

Aus dem
Institut für Unfallchirurgische Forschung und Biomechanik
der Universität Ulm
Direktor: Prof. Dr. Lutz Claes

Vorgelegt über die
Chirurgische und Gynäkologische Kleintierklinik
der Ludwig-Maximilians-Universität München
Vorstand: Prof. Dr. Ulrike Matis

**Dehnungsinduzierte Knochenneubildung an einer bewegten
synthetischen Materialoberfläche**

Inauguraldissertation
zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde
der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

vorgelegt von
Andreas Veesper
aus Kißlegg im Allgäu

München 2008

Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität München

Dekan:	Univ.-Prof. Dr. Braun
Berichterstatter:	Univ.-Prof. Dr. Matis
Korreferent/en:	Univ.-Prof. Dr. Wanke

Tag der Promotion: 18. Juli 2008

1	Einleitung	1
1.1	Einführung	1
1.2	Knochenbildung und Knochenmorphologie	3
1.2.1	Desmale Osteogenese	3
1.2.2	Chondrale Osteogenese	4
1.2.3	Geflecht- und Lamellenknochen	4
1.3	Frakturheilung und Knochenregeneration	5
1.3.1	Begriffsdefinition	5
1.3.2	Primäre Frakturheilung	5
1.3.3	Sekundäre Frakturheilung	6
1.4	Distractionsosteogenese	10
1.4.1	Begriffsdefinition	10
1.4.2	Historie und Bedeutung der Distractionsosteogenese	10
1.4.3	Laterale (horizontale/transversale) Distraction	12
1.4.3.1	Allgemeine Arbeiten zur lateralen Distraction	13
1.4.3.2	Arbeiten am Kieferkamm	13
1.4.4	Stadien der Distractionsosteogenese	14
1.5	Ziel dieser Studie	17
2	Material und Methoden	18
2.1	Tierversuch	19
2.1.1	Schafe	19
2.1.2	Haltung und Fütterung	19
2.1.3	Gruppeneinteilung	20
2.1.4	Defektmodell und Osteosynthese	20
2.1.5	Versuchsablauf	21
2.1.5.1	Anästhesie und Operationsvorbereitung	21
2.1.5.2	Operatives Vorgehen	22
2.1.5.3	Pflege der Tiere	26
2.1.5.4	Latenzperiode, Distraction, Konsolidierungszeit	26
2.1.5.5	Fluoreszenzmarkierung und Röntgen	26

2.1.5.6 Tötung	27
2.2 Postmortale Aufarbeitung der Proben	27
2.2.1 Präparation und Röntgen.....	27
2.2.2 Periphere quantitative Computertomographie (pQCT).....	27
2.2.3 Zerteilung der Knochenprobe	31
2.2.4 Biomechanik (Eindrückttests)	32
2.2.5 μ -CT.....	34
2.2.6 Histologie	34
2.2.6.1 Herstellung der Dünnschliffpräparate	34
2.2.6.2 Schnittebenen der Dünnschliffpräparate	35
2.2.6.3 Paragon-Färbung	35
2.2.6.4 Gewebedifferenzierung (quantitativ, qualitativ).....	36
2.2.6.5 Fluoreszenzhistologische Untersuchung	37
2.2.7 Statistik	39
3 Ergebnisse	40
3.1 Klinischer Verlauf.....	40
3.2 Präparation und postmortales Röntgen im Faxitron	41
3.3 pQCT	43
3.4 μ-CT	47
3.5 Biomechanik.....	49
3.6 Histologie.....	50
3.6.1 Gewebedifferenzierung.....	50
3.6.1.1 Qualitativ	50
3.6.1.2 Quantitativ	56
3.6.2 Fluoreszenzhistologische Untersuchung	59
3.7 Ergebnisse des Zusatzversuchs.....	61
4 Diskussion.....	62
4.1 Diskussion der Ergebnisse	63
4.2 Diskussion der Methodik.....	65

4.2.1 Tiermodell	65
4.2.2 Modell und Versuchsparameter	66
4.3 Chancen des Verfahrens und Ausblick.....	70
4.4 Schlussfolgerungen.....	72
5 Zusammenfassung	74
6 Summary	76
7 Literaturverzeichnis.....	77
8 Danksagung	83
9 Lebenslauf.....	84

Abkürzungsverzeichnis

BMD	bone mineral density
CT	Computertomograph
DO	Distraktionsosteogenese
Fa.	Firma
h	Stunde
HA	Hydroxylapatit
i.m.	intramuskulär
i.v.	intravenös
KGW	Körpergewicht
kV	Kilovolt
mAs	Milli-Ampere-Sekunden
min	Minuten
μ-CT	Mikro-Computertomographie
NaCl	Natriumchlorid
Nr.	Nummer
p	p-Wert zur Angabe des Signifikanzniveaus
PMMA	Polymethylmethacrylat
p.op.	post operationem
pQCT	periphere quantitative Computertomographie
ROI	Region of interest
S	Schaf
s.c.	subkutan
°	Grad

1 Einleitung

1.1 Einführung

Knochengewebe passt sich zeitlebens wechselnden mechanischen Bedingungen an und reagiert auf diese mit An- oder Abbau. Diese Erkenntnis beschrieb der deutsche Anatom Julius Wolff bereits 1892 in seiner Veröffentlichung „Das Gesetz der Transformation des Knochens“, deren Inhalt noch heute unter dem Begriff „Wolffsches Gesetz“ anerkannt ist. Neben einer Vielzahl von neuen Entwicklungen im Bereich des Knochenersatzes, wie z.B. der Verwendung von autogenen, allogenen oder xenogenen Knochentransplantaten sowie synthetischer Knochenersatzmaterialien, gilt der Knochenaufbau durch eine mechanische Stimulation der körpereigenen Knochenneubildungsfähigkeiten noch heute als eines der aussichtsreichsten Verfahren des Knochenersatzes.

Knochen reagiert auf Dehnungsreize mit Knochenneubildung, ein Phänomen, welches klinisch unter dem Begriff der Distractionsosteogenese oder Kallusdistraction erfolgreich eingesetzt wird.

Die klassische Distractionsosteogenese ist ein Verfahren zur Verlängerung des Knochens. Der Knochen wird operativ durchtrennt und die beiden Segmente werden nach gewisser Zeit durch entgegengesetzten axialen Zug mittels einer Distractionsapparatur (meist in Form eines Fixateur externe) kontinuierlich voneinander entfernt. Im Spalt zwischen den beiden Knochengrenzflächen bildet sich Kallusgewebe, welches allmählich mineralisiert und zu Knochen umgebaut wird.

Nach der ersten Beschreibung des Verfahrens um die Jahrhundertwende des vorigen Jahrhunderts hatte die Technik der Distractionsosteogenese in den Jahren nach 1950 ihren Durchbruch vor allem aufgrund der Arbeiten des russischen Professors Gavril A. Ilizarov (Ilizarov 1989a; Ilizarov 1989b; Ilizarov 1990). Ilizarov erkannte, dass gradueller Zug auf lebendes Gewebe bestimmte Gewebestrukturen durch die mechanische Beanspruchung zu Regeneration und aktivem Wachstum anregt. Er bezeichnete dies als Prinzip des „Tension-Stress Effect“ (Ilizarov et al. 1969). Durch eine Vielzahl klinischer und experimenteller Studien erforschte Ilizarov die biologischen und mechanischen Grundlagen des zuvor komplikationsreichen Verfahrens der Kallusdistraction.

Seither ist die Distractionsosteogenese in einer Vielzahl von Anwendungen in den klinischen Alltag integriert. Patienten mit kongenitalen oder erworbenen Gliedmaßenverkürzungen, schweren Deformationen von langen Knochen, chronischer Osteomyelitis, langstreckigen

Knochendefekten, Frakturheilungsstörungen und Pseudarthrosen können erfolgreich mit der Kallusdistraktionstechnik oder dem daraus abgeleiteten Knochensegmenttransport behandelt werden.

Neben der klassischen Distraktion in axialer Verlaufsrichtung des Knochens können Knochensegmente auch lateral vom Knochen weg distrahiert werden. Über die laterale Distraktion senkrecht zur Knochenlängsachse gibt es bislang nur sehr wenige Arbeiten. Sie ist vorwiegend auf eine Verbreiterung eines bestehenden Knochens oder auf die Beseitigung von Knochendefekten, die nicht den gesamten Querschnitt des Röhrenknochens betreffen, ausgerichtet. Ilizarov war der Erste, der ein Knochensegment lateral zur Achse des Knochens distrahierte (Ilizarov 1989b). Durch laterale Distraktion eines Knochensegmentes der Hundetibia versuchte Ilizarov herausfinden, welchen Einfluss der Dehnungsvektor auf die Qualität der Osteogenese hat. Er konnte eine Orientierung der Knochen trabekel parallel zum Dehnungsvektor nachweisen. Seit 1996 wird das laterale Distraktionsverfahren verstärkt in der Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie und hier hauptsächlich am Alveolarkamm zur vertikalen Kammerhöhung und zur Vorbereitung des Implantatlagers vor der Zahnersatzimplantation herangezogen (Block et al. 1996; Chin und Toth 1996). Bei der lateralen Distraktion wird durch Kortikotomie (alleinige Durchtrennung der Kortikalis unter Schonung von Periost, Endost und Knochenmark) oder Osteotomie (Sägeschnitt unter Schonung des Periosts mit Durchtrennung von Kortikalis, Endost und Markraum) operativ ein knöchernes Transportsegment für die anschließende Distraktion gewonnen. Dieser invasive chirurgische Eingriff und die damit verbundenen Komplikationen, wie z.B. ein Absterben des knöchernen Transportsegments, veranlassen zur Suche nach alternativen Behandlungsverfahren.

Ziel der vorliegenden Studie ist es daher zu untersuchen, ob durch eine mit Hydroxylapatit beschichtete Titanplatte, die dem Knochen angelegt und von ihm weg bewegt wird, eine Knochenneubildung an der kortikalen Oberfläche des Knochens induziert werden kann. Die Hypothese ist, dass es analog zur klassischen Kallusdistraktion durch den Dehnungsreiz zur Knochenneubildung an der definiert bewegten Grenzfläche kommt. Im Gegensatz zur klassischen Kallusdistraktion sollen jedoch im vorliegenden Fall nicht zwei osteoinduktive Knochenflächen voneinander entfernt werden, sondern ein bestenfalls osteokonduktives synthetisches Implantat von einer osteoinduktiven Knochenfläche. Der große Vorteil eines solchen Verfahrens gegenüber den bisher üblichen Verfahren des lateralen Knochenaufbaus ist der vergleichsweise geringe chirurgische Eingriff, da auf eine Kortikotomie oder

Osteotomie verzichtet werden kann. Mit diesem neuen Verfahren wären auch Knochendefekte zu schließen, die bisher nicht befriedigend behandelt werden konnten. Dazu zählen z.B. Knochendefekte nach Tumorresektion oder Trauma, die nicht den gesamten Querschnitt eines Knochens betreffen oder alle Knochendefekte an nicht röhrenförmigen Knochen.

