

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

**Verwendung eines weichen Kompositscaffolds zur Regeneration segmentaler
Knochendefekte in einem neuartigen Großtierdefektmodell**

Radiologische und Histologische Evaluation im Schaf

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

vorgelegt von
Katleen Beierlein
Tierärztin aus Berlin

Berlin 2017

Journal-Nr.: 3956

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Freien Universität Berlin

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Jürgen Zentek
Erster Gutachter: Univ.-Prof. Dr. Robert Klopffleisch
Zweiter Gutachter: Univ.-Prof. Dr.-Ing. Georg N. Duda
Dritter Gutachter: Univ.-Prof. Dr. Heidrun Gehlen

Deskriptoren (nach CAB-Thesaurus):

sheep; animal model; bone fractures; therapy; fracture fixation; internal (MeSH); tibia; surgical operation; bone tissue; tissue repair; healing; radiology; histology; immunohistochemistry

Tag der Promotion: 21.08.2017

Bibliografische Information der *Deutschen Nationalbibliothek*

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

ISBN: 978-3-86387-840-5

Zugl.: Berlin, Freie Univ., Diss., 2017

Dissertation, Freie Universität Berlin

D 188

Dieses Werk ist urheberrechtlich geschützt.

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

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

This document is protected by copyright law.

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

Alle Rechte vorbehalten | all rights reserved

© Mensch und Buch Verlag 2017

Choriner Str. 85 - 10119 Berlin

verlag@menschundbuch.de – www.menschundbuch.de

Meinen Eltern
und
Patti

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
Abbildungsverzeichnis	V
Tabellenverzeichnis	VIII
Abkürzungsverzeichnis	IX
1. Einleitung	1
2. Stand der Wissenschaft.....	3
2.1 Biologie des Knochens	3
2.2 Frakturen	4
2.2.1 Frakturheilung.....	4
2.2.2 Kallus	6
2.2.3 Störungen der Frakturheilung	7
2.3 Defekte kritischer Größe	8
2.3.1 Definition: Defekt kritischer Größe	8
2.3.2 Aktuelle Therapiemöglichkeiten kritischer Knochendefekte	9
2.4 Tiermodell.....	13
2.4.1 Tiermodelle in der Knochenforschung	13
2.4.2 Das Schafmodell.....	14
2.4.3 Die Tibia als Modellknochen.....	15
2.4.4 Das Osteotomiemodell	15
2.4.5 Modelle anderer Arbeitsgruppen	15
2.5 Knochenersatzmaterialien	16
2.5.1 Allgemeine Anforderungen an Knochenersatzmaterialien.....	16
2.5.2 Kalziumphosphat - Keramiken.....	18
2.5.3 Polymere.....	19
2.5.4 Komposit-Verbindungen	20
2.5.5 ChronOS Strip®.....	21
2.6 Ziele und Hypothesen der Studie	23
3. Materialien und Methoden	25
3.1. Versuchstiere	25
3.1.1 Haltung und Fütterung	25
3.1.2 Gruppeneinteilung	26
3.2 Operatives Vorgehen und Materialeinsatz	26
3.2.1 Fixateur externe.....	26

3.2.2	ChronOS Strip®.....	28
3.2.3	Narkose und Operationsvorbereitung.....	29
3.2.4	Operation.....	31
3.2.5	Spongiosaentnahme.....	34
3.3	Nachsorge.....	36
3.3.1	Pinpflege.....	36
3.3.2	Pinpflegeprotokoll.....	37
3.3.3	Röntgenkontrollen.....	37
3.4	Probengewinnung.....	38
3.4.1	Euthanasie und Probengewinnung.....	38
3.4.2	Fixierung und Aufbereitung.....	38
3.5	Radiologische Untersuchung der Proben.....	39
3.6	Computertomographische Untersuchung der Proben.....	39
3.6.1	Aufbereitung.....	39
3.6.2	Untersuchung im Computertomographen.....	39
3.6.3	Messungen im HR-pQCT.....	40
3.6.4	Messungen im Mikro-CT.....	40
3.7	Präparataufbereitung für die histologische Auswertung.....	48
3.7.1	Sägen der Knochenproben.....	48
3.7.2	Aufbereitung für die Kunststoffeinbettung.....	50
3.7.3	Histologische Färbungen der Gewebeschnitte der Kunststoffeinbettung.....	53
3.7.4	Aufbereitung für die Paraffineinbettung.....	54
3.7.5	Immunhistochemische Färbungen der Gewebeschnitte der Paraffineinbettung.....	56
3.7.6	Histochemische Färbung.....	58
3.7.7	Histologische Färbung der Gewebeschnitte der Paraffineinbettung.....	58
3.8	Auswertung der Gewebeschnitte.....	59
3.8.1	Digitalisierung der Gewebeschnitte.....	59
3.8.2	Definition der Region of Interest.....	59
3.8.3	Histomorphometrische Auswertung der Präparate.....	62
3.8.4	Deskriptive Analyse der histologischen Präparate.....	63
3.8.5	Gefäßzählung.....	64
3.8.6	Osteoklastenzählung.....	65
3.8.7	Riesenzellzählung.....	68
3.9	Statistik.....	69
4.	Ergebnisse.....	70
4.1	Operations- und Standzeitbefunde.....	70
4.2	Ergebnisse der Radiologie.....	71

4.3	Ergebnisse der computertomographischen Messungen	82
4.3.1	Ergebnisse der HR-pQCT-Untersuchungen	82
4.3.2	Ergebnisse der Mikro-CT-Untersuchungen	88
4.4	Ergebnisse der Histologie	96
4.4.1	Histomorphologische Evaluation	96
4.5	Ergebnisse der histomorphometrischen Analyse	111
4.5.1	Gewebeverteilung in der Gesamt-ROI	111
4.5.2	Gewebeverteilung in Teil-ROIs	113
4.6	Ergebnisse der immunhistochemischen Untersuchungen	119
4.6.1	Vaskularisierung	119
4.6.2	Osteoklastendichte	120
4.6.3	Riesenzellendichte	122
4.7	Zusammenfassung der Ergebnisse	123
4.7.1	Operations- und Standzeitbefunde	123
4.7.2	Radiologie	123
4.7.3	Computertomographische Untersuchungen	124
4.7.4	Deskriptive Histologie	124
4.7.5	Histomorphometrie	125
4.7.6	Vaskularisierung	125
4.7.7	Osteoklastendichte	125
4.7.8	Riesenzellendichte	125
5.	Diskussion	126
5.1.	Diskussion von Materialien und Methoden	127
5.1.1	Untersuchungsmodell	127
5.1.2	Knochenersatzmaterial	131
5.1.3	Gewinnung und Applikation der autologen Spongiosa	132
5.1.4	Entnahme und Aufarbeitung der Proben	132
5.1.5	Computertomographische Auswertung	134
5.1.6	Histomorphologische Auswertung	135
5.1.7	Histomorphometrische Auswertung	136
5.1.8	Gefäßzählung	136
5.1.9	Osteoklastendichte	137
5.1.10	Riesenzellendichte	138
5.2	Diskussion der Ergebnisse	139
5.2.1	Röntgen	139
5.2.2	Computertomographische Auswertung	140
5.2.3	Histomorphologie und Histomorphometrie	142

Inhaltsverzeichnis

5.2.4	Vaskularisierung	145
5.2.5	Osteoklastendichte	147
5.2.6	Riesenzelldichte.....	149
5.2.7	Vergleich mit anderen Studien.....	151
5.2.8	Schlussfolgerungen	153
6.	Zusammenfassung.....	156
7.	Summary	158
8.	Literaturverzeichnis	160
9.	Anhang	177
9.1	Färbeprotokolle.....	177
9.2	MATLAB-Skripte	182
9.2.1	MATLAB-Skript für HR-pQCT-Daten	182
9.2.2	MATLAB-Skript für Mikro-CT-Daten	184
10.	Publikationsverzeichnis	186
11.	Danksagung	187
12.	Selbstständigkeitserklärung	188

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Rasterelektronenmikroskopische Nativ-Aufnahme des ChronOS Strips®.....	22
Abbildung 2: 3D-Laser-Scan-Mikroskop-Aufnahme des ChronOS Strip®	22
Abbildung 3: Merino-Mix Schafe in Gruppenhaltung	26
Abbildung 4: Mediale Ansicht des montierten Hybrid-Ringfixateurs.....	27
Abbildung 5: für die Operation vorbereiteter Scaffold	28
Abbildung 6: Narkose- und Überwachungseinheit	31
Abbildung 7: Operationsfelder	31
Abbildung 8: Positionierung des Hybrid-Ringfixateurs	32
Abbildung 9: montierter Hybrid-Ringfixateur	33
Abbildung 10: PCL- β -TCP-Scaffold (ChronOS Strip®) im Osteotomiedefekt	34
Abbildung 11: Fensterung des Beckenkamms mit Hammer und Meißel	35
Abbildung 12: Spongiosaentnahme am trikortikal geöffneten Beckenkamm	35
Abbildung 13: Pinpflege am unsedierten, stehenden Schaf.....	37
Abbildung 14: HR-pQCT-Übersichtsaufnahme der Probe	40
Abbildung 15: Einzelbild eines HR-pQCT-Scans	41
Abbildung 16: Einteilung von Global Objects	42
Abbildung 17: VOI-Festlegung in den HR-pQCT-Aufnahmen.....	43
Abbildung 18: Kortikalisöffnung im Verlauf.....	43
Abbildung 19: VOI-Festlegung in Mikro-CT-Aufnahmen	44
Abbildung 20: Darstellung eines Slice mit Thresholdeinstellung	44
Abbildung 21: Darstellung der Messbereiche zur Thresholdbestimmung	45
Abbildung 22: VOI und Thresholdeinstellung	47
Abbildung 23: Sägeschema, Ansicht von proximal	49
Abbildung 24: Sägeschema für vier Schnitte	49
Abbildung 25: ABC-Methode: Der Avidin-Biotin-Komplex und biotinylierte Antikörper	57
Abbildung 26: Kalibrierung mittels Maßstabbalken	60
Abbildung 27: Markierung der Kortikales	60
Abbildung 28: Markierung der Kortikalisgrenzen und der Breite des Präparates.....	61
Abbildung 29: Berechnung der Teil-ROIs der Software aus den vorher markierten Grenzen	61
Abbildung 30: Definierte ROI und Teil-ROIs	62
Abbildung 31: Repräsentative Gesichtsfelder bei der Bestimmung der Gefäßdichte	64
Abbildung 32: Messung der Bindegewebsfläche bei der Bestimmung der Gefäßdichte.....	65
Abbildung 33: Osteoklastenausählung in der Kortikalis-ROI.....	66
Abbildung 34: Vergrößerter Ausschnitt aus Abbildung 33.....	66

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 35: Repräsentative Darstellung der TRAP-positiv gefärbten Osteoklasten.....	67
Abbildung 36: Darstellung der TRAP-positiv gefärbten Riesenzellen	68
Abbildung 37: Röntgenbilder der Gruppe 1, direkt postoperativ	74
Abbildung 38: Röntgenbilder der Gruppe 1, 4 Wochen postoperativ	75
Abbildung 39: Röntgenbilder der Gruppe 1, 8 Wochen postoperativ	76
Abbildung 40: Röntgenbilder der Gruppe 1, 12 Wochen postoperativ, Faxitron	77
Abbildung 41: Röntgenbilder der Gruppe 2, direkt postoperativ	78
Abbildung 42: Röntgenbilder der Gruppe 2, 4 Wochen postoperativ	79
Abbildung 43: Röntgenbilder der Gruppe 2, 8 Wochen postoperativ	80
Abbildung 44: Röntgenbilder der Gruppe 2, 12 Wochen postoperativ, Faxitron	81
Abbildung 45: 3D-Darstellungen der HR-pQCT-Aufnahmen von Gruppe 1	83
Abbildung 46: 3D-Darstellungen der HR-pQCT-Aufnahmen von Gruppe 2	84
Abbildung 47: Darstellung des Total Volume (mm^3) in der Gesamt-ROI	85
Abbildung 48: Darstellung des Bone Volume (mm^3) in der Gesamt-ROI	86
Abbildung 49: Darstellung des Quotienten BV/TV in der Gesamt-ROI	86
Abbildung 50: Darstellung der Bone Mineral Density (mgHA/cm^3) in der Gesamt-ROI	87
Abbildung 51: Darstellung des Bone Mineral Content (mgHA) in der Gesamt-ROI	87
Abbildung 52: Darstellung des Total Volume (mm^3) in der proximalen ROI.....	89
Abbildung 53: Darstellung des Bone Volume (mm^3) in der proximalen ROI	89
Abbildung 54: Darstellung des Quotienten BV/TV in der proximalen ROI	90
Abbildung 55: Darstellung der Bone Mineral Density (mgHA/cm^3) in der proximalen ROI ...	90
Abbildung 56: Darstellung des Bone Mineral Content (mgHA) in der proximalen ROI	91
Abbildung 57: Darstellung des Total Volume (mm^3) in der distalen ROI.....	92
Abbildung 58: Darstellung des Bone Volume (mm^3) in der distalen ROI	93
Abbildung 59: Darstellung des Quotienten BV/TV in der distalen ROI.....	93
Abbildung 60: Darstellung der Bone Mineral Density (mgHA/cm^3) in der distalen ROI.....	94
Abbildung 61: Darstellung des Bone Mineral Content (mgHA) in der distalen ROI	94
Abbildung 62: lockeres Bindegewebe und Riesenzellen an der Scaffoldoberfläche.....	99
Abbildung 63: lockeres Bindegewebe und Riesenzellen an der Scaffoldoberfläche.....	99
Abbildung 64: laterale knöcherner Überbrückung der Defektstrecke	100
Abbildung 65: vergrößerter Bereich aus Abb. 63: hyaliner Knorpel	101
Abbildung 66: vergrößerter Bereich aus Abb. 63: Geflechtknochen trabekel	101
Abbildung 67: vergrößerter Bereich aus Abb. 63: Knorpelstreifen	102
Abbildung 68: vergrößerter Bereich aus Abb. 63: Übergang von Kortikalis zum Kallus	102
Abbildung 69: von proximal nach distal spitz zulaufende Kallusformation	103
Abbildung 70: vergrößerte Bereiche aus Abb. 68: unstrukturierter Geflechtknochen	103
Abbildung 71: auslaufende Kallusformation aus Geflechtknochen	104

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 72: vergrößerter Bereich aus Abb. 70: Geflechtknochen trabekel	105
Abbildung 73: vergrößerter Bereich aus Abb. 70: Osteoklasten und Osteoblastensaum ...	105
Abbildung 74: vergrößerter Bereich aus Abb. 70: hyaline Knorpelzellen	106
Abbildung 75: von periostal spitz zulaufende Kallusausläufer an den Kortikales.....	106
Abbildung 76: endostale Kallusbildung	107
Abbildung 77: distale Kortikalis mit Geflechtknochen trabekeln	107
Abbildung 78: kristallines Scaffoldmaterial im Bindegewebe	108
Abbildung 79: Ansammlung von Erythrozyten und Entzündungszellen im Scaffold	108
Abbildung 80: breiter Streifen hyalinen Knorpels	109
Abbildung 81: distale Osteotomie kante	109
Abbildung 82: knöchernes Kallusgewebe an der distalen Osteotomie kante.....	110
Abbildung 83: knöchernes Kallusgewebe an der proximalen Osteotomie kante	110
Abbildung 84: Gewebeverteilung (%) in der Gesamt-ROI.....	112
Abbildung 85: relative Verteilung (%) der Gewebe der proximalen endostalen ROI.....	114
Abbildung 86: relative Verteilung (%) der Gewebe der proximalen periostalen ROI.....	116
Abbildung 87: relative Verteilung (%) der Gewebe der distalen endostalen ROI.....	117
Abbildung 88: relative Verteilung (%) der Gewebe der distalen periostalen ROI.....	118
Abbildung 89: Darstellung der Gefäßdichte (n/mm^2).....	119
Abbildung 90: Darstellung der Osteoklastendichte (n/mm^2) an der Kortikalis	120
Abbildung 91: Darstellung der Osteoklastendichte (n/mm^2) im Kallus	121
Abbildung 92: Darstellung der Riesenzelldichte (n/mm^2)	122

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Entwässerungsschema	50
Tabelle 2: Übersicht zur Zusammensetzung der Gebrauchslösungen	52
Tabelle 3: Entwässerungsschema des Automaten	55
Tabelle 4: Analyierte Parameter in der Gesamt-VOI der HR-pQCT-Aufnahmen	88
Tabelle 5: Analyierte Parameter in der proximalen VOI der Mikro-CT-Aufnahmen.....	91
Tabelle 6: Analyierte Parameter in der distalen VOI der Mikro-CT-Aufnahmen.....	95
Tabelle 7: Prozentuale Gewebeanteile in der Gesamt-ROI.	112
Tabelle 8: Prozentuale Gewebeanteile in der proximalen endostalen ROI.....	115
Tabelle 9: Prozentuale Gewebeanteile in der proximalen periostalen ROI.....	116
Tabelle 10: Prozentuale Gewebeanteile in der distalen endostalen ROI.....	117
Tabelle 11: Prozentuale Gewebeanteile in der distalen periostalen ROI	118
Tabelle 12: Darstellung der Gefäßdichte (n/mm^2).....	119
Tabelle 13: Darstellung der Osteoklastendichte (n/mm^2) an der Kortikalis	120
Tabelle 14: Darstellung der Osteoklastendichte (n/mm^2) im Kallus	121
Tabelle 15: Darstellung der Riesenzelldichte (n/mm^2)	122
Tabelle 16: Färbeprotokoll Movat-Pentachrom-Färbung.....	177
Tabelle 17: Färbeprotokoll Safranin Orange/von Kossa-Färbung.....	178
Tabelle 18: Färbeprotokoll Masson-Goldner-Färbung	179
Tabelle 19: Färbeprotokoll α -sma-Färbung.....	179
Tabelle 20: Färbeprotokoll TRAP-Färbung	181

Abkürzungsverzeichnis

α	Alpha
α -SMA	alpha-smooth muscle actin
A.	Arteria
Abb.	Abbildung
ABG	autologous bone graft; dt. autologes Knochentransplantat
Ag	Antigen
Ak	Antikörper
Aqua dest.	Aqua destilata
Art. Nr.	Artikelnummer
β	Beta
Bfa	straffe Bindegewebsfasern
bg	Bindegewebe
BMP	bone morphogenetic protein
C	Celsius
ca.	circa
Ch	Chondrozyten
cm	Zentimeter
CT	Computertomograph
DCP	dynamic compression plate; dt. dynamische Kompressionsplatte
Fb	Fibroblasten
Fz	Fibrozyten
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
et al.	et alii
g	Gramm
Gf	Geflechtknochen
h	Stunde
HA	Hydroxylapatit
hBg	hämatopoetisches Bindegewebe
ho	hohlzylindrischer Scaffold
hy	hyaline Chondrozyten
IMN	Intramedullärer Marknagel
i.v.	intravenös
Ka	Kallus

Abkürzungsverzeichnis

Ko	kortikaler Knochen
koll	kollagene Bindegewebsfasern
kV	Kilovolt
l	Liter
La	Lakunen
LCP	locking compression plate; dt. winkelstabile Kompressionsplatte
LC-DCP	limited contact compression plate; dt. dynamische Kompressionsplatte mit begrenzter Kontaktfläche
Lk	kompakte Knochenlamellen
Lym	Lymphozyten
M	Mol
Ma	Markraum
mA	Milliampere
mg	Milligramm
ml	Milliliter
min.	Minuten
mm	Millimeter
mm ²	Quadratmillimeter
Mp	Muskelprolaps
mPCL	medical-grade Poly-ε-Caprolacton
μ	mikro
μm	Mikrometer
n	Anzahl
nBG	nano-Bioaktivglas
N.	Nervus
Na	Natrium
NaCl	Natriumchlorid
O	Osteoid
Ob	Osteoblasten
Ok	Osteoklasten
OP	Operation
Os	Osteotomiekannte
Oz	Osteozyten
PCL	Poly-ε-Caprolacton
PCL-β-TCP	Poly-ε-Caprolacton-β-Trikalziumphosphat
PLDLLA	Poly(L-lactide-co-D,L-lactide)
PMMA	Polymethylmethacrylat

Abkürzungsverzeichnis

pH	potentia Hydrogenii
p	p-Wert, Signifikanzwert
rhBMP	recombinant human bone morphogenetic protein
ROI	Region of Interest, Region von Interesse
RZ	Riesenzellen
s.c.	subcutan
Sc	Scaffold
Std.	Stunde
Tab.	Tabelle
TCP	Trikalziumphosphat
Tr	Geflechtknochentrabekel
TRAP	tartrat-resistent-acid-phosphatase
V.	Vena
Vas	Gefäße
VOI	Volume of Interest, Volumen von Interesse
Ø	Durchmesser
°	Grad
%	Prozent

1. Einleitung

Die Therapie ausgedehnter, segmentaler Knochendefekte bedingt durch Trauma, Defektsanierung oder Tumorresektion stellt noch immer eine große klinische Herausforderung dar (Berner et al. 2012). Trotz aller Fortschritte im klinischen Alltag treten in zehn bis zwanzig Prozent der Frakturtherapien und in bis zu fünfzig Prozent aller offenen Tibiafrakturen Heilungsstörungen auf (Haas 2000; Zimmermann et al. 2009). Diese Tatsache und der Wunsch der Patienten nach immer schnellerer Rehabilitation ohne Funktionsverlust erfordern unfallchirurgische Forschung zur Verbesserung der Frakturheilung (Haas 2000). Ein besonderes Problem stellen Knochendefekte kritischer Größe dar. Solch ein Defekt wird definiert als kleinster Defekt, der zu Lebzeiten eines Individuums nicht heilt oder der zwei- bis dreimal größer ist als der Durchmesser des jeweiligen Knochens (Schmitz und Hollinger 1986; Gugala und Gogolewski 1999; Gugala et al. 2007; Reichert et al. 2009). Zur Behandlung kritischer Knochendefekte werden die Knochendistraktion oder autologe Spongiosatransplantate, vaskularisierte Knochentransplantate aus dem Beckenkamm oder der Fibula sowie allogenes Knochenmaterial verwendet (Ilizarov und Ledjaev 1969; Heiple et al. 1987; Blick et al. 1989; Ilizarov 1990; Han et al. 1992; Lane et al. 1999; Perry 1999; Hierner et al. 2009; Ryzewicz et al. 2009; Pneumatics et al. 2010). Bedingt durch die mit diesen Verfahren verbundenen Komplikationen wie einer erhöhten Entnahmemorbidität, Infektionsgefahr, einer schlechten Einheilungsrate bei allogenen Transplantat und die oft nicht ausreichende Verfügbarkeit von gewonnenem Knochen, wird seit langem an Alternativen für den Knochenersatz geforscht (Bucholz et al. 1989; Mahendra und Maclean 2007; Oest et al. 2007; Theos et al. 2008; Hierner et al. 2009).

Ein Knochenersatzmaterial sollte sowohl osteoinduktive als auch osteokonduktive Eigenschaften besitzen, dabei günstig und in unbegrenzter Menge sowie gleichbleibender Qualität verfügbar sein (Van der Stok et al. 2011). Aktuell sind scaffoldbasierte Regenerationstherapien in der Anwendung, die aus verschiedenen Materialien, wie Keramik, Polymeren oder Kompositen bestehen können und vielversprechende Ergebnisse gezeigt haben (Berner et al. 2012; Cipitria et al. 2012; Lohfeld et al. 2012; Reichert et al. 2012a; Rentsch et al. 2012; Berner et al. 2013; Cipitria et al. 2013; Rentsch et al. 2014).

In dieser Studie wird ein Komposit-Scaffold (ChronOS Strip®), bestehend aus Poly-Lactid-co- ϵ -Caprolacton und β -Trikalziumphosphat in einem Defekt kritischer Größe in der Diaphyse der Schafttibia untersucht. Die hohe Biokompatibilität, Biodegradierbarkeit und die vorteilhaften mechanischen Eigenschaften des β -TCP's werden durch die Verbindung mit Poly-Lactid-co- ϵ -Caprolacton mit einer höheren Elastizität kombiniert. Darüber hinaus lässt sich durch

die Zugabe von Polymeren die Osteokonduktivität verbessern und die Degradation besser steuern (Lam et al. 2009).

Als Modelltier dient in dieser Studie das Schaf, da es sich für die Erforschung der Knochenheilung bewährt hat und insbesondere die Schafstibia als englumiger, dickwandiger Röhrenknochen, der exakt in der Tragachse steht, funktionell mit der humanen Tibia vergleichbar ist (Stürmer und Schuchardt 1980b; Finlay et al. 1995; Berner et al. 2012; Cipitria et al. 2012; Reichert et al. 2012b; Berner et al. 2013; Rentsch et al. 2014).

Gegenstand dieser Arbeit ist die Etablierung eines kritischen 40-mm-Osteotomie-Defektmodells in der Schafstibia, stabilisiert mittels Hybrid-Ringfixateur, zur Untersuchung regenerativer Therapieansätze. Als neuartige Therapieoption wird ein Kompositcaffold aus Poly-Lactid-co- ϵ -Caprolacton und β -Trikalziumphosphat auf seine Eignung, die endogene Regeneration eines segmentalen kritischen Knochendefektes zu unterstützen, evaluiert.

Darüber hinaus wird untersucht, ob die Kombination des Scaffolds (ChronOS Strip®) mit osteoinduktiver, autologer Spongiosa zu einer weiter fortgeschrittenen Knochendefektheilung führt. Zur Analyse werden röntgenologische Verlaufsaufnahmen sowie nach einer Heilungszeit von zwölf Wochen angefertigte computertomographische, histologische, histomorphometrische und immunhistologische Untersuchungsergebnisse herangezogen.

2. Stand der Wissenschaft

2.1 Biologie des Knochens

Knochen ist, neben Dentin, eine der härtesten Substanzen des Körpers und dient vor allem als Stützgerüst, an dem Sehnen und Bänder befestigt sind und die Bewegung ermöglichen. Des Weiteren bilden Knochen die Grundlage der Brust- und Beckenhöhle und dienen daher auch dem Schutz der inneren Organe. Außerdem dienen sie als Kalzium- und Phosphorspeicher, die je nach Bedarf freigesetzt oder aufgenommen werden können (Liebich 1993; Hildebrandt 1998; Remedios 1999).

Knochen besteht aus zellulären Anteilen und mineralisierter Knochengrundsubstanz (Matrix ossea) mit enthaltenen Kollagenfasersystemen. Zu den zellulären Bestandteilen gehören die Osteoblasten, Osteozyten, Osteoklasten und die mesenchymalen Osteoprogenitorzellen. Die nicht-zelluläre Knochenmatrix setzt sich zu 30 % aus organischen (Kollagenfasern und glykosaminreiche Grundsubstanz) und zu 70% aus anorganischen Anteilen (Mineralstoffe) zusammen (Budras und Fricke 1991; Liebich 1993; Remedios 1999; Webb und Tricker 2000).

An Knochenformen werden lange Röhrenknochen, kurze Knochen, irreguläre Knochen und platte Knochen unterschieden (Budras und Fricke 1991). Die Tibia als Stellvertreter langer Röhrenknochen besteht aus einem langen Schaft, der Diaphyse, und besitzt an beiden Knochenenden jeweils eine Epiphyse (Remedios 1999). Der harte Anteil besteht bei den langen Röhrenknochen aus einer äußeren, lamellär aufgebauten *Substantia compacta* (kortikaler Knochen), die die Markhöhle umgibt, aus der *Substantia corticalis*, die sich an der Oberfläche der Epiphysen und an den kurzen Knochen bildet und aus der *Substantia spongiosa*, dem Bälkchenwerk der Schwammsubstanz, das sich im Knocheninneren befindet (Budras und Fricke 1991). Alle drei Knochenstrukturen bestehen bei ausgewachsenen Individuen aus Lamellenknochen (Ng et al. 1997).

Der Knochen wird außen vom zweischichtigen Periost umhüllt, das außen aus dem *Stratum fibrosum* und innen aus dem *Stratum osteogenicum* besteht (Bucher und Wartenberg 1997). Vom Markraum her wird der Knochen vom Endost begrenzt, das aus einer dünnen Schicht osteogener Zellen besteht. Knochengewebe kann einerseits durch die Mineralisation der von Osteoblasten sezernierten Matrix (intramembranöse oder direkte Ossifikation) oder durch den Ersatz einer knorpeligen Matrix (chondrale oder indirekte Ossifikation) entstehen. Bei beiden Prozessen entsteht zunächst Geflechtknochen, der im weiteren Verlauf zu Lamellenknochen umgebaut wird (Peters 2007).

Geflechtknochen entsteht dort, wo über längere Zeit durch Zug und Druck mechanische Kräfte einwirken und wo Knochen schnell gebildet wird (fetale Entwicklung) oder möglichst

schnell rekonstruiert werden muss (Frakturheilung). Er ist reich an Osteozyten, deren Verteilung ohne erkennbare Ordnung in der knöchernen Matrix erfolgt (Noble und Reeve 2000). Die geformte Grundsubstanz wird von einem unregelmäßigen Geflecht von Kollagenfaserbündeln durchzogen, die keine bestimmte Verlaufsrichtung erkennen lassen (Liebich 1993). Während jeder Knochenneubildung entsteht Geflechtknochen, der dann durch den stabileren und höher entwickelten Lamellenknochen ersetzt wird (Ng et al. 1997).

Lamellenknochen ist gekennzeichnet durch eine regelmäßige Struktur, bestehend aus parallel oder konzentrisch geschichteten Knochenlamellen und Knochenbälkchen (Liebich 1993; Ng et al. 1997; Noble und Reeve 2000). Außerdem ist er reich an verkalkter Grundsubstanz, arm an Zellen und kollagenen Fibrillen und enthält stark abgeplattete Osteozyten (Shapiro 1988). Er weist eine deutliche lamelläre Schichtung auf und entsteht wesentlich langsamer als Geflechtknochen (Ng et al. 1997; Noble und Reeve 2000).

2.2 Frakturen

Eine Fraktur ist eine Kontinuitätsunterbrechung des Knochens mit der Zerstörung seiner anatomischen Form, Schädigung des umgebenden Weichteilmantels (Haut, Muskeln, Nerven, Sehnen und Gefäße) und dem Verlust der Gliedmaßenfunktion (Niemand und Suter 2004). Sie entsteht durch das Einwirken exzessiver Kräfte, die zu einer Überbelastung des Knochens führen, sodass die Energie des einwirkenden Traumas die Elastizität und mechanische Festigkeit des Knochengewebes überschreiten (Simmons 1985; Perren 1992; Niemand und Suter 2004). So kommt es zu einer Fraktur des Knochens, wodurch Mechanismen in Gang gesetzt werden, die zur Knochenheilung führen sollen (Simmons 1985).

2.2.1 Frakturheilung

Die Knochenheilung ist ein spezieller Heilungsprozess, bei dem im Gegensatz zu anderen Gewebeschäden eine Regeneration stattfindet, bei der die ursprüngliche Knochenstruktur allmählich rekonstruiert wird und es so unter optimalen Bedingungen zu einer Heilung ohne Narbe kommt (McKibbin 1978; Brighton 1984; Remedios 1999; Einhorn und Lee 2001; Schmidt-Bleek et al. 2015). Es handelt sich um einen physiologischen Prozess, bei dem der geschädigte Knochen durch neuen Knochen ersetzt und in Funktion und Struktur wieder vollständig hergestellt wird (Mark et al. 2004; Marzona und Pavolini 2009). Die wesentlichen Voraussetzungen, um den ungestörten Ablauf der Frakturheilung zu gewährleisten, sind eine ausreichende Vaskularisierung und die mechanische Stabilisierung der Frakturfragmente (Claes et al. 2002). Nur bei absoluter Ruhe und sehr engem Frakturspalt tritt die Form der direkten Knochenheilung auf. Dabei verbinden Umbaueinheiten der lamellär aufgelagerten Knochen oder Knochenbrücken die Knochenfragmente direkt miteinander. Dagegen fehlen Resorption und Kallusbildung bei dieser Form der Knochenheilung (Perren et al. 1969;

Stürmer 1996). Diese primäre, direkte Knochenheilung findet jedoch unter natürlichen Bedingungen nur selten statt und stellt eher eine Kunstform der Frakturheilung dar (Stürmer 1996; Einhorn 1998). Laut Stürmer ist die primäre Knochenheilung nur bei sehr stabilen Osteosynthesen wie absolut stabiler Plattenosteosynthese, Fixateur-externe-Osteosynthese mit interfragmentären Zugschrauben und bei stabiler Zugschraubenosteosynthese zu beobachten (Stürmer 1996). Liegen die Frakturrenden nicht direkt aufeinanderheilen, heilen die meisten Frakturen jedoch indirekt durch sekundäre Frakturheilung. Die indirekte Knochenheilung ist durch periostale und endostale Kallusbildung charakterisiert und resultiert aus einer gewissen Bewegung zwischen den Fragmenten. Mit ihr geht außerdem eine flächenhafte Resorption der in der Unruhezone liegenden Fragmentenden einher (Stürmer 1984). Die sekundäre Knochenheilung ist laut Stürmer bei verschiedenen Behandlungsarten wie der konservativen Frakturbehandlung, Marknagelosteosynthese, Fixateur-externe-Osteosynthesen und bei elastischer Plattenosteosynthese zu beobachten (Stürmer 1996).

Die sekundäre Frakturheilung erfolgt in verschiedenen Phasen, die nacheinander ablaufen, sich aber auch überlappen können (McKibbin 1978). Der Heilungsverlauf der Fraktur wird allgemein histologisch beschrieben und in fünf Phasen eingeteilt: Pro- und Antiinflammatorische Phase, Granulationsphase, Hartkallusphase und Remodellingphase (Schmidt-Bleek et al. 2015).

Die Kaskade der Knochenheilung beginnt mit einer Entzündungsreaktion, die sehr wichtig für den Ablauf der Angiogenese ist. Das anschließende Abklingen der Entzündung ist dabei ebenso entscheidend für einen schnellen Beginn der Blutgefäßbildung (Kolar et al. 2010; Schmidt-Bleek et al. 2014a). Während der Entzündungsphase wird das durch das Trauma entstandene Hämatom von Immunzellen (Thrombozyten, Makrophagen, Granulozyten, Lymphozyten und Monozyten) infiltriert, die eine Infektion verhindern, Zytokine und Wachstumsfaktoren ausschütten und insgesamt einen Gerinnungsthrombus bilden (Einhorn 1998; Gerstenfeld et al. 2003; Schindeler et al. 2008). Dieser Gerinnungsthrombus verbindet die Fragmentenden und füllt die Frakturzone. Außerdem steht er in Verbindung mit dem Knochenmark, kortikalem Knochen, Periost, Endost sowie den Muskeln, welche zusammen eine einzigartige Umgebung bilden, die eine große Rolle im anschließenden Regenerationsprozess des Knochens spielen (Schmidt-Bleek et al. 2015). Aufgrund der kurzen Lebensspanne von z. B. neutrophilen Granulozyten ändert sich zwölf Stunden nach einer Verletzung die zelluläre Zusammensetzung im Initialhämatom. Es kommt vermehrt zum Zelltod im Hämatom (Schmidt-Bleek et al. 2009). Makrophagen, Riesenzellen und andere phagozytierende Zellen bauen Zelldebris ab (Schindeler et al. 2008). Die Ausschüttung von Zytokinen und Wachstumsfaktoren führt zur Migration, Proliferation und Differenzierung von multipotenten mesenchymalen Stammzellen aus dem Periost, dem Knochenmark, der Zirkulation und aus dem umliegenden Weichgewebe (Malizos und Papatheodorou 2005; Schindeler et al. 2008;

Shapiro 2008; Schmidt-Bleek et al. 2009; Schmidt-Bleek et al. 2012). 24 bis 36 Stunden nach einer Knochenfraktur wird durch Veränderung der Signalkaskade die Entzündung herunterreguliert und die Angiogenese gefördert, indem vermehrt anti-inflammatorische und angiogenetische Faktoren ausgeschüttet werden. Im Periost als möglichen Startpunkt einer Revaskularisierung werden 60 Stunden nach einer Verletzung vermehrt angiogenetische Faktoren gebildet (Schmidt-Bleek et al. 2012; Schmidt-Bleek et al. 2014b). Es kommt zur Einsprossung von Kapillaren in die Frakturzone und zur Differenzierung von mesenchymalen Stammzellen zu Fibroblasten, die das Frakturhämatom schrittweise organisieren und die Granulationsphase oder Phase des weichen Kallus einleiten (McKibbin 1978). Während der Knochenheilung reift das Granulationsgewebe und entwickelt sich zu einem weichen Kallus, der Stabilität in die Frakturzone bringen soll. Aus dem bindegewebigen Granulationsgewebe entwickelt sich dann Faserknorpel und anschließend entsteht auch hyaliner Knorpel. Allmählich kommt es zur Mineralisierung des Knorpelgewebes und zur weiteren Vaskularisierung. Schließlich wird der mineralisierte Knorpel von Osteoblasten durch Geflechtknochen ersetzt (Phase des harten Kallus) (Schindeler et al. 2008; Shapiro 2008). Der Geflechtknochen wird im Anschluss in der Remodelling-Phase langsam durch Lamellenknochen ersetzt, indem Osteoklasten Knochen abbauen und Osteoblasten auf der Oberfläche des Geflechtknochen Osteoid, d. h. unmineralisierte kollagene Matrix anlagern, welche anschließend mineralisiert (Shapiro 2008; Kerschnitzki et al. 2011a; Kerschnitzki et al. 2011b). Diese Phase kann Monate bis Jahre andauern und hat die Anpassung des Knochens an die mechanischen Belastungen zum Ziel (Schmidt-Bleek et al. 2015).

In mechanisch stabilen Bereichen oder wenn Knochenfragmente direkt aufeinanderliegen, kann es zur Frakturheilung mittels intramembranöser Ossifikation kommen (Schindeler et al. 2008). Mesenchymale Stammzellen schließen sich zusammen und synthetisieren organische Matrix. Darin enthalten sind Blutgefäße, Fibroblasten und Osteoprogenitorzellen, die in Osteoblasten differenzieren, dann organische Matrix synthetisieren und mineralisieren, wodurch Geflechtknochen entsteht (Buckwalter et al. 1996).

2.2.2 Kallus

Die Kallusheilung, also die sekundäre Frakturheilung mit Kallusbildung, ist der natürliche Weg der Stabilisierung von Knochenfragmenten (McKibbin 1978). Sie stellt die charakteristische Form der Frakturheilung bei konservativer Therapie (Sarmiento und Latta 2008) und auch immer noch die dominierende Form bei operativer Therapie dar (Kenwright et al. 1986; Gerstenfeld et al. 2006; Marsell und Einhorn 2011).

Kallus übernimmt biomechanische Funktionen, indem er temporär die mechanische Überbrückung von Fragmentenden herstellt. Dies geschieht in der frühen Heilungsphase durch

weiches, noch nicht verkalktes Kallusgewebe, das noch erheblich interfragmentäre Bewegungen zulässt. Durch Querschnittsvergrößerung und zunehmende Verknöcherung des Kallus nimmt der reifere Kallus an Steifigkeit zu und führt damit zu einer Reduktion der interfragmentären Bewegung. Der Umbau des weichen Kallus in knöchernen Kallus beginnt dabei fern der Frakturebene an der periostalen und endostalen Oberfläche und setzt sich in Richtung Fraktur fort (Stürmer 1984; Claes und Heigele 1999). Nach der Vereinigung der proximalen und distalen Kallusfronten durch einen sogenannten Brückenkallus auf Höhe der Frakturlinie ist die Fraktur soweit stabilisiert, dass die Heilung der frakturierten Kortikalis erfolgen kann. Nach Abschluss der Heilung der Kortikalis bildet sich der Kallus weitgehend zurück (Claes et al. 2000).

2.2.3 Störungen der Frakturheilung

Es kommt nicht immer zu einer ungestörten und schnellen Knochenheilung. Zu den Störungen der Frakturheilung zählen sowohl die verzögerte (delayed union) als auch die ausbleibende Heilung (non-union). Ist ein Knochenbruch nach vier bis sechs Monaten nicht verheilt, so spricht man von einer verzögerten Frakturheilung (delayed-union) (Runkel und Rommens 2000). Wenn ein Knochenbruch nach sechs bis acht Monaten noch nicht geheilt ist, der Heilungsprozess stillsteht und keine knöcherne Überbrückung erfolgt, hat sich eine Pseudarthrose (non-union) gebildet (Runkel und Rommens 2000; Schell et al. 2008).

Diese Komplikationen können biologische, infektiöse und/oder biomechanische Ursachen haben. Mangelhafte Durchblutung, bedingt durch traumatische oder operative Weichteilschäden, führen zu Knochennekrosen oder verhindern eine ausreichende Kallusreaktion (Runkel und Rommens 2000). Aber auch interfragmentäre Bewegung und die Spaltbreite der Fraktur haben einen großen Einfluss auf das Heilungsergebnis. Dabei zeigt sich, dass es mit zunehmendem Frakturspalt zu einer signifikanten Verzögerung der Kallusheilung kommt (Müller et al. 1968; Claes et al. 1997).

Erworbene Pseudarthrosen werden häufig nach Vitalität und Heilungspotential (Klassifikation nach Weber und Cech) eingeteilt (Steinhausen et al. 2013). Bei dieser Einteilung wird zwischen vitalen/reaktiven Pseudarthrosen mit ungestörtem Heilungspotential des Knochens und avitalen/inaktiven Pseudarthrosen mit gestörtem Heilungspotential des Knochens unterschieden (Steinhausen et al. 2013). Bei den vitalen/reaktiven Pseudarthrosen unterscheidet man hypertrophe und oligotrophe Pseudarthrosen. Dabei findet bei der hypertrophen Pseudarthrose trotz starker Kallusbildung keine Überbrückung der Knochenfragmente statt. Die Durchblutung ist allerdings ungestört, der Knochen vital und es besteht ein hohes Heilungspotential. Ursache für die Ausbildung einer hypertrophen Pseudarthrose ist meist eine mechanische Instabilität. Bei der oligotropen Pseudarthrose ist der Knochen vital und besitzt biologisches Heilungspotential, jedoch wird nur wenig oder gar kein Kallus gebildet. Radiolo-

gisch sind die Frakturenden bei dieser Form jedoch nicht verschmälert (Steinhausen et al. 2013).

Zu den avitalen/inaktiven Pseudarthrosen zählen die atrophe, dystrophe und die Defektpseudarthrose. Bei der atrophen Pseudarthrose fehlt die Kallusbildung. Die Frakturenden sind sklerotisch und meist verschmälert. Die Durchblutung ist gestört und der Knochen besitzt keine osteogenetische Potenz und damit kein Heilungspotential. Die Ursache für die Ausbildung einer atrophen Pseudarthrose ist meist ein primärer Schaden, der zu einer Störung der Durchblutung führt (Steinhausen et al. 2013). Bei der dystrophen Pseudarthrose (Drehkeil) ist ein intermediäres Fragment in seiner Zirkulation schwer gestört und zeigt daher nur ein geringes Heilungspotential mit wenig Kallusbildung (Runkel und Rommens 2000). Defektpseudarthrosen werden auch als Defekte kritischer Größe bezeichnet und zeichnen sich durch vaskularisierte Frakturenden der Hauptfragmente aus, die aufgrund der fehlenden Knochensubstanz jedoch eine osteologisch tote Zone besitzen. Dabei können Frakturfragmente bereits beim Unfall oder infolge einer posttraumatischen Osteitis durch Sequestrierung bzw. Nekrose verlorengegangen sein (Runkel und Rommens 2000).

2.3 Defekte kritischer Größe

2.3.1 Definition: Defekt kritischer Größe

Knochendefekte kritischer Größe (engl. critical size defects, CSD) stellen ein besonderes Problem der Frakturheilung dar. Solch ein Defekt wird definiert als kleinster Defekt, der zu Lebzeiten eines Individuums oder ohne Intervention nicht heilt (Takagi und Urist 1982; Schmitz und Hollinger 1986). Andere definieren einen Defekt kritischer Größe als Defekt, der weniger als 10 % knöcherner Regeneration während der Lebzeiten eines Individuums zeigt (Gugala und Gogolewski 1999) oder aber als einen Defekt, der zwei bis dreimal größer ist als der Durchmesser des jeweiligen Knochens (Gugala et al. 2007; Gugala Z. et al. 2007; Reichert et al. 2009). Beim Schaf gilt daher in einigen Studien ein diaphysärer Leerdefekt von 20 mm bereits als kritisch (Brunner et al. 1990; Gerhart et al. 1993; Gao et al. 1997b). Ein Defekt, der mit einem als Platzhalter dienenden Knochenersatzstoff gefüllt wird, muss jedoch größer sein, um in einer Pseudarthrose zu resultieren (Gao et al. 1997a). Ein kritischer Knochendefekt kann jedoch nicht nur über die Größe definiert werden. Die Regenerationsfähigkeit ist zusätzlich abhängig von der Spezies, der anatomischen Lokalisation, dem damit verbundenen Periost und den Weichgeweben sowie biomechanischen Bedingungen, Alter, Stoffwechsel- und systemischen Einflüssen (Rimondini et al. 2005; Lindsey et al. 2006).

Am häufigsten treten große Knochendefekte in der Diaphyse der Tibia auf (Heckman und Sarasohn-Kahn 1997; DeCoster et al. 2004; Court-Brown und Caesar 2006; Clements et al.

2008; Mardian et al. 2015). Die Fähigkeit der Tibia einen großen Defekt zu heilen, ist wegen des wenigen, umgebenden Weichteilmantels gering. Ein Knochen, der von wenig Bindegewebe umgeben ist, hat ein erhöhtes Risiko für Verluste an Knochensubstanz und für Komplikationen bei der anschließenden Therapie (Khatod et al. 2003; DeCoster et al. 2004). Trauma, Tumorsektion, Revisionschirurgie, kongenitale Entwicklungsstörungen oder Infektisanierungen können zu großen Knochenverlusten mit wenig Heilungspotential führen (Pneumaticos et al. 2010). Diese großen, segmentalen Knochendefekte stellen ein großes, klinisches Problem dar und führen ebenso zu sozioökonomischen Problemen im Gesundheitswesen, da die Rekonstruktion solch großer Knochendefekte nur durch langwierige Therapieverfahren gewährleistet werden kann. Die Lebensqualität der betroffenen Patienten wird dabei durch dauerhafte Behandlungen, wiederholte Operationen und verlängerte Krankenhausaufenthalte stark negativ beeinflusst (Pneumaticos et al. 2010).

2.3.2 Aktuelle Therapiemöglichkeiten kritischer Knochendefekte

Die aktuell eingesetzten Therapieverfahren zur Rekonstruktion ausgedehnter, segmentaler Knochendefekte umfassen die Knochendistraktion (Ilizarov-Technik) (Ilizarov und Lediaev 1969; Ilizarov und Soibel'man 1969; Ilizarov 1971) und den vaskularisierten, autologen oder allogenen Knochentransfer (Hierner et al. 2009). Aber auch Scaffolds in Form von Cages finden in großen Defekten Verwendung (Cobos et al. 2000; Attias et al. 2005). Dabei sollten diese Techniken nicht als konkurrierende, sondern als sich ergänzende Techniken verstanden werden, die je nach Indikation und Lokalisation zur Rekonstruktion eines Knochendefektes herangezogen werden (Hierner et al. 2009).

Die Distraktionsosteogenese

Die *Distraktionsosteogenese* wurde von dem russischen Orthopäden Gavril Ilizarov entwickelt (Ilizarov und Lediaev 1969; Ilizarov und Soibel'man 1969; Ilizarov 1971). Er verwendete einen externen Ringfixateur zur Verlängerung von Gliedmaßen (Ilizarov 1990). Grundlage der Technik ist die Kortikotomie mit anschließender Distraktion. Dazu wird die Kortikalis des Knochens durchtrennt und mit Hilfe des externen Fixateurs auseinandergezogen. Der Markraum mit seinen Gefäßen und das Periost bleiben intakt (Pneumaticos et al. 2010). So kann sich in dem geschaffenen Spalt Kallus bilden und ihn auffüllen. Die erneute Vergrößerung des kortikalen Spaltes (Distraktion) führt zur weiteren Kallusformation und so zur Verlängerung des Knochens. Dabei kann eine Defektstrecke von bis zu 1 mm pro Tag aufgefüllt werden (Ilizarov 1989b; Ilizarov 1989a).

Mit der Distraktionsosteogenese kann eine Knochentransplantation umgangen werden, eine schnelle Belastung der Gliedmaße ist möglich und durch die Stimulation der Angiogenese wird die lokale Durchblutung erhöht (Aronson 1994). Jedoch handelt es sich bei der Ilizarov-

Technik um eine langwierige Prozedur, die für die Patienten unbequem ist und mit Pininfektionen und -lockerungen einhergehen kann (Goldstrohm et al. 1984; Ilizarov 1989b; Lindsey et al. 2006; Gugala Z. et al. 2007).

Vaskularisierte autologe Transplantate

Vaskularisierte, autologe Transplantate bringen eine eigene Blutversorgung mit in das Empfängerlager. Sie zeigen eine schnelle Einheilung, gute Anpassung an die neuen mechanischen Gegebenheiten, eine früh einsetzende und hohe mechanische Belastbarkeit, eine hohe Überlebens- und Einheilungsrate bei ersatzunfähigen und ersatzschwachen Lagen (Infektion, schlechte Vaskularisierung) sowie eine Neovaskularisierungspotenz auf das umliegende Gewebe (Hierner et al. 2009).

Bei komplizierten Knochen-Weichteil-Defekten zeigen die vaskularisierten Transplantate allerdings hohe Komplikationsraten von 40-60%. Daher muss ihre Verwendung streng nach Indikation angepasst werden (Hierner et al. 2009). Bei Tibiadefektstrecken zwischen vier und zehn Zentimeter wird ein vaskularisierter Beckenkammtransfer empfohlen, wohingegen bei einer Defektstrecke über zehn Zentimeter nur noch das vaskularisierte Fibulatransplantat eingesetzt werden kann, da die Fixierung des Beckenkammtransplantates mechanisch insuffizient wird (Mikos et al. 1993; Hutmacher 2000; Stoop 2008). Des Weiteren besteht bei vaskularisierten Knochentransplantaten eine hohe Entnahmemorbidität; das Verfahren ist mikrochirurgisch sehr aufwändig und erfordert große Erfahrung des Chirurgen sowie eine hohe Patientencompliance (Hierner et al. 2009).

Allogene Knochentransplantate

Allogene Knochentransplantate wurden etabliert, um Probleme bei der Entnahme autologer Knochentransplantaten, zu umgehen. Sie sind jederzeit in gewünschter Menge verfügbar und ihre Anwendung erfordert keine ausgefeilten Operationstechniken (Pneumaticos et al. 2010). Sie werden von Gewebebanken verarbeitet und für den Einsatz im Menschen präpariert. Dabei wird kortikaler oder spongioser Knochen tiefgefroren oder gefriergetrocknet und anschließend unter Verwendung von schwachen und starken Säuren, wie Salzsäure und sauren Puffern, entkalkt (Langer und Vacanti 1993; Mahendra und Maclean 2007). Diese Vorgänge sind nötig, um die Übertragung von Infektionskrankheiten zu vermeiden und die Immunantwort des Empfängers zu minimieren. Dabei werden allerdings auch alle Zellen zerstört und entfernt, sodass diese Transplantate nur noch osteokonduktive, jedoch keine osteoinduktiven oder osteogenetischen Eigenschaften mehr besitzen (Giannoudis et al. 2005).

Autologe Knochen transplantate - Spongiosaplastik

Autologes Knochenmaterial besitzt alle wichtigen Eigenschaften für die Stimulation der Knochenreparatur. Es hat eine starke osteogenetische und osteoinduktive Potenz in Form von Osteoprogenitorzellen, Knochenmatrix und Wachstumsfaktoren (Mahendra und Maclean 2007). Hinzu kommen gute osteokonduktive Eigenschaften spongiöser Autotransplantate, welche durch die Porosität des Knochens selbst bedingt sind. An der porösen, gerüstähnlichen Struktur (Scaffold) können körpereigene Osteoblasten und Osteoprogenitorzellen in den Defektbereich migrieren und die Regeneration des Knochens vorantreiben (Mahendra und Maclean 2007).

Große, segmentale Knochendefekte mit einer Größe von über 4 cm heilen entsprechend klinischer Erfahrung meist nicht durch einfache *autologe Knochen transplantation* (Spongiosaplastik), da sie keine mechanische Stabilität bieten, weshalb dann meist ein vaskularisierter Transfer nötig wird (Hierner et al. 2009). Kleinere Knochendefekte können meist durch eine konventionelle *Spongiosaplastik* überbrückt werden (Keating et al. 2005). Allerdings ist die zu gewinnende Menge an autologem Knochenmaterial vor allem bei älteren Patienten begrenzt und die Entnahmemorbidität sehr hoch (Bucholz et al. 1989; Mahendra und Maclean 2007; Oest et al. 2007; Theos et al. 2008). Häufig erleiden die Patienten zusätzliche Schmerzen an der Knochenentnahmestelle. Außerdem können Hämorrhagien und Infektionen auftreten (Reichert und Devakara 2010). Probleme bei der Revaskularisierung, Devitalisierung und eine unzureichende Resorption des eingebrachten Materials können zu mechanischen Instabilitäten führen (Younger und Chapman 1989). Daher sollte autologe Spongiosa nur in kleineren Defekten angewandt werden oder als zusätzliche biologische Komponente in Kombination mit anderen Techniken die Knochenheilung anregen (Hierner et al. 2009).

Um die Einschränkungen der aktuellen Therapieoptionen von großen Knochendefekten zu umgehen und den nur begrenzt zur Verfügung stehenden autologen Knochen zu ersetzen, wird seit 30 Jahren nach einer Alternative zum autologen Knochenersatz gesucht (Rueger 1998).

Zementspacer und Masquelet-Technik

Zur Überbrückung eines Defektes kann auch ein Zementspacer implantiert werden, der nicht knöchern integriert wird und der für sich allein genommen auch nicht genügend Stabilität bietet. Daher kann dieser immer nur in Verbindung mit einer Osteosynthese angewandt werden (Kempf et al. 1986; Klemm und Borner 1986; Kruger-Franke et al. 1993). Solche Zementspacer kommen besonders bei Infektsanierungen zum Einsatz, da sie sich mit gängigen Antibiotika mischen lassen. Neben der Freisetzung von Antibiotika im infizierten Defekt füllt der Zementspacer den Leerraum und verhindert den Vorfall von Weichgewebe in den De-

fekt, sodass im Anschluss an die Infektsanierung noch Knochengewebe oder Knochenersatzmaterial eingebracht werden kann (Paley und Herzenberg 2002; Peng et al. 2015). Wegen fehlender biologischer Eigenschaften und der geringen Stabilität können Zementspacer selbst nur als temporäre Maßnahme dienen.

Im Rahmen der Masquelet-Technik wird nach umfangreichem und radikalem Debridement ein Zementspacer (PMMA) als Abstandhalter in einen großen Knochendefekt eingebracht. Die Stabilisierung erfolgt dabei je nach Lokalisation mittels intramedullärem Marknagel oder externer Fixation. Nach vollständiger Tilgung der Infektion im Defektbereich erfolgt in einem zweiten Schritt die Entnahme des Zementspacers. Dabei sollte die periostale Membran (fibröse Kapsel), die sich um den Zementspacer gebildet hat, weitgehend erhalten bleiben. Sie bildet eine Art Tasche, die einen abgeschlossenen Raum im Defektbereich bildet, der anschließend mit autologem, kortikospongiösem Knochen gefüllt und verschlossen werden kann (Dodde et al. 2000). Zudem ist diese Technik unabhängig von der Defektgröße einsetzbar und stellt daher eine geeignete Option für die Behandlung großer Knochendefekte dar (Chadayammuri et al. 2015).

Titanspacer

Zur Rekonstruktion von großen Knochendefekten werden in letzter Zeit auch häufig spezielle, defektfüllende Titanspacer als Scaffolds eingesetzt. Dazu wird dem Patienten präoperativ mittels computertomographischer Messung ein passender Titanscaffold angefertigt. Dieser besteht aus einem hochporösen Gitternetz mit einer möglichst großen Interkonnektivität der Poren, um eine bestmögliche Integration zu erreichen. Die mechanischen Eigenschaften werden durch die Struktur des Titangerüsts definiert und sind weitgehend beliebig regulierbar (Razi et al. 2012). Der Titanspacer wird in den Defekt eingebracht, die Gliedmaßenlast wird allerdings von einer zusätzlich eingebrachten Osteosynthese (z.B. intramedullärer Marknagel oder Kompressionsplatten) getragen (Cobos et al. 2000; Attias et al. 2005; Lindsey et al. 2006; Razi et al. 2012). Dadurch kann der Patient die Gliedmaße frühzeitig belasten und schnell physiotherapeutisch trainiert werden. In die Hohlräume der Titangitterstruktur können zusätzlich biologische Komponenten eingebracht werden, die durch osteogenetische und osteoinduktive Eigenschaften die Knochenheilung voranbringen sollen (Clements et al. 2008).

Die Wahl der Behandlungsstrategie für große Knochendefekte ist letztendlich abhängig von den Fähigkeiten des jeweiligen Chirurgen, der Ausstattung des betreffenden Krankenhauses, vom Patienten selbst und vom Standard des Gesundheitssystems (Busse et al. 2008; Alt et al. 2009).

2.4 Tiermodell

2.4.1 Tiermodelle in der Knochenforschung

Vor dem Einsatz neuartiger Materialien im Patienten sollten diese ausreichend untersucht werden. Die komplexen Vorgänge der Frakturheilung können nicht in In-vitro-Modellen untersucht werden. Daher sollte ein dem Menschen möglichst vergleichbares Modell etabliert werden, um Untersuchungen vorzunehmen. Laut Tierschutzgesetz dürfen dabei Versuche an Tieren, deren artspezifische Fähigkeit, unter den Versuchseinwirkungen zu leiden, stärker entwickelt ist, nur durchgeführt werden, soweit Tiere, deren derartige Fähigkeit weniger stark entwickelt ist, für den verfolgten Zweck nicht ausreichen (Tierschutzgesetz §7a(2)5).

Im Bereich der muskuloskelettalen Forschung können im Tiermodell umfangreiche Knochenheilungsstudien oder Defektmodelle unter standardisierten Bedingungen untersucht und repliziert werden. Aus den Ergebnissen der tierexperimentellen Studien sollen Rückschlüsse auf vergleichbare Situationen beim Menschen möglich sein; daher ist die Wahl des richtigen Versuchstieres besonders wichtig (Roach et al. 1989; Pearce et al. 2007). Die spezifischen Eigenschaften der Knochen verschiedener Spezies, wie die Mikrostruktur, die Zusammensetzung, das Modelling und Remodelling sowie biomechanische Eigenschaften sollen mit denen des Menschen vergleichbar sein. Die eingesetzten Tiere sollen die Gefangenschaft gut tolerieren und chirurgische Eingriffe möglichst komplikationslos überstehen. Des Weiteren sollte die Lebensdauer der verwendeten Versuchstierspezies zur Studie passen, aber auch die Verfügbarkeit, Anschaffungskosten sowie Halte- und Pflegeaufwand sind wichtige Kriterien bei der Auswahl der Spezies. Allerdings hat auch die gesellschaftliche Akzeptanz einen großen Stellenwert bei der Auswahl einer Versuchstierspezies (Wissing et al. 1990; Schimandle und Boden 1994b; Pearce et al. 2007).

Insgesamt gibt es jedoch keine Tierart, die alle Kriterien vollständig erfüllt. Es handelt sich immer um eine bestmögliche Annäherung an die humanen Verhältnisse (Pearce et al. 2007). In den frühen Testphasen für Implantate oder Biomaterialien werden vor allem kleine Tierarten wie Mäuse, Ratten oder Kaninchen verwendet. Sie sind günstiger in der Anschaffung und leichter manipulierbar, allerdings ist bei diesen kleinen Tieren die Knochenheilungsrate höher als bei größeren Tieren wie Hunden, Schweinen oder kleinen Wiederkäuern oder auch beim Menschen (den Boer et al. 1999). Zudem sind die Knochendimensionen bei kleineren Tieren nicht mit denen des Menschen vergleichbar (Kleinschmidt und Hollinger 1992; Martini et al. 2001). Für spätere Testphasen von Implantaten bieten sich daher höher entwickelte Spezies an. So können Knochenersatzmaterialien in einer klinisch relevanten Größe und in einem Modell mit angemessener Belastung untersucht werden. Zusätzlich haben die aus einem Großtiermodell gewonnenen Daten bezüglich der Degradation und Resorption sowie der biomechanischen Eigenschaften eines Scaffolds einen besonders hohen Wert für die Ein-

schätzung der Effizienz eines Knochenersatzstoffes (Reichert und Devakara 2010). So können Reaktionen zwischen Material und Gewebe sowie die Integration in den Körper und Langzeiteffekte des Implantates, wie z. B. der Abbau, überprüft werden (Roach et al. 1989). Schweine werden zwar häufig tierexperimentell eingesetzt, jedoch sind sie in ihrer Dynamik der Knochendefektheilung im Vergleich zum Schaf weniger geeignet (Metak et al. 1998). Zudem zeigen Schweine häufig einen starken Gewichtszuwachs und sind schwieriger zu manipulieren. Weitere Spezies mit ähnlich langen Frakturheilungszeiten wie der Mensch sind Pferd und Rind. Sie sind jedoch wegen des hohen Aufwands an Unterbringung, Versorgung und Handling (Roach et al. 1989), aber auch wegen des hier verwendeten großen Defektmodells und der dadurch benötigten Osteosynthese nicht für dieses Projekt geeignet. Das Osteosynthesematerial müsste für diese Großtierspezies speziell angepasst werden, um das hohe Gewicht dieser Spezies bei einem kritischen Defekt sicher zu tragen. Die Osteosynthese wäre dann jedoch aufgrund der veränderten Dimensionen auch schwer auf Verhältnisse die im Menschen übertragbar. Zusätzlich wäre durch die Verwendung dieser höher entwickelten Tierarten kein zusätzlicher Erkenntnisgewinn zu erwarten und daher auch der höhere Aufwand und die hohen Belastungen für die Tiere nicht gerechtfertigt. Auch beim Hund ist die Frakturheilungszeit im Vergleich zum Menschen verkürzt, die anatomische Form unterscheidet sich stärker als die des Schafes, das Gewicht der meisten verwendeten Hunde liegt zwischen 15 und 30 kg (Wu et al. 1984) und nur die histologischen Gegebenheiten entsprechen in der Struktur, mit ihren sekundären Osteonen, eher dem Menschen. Die Verwendung von Versuchshunden wird zudem kritisch betrachtet, weil die tierartlichen Ansprüche in der Haltung deutlich höher sind als beispielsweise beim Schaf und nicht im Verhältnis zu Erkenntnisgewinn stehen, der durch die ähnliche Knochenstruktur erreicht werden würde. Daher kommt ein Hundemodell für diesen Versuch nicht in Frage.

2.4.2 Das Schafmodell

Aufgrund einer ähnlich langen Frakturheilungszeit wie die des Menschen stellt das Schaf eine gutes Modell zur Untersuchung von Frakturheilung und ihrer Störungen dar (Stürmer und Schuchardt 1980b; Pluhar et al. 2006). Die Knochen von Schafen haben zwar eine höhere Knochendichte und -festigkeit, ihre Knochenstruktur, die Dimensionen ihres Skeletts und die mechanischen Eigenschaften sowie Knochenremodelling und -regeneration sind jedoch mit denen des Menschen vergleichbar, was nach dem Wolffschen Gesetz auf eine ähnliche Belastungsfunktion schließen lässt (Stürmer und Schuchardt 1980b). Zusätzlich zeigt das Schaf ein dem Menschen ähnliches Knocheneinwachsverhalten in poröse Implantate (Willie et al. 2004). Histologisch ist bei Schafen eher eine primäre Knochenstruktur bzw. lamelläre Knochen vorzufinden, wohingegen der Mensch bis zum Abschluss der skelettalen Reife eine sekundäre Knochenstruktur mit Osteonen ausgebildet hat. Beim Schaf kommt es

mit zunehmendem Alter, während der Knochenheilung und dem anschließenden Remodelling, auch zur Ausbildung von sekundären Osteonen (Eitel et al. 1981; Newman et al. 1995; Auer et al. 2007). Zusätzlich zeigen Schafe ein ruhiges Verhalten, was ein einfaches Handling ermöglicht (Martini et al. 2001).

2.4.3 Die Tibia als Modellknochen

Tibiaschaftfrakturen sind die am häufigsten auftretenden, diaphysären Frakturen langer Röhrenknochen des Menschen (Mardian et al. 2015). Dabei treten Frakturheilungsstörungen wie eine verzögerte Heilung bei 5 – 61 % und eine ausbleibende Heilung (Pseudarthrose) bei bis zu 21% der Tibiaschaftfrakturen auf (Whittle et al. 1992; Singer und Kellam 1995; Darder-Garcia et al. 1998; Alberts et al. 1999; Bhandari et al. 2001). Die Schafstibia ist ein englumiger, dickwandiger Röhrenknochen, der in der Tragachse der Gliedmaße steht und auch funktionell mit der humanen Tibia vergleichbar ist (Stürmer und Schuchardt 1980b). Daher wird in dieser Studie die Knochendefektheilung in der Diaphyse der Schafstibia näher untersucht. In der Schafstibia kann ein großer Defekt mit humanmedizinischen Implantaten gefüllt und diese in einer Situation untersucht werden, wie sie in entsprechender Weise auch beim Menschen Verwendung finden sollen.

2.4.4 Das Osteotomiemodell

In der aktuellen Studie wird das Osteotomiemodell dem Frakturmodell vorgezogen, da Osteotomiemodelle technisch standardisierbar und leicht reproduzierbar sind, wodurch eine gute Vergleichbarkeit der Heilungsergebnisse zwischen Versuchstieren gegeben ist (Decker et al. 2014). Ein besonderer Vorteil ist die freie Wahl der Defektgröße, die Schnittkanten sind glatt und Implantate können so perfekt eingepasst werden. Bei einem Frakturmodell wird dagegen nur ein Frakturpunkt vorgegeben, es entsteht eine Spiralfaktur, jedoch kein standardisierter Defekt (Dumont et al. 2009; Decker et al. 2014).

2.4.5 Modelle anderer Arbeitsgruppen

Wegen der umfassenden Vorteile im Vergleich zu anderen Versuchstierspezies ist das Schaf als Versuchstier für diese Studie besonders geeignet und wurde schon vielfach in anderen Studien mit ähnlichen Fragestellungen in kritischen Defektmodellen verwendet. Dabei kamen bereits verschiedene Techniken zur Fixierung kritischer Defekte in der Schafstibia zum Einsatz. So wurden externe Fixateure zur Überbrückung von 35 bis 40 mm großen Defekten angewandt (Gugala und Gogolewski 1999; Kon et al. 2000). Ebenso wurden Modelle mit intramedullären Marknägeln (IMN) etabliert, um 30 bis 50 mm große Defekte zu stabilisieren (Bloemers et al. 2003; den Boer et al. 2003; Regauer et al. 2005; Pluhar et al. 2006; Rentsch

et al. 2012; Rentsch et al. 2014). Des Weiteren wurden Modelle entwickelt, bei denen einfache oder doppelte Fixationsplatten verwendet wurden, um 30 mm große Defekte zu überbrücken (Hahn et al. 2011; Cipitria et al. 2012; Reichert et al. 2012a; Reichert et al. 2012b; Berner et al. 2013) und anschließend die Knochenheilung in den jeweiligen Defektbereichen unter dem Einfluss verschiedener osteokonduktiver Implantate (Scaffolds) sowie osteoinduktiver Gewebe oder Zellen zu untersuchen.

Bei defektnahen Fixationssystemen treten jedoch häufig unerwünschte Wechselwirkungen zwischen Knochen und dem eingebrachten Osteosynthesematerial auf. Zum einen kann durch eingebrachte Kompressionsplatten die Blutzirkulation gestört werden und zum anderen wirken diese oft selbst als zusätzliche Leitstruktur, an denen Knochengewebe direkt entlangwächst (Cipitria et al. 2012). Dadurch wird eine eindeutige Bewertung, ob sich ein Material eignet als Leitstruktur zu dienen, erschwert. Eine Stabilisation mittels intramedullärer Marknägel hat den Nachteil, dass dadurch der Markraum blockiert und das Regenerationpotential reduziert wird (Berner et al. 2013). Zudem füllt ein IMN den geschaffenen Defekt selbst aus, sodass es nicht mehr möglich ist einen befüllten Scaffold zu untersuchen. Daher wird in der vorliegenden Studie ein Hybrid-Ringfixateur aus Schanz-Schrauben und Ilizarov-Drähten verwendet, um einen 40 mm großen Defekt in der Schafstibia zu überbrücken. Diese Art der Osteosynthese schont das umgebende Weichgewebe, hat nur wenig Einfluss auf die zu untersuchende Defektstelle und bietet ausreichend Stabilität.

2.5 Knochenersatzmaterialien

2.5.1 Allgemeine Anforderungen an Knochenersatzmaterialien

Bei Knochenersatzmaterialien handelt es sich um Biomaterialien, die mit dem Ziel eingesetzt werden, die Kontinuität und mechanische Belastbarkeit des Knochens wiederherzustellen. Des Weiteren sollen sie die Menge, Qualität und Geschwindigkeit der Knochenneubildung positiv beeinflussen (Rueger 1998). Zu den gewünschten Eigenschaften von Knochenersatzmaterialien gehören Osteoinduktivität, Osteogenetik und Osteokonduktivität. Die Osteoinduktivität beschreibt die Fähigkeit eines Transplantates, aktiv die Knochenformation zu unterstützen (Urist 1965), was durch Wachstumsfaktoren wie BMP-2 und BMP-7 erreicht werden kann (Mahendra und Maclean 2007; Reichert et al. 2012b). Osteogenetische Potenz beschreibt die Anwesenheit von knochenbildenden Zellen (Osteoprogenitorzellen) (Giannoudis et al. 2005). Osteokonduktivität beschreibt die Eigenschaft eines Materials, als Gerüst (engl. Scaffold) zum Einwachsen von Osteoprogenitorzellen zu dienen, das Einsprossen von Kapillaren und perivaskulärem Gewebe in die eigene dreidimensionale Struktur und so das Einwachsen von Knochen zu ermöglichen (Burchardt 1983; Goldberg und Stevenson 1987). Von diesen Vorgängen ist direkt die Osseointegration, das heißt die Fixie-

rung eines Implantates durch den direkten Kontakt von Knochen und Implantat ohne dazwischenliegendes Bindegewebe, abhängig (Albrektsson und Johansson 2001). Die sogenannten Scaffolds sind zunächst formgebende Komponenten und sollen zusätzlich durch eine entsprechende Materialzusammensetzung und eine adäquate innere und äußere Struktur sowohl die Adhäsion als auch das Wachstum und die Differenzierung von Zellen unterstützen (Kneser et al. 2006). Die Osteokonduktivität an sich ist ein passiver Vorgang und ist abhängig von den porösen Eigenschaften des Scaffolds, aber auch von den chemischen und physikalischen Eigenschaften des Substrates selbst, da dieses die Adhäsion und das Zellwachstum unterstützen muss (LeGeros 2002). Durch gezielte Strukturierung und Anpassung der Porengröße wird es möglich, Zellen in eine bestimmte Richtung zu lenken, sie in die gewünschte Form wachsen zu lassen und die Vaskularisierung zu unterstützen (Pneumaticos et al. 2010).

Der optimale Knochenersatzstoff sollte osteogenetische, osteoinduktive und osteokonduktive Eigenschaften besitzen, stets verfügbar, einfach zu handhaben, biokompatibel und bioresorbierbar sein (Calori et al. 2011). Das heißt, das Material sollte keine Entzündungs- oder Immunreaktionen des Körpers hervorrufen und nicht zytotoxisch sein. Zusätzlich muss das Material sterilisierbar sein, um Infektionen vorbeugen zu können (Chaikof et al. 2002; Rezwan et al. 2006; Van der Stok et al. 2011).

Laut Giannoudis „Diamant-Konzept“ müssen für eine komplikationslose Frakturheilung fünf Parameter erfüllt sein: es müssen osteogenetische Zellen, osteoinduktive Potenz (Wachstumsfaktoren), ein osteokonduktiver Scaffold, mechanische Stabilität und eine gute Vaskularisierung gegeben sein (Giannoudis et al. 2007; Giannoudis et al. 2008). Viele Studien haben sich mit einem oder mehreren dieser Parameter befasst. So wurden verschiedene Wachstumsfaktoren, wie BMP-2 und -7 sowie Zelllinien auf ihr osteoinduktives oder osteogenetisches Potential untersucht und auch klinisch zufriedenstellende Ergebnisse erzielt (Friedlaender et al. 2001; Dimitriou et al. 2005; Harwood und Giannoudis 2005; Hernigou et al. 2005; Hernigou et al. 2006; Calori et al. 2008; Papathanasopoulos und Giannoudis 2008). Diese osteoinduktiven Substanzen und Zellen mit osteogenetischem Potential werden auf einen Scaffold aufgebracht, der als Träger dienen soll. So ist das Ziel, durch Kombination von einzelnen Komponenten, die jeweils nur eine oder zwei biologische Eigenschaften aufweisen, alle biologischen Eigenschaften eines autologen Knochenersatzes in einem Knochenersatztransplantat zusammenzubringen (Hutmacher et al. 2007).

Die Komponente „Scaffold“ soll als Gerüst- oder Leitstruktur dienen und so die Kolonisation, Migration, das Wachstum und die Differenzierung von Zellen unterstützen und die Entwicklung des gewünschten Gewebes leiten (Hutmacher et al. 2007) oder in manchen Fällen als bloßes Füllmaterial für Knochendefekte auch stützende Funktionen erfüllen (Huff und Sculco 2007).

Die heute für die Scaffoldherstellung verwendeten Materialien können aus natürlichen oder synthetischen Materialien bestehen. Zu den natürlichen Materialien gehören Polymere wie Polysaccharide, Hydrogele oder thermoplastische Elastomere (Tirelli et al. 2002; Berger et al. 2004; Drotleff et al. 2004; Mano et al. 2004). Zu den synthetischen Materialien gehören Metalle, Keramiken, Glaskeramiken, Polymere und Komposite aus verschiedenen Materialien. Eine wichtige Materialkategorie stellen bioaktive Keramiken wie z. B. Kalziumphosphate, bioaktive Gläser oder Glaskeramiken dar (Hench 1989; Kim et al. 2004; Levenberg und Langer 2004). Es wird aber auch an Kompositverbindungen aus Polymeren und Keramiken gearbeitet, um die Stabilität und die Gewebeinteraktion zu erhöhen (Kim et al. 2004; Niiranen et al. 2004; Zhang et al. 2004; Boccaccini und Blaker 2005; Hedberg et al. 2005; Yao et al. 2005).

2.5.2 Kalziumphosphat - Keramiken

Eine Keramik wird als anorganische Feststoffphase definiert, die durch Wärmebehandlung und anschließendes Abkühlen entsteht. Für Kalziumphosphat-Keramiken wird das Wärmeverfahren *Sintering* genannt. Bei dem Sinteringprozess werden flüchtige chemische Bestandteile entfernt und die Kristallisationsgröße erhöht, was in einem porösen und festen Material resultiert (Calori et al. 2011). Bioaktive Gläser und Keramiken sind außerordentlich biokompatibel und zeigen eine gute Knochenbindung (Hench et al. 1971). Sie werden mit der Zeit an ihrer Oberfläche kinetisch verändert, sodass sich dort eine biologisch aktive Hydroxid-Karbonat-Apatit-Schicht bildet, die die Verbindung mit der Oberfläche des Knochengewebes ermöglicht. Diese Hydroxid-Apatit-Schicht, die sich auf bioaktiven Implantaten bildet, ist chemisch und strukturell äquivalent mit der Mineralphase im Knochen (Hench 1989; Hench 1998). In der Klinik werden Keramiken als Implantate zur Defektfüllung oder zur Beschichtung von metallischen Implantaten verwendet, um diese mit osteokonduktiven Eigenschaften auszustatten (Damien und Parsons 1991). Biogläser bestehen aus Komponenten wie SiO_2 , Na_2O , CaO oder P_2O_5 und zeigen eine schnelle und direkte Bindung an Knochen, besitzen jedoch auch eine geringe Festigkeit (Rezwan et al. 2006). Die osteokonduktiven Eigenschaften dieser Stoffe hängen von der Porengröße, der Porosität und dem Abbaupotential ab. Die Porosität beschreibt dabei das Verhältnis von Hohlraumvolumen zum Gesamtvolumen eines Stoffes oder Stoffgemisches und ist zusätzlich bedingt durch die Porengröße und die Interkonnektivität der Poren (Blokhuis et al. 2000). Sie ist ein klassifizierendes Maß für tatsächlich vorliegende Hohlräume. Als makroporös werden Stoffe mit einer Porengröße von mehr als $100\ \mu\text{m}$ und als mikroporös Stoffe mit einer Porengrößen von weniger als $5\ \mu\text{m}$ definiert (Blokhuis et al. 2000). Die optimale Porengröße für das Einwachsen von neuem Knochen liegt zwischen 150 und $500\ \mu\text{m}$ (Makroporosität) (Daculsi und Passuti 1990; Blokhuis et al. 2000). Aufgrund ihrer Struktur bieten *Hydroxylapatit- (HA)* und *Trikalziumphosphat (TCP)*-

Keramiken eine gute Makrostruktur, um das Knochenwachstum zu ermöglichen. Eine Mikroporosität von $< 5 \mu\text{m}$ ist wichtig, um die Resorption des Material und die Diffusion von Nährstoffen zu ermöglichen (Driskell et al. 1972).

Sechzig Prozent des Knochens bestehen aus Hydroxylapatit, daher ist die chemische Basis vieler Knochenersatzstoffe Hydroxylapatit (HA, $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$) oder ein Kalziumphosphat wie z. B. Trikalziumphosphat (TCP, $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$) (Draenert et al. 2001; Rezwan et al. 2006). Kalziumphosphate zeigen eine hervorragende Biokompatibilität aufgrund ihrer chemischen und strukturellen Ähnlichkeit zum Knochen (Jarcho et al. 1977). Sie zeigen keinerlei osteoinduktives Potential, besitzen jedoch sehr gute osteokonduktive Eigenschaften und haben die Fähigkeit, unter bestimmten Bedingungen direkt an Knochen zu binden (Denissen et al. 1980; Hollinger und Battistone 1986; Hammerle et al. 1997). Außerdem zeigte sich in verschiedenen Studien, dass Kalziumphosphate die Bindung, Differenzierung und Proliferation von Osteoblasten oder mesenchymalen Stammzellen unterstützen (Rezwan et al. 2006).

