nachteile haben. Zur Weiterentwicklung der Technologie im Bereich der Defektrekonstruktion sind aktuell maßangefertigte Titanscaffolds mit Gitternetzstruktur in klinischer Erprobung. Das Ziel dieser Studie war es zu untersuchen, ob die Stabilisierung eines kritischen, segmentalen Knochendefekts von 4 cm Ausdehnung mit der Kombination aus dem Titan-Mesh-Scaffold und einer winkelstabilen Platte erfolgreich zu rekonstruieren und dauerhaft zu stabilisieren ist. Als weiteres Ziel galt es zu analysieren, ob die Modifikation des Titan-Mesh-Scaffolds hinsichtlich seiner Steifigkeit einen Einfluss auf die Knochenregeneration hat. Dafür haben wir ein Großtiermodell mit Schafen gewählt, da es für klinisch realistische Knochendefekte an Tibia bereits entwickelt und validiert ist [70, 77, 78]. In dieser Studie wurde mittels der Technologie des Laser Sinterings (Rapid Prototyping) ein Titan-Mesh-Scaffold entwickelt, dessen Länge 40 mm und der Durchmesser des runden Querschnitts 20 mm betrug. Durch die mechanische Anpassung der Gitternetzstreben (struts) konnte die biomechanische Steifigkeit des Konstruktes modifiziert werden. Bei der Analyse mit Finite-Elemente-Techniken der Titan-Mesh-Scaffolds wurde darauf geachtet, dass der Titan-Mesh-Scaffold eine minimale Inaktivitätsatrophie (stress-shielding) aufweist und gleichzeitig ein adäquates Widerstandsverhalten gegen mechanisches Versagen besitzt. Durch die mediale Verankerung des Plattenfixiersystems wurden in der Finite-Element-Analyse die höheren Spannungen auf der lateralen Seite vorhergesagt [1]. Daraus resultierte eine wabenartige Scaffoldkonfiguration mit einer Steifigkeit von 0,84 GPa (weich) und 2,88 GPa (hart). Die Stabilisierung erfolgte unter dem Einsatz von winkelstabilen Plattenosteosynthesen (LCP) und dynamischen Kopfverriegelungsschrauben (Dynamic Locking Screws – DLS). Die Tiere wurden in zwei Gruppen (Gruppe 1 mit weichen Titan-Mesh-Scaffolds, Gruppe 2 mit harten Titan-Mesh-Scaffolds) mit jeweils sieben Schafen eingeteilt und während ein weiteres Schaf die Positivkontrolle darstellte. Bei 15 weiblichen Merino-Mix-Schafen (mittleres Gewicht 61 kg; Standardabweichung \pm 6 kg; Alter \geq 2,5 Jahren) wurde tibial ein diaphysärer Segmentdefekt mit einer kritischen Größe (per Definition zwei- bis zweieinhalb-facher Durchmesser des betroffenen Knochens) von 4 cm Länge gesetzt. Der weiche und harte Titan-Mesh-Scaffold wurde jeweils mit der gleichen Menge

autologer Beckenkammpongiosa (7,5 ml) gefüllt, press-fit in den segmentalen Defekt eingebracht und anschließend mit der 4,5-mm-Stahl-LCP + DLS stabilisiert.

Die radiologischen Untersuchungen zeigten eine frühere vollständige knöcherne Überbrückung des Osteotomiedefektes (Bridging - Score B1) bereits acht Wochen postoperativ für die Gruppe mit den weichen Titan-Mesh-Scaffolds. Im Vergleich dazu erreichte die Gruppe mit den harten Titan-Mesh-Scaffolds den Bridging -Score B1 erst nach 24 Wochen. In beiden Gruppen war die Kallusbildung vorwiegend auf der kontralateralen Seite des Plattenfixationssystems zu erkennen. Korrespondierend zu den radiologischen Ergebnissen zeigte die deskriptive Histologie ebenfalls auf der lateralen Seite eine asymmetrisch dominierende Knochenbildung. Die histomorphometrische Analyse von mineralisiertem Knochen, Weichgewebe und Hyalinknorpel in den ROIs (laterale und mediale ROIs) bestätigte das röntgenologische Ergebnis einer asymmetrischen mineralisierten Kallusbildung auf der lateralen Defektseite, die den durch FE-Analysen vorhergesagten höheren lateralen Spannungen entspricht. Im Vergleich zu der Gruppe des harten Titan-Mesh-Scaffolds, wies die Gruppe des weichen Titan-Mesh-Scaffolds in der Total-ROI signifikant höhere Anteile an Knorpel auf (Gruppe 1 mit 0,94 [%] vgl. Gruppe 2 mit 0,19 [%]). Die Gruppe des weichen Titan-Mesh-Scaffolds wies sowohl in den Proximalen- als auch in den Distalen Centralen ROIs, mehr gebildetes knöchernes Kallusgewebe auf (Gruppe 1 in Proximale Centrale ROI mit 24,37 [%], vgl. Gruppe 2 mit 12,58 [%] und in der Distalen Centralen ROI mit 25,50 [%] vgl. Gruppe 2 mit 8,10 [%]) als die Gruppe des harten Titan-Mesh-Scaffolds.