1.2 Knochenbildung und Knochenmorphologie

Bei der Knochenbildung oder Osteogenese muss grundsätzlich zwischen zwei Formen unterschieden werden, der desmalen und der chondralen Osteogenese (Abb. 1. und Abb. 2).

1.2.1 Desmale Osteogenese

Die direkte Knochenneubildung ohne das Auftreten knorpeliger Zwischenstufen wird als desmale Ossifikation (Osteogenesis membranacea) bezeichnet. Der Knochen geht hierbei direkt aus dem Mesenchym hervor. Bei der Skelettentwicklung entsteht der Großteil des neugebildeten Knochens durch desmale Ossifikation. Desmale Ossifikation ist der schnellste Weg zur vollständigen knöchernen Regeneration und kann im Zuge der Frakturheilung nur unter hoher Stabilität und guter Blutversorgung der Fragmente stattfinden (Rhineland 1974). In Reinform ist sie nur ganz selten, z.B. bei der Entstehung einiger Schädelknochen, zu finden (Junqueira und Carneiro 1996).

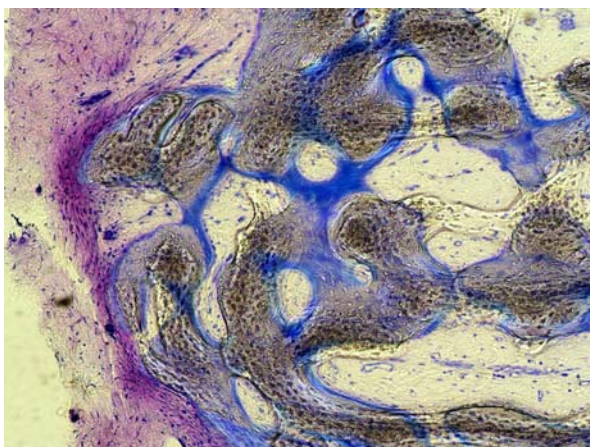


Abb. 1: Desmale Osteogenese in der Tibia eines Schafes. Paragon-Färbung. 100-fache Vergrößerung.

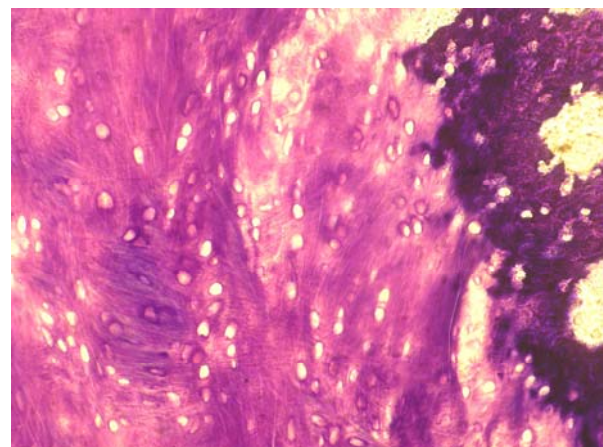


Abb. 2: Chondrale Osteogenese mit blasigen Knorpelzellen in der Tibia eines Schafes. Paragon-Färbung. 200-fache Vergrößerung.

1.2.2 Chondrale Osteogenese

Die Knochenbildung findet bei der chondralen Ossifikation (Osteogenesis cartilaginea) unter Ausbildung einer knorpeligen Zwischenstufe statt, weshalb man auch von einer indirekten Knochenneubildung spricht. Es entsteht zuerst ein Modell des späteren Knochens aus Faserknorpel. Die knorpeligen Vorstufen werden mit zunehmender Ossifikationsdauer abgebaut und durch knöcherne Strukturen ersetzt. Bei der chondralen Ossifikation unterscheidet man zwischen der zuerst auftretenden perichondralen Ossifikation, bei der an der Oberfläche des Knorpelmodells desmal Knochen entsteht und der enchondralen Ossifikation, die durch den Abbau vorhandener Knorpelstrukturen und den Aufbau von Geflechtknochen gekennzeichnet ist. Bei der Frakturheilung sind neben desmaler Ossifikation meist auch Bereiche mit enchondraler Ossifikation vorzufinden (Junqueira und Carneiro 1996). Frakturheilung durch enchondrale Ossifikation wird durch mangelnde Frakturstabilität und schlechte Sauerstoffversorgung des Gewebes begünstigt (Weber und Cech 1973).

1.2.3 Geflecht- und Lamellenknochen

Sowohl bei der desmalen als auch bei der enchondralen Ossifikation entsteht als erste Knochenform der sogenannte Geflechtknochen. Dieser kann später im Zuge des Remodelling zu Lamellenknochen in Form von Spongiosa oder Kompakta umgebaut werden.

Geflechtknochen

Bei jeder Neubildung von Knochen, sei es während der Skelettentwicklung oder bei der Frakturheilung, wird das Stadium des Geflechtknochens durchlaufen. Bei der Entstehung des Geflechtknochens kommt es zu einer ungeordneten Formation der Kollagenfaserbündel in der Grundsubstanz, wodurch ein dreidimensionales Netzwerk entsteht. Eine geordnete Lamellenbildung fehlt deshalb. Knochenkanälchen für Blutgefäße und Nerven sind jedoch zu beobachten (Junqueira und Carneiro 1996).

Lamellenknochen

Der Lamellenknochen stellt die reife und endgültige Form des Knochens dar und ersetzt den in der Entwicklung primär auftretenden unreifen Geflechtknochen. Er wird deswegen auch als Ersatzknochen bezeichnet. Lamellenknochen besteht aus Osteonen, die aus einem Zentralkanal (Havers-Kanal) und diesen konzentrisch umgebenden Lamellen aufgebaut sind. Die einzelnen Lamellen wiederum bestehen aus schraubenförmig angeordneten Kollagenfaserbündeln und Osteozyten, eingebettet in verkalkte Grundsubstanz. Die Osteone der Kompakta sind in Verlaufsrichtung des Knochens regelmäßig angeordnet. Bei der

Spongiosa dagegen sind die Knochenbälkchen weniger regelmäßig ausgebildet und als Kraftlinien (Trajektorien) entsprechend der mechanischen Beanspruchung des Knochens angeordnet (Hees und Sinowatz 2000).

1.3 Frakturheilung und Knochenregeneration

Die Kallusdistraction basiert weitgehend auf den während der Frakturheilung ablaufenden Mechanismen. Sie kann als eine gezielte Steuerung des Frakturheilungs- bzw. Knochenregenerationsprozesses angesehen werden. Deshalb sollen im Folgenden die bei der Frakturheilung ablaufenden Vorgänge genauer beschrieben werden.

1.3.1 Begriffsdefinition

Unter Frakturheilung versteht man eine Knochenneubildung zur Überwindung der Instabilität und Wiederherstellung der Kontinuität des frakturierten Knochens. Im Gegensatz zur Heilung anderer Gewebearten, bei der immer eine bindegewebige Narbe das verletzte Gewebe ersetzt, bleibt bei der Frakturheilung eine Narbenbildung aus. Es kommt zur vollständigen Regeneration des beschädigten Knochens (McKibbin 1978; Einhorn 1992). Prinzipiell wird zwischen zwei Formen der Frakturheilung unterschieden. In Abhängigkeit von der Stabilität und Blutversorgung des verletzten Knochens und damit in enger Korrelation zum angewandten Behandlungs- bzw. Osteosyntheseverfahren kommt es zur primären oder sekundären Knochenbruchheilung.

1.3.2 Primäre Frakturheilung

Bei der primären (direkten) Frakturheilung unterbleibt die Ausbildung eines peri- und endostalen Frakturkallus (Yamagishi und Yoshimura 1955; Anderson 1965).

Nur unter extrem rigider Fixierung und gutem Kontakt der anatomisch korrekt repositionierten und ausreichend vaskularisierten Frakturrenden kann es zu direkter osteonaler Heilung kommen (Rhineland 1968; Schenk und Willenegger 1977).

Abhängig von der Frakturspaltgröße erfolgt die primäre Frakturheilung entweder als Kontaktheilung oder Spaltheilung.

Kontaktheilung:

Bis zu einer Frakturspaltbreite von 0,2 mm ist eine direkte osteonale Überbrückung des Frakturspalts möglich (Stürmer 1987). Hierbei bohren Osteoklasten Kanäle in das benachbarte Fragment, gefolgt von einer kapillaren Gefäßschlinge. Osteoblasten kleiden den Resorptionskanal anschließend konzentrisch mit Knochenlamellen aus (Rahn et al. 1971; Perren 1979).

Spaltheilung:

Liegt zwischen den Fragmenten ein Spalt zwischen 0,2 und 0,5 mm, wird dieser zunächst mit in Spaltrichtung orientiertem Geflechtknochen aufgefüllt, der erst später durch längsaxial ausgerichtete Osteone ersetzt wird (Schenk und Willenegger 1977). Diese Form der primären Frakturheilung wird als Spaltheilung bezeichnet. Bei größeren Frakturspaltbreiten ist eine primäre Frakturheilung nicht mehr möglich (Stürmer 1987; Claes 1992).

1.3.3 Sekundäre Frakturheilung

Die sekundäre (indirekte) Knochenbruchheilung findet immer unter Bildung eines temporären Ersatzgewebes in Form eines periostalen und endostalen Frakturkallus statt. Sie ist bei flexibler oder ausbleibender Fixation der Fraktur anzutreffen und vorwiegend durch enchondrale Ossifikation charakterisiert (McKibbin 1978).

Der Ablauf der sekundären Frakturheilung kann in sich überlappende Phasen gegliedert werden (Braun und Rueter 1996):

- Entzündungsphase (Dauer 1 bis 3 Tage)
- Granulationsphase (Dauer ca. 3 Wochen)
- Phase der Kallushärtung (Dauer 3 bis 4 Monate)
- Phase des „Modelling“ und „Remodelling“ (Dauer Monate bis Jahre)

Während der Knochen frakturiert, kommt es zur Verletzung von Kortikalis, Knochenmark, Periost und umgebenden Weichteilen. Gefäßzerreißen bedingen eine Nekrose der Frakturrenden, die Ausbildung eines Frakturhämatoms und den Austritt von entzündlichem Exsudat (Brand und Rubin 1987). Wie bei der akuten Entzündung üblich, kommt es zur Vasodilatation und überschießenden Kapillareinsprossung (Rhineland und Baragry 1962; Rhineland 1968). Durch die verstärkte Vaskularisierung wird zum einen die Sauerstoffsättigung der lokalen Zellen verbessert und zum anderen gelangen massenhaft neue

Zellen in das Entzündungsgebiet. In der Folge beginnen polymorphkernige neutrophile Granulozyten, Mastzellen und Makrophagen mit dem Abbau des nekrotischen Gewebes.