Bei keramischen Implantaten kann der Abbau auf physikalischem, chemischem oder zellulärem Weg erfolgen und läuft stets langsam ab. TCP-Implantate werden dabei meist schneller abgebaut als HA-Keramiken (LeGeros et al. 1988). Man unterscheidet bei den Trikalziumphosphaten α - und β -TCP, wobei β -TCP biochemisch stabiler ist (Jarcho 1981; LeGeros et al. 1988). β -TCP gehört zu den synthetischen Kalziumphosphatkeramiken und wird in der Klinik häufig verwendet (Finkemeier 2002). β -TCP wird bei über 1000°C gesintert und gehört daher zu den Hochtemperatur-Kalziumphosphaten (Bohner 2000). Es zeigt eine gute Biokompatibilität, gute Resorptions- und Abbauraten und osteokonduktive Eigenschaften. Das poröse β -TCP kann vom neuen Knochen während der Knochenheilung allmählich abgebaut werden, da die Abbaurate der Knochenwachstumsrate entspricht (Liu et al. 2008). Des Weiteren kann ein β -TCP-Scaffold als Leitschiene für Osteoblasten dienen und so die Knochenneubildung fördern (Hauschild et al. 2005; Wheeler et al. 2005).

2.5.3 Polymere

Polymere sind makromolekulare Verbindungen aus mehreren gleichen oder verschiedenen Monomeren. Sie können natürlich vorkommen oder synthetisch hergestellt werden (Bendix und Liedtke 1998). Natürliche Polymere sind z. B. Polysaccharide wie Stärke, Alginate, Chitin und Hyaluronsäurederivate oder Proteine wie Soja, Kollagen, Fibringele und Seide (Rezwan et al. 2006). Synthetische Polymere können unter kontrollierten Bedingungen produziert werden und zeigen daher vorhersehbare und reproduzierbare mechanische und physikalische Eigenschaften, wie z. B. eine gute Zugfestigkeit, eine hohe Elastizität und eine gute Abbaurate. Hinzu kommt die Möglichkeit der Kontrolle auf Materialverunreinigungen, sodass das Risiko für Toxizität, Immunreaktionen und Infektionen gering ist (Rezwan et al. 2006).

Zu den meist genutzten synthetischen Polymeren für die Herstellung dreidimensionaler Scaffolds gehören *gesättigte aliphatische Polyester*, wie z. B. die Poly- α -Hydroxyester, zu denen unter anderem Poly-Lacton-Säure (PLA), Poly-Glycol-Säure (PGA), Poly-Lacton-co-Glycol (PLGA) und *Poly(ϵ -caprolacton)* (PCL) gehören. Dabei handelt es sich um semikristalline, lineare, resorbierbare Polyester. Die chemischen Eigenschaften dieser Polymere erlauben den hydrolytischen Abbau durch Spaltung einer Estergruppe. Danach können die Monomere einfach vom Körper abgebaut werden (Rezwan et al. 2006). Des Weiteren bieten sie eine geeignete Oberfläche für Zelladhäsion, -proliferation und -differenzierung. Zudem sind ihre Abbauprodukte nicht toxisch und können vom Körper metabolisiert sowie eliminiert werden (Lam et al. 2009). Zusätzlich können diese Polymere leicht in eine dreidimensionale Form mit gewünschter Geometrie und Porosität gebracht werden (Hollister 2005).

PCL im Einzelnen ist biokompatibel, nicht immunogen, nicht toxisch und wird aufgrund seiner hydrophoben Eigenschaften und seiner Kristallinität langsamer abgebaut als die anderen aliphatischen Polyester (Causa et al. 2006; McNeil et al. 2011). Die langsame Degradation ist besonders vorteilhaft, da so genügend Zeit für eine ausreichende Geweberegeneration gegeben ist (McNeil et al. 2011). Daher ist PCL grundsätzlich besonders für die Herstellung von Knochenersatzmaterialien geeignet. Allerdings bietet es nur wenig Stabilität, wodurch es sich allein als Knochenersatzmaterial weniger eignet (McNeil et al. 2011). Eine zusätzliche Fähigkeit von Polymeren ist eine Carrierfunktion für zugesetzte osteoinduktive Substanzen, wie Antibiotika, oder Wachstumsfaktoren übernehmen zu können (Pitt et al. 1981; Middleton und Tipton 2000).

2.5.4 Komposit-Verbindungen

Bei den Komposit-Verbindungen handelt es sich um Materialien, die aus einer Kombination von zwei oder mehr Einzelkomponenten bestehen (Damien und Parsons 1991). Oft wird dazu z. B. ein keramisches Material mit Kollagen oder Polymeren kombiniert, was unter anderem die mechanischen Eigenschaften des Scaffold, verbessert (Hutmacher et al. 2007).

Kompositmaterialien zeichnen sich meist durch ein ausgewogenes Verhältnis von Festigkeit und Elastizität aus. Sie weisen verbesserte Eigenschaften im Vergleich zu den Einzelkomponenten auf (McNeil et al. 2011). Die gute Biokompatibilität, Biodegradierbarkeit und die guten mechanischen Eigenschaften des Trikalziumphosphats werden beispielsweise durch ein Polymer wie PCL mit einer besseren Elastizität ausgestattet. Zusätzlich lässt sich durch die Zugabe von Polymeren die Osteokonduktivität verbessern und die Degradation besser steuern (Lam et al. 2009).

2.5.5 ChronOS Strip®

In der vorliegenden Arbeit wurden kommerziell erhältliche, vollsynthetisch hergestellte ChronOS Strips® (DePuy Synthes GmbH, West Chester, USA) mit einer Größe von 100 x 25 x 3 mm untersucht. Es handelt sich dabei um ein Komposit aus β -TCP und dem resorbierbaren Polymer Poly-Lactid-co- ϵ -Caprolacton. Das β -TCP-Granulat (ChronOS®) hat eine Größe von 0,5-0,7 mm und ist in eine Matrix aus Poly-Lactid-co- ϵ -Caprolacton eingebettet (Abbildung 1 und 2). Die Keramik und das Polymer wurden in einem Verhältnis von 60 % zu 40 % \pm 10 % gemischt. Der ChronOS Strip® besitzt laut Hersteller eine Gesamtporosität von 60 %. Die interkonnektierenden Makroporen weisen eine Größe von 100 bis 500 μ m auf (ChronOS Strip®; DePuy Synthes, USA; Overview Brochure, 28.11.2016, DSUS/MOC/0914/0100), wodurch optimale Bedingungen für die Vaskularisation und Migration von Osteoklasten und Osteoblasten erfüllt werden (Gazdag et al. 1995). Durch Mikroporen mit einem Durchmesser von weniger als 10 μ m erhält das Implantat eine größere Oberfläche und die Zirkulation von Körperflüssigkeiten wird ermöglicht, sodass Umbauprozesse beschleunigt ablaufen können (Daculsi und Passuti 1990; Gazdag et al. 1995; Blokhuis et al. 2000). Insgesamt ergibt sich ein poröses, osteokonduktives, dreidimensionales Komposit mit einer hohen Flexibilität. Die hohe Flexibilität ermöglicht die Anpassung der ChronOS Strip®s an verschiedene Formen; zudem kann die Größe durch leichtes Zuschneiden an eine entsprechende Situation angepasst werden.

Laut Hersteller wird der ChronOS Strip® innerhalb von 6 - 18 Monaten resorbiert und durch Knochen ersetzt. Sowohl eine alleinige Verwendung als auch die Kombination mit einem Autotransplantat wird empfohlen (ChronOS Strip®; DePuy Synthes, USA; Overview Brochure, 28.11.2016, DSUS/MOC/0914/0100). Der ChronOS Strip® kann als Defektfüllmaterial verwendet werden und sollte immer Kontakt zum Knochen haben. Dabei sollte jedoch eine größtmögliche Stabilität durch eine Osteosynthese gegeben sein, um eine gute knöcherne Durchwachsung zu gewährleisten.

Bisher findet der ChronOS Strip® vor allem in der Wirbelsäulen Chirurgie zur Unterstützung der posterolateralen Fusion von Wirbelgelenken Verwendung. Dazu wird der ChronOS Strip® nach vorgenommener Laminektomie und Dekompression der spinalen Stenose über den Facettengelenken der Wirbelsäule angebracht (Ramani et al. 2014). Hrabalek et al. verwendeten den ChronOS Strip® als Knochenersatzstoff zur Füllung eines Kunststoffcages, der zur Wirbelsäulenstabilisierung beitragen soll (Hrabalek et al. 2014). Kanter und Kollegen verwendeten den ChronOS® Strip in Kombination mit autologem Knochenmarksaspirat und lokalem autologen Knochenmaterial bei Patienten, die eine instrumentierte postolaterale Spondylodese mit interkorporeller Stabilisierung erhielten (Kanter et al. 2016).

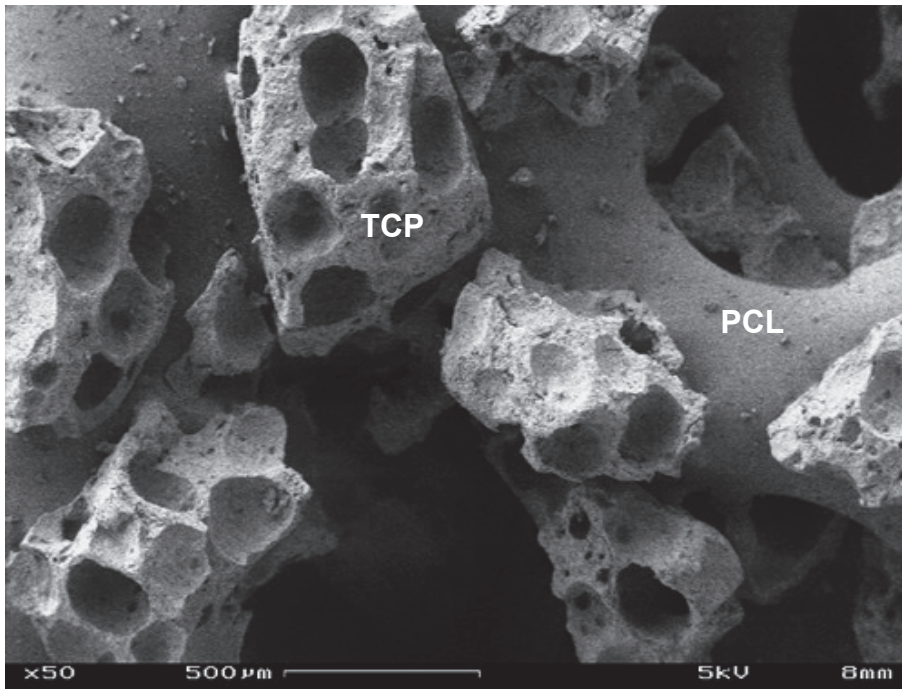


Abbildung 1: Rasterelektronenmikroskopische Nativ-Aufnahme des ChronOS Strips® (Rasterelektronenmikroskop Typ DSM 982 Gemini, Zeiss, Jena, Deutschland)

PCL: strangartig verlaufendes Poly-Lactid-co-ε-Caprolacton, TCP: ChronOS-Granulat aus β -Trikalziumphosphat

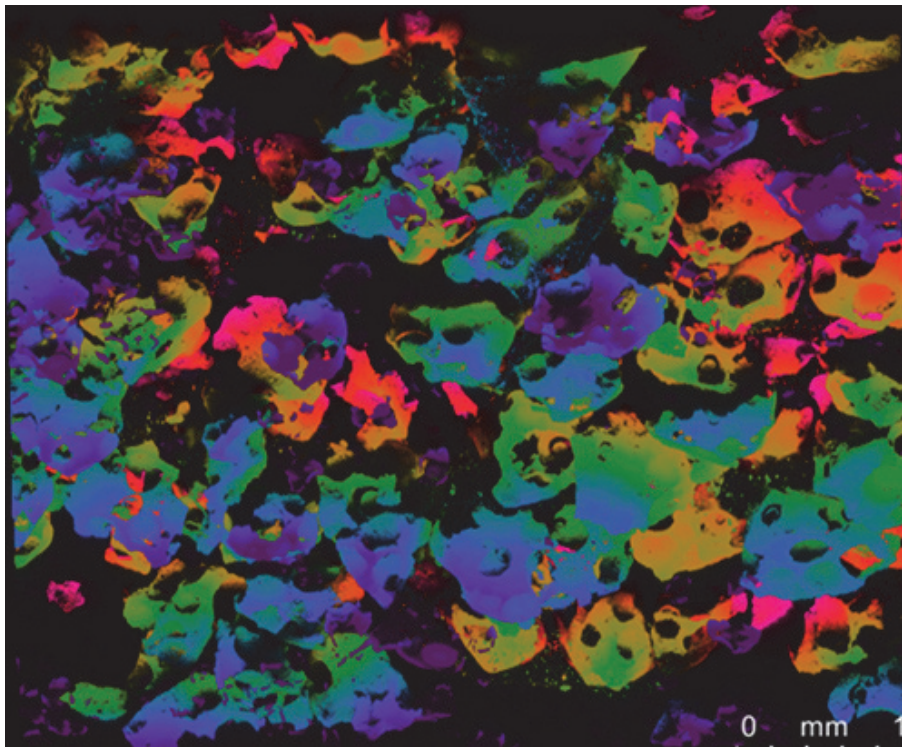


Abbildung 2: 3D-Laser-Scan-Mikroskop-Aufnahme des ChronOS Strip® (Leica SP5 II microscope (Leica Mikrosysteme Vertrieb GmbH, Wetzlar, Germany))

Die Abbildung zeigt das ChronOS-Granulat aus β -Trikalziumphosphat.

2.6 Ziele und Hypothesen der Studie

Die aktuell eingesetzten Therapieverfahren zur Behandlung großer segmentaler, kritischer Knochendefekte, wie die Knochendistraktion (Ilizarov-Technik) und vaskularisierte, autologe oder allogene Knochen transfers, sind mit einem hohen Risiko für Komplikationen, wie einer erhöhten Entnahmemorbidity, Infektionsgefahr und schlechter Einheilungsrate, verbunden. Zudem reicht die Menge an gewonnenem Knochen oft nicht aus, weshalb seit langem an Alternativen für den Knochenersatz geforscht wird.

Aktuell sind scaffoldbasierte Regenerationstherapien in der Anwendung, die aus synthetischen Polymeren, Metallen, Keramiken oder Kompositverbindungen aus diesen Materialien bestehen können. Als Alternative wird in dieser Studie ein Komposit-Scaffold (ChronOS Strip®) bestehend aus Poly-Lactid-co- ϵ -Caprolacton und β -Trikalziumphosphat zur Unterstützung der Heilung in einem Osteotomiedefekt kritischer Größe in der Diaphyse der Schaf tibia untersucht. Der oben beschriebene Komposit-Scaffold (ChronOS Strip®) mit einer Gesamtporosität von 60 %, interkonnektierenden Poren von 100 – 500 μ m und Mikroporen kleiner als 10 μ m verbindet die hohe Biokompatibilität und Biodegradierbarkeit sowie die mechanischen Eigenschaften des β -TCP mit der hohen Elastizität und Osteokonduktivität des PCL (Lam et al. 2009). Er stellt sich als poröser, flexibel formbarer Streifen dar, der vernäht und zu einem Hohlzylinder geformt und dann beispielsweise mit autologer Spongiosa aufgefüllt werden kann. Des Weiteren ist er besonders durch seine hohe Flexibilität leicht an die gewünschte Defektgröße und -form adaptierbar.

In dieser Studie wird der Komposit-Scaffold in einem 40-mm-Osteotomie-Defektmodell der Schafstibia, stabilisiert mittels Hybrid-Ringfixateur, untersucht. Verglichen wird eine Gruppe, in der der ChronOS Strip® als Scaffold allein zur Stimulation der Knochendefektheilung untersucht wird, mit einer zweiten Gruppe, bei der der ChronOS Strip® zusätzlich mit osteoinduktiver, autologer Spongiosa aus dem Beckenkamm gefüllt wird.

Die Beurteilung des Heilungsergebnisses erfolgt dabei anhand von monatlichen röntgenologischen Verlaufskontrollen und computertomographischen sowie histomorphometrischen, immunhistochemischen und histomorphologischen Untersuchungen nach einer Heilungszeit von 12 Wochen. Folgende Hypothesen sollen dabei überprüft werden:

- 1) Der 40-mm-Osteotomie-Defekt in der Schaf tibia wird mittels Hybrid-Ringfixateur adäquat stabilisiert und das Modell eignet sich für die Untersuchung regenerativer Therapieansätze.
- 2) Ein Komposit-scaffold aus Poly-Lactid-co- ϵ -Caprolacton und β -Trikalziumphosphat unterstützt die endogene Knochenregeneration in einem kritischen, segmentalen Knochendefekt.

- 3) Durch Kombination des Scaffolds mit osteoinduktiver, autologer Spongiosa wird die Knochendefektheilung stimuliert und es kommt zu einem weiter fortgeschrittenen Heilungsergebnis nach 12 Wochen.

3. Materialien und Methoden

3.1. Versuchstiere

Für diesen Versuch wurden 15 Merino-Mix-Schafe verwendet. Die Genehmigung zur Durchführung des Tierversuchsvorhabens wurde durch das Landesamt für Gesundheit und Soziales Berlin im Rahmen eines größeren Vorhabens erteilt (Genehmigungsnummer G 0451/08).

3.1.1 Haltung und Fütterung

Die Schafe wurden in einem Schafstall der Forschungseinrichtung für experimentelle Medizin (FEM) der Charité, Augustenburger Platz 1, 13353 Berlin gehalten und versorgt.

Nach der Anlieferung wurden die Tiere einer tierärztlichen Allgemeinuntersuchung unterzogen. Nach der Feststellung eines guten Gesundheitszustands und einer Zahnalterbestimmung wurden die Tiere mit einer Ohrmarke gekennzeichnet und mit einer subkutanen (s.c.) Applikation von 1,5 ml Ivermectin (Ivomec, Biokema SA, Crissier, Schweiz), einer oralen Eingabe von 5 ml je 50 kg Triclabendazol (Fasinex® 10%, Novartis Tiergesundheit GmbH, München) und einem Bolus von je 250 mg Fenbendazol je Schaf (Panacur®, MSD Tiergesundheit, Intervet Deutschland GmbH, Unterschleißheim) prophylaktisch entwurmt. Die Tiere waren weiblich, nicht tragend und mehr als zweieinhalb Jahre alt.

Zur kontrazeptiven Behandlung wurden jedem Tier zweimal im Abstand von 2 Wochen 2 ml Estrumate® (Cloprostenol-Natriumsalz, Estrumate® 250 µg/ml Injektionslösung, MSD Tiergesundheit, Intervet Deutschland GmbH, Unterschleißheim, Deutschland) s.c. in die seitliche Brustwand verabreicht. Das Körpergewicht betrug 74 ± 14 kg. Die Einstallung erfolgte in Gruppen zu sechs Tieren, jeweils mindestens eine Woche vor der Operation des ersten Tieres, um den Tieren genug Zeit zur Eingewöhnung in die neue Umgebung zu geben. Nach der Operation wurden die Tiere separat in einem kleineren, abgetrennten Gehege direkt neben der Gruppe gehalten (Abbildung 3 A). Neben der Bewegungseinschränkung konnte so eine leichtere Nachsorge in den ersten Tagen postoperativ erfolgen. Ein Kontakt zu den anderen Schafen der Gruppe war permanent durch die Gatter möglich. Die Haltung der operierten Tiere erfolgte anschließend in Kleingruppen von bis zu sechs operierten Tieren ohne weitere Bewegungseinschränkung (Abbildung 3 B).

Die Schafe wurden während des gesamten Versuchszeitraumes auf Einstreu in Form von Stroh und Sägespänen gehalten, welches regelmäßig erneuert wurde. Die Stallungen waren mit Tageslicht beleuchtet und bei 20°C klimatisiert. Wasser stand den Schafen über eine Selbsttränke ad libidum zur Verfügung. Die Fütterung mit Heu erfolgte zweimal täglich.

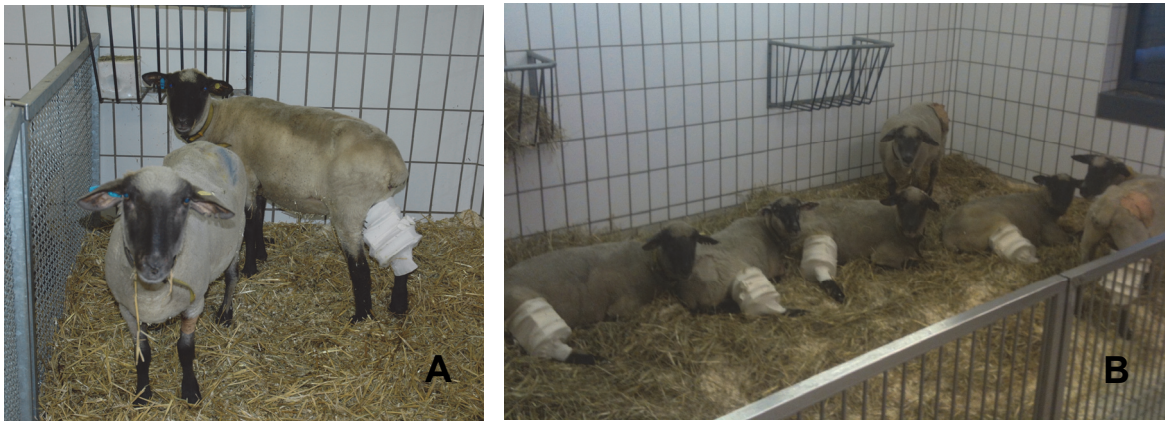


Abbildung 3: Merino-Mix Schafe in Gruppenhaltung in einem Schafstall der Forschungseinrichtung für experimentelle Medizin (FEM) der Charité

Bild A: Haltung kurz nach der OP, Bild B: Haltung in Kleingruppen von bis zu sechs Tieren

3.1.2 Gruppeneinteilung

In beiden Gruppen wurde bei den Schafen je einen Osteotomiedefekt von 40 mm im Bereich des Tibiaschaftes gesetzt, der mittels eines Hybrid-Ringfixateurs stabilisiert wurde.

In Gruppe eins wurde in den Osteotomiedefekt ein hohlzylindrisch geformter Komposit-scaffold aus β -TCP und Poly-Lactid-co- ϵ -Caprolacton (ChronOS Strip®, Depuy Synthes GmbH, West Chester, USA) eingesetzt. In Gruppe zwei wurde Scaffold zusätzlich mit autologer Spongiosa aus dem Beckenkamm des jeweiligen Tieres gefüllt.

3.2 Operatives Vorgehen und Materialeinsatz

3.2.1 Fixateur externe

Bei allen Tieren dieser Studie wurde als einheitlicher Fixateur externe ein Hybrid-Ringfixateursystem zur Stabilisierung der rechten Tibia verwendet. Der Hybrid-Ringfixateur erstreckte sich mit einer Länge von 180 mm über die gesamte Länge des Tibiaschafts, um eine ausreichende Stabilität zu gewährleisten und ein physiologisches Vorführen der Gliedmaße und Beugung im Kniegelenk weiterhin zu ermöglichen. Um eine gewisse Dynamik und Federung des Fixateurs zu gewährleisten, wurden ober- und unterhalb des ersten Ringes sich kreuzende Ilizarov-Drähte durch Haut, Weichgewebe und Tibia positioniert. Diese waren die einzigen Elemente am Ringfixateur mit bilateraler Ausrichtung. Durch die Konstruktion des Hybrid-Ringfixateurs wird eine axiale Belastung zugelassen jedoch kaum Scher- und Torsionskräfte.

Es wurde ein Hybrid-Ringfixateur mit einem Durchmesser (innerer Ring) von 160 mm (4x Vollring 160 mm, Art.Nr.: 03.311.346, DePuy Synthes GmbH, Umkirch, Deutschland) ver-

wendet. Zwischen den vier Ebenen waren Sechskantabstandhalter angebracht (proximal: 03.2211.240 4 cm, mittig: 03.311.250 5 cm; 03.311.230 3 cm, distal 03.2211.240 4 cm)

An den Ringen der ersten Ebene wurden zwei Ilizarov-Drähte mit Oliven (\varnothing 2,0 mm und 400 mm lang, Art.Nr.: 03.311.033, DePuy Synthes GmbH, Umkirch, Deutschland) und in den weiteren Ebenen fünf Schanz-Schrauben mit einem Durchmesser von 5 mm und unterschiedlichen Gewindelängen (DePuy Synthes GmbH, Umkirch, Deutschland) befestigt. Die Schanz-Schrauben wurden hier zur besseren Erklärung von proximal nach distal von 1 bis 5 durchnummeriert (Schraube 1: 50 mm Gewindelänge, Schraube 2 und 3: 32 mm Gewindelänge, Schraube 4 und 5: 28 mm Gewindelänge). Die Abstände der Schanz-Schrauben zueinander wurden durch die Befestigung mittels Schrauben, Klemmbolzen (Klemmbolzen für Schanz-Schraube, Art.Nr.: 03.311.010, Klemmbolzen für Draht, geschlitzt, Art.Nr.: 03.311.050, DePuy Synthes GmbH Umkirch, Deutschland) und Sechskantmuttern (Art.Nr.: 03.311.061, DePuy Synthes GmbH Umkirch, Deutschland) an den Ringen des Fixateurs vorgegeben (Abbildung 4).

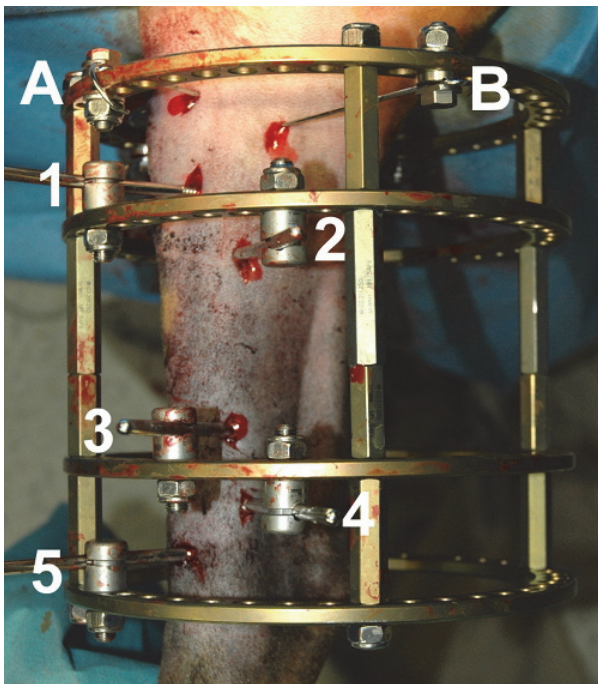


Abbildung 4: Mediale Ansicht des montierten Hybrid-Ringfixateurs

Dargestellt sind die Positionen der sich kreuzenden Ilizarov-Drähte (A und B) sowie die Anordnung der Schanz-Schrauben 1-5.

Als einzige Elemente mit bilateraler Ausrichtung wurden in der ersten Ringebene sich kreuzende Ilizarov-Drähte von kranio-medial nach kaudolateral und von kaudomedial nach kranio-lateral angebracht. So sollte eine gewisse Dynamik und Federung des Fixateurs gewährleistet werden (Abbildung 4: Markierungen A und B). An den beiden mittleren Ringebenen wurden je zwei Schanz-Schrauben (Abbildung 4: Nr. 1 und 2 sowie Nr. 3 und 4) mit Klemmba-

cken proximal und distal der jeweiligen Ringebene in verschiedenen Winkeln zur Tibia fixiert. In der untersten Ringebene wurde nur eine Schanz-Schraube (Abbildung 4: Nr. 5) proximal des Ringes angebracht.

3.2.2 ChronOS Strip®

In dieser Studie wurde ein Kompositscaffold aus Poly-(lactid)- ϵ -Caprolacton und β -Trikalziumphosphat (ChronOS Strip®, 100 x 25 x 3 mm, Depuy Synthes GmbH, West Chester, USA) untersucht, der aus β -Tricalcium-Phosphat-Granulat und einem resorbierbaren Polymer (Poly-(lactid)- ϵ -Caprolacton) besteht. Diese Komponenten ergeben ein poröses, osteokonduktives und dreidimensionales Komposit, das formbar und flexibel ist. Laut Hersteller haben die Granulatkörner des ChronOS-Streifens eine Größe von 0,5 – 0,7 mm, Makroporen mit einer Größe von 100 – 150 μ m Durchmesser, Mikroporen von weniger als 10 μ m und eine Gesamtporosität von 60%. Außerdem wird der ChronOS Strip® innerhalb von 6 bis 18 Monaten resorbiert. Der sterile Scaffold wurde in der Vorbereitung zu der Operation aus seiner Verpackung entnommen und halbiert. Diese beiden Hälften von ca. 50 mm Länge wurden übereinandergelegt und mit einer fortlaufenden Kürschner-Naht und bei Bedarf mit zusätzlichen Einzelheften vernäht (3-0er Prolene®-Faden, Ethicon, © Johnson & Johnson Medical GmbH, Norderstedt, Deutschland). Die entstandene Röhre wurde auf einen Zylinder gestülpt, um die Röhrenform anzupassen (Abbildung 5 A und B). Bei Gruppe zwei wurde Spongiosa in diesen Zylinder gefüllt. Bei der Implantation des Scaffolds in den Osteotomiespalt wurde die Länge auf 40 mm gekürzt.

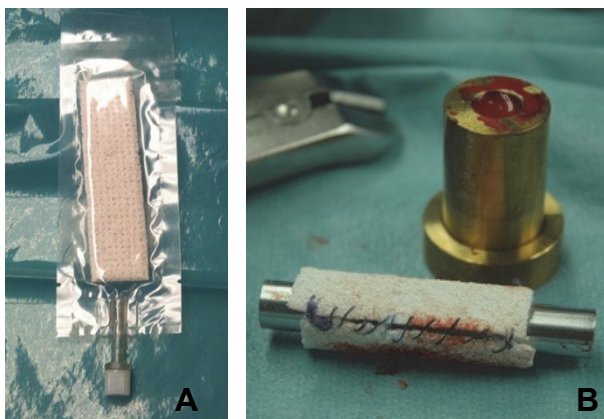


Abbildung 5: für die Operation vorbereiteter Scaffold

Bild A: Scaffold in steriler Verpackung; Bild B: Zwei Scaffoldstreifen wurden zu einer Röhre vernäht und auf einen Zylinder gestülpt, um die Form anzupassen.

3.2.3 Narkose und Operationsvorbereitung

Am Vortag der Operation erhielten die Schafe zum letzten Mal um 14 Uhr Heu, um eine Nahrungskarenz von ca. 12 bis 16 Stunden einzuhalten. Wasser stand den Tieren immer ad libitum zur Verfügung. Die Tiere konnten jedoch nicht vollständig nüchtern gehalten werden, lediglich einer zu starken Füllung des Pansens mit der daraus resultierenden Gefahr einer Pansentympanie während der Operation sollte vorgebeugt werden.

Die Schafe wurden durch zwei Personen auf die Hintergliedmaße gesetzt und fixiert. Ein Venenverweilkatheter (Größe 1,3 x 32 mm, BD Venflon™ Pro Safety, Becton Dickinson Infusions Therapy, Helsingborg, Sweden) wurde in der V. cephalica antebrachii an der rechten Vordergliedmaße gelegt. Je nach Körpergewicht und Wirkung wurden 0,5 bis 1,5 mg Thiopental-Natrium (Trapanal® Altana Pharma GmbH, Konstanz, Deutschland) intravenös verabreicht. Das sedierte Tier wurde mit Hilfe eines Kaltlicht-Laryngoskops (Laryngoskopgriff Mc. Intosh, Freiburger Model, Sonderlaryngoskop Model Foregger 30 cm für Tiere, RGW, Tuttlingen, Deutschland) und eines 9 mm starken Trachealtubus (Hi-Contour™, 9 mm Breite, 33mm Länge, Mallinckrodt Medical, Athlone, Ireland) intubiert. Die korrekte Lage in der Trachea wurde durch Druck auf den Brustkorb kontrolliert und im Anschluss wurde der Cuff mit ca. 15 ml Luft geblockt und mit Klebeband (Leukoplast®, 1,25 cm Breite, BSN medical GmbH & Co. KG, Hamburg, Deutschland) am Maul fixiert. Zwischen Tubus und Beatmungsschläuche wurde ein Klimatisierungsfilter (Pall Ultipor 25, Pall GmbH Medical, Dreieich, Deutschland) angeschlossen. Die Narkose wurde per Inhalation (Inhalationsnarkosegerät Ventilator 711, Siemens, Berlin, Deutschland) mit einem Gemisch aus Sauerstoff (ca. 50% medizinischer Sauerstoff, O₂ Linde® Gas Therapeutics GmbH & Co. KG, Unterschleißheim, Deutschland), Lachgas (ca. 20 % medizinisches Lachgas N₂O, O₂ Linde® Gas Therapeutics GmbH & Co. KG, Unterschleißheim, Deutschland) und 1,5 - 2,5 % Isofluran (Forene®, Abbott GmbH & Co. KG, Wiesbaden, Deutschland) aufrechterhalten. Dabei wurde expiratorisch ein Isoflurangehalt von 1,9 % eingestellt. Das Atemzugvolumen war mit 6 - 10 ml/kg Körpergewicht und die Beatmungsfrequenz mit 12 - 20 Atemzügen pro Minute (Verhältnis In- und Expiration 1:2) am Narkosegerät eingestellt, sodass ein inspiratorischer Mitteldruck von ca. 20 mm Hg und ein expiratorischer CO₂-Partialdruck von 35-40 mm Hg erreicht wurde.

Zur Narkoseüberwachung wurde mittels Infrarotsonde die Sauerstoffsättigung des Blutes an Zunge oder Ohr gemessen, der Blutdruck über eine Blutdruckmanschette an der linken Vordergliedmaße gemessen und die Herzaktivität wurde über die bipolare Extremitätenableitung nach Einthoven I überwacht. Des Weiteren wurden Sauerstoff, Lachgas, Isofluran und Kohlendioxingehalt ständig in der In- und Expirationsluft gemessen (Anästhesiegasmonitor NGM 1000, Fritz Stephan GmbH Medizintechnik, Gackenbach, Deutschland). Eine Pansenschlundsonde (Durchmesser 14 mm, Willy Rüscher AG, Deutschland) wurde gelegt, um einem Aufgasen des Pansens während der Operation vorzubeugen. Um ein Austrocknen der Au-

gen zu verhindern, wurde Bepanthen-Augensalbe auf die Cornea aufgetragen. Zur antibiotischen Prophylaxe erhielt jedes Tier Amoxicillin mit Clavulansäure (Unacid® 3g, 1g Sulbactam-Natrium und 2 g Ampicillin, Pulver zur Herstellung einer Infusionslösung, Pfizer Pharma GmbH, Berlin, Deutschland) und 500 mg Metronidazol intravenös verabreicht (Metronidazol, Fresenius Kabi, Bad Homburg v.d.H., Deutschland). Aufgrund der Länge des operativen Eingriffs wurde zur prophylaktischen Behandlung diese Antibiotikakombination gewählt. So wurde ein sehr breites Wirkspektrum gegen gram positive und negative Keime abgedeckt.

Während der gesamten Operationszeit wurden jedem Tier zur Kreislaufstabilisierung und zum Ausgleich des Flüssigkeitshaushaltes nach Bedarf ca. 2000 ml einer kristalloiden Infusionslösung (Jodosteril®, Fresenius Kabi, Bad Homburg v.d.H., Deutschland) und 500 ml eines Plasmavolumenersatzmittels (Volyte®, Fresenius Kabi, Bad Homburg v.d.H., Deutschland) infundiert. Schon vor Beginn der Operation wurde jedem Tier am linken Vorderbein ein Fentanyl-Pflaster (Durogesic® 75µg/h, JANSSEN-CILAG GmbH, Neuss, Deutschland) zur postoperativen Analgesie auf die rasierte und entfettete Haut geklebt. 75µg Fentanyl werden kontinuierlich transdermal pro Stunde abgegeben. Des Weiteren wurde Fentanyl® (0,5 mg i.v. im Bolus) als intraoperatives Analgetikum vor dem ersten Hautschnitt sowie vor schmerzhaften Eingriffen wie der Durchtrennung des Periosts beim Sägen und Bohren verabreicht. Post operationem wurden jedem Tier 2,2 mg Flunixin Meglumin pro 50 kg Körpergewicht (KGW) (Finandyne®, MSD Tiergesundheit, Deutschland) subkutan verabreicht.

Für den medialen Zugang zur Tibia wurden die Schafe in rechter Seitenlage positioniert. Das linke Hinterbein wurde nach kranial und über den Rücken ausgebunden, um das Operationsfeld freizulegen (Abbildung 6). Des Weiteren wurden die Klauen nach Bedarf geschnitten, gereinigt, anschließend mit Mull verbunden und die rechte Schulter zum Schutz des N. radialis mit einem Polster unterlagert.

Das Operationsfeld an der rechten Hintergliedmaße wurde von Knie bis zum Fesselgelenk geschoren, ebenso wie ein großzügiger Bereich um den linken Beckenkamm bei den Tieren der Gruppe zwei (Favorita II, Aesculap AG & Co.KG, Tuttlingen, Deutschland) (Abbildung 7 A-B). Diese Bereiche wurden von Schmutz befreit, mit Jodseife gewaschen und anschließend die Schnittlinie zusätzlich rasiert. Im Anschluss wurden die Operationsfelder mehrmals mit einer Povidon-Jod-Lösung (Braunol®, B.Braun Melsungen AG, Deutschland) desinfiziert und mit sterilen Operationstüchern (steriles Basispaket, Steri-Drape™, Firma 3M Health Care, Neuss, Deutschland) abgedeckt. Der distale Anteil des zu operierenden rechten Hinterbeines wurde auf einem weiteren Operationstisch abgestützt, so dass die Tibia rund herum frei zugänglich war (Abbildung 7 B).



Abbildung 6: Narkose- und Überwachungseinheit
Positionierung des Schafes auf dem Operationstisch



Abbildung 7: Operationsfelder

Bild A: Operationsfeld am linken Beckenkamm

Bild B: Operationsfeld an der rechten Tibia

3.2.4 Operation

Zu Beginn der Operation wurde die Position des Hybrid-Ringfixateurs bestimmt, indem er an das Bein angehalten wurde (Abbildung 8 A). Das Knie sollte weiterhin frei beweglich sein. Daneben musste der Hybrid-Ringfixateur etwas näher zur medialen Seite hin an der Tibia fixiert werden, damit er später beim Laufen nicht gegen die linke Hintergliedmaße stieß.

Passend zu dieser Position wurden zuerst die äußersten Schanz-Schrauben fixiert (DePuy Synthes GmbH, Umkirch, Deutschland; \varnothing 5mm; Schanz-Schraube 5: 28 mm Gewindelänge, Schanz-Schraube 1: 50 mm Gewindelänge) (Abbildung 8 B).

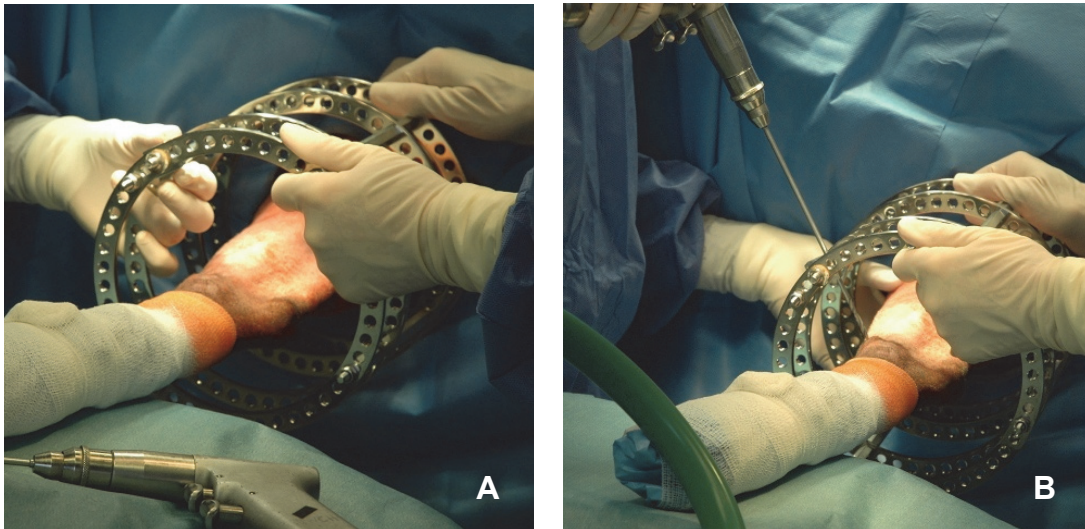


Abbildung 8: Positionierung des Hybrid-Ringfixateurs

Bild A: Austarieren der Ringfixateurposition, Bild B: Positionierung der fünften Schanz-Schraube

Zur Positionierung der Schanz-Schrauben wurde eine Hautinzision bis auf das Periost über dem Planum cutaneum cruris tibiae gesetzt. Im Anschluss wurde eine Bohrhülse durch die Hautinzision hindurch fest auf das Periost aufgesetzt. Diese Bohrhülse diente als Gewebeschutz und als Richtungsweiser für das folgende Bohrloch.

Für jede Schanz-Schraube (\varnothing 5mm) wurde ein Loch mit einem Durchmesser von 3,5 mm mit einem Spiralbohrer und einer druckluft-betriebene Bohrmaschine (Compact Air Drive II®, Depuy Synthes GmbH, Umkirch, Deutschland) durch beide Kortikales vorgebohrt. Die Position und Richtung des Bohrlochs wurde durch die bei jedem Tier an gleicher Stelle des Hybrid-Ringfixateurs befestigten Klemmbacken vorgegeben. Die Bohrungen fanden unter permanenter Spülung mit steriler Kochsalzlösung statt. Anschließend wurden die Schanz-Schrauben mit Hilfe eines Universalbohrfutters bikortikal in das Loch gedreht bis die Spitze des Gewindes auf der lateralen Seite der Tibia fühlbar wurde. Die Schanz-Schrauben sollten mit 1,5 bis 2 Gewindeumdrehungen aus der gegenseitigen Kortikalis herausragen.

Nachdem die Schanz-Schrauben fünf und eins angebracht waren, wurde die Position der zweiten, dritten und vierten Schanz-Schraube bestimmt, (DePuy Synthes GmbH, Umkirch, Deutschland; \varnothing 5mm; Schraube 2 und 3: 32 mm Gewindelänge, Schraube 4: 28 mm Gewindelänge) eingebracht und mittels Klemmbacken an den Fixateurringen befestigt. Abschließend wurden zwei sich kreuzende Ilizarov-Drähte auf Höhe des proximalen Fixateurringes durch die Tibia und Muskulatur hindurch bis zur jeweiligen kontralateralen Seite gebohrt, festgezogen und mit geschlitzten Klemmbolzen für Draht befestigt (Abbildung 9). Die jeweiligen Klemmbolzen und Muttern wurden festgezogen und jene auf der Spannseite etwas gelockert. Anschließend wurde von der Spannseite des Ringes der Draht durch die Durchbohrung eines Drahtspanners (Art.Nr: 03.311.001, Depuy Synthes GmbH, Umkirch, Deutschland) eingeführt, die Zähne des Drahtspanners fest an den Ring gesetzt und der Draht auf

130 kg gespannt. Zum Schluss wurden die spannsseitigen Klemmbolzen und Muttern und alle Schraubverbindungen nochmals kontrolliert und festgezogen.

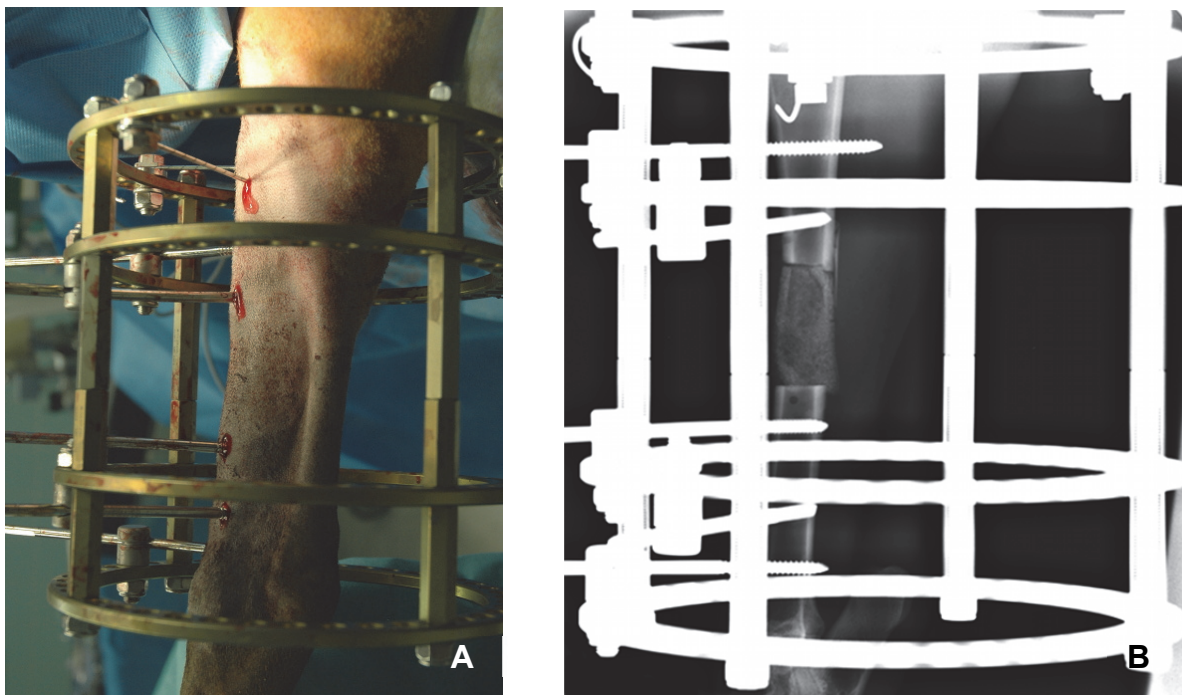


Abbildung 9: montierter Hybrid-Ringfixateur

Bild A: Kaudale Ansicht; von proximal nach distal verlaufend: 2 Ilizarovdrähte mit Oliven, eine Schanz-Schraube (50 mm Gewindelänge), zwei Schanz-Schrauben (32 mm Gewindelänge) und 2 Schanz-Schrauben (28 mm Gewindelänge),

Bild B: Röntgenbild (anterio-posterior) direkt post OP, mittig ist der mit dem Scaffold gefüllte Tibiaosteotomiedefekt erkennbar, an den proximal die zweite und distal die dritte Schraube grenzt

Nach vollständiger Fixierung des Hybrid-Ringfixateurs wurde eine Sägeschablone, die eine Defektgröße von 40 mm vorgab, an die zwei mittleren Fixateur-Schanz-Schrauben angelegt, um die Sägebene in der Mitte zwischen den beiden Schrauben festzulegen. Dann wurde ein Hautschnitt quer zur Tibia verlaufend gesetzt. Die Muskeln und Faszien, die die Tibia an dieser Stelle umgeben, wurden stumpf mit der Hand und einem Raspatorium vom Periost gelöst. Mit dem Skalpell wurden die beiden Sägeschnittstellen auf dem Periost markiert. Auf deren Höhe wurden jeweils Hohmann-Haken unter der Tibia positioniert, zum Schutz des umliegenden Weichgewebes beim Sägen. Die Osteotomie wurde mit einer oszillierenden, druckluftbetriebenen Säge (Compact Air Drive II® mit oszillierendem Sägeaufsatz, Art.Nr: 511.800, Depuy Synthes GmbH, Umkirch, Deutschland) durchgeführt. Während des Sägens wurde die Osteotomiezone permanent mit steriler Kochsalzlösung gespült. Palpatörisch wurde die komplette Durchtrennung des Knochens kontrolliert und ein 40 mm langes Tibiasegment entnommen. An dessen Stelle wurde der Scaffold positioniert (Abbildung 10). Der vorbereitete, hohlzylindrische Scaffold (Abbildung 5) wurde bei den Tieren der ersten Gruppe leer in den Defekt eingebracht und bei den Tieren der zweiten Gruppe zusätzlich mit

autologer Spongiosa aus dem rechten Beckenkamm gefüllt (Abbildung 11). Damit der präparierte Scaffold nicht disloziert, wurde er mit Hilfe eines Fadens (3-0er Prolene®-Faden, Ethicon, ©Johnson & Johnson Medical GmbH, Norderstedt, Deutschland) über ein kleines (Ø 2 mm), unikortikales Bohrloch im proximal und distal angrenzenden Tibiassegment fixiert.

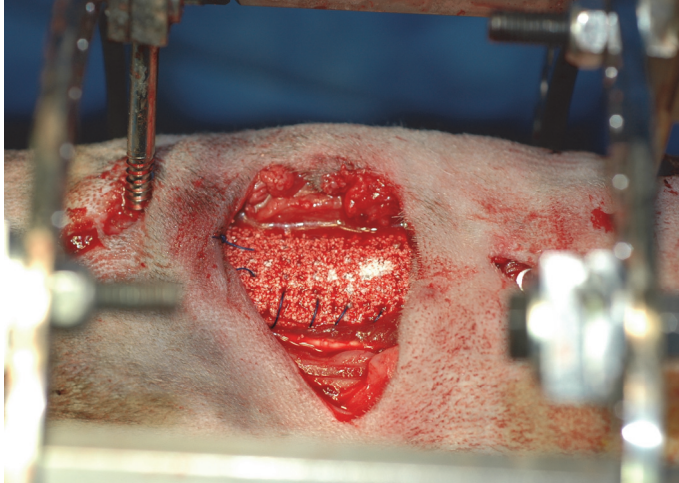


Abbildung 10: PCL-β-TCP-Scaffold (ChronOS Strip®) im Osteotomiedefekt

Zwei Scaffoldstreifen wurden vorab zu einer hohlzylindrischen Röhre vernäht. Im Rahmen der Operation wurde diese in den Defekt eingebracht und dort mit Hilfe eines Fadens durch ein unikortikales Bohrloch an den angrenzenden Tibiassegmenten fixiert, um ein Dislozieren zu verhindern.

Die Unterhaut wurde mit einer fortlaufenden Kürschner-Naht (3-0er Vicryl®-Faden, Ethicon, ©Johnson & Johnson Medical GmbH, Norderstedt, Deutschland) verschlossen, die Haut mit einer fortlaufenden Reverdinnaht (3-0er Prolene®-Faden, Ethicon, ©Johnson & Johnson Medical GmbH, Norderstedt, Deutschland) vernäht. Die überstehenden Enden der Schanz-Schrauben wurden abschließend gekürzt und die Iizarov-Drähte so umgebogen, dass sie nicht das Weichgewebe berühren oder verletzen konnten. Anschließend wurde der gesamte Hybrid-Ringfixateur mit einer sterilen Mullbinde verbunden.

3.2.5 Spongiosaentnahme

Die Gewinnung der autologen Spongiosa vom linken Beckenkamm zur Präparation des Scaffolds erfolgte in der zweiten Gruppe zeitlich vor dem Eingriff an der Tibia. Ein 10 - 12 cm langer Hautschnitt wurde entlang des Beckenkamms gesetzt (21er Klinge, FEATHER SAFETY RAZOR Co., LTD, Osaka, Japan). Mit Hilfe eines Kauters wurde der Knochen von Unterhaut und Periost befreit und auftretende Blutungen gestillt. Der freigelegte Beckenkamm wurde mit Hammer und Meißel gefensterst (Abbildung 11) und ca. 3,8 ml Spongiosa mit einem scharfen Löffel nach Volkmann entnommen und in einem speziell dafür angefertigten Messzylinder (Ø 11 mm; Höhe 40 mm, Medizinisch Technische Labore der Charité) auf-

gefangen, der in seinem Durchmesser dem des hohlzylindrischen Scaffolds entsprach (Abbildung 12 A).

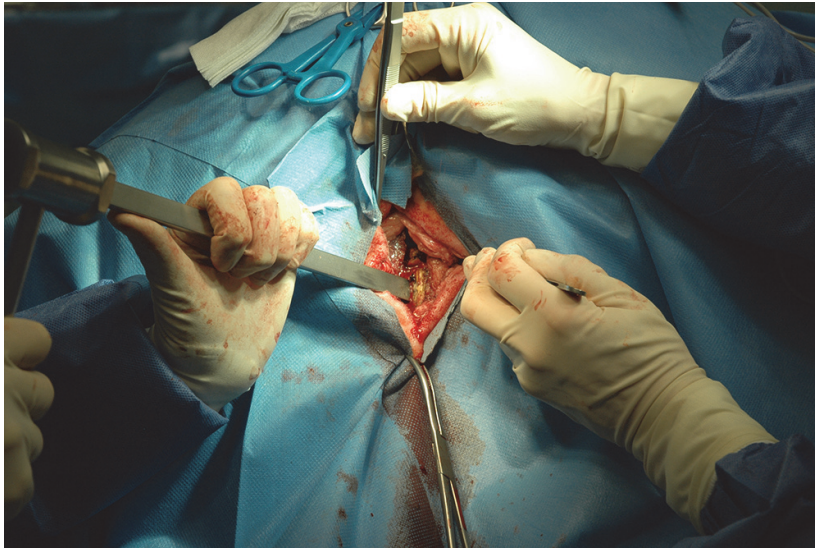


Abbildung 11: Fensterung des Beckenkamms mit Hammer und Meißel

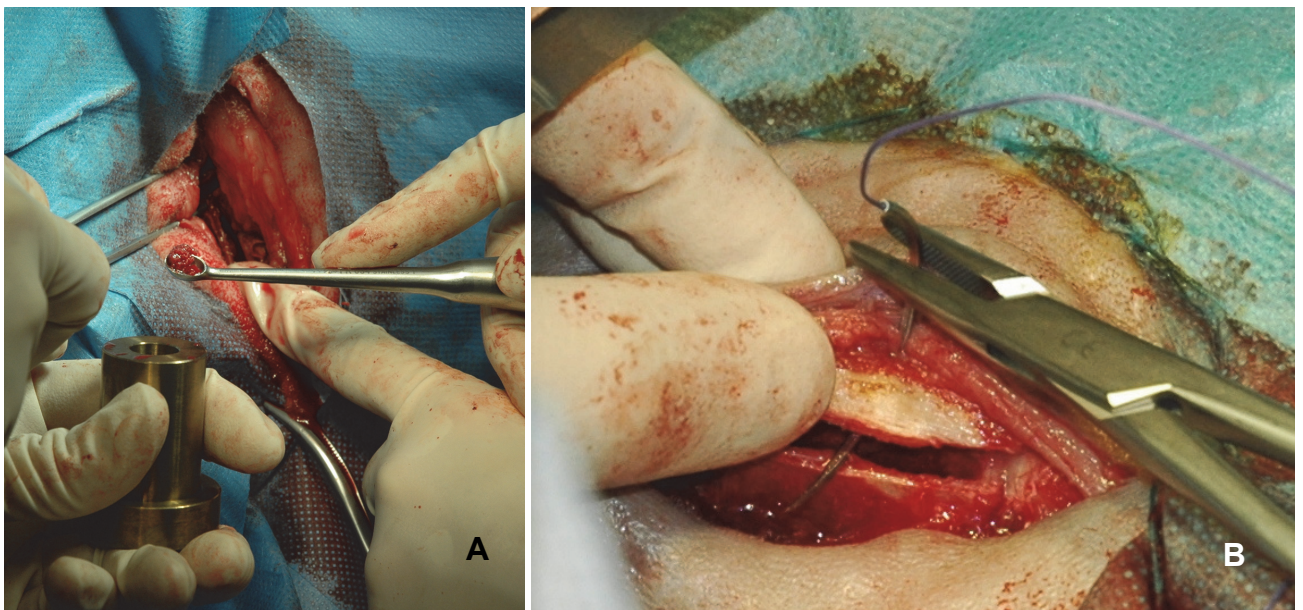


Abbildung 12: Spongiosaentnahme am trikortikal geöffneten Beckenkamm

Bild A: Entnahme von ca. 3,8 ml Spongiosa mit einem scharfen Löffel nach Volkmann, Bild B: Vernähen des aufgemeißelten trikortikalen Knochenstückes am Beckenkamm

Der aufgemeißelte, trikortikale Beckenkamm wurde mit Hilfe eines starken Fadens wieder adaptiert (1er Vicryl®-Faden, Ethicon, © Johnson & Johnson Medical GmbH, Norderstedt, Deutschland) (Abbildung 12 B). Der Verschluss der Unterhaut und Haut erfolgte entsprechend dem Eingriff an der Tibia.

3.3 Nachsorge

Nachdem die rechte Tibia steril verbunden war, wurden Röntgenaufnahmen in antero-posteriorem und im latero-medialen Strahlengang angefertigt. Diese dienten der Dokumentation des Operationsergebnisses und der Kontrolle der Scaffoldposition im Osteotomiespalt.

Sobald die Tiere selbstständig atmeten, wurden sie in den Stall zu ebenfalls operierten Schafen gebracht und erst dort bei stabiler Atmung extubiert und allein gelassen.

Als Schmerzmittel erhielten die Tiere jeden Tag 2,2 mg Flunixin Meglumine (Finadyne® RPS 83 mg/ml Injektionslösung, MSD Tiergesundheit, Intervet Deutschland GmbH, Unterschleißheim) je 50 kg Körpergewicht über die folgenden 7 Tage. Am dritten Tag post operationem wurde außerdem das Fentanyl-Pflaster (Durogesic® 75µg/h, JANSSEN-CILAG GmbH, 41457 Neuss, Deutschland) erneuert. Antibiotisch wurden die Tiere post operationem mit Penicillin G (Veracin-Compositum®, Benzyl-Penicillin-Procaïn und -Benzathin mit Streptomycin und Dihydrostreptomycin, Albrecht GmbH, Aulendorf) abgedeckt, bis die Fäden nach zehn Tagen gezogen werden konnten.

3.3.1 Pinpflege

Mit der Pinpflege wurde am Tag nach der Operation begonnen und diese jeden Tag durchgeführt. Die Tiere wurden für einen stressarmen Umgang mittels Krafffutter positiv auf die tägliche Untersuchung konditioniert und zeigten stets ein aufgeschlossenes Verhalten. Dabei wurde das Allgemeinbefinden, Futteraufnahme, Verhalten, Fortbewegung des Tieres und die Wunde beurteilt. Bei der Pin- und Wundpflege wurden die Schanz-Schrauben auf Lockerung und die Eintrittsstellen der Schrauben und Drähte auf Entzündungserscheinung wie Rötung, Wärme, Schmerzhaftigkeit und Sekretion untersucht. Die Beobachtungen wurden in einem Pinpflegeprotokoll dokumentiert.

Die Eintrittsstellen der Schrauben und Ilizarovdrähte sowie die Hautinzision über dem Osteotomiebereich wurden mit einer sterilen Pinzette von Exsudatkrusten befreit und mit in fünfprozentiger Ethacridinlactat-Lösung (Rivanol®, Dermapharm AG, Grünwald, Deutschland) getränkten Tupfern gereinigt (Abbildung 13 A). Der Hybrid-Ringfixateur wurde nach der Pinpflege erneut mit einer sterilen Mullkompressen umwickelt, sodass der gesamte Fixateur vor Verunreinigungen geschützt war (Abbildung 13 B). Zusätzlich wurde bei den Tieren der Gruppe 2 auch der Beckenkamm kontrolliert und gegebenenfalls gereinigt. Nach frühestens zehn Tagen konnten die Fäden gezogen werden.

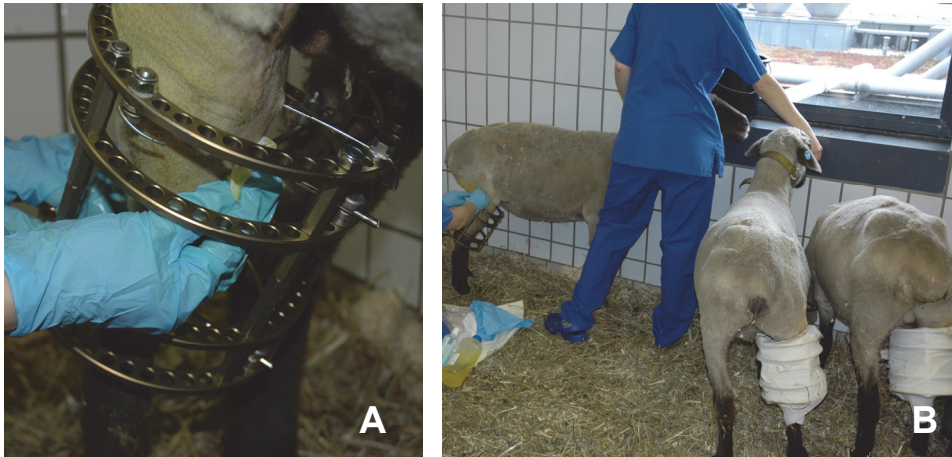


Abbildung 13: Pinpflege am unsedierten, stehenden Schaf

Bild A: Reinigung der Pineintrittsstellen, Bild B: Fixation und Beruhigung des zu behandelnden Schafes mittels Kraftfutter

3.3.2 Pinpflegeprotokoll

Das Pinpflegeprotokoll wurde geführt, um die Protokollierung zu vereinfachen und ein einheitliches Schema zur Dokumentation der Beobachtungen zu verwenden. Es diente später dem Vergleich der klinischen Ergebnisse mit den Befunden der Computertomographie und der Histologie. Dazu wurden die Pin- und Drahteintrittsstellen nach Entzündungserscheinungen beurteilt. Die Gliedmaße wurde auf Wärme, Rötung, Schmerzhaftigkeit und Umfangsvermehrung untersucht. Des Weiteren wurden die Menge und Qualität von austretendem Sekret, der betreffende Pin oder die Schraube und die Behandlung vermerkt.

3.3.3 Röntgenkontrollen

Die Röntgenkontrollen wurden direkt nach der Operation am noch narkotisierten Tier mit einem mobilen Röntgengerät (Mobilett Plus, Siemens AG, Deutschland) in zwei Ebenen vorgenommen. Die Röntgenverlaufskontrollen wurden alle vier Wochen durchgeführt. Nach der Probengewinnung 12 Wochen post OP wurden Aufnahmen in einem Röntgenschränk (Faxitron Bioptics, LLC, Arizona, USA) angefertigt.

3.4 Probengewinnung

3.4.1 Euthanasie und Probengewinnung

Nach einer Standzeit von 12 Wochen wurden die Tiere euthanasiert. Dazu wurde jedem Schaf über einen venösen Zugang 2,5 mg Thiopental-Natrium (Trapanal, Altana, Pharma Deutschland GmbH, Konstanz, Deutschland) für eine tiefe Anästhesie verabreicht. Nach Atemstillstand sowie Ausfall sämtlicher Reflexe am Auge wurden 100 ml 7,45-prozentige Kaliumchloridlösung intravenös bis zum Herzstillstand injiziert. Im Sektionsraum der Tierexperimentellen Einrichtung wurden die Proben gewonnen. Zur Entnahme der Tibia wurde das rechte Hinterbein enthäutet. Danach folgte die Eröffnung und Durchtrennung des Kniegelenks sowie des Tarsokruralgelenks. Die Muskelbäuche des Gastrocnemius wurden größtenteils entfernt, ein Teil verblieb jedoch als Schutz an der Tibia. Die Tibia wurde zunächst mit dem Hybrid-Ringfixateur entnommen und Röntgenaufnahmen im Faxitron (Bioptics, LLC, Arizona, USA) in zwei Ebenen angefertigt. Danach wurde die Osteotomieregion mit angrenzender Tibia aus dem Ringfixateur entnommen, indem proximal des zweiten Pins (proximal der Osteotomie) ein Sägeschnitt gesetzt wurde und distal des dritten Pins (distal der Osteotomie). Nach dieser Präparation wurden weitere, vergrößerte Röntgenaufnahmen im Faxitron in zwei Ebenen angefertigt. Die beiden Pins verblieben an der Probe, um ihr Stabilität zu geben, bis die radiographischen und computertomographischen Aufnahmen abgeschlossen waren.

3.4.2 Fixierung und Aufbereitung

Um die sofort einsetzende Autolyse aufzuhalten, wurden die Knochenproben nach der Entnahme für 4 Tage in isotoner 10%-Formaldehyd-Alkohol-Lösung (Zusammensetzung: 324 ml 34-prozentiges Formol, 540 ml 100-prozentiges Ethanol, 130 ml 0,1 molarer Barbitalnatrium-Puffer, pH 7,4 und 6g Glukose) fixiert. Die Lagerung erfolgte zur optimalen Benetzung der Proben in einem Plastikbehälter auf einem Schüttler (HS 501 digital, IKA Labor-technik, Staufen, Deutschland).

3.5 Radiologische Untersuchung der Proben

Die radiologischen Verlaufskontrollen fanden zu den Zeitpunkten 0, 4, 8 und 12 Wochen post operationem statt. Während der Standzeit wurden die Aufnahmen mit einem mobilen Röntgengerät (Mobilett Plus, Siemens AG, Deutschland) angefertigt. Dabei wurde je eine Aufnahme im antero-posteriorem sowie im latero-medialen Strahlengang mit 73 kV und 2,5 mA erstellt. Nach der Entnahme der Knochenproben erfolgten vier Aufnahmen in einem Röntgenschränk (Faxitron Bioptics, LLC, Arizona, USA), wovon jeweils zwei Aufnahmen mit und zwei vergrößerte Aufnahmen ohne Hybrid-Ringfixateur angefertigt wurden.

Es erfolgte die Beurteilung der Position des Scaffold im Osteotomiedefekt, die Kontrolle des bikortikalen Sitzes der Schanz-Schrauben, die Beurteilung radiologischer Anzeichen von Pinlysen und der Abrundung der Osteotomieanten. Des Weiteren wurde röntgendichte Verschattungen als Hinweis auf eine beginnende Mineralisation des Kallusgewebes im Osteotomiespalt bewertet.

3.6 Computertomographische Untersuchung der Proben

3.6.1 Aufbereitung

Für die computertomographische Messung wurden die Proben am vierten Tag nach der Entnahme aus der isotonen 10%-Formaldehyd-Alkohol-Lösung entnommen und 45 Minuten unter fließendem Leitungswasser gewässert. Anschließend wurden sie in Mullkompressen gewickelt, mit NaCl benetzt und in zwei Schichten Kunststoffolie zum Schutz vor Austrocknung verpackt.

3.6.2 Untersuchung im Computertomographen

Die Proben wurden zum einen in einem HR-pQCT (High-Resolution peripheral Quantitative CT, Xtreme CT, Scanco Medical AG, Brüttisellen, Switzerland) und zum anderen in einem Mikro-CT (vivaCT 40, SCANCO Medical, Brüttisellen, Switzerland) untersucht. Die Proben wurden stets gleichermaßen in dem jeweiligen Bett positioniert. Die proximale Tibia wurde proximal im Probenbett positioniert, die mediale Seite befand sich oben. Ein Übersichtsscan erfolgte zur weiteren Ausrichtung der Probe. Lagerungskorrekturen wurden vorgenommen, bis das Präparat so positioniert war, dass der Osteotomiespalt im Scanbereich lag und beide Kortikalisenden senkrecht zueinander standen.

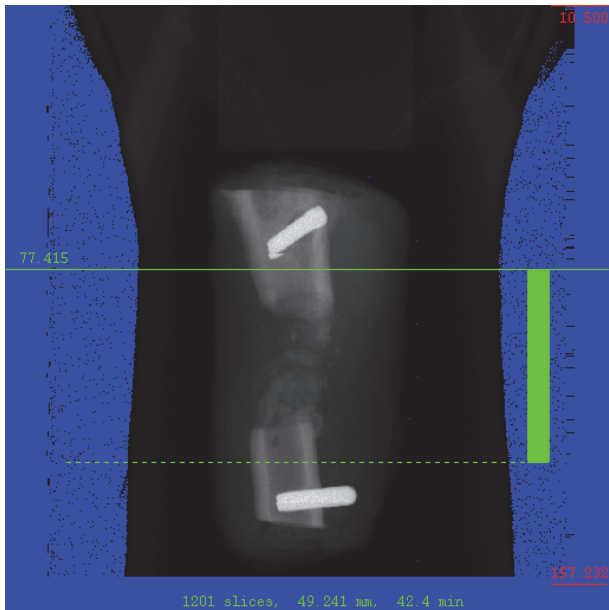


Abbildung 14: HR-pQCT-Übersichtsaufnahme der Probe
Die grüne Markierung grenzt das spätere Scanfeld ein.

3.6.3 Messungen im HR-pQCT

Im HR-pQCT wurden Aufnahmen mit 60 kVp und 900 μ A angefertigt. Vor jedem Scan wurde das HR-pQCT mit einem Knochendichtephantom kalibriert. Die entstandenen Bilder haben eine isotrope Auflösung von 41 μ m Voxelgröße. Hier war es möglich, die Proben über eine Gesamtstrecke von bis zu 7 cm, also den gesamten Osteotomiespalt und die angrenzende Kortikales, zu vermessen.

3.6.4 Messungen im Mikro-CT

Für die Untersuchung im Mikro-CT wurden zwei Teilbereiche am proximalen und distalen Randbereich des Osteotomiespalt vermessen, um den Übergang zwischen Kortikalis, Scaffold und Kallus in einer hohen Auflösung zu untersuchen. Im Mikro-CT wurden Aufnahmen mit einer Strahlendosis von 70 kVp und 110 μ A angefertigt. Die Bilder haben eine Auflösung von 19 μ m Voxelgröße. Aufgrund der Größe der Präparate und der damit verbundenen Datenmenge wurde lediglich der Übergang von Scaffold zur angrenzenden Kortikalis und dem knöchernen Kallus proximal und distal auf jeweils 12 mm analysiert. Da eine Abgrenzung des Scaffoldmaterials vom Knochengewebe sehr schwierig war, musste dies manuell im Computerprogramm festgelegt werden. Hierfür wurden die Schnittbilder einzeln betrachtet und dann kortikaler Knochen und das knöchernen Kallusgewebe markiert. Das Scaffoldmaterial wurde von der Analyse ausgeschlossen, um nur die Menge von neu gebildetem Knochenmaterial zu bestimmen.

Die Scans der beiden unterschiedlichen Computertomographen konnten anschließend mit demselben Computerprogramm von SCANCO (SCANCO Medical Viva CT 40, μ CT V 6.1,

Brüttisellen, Switzerland) ausgewertet und folgende fünf Parameter zur statistischen Auswertung herangezogen werden:

das Gesamtkallusvolumen	Total Volume (TV, mm ³)
das mineralisierte Kallusvolumen	Bone Volume (BV, mm ³)
die relative Knochendichte	Ratio of BV and TV (BV/TV)
die Knochenmineraldichte	Bone Mineral Density (BMD, mgHA/cm ³)
der Knochenmineralgehalt	Bone Mineral Content (BMC, mgHA) = (BV/1000) x BMD

Zur Darstellung und Analyse der Strukturen im Scanbereich wurden manuell auf jedem Schnittbild sogenannte „Global Objects“ eingezeichnet. Sämtliche Strukturen, die sich in diesem Bereich befanden, konnten anschließend analysiert und dargestellt werden (Abbildung 15). Um das neu gebildete knöcherne Kallusgewebe im Osteotomiedefekt zu analysieren, wurden zwei verschiedene „Global Objects“ eingezeichnet. Die Global Objects „Kallus“ und „Kortikalis“ wurden eingezeichnet, indem der Kallus gegen den Uhrzeigersinn und die Kortikalis im Uhrzeigersinn manuell umfahren wurden (Abbildung 16 A und 15 B). Durch die verschiedenen Zeichentechniken konnte das Computerprogramm das Global Object „Kortikalis“ vom Global Object „Kallus“ subtrahieren, sodass lediglich der neu gebildete Kallus in die Berechnung einging (Abbildung 16 C).

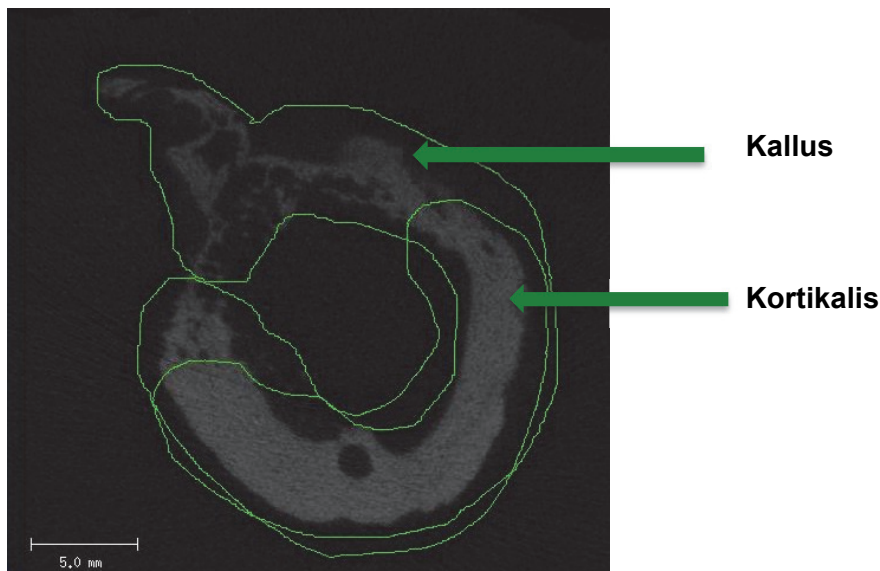


Abbildung 15: Einzelbild eines HR-pQCT-Scans

Zur Darstellung und Analyse der Strukturen im Scanbereich wurden auf jedem Schnittbild sogenannte „Global Objects“ eingezeichnet. Dabei wurden die Global Objects für „Kallus“ und „Kortikalis“ einzeln eingezeichnet.

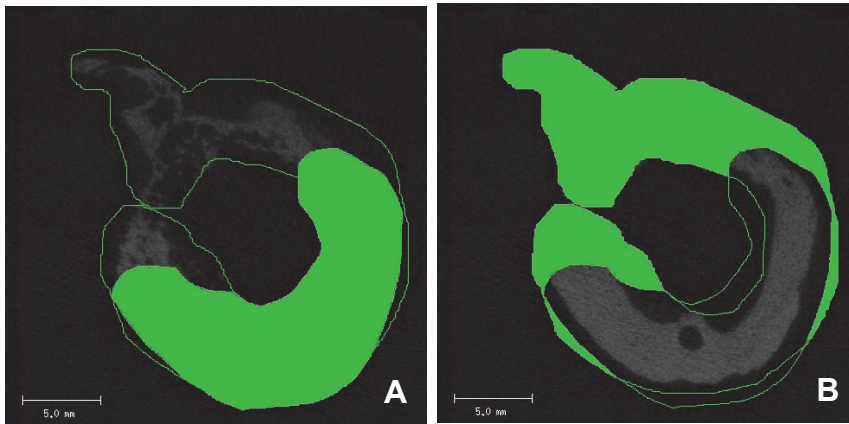


Abbildung 16: Einteilung von Global Objects

Bild A: Das Global Object „Kortikalis“ wurde eingezeichnet indem die Kortikalis im Uhrzeigersinn umfahren wurde (hier grün aufgefüllt); Bild B: Das Global Object „Kallus“ wurde eingezeichnet indem der Kallus gegen der Uhrzeigersinn umfahren wurde. Anschließend wurde die „Kortikalis“ vom „Kallus“ substrahiert. Dadurch konnte der Bereich mit neu gebildetem Knochen berechnet werden (hier grün aufgefüllt).

Festlegung der VOI in der HR-pQCT-Auswertung

Zwischen den HR-pQCT-Aufnahmen schwankte die Anzahl der Slices zwischen 929 - 1369, da der Scanbereich stets manuell gesetzt wurde. Zur Festlegung des *Volume of Interest* (Volumen von Interesse, VOI) wurde die Osteotomiedefektgröße von 40 mm herangezogen, die 976 Slices entsprach (ein Slice war 41 μm breit). Die jeweiligen Slices mit eröffneter Kortikalis proximal und distal wurden identifiziert. Aus der Strecke zwischen diesen beiden Slices wurde der Mittelpunkt errechnet. Ausgehend von diesem Mittelpunkt wurden 488 Slices nach proximal und 488 Slices nach distal abgezählt und so das VOI vom Mittelpunkt des Osteotomiedefektes ausgerichtet. Durch diese Methode wurde bei allen Präparaten ein gleich großes VOI evaluiert. Proximal und distal des Osteotomiedefektes konnten Slices mit bereits geschlossener Kortikalis in das VOI eingehen, da die Kortikalis manuell von der Berechnung ausgeschlossen wurde, war dies jedoch unerheblich für die Evaluation, in die lediglich knöchernes Kallusgewebes miteinbezogen wurde.

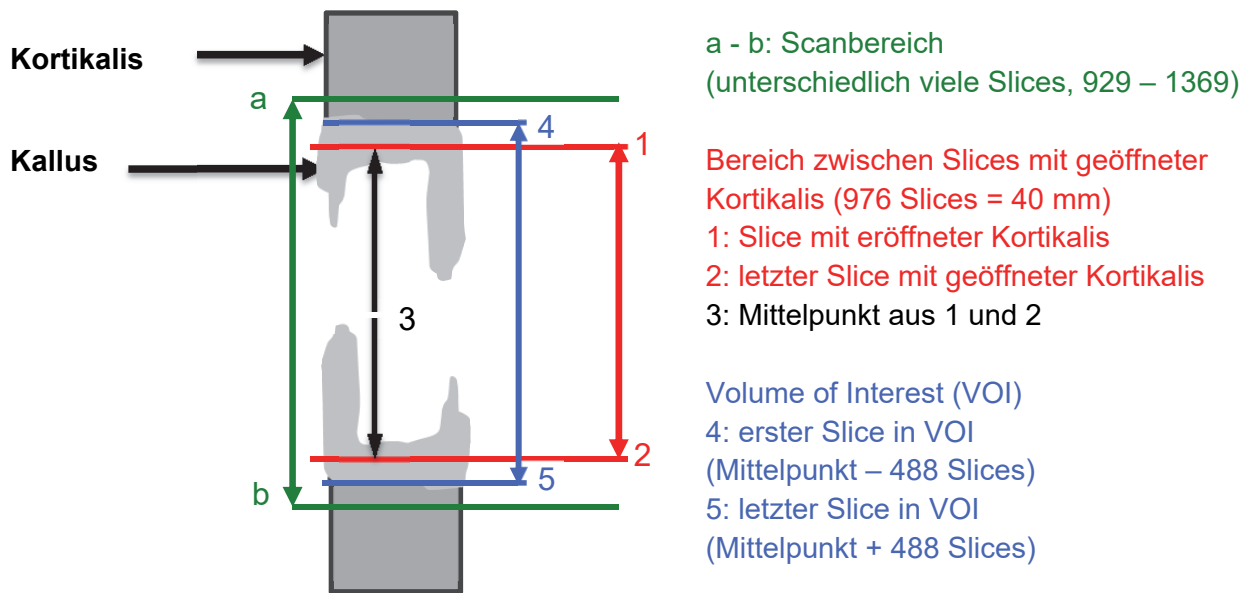


Abbildung 17: VOI-Festlegung in den HR-pQCT-Aufnahmen

Zur Festlegung des VOI wurde die Osteotomiedefektgröße von 40 mm (976 Slices) herangezogen. Die jeweiligen Slices mit eröffneter Kortikalis proximal und distal wurden identifiziert und aus der Strecke zwischen diesen beiden Slices der Mittelpunkt errechnet. Ausgehend von diesem Mittelpunkt wurden 488 Slices nach proximal und 488 Slices nach distal abgezählt und so das VOI vom Mittelpunkt des Osteotomiedefektes ausgerichtet.