Ein direkter Vergleich mit anderen Untersuchungen bezüglich zylindrischer Titan-Mesh-Scaffolds in knöchernen Defektmodellen ist nicht möglich, da jeweils eine deutliche Diskrepanz bezüglich Studiendesign und mechanischer Grundgegebenheiten besteht. Im Einzelnen konnten hingegen Übereinstimmungen hinsichtlich des asymmetrischen Heilungsergebnisses auf der kontralateralen Seite des Plattenfixationssystems festgestellt werden. Des Weiteren konnte untermauert werden, dass die Verwendung von Scaffolds mit einer geringeren Festigkeit im Ergebnis zu einer größeren Kallusbildung führt.

Zusammenfassend lässt sich also sagen, dass sich die Titan-Mesh-Scaffolds unserer Studie in Kombination mit autologer Spongiosa, im Schafsmodell sowohl in der „weichen“, als auch „rigiden“ Ausführung eine adäquate Behandlungsmöglichkeit von kritischen segmentalen Knochendefekten darstellen. Im Hinblick auf eine etwaige

Überlegenheit der unterschiedlichen Scaffolds zeigte sich der weiche Scaffold hinsichtlich radiologischer und histomorphometrischer Kallusbildung im Ausheilungsergebnis überlegen.

5 LITERATURVERZEICHNIS

1. Pobloth, A.-M., S. Checa, H. Razi, A. Petersen, J.C. Weaver, K. Schmidt-Bleek, M. Windolf, A.Á. Tatai, C.P. Roth, and K.-D. Schaser, *Mechanobiologically optimized 3D titanium-mesh scaffolds enhance bone regeneration in critical segmental defects in sheep*. Science translational medicine, 2018. **10**(423): p. eaam8828.
2. Schmitz, J.P. and J.O. Hollinger, *The critical size defect as an experimental model for craniomandibulofacial nonunions*. Clinical orthopaedics and related research, 1986. **205**: p. 299-308.
3. Balzer, A.F., *Tissue engineering von axial vaskularisiertem bioartifiziellen Knochen im critical size Femurdefektmodell der Ratte*. 2013, Imu.
4. Einhorn, T.A., *Clinically applied models of bone regeneration in tissue engineering research*. Clinical orthopaedics and related research, 1999. **367**: p. S59-S67.
5. Gugala, Z. and S. Gogolewski, *Regeneration of segmental diaphyseal defects in sheep tibiae using resorbable polymeric membranes: a preliminary study*. Journal of orthopaedic trauma, 1999. **13**(3): p. 187-195.
6. Rimondini, L., N. Nicoli-Aldini, M. Fini, G. Guzzardella, M. Tschon, and R. Giardino, *In vivo experimental study on bone regeneration in critical bone defects using an injectable biodegradable PLA/PGA copolymer*. Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology, 2005. **99**(2): p. 148-154.
7. Cacchioli, A., B. Spaggiari, F. Ravanetti, F. Martini, P. Borghetti, and C. Gabbi, *The critical bone defect: morphological study of bone healing*. Annali della facolta di medicina veterinaria. Universita di Parma, 2006. **26**: p. 97-110.
8. Lindsey, R.W., Z. Gugala, E. Milne, M. Sun, F.H. Gannon, and L.L. Latta, *The efficacy of cylindrical titanium mesh cage for the reconstruction of a critical-size canine segmental femoral diaphyseal defect*. Journal of orthopaedic research, 2006. **24**(7): p. 1438-1453.
9. Gugala, Z., R.W. Lindsey, and S. Gogolewski. *New Approaches in the Treatment of Critical-Size Segmental Defects in Long Bones*. in *Macromolecular Symposia*. 2007. Wiley Online Library.
10. Schmitz, J.P., Z. Schwartz, J.O. Hollinger, and B.D. Boyan, *Characterization of rat calvarial nonunion defects*. Cells Tissues Organs, 1990. **138**(3): p. 185-192.
11. Hollinger, J.O. and J.C. Kleinschmidt, *The critical size defect as an experimental model to test bone repair materials*. Journal of Craniofacial Surgery, 1990. **1**(1): p. 60-68.
12. Gomes, P. and M. Fernandes, *Rodent models in bone-related research: the relevance of calvarial defects in the assessment of bone regeneration strategies*. Laboratory animals, 2011. **45**(1): p. 14-24.
13. Heckman, J.D. and J. Sarasohn-Kahn, *The economics of treating tibia fractures*. Bulletin Hospital for Joint Diseases, 1997. **56**(1): p. 63-72.