In der Granulationsphase wird das Frakturhämatom mit fibroblastenreichem Granulationsgewebe, Kollagen und weiteren Kapillaren durchsetzt und dadurch organisiert (Willenegger et al. 1971; Brighton 1985; Frost 1989). Osteoklasten bauen die nekrotischen Knochenenden ab (Raekallio und Makinen 1968). Der durch das Granulationsgewebe entstandene „weiche Kallus“ bewirkt eine erste bindegewebige Durchbauung des Frakturspalts. Im Kallus zwischen den Fragmentenden erscheinen Chondroblasten als Ausgangspunkt der enchondralen Ossifikation im Frakturspalt. Aus den Spindelzellen („Osteoprogenitorzellen“ (Young 1962)) der Kambiumschicht des Periosts gehen Osteoblasten hervor. Die schnelle Bildung eines periostalen Kallus durch desmale Ossifikation beginnt im frakturfernen Bereich und kann den Frakturspalt bis zu einem gewissen Teil überbrücken (Einhorn 1992). Die periostale Kallusreaktion wird durch Bewegung gesteigert und durch zu rigide Fixierung unterdrückt (McKibbin 1978; Wang et al. 1981). Eine vollständige Überbrückung des Frakturspaltens wird durch eine zusätzliche Kallusreaktion des umgebenden Binde- und Granulationsgewebes erreicht. Diese Reaktion ist ebenfalls abhängig von den mechanischen Einflüssen im Frakturbereich und wird bei zu rigider Fixierung unterdrückt (McKibbin 1978). Ausgehend von Endost, Knochenmark und Kortex wird ein weiterer Teil des Bindegewebes durch Knochen ersetzt (Einhorn 1992).

Durch zunehmende Mineralisierung der zwischen den Kollagenfasern liegenden Grundsubstanz und des Faserknorpels kommt es zur Aushärtung des zuvor weichen Kallus. In den kalzifizierten Knorpel wachsen vermehrt Blutgefäße ein und aus perivaskulären Zellen entstehen Osteoblasten (Einhorn 1998). Chondroblasten resorbieren den Knorpelkallus und es entsteht ein dreidimensionales entlang der Kapillaren ausgerichtete Netz an Geflechtknochen (Frost 1989).

Nachdem die Knochenenden knöchern überbrückt sind, kommt es zur Umwandlung des Geflechtknochens in aus Havers'schen Systemen aufgebauten lamellären Knochen (Einhorn 1998). Dieser Umbauprozess wird als „Modelling“ bezeichnet. Die ungerichteten Knochenbälkchen des Geflechtknochens werden resorbiert und der lamelläre Knochen wird entlang der Belastungsrichtung des Knochens ausgerichtet. Ihren Abschluss findet die sekundäre Frakturheilung im „Remodelling“. Hierbei wird der überflüssige knöcherne Kallus

abgebaut und die normale Knochen- und Markraumkontur wiederhergestellt. Der Knochen passt sich funktionell an die mechanische Belastung an. Die Vorgänge des Remodelling laufen auch bei skelettgesundem Knochen im Rahmen des physiologischen Knochenumbaus zeitlebens ab (Brighton 1985; Frost 1989).

Insgesamt sind die Heilungsvorgänge am Knochen sehr stark abhängig von den mechanischen Einflüssen auf den Frakturspalt. Ausschlaggebend für die Differenzierung des im Frakturspalt liegenden Reparationsgewebes ist die Größe der im Frakturspalt wirkenden Dehnung, die definiert ist als relative Längenänderung und die Größe der im Frakturspalt auftretenden hydrostatischen Drücke.

Nach Studien von Claes (Claes et al. 1998; Claes und Heigele 1999) und Carter (Carter et al. 1988; Carter et al. 1998) und der daraus abgeleiteten Gewebedifferenzierungshypothese kommt es bei Dehnungen von kleiner $\pm 5\%$ und hydrostatischen Drücken von betragsgemäß kleiner $0,15\text{ MPa}$ hauptsächlich zu desmaler Ossifikation im Kallusgewebe (Abb. 3, Bereich A). Bei Dehnungen kleiner als $\pm 15\%$ und kompressiven hydrostatischen Drücken von größer als $-0,15\text{ MPa}$ dominiert das Bild der enchondralen Ossifikation (Abb. 3, Bereich B). Bei Dehnungen und hydrostatischen Drücken, die die beschriebenen Werte übersteigen, kommt es zur Bildung von Bindegewebe oder Faserknorpel (Abb. 3, Bereich C) (Claes und Heigele 1999).

Im Frakturspalt sind anfangs kompressive hydrostatische Drücke Ursache für die vorherrschende enchondrale Ossifikation. In den periostalen und endostalen Bereichen der Kallusperipherie kommt es aufgrund der geringen Drücke und Dehnungen zu desmaler Osteogenese. Nach Überbrückung der Frakturzone durch den Brückenkallus werden die kompressiven Kräfte geringer und der Knorpel wandelt sich enchondral in Knochen um (Carter et al. 1988; Carter et al. 1998; Claes und Heigele 1999; Claes et al. 2000b).

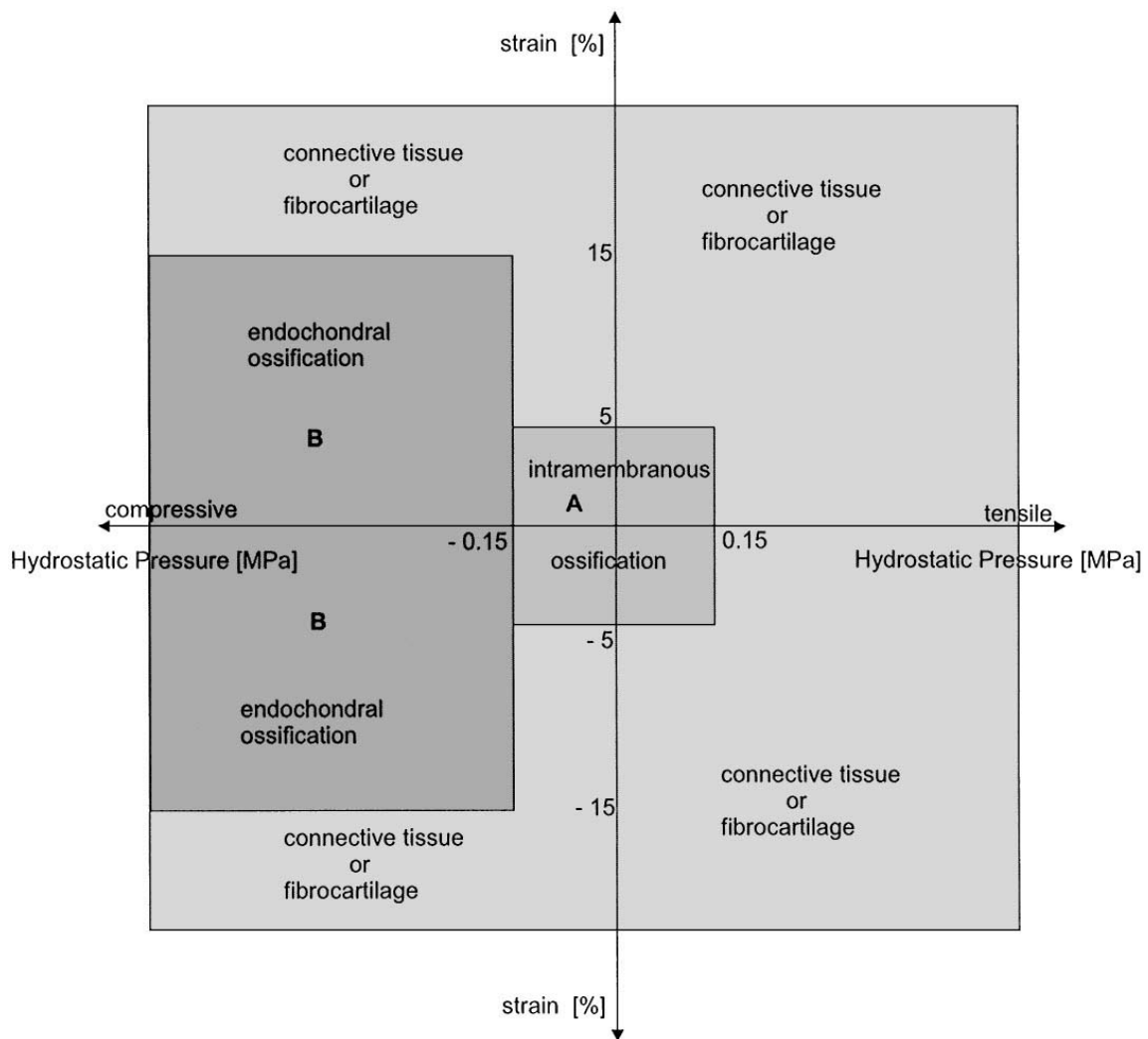


Abb. 3: Schema der zu erwartenden Gewebedifferenzierung in Abhängigkeit von den im Frakturgebiet wirkenden Kräften. (Abszisse: hydrostatischer Druck in MPa; Ordinate: Dehnung (strain in %)). Quelle: Claes und Heigele 1999.

Zu große Dehnungen verhindern eine Differenzierung des Gewebes im Frakturspalt. Minimaldehnungen sind jedoch Voraussetzung für eine Induktion der Zelldifferenzierung (Sarmiento et al. 1977; Goodship und Kenwright 1985; Aalto 1986; Kenwright und Goodship 1989). Diese Tatsache ist auch bei der im Folgenden beschriebenen Distraktionsosteogenese von großer Bedeutung.

1.4 Distractionsosteogenese

1.4.1 Begriffsdefinition

Bei der klassischen Kallusdistraction oder Distractionsosteogenese kommt es zur Knochenneubildung durch einen dehnungsinduzierten Reiz auf das weiche Kallusgewebe zwischen zwei Knochengrenzflächen. Durch entgegengesetzten Zug an zwei Segmenten eines operativ durchtrennten Knochens mittels einer speziellen Distractionsapparatur (meist in Form eines Fixateur externe), kommt es zur Bildung von Kallusgewebe, welches später zu Geflechtknochen umgebaut wird. Ilizarov bezeichnete diese Reaktion des Kallusgewebes auf mechanisch angelegte Zugspannung als den sogenannten „tension-stress effect“ (Ilizarov 1989a; Ilizarov 1989b).