Festlegung der VOI in der Mikro-CT-Auswertung

Im Mikro-CT wurden je Probe jeweils der proximale und distale Übergang vom Scaffold zur Kortikalis auf einer Länge von 12,67 mm gescannt. Beide Scans umfassten 667 Slices, wobei ein Slice jeweils 19 µm Schichtdicke entsprach.

Um innerhalb des gescannten Bereiches bei allen Proben stets ein standardisiertes VOI auszuwerten, wurde ein fester Start- und Endpunkt des VOI für alle Proben gewählt. Als fester Startpunkt des VOI wurde der Slice mit der ersten Öffnung der Kortikalis gewählt (Abbildung 18).

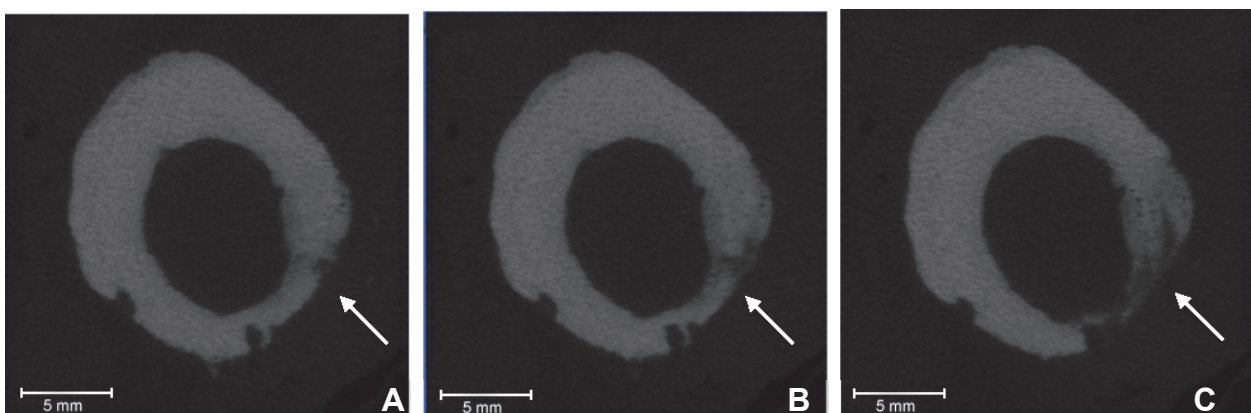


Abbildung 18: Kortikalisöffnung im Verlauf

Pfeil: Bereich, in dem sich die Kortikalis zuerst öffnet, Bild A: Slice noch geschlossen, Bild B: Slice mit erster Kortikalisöffnung, Bild C: voranschreitende Kortikalisöffnung

Ab diesem Slice wurden 369 Slices hin zum Osteotomiedefekt ausgewertet, da dies die kleinste Anzahl an Slices war, die bei allen 12 Tieren mit dem Scan aufgenommen worden war. So wurde ein Standard-VOI von 7 mm (369 slices; 1 Slice ist 19 µm breit) evaluiert wie in Abbildung 19 dargestellt.

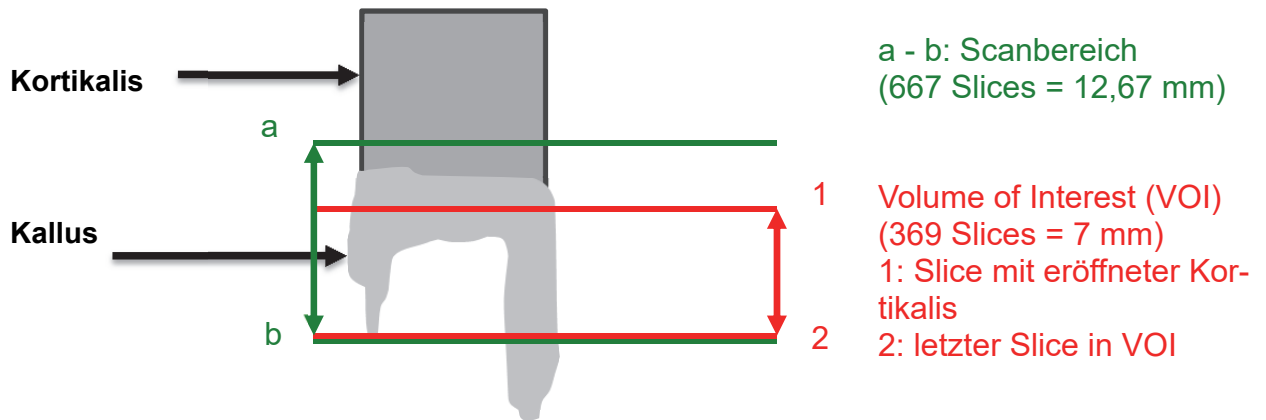


Abbildung 19: VOI-Festlegung in Mikro-CT-Aufnahmen

Es wurde ein fester Start- und Endpunkt des VOI für alle Proben gewählt, um innerhalb des gescannten Bereiches bei allen Proben stets ein standardisiertes VOI auszuwerten. Als fester Startpunkt des VOI wurde der erste Slice mit Öffnung der Kortikalis gewählt und dann die bei allen Präparaten vorhandene Strecke von 369 Slices in den Osteotomiedefekt ausgewertet. Bei allen 12 Tieren wurde eine dadurch ein Standard-VOI von 7 mm evaluiert.

Festlegung des Threshold

Für die quantitative Auswertung der CT-Daten wandelt der Computer die grauen Voxel der Aufnahme in schwarze und weiße Voxel um. Dabei sollen die mineralisierten, knöchernen Kallusanteile als solche erkannt werden und weiß erscheinen. Dies geschieht je nach Festlegung eines Schwellenwertes (Threshold) (Abbildung 20 A-B).

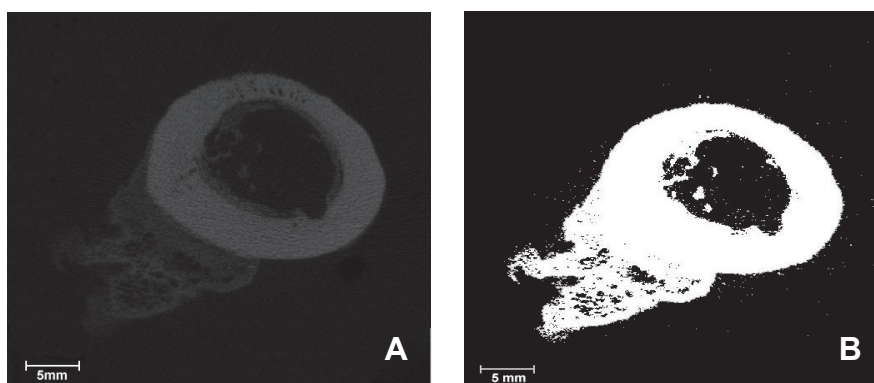


Abbildung 20: Darstellung eines Slice mit Threshold-Einstellung

Bild A: Graustufenbild eines Slice

Bild B: Abbildung mit Threshold-Einstellung (99)

In dieser Studie wurde der Threshold für die beiden CT-Typen in zwei verschiedenen und für diese Auswertung programmierten MATLAB-Skripten (Software: MATLAB, The Mathworks, Inc., Natick, USA, Skript im Anhang 9.2.1 und 9.2.2) errechnet.

Dazu wurde zunächst in allen CT-Aufnahmen ein Global Object in 20 Slices mit vollständiger Kortikalis ohne Kallus eingezeichnet. Daraus wurde dann je Aufnahme ein Histogramm erstellt, indem die Häufigkeitsverteilung der metrisch skalierten Merkmale der CT-Aufnahme graphisch in einer Tabelle dargestellt wurden (Abbildung 21 B). Mit Hilfe des MATLAB-Skripts wurden aus den Histogramm Daten folgende Werte berechnet: Background Peak, Bonepeak, Minimum Peak und 1/3 Bonepeak (Abbildung 21 A-B). Der Background Peak im Histogramm gibt den Volumenwert der Hintergrundvoxel (Voxel ohne Daten) in der Aufnahme an. Der Minimum Peak gibt den kleinsten Wert mineralisierten Gewebes im Histogramms wider, der Bone Peak gibt den Wert mit dem größten Volumen bei einer gewissen Dichte an Hydroxidapatit an und der Ein-Drittel-Bone-Peak ist der errechnete Ein-Drittel-Wert aus dem Bone Peak (Morgan et al. 2009; Bouxsein et al. 2010; Razi et al. 2015).

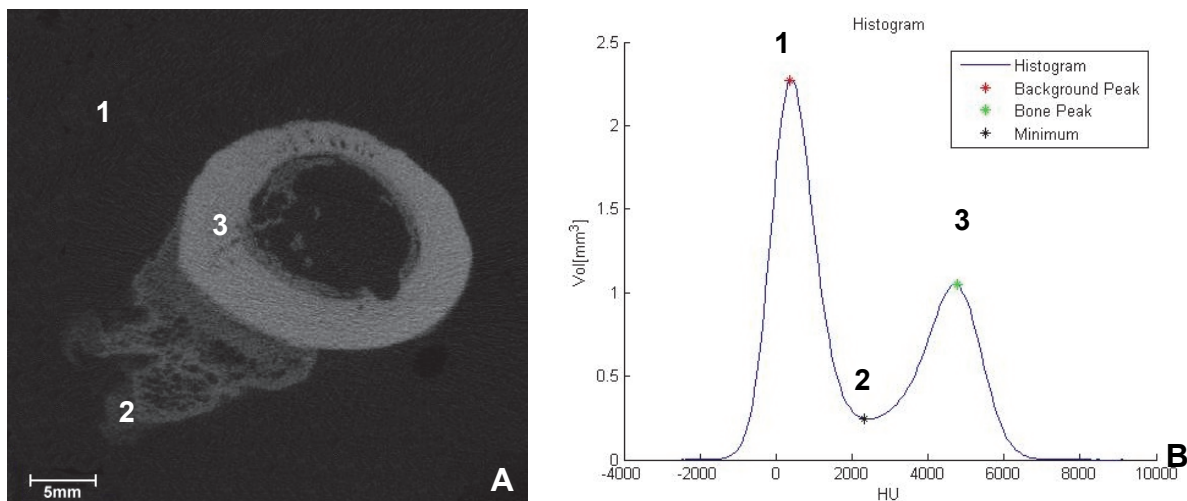


Abbildung 21: Darstellung der Messbereiche zur Thresholdbestimmung

Bild A: Mikro-CT-Aufnahme, Bild B: korrespondierendes Histogramm

1: Background Peak - Hintergrund, 2: Minimum Peak - Minimum, 3: Bone Peak – kortikaler Knochen

Anschließend wurde der ‚Ein-Drittel-Bone-Peak-Wert‘ zur weiteren Berechnung des Threshold verwendet. Je nach verwendetem CT unterscheidet sich die weitere Berechnung, weil die Messparameter in den CTs unterschiedlich sind.

Rechnung für Mikro-CT-Daten:

Aus der HEADER INFO der jeweiligen Aufnahme kann man die Werte der Density Slope (Steigung), Density Intercept (Korrektur des Steigungswertes) und μ -Scaling entnehmen.

$$\text{attenuation}_{\text{intact}} = (1/3 \text{ Bonepeak}) \times 8/1000$$

$$\text{HADensity}_{\text{intact}} = (\text{slope} \times \text{attenuation}_{\text{intact}}) - \text{intercept}$$

$$\text{HADensity}_{\text{callus}} = \text{HADensity}_{\text{intact}} / 2$$

$$\text{attenuation}_{\text{callus}} = (\text{HADensity}_{\text{callus}} - \text{intercept}) / \text{slope}$$

$$\text{threshold}_{\text{callus}} = 1000 \times (\text{attenuation}_{\text{callus}} / 8)$$

Rechnung für HR-pQCT-Daten:

Auch hier kann man aus der HEADER INFO der jeweiligen Aufnahme die Werte der Density Slope, Density Intercept und μ -Scaling entnehmen. Diese sind bei jedoch allen HR-pQCT-Aufnahmen gleich. Density Slope: 1434,66 Density Intercept: -356,5 μ -Scaling: 8192

$$\text{attenuation}_{\text{intact}} = (1/3 \text{ Bonepeak}) \times 4/1000$$

$$\text{HADensity}_{\text{intact}} = (\text{slope} \times \text{attenuation}_{\text{intact}}) - \text{intercept}$$

$$\text{HADensity}_{\text{callus}} = \text{HADensity}_{\text{intact}} / 2$$

$$\text{attenuation}_{\text{callus}} = (\text{HADensity}_{\text{callus}} - \text{intercept}) / \text{slope}$$

$$\text{threshold}_{\text{callus}} = 1000 \times (\text{attenuation}_{\text{callus}} / 4)$$

Der errechnete Wert hat die Einheit Hounsfield Unit (HU) und kann im PC-Programm von SCANCO auch in HU eingestellt werden. Als praktikabler hat sich die Einstellung des Threshold in (1/1000) erwiesen; daher muss hierfür die Umrechnung von HU in 1/1000 beachtet werden.

Für die Mikro-CT-Auswertung wurde ein globaler Threshold von 186 (1/1000) (entspricht 157 HU oder 532 mgHA/cm³) errechnet und für alle Berechnungen verwendet. Für die HR-pQCT-Auswertung wurde ein globaler Threshold von 99 (1/1000) (entspricht 606 HU oder 206 mgHA/cm³) errechnet und für alle Berechnungen verwendet.

Nachdem das „Volume of Interest“ (VOI) und der Threshold festgelegt waren, wurden die Global Objects „Kortikalis“ und „Kallus“ übereinander gelegt und gespeichert. Anschließend wurde ein Skript des PC-Programms SCANCO Medical zur Berechnung der gewünschten Parameter und der errechnete Threshold eingestellt und die Berechnung im PC durchgeführt (Abbildung 22).

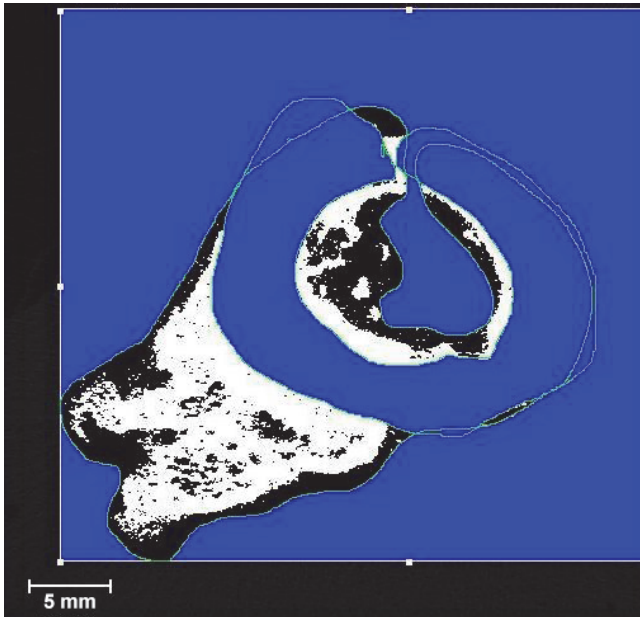


Abbildung 22: VOI und Thresholdeinstellung

Darstellung des errechneten Kallusgewebes in einem Slice eines Mikro-CT-Scans. Die in weiß dargestellten Bereiche zeigen das mineralisierte Kallusgewebe an. Die Bereiche der Kortikalis und der Umgebung, die nicht in die Berechnung eingehen sind hier blau dargestellt.

3.7 Präparataufbereitung für die histologische Auswertung

3.7.1 Sägen der Knochenproben

Fünf Tage nach der Probengewinnung wurden die Sägearbeiten zur Gewinnung der histologischen Präparate durchgeführt. Um eine thermische Schädigung der Knochenproben zu verhindern, erfolgten die Sägearbeiten mit einer wassergekühlten Säge (Makrotrennschleifsystem, Exakt Apparatebau GmbH, Norderstedt, Deutschland). Die Proben wurden mit dem distalen Tibiaende in der Einspannvorrichtung fixiert. Die Sägeebene wurde so gewählt, dass der Markraum der proximalen und distalen Tibia eröffnet war und zentral der Scaffold lokalisiert war.

Zunächst wurde der proximale Pin abgesetzt, indem senkrecht zur Längsachse der Tibia am proximalen Ende der Probe ein Sägeschnitt gesetzt wurde. Dann wurde der Knochen so eingespannt, dass die Markhöhle in mediolateraler Schnittebene mit einem zweiten Schnitt parallel zur Längsachse der Tibia halbiert wurde (Abbildung 23). Aufgrund der kritischen Defektstrecke, dem weichen Scaffoldmaterial und der nach zwölf Wochen noch unvollständigen Defektheilung war das Gewebe im Osteotomiedefekt trotz ausreichender Fixierung sehr weich und ließ sich daher schwer sägen. Um repräsentative Schnitte zu erhalten, wurde die Tibia daher nach den ersten fünf Präparaten nur noch einmal durch die Längsachse zersägt. Bei fünf Tieren der ersten Gruppe wurden ausgehend von der Mitte ein dritter und vierter Sägeschnitt im Abstand von drei Millimetern in medialer und lateraler Richtung vorgenommen (Abbildung 24). Zuletzt wurde die Probe am proximalen Ende eingespannt und ein letzter Sägeschnitt senkrecht zur Tibia-längsachse gesetzt, um den verbliebenen Pin am distalen Probenende abzusetzen. Dieser Schnitt trennte die zuvor ausgeführten Längsschnitte vom restlichen Knochen.

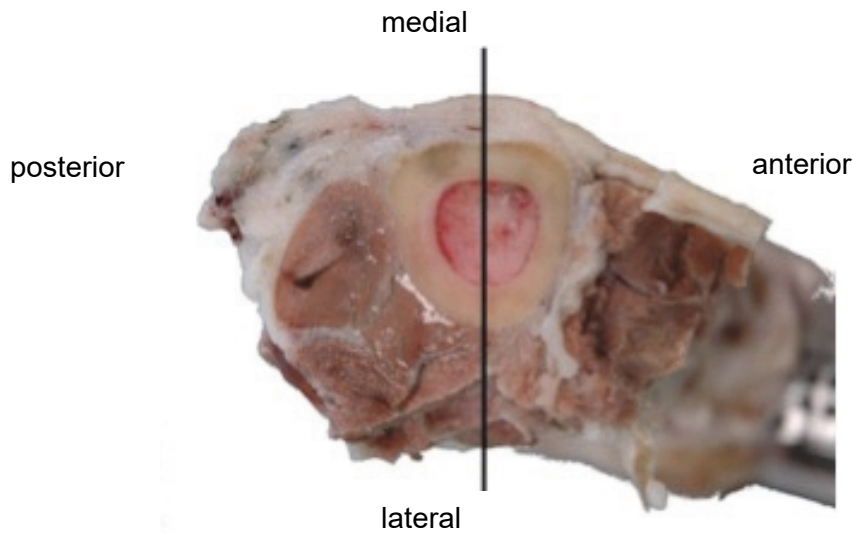


Abbildung 23: Sägeschema, Ansicht von proximal

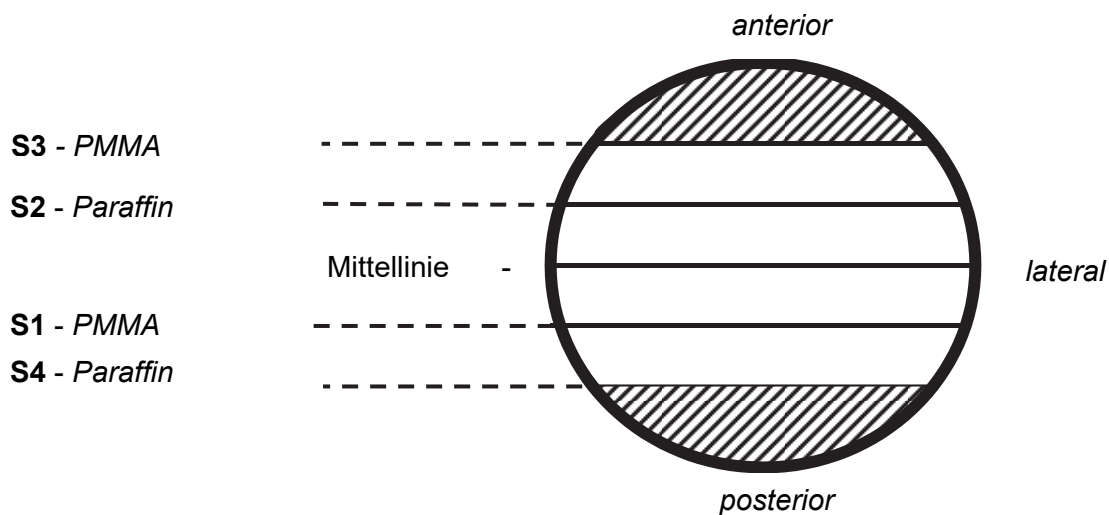


Abbildung 24: Sägeschema für vier Schnitte

Die Abbildung zeigt das Sägeschema nach dem fünf Proben bearbeitet wurden. Dabei wurde die Probe zunächst mittig durchgesägt und anschließend ausgehend von der Mitte ein dritter und vierter Sägeschnitt im Abstand von drei Millimetern in medialer und lateraler Richtung vorgenommen. Bezeichnung für die Sägeschnitte: S1-4, diese wurden abwechselnd, in die Aufbereitungsverfahren für die Kunststoffhistologie (PMMA) und die Paraffinhistologie gegeben. Sieben Proben wurden nur noch in zwei Blöcke geteilt, mit S1 und S2 bezeichnet und in die zwei Aufbereitungsverfahren gegeben.

Die gewonnenen Scheiben (Hälften) wurden für eine spätere Lokalisationszuordnung mit einem Bleistiftpunkt proximo-medial gekennzeichnet und anschließend in Mull verpackt und mit S1 und S2 (S3 und S4, wenn 4 Scheiben gesägt wurden) gekennzeichnet (Abbildung 24).

Die Schnitte wurden anschließend in die beiden Aufbereitungsverfahren der Kunststoff- oder Paraffinhistologie gegeben. Der Block S1 ging dabei in die Kunststoffhistologie und S2 war für die Paraffinhistologie bestimmt (S3 für die Kunststoff- und S4 die Paraffineinbettung).

3.7.2 Aufbereitung für die Kunststoffeinbettung

Die für die Kunststoffhistologie vorgesehenen Sägeschnitte wurden in aufsteigender Alkoholreihe entwässert (Tabelle 1).

Tabelle 1: Entwässerungsschema

Konzentration Ethanol in %	Zeit	Lagerungstemperatur
70	3 Tage	Raumtemperatur
80	7 Tage	Raumtemperatur
96	7 Tage	Raumtemperatur
100	7 Tage	Raumtemperatur
100	7 Tage	Raumtemperatur
100	7 Tage	Raumtemperatur

Die Verdünnungsstufen des Alkohols wurden aus 100-prozentigem Alkohol (Ethanol 100 Vol.-%, denaturiert mit Ethylmethylketon, Herbata-Arzneimittel, Berlin) hergestellt, indem zu diesem eine entsprechende Menge Aqua destillata hinzugegeben wurde. Der Wechsel des Alkohols erfolgte nach dem vorgegebenen Schema.

Die Präparate wurden mit reichlich Alkohol bedeckt in luftdicht schließenden Gläsern gelagert. Um eine optimale Infiltration der Knochenscheiben mit dem jeweiligen Alkohol zu erzielen, standen die Proben während der gesamten Entwässerung auf einem Laborschüttler (HS 501 digital, IKA® Werke GmbH & Co. KG, Staufen, Deutschland).

Kunststoffeinbettung

Zur Einbettung der Proben wurde unter anderem Technovit® (Technovit® 9100 NEU, Kaltpolymerisierender Kunststoff, Heraeus Kulzer GmbH, Wehrheim, Deutschland) verwendet. Dabei handelt es sich um ein spezielles Medium zur Einbettung von mineralisiertem Gewebe. Technovit® 9100 ist ein Kunststoffeinbettssystem auf Basis von Methylmethacrylat, bei dem die Polymerisation unter Sauerstoffabschluss mit Hilfe eines Katalysatorsystems aus Peroxid und Amin erfolgt. Um die komplette Durchtränkung der Präparate mit dem Kunststoff zu erreichen, wurden die Präparate vor der eigentlichen Einbettung mit einer Präinfiltrationslösung und einer Infiltrationslösung vorbereitet.

Nach der Entwässerung wurden die Präparate zur Entfettung zunächst für vier Stunden bei Raumtemperatur in Xylol (J.T. Baker, Griesheim, Deutschland) gegeben. Anschließend wurden die Proben für 24 Stunden in eine Präinfiltrationslösung gegeben und bei 4°C gelagert.

Zur Herstellung der Präinfiltrationslösung wurden 200 ml Basislösung (Technovit® 9100 NEU, Kaltpolymerisierender Kunststoff, Heraeus Kulzer GmbH, Wehrheim, Deutschland) mittels einer Aluminiumoxid-Ionenaustauschersäule (Aluminiumoxid 90 aktiv neutral, Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland) entstabilisiert. Auf dem Rührer wurde der Basislösung anschließend 1 g Härter 1 (Technovit® Härter 1 NEU, Dibenzylperoxid, Heraeus Kulzer GmbH, Wehrheim, Deutschland) hinzugegeben und ca. zwei Stunden bis zum Erhalt einer homogenen Lösung gemischt.

Nach der Präinfiltration wurden die Präparate für 14 Tage in eine Infiltrationslösung gegeben und bei 4°C gelagert. Nach sieben Tagen erfolgte ein Wechsel dieser Lösung. Zur Herstellung der Infiltrationslösung wurden 400 ml entstabilisierte Basislösung (Technovit® 9100 NEU, Kaltpolymerisierender Kunststoff, Heraeus Kulzer GmbH, Wehrheim, Deutschland) mit 40 g Polymethylmethacrylat-Pulver (PMMA; Technovit® 9100 NEU, Heraeus Kulzer GmbH, Wehrheim, Deutschland) auf dem Rührer ca. drei Stunden vermischt. Im Anschluss wurden noch zwei g Härter 1 (Technovit®, Dibenzylperoxide, Heraeus Kulzer GmbH, Wehrheim, Deutschland) hinzugegeben und nachdem die Flüssigkeit homogen erschien, wurde mit entstabilisierter Basislösung auf 500 ml aufgefüllt. 250 ml dieser Infiltrationslösung wurden in Falcon-Röhrchen bei -18°C eingefroren und dann beim Wechsel der Infiltrationslösung nach sieben Tagen verwendet.

Nach der Infiltration erfolgte die eigentliche Einbettung in Methylmethacrylat (Technovit® 9100 NEU, Heraeus Kulzer GmbH, Wehrheim, Deutschland). Dazu wurden Stammlösung A und B angesetzt und im Verhältnis 9 : 1 gemischt. Zur Herstellung von 500 ml Stammlösung A wurden 500 ml entstabilisierte Basislösung (Technovit® 9100 NEU, Kaltpolymerisierender Kunststoff, Heraeus Kulzer GmbH, Wehrheim, Deutschland) mit 80 g PMMA-Pulver (Technovit® 9100 NEU, Heraeus Kulzer GmbH, Wehrheim, Deutschland) verrührt und anschließend 3 g Härter 1 (Technovit® Härter 1 NEU, Dibenzylperoxid, Heraeus Kulzer GmbH, Wehrheim, Deutschland) hinzugegeben (Tabelle 2). Zur Herstellung der Stammlösung B wurden aus 50 ml entstabilisierter Basislösung mit vier ml Härter 2 (Technovit® Härter 2 NEU, Tetramethylanilin, Heraeus Kulzer GmbH, Wehrheim, Deutschland) und 2 ml Regler (Technovit® Regler NEU, Decanthiol, Heraeus Kulzer GmbH, Wehrheim, Deutschland) vermischt (Tabelle 2). Die Stammlösungen A und B wurden erst kurz vor der Einbettung im Verhältnis 9 : 1 vermischt und ca. 200 - 250 ml auf jedes Präparat gegeben. Die Präparate wurden einzeln, mit der später zu schneidenden Seite nach unten, in Gläser positioniert. Diese Gläser waren schon Tage zuvor mit einem lichthärtenden Einkomponentenkleber (Technovit® 7230, Heraeus Kulzer GmbH, Wehrheim, Deutschland) 5 mm dick ausgegossen worden,

um eine glatte Bodenplatte im Glas zu schaffen und der Bildung von Luftblasen an der Schnittfläche während der folgenden Einbettung in PMMA vorzubeugen.

Anschließend wurden die Probengläser, um Luftblasen aus der Probe und der PMMA-Lösung zu entfernen, zehn Minuten zum Ziehen eines Vakuums in einen Exsikkator (Exsikkator mit Hahn, Innendurchmesser 300 mm) gestellt. Um eine optimale Polymerisierung des Kunststoffes zu gewährleisten, wurden die Probengläser in einem Kühlschrank bei -4°C gelagert. Der Polymerisationsprozess war nach 48 Stunden abgeschlossen und die Präparate ausgehärtet. Eine Nachhärtung erfolgte für einen weiteren Tag unter dem Abzug. Nach der Aushärtung des Plastiks wurde das Glas um den Kunststoffblock zerschlagen und entfernt. Am Rand der Probe überstehender Kunststoff wurde mit Hilfe der Bandsäge (Makrotrennschleifsystem, Exakt Apparatebau GmbH, Norderstedt, Deutschland), der Tischschleifmaschine (Metaserve 250 Grinder Polisher, BUEHLER GmbH, Düsseldorf, Deutschland) sowie grobem Schleifpapier Größe 80 (BUEHLER GmbH, Düsseldorf, Deutschland) entfernt. Die zu schneidende Seite des Präparates wurde bis auf das Gewebe runter geschliffen. Die so vorbereiteten Proben wurden dann mit einem weiteren, schnellhärtenden Kunststoff (Technovit® 3040, Kaltpolymerisierender Kunststoff, Heraeus Kulzer GmbH, Wehrheim, Deutschland) erhöht und erneut zurechtgeschliffen, um einen festen Halt in der Einspannvorrichtung des Mikrotoms zu gewährleisten.

Tabelle 2: Übersicht zur Zusammensetzung der Gebrauchslösungen

Bezeichnung	Basislösung	PMMA-Pulver	Härter 1	Härter 2	Polymerisationsregler	Lagerfähigkeit
Präinfiltration	200 ml		1 g			½ Jahr bei -20°C
Infiltration	ad 500 ml	40 g	2 g			½ Jahr bei -20°C
Stammlösung A	ad 500 ml	80 g	3 g			½ Jahr bei -20°C
Stammlösung B	ad 50 ml			4 ml	2 ml	½ Jahr bei -20°C
Polymerisationsgemisch	Stammlösung A und B im Verhältnis 9 : 1					

Schneiden am Mikrotom

Die durchgeführte Kunststoffeinfettung ermöglicht es, nichtentkalktes Gewebe am Mikrotom zu schneiden und anschließend eine Differenzierung von mineralisiertem und nicht mineralisiertem Gewebe anhand der verschiedenen Färbungen vorzunehmen.

Der hergestellte Kunststoffblock wurde in das Hartschnittmikrotom (Leica® SM 2500M, Leica Mikrosysteme Vertrieb GmbH, Wetzlar, Deutschland) eingespannt und mittels Hartmetallmesser (Messerwinkel 40°, Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Deutschland) wurden Longitudinalschnitte mit einer Schnittdicke von 6 µm angefertigt.

Während des Schneidens wurden die Präparatblöcke und das Messer mit einer Schneidflüssigkeit aus Alkohol und Triton-X-5%-Lösung (Triton X-100, SIGMA ALDRICH CHEMIE

GmbH, Steinheim, Deutschland) benetzt, um die Oberfläche geschmeidig zu halten und ein Reißen der Schnitte zu verhindern.

Die Schnitte wurden auf Poly-L-Lysin beschichtete und mit 70-prozentigem Alkohol (Ethanol 100 Vol.-%, denaturiert mit Ethylenmethylketon, Herbeta-Arzneimittel, Berlin, Deutschland) benetzte Objektträger aufgebracht, anschließend mit einer Streckflüssigkeit (sechs Teile 70-prozentiger Alkohol, vier Teile Butoxyethylacetat) benetzt, wodurch sie sich glätteten, danach möglichst luftblasenfrei mit einer Polyethylen-Schutzfolie (Krisolfolie, Kettenbach. GmbH & Co. KG, Eschenburg, Deutschland) abgedeckt und mit einer Handwalze auf den Objektträger gepresst. Im Anschluss daran wurde ein Filterpapier auf jeden Objektträger gelegt und diese übereinander in einer Objektträgerpresse bis zur Trocknung 24 Stunden bei 60°C im Brutschrank (Heraeus® Function Line, Hanau, Deutschland) gelagert, um die sichere Haftung des Gewebes am Objektträger für die sich anschließenden Färbung zu gewährleisten.

3.7.3 Histologische Färbungen der Gewebeschnitte der Kunststoffeinfettung

Um Strukturen im histologischen Schnitt besser darstellen zu können, werden histologische Färbungen verwendet. Diese färben je nach chemischer Zusammensetzung unterschiedliche Zellbestandteile an, erhöhen den Kontrast von Zell- und Gewebestrukturen und ermöglichen so eine differenzierte Auswertung der Präparate. Von den in Kunststoff eingebetteten und geschnittenen Präparaten wurden von jedem Tier jeweils eine Movat-Pentachrom-, eine Safranin-Orange/von-Kossa- und eine Masson-Goldner-Färbung angefertigt.

Movat-Pentachrom-Färbung

Die Movat-Pentachrom-Färbung wurde sowohl zur histomorphometrischen als auch für die histomorphologische Auswertung herangezogen.

Bei dieser Färbung handelt es sich um eine farbenprächtige, sehr fein differenzierende Färbung, bei der mineralisiertes Knochengewebe und nicht mineralisierter Knorpel unterschieden werden können. Des Weiteren können alle Komponenten des Bindegewebes sowie elastische Fasern unterschieden werden. Mineralisiertes Knochengewebe und Kollagen färben sich leuchtend gelb an. Nicht mineralisierter Knorpel färbt sich blau-grün und mineralisierter Knorpel gelb. Osteoid stellt sich in dieser Färbung dunkelrot und elastische Fasern rot dar. Bindegewebe färbt sich blau und grün, Zellkerne stellen sich blauschwarz dar und das Zytoplasma wird rötlich angefärbt. (Färbeprotokoll siehe Anhang Tabelle 16)

Safranin-Orange/von-Kossa-Färbung

Die Safranin-Orange/von-Kossa-Färbung wurde für die deskriptive Histologie verwendet. Sie ermöglicht eine klare Differenzierung von mineralisiertem und nicht mineralisiertem Gewebe. Mineralisiertes Knochen- und Knorpelgewebe färbt sich schwarz, Mineralisationsfronten stel-

len sich schwarz granuliert dar und Bindegewebe, hyaliner Knorpel, nicht mineralisierter Knochen sowie Muskulatur werden unterschiedlich intensiv rot gefärbt. (Färbeprotokoll siehe Anhang Tabelle 17)

Trichromfärbung nach Masson-Goldner

Diese Färbung wurde für die histomorphologische Auswertung zur differenzierten Betrachtung der Zellen im Bindegewebe und Knochen herangezogen.

In dieser Färbung stellen sich Zellkerne braun-schwarz dar. Zytoplasma färbt sich ziegelrot und Erythrozyten orange-gelb. Bindegewebe und saure Mukosubstanzen färben sich blassgrün, wohingegen mineralisierter Knochen sich leuchtend grün darstellt. Unverkalktes Osteoid färbt sich rot an. (Färbeprotokoll siehe Anhang Tabelle 18)

3.7.4 Aufbereitung für die Paraffineinbettung

Die für die Paraffinhistologie vorgesehenen Sägeschnitte wurden in EDTA-Entkalkungslösung (Ethyldiamintetraessigsäure, Herbeta-Arzneimittel, Berlin, Deutschland) gegeben. Dies war nötig, um bestimmte Antigene über die immunhistochemischen Färbungen sichtbar machen zu können. EDTA ist ein sechs-zahniger Chelator (Komplexbildner), der an seinen freien Bindungsstellen eine Verbindung mit Kalziumionen eingeht und diese so dem Knochen entzieht. Die Schafsknochen benötigten 8-12 Wochen bei 37°C im Brutschrank bis zur vollständigen Entkalkung. Dabei wurde zweimal wöchentlich die EDTA-Lösung gewechselt. Anschließend folgte die Wässerung der Präparate für 40 Minuten unter fließendem Wasser. Im Anschluss daran wurden die in Mull verpackten Präparate in den Entwässerungsautomaten gegeben (Leica TP 1020, Leica Mikrosysteme GmbH, Wetzlar, Deutschland). Die Entwässerung verlief nach dem in Tabelle 3 dargestellten Schema.

Tabelle 3: Entwässerungsschema des Automaten

Medium	Stunden
70% Alkohol	8
80% Alkohol	5
80% Alkohol	4
96% Alkohol	8
96% Alkohol	10
100% Alkohol	3 x 10
Xylol	1,5
Xylol	1,5
Paraffin	2 x 2
Gesamt	72

Paraffineinbettung

Die Präparate wurden aus dem Automaten entnommen und im Brutschrank in ein Kännchen mit flüssigem Paraffin gegeben, um nacheinander in Paraffinblöcke gegossen zu werden.

Die Präparate wurden aus dem Mull entnommen, mit der Schnittfläche nach unten in eine ihrer Größe angepassten Metallgussform platziert, die auf einer Kühlplatte (Leica EG 1130, Leica Mikrosysteme Vertrieb GmbH, Wetzlar, Deutschland) vorgekühlt wurde und dann mit flüssigem Paraffin (Paraplast Plus Tissue Embedding Medium, Tyco Healthcare, Mansfield, USA) übergossen. Zur Aushärtung verblieben die Paraffinblöcke noch einige Minuten in der Gussform auf der Kühlplatte. Nach dem Erkalten des Paraffins konnte die Gussform entfernt werden.

Schneiden am Mikrotom

Da Paraffin bei Wärme weich wird und sich ausdehnt und dies zu einer reduzierten Schneidfähigkeit der Präparate führt, wurden die Paraffinblöcke zunächst in einem Tiefkühlschrank bei -18°C durchgefroren und anschließend auf einer Kühlplatte (MEDITE COP 30 Cooling Plate, Burgdorf, Deutschland) gekühlt.

Danach wurden die Blöcke in das Rotationsmikroskop (RM 2055, Leica Mikrosysteme Vertrieb GmbH, Wetzlar, Deutschland) eingespannt und 5 µm dünne Serienschnitte hergestellt. Diese Schnitte wurden dann in ein kaltes und anschließend in ein warmes (45°C) Wasserbad (Leica HI 1210, Leica Mikrosysteme Vertrieb GmbH, Wetzlar, Deutschland) überführt und danach auf silanisierte Objektträger (MARIENFELD 70x50x1mm HistoBond®, Paul Marienfeld GmbH & Co. KG, Lauda-Königshofen, Deutschland) aufgezogen. Anschließend wurden die Objektträger in Schiffchen gestellt, um für 24 Stunden im Brutschrank bei 37°C zu trocknen.

3.7.5 Immunhistochemische Färbungen der Gewebeschnitte der Paraffineinbettung

Prinzip der immunhistochemischen Färbung

Bei immunhistochemischen Färbungen werden bestimmte Antigene in Zell- und Gewebestrukturen mittels antikörpergekoppelter Farbstoffe visualisiert. Man macht sich die Bildung von Antigen-Antikörper-Komplexen zunutze, die dann durch Farbereaktionen sichtbar gemacht werden. Dabei werden direkte und indirekte Färbungen unterschieden. Bei der direkten Färbung ist der Antikörper mit einem Marker gekoppelt, wohingegen bei der indirekten Färbung ein sekundärer Antikörper mit dem Marker gekoppelt ist, der wiederum gegen das Fc-Fragment des Primärantikörpers angesetzt wird.

Um gesuchte Antigene (Ag) in einem Gewebe sichtbar zu machen, werden unkonjugierte Primärantikörper (Primär-Ak) auf die Gewebeschnitte gegeben. Diese richten sich dann gegen das gesuchte Antigen (Ag) und markieren es. Im nächsten Schritt werden die so gebildeten Antigen-Antikörper-Komplexe durch die Zugabe von biotinyliertem (mit Biotin markiertem) Sekundär-Antikörper (Sekundär-Ak), der sich gegen die Primär-Antikörper richtet, detektiert. Der Sekundär-Ak (Biotinylated Anti-mouse IgG made in Horse, Dako Denmark A/S, Glostrup, Denmark) muss dabei immer gegen die Immunglobuline der Tierspezies gerichtet sein, aus der auch der Primär-Ak (Monoclonal mouse Anti human smooth muscle actin Clone 14A, Dako, Dänemark) stammt. Das Normalserum (Horse-Normal-Serum, Dako Denmark A/S, Glostrup, Denmark) stammt wiederum stets aus der Tierart, in der auch die Sekundär-Ak produziert werden.

Die gesuchten Antigene wurden im Rahmen dieser Arbeit durch die indirekte Avidin-Biotin-Methode (ABC-Methode) sichtbar gemacht (Abbildung 25). Hierbei werden aus Avidin (Protein, aus Hühnereierweiß gewonnen) und Biotin (Vitamin H), das mit der alkalischen Phosphatase gekoppelt ist, große dreidimensionale Komplexe gebildet, die über freie Bindungsstellen des Avidins an Biotin-Gruppen des Sekundärantikörpers binden können. Die Gefahr von Auswaschungen während der weiteren Färbeschritte wird durch die große Bindungskraft dieses Komplexes stark verringert.

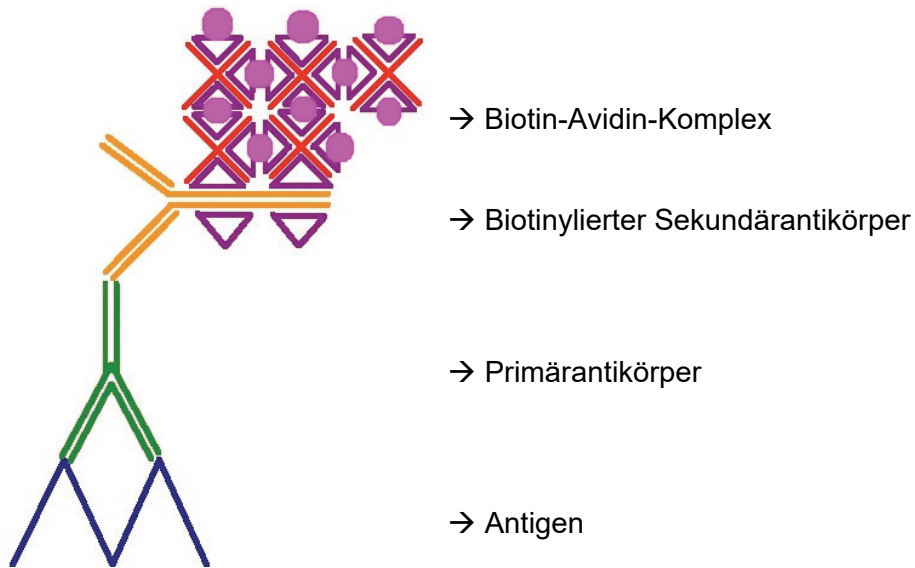


Abbildung 25: ABC-Methode: Der Avidin-Biotin-Komplex reagiert mit dem biotinylierten Antikörper (Abbildung in Anlehnung an Thomas Boenisch „Handbuch Immunologischer Färbemethoden“, 3. Auflage, 2003)

Es werden je gebundenem Primärantikörper viele Enzymmoleküle am Gewebeschnitt gekoppelt (Signalverstärkung) und können dann über das Enzym Alkalische Phosphatase visualisiert werden. Dazu wird auf die mit Primär- und Sekundär-Ak benetzten Gewebeschnitte zunächst ein Chromogenpuffer gegeben, welcher dann für den optimalen pH-Wert zur Katalyse der Enzymreaktion sorgt. Anschließend wird das Substrat (Alkaline-Phosphatase-Substrate-Kit I, Sk-5100, Vector Laboratoires, Inc. Burlingame, Canada) hinzugegeben, das dann vom Enzym reduziert wird und sich rot färbt. Diese Farbreaktion macht das Antigen im Gewebe sichtbar und kann so quantitativ und qualitativ bestimmt werden. Eine unspezifische Hintergrundfärbung wird durch die Inkubation mit 1-prozentigem Normalserum so weit wie möglich unterdrückt.

Im Anschluss an die immunhistochemische Färbung wird zur besseren Differenzierung des umliegenden Gewebes eine Gegenfärbung mit Hämatoxylin nach Mayer vorgenommen.

Alpha-smooth-muscle-actin-Färbung (α -sma)

Zur Darstellung der glatten Muskulatur der Gefäße wurde im Rahmen dieser Arbeit die α -sma (α -smooth muscle actin)-Färbung (Biologon, Kronshagen, Deutschland; Vektor[®] Laboratories, Burlingame USA) verwendet. Die detektierten Gefäße stellten sich hier rot dar. Um die Antigene bestmöglich darzustellen, wurde die optimale Konzentration des zu verwendenden Antikörpers in einem Vorversuch ermittelt. In diesem Fall betrug die Konzentration 1:100. Der Primär-Ak wurde dazu mit einem Puffer (Dako Cytomation Antibody Diluent, Dako Cytomation, Via Real, USA) verdünnt.

Als Negativkontrolle diente ein Gewebeschnitt, der nicht mit dem Primärantikörper inkubiert wurde. Die Herstellung der Gebrauchslösungen erfolgte nach Herstellerangaben.

3.7.6 Histochemische Färbung

TRAP-Färbung

Die TRAP-Färbung (Sigma Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland) wurde zur Identifizierung von Osteoklasten herangezogen. Hierbei wird die für diese Zellen typische Tartrat-resistente-saure-Phosphatase (tartrat-resistant-acid-phosphatase, TRAP) rot angefärbt. Allerdings wird dabei das Enzym indirekt nachgewiesen, indem TRAP Phosphat von einer phosphorierten Naphtholverbindung abspaltet. Das freie Naphthol kann dann Diazoniumsalz binden und damit einen roten Farbstoff bilden.

Das Enzym wird von ausgereiften, aktiven Osteoklasten gebildet. Allerdings ist es nicht spezifisch für Osteoklasten, es werden auch andere phagozytierende Zellen wie z. B. Makrophagen und Riesenzellen angefärbt.

Die Quantifizierung der Osteoklasten erfolgte daher nicht nur aufgrund des positiven Färbergebnisses, sondern auch anhand ihrer Lokalisation am Knochen und ihrer Mehrkernigkeit (mindestens zwei Zellkerne). Als Riesenzellen wurden Zellen mit positivem Färbergebnis und mindestens zwei Kernen identifiziert, die vornehmlich im Scaffold vorkamen und die keinen Kontakt zu knöchernem Gewebe hatten.

3.7.7 Histologische Färbung der Gewebeschnitte der Paraffineinbettung

Movat-Pentachrom-Färbung

Auch von den in Paraffin eingebetteten Präparaten wurden Schnitte in der Movat-Pentachrom-Färbung angefertigt. Diese wurden ebenfalls histomorphometrisch untersucht. Die hier gemessene Kallusfläche diente als Bezugsfläche zur Berechnung der in der TRAP-Färbung gezählten „Osteoklastendichte im Kallus“.

3.8 Auswertung der Gewebeschnitte

3.8.1 Digitalisierung der Gewebeschnitte

Die gefärbten Gewebeschnitte wurden stets auf die gleiche Art mittels Mikroskop (Axioskop 40 Carl Zeiss MicroImaging GmbH, Göttingen, Deutschland) und dem Computerprogramm AxioVision (Carl Zeiss MicroImaging GmbH, Göttingen, Deutschland) digitalisiert. Die Bilder wurden immer so aufgenommen, dass sich die proximale Kortikalis links im Bild befand. Außerdem wurde an dieser Stelle immer ein Maßstabbalken eingefügt. Im Fotobearbeitungsprogramm Adobe Photoshop 7 (Adobe Systems GmbH, München, Deutschland) erfolgte die Verkleinerung der Bilder auf eine Breite von 2500 Pixel sowie ggf. eine Drehung und horizontale Ausrichtung des Bildes.

3.8.2 Definition der Region of Interest

Im Rahmen der histomorphometrischen Auswertung war die Festlegung einer Region of Interest (ROI, Region von Interesse) wichtig, um alle Präparate einheitlich und standardisiert auszuwerten. Die untersuchten Parameter wurden so in einem definierten, immer konstanten Feld des Gesamtschnittes analysiert. Die Festlegung der ROI sowie die qualitative und quantitative Messung der Gewebearten im Osteotomiedefekt erfolgte mit der Auswertungssoftware KS Run (KS Run 400 Version 3.0, Carl Zeiss Vision GmbH, Aalen, Deutschland).

Grundlage für die Festlegung der ROI war der Osteotomiedefekt. Zunächst wurde das Bild mittels Maßstabbalken geeicht (Abbildung 26). Die laterale Seite war gut durch die neben dem Scaffold befindliche Muskulatur identifizierbar. Die mediale Seite war immer frei von Muskulatur. Danach wurden die Kortikales im Präparat markiert (Abbildung 27) und im Anschluss der höchste und niedrigste Punkt im Bild, also der medialste und lateralste Punkt im Präparat, gekennzeichnet (Abbildung 28, blauer Pfeil). Im nächsten Schritt wurden die periostalen Grenzen der proximalen und distalen Kortikalis markiert (Abbildung 28). Anschließend berechnete das Programm KS Run (KS Run 400 Version 3.0, Carl Zeiss Vision GmbH, Aalen, Deutschland) ein Rechteck, dessen Länge in Anlehnung an die Festlegung des HR-pQCT-VOI auch 40 mm entsprach und dessen Breite sich aus den medialen und lateralen Grenzen ergab. Durch die Halbierung der Gesamt-ROI ergaben sich dann die proximalen und distalen Anteile der ROIs (Abbildung 29). Als Grenze zwischen peri- und endostal wurde der äußere Kortikalisrand definiert, da in einigen Präparaten der Markraum nicht angeschnitten war. Durch die Festlegung der Grenze von endostal zu periostal ergaben sich die entsprechenden Teil-ROIs, sodass am Ende der Berechnung die Werte für folgende ROIs ausgegeben wurden: Gesamt-ROI, Proximale Endostale ROI, Proximale Periostale ROI, Distale Endostale ROI und Distale Periostale ROI (Abbildung 30). Aus den Teil-ROIs ließen sich anschließend noch die Werte für die Proximale ROI und die Distale ROI berechnen.

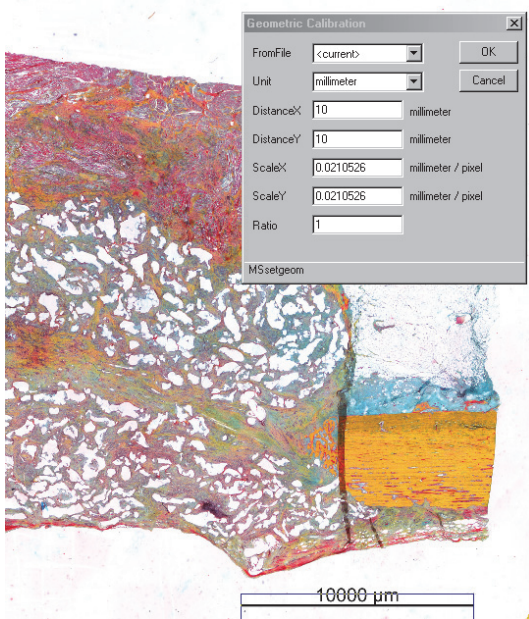


Abbildung 26: Kalibrierung mittels Maßstabbalken

Grundlage für die Festlegung der ROI war der Osteotomiedefekt. Zunächst wurde das Bild mittels Maßstabbalken geeicht.

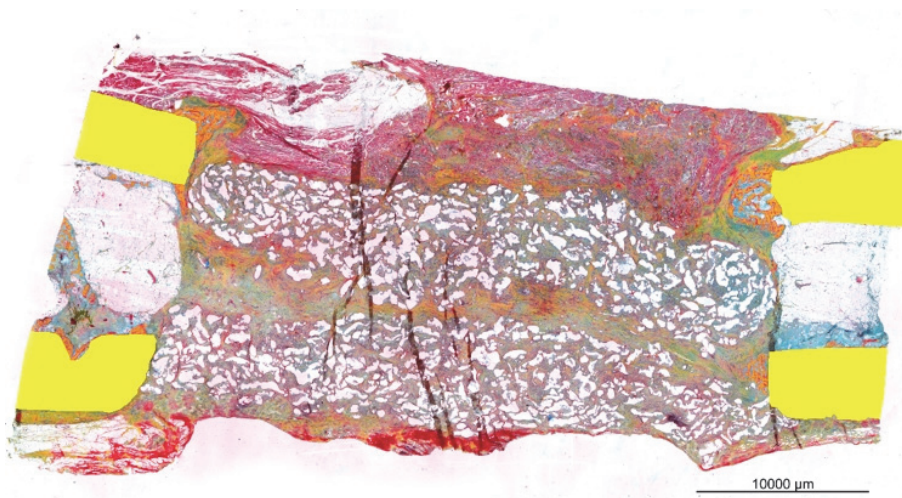


Abbildung 27: Markierung der Kortikales

Die Kortikalisanteile wurden markiert (gelb).

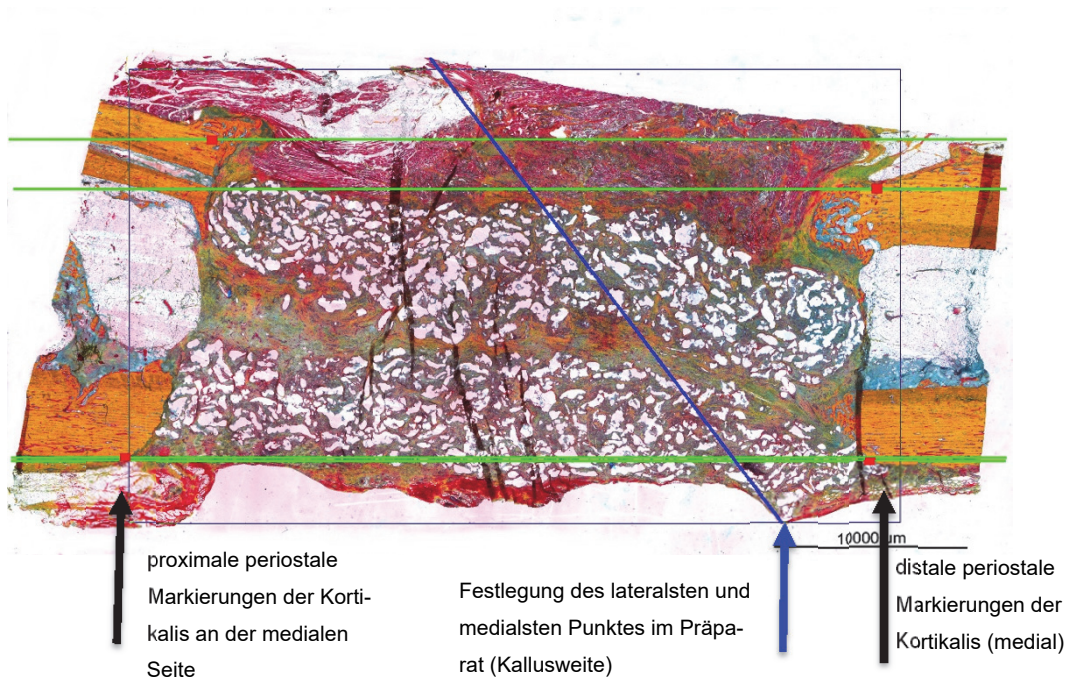


Abbildung 28: Markierung der Kortikalisgrenzen und der Breite des Präparates

Anschließend wurden der höchste und niedrigste Punkt im Bild (blauer Pfeil) markiert. Danach folgte die Festlegung der periostalen Grenzen der proximalen und distalen Kortikalis markiert (schwarze Pfeile).

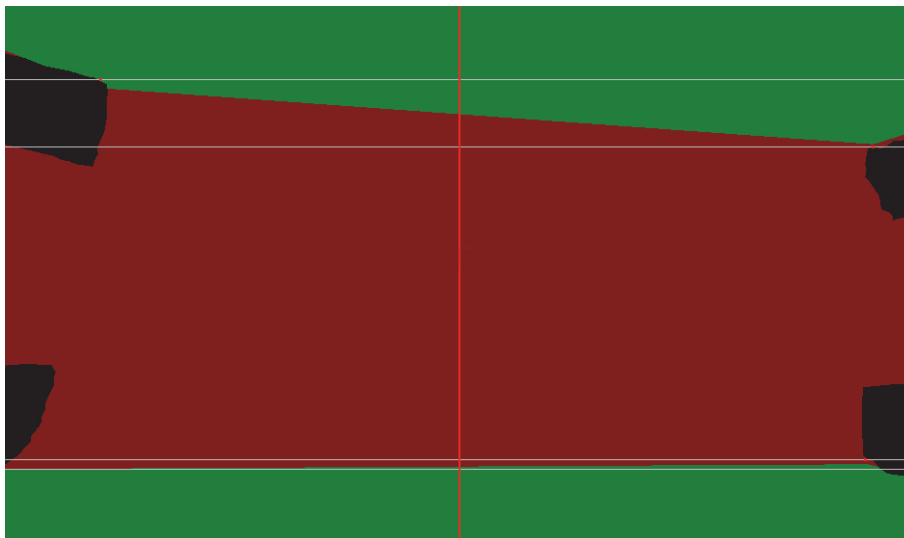


Abbildung 29: Berechnung der Teil-ROIs der Software aus den vorher markierten Grenzen

Die zuvor markierte Kortikalis erscheint hier schwarz. Das Programm KS Run berechnete anhand der Vorgaben ein Rechteck, dessen Länge in Anlehnung an die Festlegung der HR-pQCT-ROI auch 40 mm entsprach und dessen Breite sich aus den festgelegten medialen und lateralen Grenzen ergab. Durch die Halbierung der Gesamt-ROI ergaben sich die proximalen und distalen Anteile der ROIs. Als Grenze zwischen peri- und endostal wurde der äußere Kortikalisrand definiert, da in einigen Präparaten der Markraum nicht angeschnitten war. Durch die Festlegung der Grenze von endostal zu periostal ergaben sich die entsprechenden Teil-ROIs.

Rot: Endostale ROI, Grün: Periostale ROI, der vertikale rote Strich halbiert die Gesamt- und Teil-ROIs in links: proximal und rechts: distal

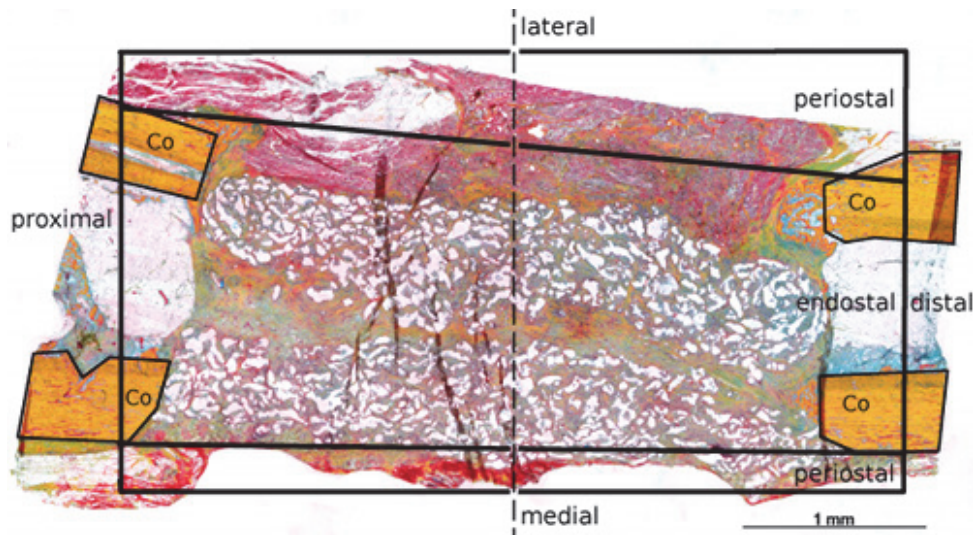


Abbildung 30: Definierte ROI und Teil-ROIs

Grundlage für die Festlegung der ROI war der Osteotomiedefekt. Die laterale Seite war gut durch die neben dem Scaffold befindliche Muskulatur identifizierbar. Aus den zuvor definierten periostalen Grenzen der proximalen und distalen Kortikalis (Co: Kortikalis) berechnete das Programm KS Run ein Rechteck, dessen Länge in Anlehnung an die Festlegung der HR-pQCT-ROI 40 mm entsprach und dessen Breite sich aus den medialen und lateralen Grenzen ergab.

3.8.3 Histomorphometrische Auswertung der Präparate

Für die histomorphometrische Auswertung der Präparate wurden die zwölf Movat-Pentachrom gefärbten Gewebeschnitte aus der Kunststoffeinfassung verwendet. Sie wurden wie in 3.8.2 "Definition der Region of Interest" beschrieben, in den verschiedenen ROIs mit Hilfe der Computersoftware KS Run ausgewertet. Das Programm KS Run 400 war in der Lage, vorher definierte, gleiche Farbpixel zu vermessen und dann als Flächen auszugeben. Diese Farbmarkierungen des Computers konnten auch noch manuell korrigiert und angepasst werden.

So konnten die folgenden Parameter sowohl für die Gesamt-ROI als auch die Teil-ROIs ausgewertet werden:

- Total Area - Gesamtfläche (mm²)
- Cortical Area - Kortikalisfläche (mm²)
- Bone Area - Knochenfläche (mm²)
- Connective Tissue Area - Bindegewebsfläche (mm²)
- Scaffold Area - Scaffoldfläche (mm²)
- Cartilage Area - Knorpelfläche (mm²)
- Muscle Area - Muskelfläche (mm²)

Zur besseren Vergleichbarkeit wurden die absoluten Werte der Flächenangaben in prozentuale Werte umgerechnet, bezogen auf die zugrundeliegende Fläche der ROI und zur statistischen Auswertung herangezogen.

3.8.4 Deskriptive Analyse der histologischen Präparate

Für die Beschreibung der Defektheilung wurde jedes Präparat in fünf verschiedenen Färbungen analysiert. Bei den zur deskriptiven Analyse herangezogenen Präparate handelte es sich um PMMA-Blöcke, die in der Movat-Pentachrom-Färbung, der kombinierten Safranin-Orange/von-Kossa-Färbung, der Trichromfärbung nach Masson und Goldner gefärbt waren und um Paraffinblöcke, die in der TRAP- und der α -sma-Färbung angefärbt waren. Die Gewebeschnitte wurden unter dem Mikroskop (Axioskop 40, Carl Zeiss MicroImaging GmbH, Göttingen, Deutschland) bei aufsteigender Vergrößerung durchgemustert.

Die histologische Analyse erfolgte nach einem einheitlichen Schema. Dazu wurde das Bild so positioniert, dass die proximale Kortikalis stets links und die distale Kortikalis rechts im Bild lagen. Dabei wurde auf die Gewebezusammensetzung und -verteilung im Osteotomiebereich geachtet. Danach wurde die Position des Scaffold im Osteotomiedefekt beurteilt sowie Menge und Ausmaß der Kallusbildung beurteilt. Dabei handelte es sich um eine starke Kallusbildung, wenn der Osteotomiebereich mit Geflechtknochen überbrückt war, um eine mittelstarke, wenn sich ein Kallusausläufer gebildet hatte, der in den Osteotomiedefekt hineinragte und um eine geringe Kallusbildung, wenn sich nur wenig Kallus am Rand der Kortikalis bildete. Auch die Abrundung der Kortikales, die Stärke ihrer Auflockerung und das Vorkommen von Osteoklasten wurden bewertet. Ein Prolaps der angrenzenden Muskulatur in den Osteotomiespalt sowie Zeichen einer Entzündung, charakterisiert durch lokale Anhäufung von Gefäßen und Entzündungszellen, wurden ebenfalls bewertet.

Durch die kritische Größe der Osteotomiedefektstrecke, der weichen Scaffoldkonsistenz und einer unvollständigen knöchernen Überbrückung über den Heilungszeitraum gestaltete sich ein zentraler Anschnitt beider Markräume mit zentral gelegenem Scaffold in einer Sägeebene bei einzelnen PMMA- und Paraffinblöcken schwierig. Daher war bei fünf Tieren (davon betroffen drei Paraffin- und zwei PMMA-Schnitte) der Markraum zentral nicht angeschnitten, sodass sich die Kortikalis als ein breites Rechteck darstellte. Die Schnitte wurden im Ganzen betrachtet, eine Einteilung in Teil-ROIs wurde, anders als in der histomorphometrischen Auswertung, nicht vorgenommen. Die Grenze zwischen endostal und periostal wurde aber wie in der histomorphometrischen Auswertung an der Außenkante der Kortikalis definiert (Abbildung 30).

3.8.5 Gefäßzählung

Die Gefäßdichte wurde bestimmt, um den Umfang der Vaskularisierung des Scaffolds und die Gewebeversorgung einschätzen zu können. Zur Bestimmung der Gefäßzahl in den immunhistochemisch gefärbten Schnitten, wurden die Präparate mit Hilfe eines Mikroskops (Axioskop 40, Carl Zeiss MicroImaging GmbH, Göttingen, Deutschland) und der Computersoftware AxioVision (Carl Zeiss MicroImaging GmbH, Göttingen, Deutschland) ausgewertet. Zunächst wurden fünf Gesichtsfelder in drei Bereichen des Osteotomiedefektes im Scaffold bestimmt, in denen die Gefäße ausgezählt wurden. Es wurden fünf Gesichtsfelder im proximalen, im zentralen Teil sowie im proximalen und distalen Anteil des Scaffold ausgezählt und die Dichte bestimmt (Abbildung 31). Die proximalen und distalen Gesichtsfelder waren dabei immer fünf mm von der Osteotomiegrenze entfernt. Die Gesichtsfelder wurden mit AxioVision digitalisiert, die Gefäße ausgezählt und die Bindegewebsflächen bestimmt. Als Einschlusskriterium mussten sich die Gefäße α -sma positiv anfärben und ein Lumen aufweisen (Abbildung 32). Im Anschluss wurde die Anzahl (n) der Gefäße pro Scaffoldabschnitt bestimmt (proximal, zentral oder distal im Scaffold) und durch die Gesamtbindegewebsfläche des proximalen, zentralen oder distalen Bereiches im Scaffold dividiert, die mit Hilfe des PC-Programms AxioVision (Carl Zeiss MicroImaging GmbH, Göttingen, Deutschland) bestimmt wurde. Bei einem Tier der ersten Gruppe war in der zentralen ROI kein Scaffold im Schnitt zur Auszählung vorhanden, sodass dieser Bereich bei diesem Tiere nicht in die Auswertung eingehen konnte.

$$\text{Gefäßdichte (n/mm}^2\text{)} = \text{Anzahl Gefäße (n)} / \text{Bindegewebsfläche (mm}^2\text{)}$$

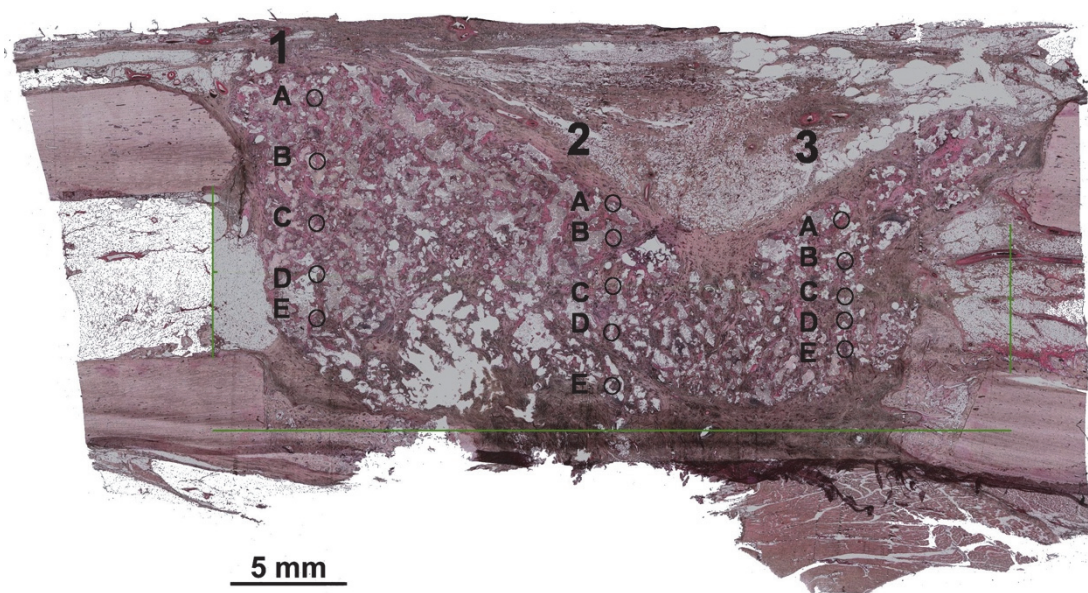


Abbildung 31: Repräsentatives Bild zur Darstellung der Gesichtsfelder bei der Bestimmung der Gefäßdichte. Es wurden jeweils fünf Gesichtsfelder im proximalen, zentralen und distalen Bereich des Scaffolds ausgewertet.

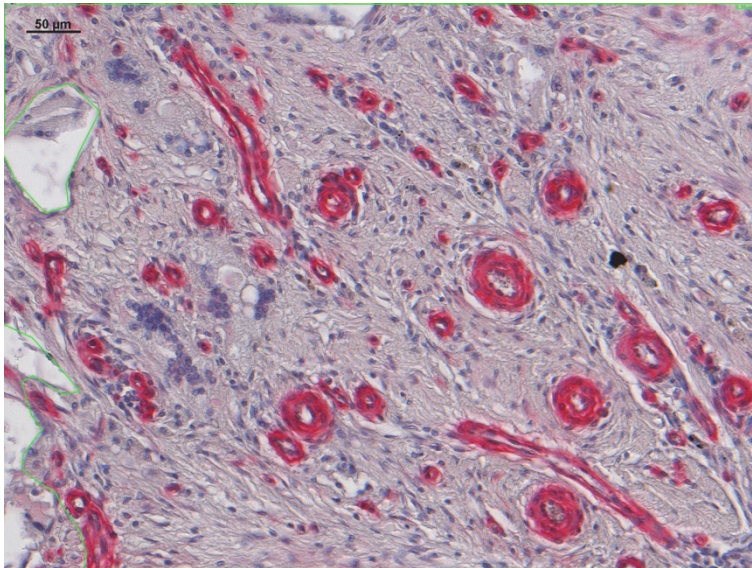


Abbildung 32: Repräsentatives Beispiel für die Messung der Bindegewebsfläche bei der Bestimmung der Gefäßdichte

Vergrößerung aus Gesichtsfeld 2B aus Abbildung 31; grüne Linie: Umrandung der Bindegewebsfläche

3.8.6 Osteoklastenzählung

Zur Auszählung der Osteoklasten wurde die TRAP-Färbung am Paraffinschnitt verwendet. Da die TRAP-Färbung alle Tartrat-resistenten-alkalische-Phosphatase-positiven Zellen wie Osteoklasten und Riesenzellen anfärbt, wurden als Osteoklasten die Zellen gezählt, die mindestens zwei Zellkerne besaßen, die sich TRAP-positiv anfärbten sowie direkt an die knöchernen Oberfläche angrenzten.

Diese Osteoklasten wurden nochmals nach Lokalisation auf der Kortikalis oder im knöchernen Kallus unterschieden.

Osteoklastenzählung an der Kortikalis

Als Osteoklasten an der Kortikalis wurden alle Zellen gezählt, die mindestens zwei Zellkerne besaßen, sich TRAP-positiv anfärbten und Kontakt zu kortikalem Knochen hatten (Abbildung 34). Zur Auszählung der Osteoklasten an der Kortikalis wurden die einzelnen Kortikales in der 10-fachen Vergrößerung in AxioVision digitalisiert (Abbildung 33). Es wurde ein Maßstabbalken gesetzt und anschließend die Fläche der Kortikalis auf einer definierten Länge von 3 mm von der Osteotomiekannte entfernt bestimmt. Die Kortikalis wurde dazu entsprechend umrandet (grüne Linie) und die Fläche von AxioVision berechnet. Die Anzahl (n) aller Osteoklasten an dieser Fläche der Kortikalis wurde bestimmt und anschließend die Osteoklastendichte je Quadratmillimeter Kortikalis berechnet. Bei zwei Tieren der ersten Gruppe konnte jeweils eine kortikale Fläche (mediale distale Kortikalis oder laterale distale Kortikalis) nicht ausgewertet werden, da diese während des Präparationsprozesses nicht vollständig erhalten blieben.

Osteoklastendichte der Kortikalis (n/mm^2) = Osteoklasten (n) / Kortikalisfläche (mm^2)

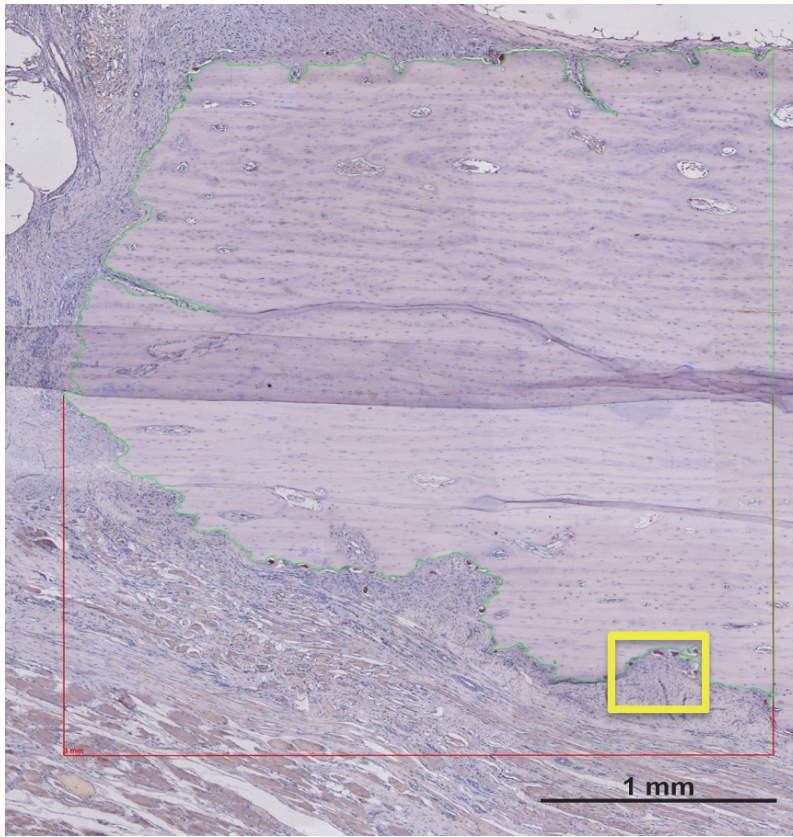


Abbildung 33: Osteoklastenausählung in der Kortikalis-ROI

Rote Linie: 3 mm Abmessung vom osteotomienahen Kortikalisrand; Grüne Linie: Umrandung der Kortikalisfläche auf 3 mm Länge; Distale laterale Kortikalis: 30 Osteoklasten / $7,12mm^2 = 4,21 (n/mm^2)$; gelbes Rechteck: Bildausschnitt siehe Abbildung 34

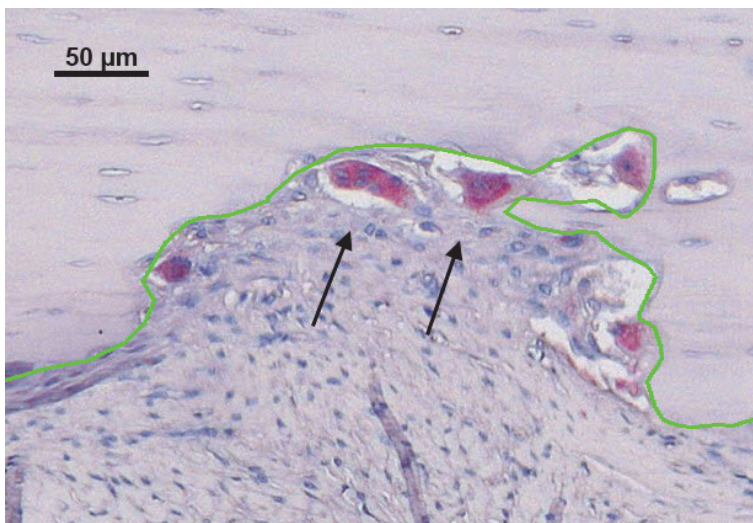


Abbildung 34: Vergrößerter Ausschnitt aus Abbildung 33

Darstellung der Osteoklasten auf der Kortikalisoberfläche, schwarze Pfeile: TRAP-positiv, rot angefärbte Osteoklasten; Grüne Linie: Umrandung der Kortikalisfläche auf 3 mm Länge

Osteoklastenzählung im Kallus

Als Osteoklasten im Kallusgewebe wurden alle Zellen gezählt, die mindestens zwei Zellkerne besaßen, sich TRAP-positiv anfärbten und Kontakt zu Kallusgewebe hatten (Abbildung 35). Die Osteoklastenzahl (n) im knöchernen Kallusgewebe, wurde in den ROIs entsprechend der histomorphometrischen Einteilung ausgezählt (proximale endostale ROI, proximale periostale ROI, distale endostale ROI, distale periostale ROI). Mit Hilfe eines wasserfesten, aber durchsichtigen Marker wurden sie auf den Objektträger übertragen und unter dem Mikroskop ausgezählt. Die mineralisierte Kallusfläche wurde in den Movat Pentachrom gefärbten Parafinschnitten aller Schafe mit Hilfe des Computerprogrammes KS Run bestimmt und anschließend die Osteoklastendichte je Quadratmillimeter Kallus (n/mm^2) bestimmt.

$$\text{Osteoklastendichte des Kallus } (n/mm^2) = \text{Osteoklasten } (n) / \text{Kallusfläche } (mm^2)$$

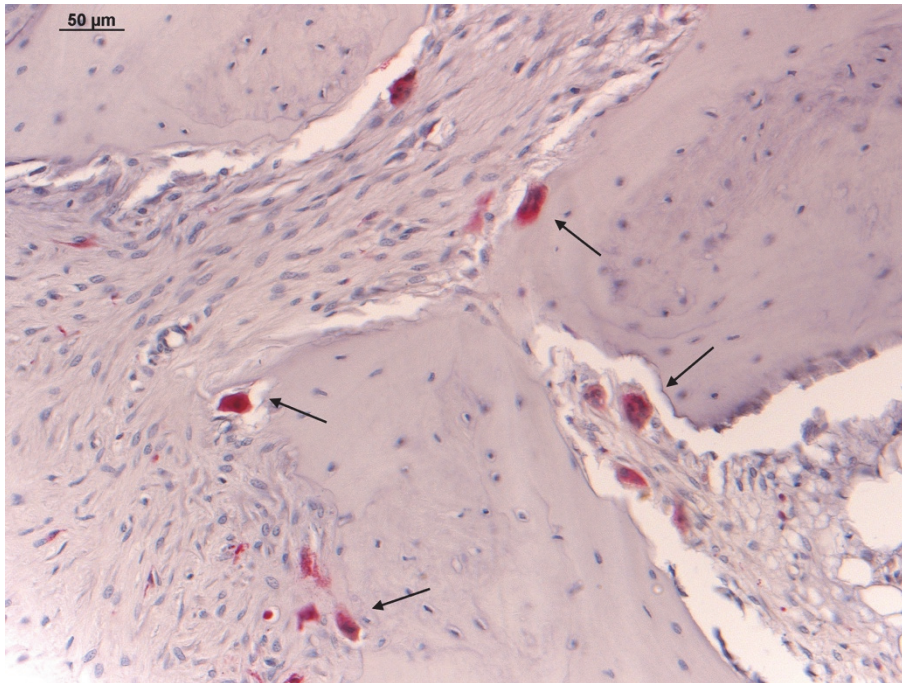


Abbildung 35: Repräsentative Darstellung der TRAP-positiv gefärbten Osteoklasten im knöchernen Kallusgewebe im Osteotomiebereich

schwarze Pfeile: Osteoklasten auf der Kallusoberfläche

3.8.7 Riesenzellzählung

Zur Auszählung der Riesenzellzahl (n) wurde die TRAP-Färbung am Paraffinschnitt verwendet. Die Einteilung der ROIs erfolgte wie für die Auszählung der Gefäße. Als Riesenzellen wurden alle Zellen gezählt, die sich TRAP-positiv färbten, mindestens zwei Zellkerne besaßen und keinen Kontakt zu knöchernem Gewebe hatten (Abbildung 36).