14. Blick, S.S., R.J. Brumback, R. Lakatos, A. Poka, and A.R. Burgess, *Early prophylactic bone grafting of high-energy tibial fractures*. *Clinical orthopaedics and related research*, 1989(240): p. 21-41.
15. Gopal, S., S. Majumder, A. Batchelor, S. Knight, P. De Boer, and R. Smith, *Fix and flap: the radical orthopaedic and plastic treatment of severe open fractures of the tibia*. *Bone & Joint Journal*, 2000. **82**(7): p. 959-966.
16. Rimmer, S., U. Prakash, and M. McQueen, *The epidemiology of open long bone fractures*. *Injury*, 1998. **29**(7): p. 529-534.
17. Keating, J., A. Simpson, and C. Robinson, *The management of fractures with bone loss*. *Bone & Joint Journal*, 2005. **87**(2): p. 142-150.
18. Gustilo, R.B., R.M. Mendoza, and D.N. Williams, *Problems in the management of type III (severe) open fractures: a new classification of type III open fractures*. *Journal of Trauma and Acute Care Surgery*, 1984. **24**(8): p. 742-746.
19. Robinson, C., G. McLauchlan, J. Christie, and M. McQueen, *Tibial fractures with bone loss treated by primary reamed intramedullary nailing*. *Bone & Joint Journal*, 1995. **77**(6): p. 906-913.
20. Van Staa, T., E. Dennison, H. Leufkens, and C. Cooper, *Epidemiology of fractures in England and Wales*. *Bone*, 2001. **29**(6): p. 517-522.
21. Martini, M., A. Daoud, A. Saighi-Bouaouina, F. Ziani, F. Burny, and M. Donkerwolcke, *Surgical treatment of chronic hematogenous osteomyelitis. A series of 42 cases*. *Revue de chirurgie orthopedique et reparatrice de l'appareil moteur*, 1993. **80**(7): p. 642-650.
22. Sellei, R., P. Kobbe, M. Knobe, P. Lichte, T. Dienstknecht, S. Lemmen, and H.-C. Pape, *Therapie der chronischen Osteomyelitis*. *Der Orthopäde*, 2012. **41**(1): p. 43-50.
23. Militz, M., C. Gabler, J. Mauck, C. Miethke, R. Bialas, V. Bühren, W. Mittelmeier, M. Öhlbauer, and R. Bader, *Rekonstruktion von Segmentdefekten der langen Röhrenknochen*. *Trauma und Berufskrankheit*, 2016. **18**(1): p. 85-91.
24. Diehl, P., R. Burgkart, T. Klier, C. Glowalla, and H. Gollwitzer, *Periprothetische Frakturen nach Knieendoprothetik*. *Der Orthopäde*, 2006. **35**(9): p. 961-974.
25. Chadayammuri, V., M. Hake, and C. Mauffrey, *Innovative strategies for the management of long bone infection: a review of the Masquelet technique*. *Patient safety in surgery*, 2015. **9**(1): p. 1.
26. Capanna, R., D.A. Campanacci, N. Belot, G. Beltrami, M. Manfrini, M. Innocenti, and M. Ceruso, *A new reconstructive technique for intercalary defects of long bones: the association of massive allograft with vascularized fibular autograft. Long-term results and comparison with alternative techniques*. *Orthopedic Clinics of North America*, 2007. **38**(1): p. 51-60.
27. Adani, R., L. Delcroix, M. Innocenti, L. Tarallo, and A. Baccarani, *Free fibula flap for humerus segmental reconstruction: report on 13 cases*. *La Chirurgia degli organi di movimento*, 2008. **91**(1): p. 21-26.
28. CIERNY III, G. and K.E. Zorn, *Segmental Tibia1 Defects Comparing Conventional and Ilizarov Methodologies*. *Clinical orthopaedics and related research*, 1994. **301**: p. 118-123.