1.4.2 Historie und Bedeutung der Distractionsosteogenese

Beinverkürzungen nach erlittenen Frakturen stellten in vergangenen Jahrhunderten aufgrund der unzureichenden Möglichkeiten der Frakturfixierung eine verbreitete Problematik dar. Gegen Ende des 19. Jahrhunderts beschäftigte sich eine zunehmende Anzahl an Medizinern mit der Frage nach Möglichkeiten der operativen Extremitätenverlängerung.

Eine Verlängerung der Extremitäten durch epiphyseale Distraction wurde erstmals 1869 von Bernhard von Langenbeck für ein Tiermodell beschrieben (Langenbeck 1869). Langenbeck erkannte damals schon, dass durch Dehnung des Knochens ein vermehrtes Längenwachstum erzielt werden kann. Er postulierte, dass die Gelenke von der Distractionsprozedur möglichst auszuschließen sind und dass eine Extension durch Gewichte unter kontinuierlicher Zugwirkung am zweckmäßigsten sei. Die Methode der Epiphysendistraction setzte keine Osteotomie voraus. Ihre Anwendung war allerdings auf den wachsenden Knochen mit noch nicht geschlossenen Epiphysenfugen beschränkt.

Erste Berichte über erfolgreiche operative Extremitätenverlängerung beim Menschen gehen auf das Jahr 1905 und den Italiener Alessandro Codivilla zurück, der als der Entdecker der Fragmentdistraction anzusehen ist (Codivilla 1904). Bei der Fragmentdistraction werden die Knochenfragmente direkt nach der Osteotomie entweder durch einmaligen intraoperativen, kontinuierlichen oder graduellen Zug auseinandergezogen. Codivilla behandelte Patienten mit unter Extension angelegten Gipsverbänden, die mehrmals aufgesägt und verlängert wurden. Die Gipsverbände verursachten jedoch Drucknekrosen. Codivilla brachte daraufhin einen Nagel in den Kalkaneus ein, über den er die Extensionskräfte leitete (Nagelextension).

Kirschner berichtete 1909 über die erste Beinverlängerung mit kontinuierlicher Fragmentdistraktion durch langsame Dehnung mittels Nagelextension (Kirschner 1909). 1916 durchtrennte Kirschner erstmals den Knochen im gesunden Gebiet und distrahierte die Knochenfragmente (Kirschner 1916).

August Bier empfiehlt in einer Publikation aus dem Jahre 1923 als Erster eine Latenzzeit von 3 bis 5 Tagen nach der Osteotomie (Bier 1923). Er ging davon aus, dass „die erhöhte metaplastische Knochenbildung von Blutkoagula induziert wird“, eine Annahme, die er auf seine Erfahrungen aus der Frakturheilung stützte. Schon 1905 hatte er die Bedeutung des Blutergusses für die Frakturheilung erkannt (Bier 1905).

Insgesamt war die bis dahin praktizierte Extremitätenverlängerung ein sehr komplikationsreiches Verfahren. Neben starken Schmerzen bei der kontinuierlichen Distraktion waren es hauptsächlich die hierbei immer wieder auftretenden Achsabweichungen der ungenügend fixierten Fragmente, die eine verbreitete klinische Anwendung des Verfahrens verhinderten.

Durch die Fortschritte auf dem Gebiet der stabilen Frakturfixierung kam es zudem nach Frakturen weniger häufig zu Beinverkürzungen, was den Distaktionsverfahren die Hauptindikationsstellung nahm und sie lange Zeit in Vergessenheit geraten ließ. Erst durch die Einführung winkelstabiler externer Fixateure konnte die Komplikation der Achsabweichung kontrolliert werden. Biers Assistenten Block (Block 1923) und Klapp (Klapp 1930) entwickelten in den 20er Jahren Rahmenfixateure, die eine Fixierung der distrahierten Fragmente mittels gespannten Kirschner-Drähten erlaubten.

Erst Ilizarov schaffte es in den Jahren nach 1951 durch den von ihm entwickelten Ilizarov-Ringfixateur, das Verfahren der Kallusdistraktion standardisiert und ohne die Komplikation der Achsabweichung anzuwenden. Durch seinen Ringfixateur war sogar eine Korrektur von bestehenden Fehlstellungen möglich. Außerdem konnte das Verfahren der Kallusdistraktion durch die neuen Erkenntnisse von Ilizarov auch für weitere Indikationsstellungen genutzt werden. Angeborene oder traumatisch bedingte Beinverkürzungen konnten nun ebenso behandelt werden wie Pseudarthrosen und langstreckige Knochendefekte (Ilizarov 1989a; Ilizarov 1989b; Ilizarov 1990).

Seither ist dieses Verfahren hauptsächlich in der orthopädischen Chirurgie zur Verlängerung langer Röhrenknochen angewendet worden. In der heutigen Zeit sind eine Vielzahl von Distraktionsapparaturen im klinischen Einsatz.

Sehr verbreitet ist immer noch die Kallusdistraction mittels Fixateur-externe-Osteosynthese. Neben dem Ringfixateur kommen heute auch sogenannte Hexapod-Ringfixateure, monolaterale Fixateure, Hybridfixateure und das Monorail-Verfahren zum Einsatz (Hankemeier et al. 2004). Beim letztgenannten Verfahren handelt es sich um eine Kombination aus Marknagel und Fixateur externe. Der externe Fixateur kann nach Beendigung der Distraction entfernt werden, was die Beeinträchtigung des Patienten erniedrigt. In jüngerer Zeit kommen auch vermehrt interne Distraktoren zum Einsatz (Baumgart et al. 1999; Cole et al. 2001; Guichet et al. 2003). Diese Verlängerungsnägel zeichnen sich durch eine intramedulläre Stabilisation des Heilungsgebiets, ein weitgehendes Fehlen von beim Fixateur externe auftretenden Komplikationen, sowie erhöhten Tragekomfort aus.

Schon bald nach der Anwendung am langen Röhrenknochen wurde das therapeutische Potential der Kallusdistraction auch für die Therapie von Deformitäten des Gesichtsschädels ausgenutzt (Ilizarov 1990; Karp et al. 1990). In den letzten zwei Dekaden wurde das Verfahren ein wichtiges chirurgisches Instrument in der Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie (Gaggl et al. 2000). Am Alveolarkamm können Knochendefizite vor Implantation dentaler Implantate durch Kallusdistraction beseitigt werden.

1.4.3 Laterale (horizontale/transversale) Distraction

Die bis hier beschriebenen Anwendungen der Distractionsosteogenese beziehen sich auf die longitudinale Distraction in Verlaufsrichtung des Knochens, also in Richtung seiner axialen Belastung. Inwiefern diese Prinzipien auf die transversale oder laterale Distraction übertragbar sind, ist kaum bekannt. Sehr wenige Studien am langen Röhrenknochen untersuchten die Distraction lateral zur Verlaufsrichtung des Knochens (Ilizarov 1989b; Matsuyama et al. 2005). Die laterale Distraction wird in der Literatur oft auch als transversale, horizontale oder vertikale Distraction bezeichnet. Der Einfachheit halber werden all diese Studien und Verfahren hier unter dem Begriff „laterale Distraction“ aufgeführt.

Im Folgenden sollen die klinischen und experimentellen Anwendungen am Gesamtskelett und anschließend speziell die vielfältigen Anwendungen in der Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie beschrieben werden.

1.4.3.1 Allgemeine Arbeiten zur lateralen Distraction

Ilizarov hat, um die Rolle des Verlängerungsvektors für die Qualität von Osteogenese und Angiogenese bei der Distractionosteogenese zu untersuchen, Versuche zur lateralen Distraction an der Hundetibia durchgeführt (Ilizarov 1989b). Dabei wurde ein rechteckiges Kortexfragment aus der Diaphyse herausgetrennt und nach einer Latenzzeit von drei Tagen seitlich distrahert. Der neue Knochen formte sich in diesen Experimenten parallel zum Dehnungsvektor, auch wenn dieser senkrecht zur mechanischen Achse des Knochens stand.

Die Wachstumszone befand sich in der Mitte des neuen Regenerats. Neue Blutgefäße bildeten sich ebenfalls in Richtung des Dehnungsvektors. Ilizarov konnte beweisen, dass bei lateraler Distraction eines kortikalen Segments die Orientierung der Knochen trabekel und der osteogenetische Prozess parallel zum Dehnungsvektor auftrat. Nach seiner Beobachtung von Osteogenese und Angiogenese in diesem Modell wendete er die Technik in der Klinik an, um den transversalen Durchmesser von schmalen Knochen zu erhöhen oder um Patienten mit Beschwerden nach chronischer Ischämie zu behandeln (Ilizarov 1989b).

Eine weitere interessante experimentelle Arbeit an der Hundetibia wurde 2005 durch Matsuyama et al. vorgestellt (Matsuyama et al. 2005). Auch hier wurde ein rechteckiges Kortexfragment (1 x 4 cm) gewonnen. Dieses wurde nach einer Latenzzeit von 7 Tagen zweimal täglich um 0,5 mm über einen Zeitraum von 14 Tagen distrahert. Nach einer Konsolidierungszeit von weiteren 28 Tagen wurden die Tiere getötet. Die Knochenbildung erfolgte in Form von „Mikrosäulen“ entlang der Distractionrichtung.

Matsuyama et al. bestätigten, dass die laterale Distractionstechnik, die Ilizarov vorschlug, beständigen und bleibenden Knochen erzeugen kann und somit klinisch einsetzbar ist.

1.4.3.2 Arbeiten am Kieferkamm

Im Bereich der Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie findet die laterale Distractionosteogenese große Beachtung und ist sehr stark in den klinischen Alltag integriert (Saulacic et al. 2004). Auch hier basiert die Technik auf der Separation und anschließenden Distraction eines mobilen, aber voll vaskularisierten Knochensegments vom zugrunde liegenden Knochen. Gerade beim Einsetzen von Zahnimplantaten besteht bei vielen Patienten ein Defizit an Höhe und/oder Breite des Kieferkamms. Durch laterale Distractionosteogenese konnte in experimentellen Arbeiten und klinischen Studien eine ausreichende Verbreiterung des Alveolarkamms vor der Insertion von Zahnimplantaten erreicht werden (Garcia et al. 2004). Nach der Konsolidierungsphase oder auch schon

während dieser Phase wird dann das Implantat in den Knochen eingesetzt (Nosaka et al. 2002). Dadurch wird der entstandene Kallus belastet und ein Remodelling im Sinne von Knochenabbau weitestgehend verhindert.

Das Heraustrennen des Kortextfragments ist jedoch ein sehr invasiver und mit erheblichen Schmerzen und Risiken (z.B. Sequesterbildung) verbundener Eingriff, was zur Suche nach Alternativen veranlasst.