Zunächst wurden fünf Gesichtsfelder in drei Bereichen des Osteotomiedefektes im Scaffold bestimmt, in denen die Gefäße ausgezählt wurden. Es wurden fünf Gesichtsfelder im proximalen, im zentralen Teil und im distalen Anteil des Scaffold ausgezählt und vermessen. Die proximalen und distalen Gesichtsfelder waren dabei immer fünf mm von der Osteotomiegrenze entfernt. Anschließend wurden auch hier die Bindegewebsfläche des Gesichtsfeldes mittels des PC-Programms AxioVision (Carl Zeiss MicroImaging GmbH, Göttingen, Deutschland) und die Riesenzelldichte bestimmt, indem die ausgezählten Riesenzellzahlen in den Gesichtsfeldern auf einer Höhe (proximal, zentral oder distal im Scaffold) addiert wurden und durch die Gesamtbindegewebsfläche der fünf Gesichtsfelder des proximalen, zentralen oder distalen Bereiches im Scaffold dividiert wurden.

Bei einem Tier der ersten Gruppe war in der zentralen ROI kein Scaffold im Schnitt zur Auszählung vorhanden, sodass dieser Bereich bei diesen Tieren nicht in die Auswertung eingehen konnte.

$$\text{Riesenzelldichte (n/mm}^2\text{)} = \text{Riesenzellen (n)} / \text{Bindegewebsfläche (mm}^2\text{)}$$

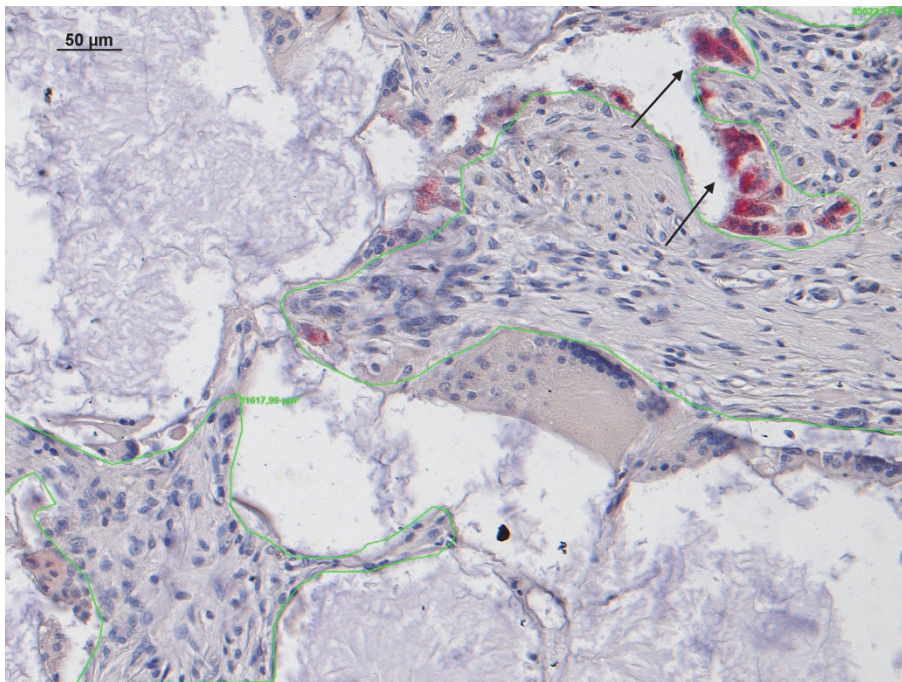


Abbildung 36: Darstellung der TRAP-positiv gefärbten Riesenzellen

- im von Bindegewebe durchzogenen Scaffold; schwarze Pfeile: TRAP-positiv (rot) gefärbte Riesenzellen im Scaffold; grüne Linie: Umrandung der Bindegewebsfläche; Vergrößerung von einem Gesichtsfeld; 16 Riesenzellen je 12 mm² Bindegewebe = 133,33 (n/mm²)

3.9 Statistik

Für die statistische Auswertung der Messwerte wurde das Programm SPSS® Version 22 (SPSS GmbH Software, München, Deutschland) verwendet. Nach dem Kolmogorov-Smirnov-Test konnte die Normalverteilung der Werte nicht bestätigt werden. Für den Vergleich der beiden Gruppen wurde der U-Test nach Mann-Whitney herangezogen. Bei dem Mann-Whitney-U-Test handelt es sich um einen nichtparametrischen Zwei-Stichproben-Test für unabhängige Stichproben. Ein signifikanter Unterschied zwischen zwei Gruppen liegt bei dem festgelegten Signifikanzniveau (α) von unter 0,05 vor. Die Irrtumswahrscheinlichkeit von (p) liegt somit bei 5%.

Die Ergebnisse der Computertomographie, der Histomorphometrie, der Gefäß-, Osteoklasten- und Riesenzellzählung wurden mittels Boxplots dargestellt. In der Boxplotdarstellung finden sich folgende Parameter: der Median, das 25- und 75-Prozentquantil, der Minimum- und Maximumwert, Ausreißer(°) und Extremwerte(*). Der Körper des Boxplots (Interquartilsabstand) enthält den Median und wird vom 25- und 75-Prozentquantil begrenzt und vereint 50% der Werte in sich. An den Körper des Boxplots schließen sich oben und unten T-förmige Whisker an, die jeweils die Werte der unterhalb des 25-Prozentquantils bzw. oberhalb des 75-Prozentquantils liegenden Werte umfassen. Die Whisker können maximal die 1,5 Interquartilsabstände lang sein. Liegen Werte außerhalb dieses Bereiches, werden sie als Ausreißer bezeichnet. Bei Ausreißern handelt es sich um Fälle mit Werten, die zwischen eineinhalb und drei Interquartilsabständen vom jeweiligen Quartil entfernt sind. Bei Extremwerten handelt es sich um Fälle mit Werten, die über drei Interquartilsabstände vom jeweiligen Quartil entfernt sind.

4. Ergebnisse

4.1 Operations- und Standzeitbefunde

Fünfzehn Tiere tolerierten die Narkose und den operativen Eingriff ohne Komplikationen. Ein Tier verstarb direkt postoperativ aufgrund von Narkosekomplikationen in der Aufwachphase und zwei Tiere, je eines aus jeder Gruppe, mussten aufgrund von Traumata im Stall frühzeitig aus dem Versuch genommen werden, so dass insgesamt zwölf Tiere nach einer Standzeit von zwölf Wochen in die Auswertung eingingen.

Die Tiere waren noch am Operationstag in der Lage selbstständig aufzustehen, sie zeigten eine Vollbelastung der operierten Gliedmaße, wobei das Gangbild, bedingt durch montierten Hybrid-Ringfixateur leicht verändert war, da dieser nur eine eingeschränkte Flexion im Kniegelenk zuließ. Bei Infektionen an den Pineintrittstellen wurden die Tiere antibiotisch mit Veracin-Compositum® (Benzyl-Penicillin-Procaïn und -Benzathin mit Streptomycin und Dihydrostreptomycin, Albrecht GmbH, Aulendorf) und bei leichten Lahmheiten zusätzlich analgetisch mit Finadyne® (Flunixin-Meglumine, RPS 83 mg/ml Injektionslösung, MSD Tiergesundheit, Intervet Deutschland GmbH, Unterschleißheim) versorgt.

Initial kam es bei allen Tieren beider Gruppen in den ersten Tagen post OP zu blutigen Sekretionen an allen Eintrittsstellen von Ilizarov-Drähten und Schanz-Schrauben, nach der Einheilung traten nur noch vereinzelt leichte Entzündungen an den Ilizarov-Drähten auf. So kam es bei fünf Tieren der ersten Gruppe zu leichten Entzündungen an den Drahteintrittstellen, wobei vier Tiere der ersten Gruppe im weiteren Verlauf aufgrund von eitrigen Entzündungen an den Ilizarov-Drähten ab dem 7. bis 14. Tag post OP über 7 Tage antibiotisch versorgt werden mussten. Bei einem Tier der ersten Gruppe kam es traumatisch bedingt nach sechs Tagen post OP zu einer Achsenabweichung der Tibia und zu einer Stauchung der Defektzone, so dass dieses Tier vorzeitig aus dem Versuch genommen werden musste. Bei einem anderen Schaf der ersten Gruppe kam es nach drei Tagen post OP zu einer Verformung einer Schanz-Schraube, das Tier wurde reoperiert und die Schanz-Schraube ersetzt. Das Schaf erholte sich anschließend unter Anwendung eines Schmerzmittels und eines Antibiotikums über 5 Tage. Zusätzlich erhielt dieses Tier aufgrund einer Lungeninfektion ein weiteres Antibiotikum (Baytril® 10% ad us. Vet, Enrofloxacin, Bayer Animal Health GmbH, Leverkusen, Deutschland). Dieses Schaf zeigte nach zehn Wochen Standzeit eine leichte Lahmheit und eine eitrige Sekretion am ersten Ilizarov-Draht, so dass es bis zum Ende der Standzeit antibiotisch versorgt wurde. Bei einem anderen Tier der ersten Gruppe kam es am 34. Tag OP zum Bruch zweier Schanz-Schrauben, so dass dieses Schaf reoperiert und die gebroche-

nen Schanz-Schrauben ersetzt werden mussten. Das Schaf erholte sich anschließend unter Schmerzmedikation ohne weitere Komplikationen.

Bei vier Tieren der zweiten Gruppe traten am Anfang der Standzeit (9. - 14. Tag) eitrige Entzündungen an den Ilizarov-Drähten auf. Diese wurden über einen Zeitraum von zwei bis vier Wochen antibiotisch behandelt. Zwei dieser Tiere zeigten im Zeitraum zwischen der achten bis zehnten Woche mittelgradige Lahmheiten und lagen vermehrt. Eines dieser beiden Schafe wurde aufgrund anhaltender eitrig-er Sekretion an den Ilizarov-Drähten über den restlichen Zeitraum antibiotisch abgedeckt. Das andere Tier besserte sich unter Schmerzmedikation deutlich und erhielt diese über weitere sieben Tage. Ab der zwölften Woche musste jedoch auch dieses Tier aufgrund eitrig-er Sekretion und einer leichten Lahmheit erneut antibiotisch versorgt werden.

Bei zwei Tieren der zweiten Gruppe kam es nach zwei bzw. vier Wochen post OP an einer Heuraufe zu Traumata der operierten Beckenkämme und im Anschluss zu eitrig-er Entzündungen im Wundbett. Die beiden Tiere wurden erfolgreich analgetisch und antibiotisch versorgt, die Wunden täglich gereinigt und mit Jodlösung (Braunol®, Povidon-Iod-Lösung, Braun, Melsungen, Deutschland) gespült, so dass die Wunden an den Beckenkämmen innerhalb von fünf Wochen verheilten. Eines dieser beiden Tiere erlitt jedoch nach 9 Wochen Standzeit ein weiteres Trauma, wobei zwei Schanz-Schrauben und die Tibia frakturierten, so dass dieses Tier vorzeitig aus dem Versuch genommen werden musste.

4.2 Ergebnisse der Radiologie

Um den Heilungsverlauf zwischen beiden Gruppen zu vergleichen, wurden die postoperativen Röntgenbilder und Verlaufskontrollen nach vier, acht- und zwölf Wochen in zwei Ebenen verwendet. Alle Tiere zeigten über den Beobachtungszeitraum eine fortschreitende sekundäre Knochendefektheilung. Bei zwei Tieren der zweiten Gruppe kam es nach acht Wochen zu einer unilateralen Überbrückung des Osteotomiedefektes.

Direkt postoperativ war der Osteotomiespalt scharf durch die Osteotomie- kante abgegrenzt. Die poröse Struktur des Scaffolds war deutlich erkennbar, er stellte sich als Streifen verlaufend im Osteotomiespalt dar (Abbildung 37 A-F und Abbildung 41 A-F) und die Schanz-Schrauben hatten bei allen Tieren einen bikortikalen Sitz.

Bei einem Schaf der ersten Gruppe war an der distalen Kortikalis eine Fragmentablösung erkennbar (Abbildung 37 B), die intra operationem durch das Sägen entstanden war.

Vier Wochen nach der Operation zeigten sich in beiden Gruppen kaum Veränderungen im Vergleich zum röntgenologischen Bild postoperativ. Die Schanz-Schrauben hatten einen bikortikalen Sitz in der Tibia und die Osteotomie- kante erschien bei allen Tieren beider Gruppen scharfkantig (Abbildung 38). Lediglich der Scaffold erschien in beiden Gruppen in seiner porösen Struktur aufgelockerter und weniger röntgendicht. Bei einem Tier der ersten Gruppe

war der Scaffold geknickt, bei einem anderen Tier erschien die Röhrenform kollabiert (Abbildung 38 A, E). Bei zwei Tieren der zweiten Gruppe wirkte der Scaffold deutlich verwaschen, die poröse Struktur und die Streifenform waren nichtmehr präzise erkennbar. (Abbildung 42 C, E). Pinlysen waren zu diesem Untersuchungszeitpunkt bei keinem Tier zu beobachten.

Bei vier Tieren der ersten Gruppe waren acht Wochen postoperativ leichte röntgendichte Verschattungen als Hinweis auf eine Kallusbildung ausgehend von der Osteotomiekannte (Abbildung 39 A, B, C, F) und stellenweise dezente wolkenartige, röntgendichte Verschattungen im Scaffold erkennbar (Abbildung 39 A, B). Bei den zwei übrigen Tieren der ersten Gruppe war nach acht Wochen kein Hinweis auf eine Kallusbildung zu beobachten (Abbildung 39 D, E).

In der zweiten Gruppe waren bei allen Tieren nach acht Wochen deutlich röntgendichte Verschattungen als Hinweis auf eine beginnende knöchernen Überbrückung der Osteotomiepaltes (Abbildung 43 A-F) zu beobachten. Bei zwei Tieren dieser Gruppe zeigte sich bereits eine unilaterale knöcherne Überbrückung des Osteotomiedefektes (Abbildung 43 C, E). Bei zwei weiteren Tieren der zweiten Gruppe hatte sich von lateralen Kortikalis ausgehend proximal und distal mineralisiertes Kallusgewebe gebildet, das in Richtung der gegenüberliegenden Kortikalis in den Osteotomiedefekt einwuchs (Abbildung 43 A, D). Zwei andere Tiere der Gruppe zwei zeigten kleinere Abschnitte mineralisierten Kallusgewebes, die inselartig, ohne Verbindung zum kortikalen Knochen im Scaffold verteilt waren (Abbildung 43 B, F).

Acht Wochen postoperativ hatten die Schanz-Schrauben bei allen Tieren beider Gruppen einen bikortikalen Sitz im Schaft der Tibia und bei allen Tieren befand sich der Scaffold in Position. In der ersten Gruppe erschien er bei zwei Schafen leicht und bei vier Schafen stark aufgelockert und weniger röntgendicht (Abbildung 39 A-F). In Gruppe zwei war der Scaffold nach acht Wochen bei allen Tieren stark aufgelockert und weniger röntgendicht (Abbildung 43 A-F). Bei vier Tieren der ersten Gruppe waren nach acht Wochen Heilungszeit leichte und bei zwei Tieren deutliche radiologische Lysen an den Schanz-Schrauben erkennbar. Die Osteotomiekannten erschienen zu diesem Heilungszeitpunkt in der ersten Gruppe bei vier Schafen aufgelockert und bereits leicht abgerundet und bei zwei Schafen scharfkantig (Abbildung 39 D, E). In der zweiten Gruppe war bei vier Tieren eine leichte und bei einem Tier eine deutliche Lyse an den Schanz-Schrauben zu beobachten. Die Osteotomiekannte war in dieser Gruppe bei fünf Tieren aufgelockert und leicht abgerundet und erschien bei nur noch einem Tier scharfkantig (Abbildung 43 D).

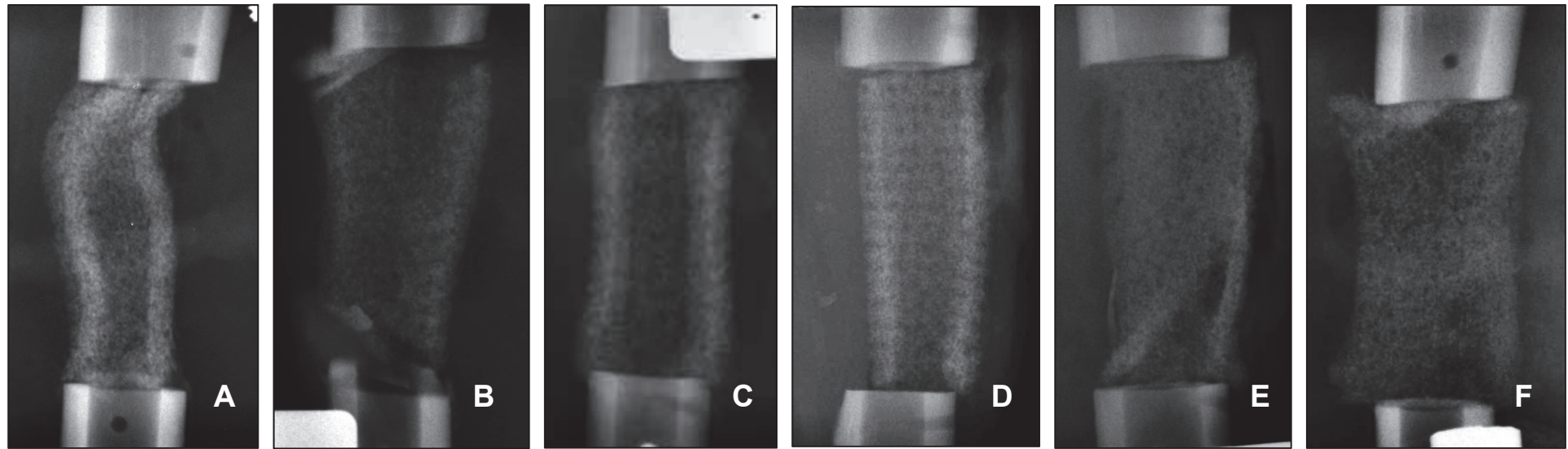
Bei zwei Schafen der ersten Gruppe war mineralisiertes Kallusgewebe erst zum Zwölfwochenzeitpunkt im Osteotomiedefekt zu beobachten (Abbildung 40 D, E). Bei den vier anderen Tieren dieser Gruppe hatte das Kallusgewebe an Umfang und am Grad der Mineralisation deutlich zugenommen (Abbildung 40 A, B, C, F). In der zweiten Gruppe hatte der Umfang

des Kallusgewebes nach zwölf Wochen nur wenig zugenommen. Vielmehr war die Mineralisierung von schon vorhandenem Kallusgewebe vorangeschritten, so dass die Konturen deutlicher erkennbar waren (Abbildung 44 A-F). Im Vergleich zur ersten Gruppe waren bei allen Tieren der zweiten Gruppe umfangreichere Kalluszubildungen zu beobachten.

Auch nach zwölf Wochen Standzeit hatten die Schanz-Schrauben bei allen Tieren in beiden Gruppen einen bikortikalen Sitz in der Tibia. Bei einem Tier der ersten Gruppe war eine Fraktur der zweiten Schanz-Schraube in den Faxitronaufnahmen zu erkennen.

In der ersten Gruppe waren nach zwölf Wochen bei einem Schaf leichte und bei fünf Tieren deutliche radiologische Anzeichen von Lysen an den zweiten und dritten Schanz-Schrauben im Hybrid-Ringfixateurs zu beobachten. Die Osteotomiekannte erschien bei allen Tieren der ersten Gruppe aufgelockert und abgerundet (Abbildung 40 A-F). Das Scaffoldmaterial war stark aufgelockert und bei einem Tier nichtmehr zu lokalisieren. Bei den übrigen fünf Tieren war der Scaffold nur noch schemenhaft als ursprünglicher Streifen zu erkennen.

In der zweiten Gruppe waren bei vier Schafen leichte und bei zwei anderen Schafen deutliche Lysen an der zweiten und dritten Schanz-Schraube erkennbar. Die Osteotomiekannten von vier Tieren in der zweiten Gruppe erschienen aufgelockert und abgerundet. Bei den zwei Tieren mit unilateraler Überbrückung des Osteotomiespaltes war die Osteotomiekannte nichtmehr klar vom übrigen Kallusgewebe zu unterscheiden. Das Scaffoldmaterial war stark aufgelockert und nur noch bei zwei Tieren als Streifen zu erkennen (Abbildung 45 A-F).



Schaf 1

Schaf 2

Schaf 3

Schaf 4

Schaf 5

Schaf 6

Abbildung 37: Röntgenbilder der Gruppe 1, direkt postoperativ

Strahlengang: posterior-anterior, links im Bild ist lateral und rechts im Bild medial

Deutlich erkennbar ist der mit dem Scaffold gefüllte Osteotomiespalt, der proximal und distal durch die Osteotomiekannte begrenzt wird. Bei Schaf 2 (Abb. B) ist lateral an der distalen Kortikalis eine Fragmentablösung erkennbar, die intra operationem durch das Sägen entstand.

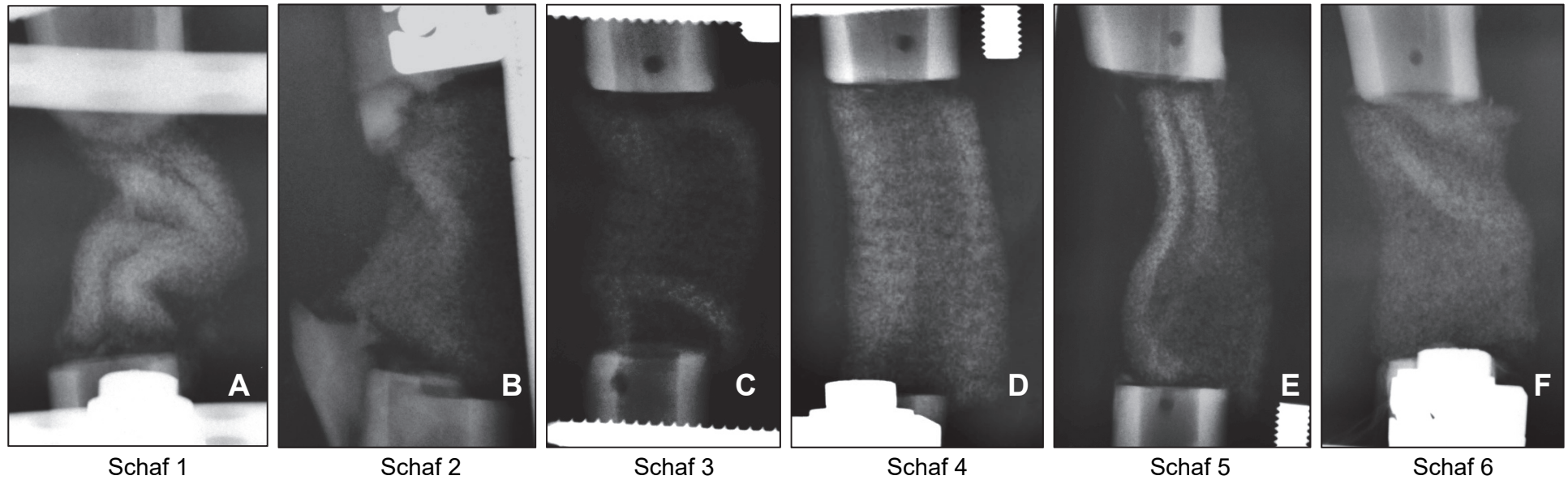


Abbildung 38: Röntgenbilder der Gruppe 1, 4 Wochen postoperativ

Strahlengang: posterior-anterior, links im Bild ist lateral und rechts im Bild medial

Vier Wochen nach der Operation waren nur geringfügige Veränderungen im Vergleich zum röntgenologischen Bild postoperativ zu erkennen. Die Osteotomiekannte erschien bei allen Tieren der ersten Gruppe scharfkantig. Deutlich erkennbar ist der mit dem Scaffold gefüllte Osteotomiespalt. Der Scaffold war in seiner porösen Struktur aufgelockerter und weniger röntgendicht als direkt postoperativ. Bei Schaf 2 (Abb. B) ist lateral an der distalen Kortikalis immernoch deutlich die Fragmentablösung erkennbar.

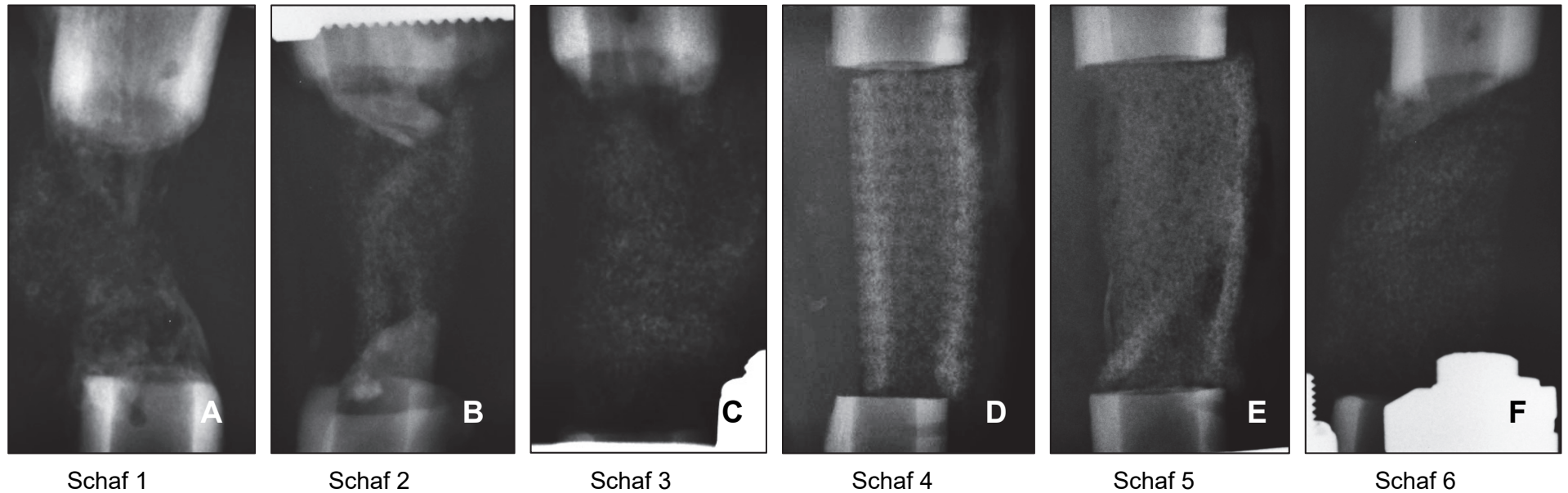


Abbildung 39: Röntgenbilder der Gruppe 1, 8 Wochen postoperativ

Strahlengang: posterior-anterior, links im Bild ist lateral und rechts im Bild medial

Nach acht Wochen zeigten sich bei drei Tieren (Abbildung A, B, F) leichte röntgendichte Verschattungen als Hinweis auf den Beginn knöchernen Überbrückung des Osteotomiespalt, ausgehend von den Osteotomieanten. Stellenweise waren dezente wolkenartige, röntgendichte Verschattungen im Scaffold erkennbar (Abb. A, B). Bei den drei übrigen Tieren der ersten Gruppe war nach acht Wochen kein Hinweis auf eine Kallusbildung erkennbar (Abb. C, D, E). Bei allen Tieren dieser Gruppe befand sich der Scaffold sich in seiner Position und erschien bei zwei Tieren leicht und vier Tieren stark aufgelockert und weniger röntgendicht. Die Osteotomieanten erschienen zu diesem Heilungszeitpunkt in der ersten Gruppe bei vier Schafen aufgelockert und bereits leicht abgerundet (Abbildung A, B, C, F) und bei zwei Schafen scharfkantig (Abbildung D, E).

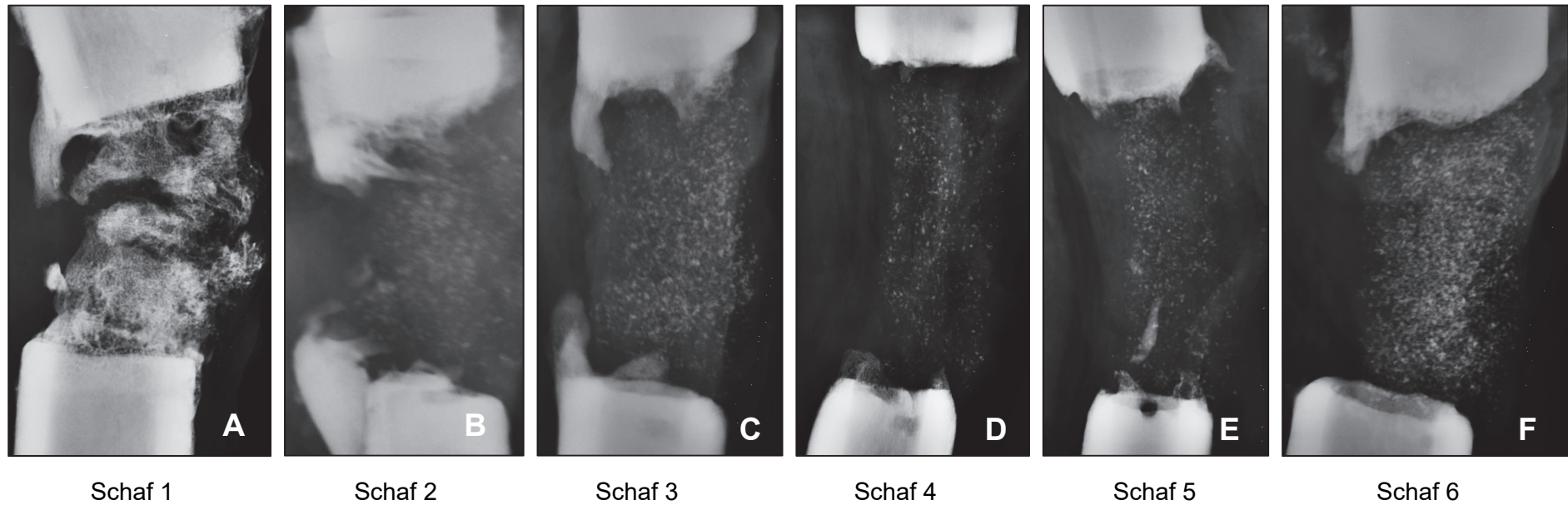


Abbildung 40: Röntgenbilder der Gruppe 1, 12 Wochen postoperativ, Faxitron

Strahlengang: posterior-anterior, links im Bild ist lateral und rechts im Bild medial

Nach zwölf Wochen war der Osteotomiespalt bei allen Tieren immernoch deutlich erkennbar. Die Osteotomiekanten zeigten deutlichere knöcherne Kallusbildungen als zum Achtwochenzeitpunkt (Abb. A, B, F). Bei drei Tieren ist erst nach zwölf Wochen mineralisiertes Kallusgewebe im Osteotomiedefekt zu beobachten (Abb. C, D, E).

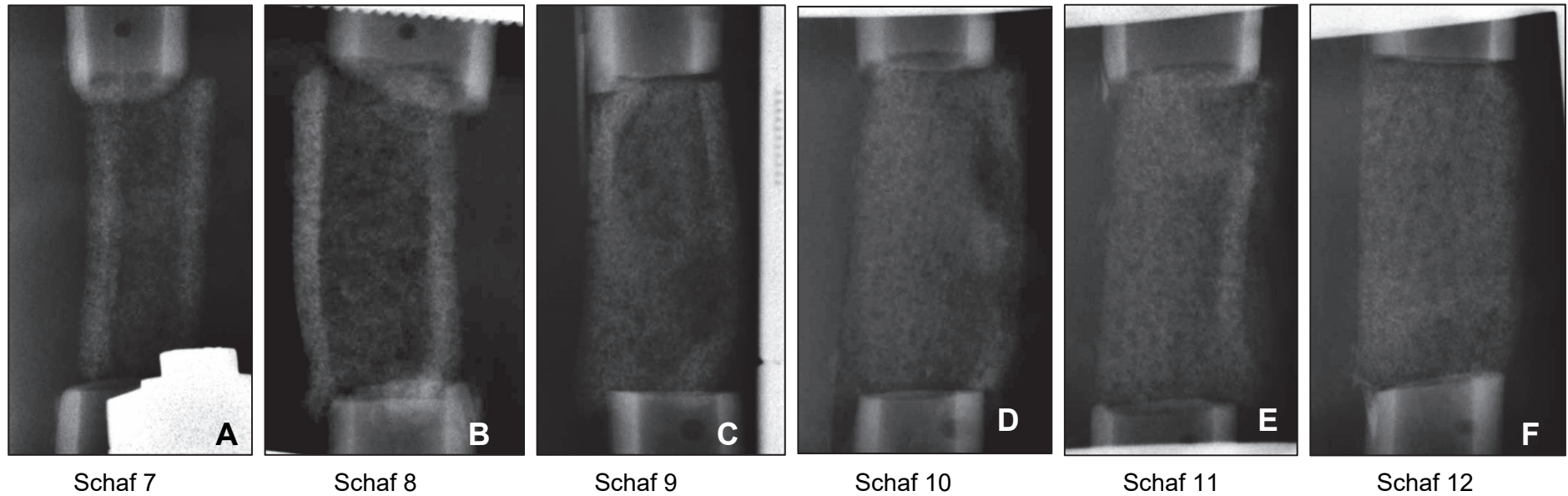


Abbildung 41: Röntgenbilder der Gruppe 2, direkt postoperativ

Strahlengang: posterior-anterior, links im Bild ist lateral und rechts im Bild medial

Deutlich erkennbar ist der mit Spongiosa gefüllte Scaffold im Osteotomiespalt, der proximal und distal durch die Osteotomieanten begrenzt wird.

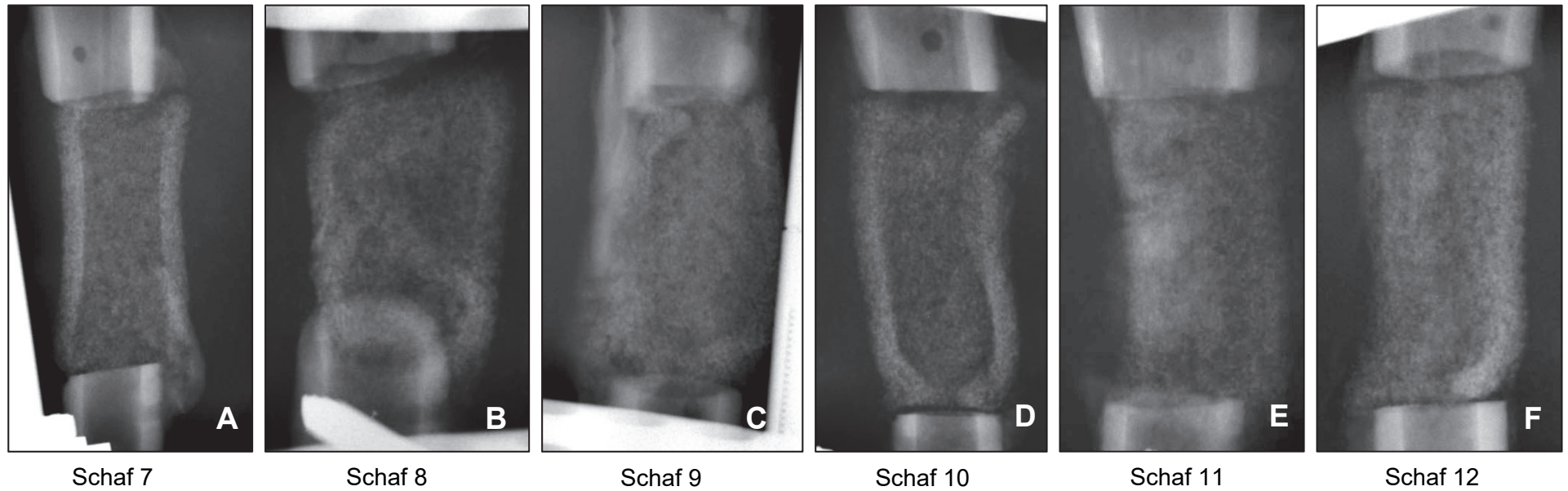


Abbildung 42: Röntgenbilder der Gruppe 2, 4 Wochen postoperativ

Strahlengang: posterior-anterior, links im Bild ist lateral und rechts im Bild medial

Vier Wochen nach der Operation waren kaum Veränderungen im Vergleich zum röntgenologischen Bild postoperativ zu beobachten. Die Osteotomiekante erschien bei allen Tieren scharfkantig. Der Scaffold war in beiden Gruppen in seiner porösen Struktur aufgelockert und weniger röntgendicht, bei zwei Tieren der zweiten Gruppe wirkte der Scaffold deutlich verwaschen, die poröse Struktur und die Streifenform waren hier nichtmehr präzise erkennbar (Abb. C und E).

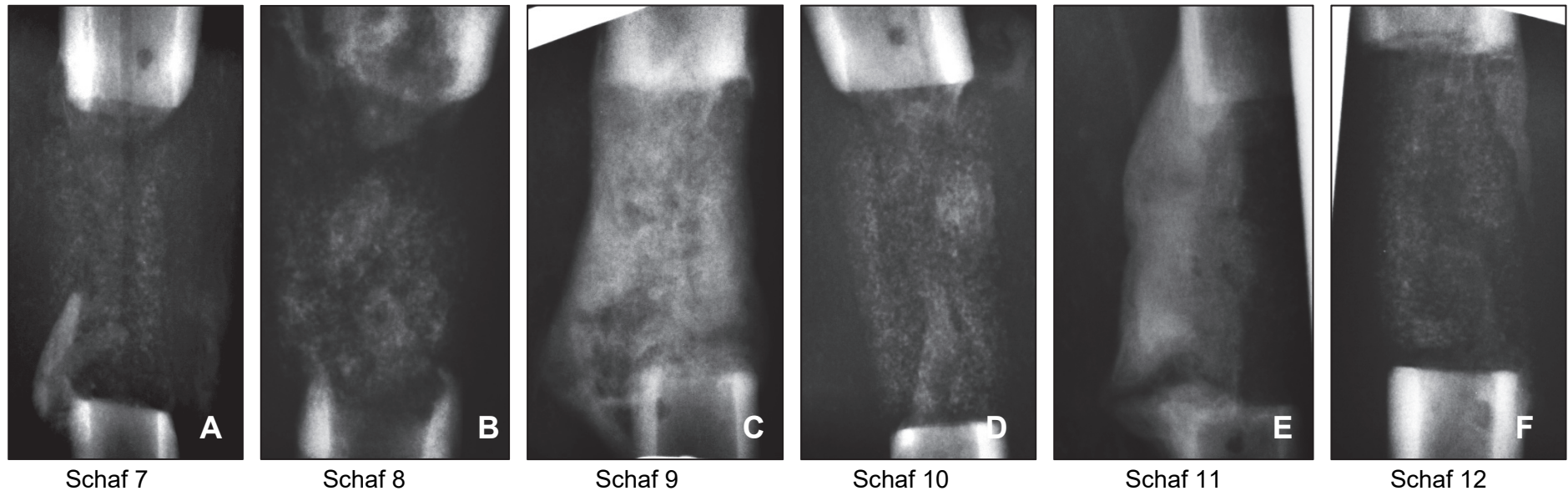


Abbildung 43: Röntgenbilder der Gruppe 2, 8 Wochen postoperativ

Strahlengang: posterior-anterior, links im Bild liegt lateral und rechts im Bild medial

Nach acht Wochen zeigten sich bei zwei Tieren röntgenologisch bereits unilaterale Überbrückungen des Osteotomiespalt (Abb. C und E). Bei allen Tieren dieser Gruppe waren deutliche röntgendichte Verschattungen als Hinweis auf eine beginnende Mineralisierung erkennbar. Dabei hatten sich bei zwei Tieren mineralisierte Kallusausläufer an der lateralen Kortikalis gebildet und breiteten sich von einer Osteotomiekannte des kortikalen Knochens zur gegenüberliegenden hin aus (Abb. A und D). Bei zwei weiteren Tieren waren kleinere, weniger röntgendichte Strukturen erkennbar, die inselartig, ohne Verbindung zum kortikalen Knochen im Scaffold lokalisiert waren (Abb. B und F). Bei allen Tieren befand sich der Scaffold in Position, erschien stark aufgelockert und weniger röntgendicht. Die Osteotomiekannten waren in dieser Gruppe bei fünf Tieren aufgelockert (Abbildung A,B,C,E,F) und leicht abgerundet und bei nur noch einem Tier scharfkantig (Abbildung D).

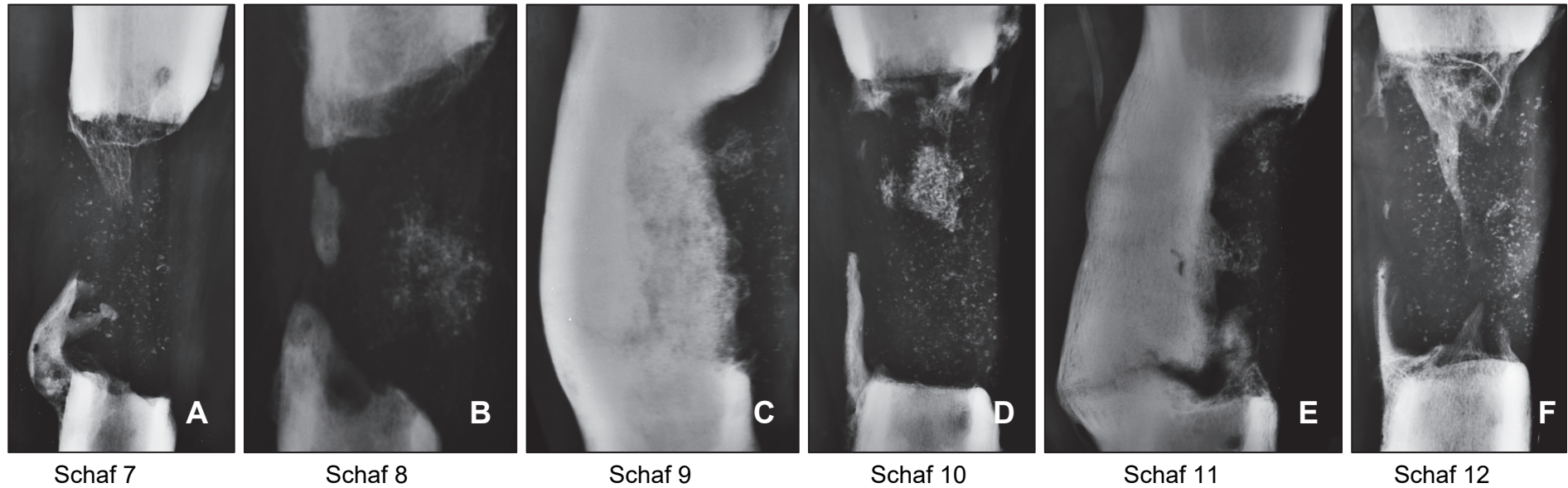


Abbildung 44: Röntgenbilder der Gruppe 2, 12 Wochen postoperativ, Faxitron

Strahlengang: posterior-anterior, links im Bild ist lateral und rechts im Bild medial

Nach zwölf Wochen waren bei zwei Tieren unilaterale Überbrückungen des Osteotomiedefektes zu beobachten (Abb. C und E). Bei den übrigen vier Tieren sind im Vergleich zur ersten Gruppe umfangreichere Kallusbildungen erkennbar. Im Vergleich zu den Aufnahmen dieser Gruppe nach acht Wochen hat der Umfang an Kallusgewebe nur wenig zugenommen. Vielmehr ist die Mineralisierung von schon vorhandenem Kallusgewebe vorangeschritten, so dass die Konturen deutlicher erkennbar waren.

4.3 Ergebnisse der computertomographischen Messungen

In die computertomographische Auswertung gingen insgesamt Knochenproben von 12 Schafen ein. Alle Tibiae wurden sowohl im HR-pQCT als auch im Mikro-CT analysiert.

4.3.1 Ergebnisse der HR-pQCT-Untersuchungen

Deskriptive Auswertung (3D-Rekonstruktion) der HR-pQCT-Messung

Die Messungen am HR-pQCT umfassten den gesamten Osteotomiespalt mit angrenzender Kortikalis. Anhand der 3D-Rekonstruktionen waren zwischen den beiden Kortikalisenden streifenartig Reste des Scaffolds (ChronOS Strip®) und unterschiedlich stark mineralisierte Kallusformation im Osteotomiedefekt zu erkennen. Die Aufnahmen wurden zwölf Wochen post OP angefertigt und zeigten in der ersten Gruppe bis auf ein Tier (Abbildung 44 A) nur wenig mineralisiertes Kallusgewebe. Bei einem anderen Tier der ersten Gruppe kam es intra operationem zu einer Fragmentabspaltung (Abbildung 45 B), die auch nach zwölf Wochen noch gut erkennbar war.

In der zweiten Gruppe kam es bei zwei Tieren zu einer unilateralen, knöchernen Überbrückung der Defektstrecke (Abbildung 46 C, E), bei den übrigen Tieren dieser Gruppe waren vor allem lateral im Osteotomiedefekt lange, spitz zu laufende Kallusausläufer, die von der Kortikalis ausgingen und weit in den Defektbereich hinein reichten zu beobachten (Abbildung 46 A, B, D, F). Auch in der zweiten Gruppe waren noch Reste von Scaffoldmaterial erkennbar, die stellenweise verdichtet erschienen (Abbildung 45 B und D).

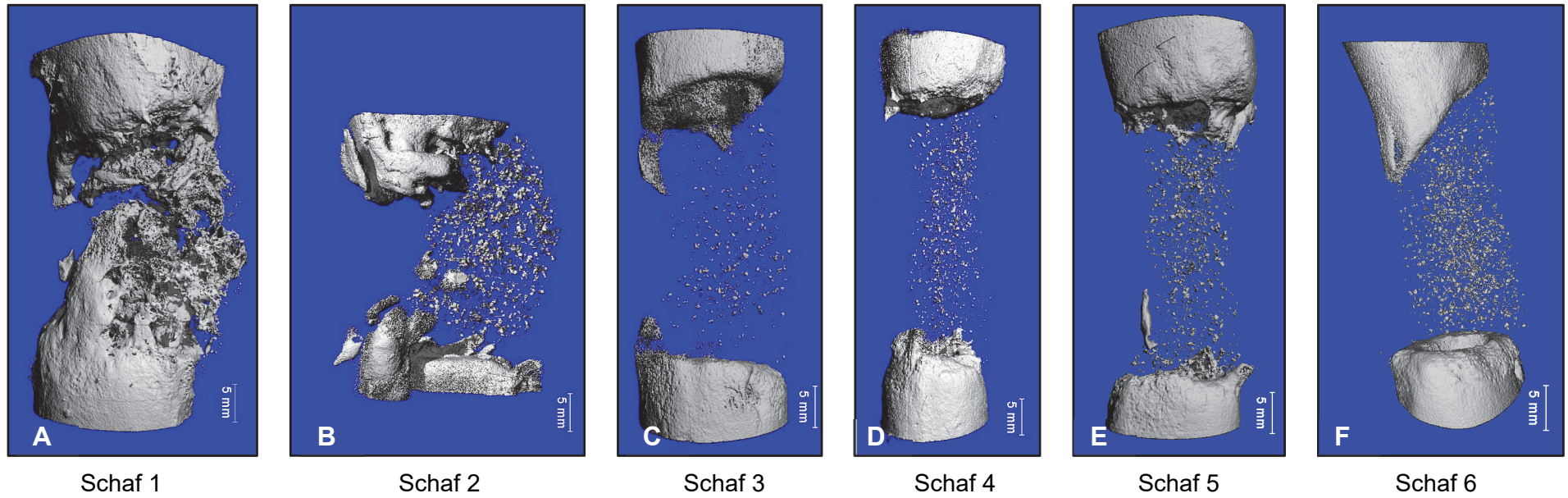


Abbildung 45: 3D-Darstellungen der HR-pQCT-Aufnahmen von Gruppe 1, 12 Wochen postoperativ

Ansicht: posterior-anterior, links im Bild ist medial und rechts im Bild lateral

Zwischen den beiden Kortikalisenden ist der Osteotomiedefektbereich zu erkennen, darin befinden sich strangförmig verlaufend Reste des Scaffolds (ChronOS Strip®) und unterschiedlich stark mineralisiertes Kallusgewebe. Nach zwölf Wochen Heilungszeit hat sich in dieser Gruppe insgesamt nur wenig mineralisiertes Kallusgewebe gebildet.

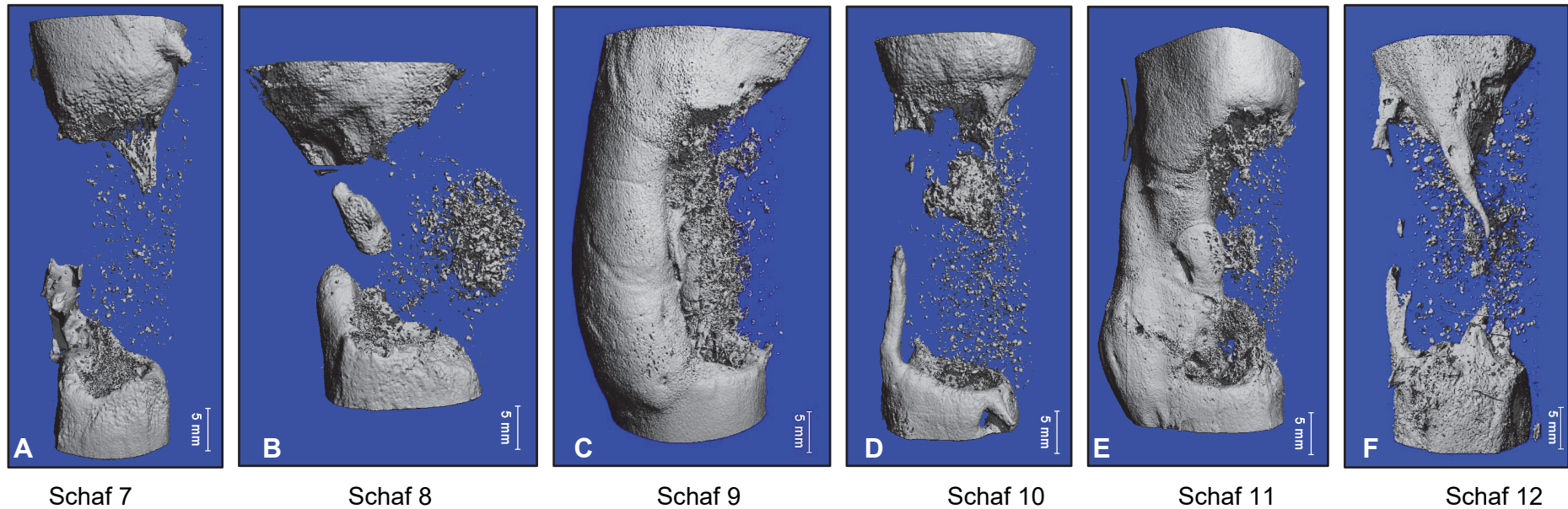


Abbildung 46: 3D-Darstellungen der HR-pQCT-Aufnahmen von Gruppe 2, 12 Wochen postoperativ

Ansicht: posterior-anterior, links im Bild ist medial und rechts im Bild lateral.

Zwischen den beiden Kortikalisenden ist der Osteotomiedefektbereich zu erkennen, darin befinden sich Reste des Scaffolds (ChronOS Strip®) und unterschiedlich starke Kallusubildungen. Bei zwei Tieren kam es zu einer unilateralen, knöchernen Überbrückung der Defektstrecke (Abb. C und E), bei den übrigen Tieren dieser Gruppe bildeten sich lange, spitz zulaufende Kallusausläufer, die von der Kortikalis ausgingen und weit in den Defektbereich hinein reichten (Abb. A, B, D, F). Scaffoldreste sind noch erkennbar, die stellenweise verdichtet erschienen (Abb. B und D).

Statistische Auswertung der HR-pQCT-Messungen

Die Darstellung der Messwerte erfolgt in absoluten Zahlen (mm^3), da stets die gleiche Anzahl an Slices ausgewertet wurde.

Das Gesamtvolumen (TV) sowie das Knochenvolumen (BV) lagen im Median in der zweiten Gruppe geringfügig über dem der Gruppe eins. Zudem zeigte sich in der zweiten Gruppe eine größere Streuung zwischen den Versuchstieren mit vereinzelt deutlich höheren Werten (Abbildung 47 und Abbildung 48), jedoch ohne statistisch signifikanten Unterschied (Tabelle 4). Beim Vergleich des Verhältnisses des Knochenvolumen zum Gesamtvolumen (BV/TV) ergab sich für die zweite Gruppe ein niedrigerer Wert im Median im Vergleich zur ersten Gruppe, einzelne Tiere wiesen auch hier wieder deutlich höher Werte auf (Abbildung 49). Beide Gruppen unterschieden sich nicht in der BMD (Abbildung 50). Beim BMC wiesen einige Tiere der Gruppe zwei eine stärkere Streuung zu höheren Werten auf (Abbildung 51). Der Unterschied im BV/TV, BMD sowie BMC zwischen beiden Gruppen war statistisch nicht signifikant.

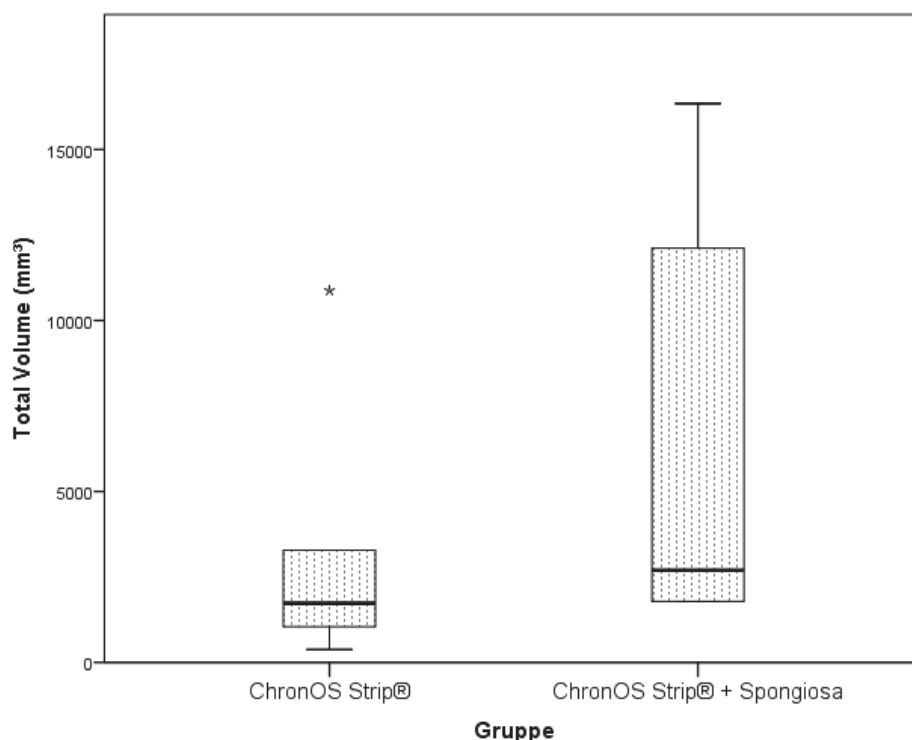


Abbildung 47: Darstellung des Total Volume (mm^3) in der Gesamt-ROI der HR-pQCT-Aufnahmen
p-Wert bezieht sich auf den U-Test nach Mann-Whitney mit Gruppe 1 ($p \leq 0,05$) (pro Gruppe $n=6$)

Das TV lag im Median in der zweiten Gruppe geringfügig über dem der ersten Gruppe und zeigte zudem eine stärkere Streuung mit vereinzelt höheren Werten. Der Unterschied zwischen beiden Gruppen war nicht statistisch signifikant.

Ergebnisse

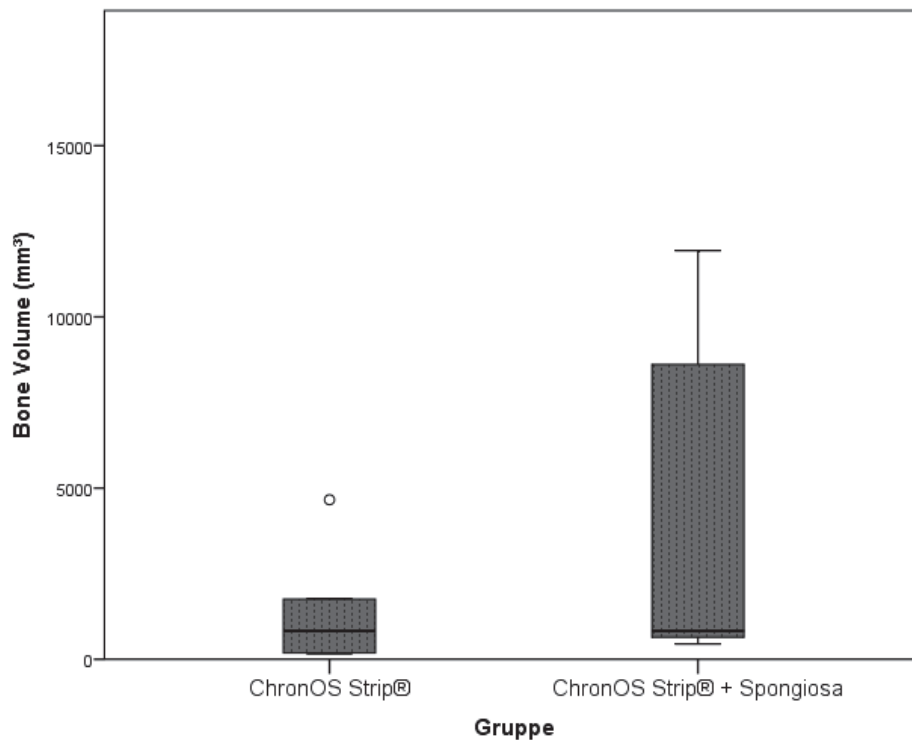


Abbildung 48: Darstellung des Bone Volume (mm³) in der Gesamt-ROI der HR-pQCT-Aufnahmen

p-Wert bezieht sich auf den U-Test nach Mann-Whitney mit Gruppe 1 ($p \leq 0,05$) (pro Gruppe n=6)

Das BV lag im Median in der zweiten Gruppe geringfügig über dem der ersten Gruppe und zeigte eine stärkere Streuung mit vereinzelt höheren Werten. Es zeigte sich kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den beiden Gruppen.

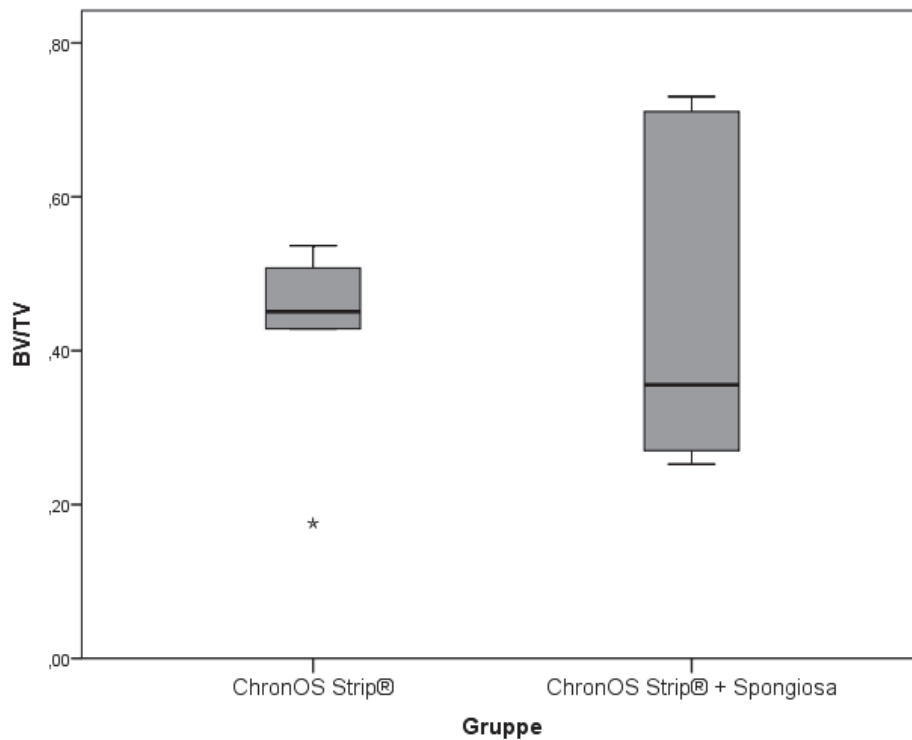


Abbildung 49: Darstellung des Quotienten BV/TV in der Gesamt-ROI der HR-pQCT-Aufnahmen

p-Wert bezieht sich auf den U-Test nach Mann-Whitney mit Gruppe 1 ($p \leq 0,05$) (pro Gruppe n=6)

Der Vergleich des Verhältnisses des BV/TV ergab für die zweite Gruppe einen niedrigeren Wert im Median im Vergleich zur ersten Gruppe, einzelne Tiere wiesen auch hier wieder deutlich höher Werte auf.

Ergebnisse

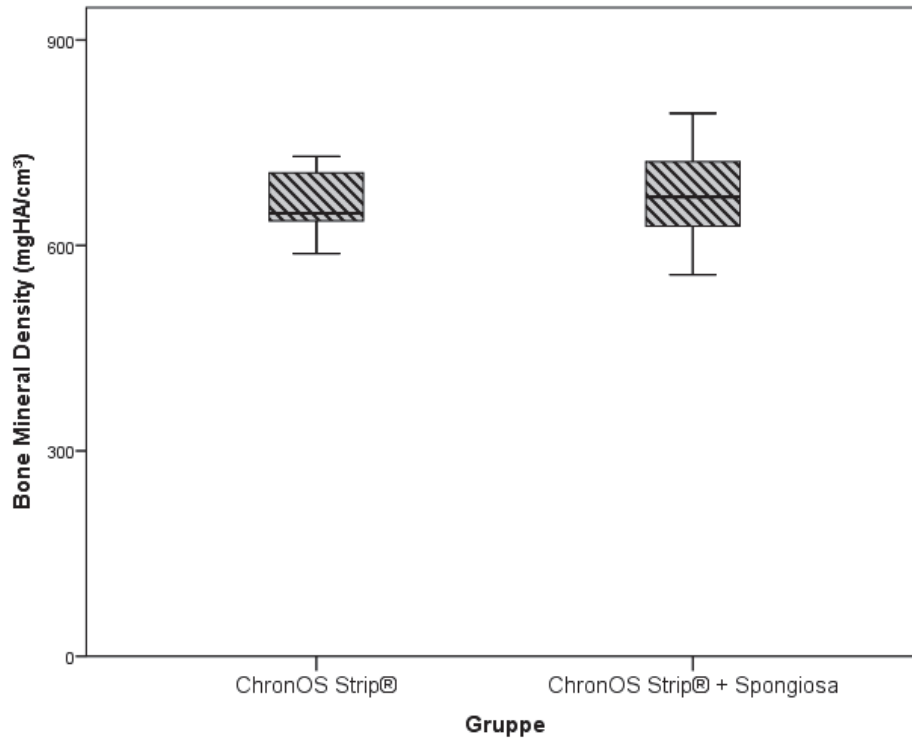


Abbildung 50: Darstellung der Bone Mineral Density (mgHA/cm³) in der Gesamt-ROI der HR-pQCT-Aufnahmen
p-Wert bezieht sich auf den U-Test nach Mann-Whitney mit Gruppe 1 ($p \leq 0,05$) (pro Gruppe n=6)

Die BMD-Werte beider Gruppen waren ähnlich hoch.

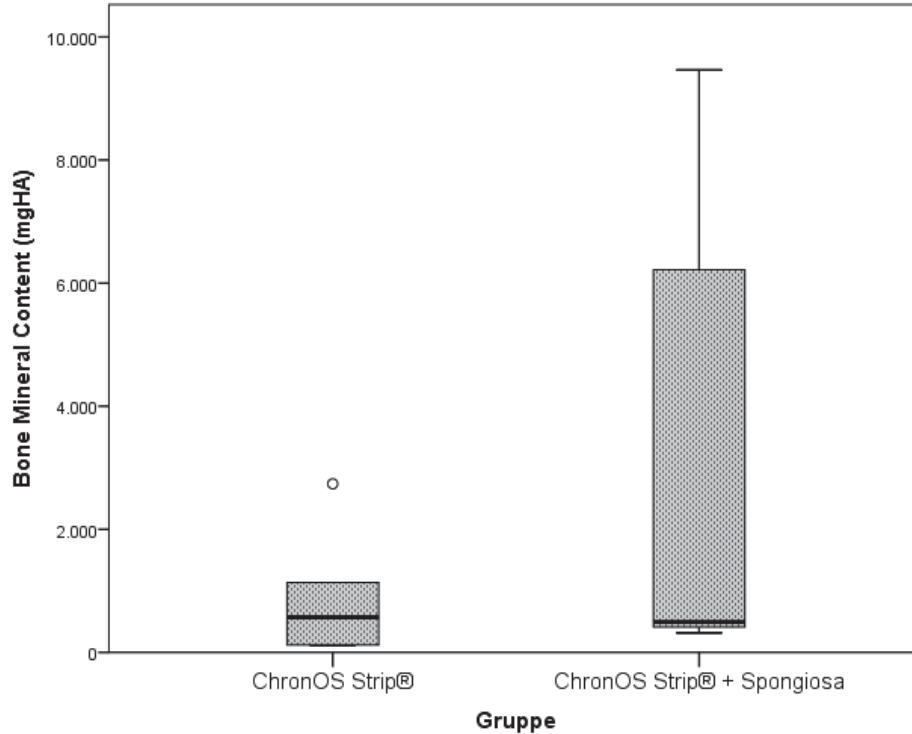


Abbildung 51: Darstellung des Bone Mineral Content (mgHA) in der Gesamt-ROI der HR-pQCT-Aufnahmen
p-Wert bezieht sich auf den U-Test nach Mann-Whitney mit Gruppe 1 ($p \leq 0,05$) (pro Gruppe n=6)

Beim BMC wiesen einige Tiere der Gruppe zwei eine stärkere Streuung zu höheren Werten auf (Abbildung 50).
Der Unterschied war statistisch nicht signifikant.

Tabelle 4: Darstellung analysierter Parameter in der Gesamt-VOI der HR-pQCT-Aufnahmen
p-Wert bezieht sich auf den U-Test nach Mann-Whitney mit Gruppe 1 ($p \leq 0,05$)

Parameter	ChronOS Strip®		ChronOS Strip® + Spongiosa		p-Wert
	Median	Min-Max	Median	Min-Max	
TV (mm³)	1730,9	376,8 – 10.875,8	2693,7	1779,9 – 16.343,4	0,240
BV (mm³)	827,1	169,5 – 4660,1	829,7	451,0 - 11.936,2	0,589
BV/TV	0,5	0,2 – 0,5	0,4	0,3 – 0,7	0,818
BMD (mgHA/cm³)	646,9	588,0 – 730,0	670,8	557,2 – 793,1	1,00
BMC (mgHA)	569,9	116,7 – 2740,0	493,7	316,1 – 9466,0	0,699

4.3.2 Ergebnisse der Mikro-CT-Untersuchungen

Die Ergebnisse dieser Messungen werden einzeln aufgeführt. Die Darstellung der Parameter erfolgt mit absoluten Zahlen (mm³), da immer die gleiche Anzahl an Slices vermessen wurde.

Ergebnisse der proximalen ROI

Bei der Analyse der kritischen Osteotomiedefekte in der Proximalen ROI im Mikro-CT wies die zweite Gruppe ein signifikant größeres TV im Vergleich zu Gruppe eins auf ($p=0,026$) (Abbildung 52). Das BV lag im Median in Gruppe zwei, geringfügig über dem der ersten Gruppe, zeigte allerdings eine größere Streuung mit vereinzelt höheren Werten in Gruppe zwei (Abbildung 53) ohne statistische Signifikanz. Beim Vergleich des BV/TV ergab sich für die zweite Gruppe ein niedrigerer Wert im Median im Vergleich zur Gruppe eins (Abbildung 54) jedoch ohne statistisch signifikant zu sein. Beide Gruppen unterschieden sich nicht in der BMD (Abbildung 55). Beim BMC wies Gruppe zwei eine stärkere Streuung der Werte hin zu einem höheren BMC auf, allerdings ergab sich im Vergleich zur ersten Gruppe kein statistisch signifikanter Unterschied (Abbildung 56).

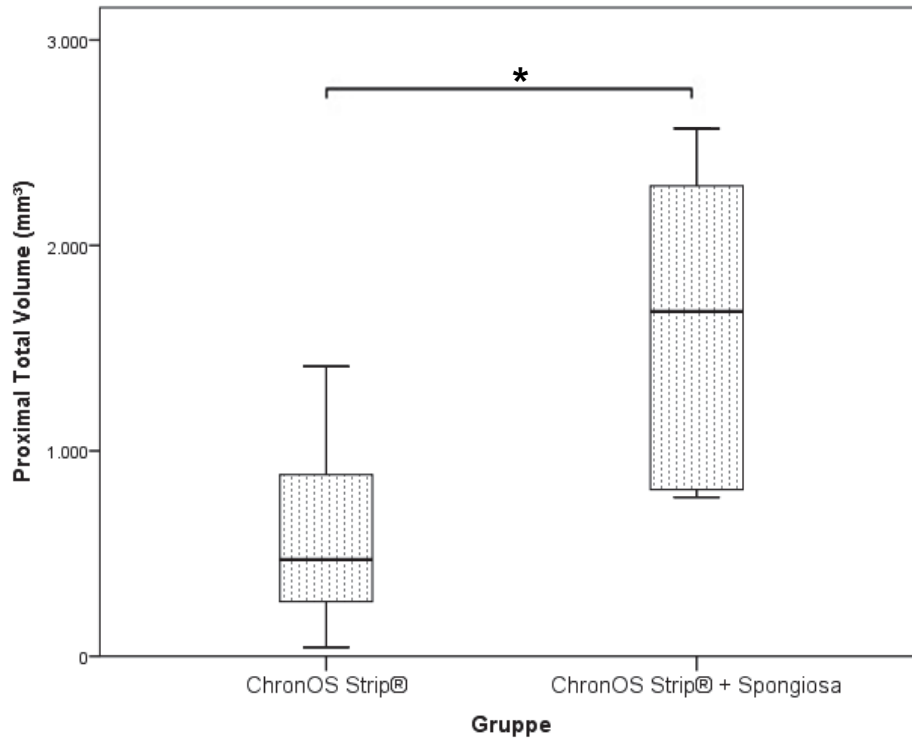


Abbildung 52: Darstellung des Total Volume (mm^3) in der proximalen ROI der Mikro-CT-Aufnahmen
 p-Wert bezieht sich auf den U-Test nach Mann-Whitney mit Gruppe 1 ($p \leq 0,05$) (pro Gruppe $n=6$)
 Die zweite Gruppe zeigte ein signifikant größeres TV im Vergleich zu Gruppe eins ($p=0,026$).

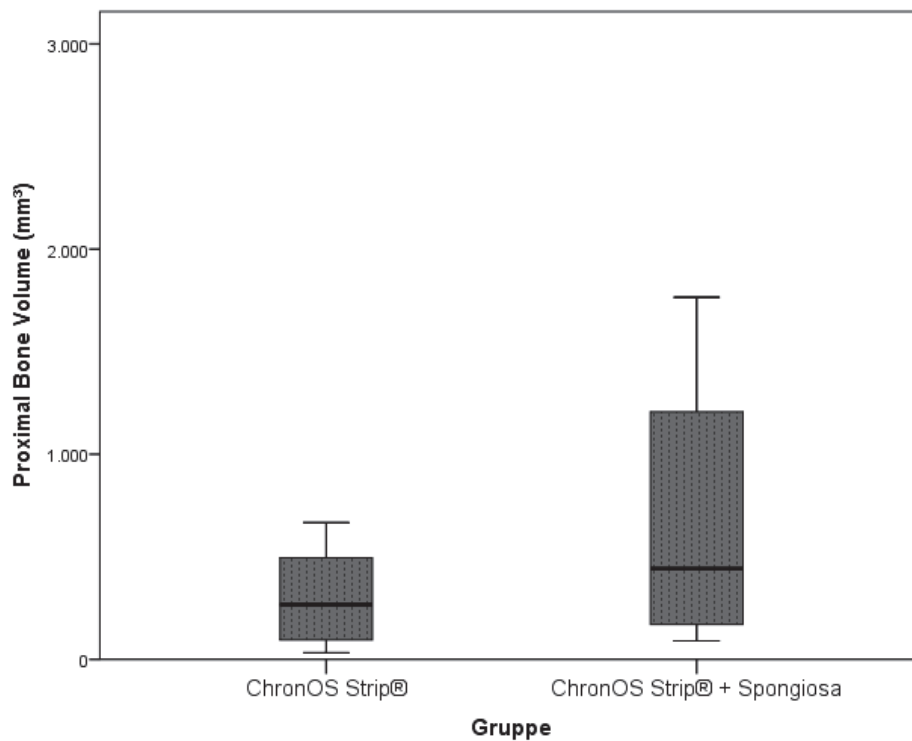


Abbildung 53: Darstellung des Bone Volume (mm^3) in der proximalen ROI der Mikro-CT-Aufnahmen
 p-Wert bezieht sich auf den U-Test nach Mann-Whitney mit Gruppe 1 ($p \leq 0,05$) (pro Gruppe $n=6$)
 Das BV lag im Median in der zweiten Gruppe geringfügig über dem der ersten Gruppe und zeigte eine größere Streuung mit vereinzelt höheren Werten in Gruppe zwei ohne statistische Signifikanz.

Ergebnisse

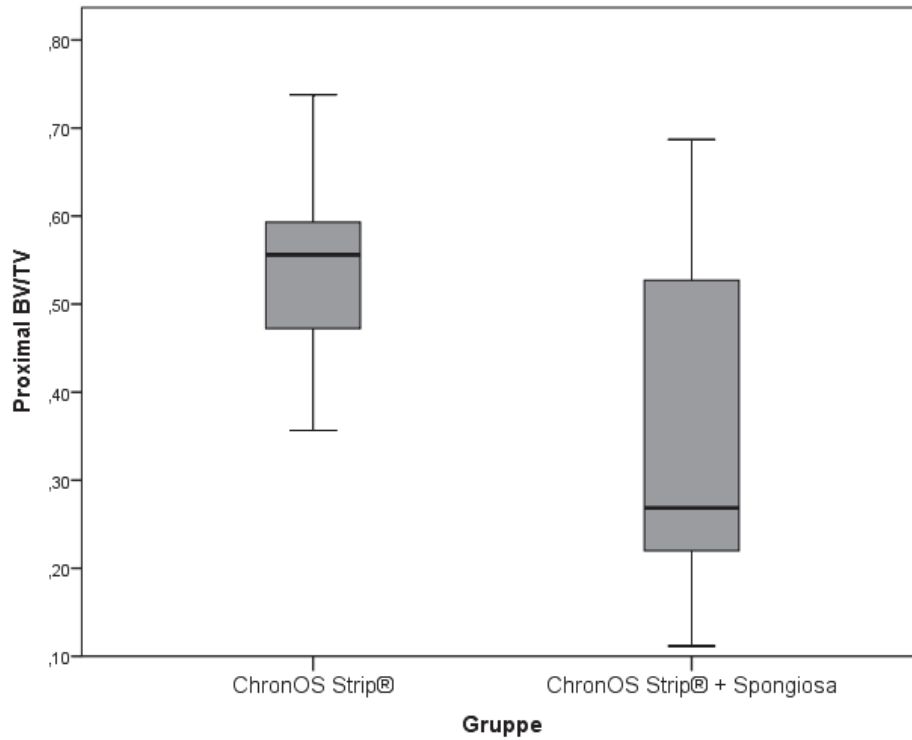


Abbildung 54: Darstellung des Quotienten BV/TV in der proximalen ROI der Mikro-CT-Aufnahmen
p-Wert bezieht sich auf den U-Test nach Mann-Whitney mit Gruppe 1 ($p \leq 0,05$) (pro Gruppe $n=6$)
Beim BV/TV ergab sich für die zweite Gruppe ein niedrigerer Wert im Median im Vergleich zur Gruppe eins ohne statistische Signifikanz.

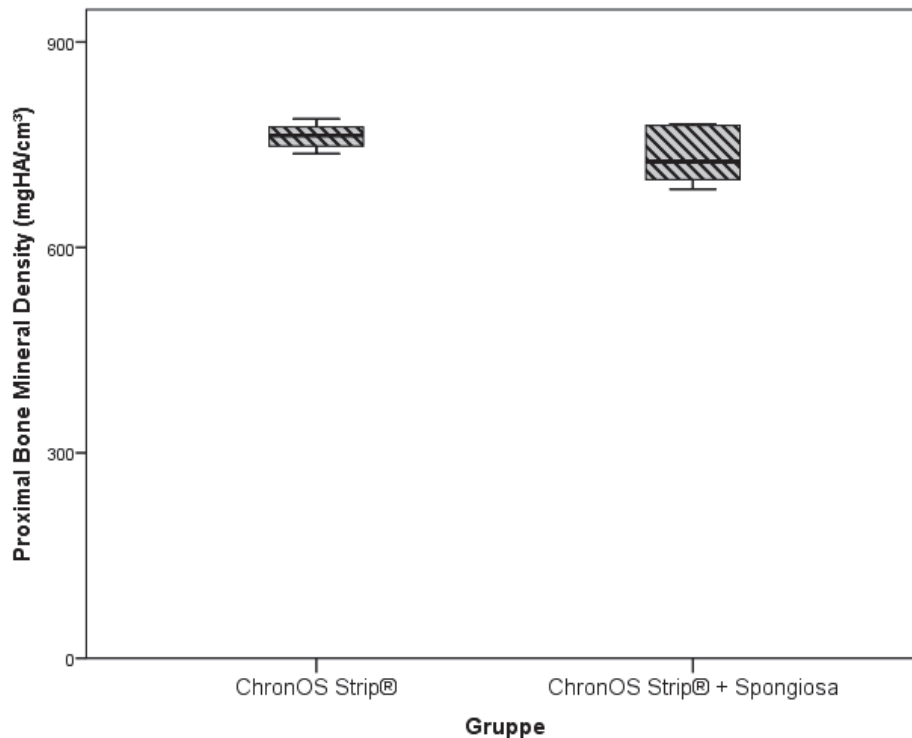


Abbildung 55: Darstellung der Bone Mineral Density (mgHA/cm^3) in der proximalen ROI der Mikro-CT-Aufnahmen
p-Wert bezieht sich auf den U-Test nach Mann-Whitney mit Gruppe 1 ($p \leq 0,05$), (pro Gruppe $n=6$)
Die beiden Gruppen unterschieden sich nicht in der BMD.