29. Hankemeier, S., L. Bastian, T. Gosling, and C. Krettek, *Prinzipien der Kallusdistraction*. Der Unfallchirurg, 2004. **107**(10): p. 945-960.
30. Glatzel, U., V. Heppert, and A. Wentzensen, *Kallusdistraction*. Trauma und Berufskrankheit, 2002. **4**(4): p. 404-412.
31. Hankemeier, S., H. Pape, M. Jagodzinski, and C. Krettek, *Operative Technik der Kallusdistraction*. Der Unfallchirurg, 2004. **107**(10): p. 961-964.
32. Hessmann, M., P. Rommens, and K. Hainson, *Callus distraction of the femur and tibia. Experience with the Monofixator—indications for reosteosynthesis*. Der Unfallchirurg, 1998. **101**(5): p. 370-376.
33. Grimer, R.J., S.R. Carter, and P.B. Pynsent, *The cost-effectiveness of limb salvage for bone tumours*. J Bone Joint Surg Br, 1997. **79**(4): p. 558-561.
34. Baumgart, R. and U. Lenze, *Expandable endoprotheses in malignant bone tumors in children: indications and limitations*, in *Treatment of bone and soft tissue sarcomas*. 2009, Springer. p. 59-73.
35. Windhager, R., G. Hobusch, and M. Matzner, *Allogene Transplantate für biologische Rekonstruktionen von Knochendefekten* *Allogeneic transplants for biological reconstruction of bone defects*. Der Orthopäde, 2017. **46**(8): p. 656-664.
36. Schuh, R., J. Panotopoulos, S. Puchner, M. Willegger, G. M. Hobusch, R. Windhager, and P. Funovics, *Vascularised or non-vascularised autologous fibular grafting for the reconstruction of a diaphyseal bone defect after resection of a musculoskeletal tumour*. The bone & joint journal, 2014. **96**(9): p. 1258-1263.
37. Ogilvie, C.M., E.A. Crawford, H.S. Hosalkar, J.J. King, and R.D. Lackman, *Long-term results for limb salvage with osteoarticular allograft reconstruction*. Clinical Orthopaedics and Related Research®, 2009. **467**(10): p. 2685-2690.
38. Wuisman, P., F. Gohlke, and A. Witlox, *Allografts in der Rekonstruktion von knöchernen Defekten bei primär malignen Knochentumoren*. Der Orthopäde, 2003. **32**(11): p. 994-1002.
39. Pacifico, M., D. Floyd, and S. Wood, *Tibial stress fracture as a complication of free-fibula vascularised graft for mandibular reconstruction*. British journal of plastic surgery, 2003. **56**(8): p. 832-834.
40. Dielert, E. and F. Zangrando, *Erste Ergebnisse zum Volumenverhalten der Knochenspäne nach avaskulärem und reanastomisiertem Transfer*. Dtsch Zahnarztl Z, 1989. **44**: p. 678-680.
41. Hierner, R. and K. Wolf, *Vaskularisierte Knochentransplantate*. Obere Extremität, 2011. **6**(3): p. 159-169.
42. Wood, M. and A. Gilbert, *Femoral head osteonecrosis*. Microvascular bone reconstruction. London: Martin Dunitz, 1997: p. 16-169.
43. Yaremchuk, M.J., R.J. Brumback, P.N. Manson, A.R. Burgess, A. Poka, and A.J. Weiland, *Acute and definitive management of traumatic osteocutaneous defects of the lower extremity*. Plastic and reconstructive surgery, 1987. **80**(1): p. 1-14.
44. Hierner, R., G. Täger, and D. Nast-Kolb, *Die vaskularisierte Knochentransplantation*. Der Unfallchirurg, 2009. **112**(4): p. 405-418.

45. Myeroff, C. and M. Archdeacon, *Autogenous bone graft: donor sites and techniques*. JBJS, 2011. **93**(23): p. 2227-2236.
46. Rentsch, C., B. Rentsch, A. Breier, K. Spekl, R. Jung, S. Manthey, D. Scharnweber, H. Zwipp, and A. Biewener, *Long-bone critical-size defects treated with tissue-engineered polycaprolactone-co-lactide scaffolds: A pilot study on rats*. Journal of Biomedical Materials Research Part A, 2010. **95**(3): p. 964-972.
47. Damron, T.A., J. Lisle, T. Craig, M. Wade, W. Silbert, and H. Cohen, *Ultraporous β -tricalcium phosphate alone or combined with bone marrow aspirate for benign cavitory lesions*. J Bone Joint Surg Am, 2013. **95**(2): p. 158-166.
48. Masquelet, A., *Muscle reconstruction in reconstructive surgery: soft tissue repair and long bone reconstruction*. Langenbeck's Archives of Surgery, 2003. **388**(5): p. 344-346.
49. Pelissier, P., A. Masquelet, R. Bareille, S.M. Pelissier, and J. Amedee, *Induced membranes secrete growth factors including vascular and osteoinductive factors and could stimulate bone regeneration*. Journal of orthopaedic research, 2004. **22**(1): p. 73-79.
50. Chotel, F., L. Nguiabanda, P. Braillon, R. Kohler, J. Bérard, and K. Abelin-Genevois, *Induced membrane technique for reconstruction after bone tumor resection in children: a preliminary study*. Orthopaedics & Traumatology: Surgery & Research, 2012. **98**(3): p. 301-308.
51. Biewener, A., J. Meyer, C. Rentsch, R. Grass, K. Günther, H. Zwipp, and S. Rammelt, *[Internal fixation of meta-and diaphyseal intercalary bone defects after tumour resection with intramedullary nailing and porous polymethylmetacrylate (PMMA) spacer]*. Der Orthopade, 2007. **36**(2): p. 152-8, 160-3.
52. Cobos, J.A., R.W. Lindsey, and Z. Gugala, *The cylindrical titanium mesh cage for treatment of a long bone segmental defect: description of a new technique and report of two cases*. Journal of orthopaedic trauma, 2000. **14**(1): p. 54-59.
53. Hertlein, H., T. Mittlmeier, S. Piltz, M. Schürmann, T. Kauschke, and G. Lob, *Spinal stabilization for patients with metastatic lesions of the spine using a titanium spacer*. European Spine Journal, 1992. **1**(2): p. 131-136.
54. Ostermann, P.A., N. Haase, A. Rübberdt, M. Wich, and A. Ekkernkamp, *Management of a long segmental defect at the proximal meta-diaphyseal junction of the tibia using a cylindrical titanium mesh cage*. Journal of orthopaedic trauma, 2002. **16**(8): p. 597-601.
55. Attias, N. and R.W. Lindsey, *Case reports: management of large segmental tibial defects using a cylindrical mesh cage*. Clinical orthopaedics and related research, 2006. **450**: p. 259-266.
56. Grob, D., S. Daehn, and A.F. Mannion, *Titanium mesh cages (TMC) in spine surgery*. European Spine Journal, 2005. **14**(3): p. 211-221.
57. Razi, H., S. Checa, K.D. Schaser, and G.N. Duda, *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, 2012. **100**(7): p. 1736-45.