1.4.4 Stadien der Distractionsosteogenese

Die Distractionsosteogenese lässt sich mechanisch und histologisch in charakteristische Stadien einteilen. Wie bereits erwähnt, werden durch Osteotomie oder Kortikotomie zwei Knochengrenzflächen geschaffen. Dabei werden die Substrukturen des Knochens (Osteone, Canaliculi) eröffnet und es kommt zur Freisetzung von Zellen und biologischen Faktoren aus der Matrix und den Gefäßen. Der während einer fakultativen Latenzzeit von ca. sieben Tagen entstandene noch weiche Kallus wird in der weiteren Heilungsphase durch den applizierten Dehnungsreiz in die Länge gezogen. Dadurch kommt es zur charakteristischen Mikrosäulenbildung von Knochengewebe ausgehend von den Knochengrenzflächen hin zur zentralen Bindegewebszone (Interzone) in der Mitte des Distractionspalts (Ilizarov 1989b; Aronson 1991). Bei geeigneter Distractionsgeschwindigkeit verbleibt diese noch nicht verknöcherte Zone während des gesamten Distractionsvorganges und überbrückt erst in der an die Distraction anschließende Konsolidierungsphase. Das entstandene, longitudinal ausgerichtete, fibröse Gewebe wandelt sich kontinuierlich in Geflechtknochen um.

Die wichtigsten biologischen und klinischen Randbedingungen für eine erfolgreiche Distractionsosteogenese wurden durch Ilizarov wie folgt definiert (Ilizarov 1990):

- a) bestmöglicher Erhalt der Blutversorgung
- b) stabile externe Fixation
- c) eine Latenzzeit von ca. 7 Tagen
- d) eine Distractionsrate von 1mm/Tag in mehreren kleinen Schritten
- e) eine Periode neutraler Fixation nach der Distraction (Konsolidierungszeit)
- f) normale, physiologische Belastung des distrahierten Bereichs

Noch heute sind neben einigen weiteren Faktoren diese Kriterien als die Wesentlichen anerkannt. Eine Optimierung der Kriterien für die jeweilige klinische Situation am Patienten

ist oberstes Gebot. Die oben beschriebenen Punkte sind in der experimentellen Forschung immer wieder variiert worden und die einzelnen Schritte des Verfahrens sind noch immer Teil einer intensiven Grundlagenforschung (Wiedemann 1994).

Ilizarov räumte dem Erhalt der extraossären, periostalen und medullären Gefäße große Bedeutung für das Gelingen der Distraktionsbehandlung ein. Er konnte zeigen, dass eine Knochenmarksschädigung zu einer reduzierten osteogenetischen Aktivität bis hin zu nekrotischem Gewebe im Distraktionsspalt führt. Auch andere Autoren, die die Angiogenese bei der Distraktionsosteogenese erforschten, beurteilen eine Schonung der versorgenden Blutgefäße als wichtig (Kojimoto et al. 1988; Delloye et al. 1990; Yasui et al. 1991). Über den Anteil der einzelnen beteiligten Strukturen (extraossäre Strukturen, Periost, Endost, Kortex und Medulla) an der Blutversorgung des Kallusbereichs gibt es jedoch widersprüchliche Forschungsergebnisse (Trueta und Buhr 1963; Kojimoto et al. 1988; Matsuyama et al. 2005).

Ilizarov erkannte die Bedeutung der Stabilität der verwendeten Fixateur-externe-Osteosynthese und konnte durch seinen dreidimensionalen Ringfixateur eine optimale Stabilität erreichen. Bei instabiler Osteosynthese kommt es zu unerwünschten interfragmentären Bewegungen an der Osteotomie- oder Frakturlinie, was eine Störung der Regeneratbildung zur Folge hat. Insbesondere Scherbewegungen wirken sich nachteilig auf die Heilung aus (Augat et al. 2003). Eine zu stabile Fixation verhindert jedoch erwünschte axiale Mikrobewegungen parallel zur Knochenachse, die sich förderlich auf die Regeneratbildung und -reifung auswirken (Goodship und Kenwright 1985; Kenwright et al. 1986; Ilizarov 1989a; Paley et al. 1990; Augat et al. 1998).

Die Bedeutung einer fakultativen Latenzzeit (Zeit neutraler Fixation vor Distraktionsbeginn) für den Erfolg der Distraktionsbehandlung wird in der Literatur unterschiedlich gewichtet. Eine Latenzzeit von 5 bis 7 Tagen wird in den meisten Fällen als idealer Zeitraum zur Organisation eines distraktionsfähigen Gewebes erachtet (Kojimoto et al. 1988; Ilizarov 1990). Das durch die Osteotomie entstandene Frakturhämatom wird zunehmend resorbiert und in einen distraktionsfähigen weichen Kallus umgewandelt. Der Beginn der Distraktion kann auch zeitlich am Auftreten eines röntgenologisch sichtbaren Kallus festgemacht werden (De Bastiani et al. 1987). In manchen experimentellen Studien wird auch von erfolgreichen

Distraktionsbehandlungen bei kürzerer oder gar fehlender Latenzzeit berichtet (Steen und Fjeld 1989; Aronson und Shen 1993; Glowacki et al. 2004).

Die Distraktionsrate beschreibt die durch Distraction erzielte tägliche Längenänderung. Bei der longitudinalen Verlängerung von Knochen wird typischerweise eine Distraktionsrate von 1mm/Tag gewählt (Ilizarov 1989a; Aronson 1994b). Durch den Distraktionsreiz kommt es zur longitudinalen Ausrichtung des kollagenen Bindegewebes im Distractionsspalt. An den Fragmentenden reihen sich Osteoblasten an die kollagenen Fasern und bilden pyramidenförmig auf den Distractionsspalt zuwachsende Osteoidsäulen (Ilizarov 1990). Neben der Distraktionsrate ist die Distraktionsfrequenz, d.h. die Unterteilung der Distraktionsrate auf mehrere Teilschritte ein wichtiger Parameter für eine erfolgreiche Distraction. Eine Unterteilung der täglichen Distraktionsrate auf mehrere kleine Einzelschritte oder im Idealfall eine kontinuierliche Distraction verspricht bessere Ergebnisse (De Bastiani et al. 1987; Aldegheri et al. 1989; Ilizarov 1990). Bei kontinuierlicher Distraction bleibt der Dehnungsreiz auf das Gewebe im Distractionsspalt gleichmäßig erhalten und die Zellen werden kontinuierlich zur Proliferation angeregt.

In der sich an die Distraction anschließenden Konsolidierungsphase verknöchert der entstandene Kallus vollständig. Das Verhältnis von Distraktionszeit zu Konsolidierungszeit beträgt in etwa 1 zu 2 oder kleiner (Ilizarov 1990; Aronson und Shen 1994). Wie bei der Frakturheilung kommt es auch bei dem durch die Distraction entstandenen Geflechtknochen zum Umbau in lamellären Knochen mit anschließendem Remodelling.

Eine baldige physiologische Belastung der operierten Gliedmaße fördert eine schnelle Ossifikation des durch die Distraction entstandenen Kallusregenerats (Ilizarov 1990). Eine frühzeitige Belastung der operierten Gliedmaße und eine Steigerung bis zur Vollbelastung nach radiologisch nachgewiesener Durchbauung der Kortikalis wird deshalb klinisch empfohlen (Hankemeier et al. 2004).

Charakteristisch für die Distraktionsosteogenese ist die desmale Knochenneubildung an den Knochengrenzflächen, die jedoch in Reinform nur bei stabilen Fixateur-externe-Osteosynthesen und idealen Distraktionsbedingungen anzutreffen ist (Ilizarov 1989b; Aronson 1991; Fink et al. 2003). Die indirekte langsamere enchondrale Ossifikation ist vor

allem bei instabilen Osteosynthesen und ungeeigneter, zu hoher Distraktionsrate zu beobachten (Wiedemann 1994; Li et al. 1997; Li et al. 2000).

1.5 Ziel dieser Studie

Ziel dieser Studie ist es, das Phänomen der Knochenneubildung unter Gewebedehnung an einer dem Knochen aufgelegten und von ihm wegdistrahierten synthetischen Materialoberfläche zu erreichen. Die bisher angewandte laterale Distraction eines kortikalen Knochenstücks erfordert eine Kortikotomie oder Osteotomie. Dies bringt das Risiko einer Sequesterbildung aufgrund gestörter vaskulärer und nervaler Versorgung des Transportsegments mit sich. Auf eine Kortikotomie oder Osteotomie kann im vorliegenden Verfahren verzichtet werden. Bei dem neuen Konzept soll an der periostalen bzw. kortikalen Oberfläche Knochen appositionell gebildet werden.

Eine Distraktionsbehandlung mit einem synthetischen Implantat wäre eine vielversprechende Alternative zum Aufbau neuen Knochens. Durch das neue Verfahren könnten auch Knochendefekte, die nicht den gesamten Querschnitt des Knochens betreffen oder Knochendefekte an nicht röhrenförmigen Knochen behandelt werden. Die Durchführbarkeit des neuen Verfahrens sollte im Tierversuch evaluiert werden.

Insbesondere sollten in der vorliegenden Arbeit folgende Fragen beantwortet werden:

- Lässt sich Knochenaufbau durch laterale Distraction eines synthetischen Implantats von einer bestehenden Knochenoberfläche erreichen?
- Welches sind die geeigneten Versuchsparameter für die Distraction eines osteokonduktiven Implantats von der osteoinduktiven Knochenoberfläche?
- Lässt sich durch das neue Distraktionsverfahren mechanisch belastbarer und beständiger Knochen erzeugen?
- Welche gewebliche Zusammensetzung hat der Distraktionskallus und welche Art der Ossifikation ist zu beobachten?

2 Material und Methoden

Als Tiermodell für die Untersuchung der lateralen Distraction mittels einer HA-beschichteten Titanplatte wurde das Schaf gewählt. Eine HA-beschichtete Titanplatte wurde medial an die Kortikalis der rechten Tibia angelegt und mittels eines eigens dafür entwickelten Fixateur externe befestigt.

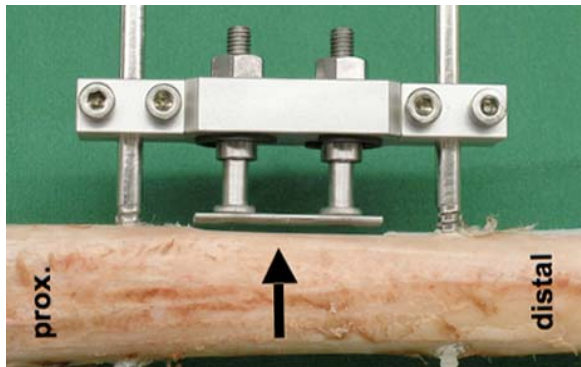


Abb. 4: Fixateur mit Titanplatte an explantierter Schafstibia. Der Pfeil gibt den Vektor der Distaktionsrichtung an.