Ergebnisse

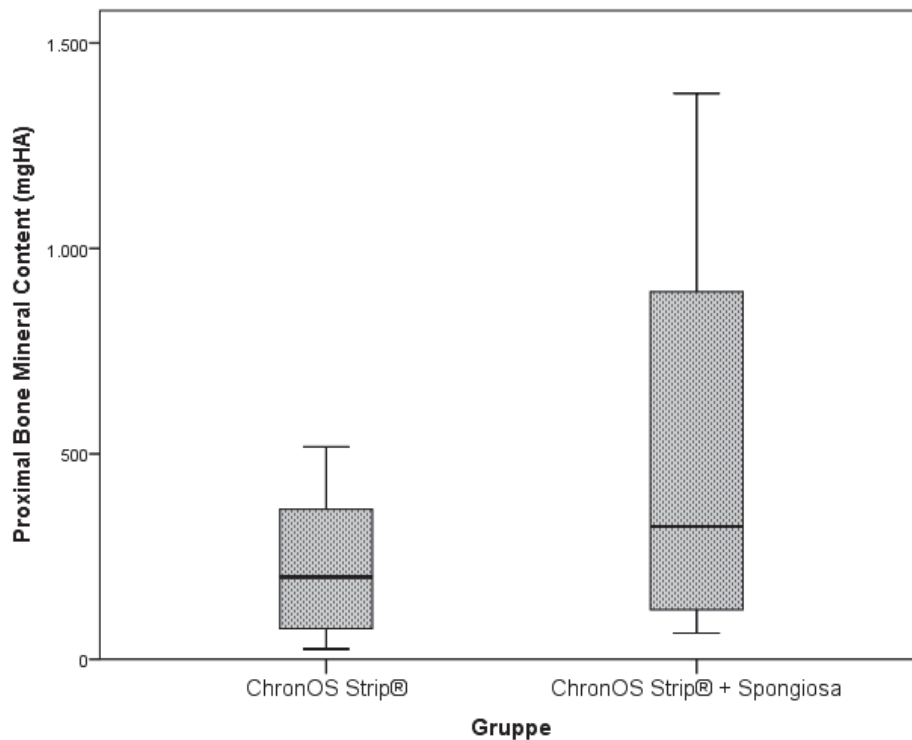


Abbildung 56: Darstellung des Bone Mineral Content (mgHA) in der proximalen ROI der Mikro-CT-Aufnahmen

p-Wert bezieht sich auf den U-Test nach Mann-Whitney mit Gruppe 1 ($p \leq 0,05$) (pro Gruppe $n=6$)

Gruppe zwei zeigte beim BMC eine stärkere Streuung der Werte hin zu einem höheren BMC auf, jedoch ergab sich im Vergleich zur Gruppe eins kein statistisch signifikanter Unterschied.

Tabelle 5: Darstellung analysierter Parameter in der proximalen VOI der Mikro-CT-Aufnahmen

p-Wert bezieht sich auf den U-Test nach Mann-Whitney mit Gruppe 1 ($p \leq 0,05$)

Parameter	ChronOS Strip®		ChronOS Strip® + Spongiosa		p-Wert
	Median	Min-Max	Median	Min-Max	
prox. TV (mm ³)	470,7	43,5 – 1411,4	1678,1	773,4 – 2568,9	0,026
prox. BV (mm ³)	267,4	32,1 - 666,6	442,9	90,7 - 1764,8	0,485
prox. BV/TV	0,6	0,4 – 0,7	0,3	0,1 – 0,7	0,093
prox. BMD (mgHA/cm ³)	763,4	736,8 - 787,8	725,4	685,0 - 780,5	0,310
prox. BMC (mgHA)	200,7	24,9 - 517,0	323,1	63,4 -1377,4	0,485

Ergebnisse der distalen ROI

Die zweite Gruppe wies auch in der distalen ROI ein signifikant größeres TV im Vergleich zur ersten Gruppe auf (Abbildung 57). Das BV lag auch distal im Median in Gruppe zwei geringfügig über dem der ersten Gruppe mit einer stärkeren Streuung hin zu höheren Werten im Vergleich zur Gruppe eins (Abbildung 58). Beim Vergleich des BV/TV ergab sich für die zweite Gruppe ein niedrigerer Wert im Median im Vergleich zur Gruppe eins (Abbildung 59). Kein Unterschied zeigte sich im BMD (Abbildung 60). Im BMC wies Gruppe zwei allerdings eine stärkere Streuung zu höheren Werten auf (Abbildung 61), jedoch ohne statistische Signifikanz.

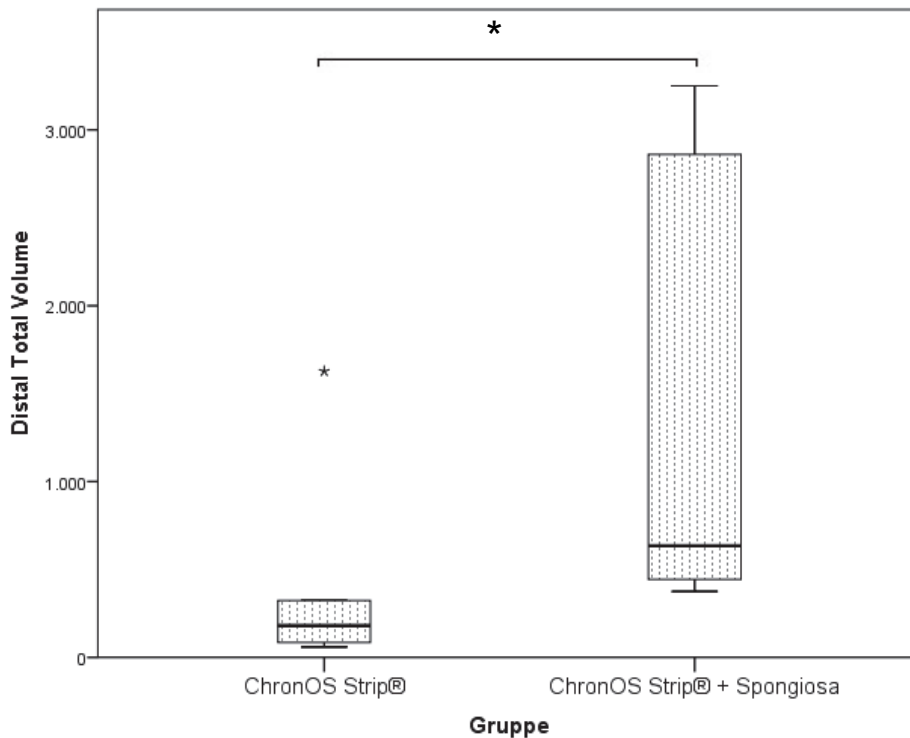


Abbildung 57: Darstellung des Total Volume (mm^3) in der distalen ROI der Mikro-CT-Aufnahmen, p-Wert bezieht sich auf den U-Test nach Mann-Whitney mit Gruppe 1 ($p \leq 0,05$) (pro Gruppe $n=6$). Auch in der distalen ROI wies die zweite Gruppe ein signifikant höheres TV auf ($p=0,026$).

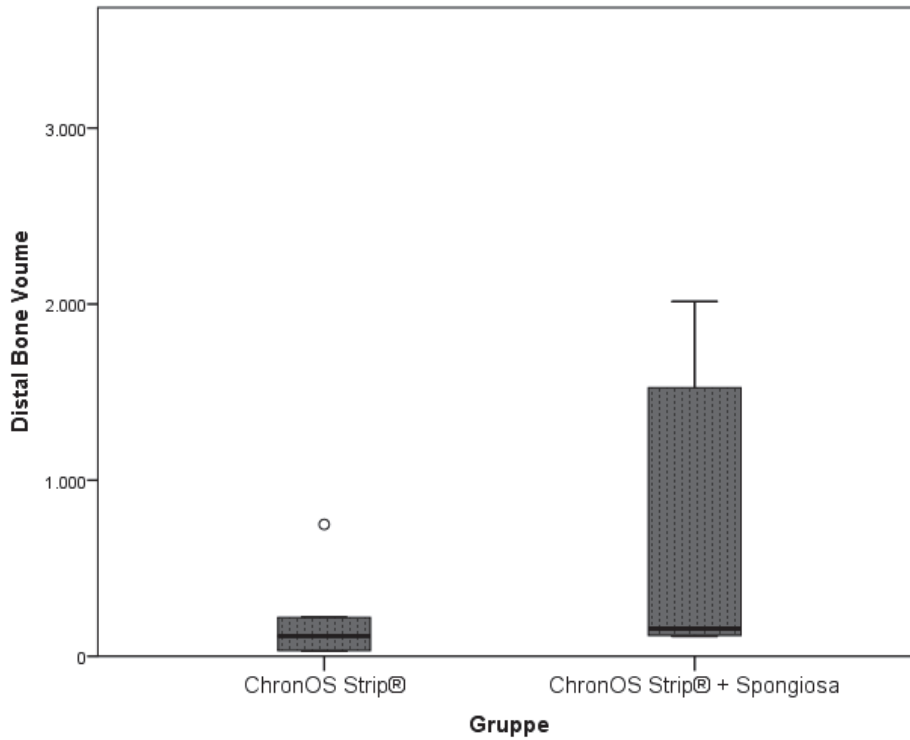


Abbildung 58: Darstellung des Bone Volume (mm³) in der distalen ROI der Mikro-CT-Aufnahmen
 p-Wert bezieht sich auf den U-Test nach Mann-Whitney mit Gruppe 1 ($p \leq 0,05$) (pro Gruppe n=6)

Das BV lag auch in der distalen ROI im Median in der zweiten Gruppe geringfügig über dem der ersten Gruppe mit einer stärkeren Streuung hin zu höheren Werten im Vergleich zur Gruppe eins, ohne statistisch signifikanten Unterschied.

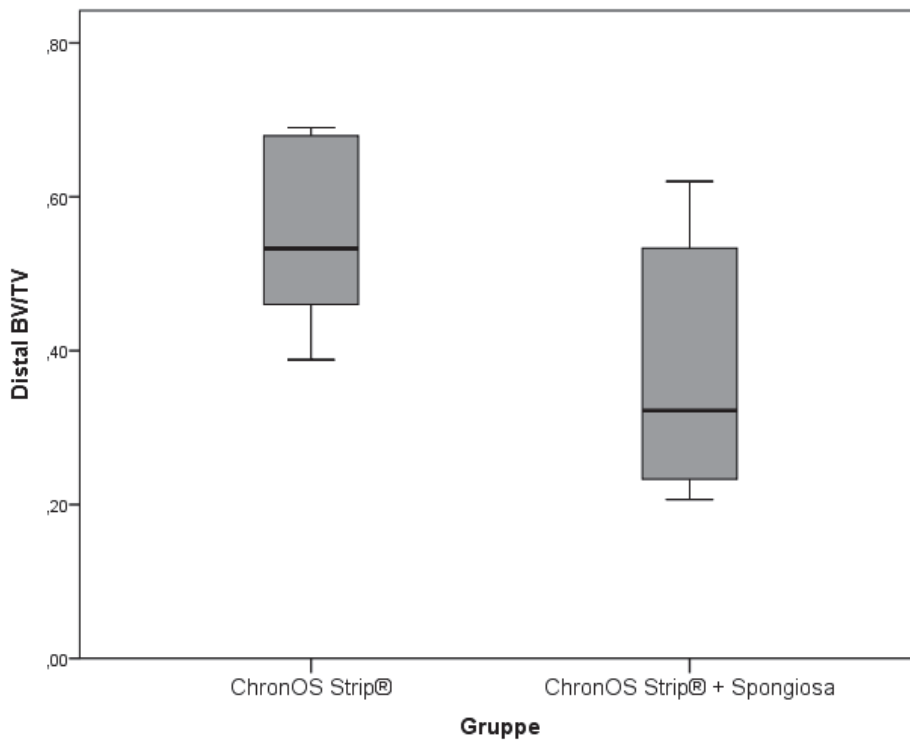


Abbildung 59: Darstellung des Quotienten BV/TV in der distalen ROI der Mikro-CT-Aufnahmen
 p-Wert bezieht sich auf den U-Test nach Mann-Whitney mit Gruppe 1 ($p \leq 0,05$) (pro Gruppe n=6)

Beim Vergleich des BV/TV ergab sich für Gruppe zwei ein niedrigerer Wert im Median im Vergleich zur Gruppe eins jedoch ohne statistische Signifikanz.

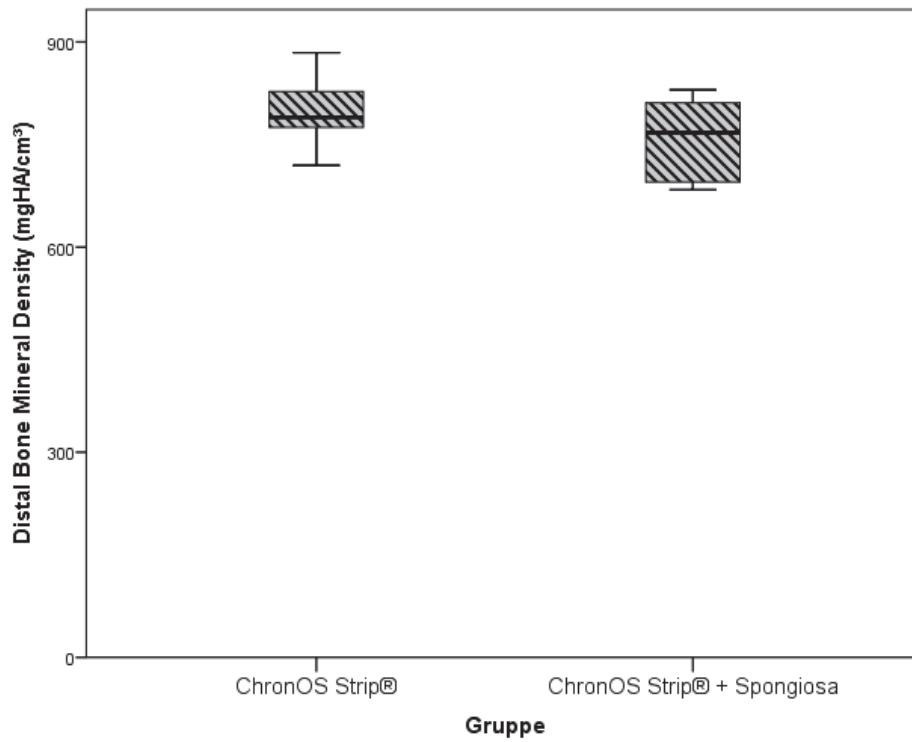


Abbildung 60: Darstellung der Bone Mineral Density (mgHA/cm³) in der distalen ROI der Mikro-CT-Aufnahmen
 p-Wert bezieht sich auf den U-Test nach Mann-Whitney mit Gruppe 1 (p≤0,05) (pro Gruppe n=6)
 Bei BMD zeigte sich kein Unterscheid zwischen den Gruppen.

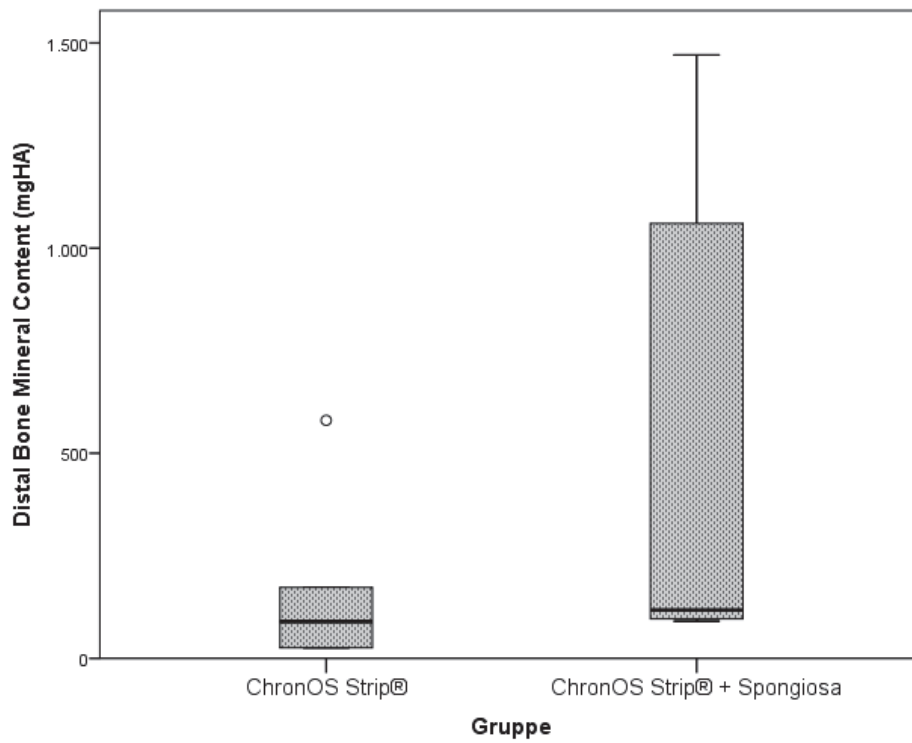


Abbildung 61: Darstellung des Bone Mineral Content (mgHA) in der distalen ROI der Mikro-CT-Aufnahmen
 p-Wert bezieht sich auf den U-Test nach Mann-Whitney mit Gruppe 1 (p≤0,05) (pro Gruppe n=6)
 Im BMC wies Gruppe zwei eine stärkere Streuung zu höheren Werten auf, jedoch ohne statistische Signifikanz.

Ergebnisse

Tabelle 6: Darstellung analysierter Parameter in der distalen VOI der Mikro-CT-Aufnahmen
(pro Gruppe n=6); p-Wert bezieht sich auf den U-Test nach Mann-Whitney mit Gruppe 1 ($p \leq 0,05$)

Parameter	ChronOS Strip®		ChronOS Strip® + Spongiosa		p- Wert
	Median	Min-Max	Median	Min-Max	
dist. TV (mm³)	181,1	59,2 - 1627,4	635,5	375,5 - 3250,7	0,026
dist. BV (mm³)	114,9	29,4 - 748,7	157,1	112,9 - 2015,5	0,240
dist. BV/TV	0,5	0,4 - 0,7	0,3	0,2 - 0,6	0,093
dist. BMD (mgHA/cm³)	789,6	719,6 - 884,1	767,3	683,9 - 830,0	0,589
dist. BMC (mgHA)	90,0	26,0 - 580,2	118,1	90,8 - 1470,7	0,240

4.4 Ergebnisse der Histologie

4.4.1 Histomorphologische Evaluation

Zur histomorphologischen Evaluation wurden die in PMMA eingebetteten Präparate in der Movat-Pentachrom-Färbung, der kombinierten Safranin Orange/von Kossa-Färbung und in der Trichromfärbung nach Masson und Goldner betrachtet. Es gingen beide Gruppen mit je sechs Tieren in die Auswertung ein. Die angefertigten Schnitte verliefen longitudinal und mid-diaphysär durch die Schafstibia. Die Kortikalis grenzte jeweils proximal und distal dem 40 mm Osteotomiespalt an. Durch den zentralen Anschnitt stellte sie sich als jeweils zwei durch den Markraum getrennte Rechtecke dar. Zentral im Präparat befand sich der Osteotomiespalt mit dem eingebrachten Scaffold. Durch die hohlzylindrische Form und den zentral gewählten Anschnitt stellte sich dieser meist als eine aus zwei Streifen bestehende, von proximal nach distal verlaufende Struktur dar. Durch seine offenporige Struktur und die teilweise präparationsbedingte Herauslösung des Scaffoldmaterials aus dem umliegenden Gewebe erschien der Scaffold als löchriger Streifen mit Kontakt zu den angrenzenden Kortikales, deren Poren von Bindegewebe und teilweise von Knochen durchwachsen waren.

Sämtliche Tiere der ersten Gruppe und vier Tiere der zweiten Gruppe wiesen überwiegend Bindegewebe im Osteotomiespalt auf. Dabei handelte es sich hauptsächlich um lockeres Bindegewebe, das auf der Scaffoldoberfläche und durch dessen Poren hindurchgewachsen und stellenweise mit faserreichem, strangartig verlaufendem Bindegewebe durchsetzt war. Zwischen diesen Bindegewebsfasern lagen spindelförmig die Zellkörper der Fibrozyten und rundlich erscheinenden Fibroblasten (Abbildung 62 und Abbildung 63).

Insgesamt hatte sich in der zweiten Gruppe mehr knöcherner Kallus gebildet, der hauptsächlich von Kortikalis und Periost ausging (Abbildung 64). Von endostal hatte sich insgesamt deutlich weniger knöcherner Kallus gebildet. Er war vielmehr an der proximalen Kortikalis in Form von feinen Geflechtknochenbälkchen lokalisiert und ragte in den Markraum (Abbildung 76). Bei zwei Tieren der zweiten Gruppe war es zu einer Überbrückung des Defektes mit knöchernem Kallus gekommen. Dabei machte Geflechtknochen den Hauptgewebeanteil im Defektbereich aus und hatte den Scaffold großflächig durchwachsen. Bei diesen beiden Tieren schien sich das knöcherne Kallusgewebe von periostal nach endostal an der inneren und äußeren Scaffoldoberfläche und auch quer dazu ausgebreitet zu haben und bestand vor allem aus lockerem Geflechtknochen, der im lateralen Bereich stellenweise bereits zu kompaktem, lamellärem Knochen umgeformt war (Abbildung 64). Dabei war ein schmaler Streifen des Scaffoldmaterials frei von Knochengewebe geblieben und dort nur bindegewebig durchsetzt (Abbildung 66). Bei dem zweiten unilateral überbrückten Tier war der Scaffold lateral komplett von knöchernem Kallus durchwachsen und nur noch medial im Osteotomiespalt freies Scaffoldmaterial erkennbar.

In der ersten Gruppe hatte sich bei nur einem Tier neben Bindegewebe auch vermehrt knöchernes Kallusgewebe im Osteotomiespalt gebildet. Bei sämtlichen anderen Tieren beider Gruppen machte knöchernes Kallusgewebe einen geringeren Gewebeanteil im Defektbereich aus. Knöcherner Kallus bildete sich dort als von der lateralen Kortikalis ausgehende, auf die Gegenkortikalis zuwachsende, spitze Kallusformationen von wenigen Millimetern Breite. Diese Kallusausläufer waren immer von Bindegewebsfasern umgeben (Abbildung 71 und Abbildung 83). In beiden Gruppen war es jeweils bei vier Tieren lateral zu einer solchen Kallusformation von proximal und distal gekommen. Dabei war der distale Kallusausläufer bei drei Tieren der zweiten Gruppe deutlich länger als der proximale und reichte weit in den Osteotomiebereich hinein (Abbildung 75). Bei einem Tier der ersten Gruppe gab es nur proximal und bei einem anderen gar keine periostale Kallusbildung. Bei jeweils zwei Tieren beider Gruppen hatte sich auf der Schnittkante der distalen Kortikalis endostaler Kallus gebildet und kleine, spitz zulaufende Kallusstrukturen geformt (Abbildung 77). Die Markhöhle war mit Fettgewebe gefüllt und stellenweise waren feine Kallusausläufer zu beobachten (Abbildung 76). Durch Bildung endostalen Kallus kam es bei drei Tieren in Gruppe 1 und einem Tier der Gruppe 2 an der angrenzenden Kortikalis proximal und/oder distal zum Markraumschluss durch eine Schicht aus Geflechtknochen.

In beiden Gruppen war die Anzahl von dunkel gefärbten Osteozyten im Geflechtknochen im Vergleich zur Kortikalis deutlich höher (Abbildung 72). In der zweiten Gruppe waren der Geflechtknochen und seine Trabekel dichter angeordnet als bei der ersten Gruppe (Abbildung 69) und größtenteils mit lockerem, stellenweise auch mit hämatopoetischem Bindegewebe aufgefüllt (Abbildung 71). An den Rändern der Knochen trabekel befanden sich meist kettenartig aufgereiht Osteoblasten, die eine Schicht unmineralisierten Osteoids bildeten (Abbildung 72 und Abbildung 73). Auch Osteoklasten waren im Knochengewebe in beiden Gruppen beim Umbau von Knochengewebe zu beobachten (Abbildung 74), wobei deren Vorkommen in der zweiten Gruppe gehäuft erschien.

Der Scaffold war bei allen Tieren beider Gruppen vollständig von Bindegewebe umgeben und durch seine Poren von diesem durchwachsen. Auf seiner Oberfläche im angrenzenden Bindegewebe waren auffällig viele Riesenzellen (Größe 100 – 150 μm ; mindestens 2 Kerne) nachweisbar, die den Scaffold abbauten. Intrazellulär war in einer Vielzahl der Riesenzellen das kristalline Scaffoldmaterial sichtbar (Abbildung 62 und Abbildung 78). Des Weiteren waren im Bereich des Scaffolds im Bindegewebe stets kleine Gefäße sichtbar, die häufig mit Erythrozyten gefüllt waren. In beiden Gruppen waren stellenweise Erythrozyten außerhalb des Gefäßlumens im Bindegewebe in wolkenartigen Ansammlungen formiert und Anhäufungen von Lymphozyten und Plasmazellen zu erkennen (Abbildung 79).

Der Scaffold war bei einem Tier der ersten Gruppe nach medial disloziert, bei zwei anderen Tieren war er leicht geknickt, sodass stellenweise kein Scaffoldmaterial in der Schnittebene

zu beobachten war. In der zweiten Gruppe war der Scaffold bei einem Tier leicht disloziert. An diesen Stellen hatte sich Bindegewebe gebildet, bei einem dieser Tiere auch knöcherner Kallus.

In beiden Gruppen war bei einzelnen Tieren hyaliner Knorpel mit beginnender Mineralisation als Zeichen einer indirekten Ossifikation sichtbar. Dabei war nur wenig hyaliner Knorpel gebildet worden und trat bei drei Tieren der ersten ganz vereinzelt und bei zwei Tieren der zweiten Gruppe als breiter Streifen auf. Zwei Tiere der ersten Gruppe wiesen hypertrophe Chondrozyten inselartig eingemauert zwischen Geflechtknochenbälkchen auf (Abbildung 74), wohingegen bei einem dritten Tier hypertrophe Chondrozyten als Kappe auf einer spitz zulaufenden Kallusformation zu erkennen waren. In Gruppe zwei war bei den beiden Schafen mit unilateral, knöchern überbrücktem Osteotomiespalt querverlaufend ein breiter Streifen hyalinen Knorpels zu beobachten, der proximal zur distalen Kortikalis verlief (Abbildung 66). Bei einem Tier war dieser Streifen sehr viel breiter als bei dem anderen und bestand bei beiden aus einer homogenen Schicht hyalinen Knorpels, der sich stellenweise säulenartig formierte und mittig durch fortschreitende Mineralisation verjüngte (Abbildung 80). Zusätzlich gab es bei den beiden Tieren endostal, im Bereich des Übergangs von knöchernem Kallus zum bindegewebig durchsetzten Scaffoldstreifen weitere Stellen mit einzelnen hyalinen Knorpelzellinseln zwischen den Geflechtknochen trabekeln (Abbildung 65).

Die operativ gesetzte, scharfe Osteotomiekannte war bei fünf Tieren der Gruppe eins und lediglich zwei Tieren der zweiten Gruppe nach der zwölfwöchigen Heilungszeit abgerundet. Auf der Oberfläche der Kortikalis waren zahlreiche Osteoklasten in ihren Lakunen sichtbar, die den Knochen auflösten und die Kortikalis rau erscheinen ließen (Abbildung 81). Die Kortikalis bestand aus gleichmäßig mineralisiertem, dichtem Knochengewebe, welches regelmäßig von Haversschen und seltener von angeschnittenen Volkmannschen Kanälen durchzogen war, in denen vereinzelt eine endotheliale Auskleidung und rote Blutkörperchen erkennbar waren. Die Grenze zwischen Kortikalis und neu gebildetem knöchernem Kallus war bei den Tieren der Gruppe eins deutlicher sichtbar. Lediglich zwei Tiere wiesen eine aufgelockerte Struktur der dem Osteotomiespalt angrenzenden Kortikalis auf. In der zweiten Gruppe dagegen war, die Kortikalis bei allen Schafen stark aufgelockert, wodurch es deutlich schwieriger war eine klare Grenze zwischen kortikalem Knochen und neu gebildetem knöchernem Kallus zu differenzieren (Abbildung 68 und Abbildung 71). Erst in einigem Abstand zur Osteotomiekannte war die ursprünglich dichte und gleichmäßig mineralisierte Struktur der Kortikalis sowie Haverssche und Volkmannsche Kanäle am Anschnitt wieder klar erkennbar (Abbildung 75).

Zu einem leichten Muskelprolaps von lateral in den Osteotomiespalt kam es nur bei einem Tier der ersten Gruppe (Abbildung 71). Dabei war die Muskulatur bis zur endostalen Grenze der Kortikalis vorgefallen.

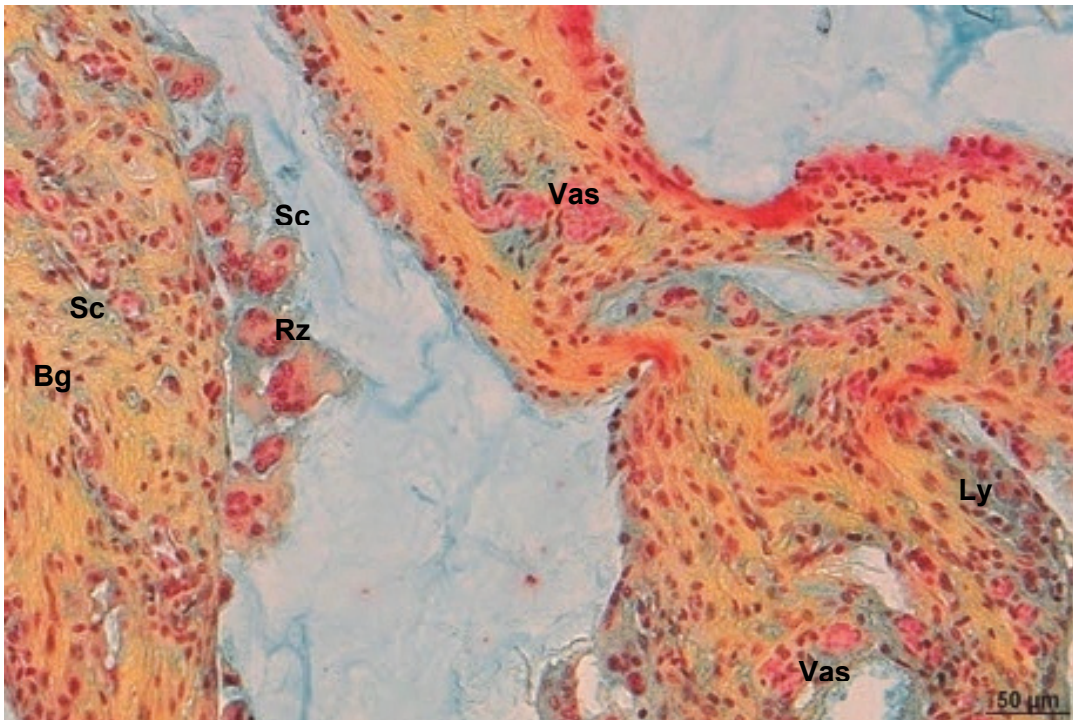


Abbildung 62: lockeres Bindegewebe und Riesenzellen an der Scaffoldoberfläche
(Movat-Pentachrom-Färbung, Schaf 5, Gruppe 1)

Lockeres Bindegewebe [Bg] auf der Scaffoldoberfläche, durchsetzt mit Riesenzellen [Rz], die gut an ihrer Größe und Mehrkernigkeit erkennbar waren. Auch kristallines Scaffoldmaterial [Sc] sowie Lymphozyten und Plasmazellen [Ly] waren im Bindegewebe gut sichtbar. Weiterhin waren im Bindegewebe verlaufende Gefäße [Vas], waren stellenweise mit Erythrozyten gefüllt.

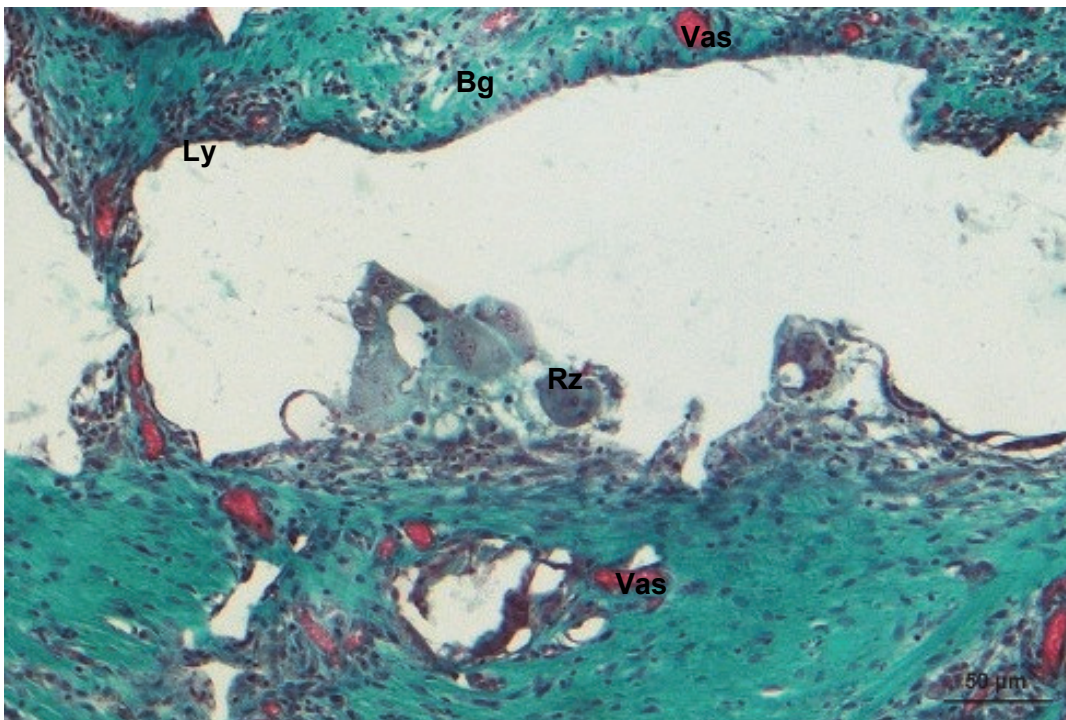


Abbildung 63: lockeres Bindegewebe und Riesenzellen an der Scaffoldoberfläche
(Masson-Goldner-Färbung, Schaf 4 Gruppe 1)

Lockeres Bindegewebe [Bg], das mit Riesenzellen [Rz], Lymphozyten [Ly] und Gefäßen [Vas] mit darin befindlichen Erythrozyten durchsetzt ist.

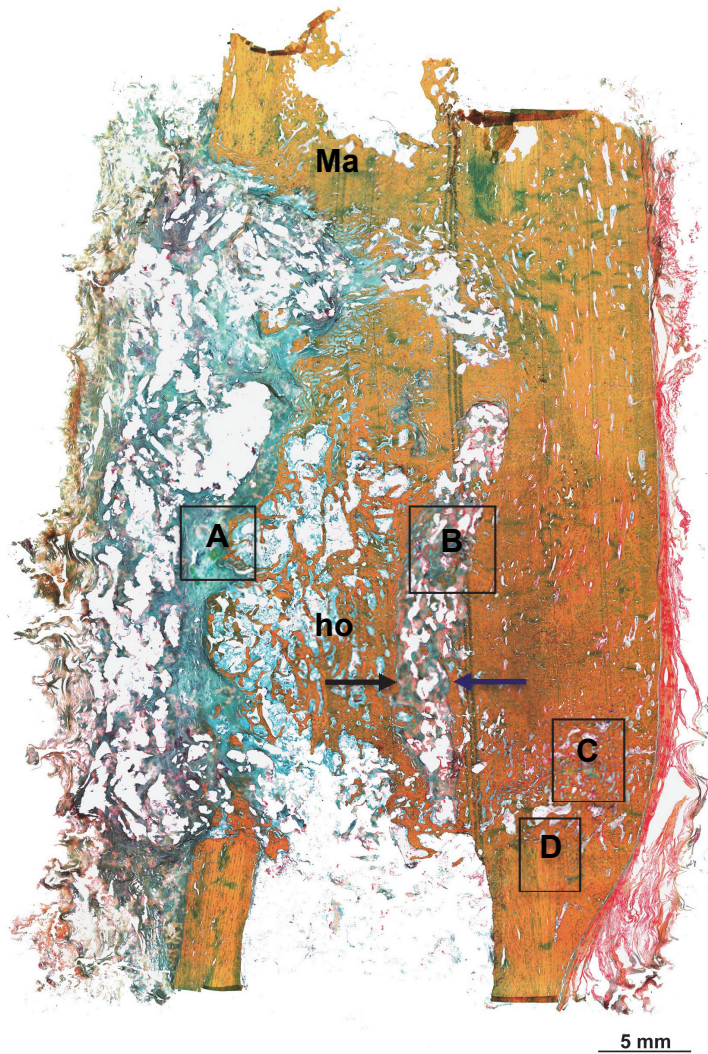


Abbildung 64: laterale knöcherne Überbrückung der Defektstrecke, medial bindegewebig durchwachsender Scaffoldstreifen

(Movat-Pentachrom-Färbung, Schaf 9, Gruppe 2)

Bei diesem Tier war es zu einer unilateralen Überbrückung des Defektes mit Kallus in Form von lockerem Geflechtknochen gekommen. Ein schmaler Streifen des Scaffolds war nur von feinen Knochen trabekeln durchzogen und vermehrt mit Bindegewebe durchsetzt (Ausschnitt B). Die hohlzylindrische Form des Scaffolds [ho] ist noch schemenhaft erkennbar und ist zentral und lateral von Geflechtknochen durchwachsen. Im lateralen Bereich war der Geflechtknochen stellenweise bereits zu kompaktem, lamellärem Knochen umgeformt. Der proximale Markraum [Ma] ist geschlossen. Die äußere [Blauer Pfeil] und innere [schwarzer Pfeil] Scaffoldoberfläche wird von knöchernem Kallus begrenzt.

[A] Vergrößerter Ausschnitt in Abbildung 65

[B] Vergrößerter Ausschnitt in Abbildung 66

[C] Vergrößerter Ausschnitt in Abbildung 67

[D] Vergrößerter Ausschnitt in Abbildung 68

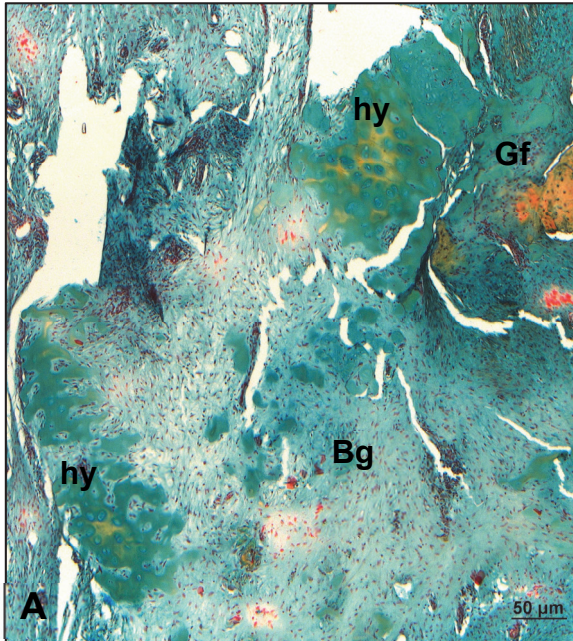


Abbildung 65: vergrößerter Bereich aus Abb. 63: hyaliner Knorpel inselartig im lockeren Bindegewebe verteilt (Movat-Pentachrom-Färbung, Schaf 9, Gruppe 2)

[hy] Chondrozyten, [Bg] lockeres Bindegewebe, [Gf] Geflechtknochen

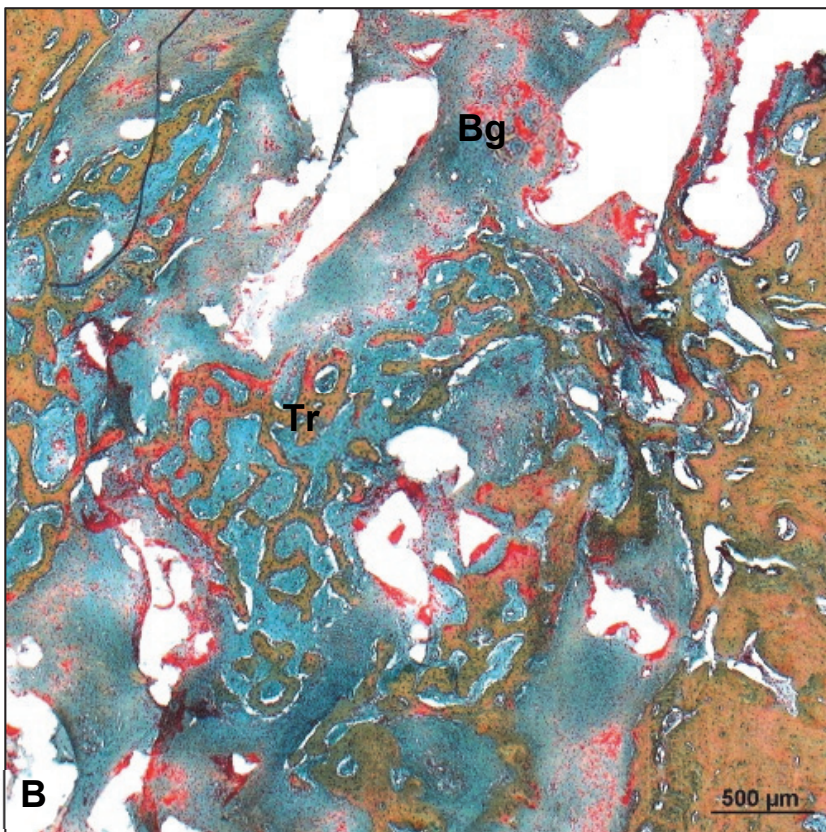


Abbildung 66: vergrößerter Bereich aus Abb. 63: Geflechtknochen trabekel im Scaffold (Movat-Pentachrom-Färbung, Schaf 9, Gruppe 2)

[Tr] dünne Geflechtknochen trabekel, die quer durch den [Bg] bindegewebig durchsetzten Scaffoldstreifen wachsen

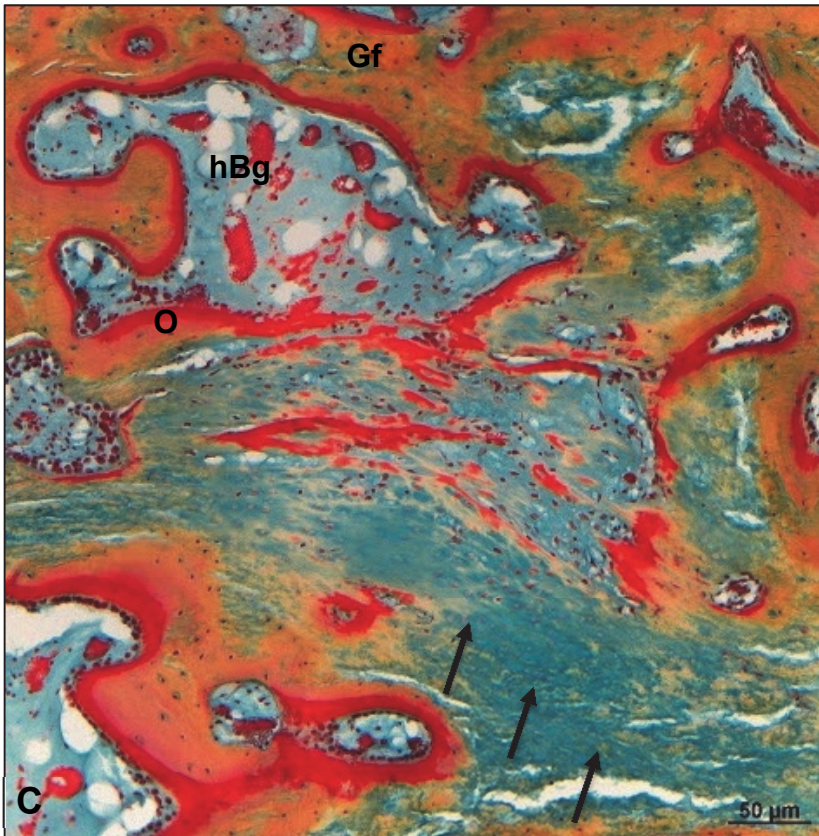


Abbildung 67: vergrößerter Bereich aus Abb. 63: von Geflechtknochentrabekeln umgebener Knorpelstreifen (schwarze Pfeile) über der distalen, lateralen Kortikalis (Movat-Pentachrom-Färbung, Schaf 9, Gruppe 2)
[Gf] mit Lakunen durchsetzter Geflechtknochen, [O] Osteoid mit Osteoblastensaum, [hBg] hämatopoetisches Bindegewebe

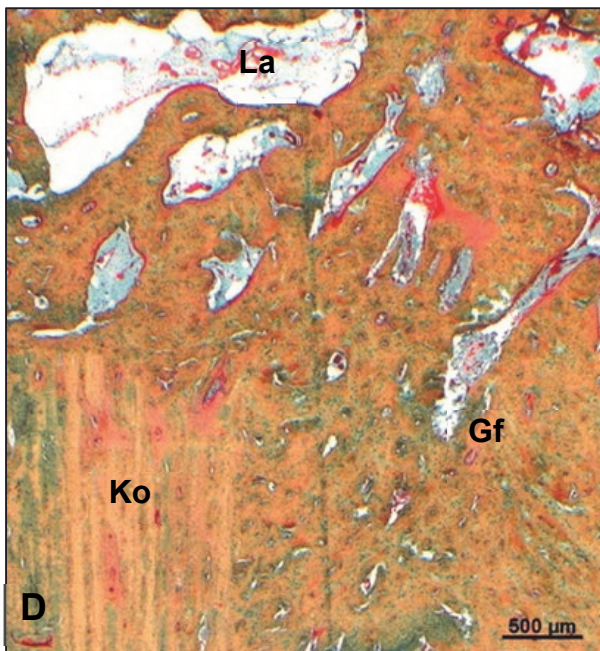


Abbildung 68: vergrößerter Bereich aus Abb. 63: Übergang von Kortikalis zum knöchernen Kallusgewebe (Movat-Pentachrom-Färbung, Schaf 9, Gruppe 2)
[Ko] kortikaler Knochen, [Gf] Geflechtknochen, [La] Lakunen mit hämatopoetischem Bindegewebe

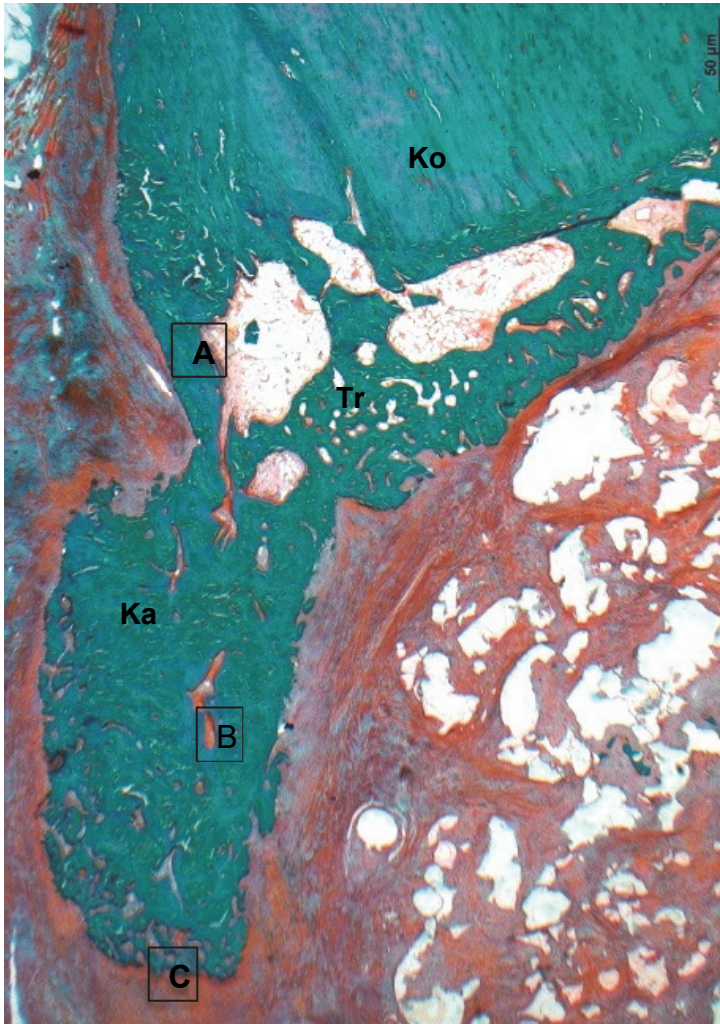


Abbildung 69: von proximal nach distal spitz zulaufende Kallusformation (Masson-Goldner-Färbung, Schaf 6, Gruppe 1)

Die Grenze zwischen Kortikalis und neu gebildetem knöchernen Kallus war bei den Tieren der Gruppe eins deutlicher sichtbar.

[Ko] Kortikalis

[Ka] spitz zulaufender Kallusausläufer von wenigen Millimetern Breite

[Tr] die Trabekel bestehen aus lockerem, unstrukturiertem Geflechtknochen, durchsetzt mit vielen [La] Lakunen

[A], [B] & [C] vergrößerte Ausschnitte in Abbildung 70

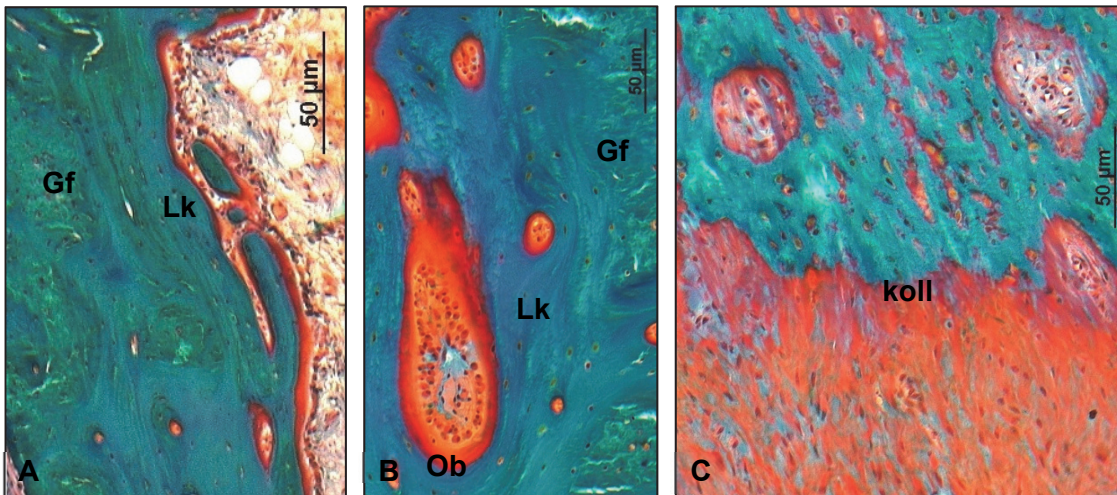


Abbildung 70: vergrößerte Bereiche aus Abb. 68: unstrukturierter Geflechtknochen, der stellenweise von kompakten Knochenlamellen durchzogen wird (Masson-Goldner-Färbung, Schaf 6, Gruppe 1)

[Gf] unstrukturierter Geflechtknochen, [Lk] kompakte Knochenlamellen mit eingemauerten Osteozyten, [Ob] Osteoid und Osteoblastensaum, [koll] direkt an Kallus inserierende kollagene Bindegewebsfasern

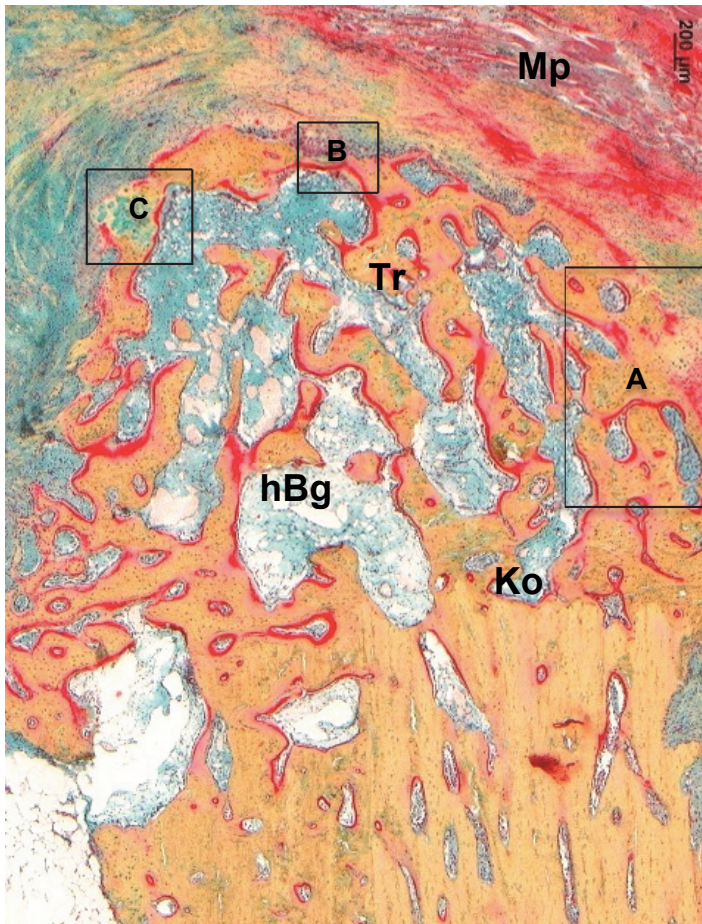


Abbildung 71: von der distalen Kortikalis nach proximal auslaufende Kallusformation aus Geflechtknochen (Movat-Pentachrom-Färbung, Schaf 4, Gruppe 1)

Stark aufgelockerte Kortikalis [Ko] am Übergang zum knöchernen Kallus, der hier zum großen Teil aus feinen Geflechtknochenbälkchen [Tr] besteht, die von lockerem, hämatopoetischen Bindegewebe [hBg] umgeben sind. Bei diesem Tier zeigt sich ein leichter [Mp] Muskelprolaps von lateral in den Osteotomiespalt.

[A] Vergrößerter Ausschnitt in Abbildung 72

[B] Vergrößerter Ausschnitt in Abbildung 73

[C] Vergrößerter Ausschnitt in Abbildung 74

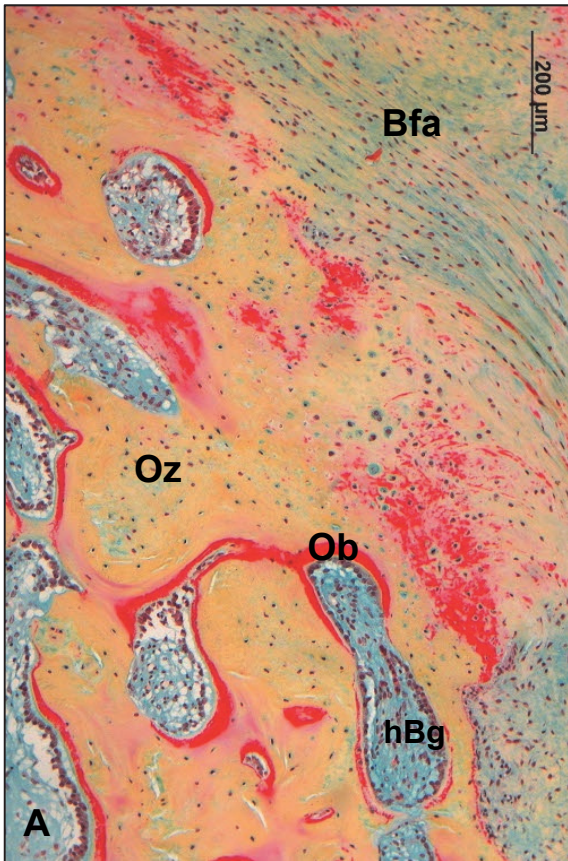


Abbildung 72: vergrößerter Bereich aus Abb. 70: Geflechtknochen trabekel mit Osteoid und Osteoblastensaum (Movat-Pentachrom-Färbung, Schaf 4, Gruppe 1) [Ob] Osteoidsaum, der von den dort anliegenden Osteoblasten synthetisiert wurde [Oz] eingemauerte Osteozyten [Bfa] straffe Bindegewebsfasern [hBg] lockeres, hämatopoetisches Bindegewebe zwischen Geflechtknochen trabekeln

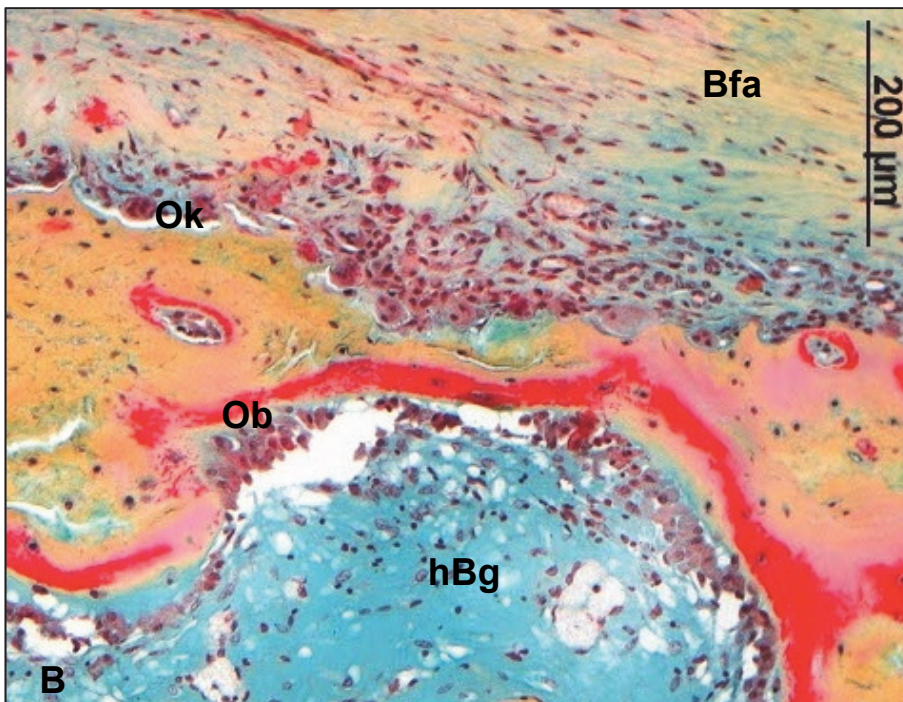


Abbildung 73: vergrößerter Bereich aus Abb. 70: Osteoklasten und Osteoblastensaum auf Geflechtknochenbälkchen

(Movat-Pentachrom-Färbung, Schaf 4, Gruppe 1)

[Ob] Osteoblasten mit Osteoidsaum, [Ok] Osteoklasten, [Bfa] Bindegewebsfasern umgeben knöchernes Kallusgewebe, [hBg] lockeres, hämatopoetisches Bindegewebe zwischen den Geflechtknochen trabekeln

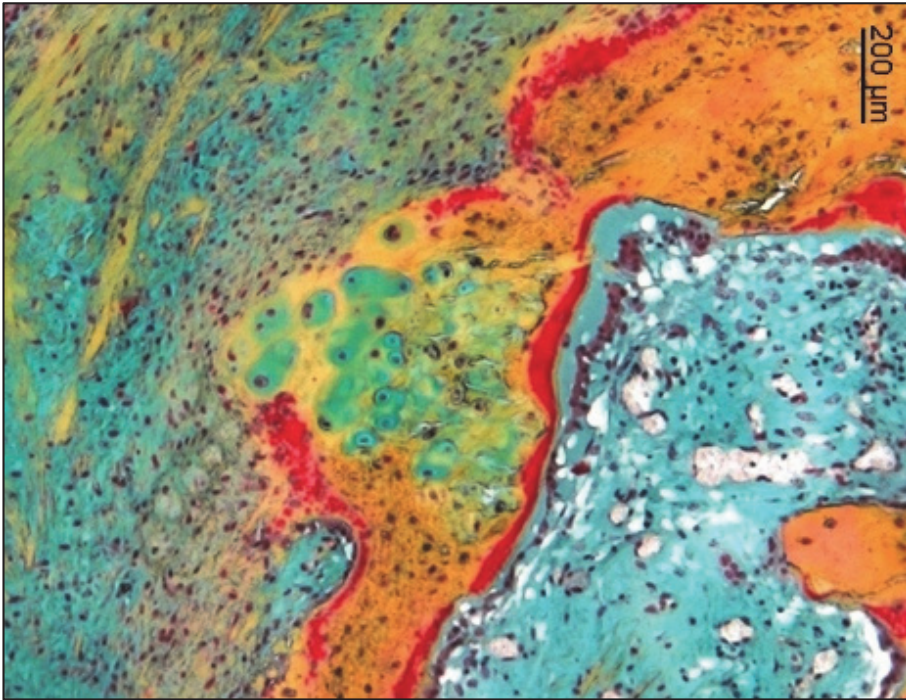


Abbildung 74: vergrößerter Bereich aus Abb. 70: Insel aus hyalinen Knorpelzellen in Geflechtknochenstrahlen (Movat-Pentachrom-Färbung, Schaf 23, Gruppe 1)

[hy] hyaline Chondrozyten, [Ob] Osteoid und Osteoblastensaum [Bfa] Bindegewebsfasern

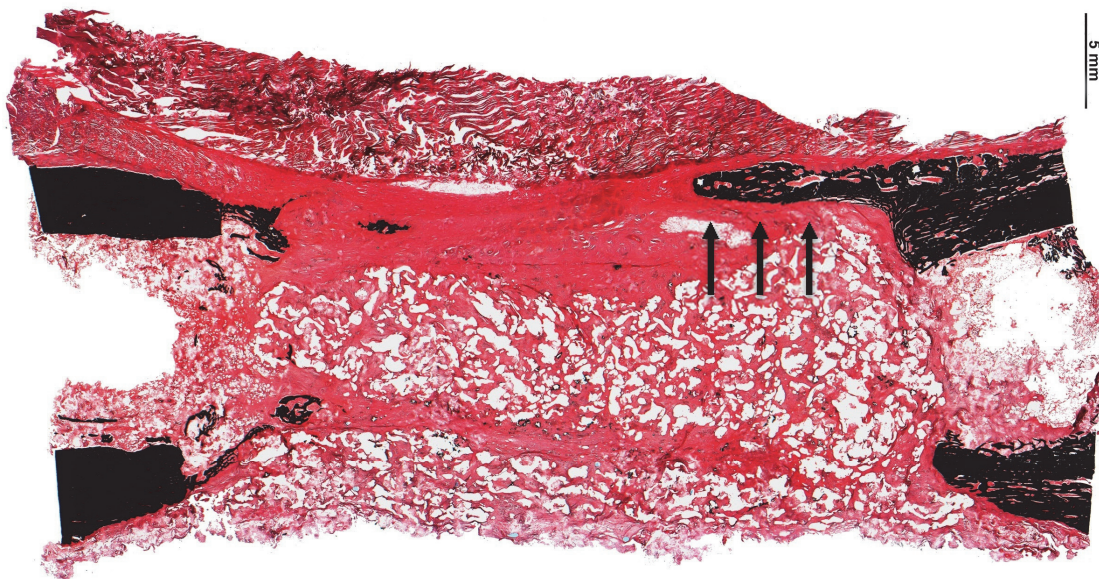


Abbildung 75: von periostal spitz zulaufende Kallusausläufer an den Kortikales (Safranin Orange/von Kossa-Färbung, Schaf 10, Gruppe 2)

[schwarze Pfeile] distaler Kallusausläufer, der auf die Gegenkortikalis zu wächst; distal stark aufgelockerte Kortikales

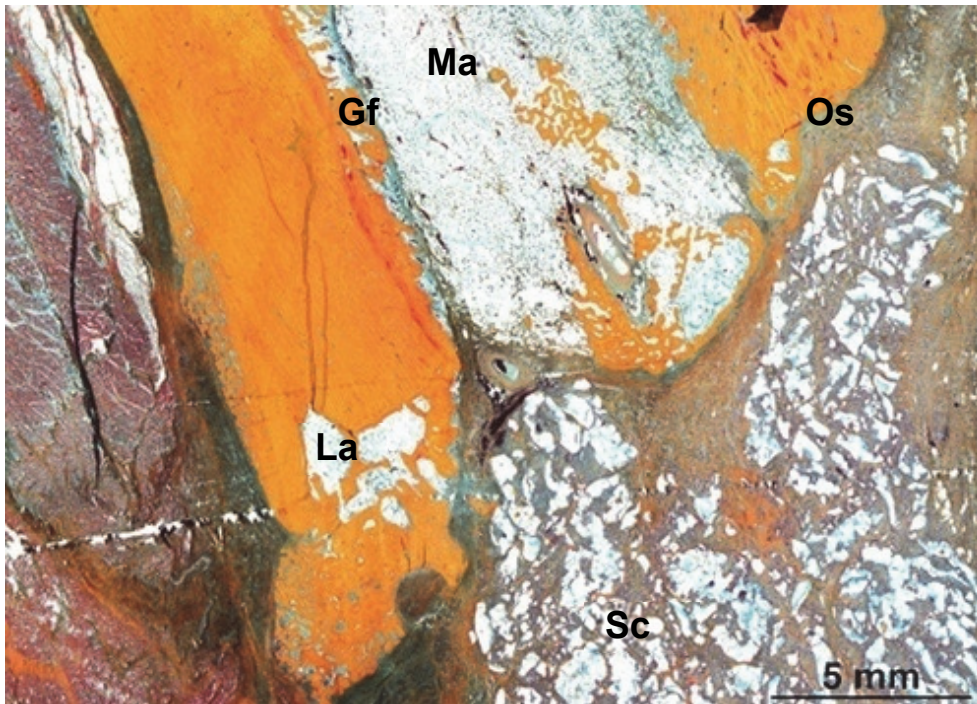


Abbildung 76: endostale Kallusbildung

(Movat-Pentachrom-Färbung, Schaf 6, Gruppe 1)

[Gf] Geflechtknochenbälkchen der proximalen Kortikalis, die in den [Ma] Markraum ragen, [Os] Osteotomiekannte
[La] Lakunen am Übergang von kortikalem Knochen zu Kallus, [Sc] Scaffold

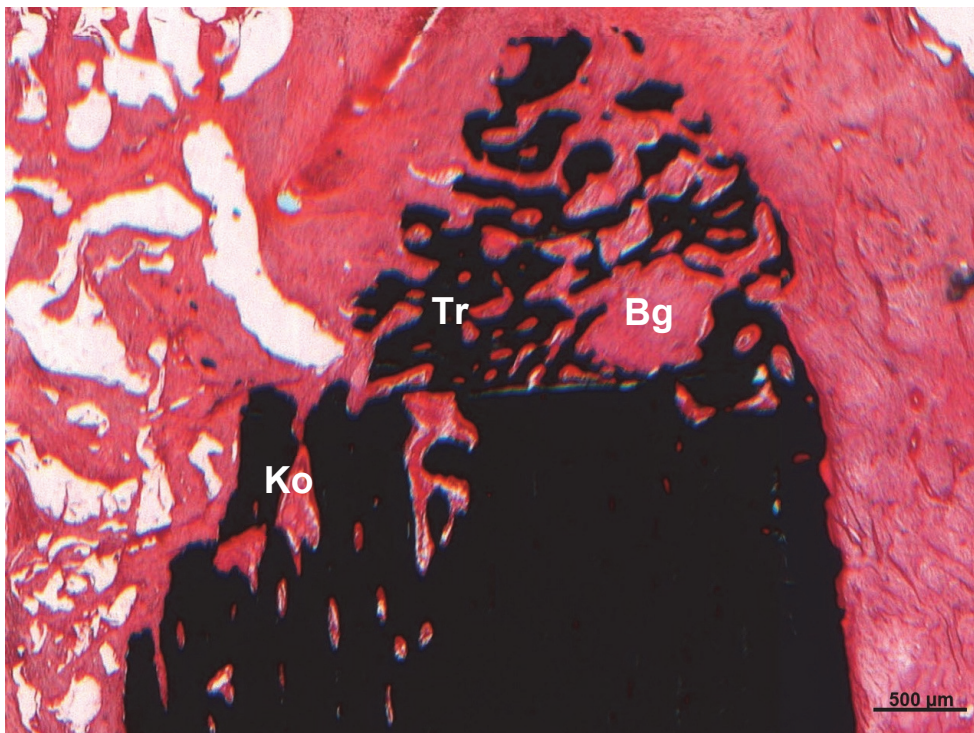


Abbildung 77: distale Kortikalis mit Geflechtknochen trabekeln

(Safranin Orange/von Kossa-Färbung, Sf 4 Gruppe 1)

[Tr] Geflechtknochen trabekel auf der Osteotomiekannte der Kortikalis, umgeben von [Bg] Bindegewebe, [Ko]
Abrundung und Auflockerung der Kortikalis an der distalen Osteotomiekannte von periostal und medial

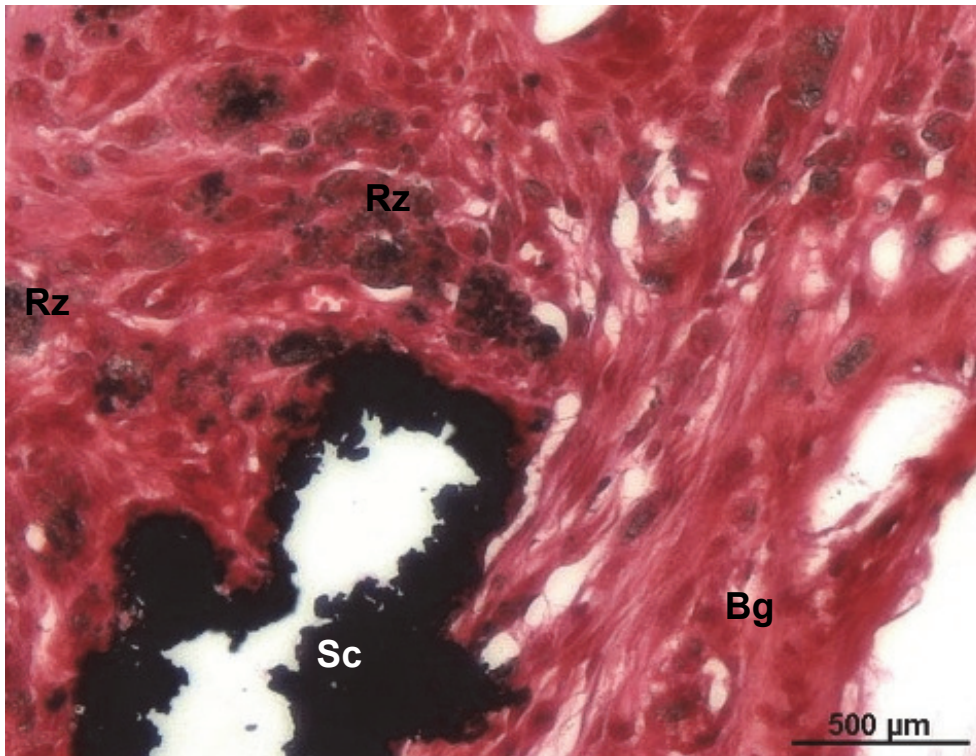


Abbildung 78: kristallines Scaffoldmaterial im Bindegewebe

(kombinierte Safranin Orange/von Kossa Färbung, Schaf 4, Gruppe 1)

[Sc] schwarz angefärbtes Scaffoldmaterial, [Bg] Bindegewebe, [Rz] mehrkernige Riesenzellen mit inkorporiertem, kristallinem Scaffoldmaterial

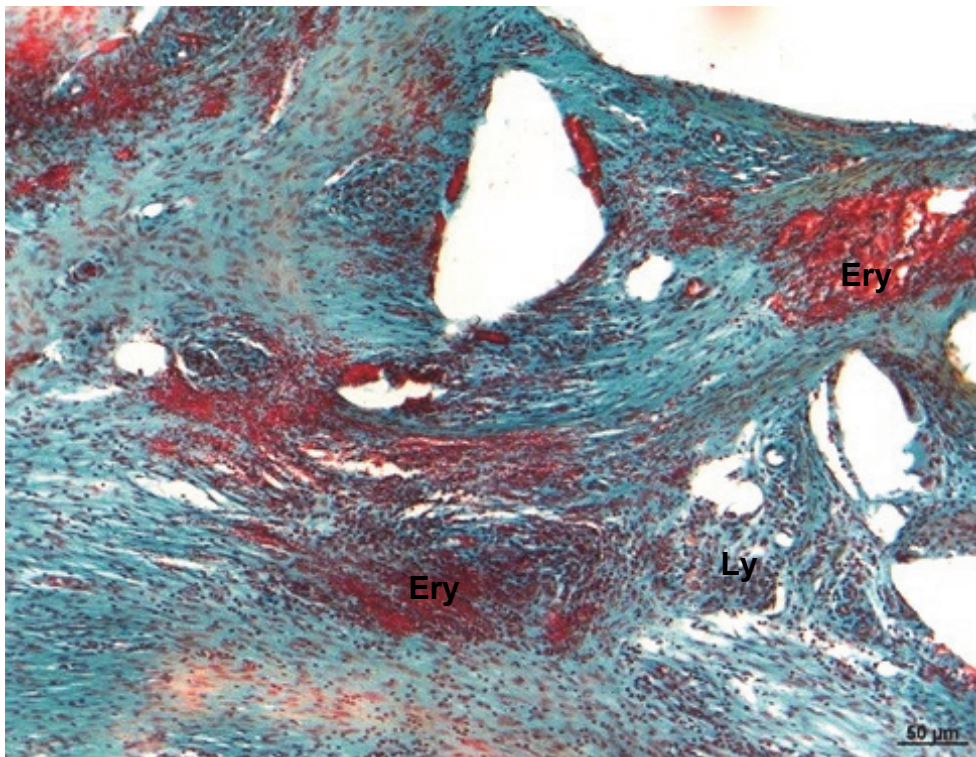


Abbildung 79: Ansammlung von Erythrozyten und Entzündungszellen im bindegewebig durchsetzten Scaffold

(Masson-Goldner-Färbung, Schaf 9, Gruppe 2)

[Ery] rot angefärbte Bereiche sind mit Erythrozyten durchsetzt, [Ly] und auch Leukozyten (Lymphozyten und Plasmazellen) durchsetzen stellenweise das lockere Bindegewebe

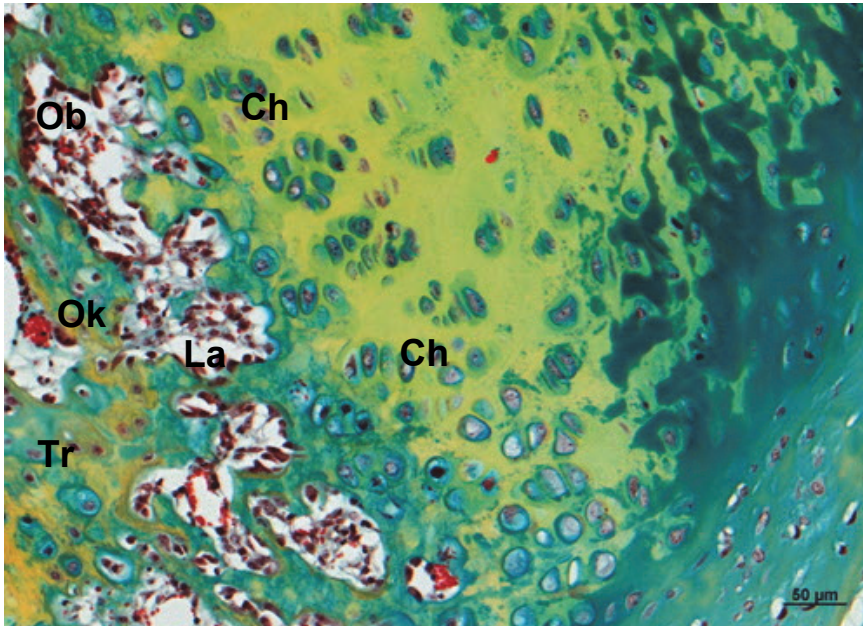


Abbildung 80: breiter Streifen hyalinen Knorpels
(Movat-Pentachrom-Färbung, Schaf 11, Gruppe 2)

[Ch] säulenartig formierte Chondrozyten, [Tr] Geflechtknochen trabekel mit einzelnen Chondrozyten mit blasenartigem Knorpelhof, [La] bindegewebig in Lakunen im Geflechtknochen deren Rand mit [Ob] Osteoblasten und stellenweise mit [Ok] Osteoklasten besetzt sind

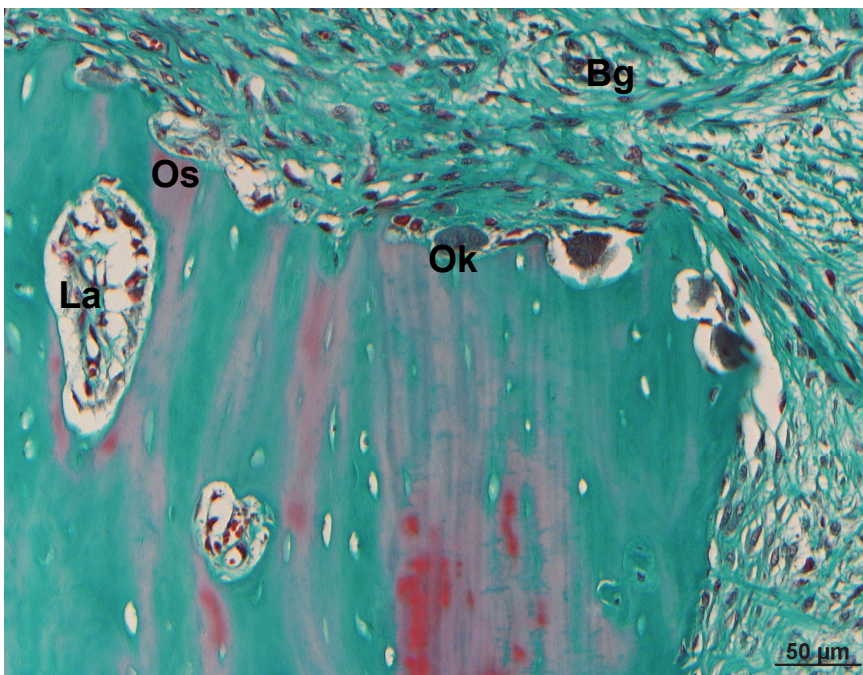


Abbildung 81: distale Osteotomie kante
(Masson-Goldner-Färbung, Schaf 5, Gruppe 1)

Auf der Oberfläche der distalen Osteotomie kante [Os] sind hier deutlich Osteoklasten [Ok] in ihren Lakunen sichtbar, die den kortikalen Lamellenknochen abbauen. Die Osteotomie kante ist umgeben von lockerem Bindegewebe [Bg].