58. Hollister, S.J., R. Maddox, and J.M. Taboas, *Optimal design and fabrication of scaffolds to mimic tissue properties and satisfy biological constraints*. Biomaterials, 2002. **23**(20): p. 4095-4103.
59. Butler, D.L., S.A. Goldstein, and F. Guilak, *Functional tissue engineering: the role of biomechanics*. Journal of biomechanical engineering, 2000. **122**(6): p. 570-575.
60. Hutmacher, D.W., *Scaffolds in tissue engineering bone and cartilage*. Biomaterials, 2000. **21**(24): p. 2529-2543.
61. Hutmacher, D.W., *Scaffold design and fabrication technologies for engineering tissues—state of the art and future perspectives*. Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition, 2001. **12**(1): p. 107-124.
62. Boccaccio, A., A. Ballini, C. Pappalettere, D. Tullo, S. Cantore, and A. Desiate, *Finite element method (FEM), mechanobiology and biomimetic scaffolds in bone tissue engineering*. International journal of biological sciences, 2011. **7**(1): p. 112.
63. Giannitelli, S., D. Accoto, M. Trombetta, and A. Rainer, *Current trends in the design of scaffolds for computer-aided tissue engineering*. Acta biomaterialia, 2014. **10**(2): p. 580-594.
64. Karageorgiou, V. and D. Kaplan, *Porosity of 3D biomaterial scaffolds and osteogenesis*. Biomaterials, 2005. **26**(27): p. 5474-5491.
65. Claes, L., M. Reusch, M. Göckelmann, M. Ohnmacht, T. Wehner, M. Amling, F.T. Beil, and A. Ignatius, *Metaphyseal fracture healing follows similar biomechanical rules as diaphyseal healing*. Journal of Orthopaedic Research, 2011. **29**(3): p. 425-432.
66. Mehta, M., S. Checa, J. Lienau, D. Hutmacher, and G.N. Duda, *In vivo tracking of segmental bone defect healing reveals that callus patterning is related to early mechanical stimuli*. Eur Cell Mater, 2012. **24**: p. 358-71.
67. Martini, L., M. Fini, G. Giavaresi, and R. Giardino, *Sheep model in orthopedic research: a literature review*. Comparative medicine, 2001. **51**(4): p. 292-299.
68. Reichert, J.C., S. Saifzadeh, M.E. Wullschleger, D.R. Epari, M.A. Schütz, G.N. Duda, H. Schell, M. van Griensven, H. Redl, and D.W. Hutmacher, *The challenge of establishing preclinical models for segmental bone defect research*. Biomaterials, 2009. **30**(12): p. 2149-2163.
69. Newman, E., A. Turner, and J. Wark, *The potential of sheep for the study of osteopenia: current status and comparison with other animal models*. Bone, 1995. **16**(4): p. S277-S284.
70. Pearce, A., R. Richards, S. Milz, E. Schneider, and S. Pearce, *Animal models for implant biomaterial research in bone: a review*. Eur Cell Mater, 2007. **13**(1): p. 1-10.
71. Schmitz, J.P. and J.O. Hollinger, *The critical size defect as an experimental model for craniomandibulofacial nonunions*. Clinical orthopaedics and related research, 1986(205): p. 299-308.
72. Calhoun, N.R., G.W. Greene jr, and G.T. Blackledge, *Plaster: a bone substitute in the mandible of dogs*. Journal of dental research, 1965. **44**(5): p. 940-946.
73. Niederlohmann, E., *Etablierung eines kritischen Knochendefektmodells an der immundefizienten Maus*. 2012.