Abb. 5: Mit Hydroxylapatit beschichtete Titanplatte.

Der Knochen unter der Auflagefläche der Membran wurde deperiostiert, plangefräst und anschließend mit kleinen Bohrungen in den Markraum versehen. Diese Bohrungen sollten eine Blutgefäßversorgung des Kallusregenerats aus den Markraumgefäßen ermöglichen. Nach einer Latenzzeit von zehn Tagen wurde bei den Tieren der Distaktionsgruppe die Titanplatte über einen Zeitraum von zehn Tagen zweimal täglich 0,27 mm vom Knochen weggezogen. Bei den Tieren der Kontrollgruppe wurde bei gleichem OP-Prozedere die Titanplatte direkt intra operationem auf 5,3 mm Abstand zum Knochen fixiert.

Nach Beendigung der Distraction und einer Konsolidierungszeit von 50 Tagen, also 10 Wochen p.op., wurden die Tiere getötet. Der entstandene Kallus wurde röntgenologisch, computertomographisch, biomechanisch und histologisch untersucht.

2.1 Tierversuch

2.1.1 Schafe

Der Tierversuch wurde vom zuständigen Regierungspräsidium in Tübingen gemäß Tierschutzgesetz in der Fassung der Bekanntmachung vom 25. Mai 1998 genehmigt (Reg.-Nr. 839, Genehmigung am 20.09.2005 und Reg.-Nr. 858, Genehmigung am 21.07.2006) und am Zentralen Tierforschungszentrum der Universität Ulm durchgeführt.

Es wurden 24 weibliche Bayerische Bergschafe operiert. Die Tiere wurden bereits vier Wochen vor Versuchsbeginn am Zentralen Tierforschungszentrum eingestallt. Durch die zeitige Einstallung sollte eine Gewöhnung an die neue Umgebung und die betreuenden Personen erreicht werden. Bei der Einstallung wurden die Tiere einer ausführlichen klinischen Untersuchung unterzogen, wobei vor allem auf Klauengesundheit, Eutergesundheit und Gesundheit des Atmungs- und Bewegungsapparates geachtet wurde. Die Tiere waren drei bis sieben Jahre alt, wobei Mittelwert und Standardabweichung der Zahnaltersbestimmung (Nickel et al. 1992) bei 5 ± 1 Jahren lag. Sie stammten alle aus der Zucht eines Schäfers aus der Ulmer Umgebung.

Das Gewicht der Tiere betrug zu Operationsbeginn $63,0 \pm 12,6$ kg.

2.1.2 Haltung und Fütterung

In den vier Wochen vor der Operation wurden die Tiere in Gruppen bis zu acht Tieren in Laufställen auf Holzspaltenboden gehalten. In der Zeit nach der Operation bis zum Versuchsende (Tötung zehn Wochen p.op.) wurden sie in Gruppen von zwei bis drei Tieren in 3 x 4 m großen Tiefstreuboxen auf Stroheinstreu gehalten. Die Tiere konnten sich jederzeit frei bewegen.

Die Fütterung bestand aus Heu ad libitum, Graspellets und ca. 0,2 kg pelletiertem Zucht- bzw. Haltungsfutter für kleine Klautiere (Altromin 0133[®], Altromin GmbH, Lage). Die Wasserversorgung wurde über Selbsttränken sichergestellt.

2.1.3 Gruppeneinteilung

Die Schafe wurden bei der Einstellung randomisiert in Gruppen eingeteilt.

Gruppe	Schafsnummern	Tierzahl/Gruppe zu Versuchsbeginn	Tierzahl/Gruppe zu Versuchsende
1. Distraction	761, 762, 763, 764, 765, 766, 774, 776, 778, 781, 782, 783	12	10
2. Kontrolle	767, 768, 769, 770, 771, 772, 773, 775, 777, 779	10	10
3. Zusatzversuch	784, 785	2	2
gesamt:		24	22

Zwei Schafe aus der Distractionsgruppe (Nr. 763 und Nr. 774) mussten aufgrund von postoperativen Frakturen der operierten Gliedmaße (siehe 3.1) aus dem Versuch genommen werden. Aufgrund dieser Ausfälle wurden zwei weitere Tiere operiert. Beide Hauptgruppen (Distraction und Kontrolle) gingen somit mit einer Anzahl von jeweils zehn Tieren in die Auswertung ein.

Um die Bedeutung der periostalen Reaktion bzw. der Bohrungen in den Markraum bei der Bildung des unter der Platte entstehenden Knochens genauer zu studieren, wurde eine kleine Zusatzstudie an zwei weiteren Schafen durchgeführt. Die beiden Schafe wurden nach dem Protokoll des Hauptversuchs operiert. Nur auf die den Markraum eröffnenden Bohrungen unter der Platte wurde verzichtet. Bei einem Schaf erfolgte die Distraction nach dem üblichen Protokoll, das andere Schaf wurde als Kontrolltier operiert, ohne Distractionsbehandlung.

2.1.4 Defektmodell und Osteosynthese

Für die Montage des Fixateurs wurde die mediale Fläche (Facies medialis) der intakten Tibia des rechten Hinterbeines gewählt. Diese Lokalisation zeichnet sich durch eine nur leicht konvexe Oberfläche aus, was das Auflegen der Titanplatte relativ einfach macht. Der Knochen ist an dieser Stelle zudem kaum von Muskeln, sondern nur von Haut und Unterhaut bedeckt. Der Fixateur (Abb. 4) ist eine Eigenkonstruktion des Instituts und wurde in der zentralen Werkstatt der Universität Ulm gefertigt. Er wurde mit zwei Schanz-Schrauben im

Knochen verankert. Die proximale Schraube wurde ca. 1 cm proximal des distalen Endes der gut durch die Haut tastbaren Tuberositas Tibiae angebracht. Die Bohrung für die distale Schanz-Schraube erfolgte ca. in der Mitte der Diaphyse.

Zur Übertragung der Distraktionsreize wurde eine mit Hydroxylapatit beschichtete Titanplatte mit rauher Oberfläche gewählt (Abb. 5). Die osteokonduktive Beschichtung sollte eine Anlagerung von Knochenzellen an das Implantat ohne bindegewebige Zwischenschicht fördern (Soballe 1993; Ducheyne und Qiu 1999). Die Platte wurde über zwei Gewindebolzen (metrisches Gewinde M5 mit einer Steigung von 0,8 mm) an den verstellbaren Muttern des Fixateurs angebracht. Die Feststellmutter konnten jeweils über eine kleine Inbusschraube in ihrer Stellung fixiert werden.

2.1.5 Versuchsablauf

2.1.5.1 Anästhesie und Operationsvorbereitung

Die Tiere fasteten präoperativ für 48 Stunden bei freiem Zugang zu Trinkwasser. Durch die zweitägige Fastenperiode kann das Risiko einer durch die Intubation ausgelösten Regurgitation und Aspiration von Panseninhalt minimiert werden.

Zur Prämedikation wurde den Tieren 0,2 mg/kg KGW Xylazin (Rompun[®] 2%ig; Firma Bayer, Leverkusen) und 0,05 mg/kg KGW Atropin (Atropinsulfat 0,5 mg; Firma Braun, Melsungen) jeweils subkutan an der seitlichen Brustwand injiziert. Nach einer Wartezeit von 10 bis 15 Minuten wurde ein Venenverweilkatheter (Vasofix Braunüle 20 G ¼; Firma Braun, Melsungen) wahlweise in die Vena auricularis intermedia oder die Vena auricularis lateralis gelegt und mit Leukoplast[®]-Tape (Leukoplast[®]hospital; BSN medical GmbH, Hamburg) an der Ohrmuschel fixiert.

Die Narkoseeinleitung erfolgte durch intravenöse Injektion von Thiopental-Natrium (Trapanal[®], 2,5 g; Firma Byk Gulden, Konstanz) in einer Dosis von 5–7 mg/kg KGW nach Wirkung über die katheterisierte Ohrvene. Die Tiere wurden mit einem Tubus der Größe Nr. 9 intubiert. Die Inhalationsnarkose wurde mit 3 % Isofluran eingeleitet und mit 1–2 % Isofluran in der Atemluft bei Spontanatmung und Kontrolle der Kreislaufparameter aufrechterhalten. Um ein Aufgasen des Pansens zu verhindern, wurde den Tieren eine Nasenschlundsonde eingeführt. Die rechte Hintergliedmaße wurde geschoren, mit Wundbenzin entfettet, mit einer Alkohol-Seifenlösung gewaschen und mit 70 %igem Alkohol desinfiziert. Nach sorgfältigem Abtrocknen erfolgte eine zweite Desinfektion mit Sterilium[®] (Firma Bode Chemie, Hamburg).

Die Tiere wurden in Rückenlage mit ausgebundenen Gliedmaßen auf dem OP-Tisch fixiert. Die zu operierende rechte Hintergliedmaße blieb frei und wurde mit speziellen Kissen unterpolstert. Nach Abschluss der Lagerung und Fixierung des Tieres wurde das OP-Feld nochmals mit 70 %igem Alkohol (Kodan[®]-Spray) desinfiziert. Die Tiere wurden mit mehreren Lagen von sterilen Tüchern abgedeckt. Nur der Kopfbereich und das Operationsfeld blieben frei.

Zur intraoperativen Analgesie wurde den Tieren 4 mg/kg KGW Carprofen (Rimadyl[®]; Pfizer GmbH, Karlsruhe) kurz vor dem Hautschnitt subkutan injiziert. Durch eine subkutane Injektion von 10 mg/kg KGW Amoxicillin (Amoxicillin 15 % WDT[®]; WDT, Garbsen) wurden die Tiere antibiotisch versorgt.

2.1.5.2 Operatives Vorgehen

Der ca. 10 cm lange Hautschnitt erfolgte als Längsschnitt in proximodistaler Richtung an der medialen Fläche (Facies medialis) der intakten Tibia. Der Schnitt wurde ca. 2 cm proximal der Crista tibiae angesetzt und in distaler Richtung entlang der Diaphyse fortgeführt. Nach dem Hautschnitt wurden die Unterhautschichten vorsichtig durchtrennt, bis das Periost darstellbar war. Die Bohrung für die proximale Schanz-Schraube erfolgte ca. 1 cm proximal des distalen Endes der Crista tibiae. Mit der am Montagefixateur befestigten Bohrlehre wurde unter Spülung mit physiologischer Kochsalzlösung eine bikortikale Bohrung mit einem Durchmesser von 3,5 mm für die proximale Schanz-Schraube angebracht. Nach der Vermessung des Bohrkanals wurde die proximale Schanz-Schraube (\varnothing 5 mm) in den Knochen eingedreht.