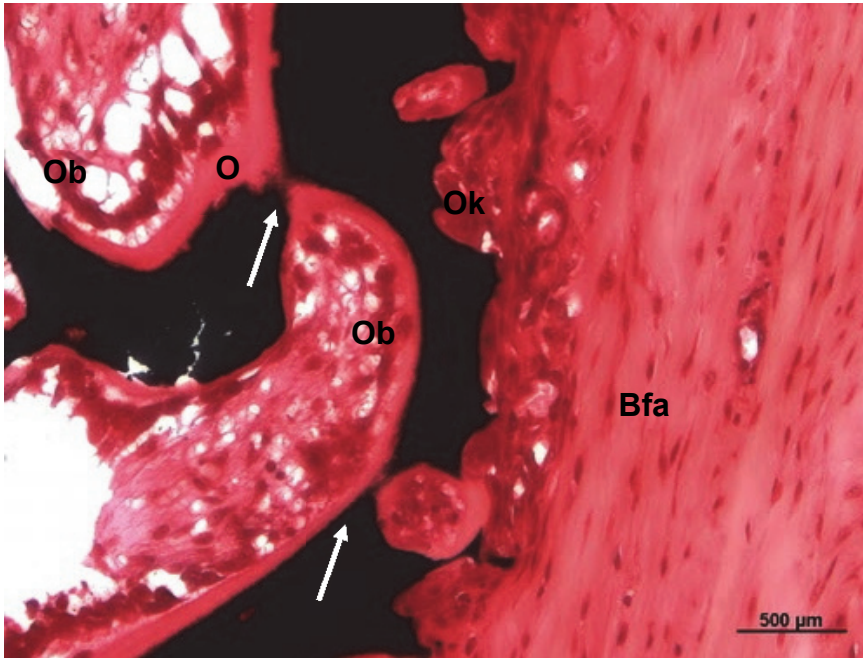


Abbildung 82: knöchernes Kallusgewebe an der distalen Osteotomie­kante (kombinierte Safranin Orange/von Kossa Färbung, Schaf 4, Gruppe 1)
Darstellung zunehmender Mineralisation der Geflechtknochen­trabekel [Ob] Osteoblastensaum mit [O] Osteoid, [Ok] Osteoklasten, [Bfa] straffes Bindegewebe [weißer Pfeil] Mineralisation

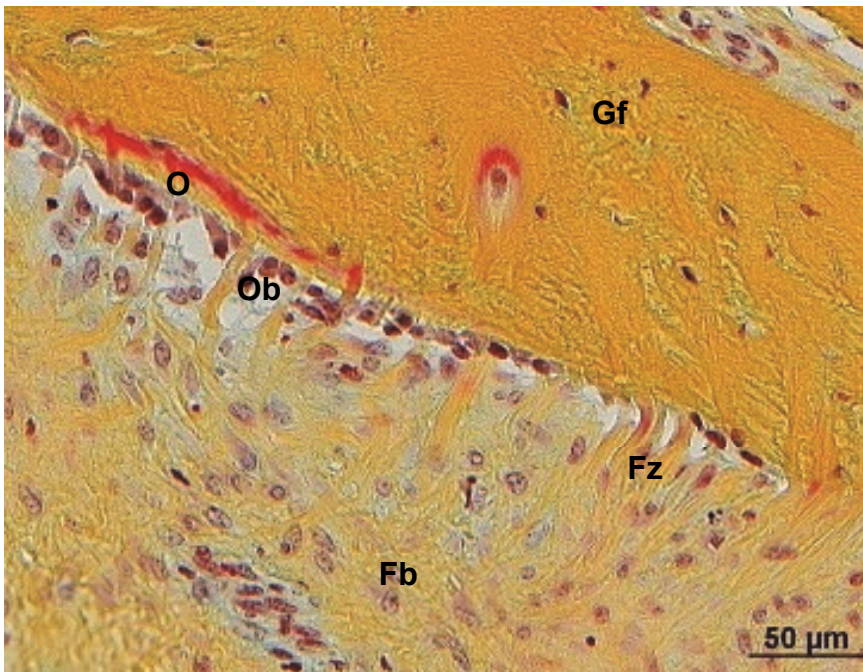


Abbildung 83: knöchernes Kallusgewebe an der proximalen Osteotomie­kante (Movat-Pentachrom-Färbung, Schaf 10, Gruppe 2)
Darstellung von Geflechtknochen­trabekeln mit daran inserierenden Bindegewebsfasern.
[Fz] spindelförmige Fibrozyten, [Fb] Fibroblasten, [Ob] Osteoblasten, [O] Osteoid, [Gf] Geflechtknochen mit eingemauerten Osteozyten

4.5 Ergebnisse der histomorphometrischen Analyse

Für die bildanalytische Auswertung wurden 12 Movat-Pentachrom gefärbte Gewebeschnitte verwendet. Die nachfolgend aufgeführten Ergebnisse ergeben sich aus der Gesamt-ROI, die in Kapitel 3.8.2 „Definition der Region of Interest“ erläutert wurde. Die Darstellung der Messwerte der analysierten Gewebeanteile erfolgt in relativen Zahlen (%).

In den Gewebeschnitten erfolgte die Messung der Verteilung verschiedener Gewebearten, wobei sich folgende Parameter ergaben: die Knochenfläche (Total Bone Area), die Knorpelfläche (Total Cartilage Area), die Scaffoldfläche (Total Scaffold Area), die Muskelfläche (Total Muscle Area) sowie die Bindegewebsfläche (Total Connective Tissue Area). Diese wurden graphisch und tabellarisch gesondert aufgeführt.

4.5.1 Gewebeverteilung in der Gesamt-ROI

Beim Hauptgewebeanteil in der Gesamt-ROI handelte es sich um Bindegewebe (Tabelle 7), das in beiden Gruppen gleich stark präsent war (Abbildung 84). Die erste Gruppe erreichte im Median 52,78 % und die zweite 52,88 % Bindegewebsanteil an der Gesamtfläche. Dagegen war die Streuung in der zweiten Gruppe deutlich größer als in der ersten. Beim Anteil an Knochengewebe an der Gesamtfläche war der Median mit 2,67 % in der ersten und 3,90 % in der zweiten Gruppe ähnlich hoch, die zweite Gruppe wies auch hier eine stärkere Streuung und bei einigen Tieren deutlich höhere Werte auf. Das Knorpelgewebe hatte in beiden Gruppen einen Anteil von unter einem Prozent an der Gesamtfläche. Der Median der gemessenen Scaffoldfläche lag in Gruppe 2 etwas höher (14,97 %) als der in Gruppe 1 (10,58 %) jedoch ohne statistische Signifikanz. Der Anteil an Muskelgewebe an der Gesamtfläche war mit 4,15 % in der ersten und 4,89 % in der zweiten Gruppe sehr ähnlich.

Ergebnisse

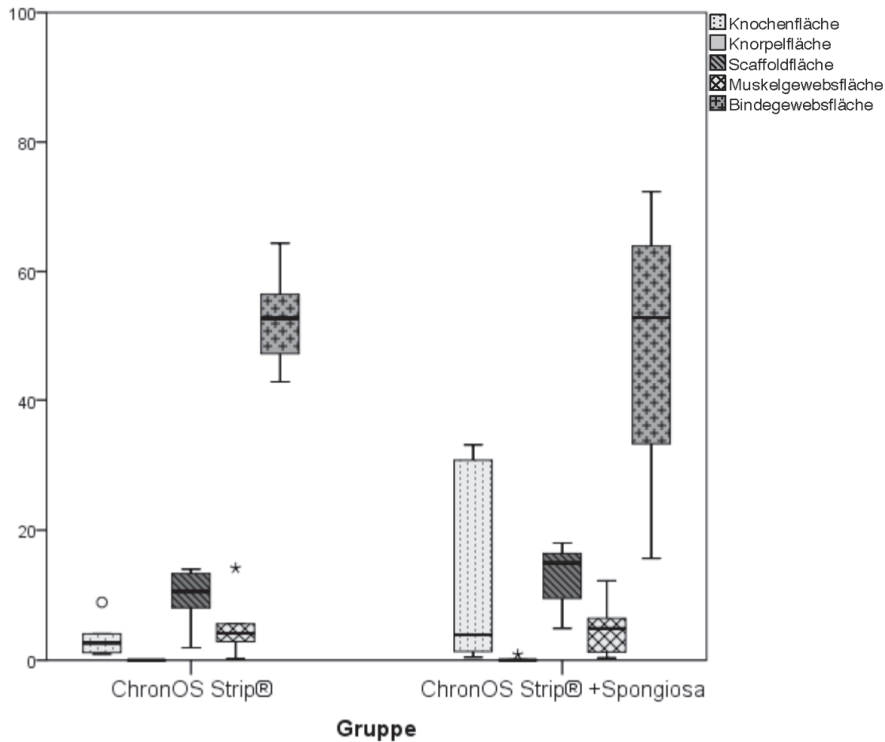


Abbildung 84: Gewebeverteilung (%) in der Gesamt-ROI im Verhältnis zur Gesamtfläche
 p-Wert bezieht sich auf den U-Test nach Mann-Whitney ($p \leq 0,05$) (pro Gruppe $n=6$)

Tabelle 7: Darstellung der prozentualen Gewebeanteile an der Gesamtfläche in der Gesamt-ROI.

Es zeigen sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Gruppen; p-Wert bezieht sich auf den U-Test nach Mann-Whitney ($p \leq 0,05$)

Parameter	ChronOS Strip®		ChronOS Strip® + Spongiosa		p-Wert
	Median	Min-Max	Median	Min-Max	
Knochenfläche (%)	2,67	0,93 - 8,91	3,90	0,47 – 33,13	0,589
Knorpelfläche (%)	0,00	0,00 – 0,01	0,00	0,00 – 0,87	1,000
Scaffoldfläche (%)	10,58	1,92 – 14,01	14,97	4,92 – 18,01	0,180
Muskelfläche (%)	4,15	0,18 – 14,16	4,89	0,36 – 12,23	0,937
Bindegewebsfläche (%)	52,78	42,94 – 64,38	52,88	15,66 – 72,33	0,937

4.5.2 Gewebeverteilung in Teil-ROIs

Die Teil-ROIs ergeben sich aus der wie in Kapitel 2.8.2 beschriebenen Festlegung der Regions of Interest. Die Bezeichnung der Teil-ROIs erfolgt nach ihrer Lage im Gewebeschnitt, proximal und distal sowie endostal und periostal.

Proximale endostale ROI

Beim Hauptgewebeanteil handelte es sich um in der proximalen endostalen ROI um Bindegewebe (

Tabelle 8), wobei der Median in beiden Gruppen vergleichbar hoch war (Gruppe 1: 63,05 %, Gruppe 2: 71,01 %). Die Streuung war jedoch in der zweiten Gruppe sehr viel größer (Abbildung 85). Beide Gruppen zeigten beim Knochengewebeanteil in diesem Bereich vergleichbare Werte (Median: Gruppe 1: 4,02 %, Gruppe 2: 6,79 %). Jedoch wurden in der zweiten Gruppe bei einigen Tieren auch sehr viel höhere Werte gemessen. Des Weiteren zeigten beide Gruppen in diesem Bereich keinerlei Vorkommen von Knorpelgewebe und der Anteil an Scaffold war in beiden Gruppen vergleichbar (Median: Gr. 1: 16,45 %, Gr.2: 19,20 %). Außerdem war in der ersten Gruppe im Gegensatz zur zweiten geringgradig Muskelgewebe in dieser ROI präsent (Median: Gr.1: 0,11 %, Gr.2: 0,00 %).

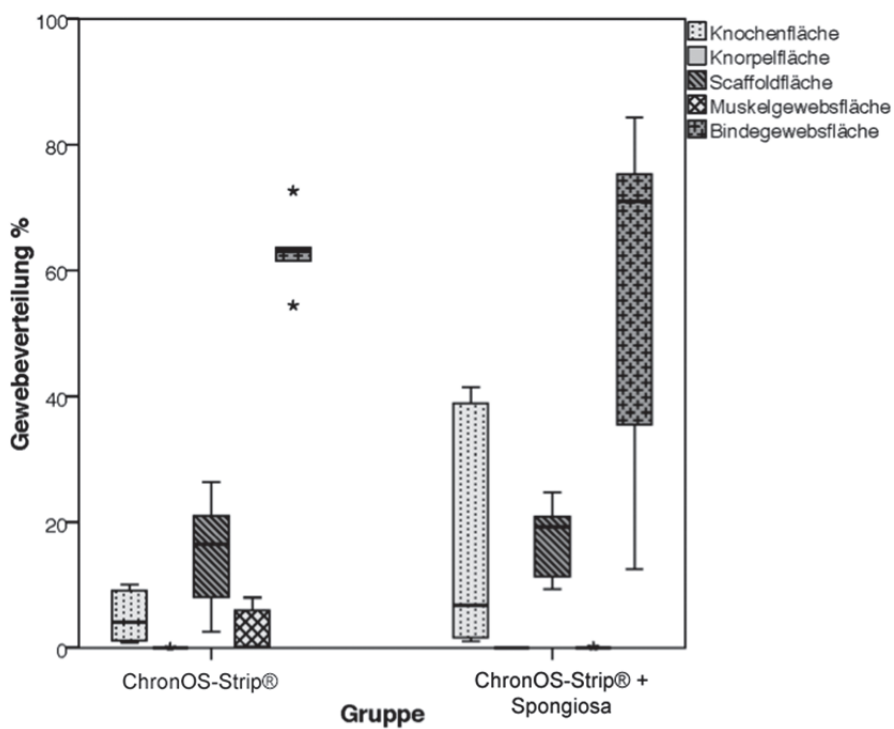


Abbildung 85: relative Verteilung (%) der Gewebe im Verhältnis zur Gesamtfläche der proximalen endostalen ROI
 p-Wert bezieht sich auf den U-Test nach Mann-Whitney ($p \leq 0,05$) (pro Gruppe n=6)

Tabelle 8: Darstellung der prozentualen Gewebeanteile an der Gesamtfläche der proximalen endostalen ROI. Es zeigen sich keine signifikanten Unterschiede. Der p-Wert bezieht sich auf den U-Test nach Mann-Whitney ($p \leq 0,05$)

Parameter	ChronOS Strip®		ChronOS Strip® + Spongiosa		p-Wert
	Median	Min-Max	Median	Min-Max	
Knochenfläche (%)	4,02	0,81 – 9,97	6,79	1,05 – 41,42	0,394
Knorpelfläche (%)	0,00	0,00 – 0,00	0,00	0,00 – 0,00	0,699
Scaffoldfläche (%)	16,45	2,51 – 26,33	19,20	9,27 – 24,7	0,818
Muskelfläche (%)	0,11	0,00 – 7,98	0,00	0,00 – 0,13	0,132
Bindegewebsfläche (%)	63,05	54,46 – 72,66	71,01	12,50 – 84,36	0,589

Proximale periostale ROI

In der proximalen periostalen ROI war bei den Tieren der zweiten Gruppe signifikant mehr Scaffoldmaterial im Osteotomiespalt vorhanden als in der ersten (Median: Gr.1: 1,02 %, Gr.2: 7,74 %, $p = 0,009$) (Abbildung 86). Den Hauptgewebeanteil in der proximo-periostalen ROI machte Bindegewebe aus (Tabelle 9), dessen Verteilung in diesem Bereich in beiden Gruppen ähnlich war (Gr.1: 34,80 %, Gr.2: 30,65 %). Beide Gruppen zeigten beim Knochen-
gewebeanteil in diesem Bereich ähnlich hohe Werte (Gr.1: 2,22 %, Gr.2: 2,09 %), wobei in der zweiten Gruppe vereinzelt auch höhere Werte erreicht wurden. Der Knorpelgewebeanteil lag in diesem Bereich in beiden Gruppen unter 1 %. Des Weiteren war in dieser Teil-ROI Muskelgewebe in beiden Gruppen im gleichen Ausmaß präsent (Gr.1: 9,85 %, Gr.2: 10,23 %).

Ergebnisse

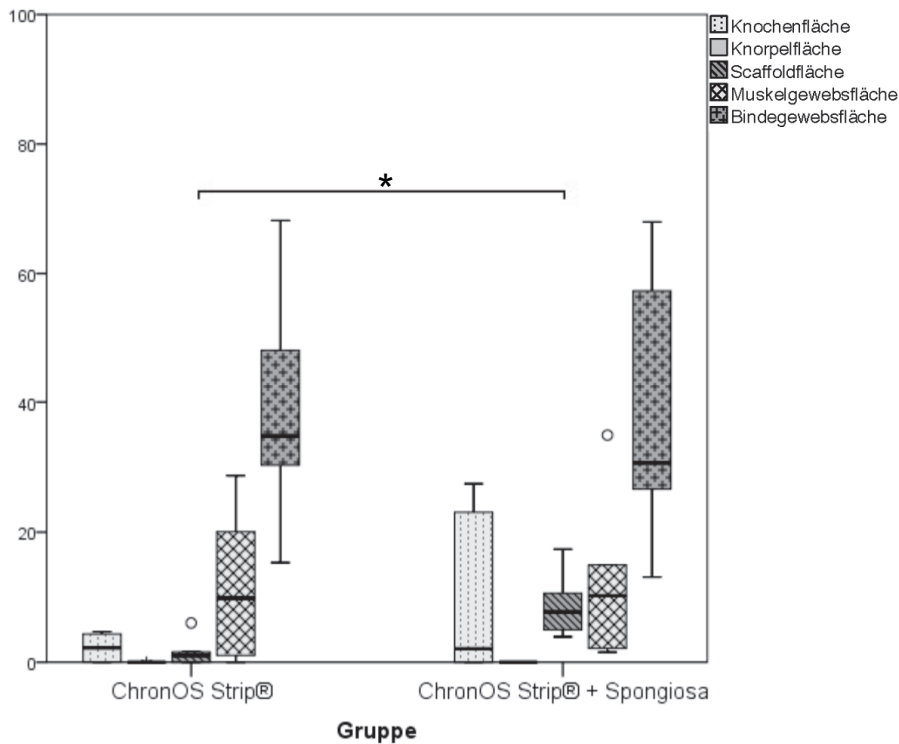


Abbildung 86: relative Verteilung (%) der Gewebe im Verhältnis zur Gesamtfläche der proximalen periostalen ROI ($p^*=0,009$) p-Wert bezieht sich auf den U-Test nach Mann-Whitney ($p \leq 0,05$) (pro Gruppe $n=6$)

Tabelle 9: Darstellung der prozentualen Gewebeanteile an der Gesamtfläche der proximalen periostalen ROI. In der zweiten Gruppe wurde signifikant mehr Scaffoldmaterial in dieser ROI gemessen als in der ersten Gruppe. p-Wert bezieht sich auf den U-Test nach Mann-Whitney ($p \leq 0,05$)

Parameter	ChronOS Strip®		ChronOS Strip® + Spongiosa		p-Wert
	Median	Min-Max	Median	Min-Max	
Knochenfläche (%)	2,22	0,00 – 4,69	2,09	0,00 – 27,45	0,937
Knorpelfläche (%)	0,00	0,00 – 0,03	0,00	0,00 – 0,00	0,699
Scaffoldfläche (%)	1,02	0,00 – 6,04	7,74	3,90 – 17,39	0,009
Muskelfläche (%)	9,85	0,00 – 28,70	10,23	1,55 – 34,92	0,699
Bindegewebsfläche (%)	34,80	15,31 – 68,19	30,65	13,09 – 67,97	0,699

Distale endostale ROI

Beim Hauptgewebeanteil in der distalen endostalen ROI handelte es sich um Bindegewebe (Tabelle 10), das in beiden Gruppen im Median gleich stark präsent war (Gr.1: 64,60 %, Gr.2: 62,99 %) (Abbildung 87). Beide Gruppen erreichten beim Knochengewebeanteil im Median ähnliche hohe Werte (Gr.1: 2,89 %, Gr.2: 6,34 %) in diesem Bereich. Allerdings erreichte die zweite Gruppe in diesem Parameter vereinzelt auch höhere Werte. Des Weiteren war der Anteil an Scaffoldfläche in beiden Gruppen vergleichbar (Median Gr.1: 17,20 %, Gr.2: 19,49 %). Knorpel- und Muskelgewebeanteile lagen in dieser ROI im Median in beiden Gruppen unter 1 %.

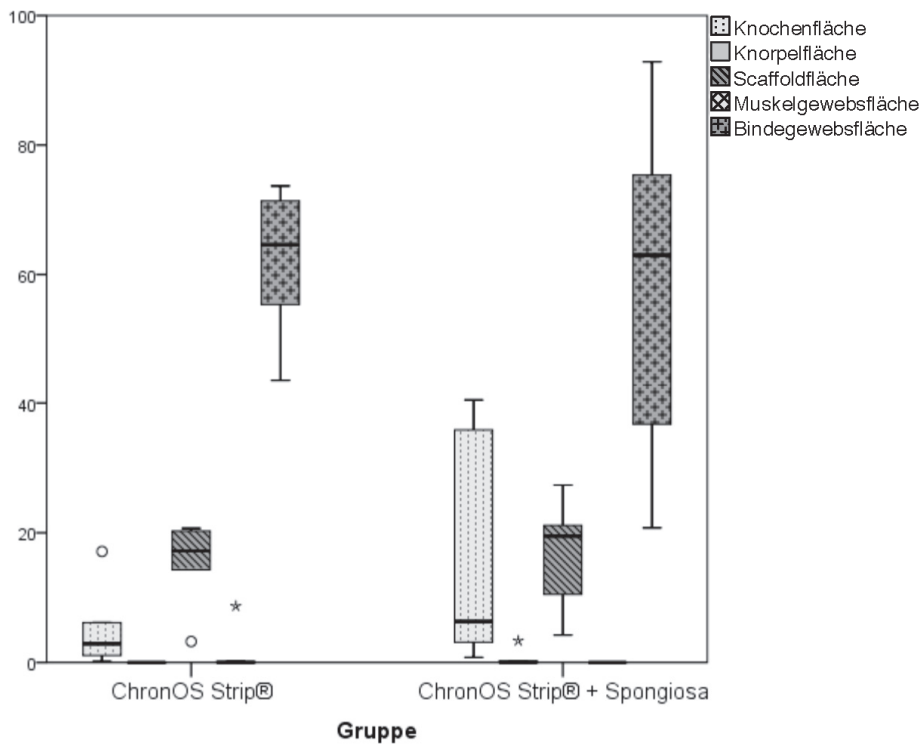


Abbildung 87: relative Verteilung (%) der Gewebe im Verhältnis zur Gesamtfläche der distalen endostalen ROI
p-Wert bezieht sich auf den U-Test nach Mann-Whitney ($p \leq 0,05$) (pro Gruppe $n=6$)

Tabelle 10: Darstellung der prozentualen Gewebeanteile an der Gesamtfläche der distalen endostalen ROI.

Es zeigen sich keine signifikanten Unterschiede; p-Wert bezieht sich auf den Mann-Whitney-U-Test

Parameter	ChronOS Strip®		ChronOS Strip® + Spongiosa		p-Wert
	Median	Min-Max	Median	Min-Max	
Knochenfläche (%)	2,89	0,15 – 17,12	6,34	0,79 – 40,46	0,394
Knorpelfläche (%)	0,00	0,00 – 0,06	0,00	0,00 – 3,35	0,818
Scaffoldfläche (%)	17,20	3,24 – 20,67	19,49	4,22 – 27,35	0,589
Muskelfläche (%)	0,00	0,00 – 8,69	0,00	0,00 – 0,00	0,394
Bindegewebsfläche (%)	64,60	43,65 – 73,67	62,99	20,76 – 92,85	1,000

Distale periostale ROI

In der distalen periostalen ROI war bei den Tieren der zweiten Gruppe signifikant mehr Scaffoldmaterial im Osteotomiespalt vorhanden als in der ersten (Median: Gr.1: 2,33 %, Gr.2: 11,31 %, $p = 0,041$) (Abbildung 89). Bindegewebe bildete auch in dieser Teil-ROI den hauptsächlichsten Gewebeanteil (Tabelle 11) und war in beiden Gruppen gleich stark präsent (Median Gr.1: 43,86, Gr.2: 43,78 %). Der Knochengeboteanteil war in Gruppe zwei im Median ähnlich hoch (Gr.1: 0,64 %, Gr.2: 2,15 %), jedoch zeigten die Werte in der zweiten Gruppe eine größere Streuung als in der ersten. Der Knorpelgewebeanteil lag in dieser ROI in beiden Gruppen bei unter 1 %. Der Muskelgewebeanteil zeigte in beiden Gruppen ähnliche Werte (Median Gr.1: 5,38 %, Gr.2: 8,76 %).

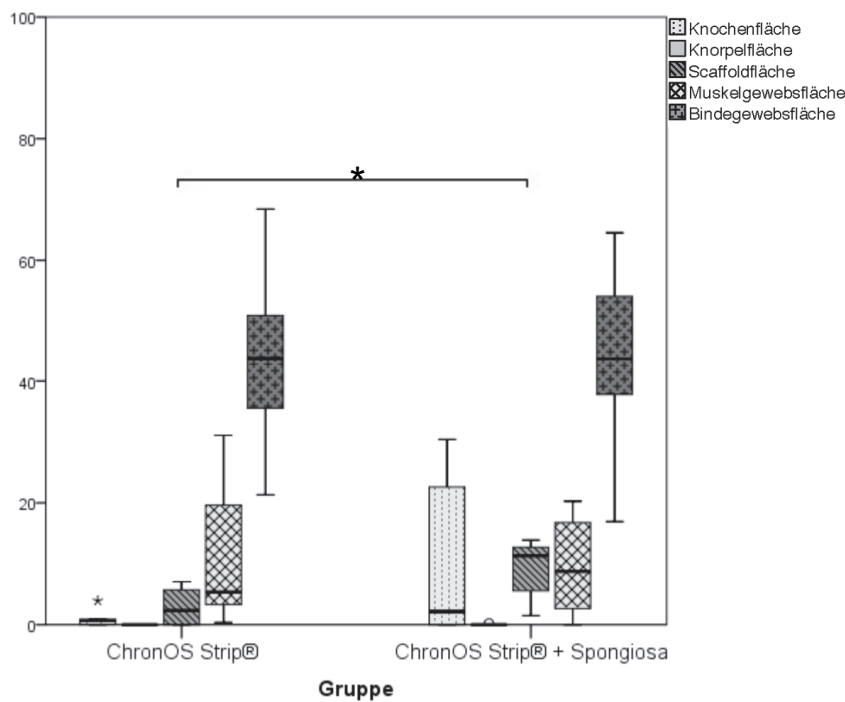


Abbildung 88: relative Verteilung (%) der Gewebe im Verhältnis zur Gesamtfläche der distalen periostalen ROI ($p^*=0,041$) p-Wert bezieht sich auf den U-Test nach Mann-Whitney ($p \leq 0,05$) (pro Gruppe $n=6$)

Tabelle 11: Darstellung der prozentualen Gewebeanteile an der Gesamtfläche der distalen periostalen ROI signifikante Unterschiede liegen in der Scaffoldverteilung vor; p-Wert bezieht sich auf den U-Test nach Mann-Whitney ($p \leq 0,05$)

Parameter	ChronOS Strip®		ChronOS Strip® + Spongiosa		p-Wert
	Median	Min-Max	Median	Min-Max	
Knochenfläche (%)	0,64	0,01 – 3,94	2,15	0,00 – 30,42	0,818
Knorpelfläche (%)	0,00	0,00 – 0,00	0,00	0,00 – 0,18	0,394
Scaffoldfläche (%)	2,33	0,00 – 7,07	11,31	1,48 – 13,88	0,041
Muskelfläche (%)	5,38	0,36 – 31,09	8,76	0,00 – 20,26	0,818
Bindegewebsfläche (%)	43,86	21,31 – 68,43	43,78	16,92 – 64,51	1,000

4.6 Ergebnisse der immunhistochemischen Untersuchungen

4.6.1 Vaskularisierung

Zur Zählung der Gefäße wurden 12 Paraffinschnitte verwendet, die mit der immunhistochemischen Färbung α -sma angefärbt wurden. Die Auszählung der Gefäße erfolgte je Präparat in 15 Gesichtsfeldern, wie in Kapitel 3.8.5. Gefäßzählung beschrieben.

Insgesamt ergaben sich keine statistisch signifikanten Unterschiede in der Gefäßdichte der Gesamt-ROI zwischen den beiden Gruppen. Die Medianwerte lagen mit 29,99 Gefäßen je mm^2 in der ersten Gruppe und 28,08 Gefäßen je mm^2 in der zweiten Gruppe (Tabelle 12) vergleichbar hoch (Abbildung 89). Die Streuung war dabei in der ersten Gruppe etwas größer als in der zweiten.

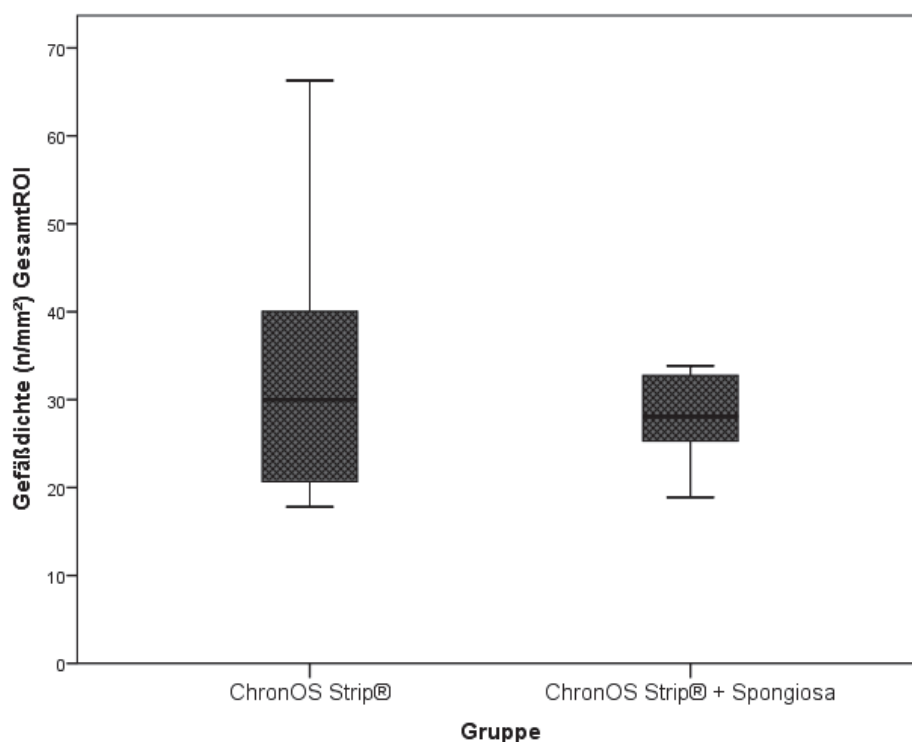


Abbildung 89: Darstellung der Gefäßdichte (n/mm^2) in der Gesamt-ROI

p-Wert bezieht sich auf den U-Test nach Mann-Whitney mit Gruppe 1 ($p \leq 0,05$) (pro Gruppe $n=6$)

Tabelle 12: Darstellung der Gefäßdichte (n/mm^2) in der Gesamt-ROI

p-Wert bezieht sich auf den U-Test nach Mann-Whitney mit Gruppe 1 ($p \leq 0,05$)

Gruppe	Mittelwert	Median	Min - Max	Standardabweichung	p-Wert
ChronOS Strip®	34,13	29,99	17,80 - 66,30	18,13	
ChronOS Strip® + Spongiosa	27,82	28,08	18,89 - 33,84	5,42	0,818

4.6.2 Osteoklastendichte

Zur Bestimmung der Osteoklastendichte wurde die TRAP-Färbung an 12 Paraffinschnitten verwendet. Die Auszählung der Osteoklasten erfolgte wie in Kapitel 3.8.6. Osteoklastenzählung beschrieben, auf der Kortikalis sowie im knöchernen Kallusgewebe.

Osteoklastendichte auf der Kortikalis

Die Osteoklastendichte der Kortikalis lag im Median in der ersten Gruppe bei 1,72/mm² und in der zweiten bei 3,64/mm² und war damit in beiden Gruppen ähnlich hoch (Tabelle 13). In der zweiten Gruppe konnte jedoch eine größere Streuung mit vereinzelt höheren Werten beobachtet werden (Abbildung 90).

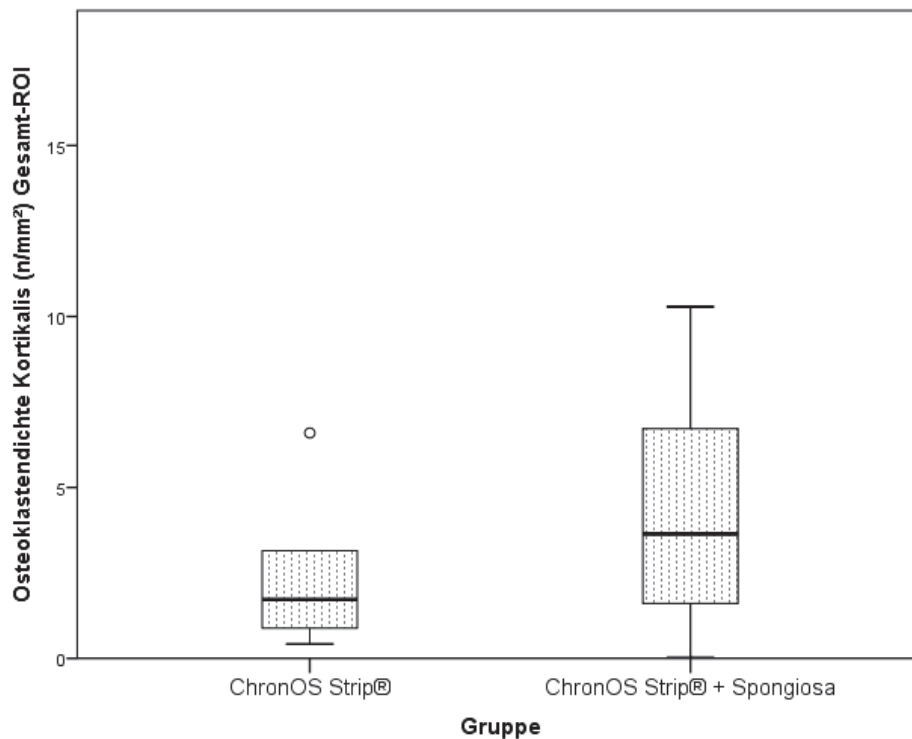


Abbildung 90: Darstellung der Osteoklastendichte (n/mm²) an der Kortikalis in der Gesamt-ROI
p-Wert bezieht sich auf den U-Test nach Mann-Whitney (p≤0,05) (pro Gruppe n=6)

Tabelle 13: Darstellung der Osteoklastendichte (n/mm²) an der Kortikalis in der Gesamt-ROI
p-Wert bezieht sich auf U-Test nach Mann-Whitney (p≤ 0,05)

Gruppe	Mittelwert	Median	Min - Max	Standard- abweichung	p-Wert
ChronOS Strip®	2,42	1,72	0,42 – 6,59	2,25	
ChronOS Strip® + Spongiosa	4,32	3,64	0,02 - 10,29	3,75	0,394

Osteoklastendichte im Kallus

Beide Gruppen erreichten im Median mit 5,13 Osteoklasten je mm² mineralisierter Kallusfläche in der ersten Gruppe und 5,39 Osteoklasten je mm² mineralisierter Kallusfläche in der zweiten Gruppe (Tabelle 14) ähnlich hohe Osteoklastendichten im Kallusgewebe (Abbildung 91). In der zweiten Gruppe konnte jedoch eine deutlich größere Streuung der Werte beobachtet werden.

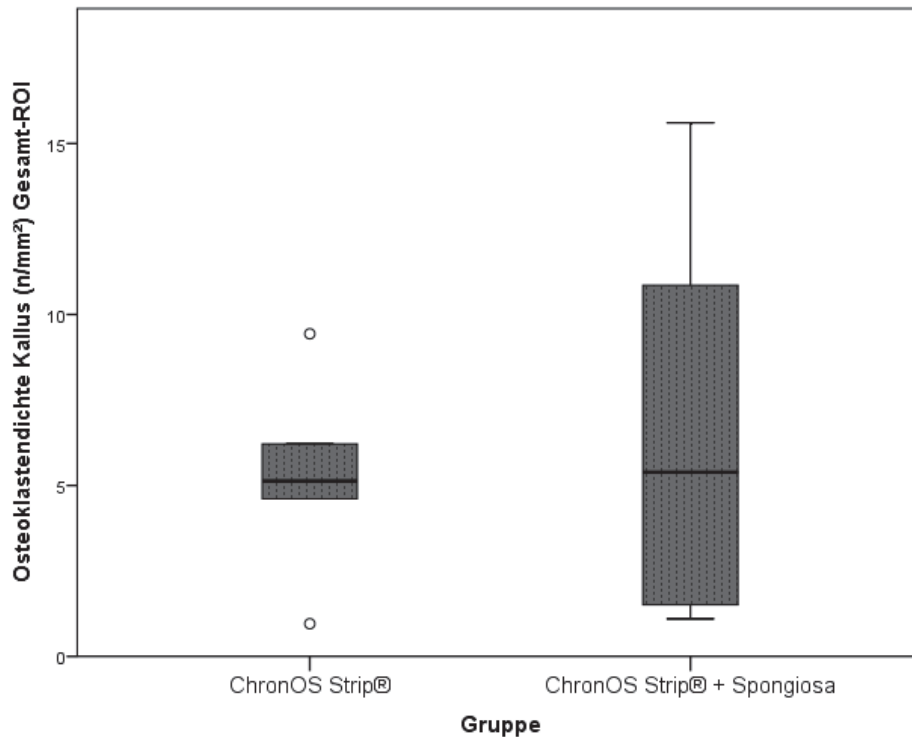


Abbildung 91: Darstellung der Osteoklastendichte (n/mm²) im Kallus in der Gesamt-ROI
p-Wert bezieht sich auf den U-Test nach Mann-Whitney mit Gruppe 1 (p≤0,05) (pro Gruppe n=6)

Tabelle 14: Darstellung der Osteoklastendichte (n/mm²) im Kallus in der Gesamt-ROI
p-Wert bezieht sich auf U-Test nach Mann-Whitney mit Gruppe 1 (p≤ 0,05)

Gruppe	Mittelwert	Median	Min - Max	Standard-abweichung	p-Wert
ChronOS Strip®	5,24	5,13	0,96 - 9,44	2,74	
ChronOS Strip® + Spongiosa	6,64	5,39	1,10 - 15,61	5,63	0,699

4.6.3 Riesenzelldichte

Für die Bestimmung der Riesenzelldichte im Scaffold wurden dieselben 12 TRAP-gefärbten Paraffinschnitte verwendet wie zur Auszählung der Osteoklasten.

Die Auszählung der Riesenzellen erfolgte wie im Kapitel 3.8.7 Riesenzellzählung beschrieben, in 15 Gesichtsfeldern. Die Ergebnisse ergeben sich aus der Gesamt-ROI, die sich aus den 15 Gesichtsfeldern zusammensetzt und werden auf die Bindegewebsfläche in Quadratmillimetern je untersuchtes Areal bezogen.

Die Riesenzelldichte im Bindegewebe im Osteotomiespalt war im Median bei Gruppe zwei mit 49,50/mm² höher als in der ersten mit 29,17/mm² (Tabelle 15), jedoch war dieser Unterschied statistisch nicht signifikant. Zudem war die Streuung in der zweiten Gruppe höher, da einige Tiere eine höhere Riesenzelldichte aufwiesen (Abbildung 92).

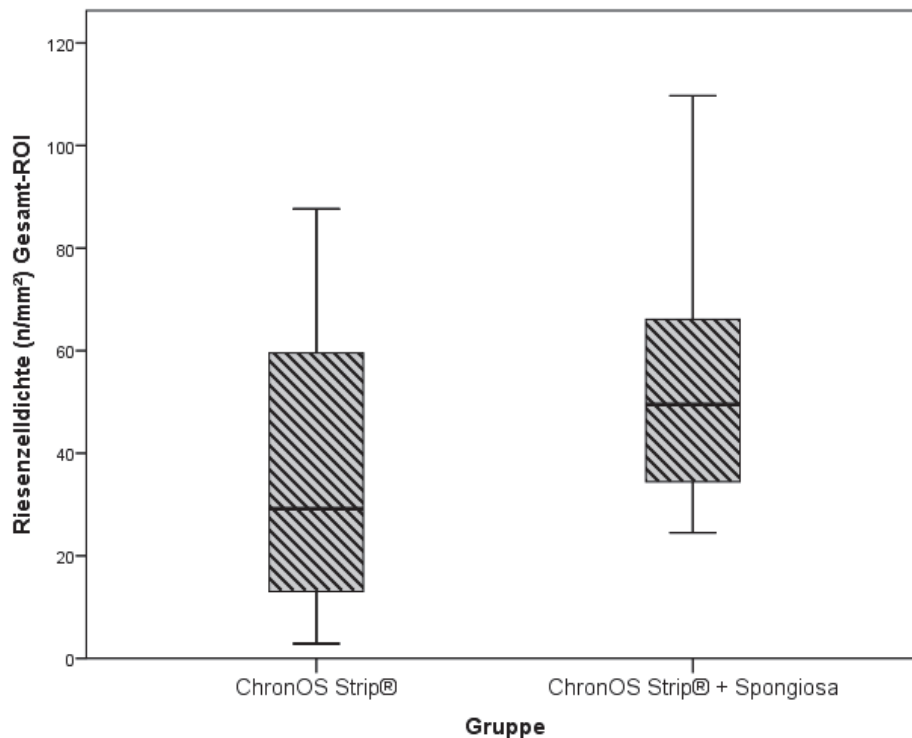


Abbildung 92: Darstellung der Riesenzelldichte (n/mm²) in der Gesamt-ROI
p-Wert bezieht sich auf den U-Test nach Mann-Whitney (p≤0,05) (pro Gruppe n=6)

Tabelle 15: Darstellung der Riesenzelldichte (n/mm²) in der Gesamt-ROI
p-Wert bezieht sich auf U-Test nach Mann-Whitney (p≤ 0,05)

Gruppe	Mittelwert	Median	Min - Max	Standardabweichung	p-Wert
ChronOS Strip®	36,91	29,17	2,88 - 87,66	31,54	
ChronOS Strip® + Spongiosa	55,63	49,50	24,50 - 109,72	30,15	0,310

4.7 Zusammenfassung der Ergebnisse

4.7.1 Operations- und Standzeitbefunde

Insgesamt gingen nach einer Standzeit von zwölf Wochen zwölf Tiere in die Auswertung ein. Die Narkose und den operativen Eingriff überstanden fünfzehn Tiere ohne Komplikationen. Ein Tier verstarb direkt postoperativ in der Aufwachphase aufgrund von Narkosekomplikationen. Zwei andere Tiere, davon je eins aus jeder Gruppe, mussten wegen Traumata im Stall vorzeitig aus dem Versuch genommen werden. Die Tiere zeigten eine Vollbelastung des osteotomierten Hinterbeins bei leicht verändertem Gangbild, aufgrund des montierten Hybrid-Rinfixateurs. In der ersten Gruppe zeigten fünf Tiere leichte Entzündungen an den Draht-eintrittsstellen, wovon vier Tiere aufgrund eitriger Infektionen antibiotisch versorgt werden mussten. Zwei Tiere dieser Gruppe mussten aufgrund von Verformungen oder Brüchen der Schanz-Schrauben reoperiert werden. Beide erholten sich unter analgetischer sowie antibiotischer Versorgung. In der zweiten Gruppe kam es bei vier Tieren zu eitrigen Entzündungen an den Eintrittsstellen der K-Drähte, die je nach Bedarf analgetisch und antibiotisch bis zur Besserung versorgt wurden. Zwei Tiere der zweiten Gruppe erlitten Traumata des operierten Beckenkamms an einer Heuraufe und mussten daher an dieser Stelle zusätzlich einer täglichen Wundtoilette unterzogen sowie antibiotisch und analgetisch versorgt werden. Eines dieser beiden Tiere musste im weiteren Verlauf der Standzeit aufgrund eines weiteren Traumas vorzeitig aus dem Versuch genommen werden.

4.7.2 Radiologie

Im Vergleich mit den Aufnahmen postoperativ zeigten sich nach vier Wochen in beiden Gruppen kaum Veränderungen. Allein der Scaffold schien in seiner Struktur aufgelockert. Nach acht Wochen zeigten sich bei vier Tieren der ersten Gruppe Hinweise auf eine erste Kallusbildung in Form von leichten röntgendichten Verschattungen an der Kortikalis und dezenten wolkenartigen Verschattungen im Scaffold. Die anderen zwei Tiere der ersten Gruppe zeigten bis zu diesem Zeitpunkt keine Hinweise auf Kallusbildung. Des Weiteren waren bei vier Tieren zu diesem Zeitpunkt leichte und bei zwei Tieren deutliche radiologische Lysen an den Schanz-Schrauben erkennbar. In der zweiten Gruppe hatte sich nach acht Wochen bei allen Tieren deutlich mehr Kallusgewebe gebildet, das in Form von umfangreichen, röntgendichten Verschattungen im Osteotomiespalt zu beobachten war. Dabei war es bei zwei Tieren bereits zu einer unilateralen Überbrückung des Defektbereiches gekommen. Zudem waren in dieser Gruppe nach acht Wochen bei vier Tieren leichte und bei einem Tier eine deutliche Lyse an den Schanz-Schrauben zu beobachten. Nach zwölf Wochen war bei drei Tieren der ersten Gruppe erstmals mineralisiertes Kallusgewebe erkennbar. Bei den anderen drei Tieren hatte das Kallusgewebe deutlich an Umfang und Mineralisation zugenommen. In

der ersten Gruppe waren radiologische Lysen bei einem Tier leicht und bei fünf Tieren deutlich erkennbar. In der zweiten Gruppe hatte im Kallusgewebe vor allem der Grad der Mineralisation deutlich zugenommen. Radiologische Lysen waren bei vier Schafen leicht und bei zwei Schafen deutlich erkennbar.

4.7.3 Computertomographische Untersuchungen

Anhand der 3D-Rekonstruktion der HR-pQCT-Messungen nach 12 Wochen war bei den Tieren der ersten Gruppe insgesamt weniger Kallus zu beobachten als bei den Tieren der zweiten Gruppe. Bei zwei Tieren der zweiten Gruppe war eine unilaterale, knöcherne Überbrückung der Defektstrecke und bei den übrigen Tieren dieser Gruppe vor allem lateral im Osteotomiedefekt Kallusbildung zu beobachten. Bei den Tieren der ersten Gruppe hatte sich, bis auf ein Tier, nur wenig mineralisiertes Kallusgewebe gebildet. Bei allen Tieren beider Gruppen waren streifenartig verlaufend Reste des Scaffolds im Osteotomiebereich zwischen den Kortikalisenden erkennbar. Die statistische Auswertung ergab im Vergleich des TV, BV und BMC innerhalb der 40 mm Defektstrecke für einzelne Tiere der zweiten Gruppe deutlich höhere Werte, jedoch ergab sich für keinen der analysierten Parameter (TV, BV, BV/TV, BMD, BMC) ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den beiden Gruppen.

In der Mikro-CT Messung des proximalen und distalen Übergangs von Kortikalis, Scaffold und Kallus zeigte die zweite Gruppe ein signifikant größeres Gesamtkallusvolumen. Einzelne Tiere der Gruppe zwei wiesen auch hier deutlich höhere Werte im BV und BMC auf, ein statistisch signifikanter Unterschied ergab sich in den anderen ausgewerteten Parametern (BV, BV/TV, BMD, BMC) jedoch nicht.

4.7.4 Deskriptive Histologie

Das histologische Erscheinungsbild ähnelt sich in beiden Gruppen. Den Hauptgewebeanteil im Osteotomiespalt machte beim Großteil der Tiere lockeres Bindegewebe aus, das in die Scaffoldporen eingewachsen war und diesen vollständig umgab. In der zweiten Gruppe wurde mehr knöcherner Kallus gebildet. Bei zwei Tieren der zweiten Gruppe machte Geflechtknochen den Hauptgewebeanteil im Osteotomiespalt aus und hatte die Defektstrecke unilateral überbrückt. Insgesamt handelte es sich beim knöchernen Kallus in beiden Gruppen hauptsächlich um ungeordneten Geflechtknochen, der stellenweise zu Lamellenknochen umgeformt und mit Osteonen durchzogen war. Die Geflechtknochen trabekel waren größtenteils von lockerem, hämatopoetischem Bindegewebe umgeben, an deren Rändern sich kettenartig aufgereiht Osteoblasten, Osteoid sowie Osteoklasten befanden. Das kristalline Scaffoldmaterial wurde in beiden Gruppen gleichermaßen von zahlreichen Riesenzellen abgebaut. Hyaliner Knorpel war in beiden Gruppen gleichermaßen selten zu beobachten. Die operativ gesetzte Osteotomiekannte war bei fünf Tieren der ersten Gruppe und zwei Tieren

der zweiten Gruppe nach zwölf Wochen Heilungszeit abgerundet und vermehrt mit Osteoklasten besetzt.

4.7.5 Histomorphometrie

In beiden Gruppen machte Bindegewebe in der Gesamt-ROI den Hauptgewebeanteil aus. Einzelne Tiere der zweiten Gruppe zeigten deutlich höhere Knochengewebsanteile. Knorpelgewebe wurde dagegen in beiden Gruppen kaum gemessen. Im Vergleich beider Gruppen ergab sich kein statistisch signifikanter Unterschied im Vergleich sämtlicher Gewebe in der Gesamt-ROI. Bei der Untersuchung der einzelnen Teil-ROIs ergaben sich lediglich für die Scaffoldfläche in der proximalen periostalen und in der distalen periostalen ROI in Gruppe zwei signifikant höhere Werte. Für alle anderen Parameter ergaben sich in den einzelnen Teil-ROIs keine statistisch signifikanten Unterschiede.

4.7.6 Vaskularisierung

Beide Gruppen wiesen zum Zwölfwochenzeitpunkt im Median mit 29,99 Gefäßen pro mm^2 in Gruppe eins und 28,08 Gefäßen pro mm^2 in Gruppe zwei eine gleich starke Vaskularisierung des Scaffolds auf.

4.7.7 Osteoklastendichte

An der Kortikalis erreichte die Osteoklastendichte im Median mit 1,72 Osteoklasten pro mm^2 in Gruppe eins und 3,64 Osteoklasten mm^2 in der zweiten Gruppe ähnlich hohe Werte.

An der mineralisierten Kallusfläche im Osteotomiespalt war im Median mit 5,13 Osteoklasten pro mm^2 in der ersten und 5,39 Osteoklasten pro mm^2 in der zweiten Gruppe eine ähnliche Osteoklastendichte in beiden Gruppen zu beobachten.

4.7.8 Riesenzelldichte

Die Riesenzelldichte im bindegewebig durchzogenen Scaffold war im Median bei Gruppe zwei mit 49,50 Riesenzellen pro mm^2 höher als in der ersten mit 29,17 Riesenzellen pro mm^2 , allerdings ohne statistische Signifikanz.

5. Diskussion

Die Rekonstruktion ausgedehnter, segmentaler Knochendefekte, wie sie nach Hochenergetraumen, Infektanierung, tumoröser Destruktion und Resektion sowie Revisionsoperationen vorkommen, stellen klinisch noch immer ein besonderes Problem dar (Pneumaticos et al. 2010). Insbesondere die Tibia weist eine hohe Non-Union-Rate von 1,1% bis zu 19 % auf (Oni et al. 1988; Sarmiento et al. 1995; Fong et al. 2013; Panteli et al. 2015). Sie besitzt aufgrund des wenigen umgebenden Bindegewebes nur wenig Potential, einen großen segmentalen Defekt zu heilen (Khatod et al. 2003; DeCoster et al. 2004). Die Behandlungsverfahren sind aufwendig und mit zahlreichen Nachteilen wie einer hohen Entnahmemorbidity oder einer schlechten Einheilungsrate, einer langen Operationszeit, dem Risiko von Infektionen oder zusätzlichen Verletzungen von Gefäßen oder Nerven behaftet (Perry 1999; Mahendra und Maclean 2007). Als Goldstandard in der Behandlung gilt derzeit der autologe, vaskularisierte Knochentransfer, der neben einem aufwendigen mikrochirurgischen Operationsverfahren den Nachteil einer limitierten Verfügbarkeit birgt (Mahendra und Maclean 2007). Daher werden scaffoldbasierte Therapieoptionen als Alternative untersucht (Reichert et al. 2011; Berner et al. 2012; Cipitria et al. 2012; Reichert et al. 2012a).

Der optimale Knochenersatzstoff sollte osteogenetische, osteoinduktive und osteokonduktive Eigenschaften besitzen, stets einsatzfähig, einfach zu handhaben, biokompatibel, bioresorbierbar, stabil und sterilisierbar sein (Giannoudis et al. 2005; Van der Stok et al. 2011). Außerdem sollte er eine definierte Porengröße und Geometrie aufweisen, um als Leitstruktur die Kolonisation, Migration, Wachstum und Differenzierung von Zellen zu unterstützen und die Entwicklung des gewünschten Gewebes zu leiten (Hutmacher et al. 2007).

In dieser Studie wurde ein Kompositscaffolds aus Poly-Lactid-co- ϵ -Caprolacton und β -Trikalziumphosphat mit einer Gesamtporosität von 60 %, interkonnektierenden Poren von 100 - 500 μm und Mikroporen kleiner als 10 μm verwendet. Dabei handelt es sich um einen porösen, flexibel formbaren Streifen, der vernäht und zu einem Hohlzylinder geformt werden kann. Er wurde zur Unterstützung der Regeneration eines ausgedehnten, segmentalen Knochendefektes eingesetzt. Dazu wurde ein neuartiges kritisches Osteotomiedefektmodell in der Schafstibia, stabilisiert mittels Hybrid-Ringfixateur, etabliert. Durch die Kombination des Scaffolds mit osteoinduktiver, autologer Spongiosa sollte die Knochendefektheilung zusätzlich stimuliert werden.

Ziel dieser Studie war es, zu überprüfen, ob ein mittels Hybrid-Ringfixateur stabilisiertes 40-mm-Osteotomie-Defektmodell in der Schafstibia geeignet ist regenerative Therapieansätze zu untersuchen. Des Weiteren wurde untersucht ob die Verwendung eines Kompositscaffolds aus Poly-Lactid-co- ϵ -Caprolacton und β -Trikalziumphosphat sich eignet die Regenera-

tion eines segmentalen kritischen Knochendefektes zu unterstützen. Außerdem sollte analysiert werden, ob die Kombination des Scaffolds (ChronOS Strip®) mit osteoinduktiver, autologer Spongiosa die Knochendefektheilung stimuliert und zu einem weiter fortgeschrittenen Heilungsergebnis nach zwölf Wochen führt.

5.1. Diskussion von Materialien und Methoden

5.1.1 Untersuchungsmodell

Tiermodell

Bevor neuartige Materialien als Knochenersatz im Patienten Anwendung finden, müssen sie ausreichend untersucht werden. In In-vitro-Modellen können die komplexen Vorgänge der Frakturheilung nicht ausreichend analysiert werden, weshalb ein dem Menschen möglichst ähnliches Modell zur Untersuchung herangezogen werden sollte (Roach et al. 1989; Schimandle und Boden 1994a). Versuche an Tieren, deren artspezifische Fähigkeit, unter den Versuchseinwirkungen zu leiden, stärker entwickelt ist, dürfen laut Tierschutzgesetz nur durchgeführt werden, soweit Tiere, deren derartige Fähigkeit weniger stark entwickelt ist, für den verfolgten Zweck nicht ausreichen (Tierschutzgesetz §7a(2)5).

Die Untersuchung des Heilungsverlaufs großer segmentaler Knochendefekte zu Lebzeiten eines Patienten sind auf nicht invasive Methoden, wie radiologische oder computertomographische Techniken, beschränkt. Biopsien und Gewebeproben können nur in sehr seltenen Fällen histologisch untersucht werden. Die Entnahme von humanen Proben stellt vor allem ein ethisches Problem dar. Deshalb können solche umfangreichen Knochenheilungsstudien in der muskuloskelettalen Forschung nur im Tiermodell unter standardisierten Bedingungen untersucht und repliziert werden (Roach et al. 1989; Pearce et al. 2007).

Schafmodell

Als Modell zur Untersuchung der Knochendefektheilung wurde in dieser Studie das Schaf gewählt, da die ovine Tibia bezüglich ihrer Form, Größe, Festigkeit, Struktur und Vaskularisierung gut mit den Dimensionen der humanen Tibia vergleichbar ist (Wissing et al. 1990). Das ermöglicht die Verwendung humanmedizinischer Implantate und in der vorliegenden Studie die erfolgreiche Implantation eines Kompositscaffolds, der in gleichen Dimension auch beim Menschen zum Einsatz kommen würde. Des Weiteren sind auch das Remodelling, die Regeneration und das Knocheneinwachsverhalten in poröse Implantate mit denen des Menschen vergleichbar (Martini et al. 2001; Willie et al. 2004).

Andere Versuchstiere wie Ratten, Mäuse, Kaninchen, Hunde oder Schweine erscheinen besonders in Bezug auf Knochendimensionen, Struktur oder aber auch im Hinblick auf die Dynamik der Knochendefektheilung im Vergleich zum Schaf weniger geeignet (Hollinger und Kleinschmidt 1990; Kleinschmidt und Hollinger 1992; Metak et al. 1998; den Boer et al. 1999; Martini et al. 2001). Ein weiterer Vorteil des Schafes für die aktuelle Studie ist die Tatsache, dass eine Kontamination des Wundgebietes durch Belecken oder Beknabbern wie bei Hunden oder Schweinen bei Schafen nicht vorkommt. Hinzu kommt, dass die Unterbringung, Versorgung und das Handling von Schafen in der Versuchstierhaltung sich einfach gestalten (Roach et al. 1989). Extrembelastungen der operierten Gliedmaße konnten durch das trainierte Zutrauen zum Menschen, Herdenhaltung sowie behutsames Einfangen und Behandeln im Rahmen der vorliegenden Studie gering gehalten werden.

Heilungszeit

Ein weiterer wichtiger Aspekt bei der Wahl des Tiermodells ist die Heilungszeit, die der des Menschen ähneln sollte. Bei kleineren Versuchstieren (Ratte, Maus, Kaninchen) dauert die knöcherne Durchbauung einer Fraktur aufgrund ihrer primitiven Knochen nur wenige Wochen, wodurch ein Vergleich der Frakturheilungszeiten beim Menschen unmöglich wird (Stürmer und Schuchardt 1980a; Metak et al. 1998). Auch Rinder und Pferde sind aufgrund ihrer deutlich längeren Frakturheilungszeiten und auch wegen ihrer Größe nicht für die Erforschung der Knochendefektheilung geeignet (Roach et al. 1989).

Metak und Mitarbeiter konnten anhand eines Interspeziesvergleichs zeigen, dass sich die Abläufe der Knochendefektheilung vom Schaf am besten auf die humanen Verhältnisse übertragen lassen (Metak et al. 1998). Insbesondere für Langzeitstudien ist das Schaf gut geeignet, da es je nach Versorgungstechnik eine ähnlich lange Frakturheilungszeit von sechs bis acht Wochen aufweist (Stürmer und Schuchardt 1980b; Wu et al. 1984; Goodship et al. 1993). Unter externer Fixation ist die Heilungszeit eines Knochendefektes im Vergleich zu anderen Fixationsmethoden signifikant länger (Konrad und Sudkamp 2007). Bei großen, segmentalen Knochendefekten laufen die Phasen der Frakturheilung zudem verzögert ab, sodass die Phase des Remodellings erst in der sechsten bis neunten Woche der Frakturheilung einsetzt (Liu et al. 2010; Peters et al. 2010) und über vier bis sechs Monate andauern kann (delayed-union) (Runkel und Rommens 2000). Steht der Heilungsprozess und erfolgt keine knöcherne Überbrückung nach sechs bis acht Monaten, hat sich eine Pseudarthrose (non-union) gebildet, die Heilung wird ausbleiben (Runkel und Rommens 2000). Um die Heilungsabläufe in einer späten Phase der Defektheilung genau beobachten zu können, wurden in der vorliegenden Studie die Proben nach einer verlängerten Heilungszeit von zwölf Wochen gewonnen. Histologisch konnte die Knochenheilung zu diesem Untersuchungszeitpunkt zur Phase des harten Kallus/Remodelling zugeordnet werden. Die Integration von Scaffold-

material in den Kallus und die beginnende Resorption dieses Materials sowie eine vorangeschrittene Knochenformation konnten dargestellt werden. Die Phase der Entzündung war abgeschlossen, die Revaskularisierung stark vorangeschritten und in Lakunen eingebettete Osteozyten sowie Osteoblasten, die Osteoid abschieden, konnten an Knochen trabekeln beobachtet werden. Zwölf Wochen post OP lag bei allen Tieren beider Gruppe eine verzögerte Defektheilung vor, bei zwei Tieren der zweiten Gruppe war der Defektbereich zwar unilateral knöchern überbrückt, diese Überbrückung war jedoch nicht vollständig abgeschlossen. Der Untersuchungszeitpunkt von zwölf Wochen erwies sich daher als geeignet, die Heilungsabläufe in einer späten Phase der Defektheilung und damit eine verzögerte Heilung zu untersuchen. Aufgrund der durch die Röntgenverlaufkontrollen beobachtete Stagnation des Kalluswachstums nach acht Wochen Heilungszeit könnte es im weiteren Verlauf zu einer Pseudarthrosebildung (non-union) nach sechs bis acht Monaten kommen.

Kritischer Defekt

Ein kritischer Defekt wird definiert als ein Defekt, der zwei- bis zweieinhalb mal so groß ist, wie der Durchmesser des betroffenen Knochens (Lindsey et al. 2006; Gugala Z. et al. 2007; Reichert et al. 2009). Die Größe eines kritischen Defektes, der per Definition in einem Versagen der spontanen Frakturheilung und somit zu einer Pseudarthrose führt, variiert stark je nach Tierspezies und Extremität (Hollinger und Kleinschmidt 1990; Dodde et al. 2000; Lindsey et al. 2006). Beim Schaf gilt dabei ein leerer diaphysärer Defekt von 20 mm ohne Anwendung eines Implantates als kritisch (Brunner et al. 1990; Gerhart et al. 1993; Gao et al. 1997a). Der Fixationstyp spielt bei dieser Defektgröße, bei einem leeren Defekt keine Rolle (Gao et al. 1997a). Ein Defekt, der mit einem Platzhalter in Form eines Knochenersatzstoffes gefüllt wird, muss jedoch um zu einer Pseudarthrose zu führen, größer sein (Gao et al. 1997a). In der Schaftibia wird am häufigsten ein kritischer Defekt von 30 - 40 mm verwendet, um das Heilungspotential von Knochenersatzstoffen zu untersuchen (Bloemers et al. 2003; den Boer et al. 2003; Hahn et al. 2011; Cipitria et al. 2012). In der aktuellen Studie wurde zur Untersuchung eines PCL- β -TCP-Scaffolds (ChronOS Strip®) ein 40-mm-Volldefekt gewählt, um trotz Verwendung eines Knochenersatzstoffes als Platzhalter die Defektheilung über eine adäquate Defektstrecke untersuchen zu können. Anhand der Ergebnisse zeigt sich, dass es sich bei der Defektstrecke von 40 mm um einen kritischen Defekt handelte. Keines der Tiere beider Gruppen wies nach zwölf Wochen eine vollständige Überbrückung des Defektes auf. Bei zwei Tieren der zweiten Gruppe kam es lediglich zu einer unilateralen Überbrückung, die Heilung des Defektes war jedoch noch nicht abgeschlossen. Der in der aktuellen Studie geschaffene kritische Defekt von 40 mm entspricht den Kriterien eines Defektes kritischer Größe, da er den zweifachen Durchmesser der Tibia übersteigt und voraussichtlich nicht in der physiologischen Heilungszeit von ca. sechs Monaten verheilt sein

wird (Schmitz und Hollinger 1986; Gugala und Gogolewski 1999; Gugala et al. 2007; Reichert et al. 2009).

Osteosynthese-Technik

Zur Fixierung von Defekten kritischer Größe in der Schafstibia sollte eine Technik verwendet werden, die in ähnlicher Weise beim Menschen Anwendung findet, da die Ergebnisse aus dem präklinischen Modell Aufschluss über die spätere Verwendung am Menschen geben sollen. Da Schafe jedoch nicht wie der Mensch eine kontrollierte Teilbelastung der Gliedmaße ausüben können, muss ein stabileres System verwendet werden oder ein Kompromiss aus Fixationssystem und Bewegungseinschränkung der Tiere post-OP eingegangen werden (Stürmer 1984).

Zur Stabilisierung eines kritischen Defekts wurden bereits verschiedene Techniken etabliert und angewandt wie z. B. uni- oder bilaterale externe Fixateure (Gugala und Gogolewski 1999; Kon et al. 2000), intramedulläre Marknägel (Bloemers et al. 2003; den Boer et al. 2003; Regauer et al. 2005) sowie einfache oder doppelte Fixationsplatten (Hahn et al. 2011; Cipitria et al. 2012). Nachteile dieser Osteosynthesemethoden sind die unerwünschten Wechselwirkungen wie eine gestörte Blutzirkulation, die z. B. zwischen Kompressionsplatten und Knochen auftreten können und so einen starken Einfluss auf den zu untersuchenden Defektbereich haben (Krischak et al. 2002; Hahn et al. 2011). Marknägel oder Plattenfixationssysteme beeinflussen die zu untersuchende Defektstelle sehr stark, sie wirken defektnah, neben dem Scaffold als Leitstruktur, an der Knochengewebe entlangwachsen kann oder füllen den Defekt selbst (Cipitria et al. 2012; Rentsch et al. 2014). Auch intramedulläre Marknägel beeinflussen allein durch ihre Position den zu untersuchenden Defektbereich und viele neuartige Modelle, die Plattensysteme verwenden, benötigen eine zusätzliche Stabilisierung mittels Vollcast oder eine Aufhängung im Gurtsystem, um die vollständige Belastung der Gliedmaße auszugleichen (Cipitria et al. 2012; Berner et al. 2013).

In der vorliegenden Studie wurde ein externer Hybrid-Ringfixateur bestehend aus zwei Ilizarov-Drähten und fünf Schanz-Schrauben zur Stabilisierung eines 40-mm-Volldefektes in der Schafstibia verwendet. Diese externe Osteosynthesetechnik bietet eine vielseitige und einfache Anwendung, einen besseren Schutz des äußeren Weichgewebes und vermeidet unerwünschte Wechselwirkungen zwischen Knochen und Fixationssystem (Krischak et al. 2002; Hahn et al. 2011). Der verwendete externe Hybrid-Ringfixateur lässt eine axiale Belastung zu, wobei Scher- und Torsionskräfte weitestgehend ausgeschaltet sind. Die Ilizarov-Drähte ermöglichen eine gewisse Dynamik, um die Stabilität der Osteosynthese bei sofortiger Belastung der Gliedmaße post OP zu gewährleisten. Zusätzlich ermöglicht ein externes Fixationssystem die Schaffung eines standardisierten leeren Knochendefektes, in den dann Knochenersatzstoffe eingebracht, befüllt und anschließend der gesamte Defektbereich un-

tersucht werden kann (Reichert und Devakara 2010; Hahn et al. 2011). Allerdings bietet diese Osteosynthesetechnik für die Tiere wenig Komfort und die Pins können als Eintrittspforte für Keime dienen, weshalb eine aufwendige Pinpflege nötig ist.

Das hier verwendete Fixationssystem musste im Rahmen der aktuellen Studie bei dem eingesetzten weichen Scaffold die komplette Last der Gliedmaße tragen und war relativ starr. Zudem muss bei so einem Modell am Schaf beachtet werden, dass diese Tiere zum einen alle Gliedmaßen stets gleichmäßig belasten und es zum anderen bei Fluchtreaktionen im Stall schnell zu kritischen Belastungen und im Rahmen von Unfallsituationen zu einem Versagen der Osteosynthese kommen kann. Auch Scherbewegungen können nicht zuverlässig ausgeschlossen werden, wodurch bei einer Überbelastung Pins aus dem Knochen ausbrechen können, was im Verlauf dieser Studie auch bei drei Tieren aufgrund von Unfällen im Stall der Fall war. Bei einem Tier wurde eine Re-OP durchgeführt, zwei andere Schafe, je eins aus jeder Gruppe, mussten vorzeitig aus dem Versuch genommen werden.

Die aufgestellte Hypothese, dass der verwendete Hybrid-Ringfixateur geeignet ist einen 40-mm-Osteotomie-Defekt in der Schafttibia zu stabilisieren und so die Untersuchung regenerativer Therapieansätze zu ermöglichen, kann bestätigt werden, da er zum einen eine sofortige physiologische Belastung der Gliedmaße post OP ohne Bewegungseinschränkung oder Einzelhaltung ermöglichte und zum Anderen die Gewinnung und Auswertung standardisierter Proben von sechs Tieren je Gruppe ermöglichte, die den vollständigen Defektbereich mit darin eingebrachtem Scaffold und das über zwölf Wochen gebildete Kallusgewebe umfassten.

5.1.2 Knochenersatzmaterial

Die Verwendung eines Knochenersatzmaterials wird notwendig, wenn ein Knochendefekt besteht, der nicht durch herkömmliche Therapieoptionen heilen kann. Das Knochenersatzmaterial soll den Knochen nicht vollständig ersetzen, sondern die Kontinuität und die mechanische Belastbarkeit des Knochens wiederherstellen sowie die Menge, Qualität und Geschwindigkeit der Knochenneubildung positiv beeinflussen (Rueger 1998).

Bei dem in dieser Studie verwendeten Knochenersatz (ChronOS Strip®) handelt es sich um ein Komposit aus Poly-Lactid-co- ϵ -Caprolacton (PCL) und β -Trikalziumphosphat (β -TCP). Die Kombination dieser Materialien führt zu einer Verbesserung der Eigenschaften im Vergleich zu den Einzelkomponenten. Polymere wie Polycaprolactone haben eine höhere Elastizität als Keramiken, wodurch das Komposit eine geringere Steifigkeit und eine niedrigere mechanische Belastbarkeit besitzt, aber auch eine bessere Osteokonduktivität und steuerbare Degradation erhalten soll (Hutmacher et al. 2007; Lam et al. 2009). Die Keramik und das Polymer des in der vorliegenden Studie verwendeten Scaffolds lagen in einem Verhältnis von 60 % zu 40 % \pm 10 % vor. Dadurch erhielt der Scaffold (ChronOS Strip®) eine hohe Fle-

xibilität und ließ sich intraoperativ leicht vernähen, zu einer Röhre formen und konnte daher je nach Bedarf an dem Defekt angepasst werden. Zwar war der Scaffold nicht lasttragend jedoch bot er zusätzliche Stabilität im Defektbereich indem er als Platzhalter diente und so einen Muskelprolaps verhinderte.

Die osteokonduktiven Eigenschaften eines Knochenersatzmaterials hängen von der Porosität, speziell von der Porengröße, dem Porenvolumen und der Interkonnektivität ab (Blokhuis et al. 2000). Der verwendete ChronOS Strip® weist aufgrund der Kombination von PCL und β -TCP eine ideale Makrostruktur auf, die laut Hersteller eine Porengröße von 150-500 μm und eine Gesamtporosität von 60% besitzt. Damit erfüllt er die Bedingungen, die für das Einwachsen von Gefäßen und die Migration von Osteoblasten und Osteoklasten, also von neuem Knochen nötig sind (Daculsi und Passuti 1990; Blokhuis et al. 2000). Zudem ist eine die Mikroporosität wichtig, um die Resorption des Material und die Diffusion von Nährstoffen zu ermöglichen (Driskell et al. 1972). Beim ChronOS Strip® weisen die Mikroporen einen Durchmesser von weniger als 10 μm auf, wodurch der Scaffold eine größere Oberfläche erhält, die Zirkulation von Körperflüssigkeiten ermöglicht wird und so die Um- und Abbauprozesse beschleunigt werden (Driskell et al. 1972).

5.1.3 Gewinnung und Applikation der autologen Spongiosa

Die Spongiosa wurde bei den sechs Tieren der zweiten Gruppe stets auf die gleiche Art aus dem rechten Beckenkamm gewonnen. Dieses Verfahren entspricht der Entnahmetechnik beim Menschen und wurde in anderen Studien entsprechend durchgeführt und gut von den Schafen toleriert (Pobloth 2010; Pobloth et al. 2015). Unter Verwendung eines scharfen Löffels wurde eine Menge von ca. 3,8 ml gesammelt und in einem eigens angefertigten Messzylinder aufgefangen und aufbewahrt, der im Innendurchmesser dem des den hohlzylindrischen Scaffolds entsprach. Die Applikation der Spongiosa in den Scaffold erfolgte direkt vor dem Einsetzen des Scaffolds in den geschaffenen 40 mm Defekt.

Die Tiere tolerierten auch in dieser Studie den zusätzlichen Eingriff am Becken gut. Bei zwei Tieren kam es zu einem Trauma an einer Heuraufe, bei der der eröffnete Teil des Beckenkamms vom unterliegenden Knochen abgelöst wurde und ohne ausreichende Blutversorgung abgestoßen wurde. Es kam bei beiden Tieren zu Wundinfektionen, die durch tägliche Wundreinigung sowie die Applikation von Antibiotika und Schmerzmittel ausheilte.

5.1.4 Entnahme und Aufarbeitung der Proben

Um ein Zerreißen des Gewebes im noch unvollständig ausgeheilten 40-mm-Osteotomiedefekt zu vermeiden, wurde der Hybrid-Ringfixateur für die Faxitronaufnahmen zunächst an der Tibia belassen. Darauf folgte das vorsichtige Zersägen der Tibia im Fixateur. Der Osteotomiebereich der Tibia wurde mit den angrenzenden Pins entnommen, um

zusätzliche Stabilität zu gewährleisten, bis die radiographischen und computertomografischen Aufnahmen abgeschlossen waren.

Die Proben wurden zur Fixierung für vier Tage in isotoner 10 % Formaldehyd-Alkohol-Lösung gelagert. Erst danach erfolgten die HR-pQCT und Mikro-CT-Aufnahmen. Durch die vorangegangene Lagerung in der Formaldehyd-Lösung erhielt das Gewebe eine ausreichende Festigkeit für das anschließende Zersägen. Dabei zeigte sich, dass lediglich ein midsagittaler Sägeschnitt durch die Tibia erfolgen konnte, ein gleichmäßiges Sägen weiterer Scheiben durch das weiche Gewebe war nicht möglich. Der Längsschnitt verlief stets zentral durch den im Defektbereich gebildeten Kallus, der dann in seiner longitudinalen Entwicklung entlang der Knochenachse und seiner Ausbreitung in der Sägeebene beurteilt werden konnte. Ein repräsentativer Querschnitt durch das Kallusgewebe im Osteotomiespalt konnte so stets beurteilt werden.

Aufgrund der Probengröße erwiesen sich die Aufbereitungsverfahren stellenweise als sehr komplex. So musste stets kontrolliert werden ob die einzelnen Bearbeitungsschritte für die weitere Verarbeitung angemessen waren. Bei der Kunststoffeinbettung waren die Entwässerung mittels Alkoholreihe und die anschließende vollständige Infiltration der Proben mit dem Kunststoff kritische Punkte. Eine ausreichende Infiltration des Gewebes mit dem Kunststoff war nötig, um eine ausreichende Aushärtung zu gewährleisten, eine ausreichende Festigkeit im Gewebe zu erreichen und so das Schneiden am Mikrotom zu ermöglichen. Lediglich eine Probe erwies sich nach der Kunststoffeinbettung als zu weich und musste daher erneut in Kunststoff infiltriert und eingebettet werden.

Insgesamt konnte bei drei Proben keine ausreichende Festigkeit erreicht werden, sodass die Schnitte nicht dünn genug geschnitten werden konnten, um eine Auswertung in der Movat-Pentachrom-Färbung vorzunehmen. Daher wurde bei diesen drei Schnitten auf Paraffinblöcke zurückgegriffen, die dann in die Auswertung gingen.

Bei der Paraffineinbettung war die vollständige Entkalkung der Proben besonders wichtig und wurde je nach Zustand der Probe über acht bis zwölf Wochen durchgeführt. Erst danach war das Gewebe weich genug, um am Mikrotom geschnitten werden zu können.

Alle restlichen Präparate der Kunststoff- als auch die der Paraffineinbettung, ließen sich problemlos an den jeweiligen Mikrotomen schneiden, wobei sich kleinere Artefakte und Risslinien aufgrund der Größe der Präparate nicht immer vollständig vermeiden ließen. Diese konnten jedoch bei der computergestützten Bildanalyse manuell korrigiert werden.

Es stellte eine labor- und datentechnische Herausforderung dar, Proben dieser Größe auszuwerten. Der Hersteller unterstützt die Einbettung derartig großer Proben nicht mit standardmäßigen Einbettungsformen, daher musste bei der Einbettung mit entsprechenden Gefäße ohne Luftabschluss gearbeitet werden (Honiggläser). Bei unzureichender Polymerisati-

on musste daher eine Rückführung der Proben mit anschließender erneuter Infiltration und Einbettung erfolgen.

5.1.5 Computertomographische Auswertung

Die quantitative Messung von Knochenmasse hat sich als präzise Technik erwiesen, durch die zusätzliche Informationen über die Knochenheilung gewonnen werden können, die zum Verständnis von Komplikationen während der Frakturheilung, wie einer verzögerten oder ausbleibenden Frakturheilung sowie bei Entscheidungen für bestimmte Fixationssysteme beitragen können (Augat et al. 1997). Ein entscheidender Vorteil der CT-Untersuchung ist im Gegensatz zur Histologie die Möglichkeit, sich einen Eindruck der dreidimensionalen Verhältnisse im Osteotomiebereich verschaffen und diesen Bereich umfassend quantifizieren zu können.

In der aktuellen Studie sollte die Knochenheilung in einem kritischen Osteotomiedefekt dreidimensional analysiert werden. Das HR-pQCT hat gegenüber anderen am Patienten eingesetzten CTs den Vorteil eine entsprechende Probengröße bei einer erhöhten Auflösung scannen zu können. Eine Gesamtaufnahme der Proben war im Mikro-CT nicht möglich, daher sollte mit einer höheren Auflösung der Abschnitt zwischen knöchernem Kallusgewebe, das von den angrenzenden Tibiasegmenten in den Defekt wuchs, und dem Scaffold näher charakterisiert werden. Eine besondere Schwierigkeit war dabei die Abgrenzung des Scaffoldmaterials vom Knochengewebe. Dies musste manuell im Computerprogramm festgelegt werden. Dazu wurde jedes Schnittbild einzeln betrachtet und sowohl kortikaler Knochen als auch Kallusgewebe markiert. Scaffoldmaterial wurde von der Messung ausgeschlossen, da nur die Menge an neugebildetem Knochengewebe von Interesse war.