74. Anderson, M.L., W.J. Dhert, J.D. de Bruijn, R.A. Dalmeijer, H. Leenders, C.A. van Blitterswijk, and A.J. Verbout, *Critical size defect in the goat's os ilium: A model to evaluate bone grafts and substitutes*. Clinical Orthopaedics and Related Research®, 1999. **364**: p. 231-239.
75. Aerssens, J., S. Boonen, G. Lowet, and J. Dequeker, *Interspecies differences in bone composition, density, and quality: potential implications for in vivo bone research*. Endocrinology, 1998. **139**(2): p. 663-670.
76. Mastrogiacomo, M., A. Corsi, E. Francioso, M.C. Di, F. Monetti, S. Scaglione, A. Favia, A. Crovace, P. Bianco, and R. Cancedda, *Reconstruction of extensive long bone defects in sheep using resorbable bioceramics based on silicon stabilized tricalcium phosphate*. Tissue engineering, 2006. **12**(5): p. 1261-1273.
77. Hettwer, W., S. Bischoff, H. Schubert, E. Liden, and M. Diefenbeck, *RADIOGRAPHIC REMODELLING PATTERNS OF A GENTAMICIN-ELUTING HYDROXYAPATITE/CALCIUM SULFATE BIOCOMPOSITE: PRELIMINARY RESULTS FROM A LARGE ANIMAL MODEL*. Bone Joint J, 2016. **98**(SUPP 23): p. 68-68.
78. Huffer, W.E., J.J. Benedict, A. Turner, A. Briest, R. Rettenmaier, M. Springer, and X. Walboomers, *Repair of sheep long bone cortical defects filled with COLLOSS®, COLLOSS® E, OSSAPLAST®, and fresh iliac crest autograft*. Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials, 2007. **82**(2): p. 460-470.
79. Hettwer, W., *Synthetischer Knochenersatz Synthetic bone replacement*. Der Orthopäde, 2017. **46**(8): p. 688-700.
80. Huiskes, R., H. Weinans, and B. Van Rietbergen, *The relationship between stress shielding and bone resorption around total hip stems and the effects of flexible materials*. Clinical orthopaedics and related research, 1992: p. 124-134.
81. Schmal, H., P.C. Strohm, M. Jaeger, and N.P. Südkamp, *Flexible fixation and fracture healing: do locked plating 'internal fixators' resemble external fixators?* Journal of orthopaedic trauma, 2011. **25**: p. S15-S20.
82. Perren, S., T. Perren, and E. Schneider, *[Are the terms "biology" and "osteosynthesis" contradictory?]*. Therapeutische Umschau. Revue therapeutique, 2003. **60**(12): p. 713-721.
83. Döbele, S., C. Horn, S. Eichhorn, A. Buchholtz, A. Lenich, R. Burgkart, A.K. Nüssler, M. Lucke, D. Andermatt, and R. Koch, *The dynamic locking screw (DLS) can increase interfragmentary motion on the near cortex of locked plating constructs by reducing the axial stiffness*. Langenbeck's Archives of Surgery, 2010. **395**(4): p. 421-428.
84. Döbele, S., S. Schröter, D. Höntzsch, U. Stöckle, and T. Freude, *Dynamic Locking Screw–DLS*. OP-JOURNAL, 2012. **28**(02): p. 174-177.
85. *ImageJ*. ImageJ is public domain open source software. An ImageJ user has the four essential freedoms defined by the Richard Stallman in 1986]. Available from: <https://imagej.nih.gov/ij/index.html>.
86. Kronthaler, F., *Statistik angewandt: Datenanalyse ist (k) eine Kunst*. 2014: Springer-Verlag.
87. Mosler, K. and F. Schmid, *Beschreibende Statistik und Wirtschaftsstatistik*. 2007: Springer-Verlag.