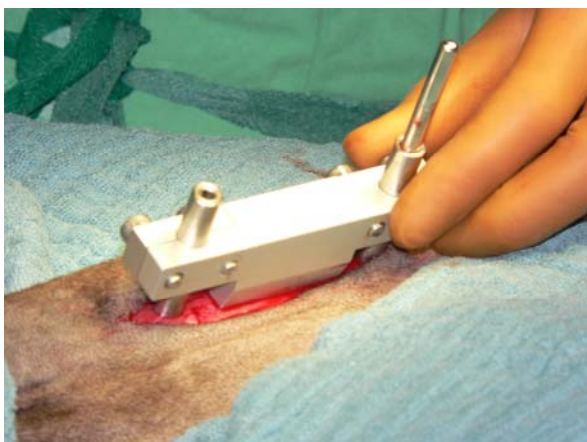


Abb. 6: Montagefixateur zum Setzen der Schanz-Schrauben und zur Fensterung des Periosts.



Abb. 7: Zustand nach Entfernung des Periosts an der Plattenauflagefläche.

An der vorgesehenen Auflagefläche der Titanplatte wurde das Periost mit einem Skalpell entfernt. Als Schablone diente ein Stempel am Montagefixateur (Abb. 6), dessen Abmessungen der Fläche der Membran (1 x 3,5 cm) entsprachen. Nach der Bohrung und dem Einsetzen der distalen Schanz-Schraube wurde der Montagefixateur entfernt (Abb. 7). Um ein festes Aufliegen der Membran zu ermöglichen, wurde die Knochenoberfläche plangefräst. Dazu wurde eine speziell gefertigte Lehre am Knochen montiert (Abb. 8). Der Knochen wurde unter Kühlung mit physiologischer Kochsalzlösung durch eine spezielle Stirnfräse plangefräst.



Abb. 8: Frätlehre und Zustand nach Fräsen der ersten Bahn mit der Stirnfräse.

Die beim Fräsen entstandenen Knochenspäne wurden durch Spülung sorgfältig entfernt. Nach dem Abmontieren der Frätlehre wurde eine ebenfalls im Institut angefertigte Bohrlehre für 22 kleine Bohrungen in den Markraum (\varnothing 1,1 mm) an den Schanz-Schrauben befestigt (Abb. 9). Die 1,1-mm-Bohrungen wurden ebenfalls unter NaCl-Kühlung durchgeführt (Abb. 10). Die Eröffnung des Markraums mittels der kleinen Bohrungen sollte eine Blutgefäßversorgung des Kallusregenerats über das medulläre Gefäßsystem ermöglichen.

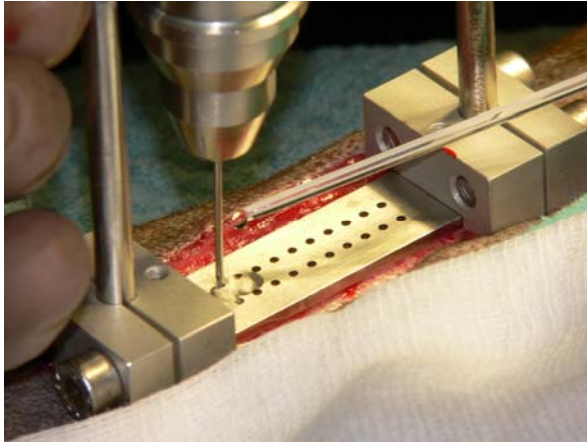


Abb. 9: Bohrung der 22 den Markraum eröffnenden Löcher mittels spezieller Bohrlehre.

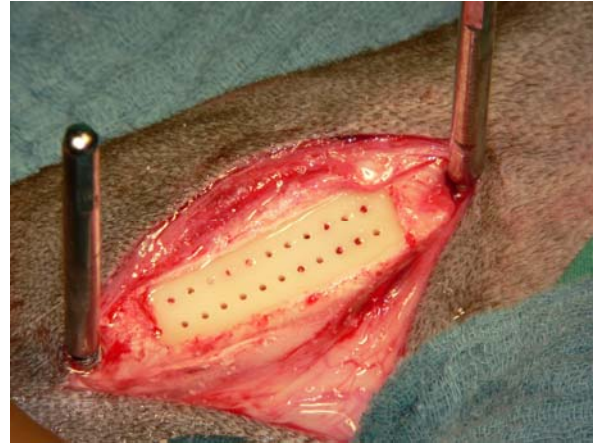


Abb. 10: Zustand nach Bohrung.

Nach Entfernen der Bohrlehre wurde die HA-beschichtete Titanplatte auf die am Knochen vorgesehene Fläche aufgelegt und mittels spezieller Klemmbacken an den Schanz-Schrauben befestigt (Abb. 11). Das Vernähen der Unterhaut erfolgte mit Einzelknopflehten in zwei Schichten. Als Nahtmaterial wurde hierfür Vicryl® 2-0 (Fa. Ethicon, Norderstedt) verwendet. Die Haut wurde mit Resolon® 3-0 (Fa. Resorba, Nürnberg) ebenfalls durch Einzelknopflehte adaptiert (Abb. 12).

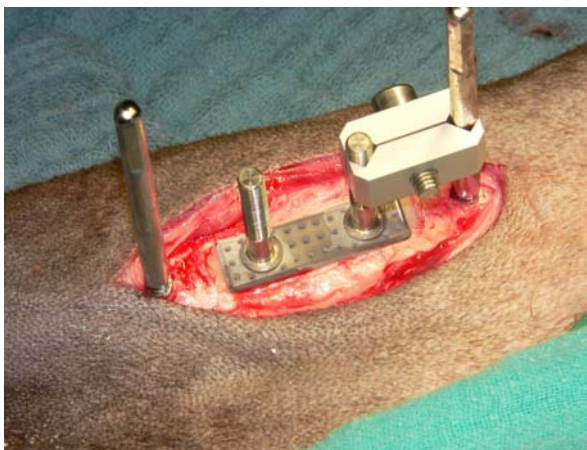


Abb. 11: Temporäre Fixation der Titanplatte am Knochen mittels spezieller Klemmbacken.

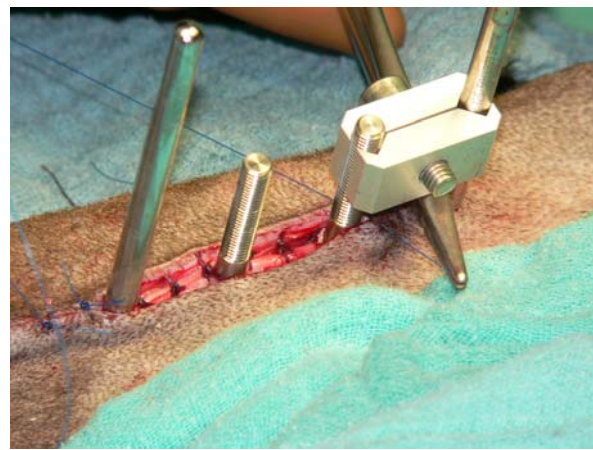


Abb. 12: Hautnaht nach bereits abgeschlossener Unterhautnaht.

Jetzt wurde der eigentliche Fixateur angelegt und die Titanplatte an ihm fixiert. Um sicherzustellen, dass die Platte dem Knochen gut auflag, wurde sie über zwei Einstellmuttern am Fixateur bis zum Auftreten von Widerstand an den Knochen angedreht und in dieser Position fixiert (Abb. 13).

Bei den Tieren der Kontrollgruppe wurde die Titanplatte schon intra operationem in einem Abstand von 5,4 mm zum Knochen fixiert (Abb. 14). Dieser Abstand entsprach der Distraktionsdistanz, die in der Distraktionsgruppe nach Beendigung der Distraktion erreicht wurde. Die überstehenden Enden der Schanz-Schrauben wurden mit einem Seitenschneider gekappt (Abb. 13).

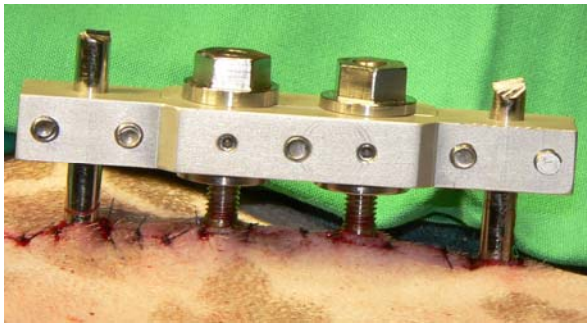


Abb. 13: Distraktionsgruppe, Zustand nach Anbringen des Fixateurs am Ende der OP.

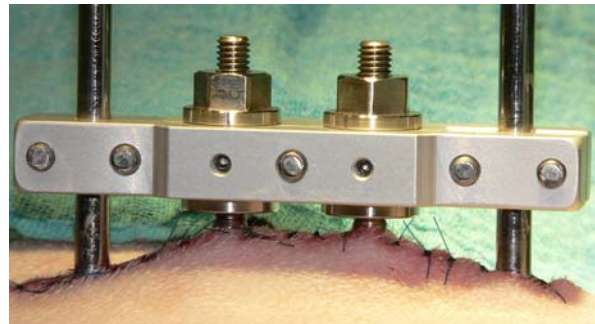


Abb. 14: Kontrollgruppe, Zustand nach Anbringen des Fixateurs und Einstellung des 5,4 mm Abstandes der Titanplatte.

Postoperative Versorgung

Die operierte Gliedmaße wurde nach sorgfältiger Reinigung des OP-Feldes im Bereich des Fixateurs verbunden. Die Hautdurchtrittsstellen der Schrauben des Fixateurs und der Gewindestangen der Platte wurden zur Aufnahme des austretenden Wundsekrets mit einer Vliesstoffkomresse (Nobatop[®]; Noba Verbandmaterial Danz GmbH, Wetter) umwickelt. Die Tibia wurde durch eine Polsterbinde (Rolta[®]; Hartmann AG, Herbrechtingen) geschützt. Der Polsterverband wurde durch einen Strumpfverband (Stülpa[®]; 4R, Fa. Hartmann, Heidenheim) fixiert.

Bei nachlassender Narkosetiefe wurden die Tiere in Seitenlage gelegt und die Pansensonde wurde entfernt. Nach der Extubation wurden die Tiere in eine mit Stroh eingestreute Box verbracht. Um ein kontrolliertes Aufstehen sicherzustellen, blieben die Tiere zunächst unter Aufsicht.