In der vorliegenden Studie wurden von jedem Tier computertomographische Aufnahmen vom gesamten Defektbereich im HR-pQCT und zwei Teilaufnahmen einer definierten Größe im Bereich der proximalen und distalen Osteotomiekante im Mikro-CT angefertigt.

Beim HR-pQCT (High Resolution Peripheral Quantitative Computed Tomography) werden hochauflösende Aufnahmen durch Hochgeschwindigkeitsscans und bei einer geringen Strahlendosis (60 kVp, 900 μ A) erzeugt. Die HR-pQCT (Xtreme-CT, Scanco Medical AG, Brüttisellen, Schweiz) ist eine neuartige computertomographische Methode, die sehr exakt und reproduzierbar die Knochenmikrostruktur bei einer nominalen, isotropischen Voxelgröße (3-dimensionale Bildeinheit) von 41 μ m darstellt. Die Knochendichteuntersuchung mittels HR-pQCT wurde mittlerweile für den humanen distalen Radius und die distale Tibia in Studien validiert. Mittels HR-pQCT lassen sich 3-dimensionale morphometrische Parameter sowie volumetrische Dichteparameter der kortikalen und trabekulären Bestandteile des Knochens erfassen (Finzel et al. 2013). Im HR-pQCT war es möglich, die Proben über eine Ge-

samtstrecke von bis zu 7 cm, also den gesamten Osteotomiebereich und die angrenzende Kortikales, zu analysieren.

Im Mikro-CT wurden hochauflösende Aufnahmen (19 μm Voxelgröße) in kurzer Aufnahmezeit und bei geringer Strahlendosis von 70 kVp und 110 μA angefertigt. Dieses CT ist für präklinische Studien an Mäusen und Ratten konzipiert, ermöglicht daher für diese Spezies Ganzkörperaufnahmen und stellt die übliche Auswertungsmethode für Osteotomieheilungsstudien dar (Claes et al. 2009; Willie et al. 2013).

In der vorliegenden Studie konnte zwar die gesamte Gewebeprobe aus der Schafstibia in das Probenbett des Mikro-CT eingebracht werden, jedoch wurde aufgrund der Größe der Präparate und der damit verbundenen Datenmenge die Messung auf einen proximalen und distalen Abschnitt von 12 mm Länge zwischen einwachsendem Knochen und Scaffold beschränkt. Diese Messung wurde dann als ergänzende Untersuchung zum HR-pQCT zur Beurteilung der Knochenneubildung herangezogen.

Die Analyse aller Aufnahmen erfolgte mit Hilfe des PC-Programms SCANCO Medical Viva CT 40 μCT (V 6.1, Brüttsellen, Switzerland). Dabei wurden sämtliche Parameter zur Beurteilung Quantität und Qualität von Kallusgewebe ausgewertet: Total Volume (TV), Bone Volume (BV), Quotient der BV & TV (BV/TV), Bone Mineral Density (BMD) und Bone Mineral Content (BMC) (Morgan et al. 2009; Bouxsein et al. 2010). Diese Parameter dienen als Standard um Kallus- und Knochengewebe sowie Heilungsfortschritte in der Knochenheilung beurteilen zu können (Claes et al. 2009; Reichert et al. 2011; Reichert et al. 2012a; Berner et al. 2013; Cipitria et al. 2013; Willie et al. 2013). Des Weiteren war es in der vorliegenden Studie anhand dieser Parameter möglich, einen Vergleich des Abschnittes am Übergang von Kortikalis zum knöchernen Kallus in beiden Gruppen vorzunehmen und einen neuartigen Scaffold im kritischen Defekt im Zeitrahmen einer verzögerten Frakturheilung zu untersuchen.

5.1.6 Histomorphologische Auswertung

Bei der histomorphologischen Auswertung wurde von jedem Tier ein Präparat in der kombinierten Safranin-Orange/von-Kossa-Färbung, Movat-Pentachrom-Färbung und Masson-Goldner-Färbung betrachtet. Die histomorphologische Beurteilung liefert ergänzend zu den quantitativen histologischen Methoden, der computertomographischen Auswertung und den Gefäß-, Osteoklasten- und Riesenzellzählungen wichtige Informationen über das Heilergebnis des kritischen Osteotomiedefektes. Mit der histomorphologischen Auswertung lassen sich nicht nur Zahlen vergleichen, sondern auch komplexe Vorgänge der Knochenheilung in einem kritischen Osteotomiedefekt unter Verwendung eines Knochenersatzmaterial beschreiben (Cipitria et al. 2012; Reichert et al. 2012a).

Durch die aufwändigen Färbungen konnten die Abläufe im Gewebe wie die enchondrale Ossifikation aber auch die Gewebezusammensetzung und -verteilung im Osteotomiespalt, die Gewebereaktion auf das verwendete Knochenersatzmaterial und dessen Degradation bewertet sowie verschiedene Zelltypen im Osteotomiedefekt, die Knochenqualität und Entzündungsreaktionen dargestellt werden. Beurteilt wurden dann insbesondere das Kalluswachstum auf der Scaffoldoberfläche und durch dessen Poren sowie die Kallusbildung an der Oberfläche der Kortikales.

5.1.7 Histomorphometrische Auswertung

Die histomorphometrische Auswertung erfolgte an jeweils einem Movat-Pentachrom gefärbten Gewebeschnitt pro Tier. In dieser farbenfrohen Gewebefärbung war die Differenzierung von Knochen- und Knorpelgewebe gut möglich. Mineralisiertes Knochengewebe und Kollagen stellt sich leuchtend gelb dar. Nicht-mineralisierter Knorpel färbt sich blau-grün und mineralisierter Knorpel gelb. Osteoid färbt sich in dieser Färbung dunkelrot und elastische Fasern rot an. Bindegewebe stellt sich in verschiedenen Gelb- und Grüntönen dar, die Zellkerne färben sich blauschwarz und das Zytoplasma wird rötlich angefärbt (Movat 1955).

Die computergestützte histomorphometrische Auswertung bietet den Vorteil der automatisierten und standardisierten Auswertung von Gewebeflächen und dem besseren Vergleich des Heilungsergebnisses auf Gewebewebeebene zwischen den Gruppen. Sie wird standardmäßig zur Beurteilung der Kalluszusammensetzung und des Heilungsprozesses im Osteotomiespalt herangezogen (Lienau et al. 2010; Peters et al. 2010; Schell et al. 2011).

Das Computerprogramm ist in der Lage, vorher definierte Farbpixel zu vermessen und dann als Flächen auszugeben. Die entsprechenden Gewebeschnitte wurden unter dem Mikroskop kontrolliert und bei Bedarf manuell korrigiert. Von Vorteil ist hier die einfache Auswertung auch durch Personen ohne spezielle Vorkenntnisse. Bei der automatisierten oder halb automatisierten Messung können individuelle Unterschiede im Vergleich mit manuellen Messmethoden reduziert werden (Wright et al. 1992; Flygare et al. 1997).

5.1.8 Gefäßzählung

Zum Nachweis von Gefäßen im Kallusgewebe von Schafen im ausgedehnten segmentalen Osteotomiedefekt wurde die selektive Anfärbung des α -smooth-muscle-actins durch die angewandte immunhistochemische Färbung am Paraffinschnitt verwendet. Das Färbeprotokoll hat sich in zahlreichen Versuchen am Schafknochen bewährt (Lienau et al. 2005; Lienau et al. 2006; Peters et al. 2010). In der aktuellen Studie war aufgrund der Größe der Präparate und der damit verbundenen großen Fläche und hohen Zahl an Gefäßen nur die Auszählung innerhalb von fünfzehn festgelegten, repräsentativen ROIs möglich (3.8.5. Gefäßzählung). Diese fünfzehn Gesichtsfelder (fünf Gesichtsfelder auf drei Höhen: proximal, zentral, distal)

im bindegewebig durchwachsenen Scaffoldbereich wurden ausgezählt, um einen repräsentativen Bereich zur Quantifizierung und Beurteilung der Vaskularisierung zu untersuchen. Die Bindegewebsfläche je Gesichtsfeld wurde ebenfalls bestimmt und anschließend die erfasste Gefäßdichte pro Quadratmillimeter Bindegewebe errechnet. Durch diese Färbung werden Myofibroblasten ebenfalls rot angefärbt, durch das fehlende Lumen konnte sie jedoch von Gefäßen unterschieden werden. Dagegen werden bei dieser Färbung neu gebildete Kapillaren, die nur aus Endothelzellen bestehen, nicht erfasst (Lienau et al. 2005). Diese ließen sich durch eine selektive Färbung, die den von-Willebrand-Faktor nachweist, darstellen. Da bereits durch die α -SMA-Färbung eine hohe Anzahl von Gefäßen dargestellt werden konnte, wurde auf eine weitere selektive Färbung verzichtet.

Die Durchführung der Färbung war an den Tibiapräparaten leicht möglich und zeigte bei Wiederholungen am gleichen Präparat eine vergleichbare Anzahl von angefärbten Gefäßen. Als kritische Punkte dieser Messmethode war die manuelle Einzeichnung der fünfzehn verschiedenen Gesichtsfelder zu sehen sowie der Bezug der Gefäßanzahl auf eine Bindegewebsfläche. Die Bindegewebsflächen jedes Gesichtsfeldes unterschieden sich durch verschieden große Leerflächen, die durch das Auswaschen von Scaffoldmaterial bei der Färbung entstanden waren und somit zu einer gewissen Messungengenauigkeit geführt haben können.

5.1.9 Osteoklastendichte

Die Osteoklasten wurden mit einer biochemischen Markierung, der Anfärbung der lysosomenständigen Tartrat-resistenten alkalischen Phosphatase (TRAP), dargestellt und so optisch quantifizierbar. Alle Zellen, die sich rosa anfärbten, mindestens zwei Kerne besaßen und Kontakt zum Knochen hatten, wurden als Osteoklasten gezählt (Schell et al. 2006). Auch die Zählung der Osteoklasten erfolgte am Paraffinschnitt, da sich am Plastikschnitt deutlich schlechtere Färbeergebnisse erzielen ließen. Die Bestimmung der Osteoklastendichte je nach Lokalisation erfolgte, um eine Charakterisierung des Remodelling nach zwölf Wochen Defektheilungszeit vornehmen zu können. Die Osteoklasten an der Kortikalis geben Hinweise auf den Grad einer Resorption von kortikalem Knochen oder Lyse von Knochen aufgrund von Entzündungsreaktionen, wohingegen Osteoklasten am knöchernen Kallus Hinweis auf einen Umbau des Gewebes im Verlauf des Heilungsprozesses und damit auf ein fortgeschrittenes Stadium der Knochenheilung geben können.

Die Osteoklasten wurden pro Quadratmillimeter kortikaler Fläche bestimmt. Auch hier konnte aufgrund der Dimensionen der Präparate keine Digitalisierung vorgenommen werden, sodass auf die manuelle Zählung mittels 20facher Vergrößerung unter dem Lichtmikroskop mit Handzählgerät zurückgegriffen wurde. Des Weiteren wurden alle Osteoklasten mit Kontakt zu knöchernem Kallus bestimmt. Dazu wurden alle Osteoklasten im Osteotomiespalt durch

meanderförmiges Durchmustern der Gewebeschnitte bestimmt und anschließend auf die Kallusfläche bezogen. Die Kallusfläche wurde in einem Movat-Pentachrom gefärbten Paraffinschnitt computergestützt, histomorphometrisch bestimmt.

Als Ursache für eventuelle Messungenauigkeiten ist der Bezug der Osteoklasten von einem Paraffinschnitt auf eine Knochenfläche, die bei der Auswertung eines direkt angrenzenden Paraffinschnittes gemessen wurde, zu sehen. Da der zur Knochenflächenbestimmung herangezogene Paraffinschnitt mit dem TRAP gefärbten Schnitt vergleichbar ist, wurde auf eine Knochenflächenbestimmung vom gleichen Paraffinschnitt verzichtet und diese Messungenauigkeit in Kauf genommen.

5.1.10 Riesenzelldichte

Auch die Riesenzellzählung erfolgte in den TRAP gefärbten Paraffinschnitten, da die Färbung am Plastikschnitt zu deutlich schlechteren Färbeergebnissen führte. Die Riesenzellzählung erfolgte, um den Abbau des Scaffolds, eine Entzündungsreaktion und das Remodelling während der Knochenheilung näher quantifizieren zu können.

Aufgrund der Größe der Präparate konnte keine Digitalisierung vorgenommen werden, sodass erneut auf die manuelle Zählung mittels 20facher Vergrößerung unter dem Lichtmikroskop mit Handzählgerät zurückgegriffen wurde. Die Einteilung der ROIs erfolgte wie für die Auszählung der Gefäße in 15 Gesichtsfeldern (3.8.6. Osteoklastenzählung) (fünf Gesichtsfelder auf drei Höhen: proximal, zentral, distal) im bindegewebig durchwachsenen Scaffoldbereich, um einen repräsentativen Bereich zur Quantifizierung und Beurteilung der Biodegradation oder einer Fremdkörperreaktion vornehmen zu können. Die Bindegewebsfläche je Gesichtsfeld wurde ebenfalls bestimmt und anschließend die erfasste Riesenzelldichte pro Quadratmillimeter Bindegewebe errechnet. Als Riesenzellen wurden alle Zellen gezählt, die sich rosa anfärbten, mindestens zwei Zellkerne besaßen und keinen Kontakt zu knöchernem Gewebe hatten.

Als kritische Punkte dieser Messmethode ist hier ebenfalls die manuelle Einzeichnung der fünfzehn verschiedenen Gesichtsfelder zu sehen sowie der Bezug der Riesenzellzahl auf eine Bindegewebsfläche. Auch hier unterschieden sich die Bindegewebsflächen jedes Gesichtsfeldes durch verschieden große Leerflächen, die durch das Auswaschen von Scaffoldmaterial bei der Färbung entstanden waren und so zu einer gewissen Messungenauigkeit geführt haben können. Aufgrund der hohen Zahl an Riesenzellen kann diese jedoch vernachlässigt werden.

5.2 Diskussion der Ergebnisse

5.2.1 Röntgen

Röntgenologisch zeigten sich nach vier Wochen in beiden Gruppen kaum Veränderungen der Scaffoldstruktur, der Osteotomiekannte oder bei der Kallusbildung im Osteotomiespalt im Vergleich zum röntgenologischen Bild postoperativ. Nach acht Wochen war bei drei Tieren der ersten und allen sechs Tieren der zweiten Gruppe mineralisiertes Kallusgewebe im Defektbereich zu beobachten. In der zweiten Gruppe zeigten nach acht Wochen zwei Tiere eine unilaterale Überbrückung des Osteotomiebereiches, bei zwei anderen waren größere, mineralisierte Kallusausläufer unilateral im Defekt erkennbar und bei den zwei übrigen bildeten sich vereinzelte Kallusinseln im Scaffoldbereich ohne Verbindung zum kortikalen Knochen.

Bei zwei Tieren der ersten Gruppe war erst nach zwölf Wochen mineralisiertes Kallusgewebe im Osteotomiespalt erkennbar. Bei den vier anderen Tieren der ersten Gruppe und allen Tieren der zweiten Gruppe war bereits im Zeitraum zwischen der achten und der zwölften Woche eine Zunahme der Röntgendichte des Kallusgewebes zu beobachten. Quantitativ war nach zwölf Wochen jedoch keine weitere Steigerung an Kallusgewebe bei diesen Tieren zu beobachtende. Lohfeld und Mitarbeiter konnten in einem mid-diaphysären 20-mm-Osteotomiedefekt in der Schafstibia, stabilisiert mittels winkelstabiler Kompressionsplatte (LCP), ebenfalls darstellen, dass eine Knochenneubildung bei PCL- β -TCP- und β -TCP-Implantaten im Defektbereich hauptsächlich zwischen der achten und vierzehnten Woche erfolgt (Lohfeld et al. 2012).

Reichert und Kollegen konnten in einem mid-diaphysären 30-mm-Osteotomiedefekt, stabilisiert mittels dynamischer Kompressionsplatte (DCP) zeigen, dass die Verwendung von autologem Knochenmaterial im Vergleich zu einem mit medical-grade Polycaprolacton-Trikalziumphosphat-Scaffold (mPCL-TCP) gefüllten Defekt zu einem vorangeschrittenen Knochenwachstum und einer größeren Überbrückungsrate zum Zwölfwochenzeitpunkt führt (Reichert et al. 2012a). Auch Berner et al. konnten in einem mid-diaphysären 30-mm-Osteotomiedefektmodell, stabilisiert mittels DC-Platte, zeigen, dass ein mit allogenen oder autologen mesenchymalen Stammzellen (MSC) bestückter mPCL-TCP-Scaffold im Vergleich zum Leerdefekt ein verbessertes Knochenwachstum nach zwölf Wochen aufweist (Berner et al. 2013). Zur Defektüberbrückung kam es dabei jedoch nur in der Positivgruppe (ABG ohne Scaffold). Wie in den beiden genannten Studien von Reichert et al. und Berner et al. zeigen die Ergebnisse der aktuellen Studie ebenfalls, dass die Kombination eines Scaffolds mit autologem Knochenmaterial zu einer verbesserten Defektheilung führt. Anhand der Röntgenverlaufskontrollen der vorliegenden Studie war erkennbar, dass die Knochenneubildung in der Spongiosa-Gruppe zwischen der vierten und achten Woche beginnt und sich bis zur zwölften Woche fortsetzt. Da sich mineralisiertes Gewebe radiologisch erst ab einer Dichte

von 30% darstellen lässt (Radasch 1999), muss der knöcherne Kallus in der Spongiosa-Gruppe der vorliegenden Studie bei allen Tieren bereits zum Achtwochenzeitpunkt eine entsprechende Dichte aufgewiesen haben und damit eine vermehrte Knochenbildung im Defektbereich vonstattengegangen sein, wohingegen bei zwei Tieren der ersten Gruppe erst zum Zwölfwochenzeitpunkt deutliche Knochenzubildungen erkennbar waren, die außerdem einen geringeren Umfang erreichten. Die zweite Gruppe zeigte daher im Vergleich zur ersten Gruppe sowohl in der Quantität als auch in der Qualität ein weiter fortgeschrittenes Ergebnis, was auf eine initiale Beschleunigung des Knochenwachstums durch die Verwendung von Spongiosa in der vorliegenden Studie hindeutet.

Radiologische Charakteristika atrophier Pseudarthrosen stellen mangelnde periostale und endostale Kallusbildung sowie die Abrundung der Fraktur- und Osteotomieenden mit Erweiterung des Osteotomiespaltes dar (Frost 1989; Rüter und Mayr 1999; Jones und Mayo 2005). Anhand der vorliegenden Röntgenbilder war bereits nach acht Wochen bei je vier Tieren beider Gruppen eine Abrundung der Osteotomiekanten erkennbar. Nach zwölf Wochen erschienen die Osteotomiekanten aller Tiere der ersten und vier Tieren der zweiten Gruppe abgerundet. Bei zwei Tieren der zweiten Gruppe mit unilateraler Überbrückung des Osteotomiespaltes war die Osteotomiekante nichtmehr vom umgebenden knöchernen Kallus zu unterscheiden. Eine Atrophie der Kortikalisenden mit Erweiterung des Osteotomiespaltes konnte bei keinem Tier beider Gruppe festgestellt werden. Zu diesem Untersuchungszeitpunkt kann von einer verzögerten Heilung gesprochen werden, die wahrscheinlich in einer Pseudarthrose münden würde (Runkel und Rommens 2000). Der Heilungsverlauf zeigt ein moderates Heilungspotential, wobei eine mäßige und nur bei zwei Tieren eine starke Kallusbildung zu beobachten ist. Eine Klassifizierung in eine Pseudarthrose sollte erst zu einem späteren Untersuchungszeitpunkt, das heißt nach einem Heilungsverlauf von sechs Monaten vorgenommen werden, da eine Fraktur bei Patienten auch erst nach diesem Heilungszeitraum nach radiologischen Kriterien sicher eingeschätzt werden kann (Wiss und Stetson 1996).

5.2.2 Computertomographische Auswertung

Die 3D-Ansichten der HR-pQCT-Aufnahmen zeigen mehr knöchernes Kallusgewebe in der zweiten Gruppe, zwei Tiere dieser Gruppe zeigten eine unilaterale Überbrückung des Osteotomiedefektes und auch die statistische Auswertung ergab für einzelne Tiere ein deutlich größeres Knochenvolumen (BV), ein statistisch signifikanter Unterschied der HR-pQCT-Untersuchung ergab sich im Vergleich beider Gruppen jedoch nicht.

Von besonderem Interesse war der Übergang zwischen Kortikalis, Scaffold und Kallus, daher wurden zusätzlich Aufnahmen dieses Bereichs im Mikro-CT angefertigt. Bei der Betrachtung der 3D-Ansichten der Mikro-CT-Aufnahmen zeigt sich ebenfalls eine vermehrte Kno-

chenbildung in der zweiten Gruppe. Die statistische Auswertung der Mikro-CT-Untersuchung ergab für den Bereich am Übergang zwischen Kortikalis und Defekt, sowohl proximal als auch distal, für das Total Volume (TV) ein signifikant größeres Gesamtvolumen in der zweiten Gruppe im Vergleich zur ersten. Das Bone Volume (BV) war dagegen nur bei einzelnen Tieren der zweiten Gruppe erhöht, im Vergleich zwischen den beiden Gruppen ergab sich kein statistisch signifikanter Unterschied.

In der Mikro-CT-Untersuchung wurde im Gegensatz zur Messung im HR-pQCT in der proximalen und in der distalen ROI ein signifikant größeres TV in der zweiten Gruppe gemessen. Dies kann durch die höhere Auflösung bei der Messung im Mikro-CT und die dadurch genauere Aufteilung von Voxeln bei der ThresholdEinstellung bedingt sein. Da sich das TV jedoch aus mineralisiertem und nicht mineralisiertem Gewebe zusammensetzt, kann für die zweite Gruppe nur ein größeres Volumen an weichem, nicht mineralisiertem Kallus angenommen werden. Das mineralisierte Kallusgewebe (Bone Volume) unterscheidet sich in beiden CT-Messungen nicht signifikant. Die HR-pQCT-Messung spiegelt somit die detaillierten Ergebnisse des Mikro-CT wider. Es kann daher anhand der HR-pQCT-Messung eine Aussage über den gesamten Osteotomiebereich getroffen werden.

Das relative Knochenvolumen (BV/TV) bezieht das Knochenvolumen auf das Gesamtvolumen (Cano et al. 2007), und war in beiden CT-Messungen in beiden Gruppen ähnlich. In der zweiten Gruppe war der Median des BV/TV in der Gesamt-ROI und den Teil-ROIs immer kleiner als in der ersten Gruppe. Das bedeutet, dass insgesamt weniger relativer Knochenanteil im Kallus der Tiere der zweiten Gruppe vorhanden war, was durch ein vermehrtes Vorkommen von bindegewebigem oder zumindest weniger mineralisiertem Kallus im Verhältnis zum Gesamtvolumen bedingt sein kann und sich auch schon beim Vergleich des TV gezeigt hatte. In der zweiten Gruppe wurde also im Umfang mehr Kallusgewebe gebildet, das zu einem großen Teil aus Bindegewebe und nicht mineralisiertem Kallus bestand.

Die Dichte des mineralisierten Knochens (Bone Mineral Density, mgHA/ccm) war in allen ROIs in beiden Gruppen sehr ähnlich. Auch der Knochenmineralgehalt (Bone Mineral Content, mgHA) war in allen ROIs in beiden Gruppen ähnlich, was insgesamt auf eine ähnliche Kallusqualität nach zwölf Wochen Standzeit schließen lässt.

In verschiedenen Studien (Reichert et al. 2012a; Berner et al. 2013; Cipitria et al. 2013) konnte in mid-diaphysären 30-mm-Osteotomiedefekten in der Schafstibia, stabilisiert mittels interner Fixationsplatten, gezeigt werden, dass das BV unter Verwendung eines Scaffolds aus mPLC-TCP in Kombination mit Wachstumsfaktoren (rhBMP-7, recombinant human bone morphogenetic protein 7) oder bei Verwendung autologer Spongiosa (ABG) signifikant höher ist als bei der alleinigen Verwendung dieses Scaffolds. Des Weiteren zeigte sich in diesen Studien, dass es zu mehr Knochenneubildung im Bereich des Übergangs zwischen Knochen und Defektbereich kommt, die Knochenneubildung also vom kortikalen Knochen ausgeht

(Reichert et al. 2012a). Die Ergebnisse der aktuellen Studie zeigen für einzelne Tiere der zweiten Gruppe (ChronOS Strip® + Spongiosa) ebenfalls deutlich höhere Werte bei der Knochenneubildung, jedoch unterscheiden sich die Werte beider Gruppen im Vergleich nicht statistisch signifikant. Die Hypothese, dass die Kombination des Scaffolds mit autologer Spongiosa die Knochendefektheilung stimuliert, kann somit bestätigt werden, da die Verwendung des β -TCP-Scaffolds in Kombination mit autologer Spongiosa in der aktuellen Studie eine vermehrte Kallusbildung stimulierte, was es bei zwei Tieren sogar zu einer unilateralen Überbückung des Defektes und somit zu einer verbesserten Knochendefektheilung führte.

5.2.3 Histomorphologie und Histomorphometrie

Nach zwölf Wochen Heilungszeit hatte sich bei allen Tieren beider Gruppen Geflechtknochen im Osteotomiespalt gebildet. Die Verwendung autologer Spongiosa in Kombination mit dem Kompositscaffold (ChronOS Strip®) zeigte eine Verbesserung der kritischen Defektheilung im Vergleich zu der Gruppe, die nur den Scaffold erhalten hatte. Zwei Tiere der zweiten Gruppe (ChronOS Strip® + Spongiosa; n = 6) zeigten eine knöchernen Überbrückung und auch die restlichen vier Tiere zeigten histomorphologisch ein größeres Maß an Knochenwachstum im Vergleich zu den Tieren der ersten Gruppe. Die histomorphometrische Auswertung bestätigte, dass einzelne Tiere deutlich größere Knochenflächen aufwiesen, ein statistisch signifikanter Unterschied ergab sich im Vergleich beider Gruppen jedoch nicht. Diese vermehrte Kallusbildung in der zweiten Gruppe im Vergleich zur ersten ist auf die Verwendung autologer Spongiosa zurückzuführen, da diese starke osteogenetische und osteoinduktive Potenz in Form von Osteoprogenitorzellen, Knochenmatrix und Wachstumsfaktoren besitzt (Mahendra und Maclean 2007).

In der vorliegenden Studie liefen die Heilungsabläufe im Vergleich zu einer normalen Fraktur verzögert ab, histologisch befand sich die Knochenheilung im Osteotomiedefekt nach zwölf Wochen in der Phase des harten Kallus/Remodelling. Es konnte die beginnende Resorption des Scaffolds und eine vorangeschrittene Knochenformation beobachtet werden. Die Phase der Entzündung war bereits abgeschlossen, die Revaskularisierung stark vorangeschritten, in Lakunen eingebettete Osteozyten und Osteoblasten saumartig an Knochen trabekeln vorzufinden, die Osteoid abschieden.

Reichert und Mitarbeiter untersuchten in einem 30-mm-Osteotomiedefektmodell an der Schafstibia, stabilisiert mittels dynamischer Kompressionsplatten, einen mPCL-TCP-Scaffold, allein oder in Kombination mit MSC, oder einem Wachstumsfaktoren (rhBMP-7). Wie auch in der vorliegenden Studie beobachteten Reichert et al. vaskularisiertes, mineralisiertes Knochengewebe sowie nicht mineralisiertes Osteoid, das besonders am Übergang zwischen mineralisiertem Knochengewebe und Bindegewebe zu beobachten war und von

knochensezernierenden Osteoblasten sowie knochenresorbierenden Osteoklasten umrandet war (Reichert et al. 2012a).

In der vorliegenden Studie ist die autologe Spongiosa, die bei den Tieren der zweiten Gruppe mit dem Scaffold eingebracht wurde, nach zwölf Wochen nicht mehr von neu gebildetem Geflechtknochen zu unterscheiden. Nach zwölf Wochen hatte vor allem Bindegewebe den Defekt überbrückt und den Scaffold durch die Poren und auf der Oberfläche umwachsen. Das histologische Erscheinungsbild der Osteotomiezone stellte sich in beiden Gruppen relativ einheitlich dar. Der Scaffold stellte sich immer als eine aus zwei Streifen bestehende Struktur dar, die löchrig erschien und in Kontakt zu den angrenzenden Kortikales stand, was durch das Auswaschen des Scaffoldmaterials bei der Färbung bedingt war. Der Scaffold war auf seiner Oberfläche und durch die Poren hindurch von unstrukturiertem, lockerem Bindegewebe umwachsen.

Cipitria und Mitarbeiter untersuchten in ihrer Studie am 30-mm-Osteotomiedefektmodell an der Schafstibia, stabilisiert mittels dynamischer Kompressionsplatte, einen PCL- β -TCP-Scaffold, um den Effekt der Scaffoldarchitektur auf die Zellorganisation sowie die Bindegewebs- und Knochenformation zu erhalten. Sie beobachteten größtenteils Bindegewebszellen direkt auf der Scaffoldoberfläche aufliegend (Cipitria et al. 2012). Auch in der aktuellen Studie konnten überwiegend Retikularfasern, einige Typ-I-Kollagenfasern und elastische Faser auf der Scaffoldoberfläche beobachtet werden. Das Bindegewebe erschien in der vorliegenden Studie deutlich dichter als bei Cipitria et al., was wahrscheinlich durch eine andere Scaffoldmikrostruktur und Porosität bedingt war. Bei vielen Tieren der aktuellen Studie hatte sich an der äußeren Scaffoldoberfläche Geflechtknochen gebildet, der stellenweise in das Scaffoldinnere hineinwuchs. Der Scaffold agierte als Platzhalter und verhinderte einen Vorfall von Muskel- oder Weichgewebe aus der Umgebung in den Osteotomiespalt. Das Bindegewebe diente im Scaffoldbereich als netzartige Struktur, an der Riesenzellen und knochenbildende Vorläuferzellen entlang in das Scaffoldinnere wandern konnten, um im Rahmen des Defektregeneration kristalline Scaffoldstrukturen ab- und Knochen aufzubauen. Die Hypothese, dass ein Kompositscaffold aus PCL- β -TCP geeignet ist die Regeneration in einem kritischen, segmentalen Knochendefekt zu unterstützen, kann daher bestätigt werden. Des Weiteren kann, wie bei Cipitria und Kollegen, von einem Leitschienenefekt des Scaffolds ausgegangen werden, da er zunächst die Bildung eines strukturierten Bindegewebes fördert, welches dann sekundär als strukturgebendes Netz für die Zellmigration und anschließenden Mineralisationsprozess dienen kann, jedoch nicht zwangsläufig zu einer vollständigen Defektüberbrückung führen muss (Cipitria et al. 2012).

Besonders auffällig war in beiden Gruppen der aktuellen Studie die Formation von spitz zulaufenden Kallusausläufern, bevorzugt an der lateralen Seite der Osteotomie. In der zweiten Gruppe waren diese Kallusausläufer sehr lang und schienen vorzugsweise an der äußeren

Scaffoldoberfläche entlang zu wachsen, an der inneren Oberfläche des hohlzylindrischen Scaffolds waren nur inselartig, dünne Bälkchen neugebildeten Knochens festzustellen. Auch in einer Studie von Rentsch und Mitarbeitern konnte nach einer Heilungszeit von zwölf Wochen in einem 30-mm-Osteotomie-Defektmodell beim Schaf, stabilisiert mittels IMN, unter Verwendung eines PCL-Scaffolds bei zwei von vier Tieren eine unilaterale Überbrückung der Tibia beobachtet werden (Rentsch et al. 2012). Rentsch und Mitarbeiter beobachteten dabei auch, dass die Knochenneubildung hauptsächlich im peripheren Bereich des Scaffoldszylinders ablief.

Aus der Literatur ist bekannt, dass bei einem monolateral montierten Fixateur externe an der Fixateur-fernen Seite von höheren Scherbewegungen auszugehen ist (Probst und Spiegel 1997), die zu einer stärkeren mechanischen Stimulation führen und damit die Kallusbildung verstärken. Bei dem in dieser Studie verwendete Hybrid-Ringfixateur sollten durch die verwendeten Ringe Scherbewegungen gering gehalten und eine ausreichende Steifigkeit erreicht werden. Die Pins und Schanz-Schrauben wurden bei dem Hybrid-Ringfixateur der vorliegenden Studie von medial befestigt, daher ist lateral in geringem Umfang mehr Bewegung im Osteotomiebereich möglich, welche eine mechanische Stimulation für eine verstärkte Knochenbildung in diesem Bereich verursacht haben kann. Generell lässt der Hybrid-Ringfixateur jedoch hauptsächlich axiale Belastung zu, sodass kaum Scher- und Torsionskräfte auf den Defektbereich wirken konnten. Die vermehrte Kallusbildung an der lateralen Seite der Gliedmaße in der aktuellen Studie ist daher wahrscheinlich durch die bessere Vaskularisierung an dieser Seite bedingt, die das umgebende Muskel- und Weichgewebe bietet. Dies konnten auch Gugala und Gogolewski in ihrer Studie zeigen, in der ein bilateraler Fixateur externe verwendet wurde, um einen 40-mm-Osteotomiedefekt zu stabilisieren und eine gleichmäßige Belastung beider Kortikales zu gewährleisten. Dabei zeigte sich ebenfalls eine verstärkte Kallusbildung an der lateralen Kortikalis, sodass dieser Effekt vielmehr der besseren Vaskularisierung in diesem Bereich bedingt durch die Abdeckung mit Weichgewebe an der lateral Seite der Gliedmaße, als einem mechanischen Stimulus in diesem Bereich zuzusprechen ist (Gugala und Gogolewski 1999). In der aktuellen Studie bot das Weichteilgewebe ebenfalls von lateral Stabilität für den Scaffold, der durch diese Stabilisierung in seiner Position im Defektbereich gehalten wurde, sodass auch ein Prolaps des Muskelgewebes verhindert werden konnte.

In der Qualität zeigten sich beim knöchernen Kallus kaum Unterschiede. In beiden Gruppen bestand das Kallusgewebe vor allem aus Geflechtknochen, der stellenweise von lamellärem Knochen durchbaut war, was dafür spricht, dass im Zuge des Remodellings Knochen bereits stellenweise umgebaut und durch weiter entwickelten Knochen ersetzt wurde (Remedios 1999). In beiden Gruppen konnten Osteoklasten beobachtet werden, die Lakunen bildeten. Bei den Tieren der zweiten Gruppe war die Kortikalis allerdings stärker aufgelockert, Osteo-

klasten hatten im Rahmen des Remodellings Raum für das Einsprossen von Gefäßen und die Entstehung neuer Osteone geschaffen, welche Kallus und Kortikalis miteinander verflechten und so die Verbindung zwischen Kallus und Knochen erhöhen können. Dieses fortgeschrittene Heilungsergebnis bestätigt die Hypothese, dass autologe Spongiosa die Knochenheilung stimuliert und so zu einem fortgeschrittenen Heilungsergebnis führt. Zudem waren in der zweiten Gruppe mehr Osteoklasten an der Kortikalis zu beobachten, allerdings zeigte sich beim Bezug dieser absoluten Anzahl auf die Knochenfläche in beiden Gruppen eine ähnliche Dichte (siehe 5.2.5 Osteoklastendichte). Auch bei der histomorphometrischen Auswertung der Knorpelfläche, Scaffoldfläche, Muskelfläche und Bindegewebsfläche ergaben sich keine signifikanten Unterschiede in der Gesamt-ROI. Knorpel bildete sich in beiden Gruppen nur in sehr geringen Ausmaßen. Knorpelgewebe war bei drei Tieren der ersten Gruppe nur an Fronten von knöchernem Kallus und bei zwei Tieren der zweiten Gruppe als breiter Streifen proximal-lateral der distalen Kortikalis vorzufinden. Dies kann auf eine limitierte Blutzufuhr (Willenegger et al. 1971; Palmer et al. 1992), eine geringe Sauerstoffspannung (Cruess und Dumont 1975; McKibbin 1978) und moderate Kompressions- oder Scherbewegungen (Yamagishi und Yoshimura 1955) in diesem Bereich zurückzuführen sein.

Bei der gesonderten Betrachtung der Parameter in Teil-ROIs zeigte sich, dass bei den Tieren der zweiten Gruppe in der proximalen periostalen ROI und in der distalen periostalen ROI signifikant mehr Scaffold als bei den Tieren der ersten Gruppe vorlag. Das vermehrte Vorkommen von Scaffoldmaterial in der periostalen ROI kann durch eine Verschiebung des Scaffold aus dem endostalen in den periostalen Bereich durch das Befüllen des Scaffold mit Spongiosa und eine damit Verbundene Umfangsvermehrung des hohlzylindrisch geformten Scaffolds bedingt sein.

5.2.4 Vaskularisierung

Durch eine Fraktur bzw. einen Osteotomiedefekt werden Gefäße zerstört und damit die Versorgung des Gewebeabschnittes unterbrochen. Daher ist die Revaskularisierung des betroffenen Gewebeabschnittes essentiell und muss der erste Schritt in der Frakturheilung sein (Lienau et al. 2005; Schmidt-Bleek et al. 2015). Kommt es zur Störung der Revaskularisierung kann es zur Verzögerung der Frakturheilung oder der Bildung einer atrophen Pseudarthrose kommen (Stürmer 1996; Runkel und Rommens 2000). Für die Gewebeheilung ist eine ausreichende Sauerstoff- und Nährstoffversorgung sowie die Übertragung von Signalmolekülen und Zellen durch das Gefäßsystem nötig. Des Weiteren kann darüber der Abtransport von unerwünschtem Material erfolgen (Dohle et al. 2014; Kuroda et al. 2014).

In der vorliegenden Studie wurde die Gefäßdichte im Bindegewebe des Scaffolds im Osteotomiedefekt zu einem späten Zeitpunkt der Defektheilung bestimmt. Bisher wurde keine Quantifizierung der Gefäßdichte in einem so großen Defekt vorgenommen, was einen Ver-

gleich mit anderen Studien erschwert. Die Gefäßdichte wurde im Defektbereich proximal, zentral und distal im Bindegewebe im Bereich des Scaffolds gemessen.

Beide Gruppen zeigten im Vergleich über die Gesamt-ROI zwölf Wochen post OP mit 30,06 Gefäßen/mm² in der ersten Gruppe und 27,46 Gefäßen/mm² in der zweiten Gruppe vergleichbare Werte. Die Verwendung autologer Spongiosa hatte daher keinen Einfluss auf die Vaskularisierung im Vergleich der Gesamt-ROI innerhalb des Scaffolds.

Lienau und Kollegen untersuchten quantitativ die Vaskularisierung in einem 3-mm-Distraktionsmodell in der Schafstibia, stabilisiert mittels rigidem und semirigidem, monolateralen, externen Fixateur. Dabei konnten sie zeigen, dass eine erhöhte interfragmentäre Scherbewegung zu einer reduzierten initialen Vaskularisation und zu einer verlängerten Heilung führen (Lienau et al. 2005). In einer nachfolgenden Studie mit ähnlichem Studiendesign veröffentlichten Lienau et al. zusätzlich eine differenzierte Betrachtung der initialen Vaskularisierung (Lienau et al. 2006). In der Studie von Lienau et al. von 2005 mit geringerer Knochendefektstrecke im Schaf wurde die Gefäßdichte zu frühen Zeitpunkten der Defektheilung (2, 3, 6 und 9 Wochen post OP) quantifiziert. Im Vergleich zur vorliegenden Studie war die Gefäßdichte bei Lienau et al. nach neun Wochen (Gr. 1 (rigider Fixateur externe): 21/mm², Gr. 2 (semirigider Fixateur externe): 12/mm²) geringer (Gr. 1 (ChronOS® Strip) : 30/mm², Gr. 2 (ChronOS® Strip + Spongiosa): 27/mm²).

Peters und Mitarbeiter untersuchten im gleichen 3-mm-Distraktionsmodell in der Schafstibia wie Lienau et al., stabilisiert mit semirigidem Fixateur, die Gewebezusammensetzung zusätzlich zu den frühen Untersuchungszeitpunkten (2,3,6,9 Wochen) auch in einer Gruppe mit 6 Monaten Heilungszeit. Dabei wurde die Vaskularisierung jedoch nur morphologisch betrachtet und war nach sechs Monaten Heilungszeit in der ersten Gruppe bei fünf von acht Tieren und bei drei von acht Tieren der zweiten Gruppe sehr stark (Peters et al. 2010). Der Vergleich mit der aktuellen Studie ist daher nur qualitativ möglich. Sowohl in der aktuellen als auch in der Studie von Peters et al. war die Defektheilung zu einem späten Untersuchungszeitpunkt noch aktiv, wobei die intramembranöse Ossifikation und das Remodelling mit dem Umbau von Geflechtknochen zu Lamellenknochen sowohl in der aktuellen Studie nach 12 Wochen als auch in der Studie von Peters und Mitarbeitern nach 6 Monaten noch abliefen und auch das Bindegewebe in beiden Studien im Defektbereich stark vaskularisiert erschien. Auch in Studien von Schmidt-Bleek und Mitarbeitern konnten in einem 20-mm-Osteotomie-Modell der rechten Schafstibia bei normaler Defektheilung bereits sieben Tage post OP Gefäße in der Movat-Pentachrom-Färbung qualitativ im Osteotomiespalt dargestellt werden (Schmidt-Bleek et al. 2009; Schmidt-Bleek et al. 2012; Schmidt-Bleek et al. 2014b). Des Weiteren wurde in einer dieser Studien beobachtet, dass im Frakturhämatom der Gruppen mit verzögerter Heilung die Expression angiogenetischer Faktoren signifikant niedriger ist und

mit einer verlängerten Entzündungsreaktion während der ersten 21 Tage der Heilung einhergeht (Schmidt-Bleek et al. 2014b).

Insgesamt ist die Vaskularisierung der aktuellen Studie im Vergleich zu anderen Studien mit normaler Heilung recht hoch. Die Verzögerung der Defektheilung in der aktuellen Studie ist daher nicht auf eine unzureichende Vaskularisierung im Scaffold zurückzuführen. Zudem war durch die verwendete Fixationstechnik eine ausreichende Stabilität gegeben, sodass Gefäße gut einsprossen konnten und nicht wie in anderen Studien durch interfragmentäre Bewegungen im Osteotomiespalt zerrissen wurden (Schell et al. 2008; Lienau et al. 2009; Peters et al. 2010). Der Scaffold erwies sich als Leitstruktur, die zusätzliche Stabilität bietet und das Einsprossen von Gefäßen in den Defekt erleichtert.

5.2.5 Osteoklastendichte

In dieser Studie wurde die Osteoklastendichte bestimmt, um eine Charakterisierung des Remodellings vorzunehmen und die Resorption von kortikalem Knochen sowie knöchernem Kallus im Rahmen einer ausbleibenden Heilung oder die Lyse des Knochens aufgrund von Entzündungsreaktionen zu evaluieren. Dazu wurde die Osteoklastendichte an der Kortikalis und im Kallus zu einem späten Zeitpunkt der Defektheilung bestimmt. Dabei zeigten beide Gruppen zwölf Wochen post OP an der Kortikalis und im Kallus vergleichbare Osteoklastendichten.

Auch in anderen Studien wurde bereits die Rolle der Osteoklasten während der Knochenheilung untersucht. So untersuchten Schell und Kollegen am 3-mm-Distraktionsmodell in der rechten Schafstibia, stabilisiert mittels monolateralem Fixateur externe, die Rolle der Osteoklasten während der Frühphase der Frakturheilung und während des Remodellings. Die Knochenheilung wurde zwei, drei, sechs und neun Wochen post OP histomorphometrisch und immunhistochemisch untersucht. Zur Bestimmung der Osteoklastendichte wurde wie in der vorliegenden Studie die TRAP-Färbung verwendet. Im Verlauf ihrer Studie zeigte sich ein signifikanter Anstieg der Osteoklastendichte an der Kortikalis zwischen der sechsten und neunten Woche (Schell et al. 2006). Die Studie verdeutlicht die wichtige Rolle, die Osteoklasten über den gesamten Verlauf der Frakturheilung spielen. Ihre Funktion wechselt zwischen der reinen Resorptionsaktivität zur Entfernung von überflüssigem, mineralisiertem Material und der aktiven Rolle während des Remodellings, wobei sie in enger Zusammenarbeit mit den Osteoblasten zur Optimierung der Knochenstruktur und Ausrichtung beitragen. Die jeweils dominierende Osteoklastenfunktion hängt von der Phase der Frakturheilung sowie der Lokalisation im Kallus ab. Schell und Kollegen konnten zeigen, dass Osteoklasten bereits zu Beginn der Frakturheilung und über den gesamten Heilungsprozess hinweg aktiv sind und vermutlich eine Beteiligung der Osteoklasten an der Regulation der Knochenformation (Schell et al. 2006).

Der direkte Vergleich der Osteoklastendichten an der Kortikalis beider Gruppen der vorliegenden Studie zeigt für die zweite Gruppe (ChronOS Strip® + Spongiosa) etwas höhere Werte als für die erste (ChronOS Strip®) (Gr.1: 2,5/mm², Gr.2: 3,6/mm²) ohne signifikanten Unterschied zwischen den Gruppen. Die Osteoklastendichten beider Gruppen im kritischen Defektmodell der aktuellen Studie erreichen vergleichbare Werte wie die Osteoklastendichte der Studie von Schell et al. zum 9 Wochenzeitpunkt in einem 3-mm-Osteotomiemodell mit ungestörter Heilung in einem unkritischen Modell (3,7/mm²) (Schell et al. 2006). Damit entspricht die Osteoklastendichte der vorliegenden Studie der zu erwartenden Dichte im Rahmen des Remodelling. Dabei zeigt die zweite Gruppe mit einer leicht höheren Osteoklastendichte ein entsprechend stärkeres Remodelling, was sich auch in der stärker aufgelockerten Kortikalisstruktur widerspiegelt, auf eine vorangeschrittenen Phase der Defektheilung hindeutet und wahrscheinlich auf die Applikation von autologer Spongiosa in der dieser Gruppe zurückzuführen ist.

Wie in der Studie von Schell und Mitarbeitern waren auch in der vorliegenden Studie histologisch bei allen Tieren Osteoklasten in Knochenlakunen zu erkennen, die den Geflechtknochen abbauten (Schell et al. 2006). In deren Umgebung waren auch immer Osteoblasten erkennbar, die neuen Knochen aufbauten. Zudem erschien die Kortikalis stellenweise stark abgerundet, was den Schluss zulässt, dass die Struktur der Kortikalis systematisch umgebaut wird, um sich neuen Belastungsbedingungen anzupassen (Schell et al. 2006).

In einer weiteren Studie am gleichen 3-mm-Distraktions-Modell an der Schafstibia untersuchten Schell und Mitarbeiter die biologischen Reaktionen des Knochengewebes auf eine eingebrachte Schraube des Fixateur externe, um die Beziehung zwischen der knöchernen Verankerung der Schraube, die Inzidenz von Infektionen und das histologische Bild zu analysieren. Schell und Kollegen konnten in ihrer Studie zeigen, dass die Osteoklastenzahl im knöchernen Kallus im Verlauf von neun Wochen sinkt und die Osteoklastenzahl in der Kortikalis über die gesamte Heilungszeit konstant bleibt (Schell et al. 2011). Zur Bestimmung der Osteoklastendichte am Schrauben-Knochen-Interface wurde die TRAP-Färbung verwendet. Die Osteoklasten wurden der Kortikalis oder dem Kallusgewebe zugeordnet, jedoch nicht je Knochenfläche sondern je Schraubenzacke des Schraubenkanals im Knochen gezählt. Daher ist die Osteoklastendichte nicht mit der der aktuellen Studie vergleichbar.

In der vorliegenden Studie war die Osteoklastendichte im Kallusgewebe beider Gruppen (Gr.1: 5,1 OK/mm², Gr.2: 5,4 OK/mm²) im Vergleich zur Studie von Schell et al. nach neun Wochen (3,0 OK/mm²) leicht erhöht (Schell et al. 2006). Dies kann durch den späteren Untersuchungszeitpunkt bedingt sein, aber auch durch die Verwendung des PCL-β-TCP-Scaffolds, den größeren Defekt oder die abweichende Osteosynthesemethode. Beide Gruppen der vorliegenden Studie weisen ähnlich hohe Osteoklastendichten im knöchernen Kallus

auf, wobei die zweite Gruppe eine größere Streuung der Werte zeigte. Dies kann auf ein stärkeres Remodelling durch die Verwendung der autologen Spongiosa in der zweiten Gruppe zurückgeführt werden, da diese durch ihre starke osteogenetische und -induktive Potenz für eine starke Stimulation der Knochenheilung sorgt und einen gleichzeitigen Auf- und Abbau von Knochen bedingt (Cypher und Grossman 1996; Bloemers et al. 2003; Mahendra und Maclean 2007; Fong et al. 2013).

Der geringere Anteil an neu gebildetem Knochen in der ersten Gruppe lässt sich nicht auf einen vermehrten Abbau von Knochen zum Zwölfwochenzeitpunkt zurückführen, da in beiden Gruppen ähnliche Osteoklastendichten zu beobachten waren. Vielmehr ist der geringere Knochenanteil auf eine insgesamt niedrigere Knochenneubildung in der ersten Gruppe zurückzuführen.

5.2.6 Riesenzelldichte

Am Prozess der Biodegradation von polymeren, medizinischen Implantaten sind vor allem Fremdkörperriesenzellen beteiligt (Anderson 2000). Die Oberflächenbeschaffenheit des implantierten Materials ist für das Ausmaß und die Modulation der Aktivität von Fremdkörperriesenzellen von entscheidender Bedeutung (Anderson et al. 2008).

In der aktuellen Studie wurden zum ersten Mal in einem kritischen Osteotomie-Defektmodell Fremdkörperriesenzellen mittels TRAP-Färbung nachgewiesen und quantitativ im Bindegewebe im Osteotomiespalt bestimmt. Dabei waren bei der zweiten Gruppe (ChronOS® + Spongiosa) in Vergleich zur ersten (ChronOS Strip®) höhere Werte zu beobachten (Gr. 1: 29,71/mm², Gr. 2: 50,29/mm²), die Ergebnisse unterschieden sich jedoch nicht statistisch signifikant. Die höhere Riesenzelldichte in der zweiten Gruppe kann auf die Verwendung autologer Spongiosa zurückgeführt werden und auf eine stärkere Remodellingaktivität in dieser Gruppe hindeutet. In beiden Gruppen sind nach zwölf Wochen noch große Mengen Scaffoldmaterial nachweisbar, welche bereits im Rahmen der beginnenden Degradation von Riesenzellen abgebaut werden. Dies geht mit den Herstellerangaben konform, nach denen ein vollständiger Abbau des Scaffoldmaterials erst nach 6 bis 18 Monaten erreicht wird. Zur vollständigen Beurteilung der Biokompatibilität wäre ein späterer Untersuchungszeitpunkt zu empfehlen, um die vollständige und zuverlässige Degradation in diesem Modell nachvollziehen zu können.

Lohfeld und Mitarbeiter konnten im 20-mm-Osteotomiemodell in der Schafstibia, stabilisiert mittels winkelstabiler Titanplattenosteosynthese und einem zusätzlichen Castverband, zeigen, dass ein Polymerscaffold aus PCL/TCP langsamer degradiert wird als ein reiner β -TCP-Scaffold, und dass es in seiner Umgebung nur zu lokalen Entzündungsreaktionen in Form von Riesenzellen und Makrophagen kommt (Lohfeld et al. 2012). Im Hinblick auf die Biokompatibilität konnten Lohfeld et al. in der PCL/TCP-Gruppe vermehrt Riesenzellen feststel-

len, die sie im Gegensatz dazu in der Referenzgruppe (β -TCP) nicht vorfanden. In der Studie von Lohfeld und Kollegen wurde keine quantitative Messung der Riesenzelldichte vorgenommen. Daher kann nur ein histomorphologischer Vergleich mit der aktuellen Studie vorgenommen werden. In beiden Studien wird der Kompositscaffold aus PCL- β -TCP von Riesenzellen umschlossen, die diesen abbauen und inkorporieren. Laut Anderson et al. deutet eine erhöhte Riesenzelldichte im Verlauf der Wundheilung auf eine Fremdkörperreaktion hin, die zudem mit der Bildung von Granulationsgewebe einhergeht und Vorläufer der fibrotischen Kapsel ist, die vom Implantat oder Biomaterial durch ein oder zwei Zellschichten aus Monozyten, Makrophagen oder Fremdkörperriesenzellen separiert ist (Anderson et al. 2008). In der vorliegenden Studie waren die Riesenzellen und seltener Entzündungszellen in Bindegewebe eingebettet. Lymphozyten und Plasmazellen waren nur stellenweise bei einzelnen Tieren zu beobachten und auch eine Schichtbildung aus Zellen konnte nicht beobachtet werden, es kam folglich gegenüber der Umgebung nicht zu einer Abkapselung. Des Weiteren waren Riesen- und Entzündungszellen immer nur in unmittelbarem Kontakt zum Scaffoldmaterial zu finden und nicht außerhalb des Implantates oder in der Defektumgebung nachweisbar, was auf eine eher milde Entzündungsreaktion schließen lässt.

Reichert und Mitarbeiter untersuchten in einem mittels winkelstabiler Kompressionsplatten stabilisierten 20-mm-Osteotomiemodell in der Schafstibia die Heilung im Leerdefekte sowie im mit PLDLLA-TCP-PCL-, mPCL-TCP-Scaffold oder autologer Spongiosa gefüllten Defekt nach zwölf Wochen Heilungszeit (Reichert et al. 2011). Die Riesenzellen wurden dabei lediglich qualitativ bestimmt. Dabei wurden nur in der Gruppe mit autologer Spongiosa Riesenzellen beobachtet. In der aktuellen Studie wurden Riesenzellen in beiden Gruppen beobachtet, wobei der Scaffoldabbau bereits weiter vorangeschritten erscheint als in der Studie von Reichert und Mitarbeitern. Ein eindeutiger Vergleich wäre jedoch auch hier erst durch die Bestimmung der Riesenzelldichte mit den dort verwendeten Scaffolds möglich.

Roohani-Esfahani und Mitarbeiter untersuchten in einem 15-mm-Osteotomiedefekt im Kaninchenradius verschiedene Kompositscaffolds (Baghdadit-, Bagdadit-PCL-Nano-Bioaktiv-Glas- (Bag-PCL-nBG), TCP/HA- und TCP/HA-PCL-Bag-) über 12 Wochen (Roohani-Esfahani et al. 2012). Hinsichtlich der Riesenzellen bzw. Osteoklasten, die sie mittels TRAP-Färbung nachwiesen, konnten Roohani-Esfahani und Kollegen zeigen, dass diese sowohl den Knochen als auch die Transplantatoberflächen aller Materialien bedeckten. Dies weist laut Roohani-Esfahani und Mitarbeitern auf ablaufende Remodellingprozesse hin und zeigt, dass keramische Materialien potentiell von Osteoklasten abgebaut werden können (Roohani-Esfahani et al. 2012). Da es sich bei der TRAP-Färbung um eine unspezifische Färbung handelt, die beide, Riesenzellen und Osteoklasten im gleichen Maße anfärbt, wurden in der vorliegenden Studie die Riesenzellen und Osteoklasten nach ihrer Lokalisation unterschieden. Als Osteoklasten wurden alle Zellen gezählt, die mindestens zwei Zellkerne besaßen,

die sich TRAP-positiv anfärbten und direkt an eine knöchernen Oberfläche angrenzten. Als Riesenzellen wurden alle Zellen gezählt, die sich TRAP-positiv färbten, mindestens zwei Zellkerne besaßen und keinen Kontakt zu knöchernem Gewebe hatten.

Die von Roohani-Esfahani und Kollegen beschriebenen Osteoklasten auf der Materialoberfläche können daher mit den Riesenzellen im Scaffold der vorliegenden Studie verglichen werden. Das in der aktuellen Studie verwendete Kompositmaterial wurde speziell dafür entwickelt, vom Körper abgebaut und resorbiert werden zu können. In der vorliegenden Studie wanderten Riesenzellen im Rahmen einer milden Fremdkörperreaktion ein, bauten vermehrt kristallines Scaffoldmaterial ab und inkorporierten es, sodass eindeutig kristalline Strukturen in den Zellkörpern zu erkennen waren, was für eine Biodegradation durch die Riesenzellen spricht und durchaus erwünscht war.

5.2.7 Vergleich mit anderen Studien

Ein direkter Vergleich dieser Studie mit anderen gestaltet sich schwierig, zum einen weil der in dieser Arbeit verwendete Knochenersatzstoff (ChronOS Strip®) in dieser Zusammensetzung und an dieser Lokalisation noch nicht untersucht wurde und zum anderen, weil die verwendete Osteosynthese mit einem externen Ringfixateur noch nicht für einen 40-mm-Defekt im Schaf verwendet wurde. Die Anwendung unterschiedlicher Osteosynthesemethoden, Defektgrößen und Materialien, führt zu einer vielfältigen Beeinflussung des Heilungsverlaufes, wodurch ein direkter Vergleich erschwert wird. Durch den Vergleich mit anderen Studien können Hinweise oder Richtungen deutlich werden, hinsichtlich derer weitere Untersuchungen angestellt werden sollten.

Den Boer und Kollegen untersuchten die Knochendefektheilung nach zwölf Wochen in einem segmentalen Defekt von 30 mm in der Schafstibia, stabilisiert mittels intramedullärem Marknagel (IMN). Die Heilung wurde sowohl im Leerdefekt als auch unter Verwendung von Hydroxidapatit-Granulat (HA), autologer Spongiosa, HA in Kombination mit einem Wachstumsfaktor (recombinat human osteogenic protein-1, rhoP-1) oder autologem Knochenmark untersucht (den Boer et al. 2003). Sie konnten zeigen, dass die Defektheilung in einem mit HA behandelten Defekt gesteigert werden kann, indem zusätzlich ein osteoinduktives Material wie rhoP-1 oder autologes Knochenmark eingebracht wird. Diese Kombination von osteokonduktivem Material mit osteoinduktiven und osteogenetischen Materialien stellen geeignete Alternativen zum Autotransplantat (autologe Spongiosa) bei der Behandlung von großen Knochendefekten und atrophen Pseudarthrosen dar (den Boer et al. 2003). In der vorliegenden Studie ergab die Kombination von autologer Spongiosa mit dem PCL- β -TCP-Scaffold im Vergleich zum Scaffold allein ein beschleunigtes Knochenwachstum sowie eine histomorphologisch stärkere Kallusbildung. Auch in der Studie von den Boer et al. konnten bei der Knochenbildung keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen der Gruppe mit HA

allein und den Gruppen mit HA in Kombination mit rhoP-1 oder autologem Knochenmark dargestellt werden (den Boer et al. 2003). Die Gruppe mit HA in Kombination mit rhOP-1 zeigte bei sechs von acht Tieren eine unilaterale Überbrückung und die Gruppe mit HA in Kombination mit autologem Knochenmark bei drei von acht eine unilaterale und bei zwei von acht eine bilaterale Überbrückung des 30-mm-Defekts. Die Tatsache, dass es in der Studie von den Boer und Mitarbeitern häufiger zu einer knöchernen Überbrückung des Defektes kam, kann auf die geringere Defektstrecke, aber auch das verwendete Ersatzmaterial und seine Eigenschaften zurückgeführt werden.

Cipitria et al. untersuchten einen PCL- β -TCP-Scaffold (80:20) in einem 30-mm-Defekt sowie einen 30 mm Leerdefekt, stabilisiert mittels dynamischer Kompressionsplatte, in der Schafstibia (Cipitria et al. 2012). Der von Cipitria et al. im Volldefekt verwendete PCL- β -TCP-Scaffold führte im Vergleich zur Leergruppe zu einer verbesserten Struktur des Bindegewebes. Cipitria und Mitarbeiter beschrieben den Scaffold als Platzhalter der einen Muskel- bzw. Weichgewebevorfall in den Defekt verhinderte, das entstehende Hämatom auffangen und das Schrumpfen des Gerinnungsthrombus verhindern konnte, was in der frühen Phase der Knochenheilung wichtig ist (Yannas 2005). Auch Gao et al. begründen in ihrer Studie die verbesserte Frakturheilung eines 20 mm großen Tibiadefektes im Schaf durch die Verwendung eines TCP-Scaffolds, der als osteokonduktiver Platzhalter diente (Gao et al. 1997a). Auch in der vorliegenden Studie agierte der verwendete β -TCP-Scaffold als Platzhalter und verhinderte einen Vorfall von Muskel- oder Weichgewebe aus der Umgebung in den Osteotomiespalt. Des Weiteren diente der Scaffold in der vorliegenden Studie wie auch in der Studie von Cipitria et al. beschrieben, als Leitstruktur, an der knochenbildende Vorläuferzellen und Riesenzellen entlang in das Scaffoldinnere einwandern konnten (den Boer et al. 2003). Reichert und Mitarbeiter untersuchten die Defektheilung nach zwölf Wochen sowie nach zwölf Monaten in einem mid-diaphysären 30 mm Volldefekt in der Schafstibia, der durch eine dynamische Kompressionsplatte stabilisiert wurde (Reichert et al. 2012a). Sie verglichen autologe Spongiosa mit einem mPCL-TCP-Scaffold allein oder in Kombination mit MSC oder einem Wachstumsfaktor (rhBMP-7) zur Defektregeneration. Dabei konnten sie zeigen, dass der Scaffold in Kombination mit rhBMP-7 eine ähnlich gute Knochenbildung induzierte wie autologe Spongiosa allein. Unter der Verwendung des Scaffolds allein und in Kombination mit MSC wurde dagegen weniger Knochen gebildet. Nach zwölf Monaten war die Knochenheilung in der Gruppe mit Scaffold in Kombination mit rhBMP-7 der autologen Spongiosa sogar überlegen, was das starke Potential des rhBMP-7 verdeutlicht (Reichert et al. 2012a). Auch in der aktuellen Studie führte die Kombination des Scaffolds mit dem osteoinduktiven Material autologer Spongiosa zu einer verbesserten Knochenneubildung. Beim direkten Vergleich der beiden Studien muss die kleinere Defektstrecke, die unterschiedlichen Osteosynthesemethoden und verschiedenen Scaffolds berücksichtigt werden. Der in der vorliegenden

Studie verwendete β -TCP-Scaffold förderte ebenso wie der von Reichert und Mitarbeitern verwendete mPCL-TP-Scaffold das Knochenwachstum in den Defekt hinein (Reichert et al. 2012a). In der Gruppe mit Leerdefekten konnten Reichert und Mitarbeiter hingegen nur ein sehr geringes Knochenwachstum beobachten. Des Weiteren zeigte das von Reichert und Mitarbeitern verwendete rhBMP-7 ein sehr hohes Potential die Knochendefektheilung zu stimulieren. Solche Wachstumsfaktoren könnten daher in weiteren Studien in Kombination mit dem aktuell verwendeten β -TCP-Scaffold untersucht werden.

5.2.8 Schlussfolgerungen

In dieser tierexperimentellen Studie erwies sich der verwendete Hybrid-Ringfixateur als ein adäquates Stabilisierungssystem für einen 40-mm-Osteotomie-Defekt in der Schafstibia zur Untersuchung eines regenerativen Therapieansatzes. Die Tiere konnten direkt post operativ selbständig aufstehen und die operierte Gliedmaße beim Laufen voll belasteten. Des Weiteren konnten sie problemlos in einer Kleingruppen gehalten werden, sich innerhalb dieser Gruppe frei bewegen und im Verlauf der Standzeit zeigten nur ein Tier der ersten und zwei Tiere der zweiten Gruppe leichte bis mittelgradige Lahmheiten aufgrund von K-Draht-Infektionen. Das Gangbild war aufgrund der Dimensionen des externen Hybrid-Ringfixateurs und der damit einhergehenden Einschränkung der Flexion im Kniegelenk leicht verändert. Der externe Hybrid-Ringfixateur erwies sich bis auf typische Komplikationen wie vermehrte Sekretion an den Eintrittsstellen und damit verbundenen Pininfektionen als geeignete Stabilisierungstechnik eines kritischen 40-mm-Volldefekts.

Der mit einem PCL- β -TCP-Scaffold aufgefüllte Volldefekt von 40 mm Größe führte in dieser Studie nach zwölf Wochen bei keinem Tier der ersten Gruppe zu einer vollständigen knöchernen Überbrückung und stellt daher ein geeignetes kritisches Defektmodell dar. Im Rahmen dieser Studie kam es definitionsgemäß zu einer verzögerten Defektheilung im Osteotomiebereich, da eine Pseudarthrose beim Schaf erst durch das Ausbleiben einer Frakturüberbrückung nach sechs Monaten definiert ist und in dieser Studie der Heilungsverlauf nur über drei Monate beobachtet wurde (Schell et al. 2008). Das verwendete Osteotomie-Defektmodell erwies sich als repräsentativ für die klinische Situation eines kritischen Defektes mit verzögerter Heilung, die wahrscheinlich zu einem späteren Zeitpunkt in einer Pseudarthrose resultieren würde. Erst nach Ablauf der physiologischen Heilungszeit in Verbindung mit morphologischer Charakterisierung kann sicher von einem vollständigen Erliegen der Knochenheilung gesprochen werden (Schweiberer et al. 1999). Defektmodelle einer verzögerten Heilung benötigen jedoch eine Positivkontrollgruppe, die demonstriert, dass das Modell an sich zu einer Überbrückung führen kann (Mills und Simpson 2012), was in der vorliegenden Arbeit durch die Verwendung autologer Spongiosa in der zweiten Gruppe teilweise demonstriert werden konnte. Zwei Tiere zeigten eine unilaterale Überbrückung des

Defektes, insgesamt reichte die Kombination von Scaffold und autologer Spongiosa als Stimulus für eine sichere Defektheilung jedoch nicht aus.

Die Verwendung eines Kompositscaffolds aus Poly-L-(Lactid)-co- ϵ -Caprolacton und β -Trikalziumphosphat erwies sich als geeignet, die Regeneration eines segmentalen, kritischen Knochendefektes zu unterstützen, da er in seiner Form stabil blieb und als Platzhalter im Defekt wirkte und somit einen Prolaps von Weich- oder Muskelgewebe in den Defekt verhinderte. Zusätzlich ermöglichte die Mikrostruktur des Scaffolds das Einwachsen von lockerem Bindegewebe, das netzartig verteilt im gesamten Defektbereich zu beobachten war. Dieses Netzwerk aus Bindegewebe lenkt den Mineralisationsprozess und somit das Einwachsen von Knochen in den kritischen Defekt, wobei nicht immer eine vollständige Überbrückung des Defektes erreicht wird (Cipitria et al. 2012).

Die Kombination des Scaffolds (ChronOS Strip®) mit autologer Spongiosa führte initial zu einer beschleunigten und bei einzelnen Tieren auch zu einer deutlich gesteigerten Knochenneubildung. Anhand der Röntgenverlaufsbilder sind in der zweiten Gruppe schon zum Achtwochenzeitpunkt deutliche Kallusformationen erkennbar, deren Ausdehnungen auch nach zwölf Wochen noch umfangreicher waren als die der ersten Gruppe. Insgesamt ist jedoch weder histomorphometrisch (Bone Area) noch computertomographisch (Bone Volume) eine signifikante Steigerung der Knochenneubildung durch die Zugabe autologer Spongiosa in der zweiten Gruppe nach zwölf Wochen erkennbar.

Histomorphologisch zeigten vor allem die beiden Tiere mit unilateraler Überbrückung des Osteotomiedefektes stellenweise Knochengewebe, das bereits zu Lamellenknochen umgebaut wurde. Darüberhinaus ist histomorphologisch kein qualitativer Unterschied des gebildeten Kallusgewebes zwischen den Gruppen erkennbar. Auch die CT-Werte wie die Knochenmineraldichte und der Knochenmineralgehalt unterscheiden sich in den beiden Gruppen nicht, sodass auch hier kein qualitativer Unterschied heraus zu stellen war. Beide Gruppen zeigten eine vergleichbar hohe Vaskularisierung und Osteoklastendichte. Die Verzögerung der Defektheilung ist daher nicht auf eine unzureichende Vaskularisierung oder einen übermäßigen Knochenabbau durch Osteoklasten bedingt. Auch die beginnende Degradation des Scaffolds durch Riesenzellen konnte in beiden Gruppen in vergleichbarem Ausmaß beobachtet werden. Durch die Zugabe autologer Spongiosa konnte bei diesen Parametern keine signifikante Steigerung der Knochenneubildung oder -qualität in der zweiten Gruppe erreicht werden.

Das untersuchte Knochenersatzmaterial (ChronOS Strip®) ist zur Unterstützung der Defektheilung in diesem Modell geeignet, indem es als Leitstruktur für Bindegewebe, Fasern, Gefäße, Osteoklasten und Riesenzellen zum Einwachsen in den Defekt dient und im späteren Verlauf auch als Leitstruktur für die Bildung von Knochen wirkt. Jedoch ist es allein nicht in der Lage die Defektheilung so zu unterstützen, dass eine Überbrückung eines kritischen De-

fektes möglich ist. Durch die Kombination des Scaffolds mit autologer Spongiosa kann die Knochenneubildung derartig gesteigert werden, dass eine unilaterale Überbrückung des kritischen Defektes bei 1/3 der Tiere der zweiten Gruppe erreicht werden kann. Für eine sichere und stabile Überbrückung des segmentalen Defektes sollte der verwendete Scaffold (ChronOS Strip®) mit einem potenteren, osteoinduktivem Material kombiniert werden. Weiterführende Studien sollten sich auf die Optimierung des Scaffolds hinsichtlich seiner Geometrie und Porenanordnung sowie seiner Eigenschaften, als Leitstruktur zu wirken, fokussieren. Das in dieser Studie etablierte Tiermodell kann zukünftig dafür verwendet werden, andere vielversprechende Materialien und beispielsweise Wachstumsfaktoren zur endogenen Knochenregeneration im präklinischen Knochendefektmodell zu untersuchen.

6. Zusammenfassung

Die Heilung großer segmentaler Knochendefekte bedingt durch degenerative, entzündliche oder traumatische Erkrankungen stellt noch immer ein besonderes klinisches und sozioökonomisches Problem dar. Aktuelle Therapieverfahren zur Rekonstruktion ausgedehnter segmentaler Knochendefekte umfassen die Knochendistraktion und den vaskularisierten, autologen oder allogenen Knochentransfer, aber auch Scaffolds in Form von Cages finden in großen Defekten Verwendung. Durch die mit diesen Verfahren verbundenen Komplikationen, wie Pininfektionen bei der Ilizarov-Technik oder eine erhöhte Entnahmemorbidität, Infektionsgefahr, schlechte Einheilungsraten und die oft nicht ausreichende Menge an gewonnenem Knochen beim Knochentransfer, wird seit langem an einer Alternative für den autologen Knochenersatz geforscht.

In dieser Studie wurde deshalb untersucht ob sich ein mittels Hybrid-Ringfixateur stabilisierter 40-mm-Osteotomiedefekt in der Schafstibia eignet regenerative Therapieansätze zu untersuchen. Weiterhin sollte als ein Therapieansatz ein Poly-L-(lactid)- ϵ -Caprolacton/ β -Trikalziumphosphat-Scaffold in den 40 mm Tibiadefekt eingebracht und auf seine Eignung, die Regeneration in einem kritischen segmentalen Knochendefekt zu unterstützen, untersucht werden. Zusätzlich wurde in einer Gruppe der PCL/ β -TCP-Scaffold mit autologer Spongiosa gefüllt, um deren Wirkung in Kombination mit dem Knochenersatzmaterial PCL/ β -TCP auf die Knochendefektheilung zu untersuchen.

Dazu wurden zwölf Merino-Mix-Schafe in zwei Gruppen zu je sechs Tieren eingeteilt. Es wurde eine Osteotomie in der rechten Tibia vorgenommen und ein 40-mm-Defekt geschaffen, der durch einen Hybrid-Ringfixateur stabilisiert wurde. In den 40-mm-Osteotomie-Defekt wurde in der ersten Gruppe der hohlzylindrische Scaffold allein und in der zweiten Gruppe der mit Spongiosa gefüllte Scaffold eingebracht. Zwölf Wochen postoperativ erfolgte die Entnahme der Proben und die röntgenologische, computertomographische, histomorphologische, histomorphometrische und immunhistochemische Auswertung der Heilung im kritischen Defekt.

Der verwendete Hybrid-Ringfixateur erwies sich als adäquates Stabilisierungssystem für einen 40-mm-Osteotomiedefekt in der Schafstibia. Das Modell erwies sich als geeignet zur Untersuchung regenerativer Therapieansätze. Die Verwendung des Kompositsscaffolds aus PCL- β -TCP unterstützt die Regeneration eines segmentalen, kritischen Knochendefektes. Der Scaffold blieb in seiner Form stabil, diente als Platzhalter im Defekt, verhinderte einen Prolaps von Weich- oder Muskelgewebe in den Defekt und diente als Leitstruktur indem er durch seine Mikrostruktur das Einwandern von Zellen und das Einwachsen von lockerem Bindegewebe, Gefäßen und auch Knochengewebe ermöglichte.

Durch die Kombination des Scaffolds (ChronOS Strip®) mit autologer Spongiosa in der zweiten Gruppe wurde die Knochenneubildung initial beschleunigt und bei einzelnen Tieren auch gesteigert. Die zweite Gruppe (ChronOS Strip® + Spongiosa) zeigte im Vergleich zur ersten nach zwölf Wochen ein vorangeschrittenes Heilungsergebnis. Röntgenologisch zeigten zwei Tiere dieser Gruppe bereits nach acht Wochen eine Überbrückung des 40 mm Osteotomie-defektes und nach zwölf Wochen eine weitere Zunahme der Dichte des neugebildeten Kallus. Histomorphometrisch machte in beiden Gruppen nach 12 Wochen Bindegewebe den hauptsächlichen Gewebeanteil im Osteotomiespalt aus. Hinsichtlich des knöchernen Kallus war computertomographisch (Bone Volume) und histomorphometrisch (Bone Area) keine signifikante Steigerung der Knochenneubildung durch autologe Spongiosa im Vergleich zur ersten Gruppe erkennbar. Allerdings erreichten in der zweiten Gruppe einige Tiere höhere Werte. Die Knochenmineraldichte (BMD) und der Knochenmineralgehalt (BMC) zeigten in den beiden Gruppen im Median ähnliche Werte. Lediglich bei zwei Tieren der zweiten Gruppe mit unilateraler Überbrückung des Osteotomiedefektes war bereits Lamellenknochen zu beobachten. Histomorphologisch war darüberhinaus kein qualitativer Unterschied des gebildeten Kallusgewebes zwischen den Gruppen erkennbar; allein die Kortikalis erschien in der zweiten Gruppe stärker aufgelockert. Auch die Vaskularisierung und Osteoklastendichte war in beiden Gruppen der vorliegenden Studie vergleichbar. Die Verzögerung der Defektheilung ist daher nicht auf eine unzureichende Vaskularisierung oder einen übermäßigen Knochenabbau durch Osteoklasten zurückzuführen. Ebenso war in beiden Gruppen die beginnende Degradation des Scaffolds durch Riesenzellen in vergleichbarem Ausmaß zu beobachten. Die Zugabe autologer Spongiosa (Gruppe 2) führte bei einzelnen Tieren zu einer deutlichen Steigerung der Knochenneubildung, der Vaskularisierung sowie der Osteoklasten- und Riesenzelldichte, im Vergleich zwischen den Gruppen wurde jedoch kein statistisch signifikanter Unterschied erreicht. Der verwendete Scaffold erwies sich in beiden Gruppen als Leitstruktur, die das Einsprossen von Gefäßen und die Migration von Osteoklasten und Riesenzellen in den Defekt ermöglichte.

7. Summary

Application of a soft composite scaffold for the regeneration of segmental bone defects in a novel animal model – radiological and histological evaluation in sheep

The healing of large segmental bone defects caused by degenerative, inflammatory or traumatic diseases pose a major clinical and socioeconomic problem. Current treatment methods for the reconstruction of large segmental bone defects include bone distraction, vascularised, autologous or allogenic bone grafting and even cages that are used as scaffolds. Because of procedure associated complications, such as pin infections in the Ilizarov-technique or an increased donor site morbidity, the risk of infection, poor healing rates and the frequently insufficient amount of recovered bone, there has been a longstanding history of research in this field.

The aim of this study was to examine a 40 mm osteotomy defect model, stabilised by a hybrid ring fixator, in the tibia of the sheep and its qualification to enable the investigations of regenerative therapies. In particular, as such a therapeutic approach, a poly-L-(lactid)- ϵ -caprolacton/ β -tricalciumphosphat-scaffold was put into the 40 mm tibial defect and tested if it is qualified to support the regeneration in a critical segmental bone defect. Additionally, in one group the PCL/ β -TCP-scaffold was filled with autologous bone graft to investigate its effect in combination with the bone substitute on the bone defect healing.

Twelve merino-mix-sheep were randomly assigned in two groups. A 40 mm osteotomy defect in the right tibia was set and stabilised by a hybrid ring fixator. In the first group the osteotomy defect was filled with the scaffold alone, which was formed into hollow cylindrical shape. In the second group the hollow cylindrical shaped scaffold was filled with autologous cancellous bone from the iliac crest. Twelve weeks after surgical treatment, the defect zone was removed for radiological, histomorphological, histomorphometrical and immunohistochemical examination of the defect healing.

The hybrid ring fixator used in this study proved to be an adequate stabilization system for the study of regenerative therapies in a 40 mm osteotomy defect model. And also the use of the composite scaffold (PCL- β -TCP) proved to be appropriate to support the regeneration in a segmental critical size defect. It remained stable in its form, served as a placeholder in the defect, prevented a prolapse of soft or muscle tissue into the defect and allowed by its microstructure and migration of cells and ingrowth of loose connective tissue and blood vessels.

By combining the scaffold (chronOS strip®) and autologous cancellous bone the bone formation was initially accelerated and also increased, but not statistically significant. After twelve weeks the second group (chronOS strip® + ABG) showed an advanced healing re-

sult. After eight weeks the radiographs showed two animals of this group with a bridging of the 40 mm osteotomy defect and an increased callus formation after twelve weeks. According to the histomorphometrical investigations after 12 weeks in both groups, the main part was formed of connective tissue. Conforming to the new bone formation neither the computed tomographic nor the histomorphometric measurements showed a significant increase of new bone formation by autologous bone graft compared to the first group. Certainly, in the second group some animals showed increased results. The bone mineral density and the bone mineral content in both groups showed similar median values.