88. Reinwald, S. and D. Burr, *Review of nonprimate, large animal models for osteoporosis research*. Journal of Bone and Mineral Research, 2008. **23**(9): p. 1353-1368.
89. Reichert, J.C., D.R. Epari, M.E. Wullschleger, S. Saifzadeh, R. Steck, J. Lienau, S. Sommerville, I.C. Dickinson, M.A. Schütz, and G.N. Duda, *Establishment of a preclinical ovine model for tibial segmental bone defect repair by applying bone tissue engineering strategies*. Tissue Engineering Part B: Reviews, 2010. **16**(1): p. 93-104.
90. Prendergast, P., R. Huiskes, and K. Søballe, *Biophysical stimuli on cells during tissue differentiation at implant interfaces*. Journal of biomechanics, 1997. **30**(6): p. 539-548.
91. Morgan, E.F., K.T.S. Palomares, R.E. Gleason, D.L. Bellin, K.B. Chien, G.U. Unnikrishnan, and P.L. Leong, *Correlations between local strains and tissue phenotypes in an experimental model of skeletal healing*. Journal of biomechanics, 2010. **43**(12): p. 2418-2424.
92. Thompson, E.M., A. Matsiko, D.J. Kelly, J.P. Gleeson, and F.J. O'Brien, *An Endochondral Ossification-Based Approach to Bone Repair: Chondrogenically Primed Mesenchymal Stem Cell-Laden Scaffolds Support Greater Repair of Critical-Sized Cranial Defects Than Osteogenically Stimulated Constructs In Vivo*. Tissue Engineering Part A, 2016. **22**(5-6): p. 556-567.
93. Thompson, E.M., A. Matsiko, E. Farrell, D.J. Kelly, and F.J. O'Brien, *Recapitulating endochondral ossification: a promising route to in vivo bone regeneration*. Journal of tissue engineering and regenerative medicine, 2015. **9**(8): p. 889-902.
94. Claes, L. and C. Heigele, *Magnitudes of local stress and strain along bony surfaces predict the course and type of fracture healing*. Journal of biomechanics, 1999. **32**(3): p. 255-266.
95. Carter, D., P. Blenman, and G. Beaupre, *Correlations between mechanical stress history and tissue differentiation in initial fracture healing*. Journal of Orthopaedic Research, 1988. **6**(5): p. 736-748.
96. Gerber, A. and S. Gogolewski, *Reconstruction of large segmental defects in the sheep tibia using polylactide membranes. A clinical and radiographic report*. Injury, 2002. **33**: p. 43-57.
97. Jiang, N., C.-H. Qin, Y.-F. Ma, L. Wang, and B. Yu, *Possibility of one-stage surgery to reconstruct bone defects using the modified Masquelet technique with degradable calcium sulfate as a cement spacer: A case report and hypothesis*. Biomedical reports, 2016. **4**(3): p. 374-378.
98. Mastrogiacomo, M., A. Corsi, E. Francioso, M.D. Comite, F. Monetti, S. Scaglione, A. Favia, A. Crovace, P. Bianco, and R. Cancedda, *Reconstruction of extensive long bone defects in sheep using resorbable bioceramics based on silicon stabilized tricalcium phosphate*. Tissue engineering, 2006. **12**(5): p. 1261-1273.
99. Gao, T., T. Lindholm, B. Kommonen, P. Ragni, A. Paronzini, T. Lindholm, P. Jalovaara, and M. Urist, *The use of a coral composite implant containing bone morphogenetic protein to repair a segmental tibial defect in sheep*. International orthopaedics, 1997. **21**(3): p. 194-200.
100. Gugala, Z. and S. Gogolewski, *Healing of critical-size segmental bone defects in the sheep tibiae using bioresorbable polylactide membranes*. Injury, 2002. **33**: p. 71-76.

101. Wefer, J., A. Wefer, H. Schratt, H. Thermann, and B. Wippermann, *Healing of autologous cancellous bone transplants and hydroxylapatite ceramics in tibial segment defects. Value of ultrasonic follow up.* Der Unfallchirurg, 2000. **103**(6): p. 452-461.
102. Fujibayashi, S., H.-M. Kim, M. Neo, M. Uchida, T. Kokubo, and T. Nakamura, *Repair of segmental long bone defect in rabbit femur using bioactive titanium cylindrical mesh cage.* Biomaterials, 2003. **24**(20): p. 3445-3451.
103. Wieding, J., R. Souffrant, W. Mittelmeier, and R. Bader, *Finite element analysis on the biomechanical stability of open porous titanium scaffolds for large segmental bone defects under physiological load conditions.* Medical engineering & physics, 2013. **35**(4): p. 422-432.
104. Wieding, J., A. Wolf, and R. Bader, *Numerical optimization of open-porous bone scaffold structures to match the elastic properties of human cortical bone.* Journal of the mechanical behavior of biomedical materials, 2014. **37**: p. 56-68.
105. Wieding, J., T. Lindner, P. Bergschmidt, and R. Bader, *Biomechanical stability of novel mechanically adapted open-porous titanium scaffolds in metatarsal bone defects of sheep.* Biomaterials, 2015. **46**: p. 35-47.

6 LEBENSLAUF

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

7 VOLLSTÄNDIGE PUBLIKATIONSLISTE

Pobloth, Anne-Marie; Checa, Sara; Razi, Hajar; Petersen, Ansgar; Weaver, James C; Schmidt-Bleek, Katharina; Windolf, Markus, Tatai, Andras Á; Roth, Claudia P, Schaser, Klaus-Dieter; Mechanobiologically optimized 3D titanium-mesh scaffolds enhance bone regeneration in critical segmental defects in sheep. Science translational medicine, 2018. 10(423): p. eaam8828.

8 PREISE

1. Preis des Jungen Forums in der Kategorie Traumatologie/Orthopädie bei der Jahrestagung der Berliner Chirurgischen Gesellschaft

Anne-Marie Pobloth als Referentin des Vortrags "Rekonstruktion segmentaler Knochendefekte durch mechanobiologisch modulierte, Laser-gesinterte Titan-Mesh-Scaffolds" erhielt dafür, zusammen mit ihren Koautoren H.Razi, K.Schmidt-Bleek, C.P.Roth, A.Á.Tatai, K.-D.Schaser, G.N.Duda und P.Schwabe, den 1. Preis des Jungen Forums in der Kategorie Traumatologie/Orthopädie bei der Jahrestagung der Berliner Chirurgischen Gesellschaft.

9 EIDESSTATTLICHE VERSICHERUNG UND ANTEILSERKLÄRUNG

„Ich, András Áron Tatai, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „Rekonstruktion von segmentalen Knochendefekten mittels 3D-Laser-gesinterten Titanimplantaten (rapid prototyping) in einem Schafsmodell“ selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen werden von mir verantwortet.

Meine Anteile an etwaigen Publikationen zu dieser Dissertation entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem/der Betreuer/in, angegeben sind. Für sämtliche im Rahmen der Dissertation entstandenen Publikationen wurden die Richtlinien des ICMJE (International Committee of Medical Journal Editors; www.icmje.org) zur Autorenschaft eingehalten. Ich erkläre ferner, dass mir die Satzung der Charité – Universitätsmedizin Berlin zur Sicherung Guter Wissenschaftlicher Praxis bekannt ist und ich mich zur Einhaltung dieser Satzung verpflichte.

Die Bedeutung dieser eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unwahren eidesstattlichen Versicherung (§156,161 des Strafgesetzbuches) sind mir bekannt und bewusst.“

Datum

Unterschrift

Anteilserklärung an etwaigen erfolgten Publikationen

András Áron Tatai hatte folgenden Anteil an den folgenden Publikationen:

Publikation 1:

Pobloth, Anne-Marie; Checa, Sara; Razi, Hajar; Petersen, Ansgar; Weaver, James C; Schmidt-Bleek, Katharina; Windolf, Markus, Tatai, Andras Á; Roth, Claudia P, Schaser, Klaus-Dieter; Mechanobiologically optimized 3D titanium-mesh scaffolds enhance bone regeneration in critical segmental defects in sheep. Science translational medicine, 2018. 10(423): p. eaam8828.

Beitrag im Einzelnen (bitte detailliert ausführen):

Unterstützung bei der Tierpflege, Unterstützung bei der Operationen (Operationsvorbereitung, Protokollierung, perioperative Fotodokumentation, perioperative Assistenz), Anästhesie, Durchführung von Röntgenbildern, histologischen Präparaten (Präparate der Gruppe 1, 2, 3) und Datenerhebung (Deskriptiv)

Unterschrift, Datum und Stempel des betreuenden Hochschullehrers/der betreuenden Hochschullehrerin

Unterschrift des Doktoranden/der Doktorandin

10 DANKSAGUNG

Allen voran möchte ich meine höchste Dankbarkeit Gott widmen, der mir diese Arbeit auf einer für mich „fremden“ Sprache erst ermöglicht hat, mich dabei mit Kraft gesegnet hat und in den etlichen Stunden Arbeit bei mir war.

Ein großer Dank gilt auch meinen geduldigen Betreuern Dr. med. vet. Anne-Marie Pobloth und PD Dr. med. Philipp Schwabe dafür, dass sie mir ermöglicht haben an dieser interessanten Studie teilnehmen zu dürfen und, dass sie mich dabei langjährig betreut haben. Ich bin sehr dankbar, dass ihr mit mir so viel Geduld hattet. Ich möchte mich auch bei Claudia Roth bedanken. Wir haben unzählige Stunden im Stall mit den Tieren, später in der Histologie und bei der Auswertung verbracht. Mein Dank gilt aber auch der gesamten Forschungsgruppe und den Mitarbeitern des Julius-Wolf-Instituts. Des Weiteren möchte ich mich noch privat bei meiner Familie, Freunden aber besonders auch bei meiner Mutter bedanken. Danke, dass du an mich geglaubt hast und immer an meiner Seite mit Rat und Tat standest. "Köszönöm Anya!"

Ich bin sehr glücklich, dass ich solch liebe Menschen in meinem Leben haben darf. Ich danke euch herzlich.