Two animals in the second group showed a unilateral bony bridging of the defect on the lateral side with partially already remodeled bone tissue organized to lamellar bone. Histologically, there was no further qualitative difference in the new formed bone, only the cortical bone in the second group appeared loosened. The vascularization and the osteoclast density were similar in both groups. Hence, the delay of the defect healing is not due to the insufficient vascularization or excessive bone resorption by osteoclasts. In both groups the onset of degradation of the scaffold by giant cells could be observed in a similar fashion. The addition of autologous bone graft (group 2) resulted for some animals in a distinct increase of new bone formation, vascularization, osteoclast and giant cell density. However, no statistically significant difference was achieved compared between the groups. Nonetheless, the used scaffold served in both groups as a guiding structure that enabled the ingrowth of loose connective tissue, vessels, osteoclasts and giant cells into the defect.

8. Literaturverzeichnis

Alberts, K. A.; Loohagen, G.; Einarsdottir, H. (1999): Open tibial fractures: faster union after unreamed nailing than external fixation. *Injury* 30(8): 519-23.

Albrektsson, T.; Johansson, C. (2001): Osteoinduction, osteoconduction and osseointegration. *Eur Spine J* 10 Suppl 2: S96-101.

Alt, V.; Donell, S. T.; Chhabra, A.; Bentley, A.; Eicher, A.; Schnettler, R. (2009): A health economic analysis of the use of rhBMP-2 in Gustilo-Anderson grade III open tibial fractures for the UK, Germany, and France. *Injury* 40(12): 1269-75.

Anderson, J. M. (2000): Multinucleated giant cells. *Curr Opin Hematol* 7(1): 40-7.

Anderson, J. M.; Rodriguez, A.; Chang, D. T. (2008): Foreign body reaction to biomaterials. *Semin Immunol* 20(2): 86-100.

Aronson, J. (1994): Temporal and spatial increases in blood flow during distraction osteogenesis. *Clin Orthop Relat Res*(301): 124-31.

Attias, N.; Lehman, R. E.; Bodell, L. S.; Lindsey, R. W. (2005): Surgical management of a long segmental defect of the humerus using a cylindrical titanium mesh cage and plates: a case report. *J Orthop Trauma* 19(3): 211-6.

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

Augat, P.; Merk, J.; Genant, H. K.; Claes, L. (1997): Quantitative assessment of experimental fracture repair by peripheral computed tomography. *Calcif Tissue Int* 60(2): 194-9.

Bendix, D.; Liedtke, H. (1998): Resorbierbare Polymere: Zusammensetzung, Eigenschaften und Anwendungen. In: *Biodegradierbare Implantate und Materialien*. Hefte zu „Der Unfallchirurg“. Herausgeber: Claes, L.; Ignatius, A. (1998) 265, Berlin Heidelberg, Springer-Verlag.

Berger, J.; Reist, M.; Mayer, J. M.; Felt, O.; Peppas, N. A.; Gurny, R. (2004): Structure and interactions in covalently and ionically crosslinked chitosan hydrogels for biomedical applications. *Eur J Pharm Biopharm* 57(1): 19-34.

Berner, A.; Reichert, J. C.; Muller, M. B.; Zellner, J.; Pfeifer, C.; Dienstknecht, T.; Nerlich, M.; Sommerville, S.; Dickinson, I. C.; Schutz, M. A.; Fuchtmeier, B. (2012): Treatment of long bone defects and non-unions: from research to clinical practice. *Cell Tissue Res* 347(3): 501-19.

Berner, A.; Reichert, J. C.; Woodruff, M. A.; Saifzadeh, S.; Morris, A. J.; Epari, D. R.; Nerlich, M.; Schuetz, M. A.; Hutmacher, D. W. (2013): Autologous vs. allogenic mesenchymal progenitor cells for the reconstruction of critical sized segmental tibial bone defects in aged sheep. *Acta Biomater* 9(8): 7874-84.

- Bhandari, M.; Guyatt, G. H.; Swiontkowski, M. F.; Schemitsch, E. H. (2001):** Treatment of open fractures of the shaft of the tibia. *J Bone Joint Surg Br* 83(1): 62-8.
- Blick, S. S.; Brumback, R. J.; Lakatos, R.; Poka, A.; Burgess, A. R. (1989):** Early prophylactic bone grafting of high-energy tibial fractures. *Clin Orthop Relat Res*(240): 21-41.
- Bloemers, F. W.; Blokhuis, T. J.; Patka, P.; Bakker, F. C.; Wippermann, B. W.; Haarman, H. J. (2003):** Autologous bone versus calcium-phosphate ceramics in treatment of experimental bone defects. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 66(2): 526-31.
- Blokhuis, T. J.; Termaat, M. F.; den Boer, F. C.; Patka, P.; Bakker, F. C.; Haarman, H. J. (2000):** Properties of calcium phosphate ceramics in relation to their in vivo behavior. *J Trauma* 48(1): 179-86.
- Boccaccini, A. R.; Blaker, J. J. (2005):** Bioactive composite materials for tissue engineering scaffolds. *Expert Rev Med Devices* 2(3): 303-17.
- Boenisch, T.; Henne, C.; GmbH, D. (2003):** Handbuch immunchemische Färbemethoden. Hamburg: DakoCytomation.
- Bohner, M. (2000):** Calcium orthophosphates in medicine: from ceramics to calcium phosphate cements. *Injury* 31 Suppl 4: 37-47.
- Bouxsein, M. L.; Boyd, S. K.; Christiansen, B. A.; Goldberg, R. E.; Jepsen, K. J.; Muller, R. (2010):** Guidelines for assessment of bone microstructure in rodents using micro-computed tomography. *J Bone Miner Res* 25(7): 1468-86.
- Brighton, C. T. (1984):** The biology of fracture repair. *Instr Course Lect* 33: 60-82.
- Brunner, U.; Kessler, S.; Cordey, J.; Rahn, B.; Schweiberer, L.; Perren, S. M. (1990):** Treatment of defects of the long bones using distraction osteogenesis (Ilizarov) and intramedullary nailing. Theoretic principles, animal experiments, clinical relevance. *Unfallchirurg* 93(6): 244-50.
- Bucher, O.; Wartenberg, H. (1997):** Cytologie, Histologie und mikroskopische Anatomie des Menschen. 12., vollst. überarb. Aufl. Bern u.a.: Huber.
- Bucholz, R. W.; Carlton, A.; Holmes, R. (1989):** Interporous hydroxyapatite as a bone graft substitute in tibial plateau fractures. *Clin Orthop Relat Res*(240): 53-62.
- Buckwalter, J. A.; Glimcher, M. J.; Cooper, R. R.; Recker, R. (1996):** Bone biology. II: Formation, form, modeling, remodeling, and regulation of cell function. *Instr Course Lect* 45: 387-99.
- Budras, K.-D.; Fricke, W. (1991):** Atlas der Anatomie des Hundes: Lehrbuch für Tierärzte und Studierende 3., überarb. u. erw. Auflage Hannover: Schlütersche Verlagsanstalt.
- Burchardt, H. (1983):** The biology of bone graft repair. *Clin Orthop Relat Res*(174): 28-42.
- Busse, J. W.; Morton, E.; Lacchetti, C.; Guyatt, G. H.; Bhandari, M. (2008):** Current management of tibial shaft fractures: a survey of 450 Canadian orthopedic trauma surgeons. *Acta Orthop* 79(5): 689-94.
- Calori, G. M.; Tagliabue, L.; Gala, L.; d'Imporzano, M.; Peretti, G.; Albisetti, W. (2008):** Application of rhBMP-7 and platelet-rich plasma in the treatment of long bone non-unions: a prospective randomised clinical study on 120 patients. *Injury* 39(12): 1391-402.

- Calori, G. M.; Mazza, E.; Colombo, M.; Ripamonti, C. (2011):** The use of bone-graft substitutes in large bone defects: any specific needs? *Injury* 42 Suppl 2: S56-63.
- Cano, J.; Campo, J.; Vaquero, J. J.; Martínez, J. M.; Bascones, A. (2007):** High resolution image in bone biology I. Review of the literature. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal* 12(6): E454-8.
- Causa, F.; Netti, P. A.; Ambrosio, L.; Ciapetti, G.; Baldini, N.; Pagani, S.; Martini, D.; Giunti, A. (2006):** Poly-epsilon-caprolactone/hydroxyapatite composites for bone regeneration: in vitro characterization and human osteoblast response. *J Biomed Mater Res A* 76(1): 151-62.
- Chadayammuri, V.; Hake, M.; Mauffrey, C. (2015):** Innovative strategies for the management of long bone infection: a review of the Masquelet technique. *Patient Saf Surg* 9: 32.
- Chaikof, E. L.; Matthew, H.; Kohn, J.; Mikos, A. G.; Prestwich, G. D.; Yip, C. M. (2002):** Biomaterials and scaffolds in reparative medicine. *Ann N Y Acad Sci* 961: 96-105.
- Cipitria, A.; Lange, C.; Schell, H.; Wagermaier, W.; Reichert, J. C.; Hutmacher, D. W.; Fratzl, P.; Duda, G. N. (2012):** Porous scaffold architecture guides tissue formation. *J Bone Miner Res* 27(6): 1275-88.
- Cipitria, A.; Reichert, J. C.; Epari, D. R.; Saifzadeh, S.; Berner, A.; Schell, H.; Mehta, M.; Schuetz, M. A.; Duda, G. N.; Hutmacher, D. W. (2013):** Polycaprolactone scaffold and reduced rhBMP-7 dose for the regeneration of critical-sized defects in sheep tibiae. *Biomaterials* 34(38): 9960-8.
- Claes, L.; Augat, P.; Suger, G.; Wilke, H. J. (1997):** Influence of size and stability of the osteotomy gap on the success of fracture healing. *J Orthop Res* 15(4): 577-84.
- Claes, L.; Wolf, S.; Augat, P. (2000):** [Mechanical modification of callus healing]. *Chirurg* 71(9): 989-94.
- Claes, L.; Eckert-Hubner, K.; Augat, P. (2002):** The effect of mechanical stability on local vascularization and tissue differentiation in callus healing. *J Orthop Res* 20(5): 1099-105.
- Claes, L.; Blakytyn, R.; Gockelmann, M.; Schoen, M.; Ignatius, A.; Willie, B. (2009):** Early dynamization by reduced fixation stiffness does not improve fracture healing in a rat femoral osteotomy model. *J Orthop Res* 27(1): 22-7.
- Claes, L. E.; Heigele, C. A. (1999):** Magnitudes of local stress and strain along bony surfaces predict the course and type of fracture healing. *J Biomech* 32(3): 255-66.
- Clements, J. R.; Carpenter, B. B.; Pourciau, J. K. (2008):** Treating segmental bone defects: a new technique. *J Foot Ankle Surg* 47(4): 350-6.
- Cobos, J. A.; Lindsey, R. W.; Gugala, Z. (2000):** The cylindrical titanium mesh cage for treatment of a long bone segmental defect: description of a new technique and report of two cases. *J Orthop Trauma* 14(1): 54-9.
- Court-Brown, C. M.; Caesar, B. (2006):** Epidemiology of adult fractures: A review. *Injury* 37(8): 691-7.
- Cypher, T. J.; Grossman, J. P. (1996):** Biological principles of bone graft healing. *J Foot Ankle Surg* 35(5): 413-7.

- Daculsi, G.; Passuti, N. (1990):** Effect of the macroporosity for osseous substitution of calcium phosphate ceramics. *Biomaterials* 11: 86-7.
- Damien, C. J.; Parsons, J. R. (1991):** Bone graft and bone graft substitutes: a review of current technology and applications. *J Appl Biomater* 2(3): 187-208.
- Darder-Garcia, A.; Darder-Prats, A.; Gomar-Sancho, F. (1998):** Nonreamed flexible locked intramedullary nailing in tibial open fractures. *Clin Orthop Relat Res*(350): 97-104.
- Decker, S.; Reifenrath, J.; Omar, M.; Krettek, C.; Müller, C. W. (2014):** Non-Osteotomy and Osteotomy Large Animal Fracture Models in Orthopedic Trauma Research. *Orthop Rev (Pavia)* 6(4).
- DeCoster, T. A.; Gehlert, R. J.; Mikola, E. A.; Pirela-Cruz, M. A. (2004):** Management of posttraumatic segmental bone defects. *J Am Acad Orthop Surg* 12(1): 28-38.
- den Boer, F. C.; Patka, P.; Bakker, F. C.; Wippermann, B. W.; van Lingen, A.; Vink, G. Q.; Boshuizen, K.; Haarman, H. J. (1999):** New segmental long bone defect model in sheep: quantitative analysis of healing with dual energy x-ray absorptiometry. *J Orthop Res* 17(5): 654-60.
- den Boer, F. C.; Wippermann, B. W.; Blokhuis, T.; Patka, P.; Bakker, F. C.; Haarman, H. J. (2003):** Healing of segmental bone defects with granular porous hydroxyapatite augmented with recombinant human osteogenetic protein-1 or autologous bone marrow. *J of Orthopaedic Research* 21: 521-528.
- Denissen, H. W.; de Groot, K.; Makkes, P. C.; van den Hooff, A.; Klopper, P. J. (1980):** Tissue response to dense apatite implants in rats. *J Biomed Mater Res* 14(6): 713-21.
- Dimitriou, R.; Dahabreh, Z.; Katsoulis, E.; Matthews, S. J.; Branfoot, T.; Giannoudis, P. V. (2005):** Application of recombinant BMP-7 on persistent upper and lower limb non-unions. *Injury* 36 Suppl 4: S51-9.
- Dodde, R., 2nd; Yavuzer, R.; Bier, U. C.; Alkadri, A.; Jackson, I. T. (2000):** Spontaneous bone healing in the rabbit. *J Craniofac Surg* 11(4): 346-9.
- Dohle, E.; Bischoff, I.; Bose, T.; Marsano, A.; Banfi, A.; Unger, R. E.; Kirkpatrick, C. J. (2014):** Macrophage-mediated angiogenic activation of outgrowth endothelial cells in co-culture with primary osteoblasts. *Eur Cell Mater* 27: 149-64; discussion 164-5.
- Draenert, K.; Wiese, F. G.; Garde, U.; Draenert, Y.; Helber, U.; Börner, M. (2001):** Synthetische Knochenersatzwerkstoffe auf HA- und TCP-Basis. *Trauma Berufskrankheiten* 3: 293-300.
- Driskell, T. D.; O'Hara, M. J.; Sheets, H. D., Jr.; Greene, G. W., Jr.; Natiella, J. R.; Armitage, J. (1972):** Development of ceramic and ceramic composite devices for maxillofacial applications. *J Biomed Mater Res* 6(1): 345-61.
- Drotleff, S.; Lungwitz, U.; Breunig, M.; Dennis, A.; Blunk, T.; Tessmar, J.; Gopferich, A. (2004):** Biomimetic polymers in pharmaceutical and biomedical sciences. *Eur J Pharm Biopharm* 58(2): 385-407.
- Dumont, C.; Kauer, F.; Bohr, S.; Schmidtman, U.; Knopp, W.; Engelhardt, T.; Sturmer, E. K.; Sturmer, K. M. (2009):** Long-term effects of saw osteotomy versus random fracturing on bone healing and remodeling in a sheep tibia model. *J Orthop Res* 27(5): 680-6.

- Einhorn, T. A. (1998):** The cell and molecular biology of fracture healing. *Clin Orthop Relat Res*(355 Suppl): S7-21.
- Einhorn, T. A.; Lee, C. A. (2001):** Bone regeneration: new findings and potential clinical applications. *J Am Acad Orthop Surg* 9(3): 157-65.
- Eitel, F.; Seiler, H.; Schweiberer, L. (1981):** [Morphological examination of animal-experiment results: comparison with regeneration of the human bone-structure. II. Research results (author's transl)]. *Unfallheilkunde* 84(6): 255-64.
- Finkemeier, C. G. (2002):** Bone-grafting and bone-graft substitutes. *J Bone Joint Surg Am* 84-A(3): 454-64.
- Finlay, J. B.; Hurtig, M. B.; Hardie, W. R.; Liggins, A. B.; Batte, S. W. (1995):** Geometrical properties of the ovine tibia: a suitable animal model to study the pin-bone interface in fracture fixation? *Proc Inst Mech Eng H* 209(1): 37-50.
- Finzel, S.; Rech, J.; Kleyer, A. (2013):** Hochauflösende periphere quantitative CT (HR-pQCT). *Zeitschrift für Rheumatologie* 72(2): 129-136.
- Flygare, L.; Hosoki, H.; Rohlin, M.; Petersson, A. (1997):** Bone histomorphometry using interactive image analysis. A methodological study with application on the human temporomandibular joint. *Eur J Oral Sci* 105(1): 67-73.
- Fong, K.; Truong, V.; Foote, C. J.; Petrisor, B.; Williams, D.; Ristevski, B.; Sprague, S.; Bhandari, M. (2013):** Predictors of nonunion and reoperation in patients with fractures of the tibia: an observational study. *BMC Musculoskelet Disord* 14: 103.
- Friedlaender, G. E.; Perry, C. R.; Cole, J. D.; Cook, S. D.; Cierny, G.; Muschler, G. F.; Zych, G. A.; Calhoun, J. H.; LaForte, A. J.; Yin, S. (2001):** Osteogenic protein-1 (bone morphogenetic protein-7) in the treatment of tibial nonunions. *J Bone Joint Surg Am* 83-A Suppl 1(Pt 2): S151-8.
- Frost, H. M. (1989):** The biology of fracture healing. An overview for clinicians. Part I. *Clin Orthop Relat Res*(248): 283-93.
- Gao, T. J.; Lindholm, T. S.; Kommonen, B.; Ragni, P.; Paronzini, A.; Lindholm, T. C. (1997a):** Stabilization of an inserted tricalcium phosphate spacer enhances the healing of a segmental tibial defect in sheep. *Arch Orthop Trauma Surg* 116(5): 290-4.
- Gao, T. J.; Lindholm, T. S.; Kommonen, B.; Ragni, P.; Paronzini, A.; Lindholm, T. C.; Jalovaara, P.; Urist, M. R. (1997b):** The use of a coral composite implant containing bone morphogenetic protein to repair a segmental tibial defect in sheep. *Int Orthop* 21(3): 194-200.
- Gazdag, A. R.; Lane, J. M.; Glaser, D.; Forster, R. A. (1995):** Alternatives to Autogenous Bone Graft: Efficacy and Indications. *J Am Acad Orthop Surg* 3(1): 1-8.
- Gerhart, T. N.; Kirker-Head, C. A.; Kriz, M. J.; Holtrop, M. E.; Hennig, G. E.; Hipp, J.; Schelling, S. H.; Wang, E. (1993):** Healing segmental femoral defects in sheep using recombinant human bone morphogenetic protein. *Clin Orthop Relat Res*(293): 317-26.
- Gerstenfeld, L. C.; Cullinane, D. M.; Barnes, G. L.; Graves, D. T.; Einhorn, T. A. (2003):** Fracture healing as a post-natal developmental process: molecular, spatial, and temporal aspects of its regulation. *J Cell Biochem* 88(5): 873-84.

- Gerstenfeld, L. C.; Alkhiary, Y. M.; Krall, E. A.; Nicholls, F. H.; Stapleton, S. N.; Fitch, J. L.; Bauer, M.; Kayal, R.; Graves, D. T.; Jepsen, K. J.; Einhorn, T. A. (2006):** Three-dimensional reconstruction of fracture callus morphogenesis. *J Histochem Cytochem* 54(11): 1215-28.
- Giannoudis, P. V.; Dinopoulos, H.; Tsiridis, E. (2005):** Bone substitutes: an update. *Injury* 36 Suppl 3: S20-7.
- Giannoudis, P. V.; Einhorn, T. A.; Marsh, D. (2007):** Fracture healing: the diamond concept. *Injury* 38 Suppl 4: S3-6.
- Giannoudis, P. V.; Einhorn, T. A.; Schmidmaier, G.; Marsh, D. (2008):** The diamond concept--open questions. *Injury* 39 Suppl 2: S5-8.
- Goldberg, V. M.; Stevenson, S. (1987):** Natural history of autografts and allografts. *Clin Orthop Relat Res*(225): 7-16.
- Goldstrohm, G. L.; Mears, D. C.; Swartz, W. M. (1984):** The results of 39 fractures complicated by major segmental bone loss and/or leg length discrepancy. *J Trauma* 24(1): 50-8.
- Goodship, A. E.; Watkins, P. E.; Rigby, H. S.; Kenwright, J. (1993):** The role of fixator frame stiffness in the control of fracture healing. An experimental study. *J Biomech* 26(9): 1027-35.
- Gugala, Z.; Gogolewski, S. (1999):** Regeneration of segmental diaphyseal defects in sheep tibiae using resorbable polymeric membranes: a preliminary study. *J Orthop Trauma* 13(3): 187-95.
- Gugala, Z.; Davis, A. R.; Fouletier-Dilling, C. M.; Gannon, F. H.; Lindsey, R. W.; Olmsted-Davis, E. A. (2007):** Adenovirus BMP2-induced osteogenesis in combination with collagen carriers. *Biomaterials* 28(30): 4469-79.
- Gugala Z.; Lindsey RW; S., G. (2007):** New approaches in the treatment of critical-size segmental defects in long bones. *Macromol Symp.*(253): 147-61.
- Haas, N. P. (2000):** [Callus modulation--fiction or reality?]. *Chirurg* 71(9): 987-8.
- Hahn, J. A.; Witte, T. S.; Arens, D.; Pearce, A.; Pearce, S. (2011):** Double-plating of ovine critical sized defects of the tibia: a low morbidity model enabling continuous in vivo monitoring of bone healing. *BMC Musculoskelet Disord* 12: 214.
- Hammerle, C. H.; Olah, A. J.; Schmid, J.; Fluckiger, L.; Gogolewski, S.; Winkler, J. R.; Lang, N. P. (1997):** The biological effect of natural bone mineral on bone neof ormation on the rabbit skull. *Clin Oral Implants Res* 8(3): 198-207.
- Han, C. S.; Wood, M. B.; Bishop, A. T.; Cooney, W. P., 3rd (1992):** Vascularized bone transfer. *J Bone Joint Surg Am* 74(10): 1441-9.
- Harwood, P. J.; Giannoudis, P. V. (2005):** Application of bone morphogenetic proteins in orthopaedic practice: their efficacy and side effects. *Expert Opin Drug Saf* 4(1): 75-89.
- Hauschild, G.; Merten, H. A.; Bader, A.; Uhr, G.; Deivick, A.; MeyerLindenberg, A.; Fehr, M. (2005):** Bioartificial bone grafting: Tarsal joint fusion in a dog using a bioartificial composite bone graft consisting of beta-tricalciumphosphate and platelet rich plasma--a case report. *Vet Comp Orthop Traumatol* 18(1): 52-4.

- Heckman, J. D.; Sarasohn-Kahn, J. (1997):** The economics of treating tibia fractures. The cost of delayed unions. *Bull Hosp Jt Dis* 56(1): 63-72.
- Hedberg, E. L.; Kroese-Deutman, H. C.; Shih, C. K.; Crowther, R. S.; Carney, D. H.; Mikos, A. G.; Jansen, J. A. (2005):** In vivo degradation of porous poly(propylene fumarate)/poly(DL-lactic-co-glycolic acid) composite scaffolds. *Biomaterials* 26(22): 4616-23.
- Heiple, K. G.; Goldberg, V. M.; Powell, A. E.; Bos, G. D.; Zika, J. M. (1987):** Biology of cancellous bone grafts. *Orthop Clin North Am* 18(2): 179-85.
- Hench, L. I.; Splinter, R. J.; Allen, W. C. (1971):** Bonding mechanisms at the interface of ceramic prosthetic materials. *J Biomed Mater Res* 2: 117-41.
- Hench, L. L. (1989):** Bioceramics and the origin of life. *J Biomed Mater Res* 23(7): 685-703.
- Hench, L. L. (1998):** Biomaterials: a forecast for the future. *Biomaterials* 19(16): 1419-23.
- Hernigou, P.; Poignard, A.; Beaujean, F.; Rouard, H. (2005):** Percutaneous autologous bone-marrow grafting for nonunions. Influence of the number and concentration of progenitor cells. *J Bone Joint Surg Am* 87(7): 1430-7.
- Hernigou, P.; Mathieu, G.; Poignard, A.; Manicom, O.; Beaujean, F.; Rouard, H. (2006):** Percutaneous autologous bone-marrow grafting for nonunions. Surgical technique. *J Bone Joint Surg Am* 88 Suppl 1 Pt 2: 322-7.
- Hierner, R.; Tager, G.; Nast-Kolb, D. (2009):** [Vascularized bone transfer]. *Unfallchirurg* 112(4): 405-16; quiz 417-8.
- Hildebrandt, H. (1998):** Pschyrembel, klinisches Wörterbuch. - 258. Auflage. Walter de Gruyter Verlag.
- Hollinger, J. O.; Battistone, G. C. (1986):** Biodegradable bone repair materials. Synthetic polymers and ceramics. *Clin Orthop Relat Res*(207): 290-305.
- Hollinger, J. O.; Kleinschmidt, J. C. (1990):** The critical size defect as an experimental model to test bone repair materials. *J Craniofac Surg* 1(1): 60-8.
- Hollister, S. J. (2005):** Porous scaffold design for tissue engineering. *Nat Mater* 4(7): 518-24.
- Hrabalek, L.; Cechakova, E.; Burval, S.; Adamus, M.; Langova, K.; Vaverka, M. (2014):** [Use of artificial bone in lateral interbody fusion of the lumbar spine: a prospective radiographic study]. *Acta Chir Orthop Traumatol Cech* 81(6): 392-8.
- Huff, T. W.; Sculco, T. P. (2007):** Management of bone loss in revision total knee arthroplasty. *J Arthroplasty* 22(7 Suppl 3): 32-6.
- Hutmacher, D. W. (2000):** Scaffolds in tissue engineering bone and cartilage. *Biomaterials* 21(24): 2529-43.
- Hutmacher, D. W.; Schantz, J. T.; Lam, C. X.; Tan, K. C.; Lim, T. C. (2007):** State of the art and future directions of scaffold-based bone engineering from a biomaterials perspective. *J Tissue Eng Regen Med* 1(4): 245-60.
- Ilizarov, G. A.; Lediaev, V. I. (1969):** [Replacement of defects of long tubular bones by means of one of their fragments]. *Vestn Khir Im I I Grek* 102(6): 77-84.

- Ilizarov, G. A.; Soibel'man, L. M. (1969):** [Clinical and experimental data on bloodless lengthening of lower extremities]. *Eksp Khir Anesteziol* 14(4): 27-32.
- Ilizarov, G. A. (1971):** [Basic principles of transosseous compression and distraction osteosynthesis]. *Ortop Travmatol Protez* 32(11): 7-15.
- Ilizarov, G. A. (1989a):** The tension-stress effect on the genesis and growth of tissues. Part I. The influence of stability of fixation and soft-tissue preservation. *Clin Orthop Relat Res*(238): 249-81.
- Ilizarov, G. A. (1989b):** The tension-stress effect on the genesis and growth of tissues: Part II. The influence of the rate and frequency of distraction. *Clin Orthop Relat Res*(239): 263-85.
- Ilizarov, G. A. (1990):** Clinical application of the tension-stress effect for limb lengthening. *Clin Orthop Relat Res*(250): 8-26.
- Jarcho, M.; Kay, J. F.; Gumaer, K. I.; Doremus, R. H.; Drobeck, H. P. (1977):** Tissue, cellular and subcellular events at a bone-ceramic hydroxylapatite interface. *J Bioeng* 1(2): 79-92.
- Jarcho, M. (1981):** Calcium phosphate ceramics as hard tissue prosthetics. *Clin Orthop Relat Res*(157): 259-78.
- Jones, C. B.; Mayo, K. A. (2005):** Nonunion treatment: iliac crest bone graft techniques. *J Orthop Trauma* 19(10 Suppl): S11-3.
- Kanter, A. S.; Gandhoke, G. S.; Welch, W. C.; Arnold, P. M.; Cheng, J. S.; Okonkwo, D. O. (2016):** A prospective, multi-center clinical and radiographic outcomes evaluation of ChronOS strip for lumbar spine fusion. *J Clin Neurosci* 25: 36-40.
- Keating, J. F.; Simpson, A. H.; Robinson, C. M. (2005):** The management of fractures with bone loss. *J Bone Joint Surg Br* 87(2): 142-50.
- Kempf, I.; Grosse, A.; Rigaut, P. (1986):** The treatment of noninfected pseudarthrosis of the femur and tibia with locked intramedullary nailing. *Clin Orthop Relat Res*(212): 142-54.
- Kenwright, J.; Richardson, J. B.; Goodship, A. E.; Evans, M.; Kelly, D. J.; Spriggins, A. J.; Newman, J. H.; Burrough, S. J.; Harris, J. D.; Rowley, D. I. (1986):** Effect of controlled axial micromovement on healing of tibial fractures. *Lancet* 2(8517): 1185-7.
- Kerschnitzki, M.; Wagermaier, W.; Liu, Y.; Roschger, P.; Duda, G. N.; Fratzl, P. (2011a):** Poorly ordered bone as an endogenous scaffold for the deposition of highly oriented lamellar tissue in rapidly growing ovine bone. *Cells Tissues Organs* 194(2-4): 119-23.
- Kerschnitzki, M.; Wagermaier, W.; Roschger, P.; Seto, J.; Shahar, R.; Duda, G. N.; Mundlos, S.; Fratzl, P. (2011b):** The organization of the osteocyte network mirrors the extracellular matrix orientation in bone. *J Struct Biol* 173(2): 303-11.
- Khatod, M.; Botte, M. J.; Hoyt, D. B.; Meyer, R. S.; Smith, J. M.; Akeson, W. H. (2003):** Outcomes in open tibia fractures: relationship between delay in treatment and infection. *J Trauma* 55(5): 949-54.
- Kim, H. W.; Knowles, J. C.; Kim, H. E. (2004):** Hydroxyapatite/poly(epsilon-caprolactone) composite coatings on hydroxyapatite porous bone scaffold for drug delivery. *Biomaterials* 25(7-8): 1279-87.

- Kleinschmidt, J. C.; Hollinger, J. O. (1992):** Animal Models in bone research. In: Bone grafts an bone substitutes. / Hrsg. M. B. Habal and A. H. Reddi. W.B. Saunders Co., Philadelphia. S. 133 - 146.
- Klemm, K. W.; Borner, M. (1986):** Interlocking nailing of complex fractures of the femur and tibia. Clin Orthop Relat Res(212): 89-100.
- Kneser, U.; Schaefer, D. J.; Polykandriotis, E.; Horch, R. E. (2006):** Tissue engineering of bone: the reconstructive surgeon's point of view. J Cell Mol Med 10(1): 7-19.
- Kolar, P.; Schmidt-Bleek, K.; Schell, H.; Gaber, T.; Toben, D.; Schmidmaier, G.; Perka, C.; Buttgereit, F.; Duda, G. N. (2010):** The early fracture hematoma and its potential role in fracture healing. Tissue Eng Part B Rev 16(4): 427-34.
- Kon, E.; Muraglia, A.; Corsi, A.; Bianco, P.; Marcacci, M.; Martin, I.; Boyde, A.; Ruspantini, I.; Chistolini, P.; Rocca, M.; Giardino, R.; Cancedda, R.; Quarto, R. (2000):** Autologous bone marrow stromal cells loaded onto porous hydroxyapatite ceramic accelerate bone repair in critical-size defects of sheep long bones. J Biomed Mater Res 49(3): 328-37.
- Konrad, G.; Sudkamp, N. (2007):** Extra-articular proximal tibial fracture. Chirurg 78(2): 161-71; quiz 172-3.
- Krischak, G. D.; Janousek, A.; Wolf, S.; Augat, P.; Kinzl, L.; Claes, L. E. (2002):** Effects of one-plane and two-plane external fixation on sheep osteotomy healing and complications. Clin Biomech (Bristol, Avon) 17(6): 470-6.
- Kruger-Franke, M.; Carl, C.; Haus, J. (1993):** [Treatment of infected intramedullary osteosynthesis. A comparison of various therapeutic procedures]. Aktuelle Traumatol 23(2): 72-6.
- Kuroda, R.; Matsumoto, T.; Kawakami, Y.; Fukui, T.; Mifune, Y.; Kurosaka, M. (2014):** Clinical impact of circulating CD34-positive cells on bone regeneration and healing. Tissue Eng Part B Rev 20(3): 190-9.
- Lam, C. X.; Hutmacher, D. W.; Schantz, J. T.; Woodruff, M. A.; Teoh, S. H. (2009):** Evaluation of polycaprolactone scaffold degradation for 6 months in vitro and in vivo. J Biomed Mater Res A 90(3): 906-19.
- Lane, J. M.; Tomin, E.; Bostrom, M. P. (1999):** Biosynthetic bone grafting. Clin Orthop Relat Res(367 Suppl): S107-17.
- Langer, R.; Vacanti, J. P. (1993):** Tissue engineering. Science 260(5110): 920-6.
- LeGeros, R. Z.; Parsons, J. R.; Daculsi, G.; Driessens, F.; Lee, D.; Liu, S. T.; Metsger, S.; Peterson, D.; Walker, M. (1988):** Significance of the porosity and physical chemistry of calcium phosphate ceramics. Biodegradation-bioresorption. Ann N Y Acad Sci 523: 268-71.
- LeGeros, R. Z. (2002):** Properties of osteoconductive biomaterials: calcium phosphates. Clin Orthop Relat Res(395): 81-98.
- Levenberg, S.; Langer, R. (2004):** Advances in tissue engineering. Curr Top Dev Biol 61: 113-34.

- Liebich, H.-G. (1993):** "Funktionelle Histologie: Farbatlas und Kurzlehrbuch der mikroskopischen Anatomie der Haussäugetiere." 3. Auflage Stuttgart, New York: Schattauer Verlag.
- Lienau, J.; Schell, H.; Duda, G. N.; Seebeck, P.; Muchow, S.; Bail, H. J. (2005):** Initial vascularization and tissue differentiation are influenced by fixation stability. *J Orthop Res* 23(3): 639-45.
- Lienau, J.; Schell, H.; Epari, D. R.; Schutze, N.; Jakob, F.; Duda, G. N.; Bail, H. J. (2006):** CYR61 (CCN1) protein expression during fracture healing in an ovine tibial model and its relation to the mechanical fixation stability. *J Orthop Res* 24(2): 254-62.
- Lienau, J.; Schmidt-Bleek, K.; Peters, A.; Haschke, F.; Duda, G. N.; Perka, C.; Bail, H. J.; Schutze, N.; Jakob, F.; Schell, H. (2009):** Differential regulation of blood vessel formation between standard and delayed bone healing. *J Orthop Res* 27(9): 1133-40.
- Lienau, J.; Schmidt-Bleek, K.; Peters, A.; Weber, H.; Bail, H. J.; Duda, G. N.; Perka, C.; Schell, H. (2010):** Insight into the molecular pathophysiology of delayed bone healing in a sheep model. *Tissue Eng Part A* 16(1): 191-9.
- Lindsey, R. W.; Gugala, Z.; Milne, E.; Sun, M.; Gannon, F. H.; Latta, L. L. (2006):** The efficacy of cylindrical titanium mesh cage for the reconstruction of a critical-size canine segmental femoral diaphyseal defect. *J Orthop Res* 24(7): 1438-53.
- Liu, G.; Zhao, L.; Zhang, W.; Cui, L.; Liu, W.; Cao, Y. (2008):** Repair of goat tibial defects with bone marrow stromal cells and beta-tricalcium phosphate. *J Mater Sci Mater Med* 19(6): 2367-76.
- Liu, Y.; Manjubala, I.; Schell, H.; Epari, D. R.; Roschger, P.; Duda, G. N.; Fratzl, P. (2010):** Size and habit of mineral particles in bone and mineralized callus during bone healing in sheep. *J Bone Miner Res* 25(9): 2029-38.
- Lohfeld, S.; Cahill, S.; Barron, V.; McHugh, P.; Durselen, L.; Kreja, L.; Bausewein, C.; Ignatius, A. (2012):** Fabrication, mechanical and in vivo performance of polycaprolactone/tricalcium phosphate composite scaffolds. *Acta Biomater* 8(9): 3446-56.
- Mahendra, A.; Maclean, A. D. (2007):** Available biological treatments for complex non-unions. *Injury* 38 Suppl 4: S7-12.
- Malizos, K. N.; Papatheodorou, L. K. (2005):** The healing potential of the periosteum molecular aspects. *Injury* 36 Suppl 3: S13-9.
- Mano, J. F.; Sousa, R. A.; Boesel, L. F.; Neves, N. M.; Reis, R. L. (2004):** Bioinert, biodegradable and injectable polymeric matrix composites for hard tissue replacement: state of the art and recent developments. *Composites Sci Technol.* 64: 789-817.
- Mardian, S.; Schwabe, P.; Schaser, K. D. (2015):** [Fractures of the tibial shaft]. *Z Orthop Unfall* 153(1): 99-117; quiz 118-9.
- Mark, H.; Nilsson, A.; Nannmark, U.; Rydevik, B. (2004):** Effects of fracture fixation stability on ossification in healing fractures. *Clin Orthop Relat Res*(419): 245-50.
- Marsell, R.; Einhorn, T. A. (2011):** THE BIOLOGY OF FRACTURE HEALING. *Injury* 42(6): 551-555.

- Martini, L.; Fini, M.; Giavaresi, G.; Giardino, R. (2001):** Sheep model in orthopedic research: a literature review. *Comp Med* 51(4): 292-9.
- Marzona, L.; Pavolini, B. (2009):** Play and players in bone fracture healing match. *Clin Cases Miner Bone Metab* 6(2): 159-62.
- McKibbin, B. (1978):** The biology of fracture healing in long bones. *J Bone Joint Surg Br* 60-B(2): 150-62.
- McNeil, S. E.; Griffiths, H. R.; Perrie, Y. (2011):** Polycaprolactone fibres as a potential delivery system for collagen to support bone regeneration. *Curr Drug Deliv* 8(4): 448-55.
- Metak, G.; Gomoll, A.; Wolter, W.; Barth, G.; Ascherl, R. (1998):** Interspecies comparison of healing standardized bone defects with and without autogenous bone transplantation. *Langenbecks Arch Chir Suppl Kongressbd* 115(Suppl I): 25-30.
- Middleton, J. C.; Tipton, A. J. (2000):** Synthetic biodegradable polymers as orthopedic devices. *Biomaterials* 21(23): 2335-46.
- Mikos, A. G.; Sarakinos, G.; Lyman, M. D.; Ingber, D. E.; Vacanti, J. P.; Langer, R. (1993):** Prevascularization of porous biodegradable polymers. *Biotechnol Bioeng* 42(6): 716-23.
- Mills, L. A.; Simpson, A. H. (2012):** In vivo models of bone repair. *J Bone Joint Surg Br* 94(7): 865-74.
- Morgan, E. F.; Mason, Z. D.; Chien, K. B.; Pfeiffer, A. J.; Barnes, G. L.; Einhorn, T. A.; Gerstenfeld, L. C. (2009):** Micro-computed tomography assessment of fracture healing: relationships among callus structure, composition, and mechanical function. *Bone* 44(2): 335-44.
- Movat, H. Z. (1955):** Demonstration of all connective tissue elements in a single section; pentachrome stains. *AMA Arch Pathol* 60(3): 289-95.
- Müller, J.; Schenk, R.; Willenegger, H. (1968):** [Experimental studies on the development of reactive pseudarthroses on the canine radius]. *Helv Chir Acta* 35(1): 301-8.
- Newman, E.; Turner, A. S.; Wark, J. D. (1995):** The potential of sheep for the study of osteopenia: current status and comparison with other animal models. *Bone* 16(4 Suppl): 277S-284S.
- Ng, K. W.; Romas, E.; Donnan, L.; Findlay, D. M. (1997):** Bone biology. *Baillieres Clin Endocrinol Metab* 11(1): 1-22.
- Niemand, H. G.; Suter, P. F. (2004):** *Praktikum der Hundeklinik*. 9. Auflage: Parey-Verlag.
- Niiranen, H.; Pyhalto, T.; Rokkanen, P.; Kellomaki, M.; Tormala, P. (2004):** In vitro and in vivo behavior of self-reinforced bioabsorbable polymer and self-reinforced bioabsorbable polymer/bioactive glass composites. *J Biomed Mater Res A* 69(4): 699-708.
- Noble, B. S.; Reeve, J. (2000):** Osteocyte function, osteocyte death and bone fracture resistance. *Mol Cell Endocrinol* 159(1-2): 7-13.
- Oest, M. E.; Dupont, K. M.; Kong, H. J.; Mooney, D. J.; Guldberg, R. E. (2007):** Quantitative assessment of scaffold and growth factor-mediated repair of critically sized bone defects. *J Orthop Res* 25(7): 941-50.

- Oni, O. O.; Hui, A.; Gregg, P. J. (1988):** The healing of closed tibial shaft fractures. The natural history of union with closed treatment. *J Bone Joint Surg Br* 70(5): 787-90.
- Paley, D.; Herzenberg, J. E. (2002):** Intramedullary infections treated with antibiotic cement rods: preliminary results in nine cases. *J Orthop Trauma* 16(10): 723-9.
- Palmer, R. H.; Hulse, D. A.; Hyman, W. A.; Palmer, D. R. (1992):** Principles of bone healing and biomechanics of external skeletal fixation. *Vet Clin North Am Small Anim Pract* 22(1): 45-68.
- Panteli, M.; Pountos, I.; Jones, E.; Giannoudis, P. V. (2015):** Biological and molecular profile of fracture non-union tissue: current insights. *J Cell Mol Med* 19(4): 685-713.
- Papathanasopoulos, A.; Giannoudis, P. V. (2008):** Biological considerations of mesenchymal stem cells and endothelial progenitor cells. *Injury* 39 Suppl 2: S21-32.
- Pearce, A. I.; Richards, R. G.; Milz, S.; Schneider, E.; Pearce, S. G. (2007):** Animal models for implant biomaterial research in bone: a review. *Eur Cell Mater* 13: 1-10.
- Peng, J.; Min, L.; Xiang, Z.; Huang, F.; Tu, C.; Zhang, H. (2015):** Ilizarov bone transport combined with antibiotic cement spacer for infected tibial nonunion. *Int J Clin Exp Med* 8(6): 10058-65.
- Perren, S. M.; Huggler, A.; Russenberger, M.; Allgower, M.; Mathys, R.; Schenk, R.; Willenegger, H.; Muller, M. E. (1969):** The reaction of cortical bone to compression. *Acta Orthop Scand Suppl* 125: 19-29.
- Perren, S. M. (1992):** Biomechanical basis of fracture treatment. *Orthopade* 21(1): 3-10.
- Perry, C. R. (1999):** Bone repair techniques, bone graft, and bone graft substitutes. *Clin Orthop Relat Res*(360): 71-86.
- Peters, A. (2007):** Einfluss autologer pluripotenter mesenchymaler Stammzellen auf die Knochenheilung im Modell der atrophien Pseudarthrose der Ratte unter Berücksichtigung der periostalen Rekonstruktion. Berlin, Mensch & Buch Verl., Berlin, Freie Univ., Diss., 2007. 169 S. S.
- Peters, A.; Schell, H.; Bail, H. J.; Hannemann, M.; Schumann, T.; Duda, G. N.; Lienau, J. (2010):** Standard bone healing stages occur during delayed bone healing, albeit with a different temporal onset and spatial distribution of callus tissues. *Histol Histopathol* 25(9): 1149-62.
- Pitt, C. G.; Gratzl, M. M.; Kimmel, G. L.; Surles, J.; Schindler, A. (1981):** Aliphatic polyesters II. The degradation of poly (DL-lactide), poly (epsilon-caprolactone), and their copolymers in vivo. *Biomaterials* 2(4): 215-20.
- Pluhar, G. E.; Turner, A. S.; Pierce, A. R.; Toth, C. A.; Wheeler, D. L. (2006):** A comparison of two biomaterial carriers for osteogenic protein-1 (BMP-7) in an ovine critical defect model. *J Bone Joint Surg Br* 88(7): 960-6.
- Pneumaticos, S. G.; Triantafyllopoulos, G. K.; Basdra, E. K.; Papavassiliou, A. G. (2010):** Segmental bone defects: from cellular and molecular pathways to the development of novel biological treatments. *J Cell Mol Med* 14(11): 2561-9.

Pobloth, A.-M. (2010): Lokaler Einsatz von modifiziertem Parathormon 1-34 in einer Fibrinmatrix zur Verbesserung der ventralen Spondylodese der Schafshalswirbelsäule: histologische Evaluation. Berlin, Mensch-und-Buch-Verl., Berlin, Freie Univ., Diss., 2011. XII, 201 S. S.

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

Probst, A.; Spiegel, H. U. (1997): Cellular mechanisms of bone repair. *J Invest Surg* 10(3): 77-86.

Radasch, R. M. (1999): Biomechanics of bone and fractures. *Vet Clin North Am Small Anim Pract* 29(5): 1045-82, v-vi.

Ramani, P. S.; Pawar, S.; Babhulkar, S. (2014): Association of Lateral Recess Stenosis with Lumbar Disc Herniation. In: *Textbook of Surgical Management of Lumbar Disc Herniation.* / Hrsg. P. S. Ramani. New Dehli, London, Philadelphia, Panama: Jaypee Brothers Medical Publishers (P) Ltd. S. 275 - 277.

Razi, H.; Checa, S.; Schaser, K. D.; Duda, G. N. (2012): Shaping scaffold structures in rapid manufacturing implants: a modeling approach toward mechano-biologically optimized configurations for large bone defect. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 100(7): 1736-45.

Razi, H.; Birkhold, A. I.; Zaslansky, P.; Weinkamer, R.; Duda, G. N.; Willie, B. M.; Checa, S. (2015): Skeletal maturity leads to a reduction in the strain magnitudes induced within the bone: a murine tibia study. *Acta Biomater* 13: 301-10.

Regauer, M.; Jürgens, I.; Kotsianos, D.; Stutzle, H.; Mutschler, W.; Schieker, M. (2005): New-bone formation by osteogenic protein-1 and autogenic bone marrow in a critical tibial defect model in sheep. *Zentralbl Chir* 130(4): 338-45.

Reichert, J. C.; Saifzadeh, S.; Wullschleger, M. E.; Epari, D. R.; Schutz, M. A.; Duda, G. N.; Schell, H.; van Griensven, M.; Redl, H.; Hutmacher, D. W. (2009): The challenge of establishing preclinical models for segmental bone defect research. *Biomaterials* 30(12): 2149-63.

Reichert, J. C.; Devakara, R. E. (2010): Establishment of a preclinical ovine model for tibial segmental bone defect repair by applying bone tissue engineering strategies. *Tissue Engineering* 16(1): 93-104.

Reichert, J. C.; Wullschleger, M. E.; Cipitria, A.; Lienau, J.; Cheng, T. K.; Schutz, M. A.; Duda, G. N.; Noth, U.; Eulert, J.; Hutmacher, D. W. (2011): Custom-made composite scaffolds for segmental defect repair in long bones. *Int Orthop* 35(8): 1229-36.

Reichert, J. C.; Cipitria, A.; Epari, D. R.; Saifzadeh, S.; Krishnakanth, P.; Berner, A.; Woodruff, M. A.; Schell, H.; Mehta, M.; Schuetz, M. A.; Duda, G. N.; Hutmacher, D. W. (2012a): A tissue engineering solution for segmental defect regeneration in load-bearing long bones. *Sci Transl Med* 4(141): 141ra93.

Reichert, J. C.; Epari, D. R.; Wullschleger, M. E.; Berner, A.; Saifzadeh, S.; Noth, U.; Dickinson, I. C.; Schuetz, M. A.; Hutmacher, D. W. (2012b): Bone tissue engineering. Reconstruction of critical sized segmental bone defects in the ovine tibia. *Orthopade* 41(4): 280-7.

- Remedios, A. (1999):** Bone and bone healing. *Vet Clin North Am Small Anim Pract* 29(5): 1029-44, v.
- Rentsch, B.; Bernhardt, R.; Scharnweber, D.; Schneiders, W.; Rammelt, S.; Rentsch, C. (2012):** Embroidered and surface coated polycaprolactone-co-lactide scaffolds: a potential graft for bone tissue engineering. *Biomatter* 2(3): 158-65.
- Rentsch, C.; Schneiders, W.; Hess, R.; Rentsch, B.; Bernhardt, R.; Spekl, K.; Schneider, K.; Scharnweber, D.; Biewener, A.; Rammelt, S. (2014):** Healing properties of surface-coated polycaprolactone-co-lactide scaffolds: A pilot study in sheep. *J Biomater Appl* 28(5): 654-66.
- Rezwan, K.; Chen, Q. Z.; Blaker, J. J.; Boccaccini, A. R. (2006):** Biodegradable and bioactive porous polymer/inorganic composite scaffolds for bone tissue engineering. *Biomaterials* 27(18): 3413-31.
- Rimondini, L.; Nicoli-Aldini, N.; Fini, M.; Guzzardella, G.; Tschon, M.; Giardino, R. (2005):** In vivo experimental study on bone regeneration in critical bone defects using an injectable biodegradable PLA/PGA copolymer. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 99(2): 148-54.
- Roach, H. I.; Shearer, J. R.; Archer, C. (1989):** The choice of an experimental model. A guide for research workers. *J Bone Joint Surg Br* 71(4): 549-53.
- Roohani-Esfahani, S. I.; Dunstan, C. R.; Davies, B.; Pearce, S.; Williams, R.; Zreiqat, H. (2012):** Repairing a critical-sized bone defect with highly porous modified and unmodified baghdadite scaffolds. *Acta Biomater* 8(11): 4162-72.
- Rueger, J. M. (1998):** Bone substitution materials. Current status and prospects. *Orthopade* 27(2): 72-9.
- Runkel, M.; Rommens, P. M. (2000):** Pseudoarthrosis. *Unfallchirurg* 103(1): 51-63; quiz 63.
- Rüter, A.; Mayr, E. (1999):** Pseudarthrosis. *Chirurg* 70(11): 1239-45.
- Ryzewicz, M.; Morgan, S. J.; Linford, E.; Thwing, J. I.; de Resende, G. V.; Smith, W. R. (2009):** Central bone grafting for nonunion of fractures of the tibia: a retrospective series. *J Bone Joint Surg Br* 91(4): 522-9.
- Sarmiento, A.; Sharpe, F. E.; Ebramzadeh, E.; Normand, P.; Shankwiler, J. (1995):** Factors influencing the outcome of closed tibial fractures treated with functional bracing. *Clinical Orthopaedics and Related Research*(315): 8-24.
- Sarmiento, A.; Latta, L. L. (2008):** Functional treatment of closed segmental fractures of the tibia. *Acta Chir Orthop Traumatol Cech* 75(5): 325-31.
- Schell, H.; Lienau, J.; Epari, D. R.; Seebeck, P.; Exner, C.; Muchow, S.; Bragulla, H.; Haas, N. P.; Duda, G. N. (2006):** Osteoclastic activity begins early and increases over the course of bone healing. *Bone* 38(4): 547-54.
- Schell, H.; Thompson, M. S.; Bail, H. J.; Hoffmann, J. E.; Schill, A.; Duda, G. N.; Lienau, J. (2008):** Mechanical induction of critically delayed bone healing in sheep: radiological and biomechanical results. *J Biomech* 41(14): 3066-72.
- Schell, H.; Reuther, T.; Duda, G. N.; Lienau, J. (2011):** The pin-bone interface in external fixator: a standardized analysis in a sheep osteotomy model. *J Orthop Trauma* 25(7): 438-45.

- Schimandle, J. H.; Boden, S. D. (1994a):** Spine update. Animal use in spinal research. *Spine (Phila Pa 1976)* 19(21): 2474-7.
- Schimandle, J. H.; Boden, S. D. (1994b):** Spine update. The use of animal models to study spinal fusion. *Spine (Phila Pa 1976)* 19(17): 1998-2006.
- Schindeler, A.; McDonald, M. M.; Bokko, P.; Little, D. G. (2008):** Bone remodeling during fracture repair: The cellular picture. *Semin Cell Dev Biol* 19(5): 459-66.
- Schmidt-Bleek, K.; Schell, H.; Kolar, P.; Pfaff, M.; Perka, C.; Buttgereit, F.; Duda, G.; Lienau, J. (2009):** Cellular composition of the initial fracture hematoma compared to a muscle hematoma: a study in sheep. *J Orthop Res* 27(9): 1147-51.
- Schmidt-Bleek, K.; Schell, H.; Schulz, N.; Hoff, P.; Perka, C.; Buttgereit, F.; Volk, H. D.; Lienau, J.; Duda, G. N. (2012):** Inflammatory phase of bone healing initiates the regenerative healing cascade. *Cell Tissue Res* 347(3): 567-73.
- Schmidt-Bleek, K.; Petersen, A.; Dienelt, A.; Schwarz, C.; Duda, G. N. (2014a):** Initiation and early control of tissue regeneration - bone healing as a model system for tissue regeneration. *Expert Opin Biol Ther* 14(2): 247-59.
- Schmidt-Bleek, K.; Schell, H.; Lienau, J.; Schulz, N.; Hoff, P.; Pfaff, M.; Schmidt, G.; Martin, C.; Perka, C.; Buttgereit, F.; Volk, H. D.; Duda, G. (2014b):** Initial immune reaction and angiogenesis in bone healing. *J Tissue Eng Regen Med* 8(2): 120-30.
- Schmidt-Bleek, K.; Kwee, B. J.; Mooney, D. J.; Duda, G. N. (2015):** Boon and Bane of Inflammation in Bone Tissue Regeneration and Its Link with Angiogenesis. *Tissue Eng Part B Rev*.
- Schmitz, J. P.; Hollinger, J. O. (1986):** The critical size defect as an experimental model for craniomandibulofacial nonunions. *Clin Orthop Relat Res*(205): 299-308.
- Schweiberer, L.; Baumgart, R.; Deiler, S. (1999):** The biological reaction in atrophic and hypertrophic pseudarthrosis of diaphysis of long bone. Causes and forms of appearance. *Chirurg* 70(11): 1193-201.
- Shapiro, F. (1988):** Cortical bone repair. The relationship of the lacunar-canalicular system and intercellular gap junctions to the repair process. *J Bone Joint Surg Am* 70(7): 1067-81.
- Shapiro, F. (2008):** Bone development and its relation to fracture repair. The role of mesenchymal osteoblasts and surface osteoblasts. *Eur Cell Mater* 15: 53-76.
- Simmons, D. J. (1985):** Fracture healing perspectives. *Clin Orthop Relat Res*(200): 100-13.
- Singer, R. W.; Kellam, J. F. (1995):** Open tibial diaphyseal fractures. Results of unreamed locked intramedullary nailing. *Clin Orthop Relat Res*(315): 114-8.
- Steinhausen, E.; Glombitza, M.; Bohm, H. J.; Hax, P. M.; Rixen, D. (2013):** [Non-unions. From diagnosis to healing]. *Unfallchirurg* 116(7): 633-47; quiz 648-9.
- Stoop, R. (2008):** Smart biomaterials for tissue engineering of cartilage. *Injury* 39 Suppl 1: S77-87.
- Stürmer, K. M.; Schuchardt, W. (1980a):** New aspects of closed intramedullary nailing and marrow cavity reaming in animal experiments. III. Bone-healing, revascularisation and remodelling (author's transl). *Unfallheilkunde* 83(9): 433-5.

- Stürmer, K. M.; Schuchardt, W. (1980b):** New aspects of closed intramedullary nailing and marrow cavity reaming in animal experiments. I. The tibia of the sheep, as a model for intramedullary nailing (author's transl). *Unfallheilkunde* 83(7): 341-5.
- Stürmer, K. M. (1984):** Histologic finding of fracture healing using external fixation and its clinical significance. *Unfallchirurgie* 10(3): 110-22.
- Stürmer, K. M. (1996):** Pathophysiology of disrupted bone healing. *Orthopade* 25(5): 386-93.
- Takagi, K.; Urist, M. R. (1982):** The reaction of the dura to bone morphogenetic protein (BMP) in repair of skull defects. *Ann Surg* 196(1): 100-9.
- Theos, C.; Koulouvaris, P.; Kottakis, S.; Demertzis, N. (2008):** Reconstruction of tibia defects by ipsilateral vascularized fibula transposition. *Arch Orthop Trauma Surg* 128(2): 179-84.
- Tirelli, N.; Lutolf, M. P.; Napoli, A.; Hubbell, J. A. (2002):** Poly(ethylene glycol) block copolymers. *J Biotechnol* 90(1): 3-15.
- Urist, M. R. (1965):** Bone: formation by autoinduction. *Science* 150(3698): 893-9.
- Van der Stok, J.; Van Lieshout, E. M.; El-Massoudi, Y.; Van Kralingen, G. H.; Patka, P. (2011):** Bone substitutes in the Netherlands - a systematic literature review. *Acta Biomater* 7(2): 739-50.
- Webb, J. C. J.; Tricker, J. (2000):** "Bone biology - A review of fracture healing." *Current Orthopaedics* 14: 457-463.
- Wheeler, D. L.; Cross, A. R.; Eschbach, E. J.; Rose, A. T.; Gallogly, P. M.; Lewis, D. D.; Vander Griend, R. A. (2005):** Grafting of massive tibial subchondral bone defects in a caprine model using beta-tricalcium phosphate versus autograft. *J Orthop Trauma* 19(2): 85-91.
- Whittle, A. P.; Russell, T. A.; Taylor, J. C.; Lavelle, D. G. (1992):** Treatment of open fractures of the tibial shaft with the use of interlocking nailing without reaming. *J Bone Joint Surg Am* 74(8): 1162-71.
- Willenegger, H.; Perren, S. M.; Schenk, R. (1971):** Primary and secondary healing of bone fractures. *Chirurg* 42(6): 241-52.
- Willie, B. M.; Bloebaum, R. D.; Bireley, W. R.; Bachus, K. N.; Hofmann, A. A. (2004):** Determining relevance of a weight-bearing ovine model for bone ingrowth assessment. *J Biomed Mater Res A* 69(3): 567-76.
- Willie, B. M.; Birkhold, A. I.; Razi, H.; Thiele, T.; Aido, M.; Kruck, B.; Schill, A.; Checa, S.; Main, R. P.; Duda, G. N. (2013):** Diminished response to in vivo mechanical loading in trabecular and not cortical bone in adulthood of female C57Bl/6 mice coincides with a reduction in deformation to load. *Bone* 55(2): 335-46.
- Wiss, D. A.; Stetson, W. B. (1996):** Tibial Nonunion: Treatment Alternatives. *J Am Acad Orthop Surg* 4(5): 249-257.
- Wissing, H.; Stürmer, K. M.; Breidenstein, G. (1990):** Die Wertigkeit verschiedener Versuchstierspecies für experimentelle Untersuchungen am Knochen. *Hefte Unfallheilkd* 212: 479-488.

Wright, C. D.; Vedi, S.; Garrahan, N. J.; Stanton, M.; Duffy, S. W.; Compston, J. E. (1992): Combined inter-observer and inter-method variation in bone histomorphometry. *Bone* 13(3): 205-8.

Wu, J. J.; Shyr, H. S.; Chao, E. Y.; Kelly, P. J. (1984): Comparison of osteotomy healing under external fixation devices with different stiffness characteristics. *J Bone Joint Surg Am* 66(8): 1258-64.

Yamagishi, M.; Yoshimura, Y. (1955): The biomechanics of fracture healing. *J Bone Joint Surg Am* 37-A(5): 1035-68.

Yannas, I. V. (2005): Similarities and differences between induced organ regeneration in adults and early foetal regeneration. *J R Soc Interface* 2(5): 403-17.

Yao, J.; Radin, S.; P, S. L.; Ducheyne, P. (2005): The effect of bioactive glass content on synthesis and bioactivity of composite poly (lactic-co-glycolic acid)/bioactive glass substrate for tissue engineering. *Biomaterials* 26(14): 1935-43.

Younger, E. M.; Chapman, M. W. (1989): Morbidity at bone graft donor sites. *J Orthop Trauma* 3(3): 192-5.

Zhang, K.; Wang, Y.; Hillmyer, M. A.; Francis, L. F. (2004): Processing and properties of porous poly(L-lactide)/bioactive glass composites. *Biomaterials* 25(13): 2489-500.

Zimmermann, G.; Wagner, C.; Schmeckenbecher, K.; Wentzensen, A.; Moghaddam, A. (2009): Treatment of tibial shaft non-unions: bone morphogenetic proteins versus autologous bone graft. *Injury* 40 Suppl 3: S50-3.

9. Anhang

9.1 Färbeprotokolle

Tabelle 16: Färbeprotokoll Movat-Pentachrom-Färbung

1. Entplasten in MEA (Merck Schuchardt OHG, Hohenbrunn, Deutschland)	3x 30 Minuten
2. Absteigende Alkoholreihe 100 %- Alkohol, 96 %-Alkohol, 80 %- Alkohol, 70 %- Alkohol (Her- beta-Arzneimittel, Berlin, Deutschland)	Je 2 Minuten
3. Aqua dest.	2 Minuten
4. 1 % Alcianblaulösung (8 GS Chroma 1A288, Sigma- Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland)	10 Minuten
5. In Leitungswasser spülen	5 Minuten
6. Alkalischer Ethylalkohol 60 Minuten (10 ml 25 % Ammoniak (Merck, Darmstadt, Deutschland) auf 180 ml 96 % Alkohol)	60 Minuten
7. In fließendem Leitungswasser spülen	10 Minuten
8. Aqua dest.	1x eintauchen
9. Weigerts Eisenhämatoxylin (Eisenhämatoxylin A und B im Verhältnis 1:1 (A: 2E032, B:2E052); Waldeck GmbH, Dicsion Chroma®, Münster, Deutschland)	10 Minuten
10. In fließendem Leitungswasser spülen	15 Minuten
11. Waschen in Aqua dest.	Kurz
12. Brillant Crocein-Säurefuchsin (Brilliantcrocein R (Chroma 1B109); Säurefuchsin (Chroma 1B525); Waldeck GmbH, Dicsion Chroma®, Münster, Deutschland)	10 - 15 Minuten
13. Essigsäure 0,5 % (Merck DGaA, Darmstadt, Deutschland)	Kurz spülen
14. Phosphorwolframsäure 5 % (Chroma 3D092; Waldeck GmbH, Dicsion Chroma®, Münster, Deutschland)	20 Minuten
15. Essigsäure 0,5 % (darin bewegen)	2 Minuten
16. 3 x in 100 % Ethylalkohol spülen	3x 2 Minuten
17. Saffron du Gâtinais	60 Minuten

(Chroma 5A394, Division Chroma®, Waldeck GmbH, Münster, Deutschland)	
18. 100 % Ethylalkohol	3x 2 Minuten
19. Entfetten in Xylol (Mallinckrodt Baker BV., Deventer, 2 x 5 Minuten Holland)	2x 5 Minuten
20. Eindecken mit Vitro-Clud® (R.Langensbrinck, Teningen, Deutschland)	

Tabelle 17: Färbeprotokoll Safranin Orange/von Kossa-Färbung

1. Entplasten in MEA	3 x 30 Minuten
2. Absteigende Alkoholreihe 100 %- Alkohol, 96 %-Alkohol, 80 %- Alkohol, 70 %- Alkohol	Je 2 Minuten
3. Aqua dest.	2 Minuten
4. 3 % wässrige Silbernitratlösung (Merck 1512; Merck, Darmstadt, Deutschland)	10 Minuten
5. Aqua dest.	3x spülen
6. Natriumcarbonat-Formaldehyd-Lösung (Merck 6392 (wasserfrei) bzw. Merck 6391 (Dekahydrat); Merck, Darmstadt, Deutschland)	2 Minuten
7. Leitungswasser	10 Minuten
8. Natriumthiosulfat-Lösung 5% (Merck 6516; Merck, Darmstadt, Deutschland)	5 Minuten
9. Leitungswasser	10 Minuten
10. Aqua dest.	5x eintauchen
11. Safranin-O (Merck 1382, Merck Darmstadt, Deutschland)	8 Minuten
12. Aqua dest.	5x eintauchen
13. 96% Alkohol	2x 2 Minuten
14. 100% Alkohol	2x 2 Minuten
15. Entfetten in Xylol	2x 5 Minuten
16. Eindecken mit Vitro-clud®	

Tabelle 18: Färbeprotokoll Masson-Goldner-Färbung

1. Entplasten in MEA	3x 30 Minuten
2. Absteigende Alkoholreihe 100 %- Alkohol, 96 %-Alkohol, 80 %- Alkohol, 70 %- Alkohol	Je 2 Minuten
3. Aqua dest.	2 Minuten
4. Weigerts Eisenhämatoxylin (Lösung A und B zu gleichen Teilen; A: Chroma 2E032, B: Chroma 2E052)	2 - 4 Minuten
5. Leitungswasser	10 Minuten
6. Säurefuchsin-Ponceau (Chroma: 2C149, Division Chroma®, Waldeck GmbH, Münster, Deutschland)	5 Minuten
7. Essigsäure 1 %	Abspülen
8. Differenzieren unter Sichtkontrolle in PMS-Orange-G (PMS: Merck 1. 00532; Orange-G: Sigma O-3756 oder Merck: 1.15925; Sigma- Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland) (3-5g PMS (Phosphormolybdänsäure) und 2g Orange-G in 100 ml a.d. lösen)	15 - 30 Minuten
9. Essigsäure 1 %	Abspülen
10. Lichtgrün (Chroma 1B211)	5 - 10 Minuten
11. Essigsäure 1 %	Abspülen
12. 3x 100 % Alkohol	kurz
13. Xylol	2x 5 Minuten
14. Eindecken mit Vitro-clud®	

Tabelle 19: Färbeprotokoll α -sma-Färbung

1. Entparaffinieren in Xylol (Mallinckrodt Baker BV., Denventer, Holland)	2x 10 Minuten
2. Rehydrieren in absteigender Alkoholreihe 2 x 100 %-, 96 %-, 80 %-, 70 %- Alkohol	je 2 Minuten
3. Aqua dest.	2 Minuten
4. Spülen in Phosphatpuffer (pH-Wert 7,2) bestehend aus 9 Teilen Aqua dest. und einem Teil Phosphatpuffer-Lösung (Waldeck GmbH, Münster, Deutschland)	2x 5 Minuten
5. Inkubation in Normalserum Horse bei Raumtemperatur (Vektor® Laboratoires, Burlingame, USA)	20 Minuten
6. Spülen in Phosphatpuffer	2x 5 Minuten

-
- | | |
|---|---------------|
| 7. Inkubation mit dem Primärantikörper bei 37°C
Antikörper und Antibodydiluent im Verhältnis 1:100 (Ak:Monoclonal
Anti-human smooth muscle actin Clone 14A, Diluent: S0809; Dako
Deutschland GmbH, Hamburg, Deutschland) | 60 Minuten |
| 8. Spülen in Phosphatpuffer | 2x 5 Minuten |
| 9. Inkubation mit biotinyliertem und enzymgekoppeltem (Alkalische
Phosphatase) Sekundärantikörper bei Raumtemperatur
2 %er Sekundärantikörper: Anti-mouse/Anti-rabbit IgG; No: BA-
1400, Vektor® Laboratories, Burlingame, USA) | 30 Minuten |
| 10. Spülen in Phosphatpuffer | 2x 5 Minuten |
| 11. Inkubation mit ABC-Lösung
in 5 ml PBS 1 Tropfen A (Avidin) und 1 Tropfen B (Biotin) geben
(Vectastain Ak-5000, Vektor® Laboratories, Burlingame, USA) | 50 Minuten |
| 12. Inkubation mit Chromogenpuffer (pH-Wert: 8,2) | 2x 5 Minuten |
| 13. Inkubation mit Alkalischer Phosphatase-Substrat
in 2,5 ml Chromogenpuffer je einen Tropfen Reagenz 1,2 und 3 ge-
ben (Sk-5100; Vektor® Red Alkaline Phosphatase Kit 1, Burlinga-
me, USA) unter Beobachtung der Farbreaktion unter dem Mikro-
skop (Axioskop 2, Zeiss, Jena, Deutschland) | 2 - 6 Minuten |
| 14. Abstoppen der Farbreaktion durch Spülen in Phosphatpuffer | 2x 5 Minuten |
| 15. Kerngegenfärbung mit Hämalaun nach Mayer | |
| a) Spülen in Aqua dest. | 2 Minuten |
| b) Hämalaun nach Mayer
(Hämalaunlösung, Merck, Darmstadt, Deutschland) | 2 Minuten |
| c) Leitungswasser | 5 Minuten |
| 16. Eindecken mit Aquatex® (Merck, Darmstadt, Deutschland) | |
-

Tabelle 20: Färbeprotokoll TRAP-Färbung

1. Entparaffinieren in Xylol	2 x 7 Minuten
2. Rehydrieren in absteigender Alkoholreihe 2 x 100 %-, 96 %-, 80 %-, 70 %- Alkohol	je 2 Minuten
3. Aqua dest.	2 Minuten
4. TRAP-Puffer pH 5,0 (3,28g Na-Acetat (Carl Roth GmbH&CoKg, Karlsruhe, Deutschland) und 46,01g Na-Tartat (Merck, Darmstadt, Deutschland) mit A.dest. auf 1L auffüllen)	2 x 5 Minuten
5. TRAP-Färbelösung bei 37°C inkubieren 1 Küvette: 300 ml TRAP-Puffer, 6 ml N, N-Dimethylformamid (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland), 3 ml Triton X-100 (Sigma: D4551), 60 mg Naphthol AS-MIX-Phosphat (Sigma: N5000; SIGMA ALDRICH CHEMIE GmbH, Steinheim, Deutschland), 360 mg Fast Red Violett LB Salt (Sigma: F3381)	2 Stunden
6. Aqua dest.	Spülen
7. Kernfärbung mit Hämalan nach Mayer	Kurz
a) Aqua dest.	2 Minuten
b) Hämalan	kurz
c) Aqua dest.	
d) Leitungswasser	5 Minuten
8. Eindecken mit Aquatex®	

9.2 MATLAB-Skripte

9.2.1 MATLAB-Skript für HR-pQCT-Daten

```

clear data i x m* n* k s* b* t* y p a*
close all
%Load data from txt file
%CHANGE SAVE PATHWAY LINE 119
%Gets file of interest

if exist('pathname')==0
    pathname=pwd;
    end
[filename,pathname]=uigetfile([pathname, '*.*'], 'Choose Histogram File');
data=dlmread([pathname,filename],'\t',18,0);%skip 29 lines for Scanco output
x = data(:,2); %Scanco output col. 2
y = data(:,4); %Scanco output col. 4

    hold on
    plot(x,y);
    title('Histogram');
    xlabel('mg HA/cc ?? need to check');
    ylabel('Vol[mm^3] ?? need to check');

    i = length(x);
    %search parameters for HU units
    for t = 1:i
if x(t)>=-1000 && x(t)<=500
    my_1(t) = y(t);
    %my_1 array of background peak
elseif x(t)>=2500 && x(t)<=4000
    my_2(t) = y(t);
    %my_2 array of bone peak
elseif x(t)>=500 && x(t)<=2500
    ny(t) = y(t);
    %ny array of minimum value
end
if x(t)<=122
    iy(t) = y(t);
    %iy array of possible initial value
end
end

    k = length(ny);

    for s = 1:k
if ny(s) == 0
    ny(s) = 6000;
end
end

    %peak value of background
    maxy1 = max(my_1);
    %peak value of bone
    maxy2 = max(my_2);
    %minimum value between 2 peaks
    miny = min(ny);
%initial value of the histogram
iny = min(iy);

    for p = 1:i
if y(p) == maxy1
    m1 = p;
elseif y(p) == maxy2
    m2 = p;
elseif y(p) == miny

```

```

    m3 = p;
end
end
for p = 1:120
    if y(p) == iny
        m4 = p;
    end
end

%Find HU for each peak
%Background peak HU
backgroundx = x(m1);
%Peak bone HU
bonex = x(m2);
%Minimum HU
minimumx = x(m3);
%initial point
initialx = x(m4);
%Mirror point of the initial
mirrorx = x(2*m1-m4);
%1/3 of bone peak
threshpt=bonex/3; %x value (HU value)

%Background peak
plot(x(m1),y(m1),'r*');
%Bone peak
plot(x(m2),y(m2),'g*');
%Minimum between 2 peaks
plot(x(m3),y(m3),'k*');
%Initial point
plot(x(m4),y(m4),'m*');
%Mirror point
plot(x(2*m1-m4),y(2*m1-m4),'m*');
%1/3 bone peak
plot(threshpt,0,'ro');
%plots value or 1/3 pt.
text(threshpt-300, 0.01, num2str(round(threshpt)));
%plots value of bone peak
text(bonex-300, 0.01, num2str(round(bonex)));

legend('Histogram','Background Peak','Bone Peak','Minimum','Initial ',' Mirror', '1/3 of bone')

hold off

sfile=fopen('threshold2.csv','a'); % saves csv file in current folder
%General saved stuff
fprintf(sfile,'%s',date); % today's date
fprintf(sfile,'%s',filename(1,1:9)); % Bgoat, JGoat, emu, etc. %6-9 for scanco
fprintf(sfile,'%0f',backgroundx); % background peak
fprintf(sfile,'%0f',bonex); % bone peak
fprintf(sfile,'%0f',minimumx); % minimum between 2 pks
fprintf(sfile,'%0f',threshpt); % 1/3 of bone pk
fprintf(sfile,'%0f',mirrorx); % mirror point
fprintf(sfile,'\n'); % newline character

fclose(sfile);

```

9.2.2 MATLAB-Skript für Mikro-CT-Daten

```

clear data i x m* n* k s* b* t* y p a*
close all
%Load data from txt file
%CHANGE SAVE PATHWAY LINE 119
%Gets file of interest

if exist('pathname')==0
    pathname=pwd;
end

[filename,pathname]=uigetfile(['C:\Dokumente und Einstellungen\beierlek\My Documents\MATLAB\','*.*'],
'Choose Histogram File');
data=dlmread([pathname,filename],'\t',18,0); %skip 29 lines for Scanco output
x = data(:,2); %Scanco output col. 2
y = data(:,4); %Scanco output col. 4

hold on
plot(x,y);
title('Histogram');
xlabel('HU');
ylabel('Vol[mm^3]');

i = length(x);
%search parameters for mg HU units
for t = 1:i
    if x(t)>=0 && x(t)<=2000
        my_1(t) = y(t);
        %my_1 array of background peak
    elseif x(t)>=4000 && x(t)<=8000
        my_2(t) = y(t);
        %my_2 array of bone peak
    elseif x(t)>=2000 && x(t)<=4000
        ny(t) = y(t);
        %ny array of minimum value
    end
%    if x(t)<=100
%        iy(t) = y(t);
%        %iy array of possible initial value
%    end
end

k = length(ny);

for s = 1:k
    if ny(s) == 0
        ny(s) = 5;
    end
end

% r = length(iy);
% for h = 1:r
%     if iy(h) < 0.0001
%         iy(h) = 5;
%     end
% end

%peak value of background
maxy1 = max(my_1);
%peak value of bone
maxy2 = max(my_2);
%minimum value between 2 peaks
miny = min(ny);
%initial value of the histogram
%iny = min(iy);

```



```

for p = 1:i
    if y(p) == maxy1
        m1 = p;
    elseif y(p) == maxy2
        m2 = p;
    elseif y(p) == miny
        m3 = p;
    end
end
end
% for p = 1:50
%     if y(p) == iny
%         m4 = p;
%     end
% end

%Find HU for each peak
%Background peak HU
backgroundx = x(m1);
%Peak bone HU
bonex = x(m2);
%Minimum HU
minimumx = x(m3);
%initial point
%initialx = x(m4);
%Mirror point of the initial
%mirrorx = x(2*m1-m4);
%1/3 of bone peak
threshpt=bonex*0.65; %x value (HU value)

%Background peak
plot(x(m1),y(m1),'r*');
%Bone peak
plot(x(m2),y(m2),'g*');
%Minimum between 2 peaks
plot(x(m3),y(m3),'k*');
%Initial point
%plot(x(m4),y(m4),'m*');
%Mirror point
%plot(x(2*m1-m4),y(2*m1-m4),'m*');
%1/3 bone peak
% plot(threshpt,0,'ro');
%plots value or 1/3 pt.
%text(threshpt-300, 0.01, num2str(round(threshpt)));
%plots value of bone peak
%& text(bonex-300, 0.01, num2str(round(bonex)));

legend('Histogram','Background Peak','Bone Peak','Minimum')

hold off

sfile=fopen('C:\Dokumente und Einstellungen\beierlek\My Documents\MATLAB\histogram values.csv','a');

%General saved stuff
fprintf(sfile,'\n'); % newline character
fprintf(sfile,'%s',date); % today's date
fprintf(sfile,'%s',filename(1,6:9)); % Bgoat, JGoat, emu, etc. %6-9 for scanco
fprintf(sfile,'%0f',backgroundx); % background peak
fprintf(sfile,'%0f',bonex); % bone peak
fprintf(sfile,'%0f',minimumx); % minimum between 2 pks
fprintf(sfile,'%0f',threshpt); % 1/3 of bone pk
% fprintf(sfile,'%0f',mirrorx); % mirror point

fclose(sfile);

```

10. Publikationsverzeichnis

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

11. Danksagung

Zuerst danke ich meinem Doktorvater Herrn Professor Dr. Robert Klopffleisch für die Betreuung der externen Doktorarbeit und die Durchsicht meiner Arbeit als Erstgutachter. Vielen Dank auch für viele Ratschläge, die motivierenden Worte und den Enthusiasmus.

Des Weiteren gilt mein Dank Herrn Professor Georg N. Duda für die Bereitstellung des Themas und die Möglichkeit Erfahrungen auf dem Gebiet der Forschung zu sammeln.

Mein herzlicher Dank gilt Frau Dr. Anne-Marie Pobloth für die intensive und umfassende Betreuung während der gesamten Arbeit. Ich danke dir für die gute Einarbeitung und alle kritischen Denkanstöße, aber auch für den Spaß während der praktischen Arbeit. Danke auch vielfach für das unermüdliche Lesen meiner Entwürfe und der gesamten Arbeit.

Vielen Dank auch an die Mitarbeiter des Forschungslabors Gabriela Korus und Marzena Princ für die nette Betreuung und unendliche Geduld bei der Laborarbeit. Auch Mario Thiele danke ich ganz herzlich für die nette, technische Einarbeitung und Betreuung in der Bildanalyse und am Mikro-CT.

Bedanken möchte ich mich auch bei meinen Mitdoktoranden im JWI für die gute Zusammenarbeit, die nette Gesellschaft während der Kaffeepausen und für die aufmunternden Worte. Danke Claudia Roth, Nicolai Kolarczik, Sophie Nast, Elisabeth Huber und euch vielen anderen netten Leuten.

Außerdem möchte ich mich ganz herzlich bei meinen guten Freundinnen Henriette Ast und Imke Driemel für das Korrekturlesen und das Zuhören während der gesamten Schaffenszeit bedanken. Auch bei allen weiteren Freunden, die mich während dieser Zeit unterstützt und inspiriert haben, bedanke ich mich ganz herzlich.

Meinem Freund Patti danke ich für all seine Geduld, Verständnis und Unterstützung während des Studiums und der Doktorarbeit.

Besonderer Dank gilt meiner Familie und ganz besonders meinen Eltern, Raja und Karsten. Danke für all die Unterstützung während des langen Studiums und dieser Doktorarbeit.

12. Selbstständigkeitserklärung

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

Zeust, den 21.08.2017

Katleen Beierlein