In den ersten drei postoperativen Tagen wurde den Schafen 10 mg/kg KGW Amoxicillin (Amoxicillin 15 % WDT; WDT, Garbsen) zur Infektionsprophylaxe und 4 mg/kg KGW Carprofen (Rimadyl[®]; Pfizer GmbH, Karlsruhe) zur Analgesie subkutan injiziert.

2.1.5.3 Pflege der Tiere

Über die gesamte Dauer des Versuchs erfolgte täglich eine Wundkontrolle und Wundpflege sowie eine Kontrolle der rektalen Körpertemperatur und des Allgemeinbefindens. Zur Wundpflege und Desinfektion wurde ein alkoholisches Hautantiseptikum (FrekaDerm®; Fa. Fresenius, Bad Homburg) verwendet. Um Pininfektionen zu vermeiden wurde besonders auf eine gründliche Desinfektion der Hautdurchtrittsstellen der Schanz-Schrauben und der Gewindestangen der Titanplatte geachtet.

2.1.5.4 Latenzperiode, Distraction, Konsolidierungszeit

Als postoperative Latenzzeit bis zum Beginn der Distraction wurde eine Zeitspanne von zehn Tagen gewählt. Danach wurde bei den Tieren der Distractiongruppe über zehn Tage zweimal täglich je 0,266 mm distrahiert. Zur Distraction über die Einstellmuttern wurde ein spezieller, mit Markierungen (eine Markierung = 0,266 mm) versehener Schlüssel verwendet. Aus diesem Vorgehen resultierte nach zehn Tagen ein Abstand von 5,4 mm zwischen Titanplatte und Knochen. Die Zahl von 0,266 mm ergab sich durch die Verwendung eines metrischen Gewindes M5 mit einer Steigung von 0,8 mm. Pro Tag wurde das Gewinde um 240° weitergedreht.

An die Distraction schloss sich eine Konsolidierungszeit des gebildeten Kallus von 50 Tagen an, die 10 Wochen p.op. beendet war.

2.1.5.5 Fluoreszenzmarkierung und Röntgen

Um die Knochenneubildung zu verschiedenen Zeitpunkten beurteilen zu können, erfolgte eine Markierung des neu gebildeten Knochens durch Fluoreszenzfarbstoffe. Die Farbstoffe wurden den Tieren über die Vena jugularis injiziert. Durch Gabe von Calceingrün (10 mg/kg KGW, i.v.) am Ende der Distraction (Tag 20 p.op.) und von Tetrazyklin (25 mg/kg KGW, i.v.) zehn Tage nach Distractionsende (Tag 30) konnte die Knochenneubildung zu den jeweiligen Injektionszeitpunkten ermittelt werden. Die Fluoreszenzfarbstoffe lagern sich in den ersten zwei bis drei Tagen nach der Injektion in neu mineralisiertes Gewebe ein und ermöglichen später im histologischen Schnitt einen Nachweis der Mineralisationsfront zum gewählten Injektionszeitpunkt.

Mit einem portablen Röntgengerät (AJEX 140 H; AJEX Meditech Ltd., South-Korea) wurden Röntgenaufnahmen vom Kallusbereich im antero-posterioren Strahlengang am liegenden

Schaf angefertigt. Für die Aufnahmen wurden standardisiert die Einstellungen Spannung 56 kV, Stromstärke 2,0 mAs, Belichtungszeit 0,05 s und ein Fokus-Film-Abstand von 100 cm gewählt. Auf den Aufnahmen waren nach vier Wochen bereits Hinweise auf eine Knochenneubildung zu erkennen. Neben postoperativen Kontrollaufnahmen wurde eine Aufnahme vier Wochen nach Ende der Distraktionsbehandlung angefertigt, eine weitere eine Woche vor der Tötung, also neun Wochen p.op.

2.1.5.6 Tötung

Die Tötung der Tiere erfolgte zehn Wochen p.op. durch Entbluten nach vorausgegangener Bolzenschussbetäubung.

2.2 Postmortale Aufarbeitung der Proben

2.2.1 Präparation und Röntgen

Die Tibiae wurden explantiert und Haut und Muskeln abpräpariert. Mit Ausnahme des Gewebes zwischen Titanplatte und Knochen wurde alles dem Knochen anliegende Gewebe vorsichtig abgetragen. Die präparierte Tibia wurde vor der Entfernung des Fixateurs fotografiert (Olympus Digitalkamera C-5060; Olympus Corporation, Japan). Im gleichen Zustand wurde im Faxitron-Tischröntgengerät (Faxitron 43805N X-Raysystem; Fa. Hewlett-Packard, USA) eine Kontaktröntgenaufnahme im antero-posterioren Strahlengang bei Spannungen von 30 kV bzw. 45 kV und einer Belichtungszeit von 5 Minuten angefertigt. Anschließend wurden der Fixateur abmontiert und die Schanz-Schrauben entfernt. Zur Entfernung der Titanplatte unter Loslösung der knöchernen und bindegewebigen Strukturen an der Plattenunterseite wurde ein Skalpell verwendet. Die Tibiae wurden proximal und distal der Kallusfläche auf Höhe der entfernten Schanz-Schrauben durch eine Querosteotomie abgesägt und anschließend einer peripheren quantitativen Computertomographie (pQCT) unterzogen.

2.2.2 Periphere quantitative Computertomographie (pQCT)

Anhand der peripheren quantitativen Computertomographie (pQCT) lässt sich die Mineraldichte des Knochengewebes bestimmen. Zusätzlich erhält man Informationen über die strukturellen Eigenschaften der Knochenprobe.

Zur Bestimmung der Parameter Kallusdichte (BMD = bone mineral density) und Kallusvolumen, wurde ein peripher quantitativer Computertomograph (XCT 960A; Fa. Stratec Medizintechnik, Pforzheim) verwendet. Anhand hochauflösender CT-Schnitte mit einer Voxelgröße von $0,295 \times 0,295 \times 1$ mm konnten die Zielparameter bestimmt werden.

An einem Standardphantom aus Hydroxylapatit (Phantom 0.495, Nr. 91068) wurde täglich eine Referenzmessung zur Kalibrierung des Geräts durchgeführt. Die Abweichungen der einzelnen Referenzmessungen lagen bei unter 3 %. Der Knochen wurde nach dem Entfernen der Titanplatte mit der Kallusfläche nach oben auf die als Probenhalterung dienende Acrylglasschiene eingespannt (Abb. 15).



Abb. 15: CT-Röhre mit zentriertem Präparat auf der Justierschiene.

Das Tibiastück wurde zentral im Scanschacht positioniert. Als Startpunkt für den anfänglichen 30 mm langen Übersichtsscan („Scoutview“) wurde das distale Ende der Kallusfläche gewählt. Der Übersichtsscan bestand aus 15 Horizontalschnitten mit einer Schichtdicke von 1 mm und einem Abstand von 1 mm. Anhand der farbcodierten Rasteraufnahme des zweidimensionalen Scoutviews wurde die Position der eigentlichen Querschnitte manuell festgelegt. Zur Bestimmung der BMD wurden 3 Querschnitte im Abstand von je 0,5 cm angefertigt, wobei der mittlere Querschnitt in der Mitte des Übersichtsscans (bei 15 mm) positioniert wurde.

Mittels der zum Gerät gehörenden Auswertungssoftware (Version 5.20) wurden die einzelnen Schnitte ausgewertet. Die Auswertung erfolgte bei zwei unterschiedlichen Schwellwerten. Der Schwellwert gibt dem Rechner vor, ab welchem Schwächungskoeffizienten die erhaltenen Bildpunkte als Objekt zu werten sind. Bildpunkte, deren Schwächungskoeffizient unter dem angegebenen Schwellwert liegt, werden als Umgebung (Hintergrund) gewertet und gehen nicht in die Auswertung mit ein. In einer ersten Auswertung wurde ein Schwellwert von 0,2 (1/cm) gewählt, der auch Gewebeanteile von bindegewebiger Dichte in die

Auswertung einschloss und somit die durchschnittliche Dichte des zwischen Titanplatte und Knochen befindlichen Gewebes angab. In einer zweiten Auswertung wurde ein Schwellwert von $0,45 \text{ (1/cm)}$ gewählt. Hier wurden alle knöchernen Strukturen mit einer Dichte von mehr als 218 mg/cm^3 bestimmt. Dieser zweite Schwellwert gibt Aufschluss über die Dichte und den Volumenanteil der kalzifizierten Kallusanteile zwischen Titanplatte und Knochen.

Für jeden der 3 Schnitte wurden zwei verschieden große rechteckige Auswertungsfenster, auch „region of interest“ (ROI) genannt, festgelegt und als $\text{ROI}_{\text{klein}}$ und $\text{ROI}_{\text{groß}}$ bezeichnet. Der $\text{ROI}_{\text{klein}}$ beinhaltet genau die Fläche zwischen Titanplatte und Kortikalis ($5,3 \times 10 \text{ mm}$). Der $\text{ROI}_{\text{groß}}$ schloss auch die in der Distraktionsgruppe seitlich der Titanplatte entstandenen Knochenzapfen mit ein. Als laterale Begrenzung wurden die durch das Fräsen entstandenen Kortikaliskanten gewählt. Der $\text{ROI}_{\text{groß}}$ entspricht somit dem tatsächlichen Gewebezugewinn ausgehend von der ursprünglichen kortikalen Oberfläche des Knochens (Abb. 16).

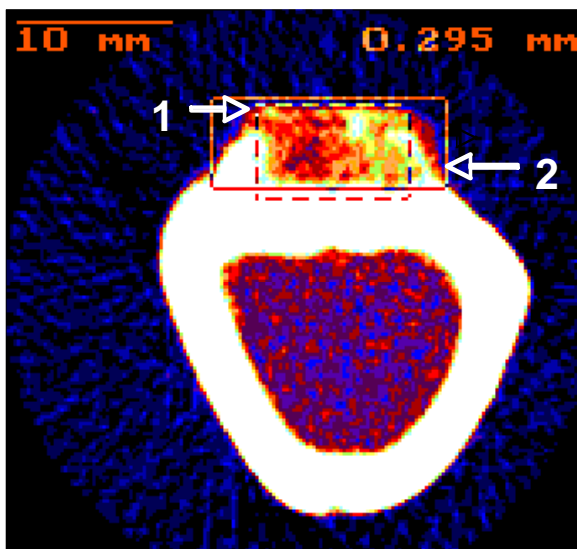


Abb. 16: Darstellung der beiden für die Auswertung herangezogenen ROIs („regions of interest“) an einem Querschnitt durch Tibia und Kallus.

- 1 = $\text{ROI}_{\text{klein}}$ (gestrichelt)
- 2 = $\text{ROI}_{\text{groß}}$

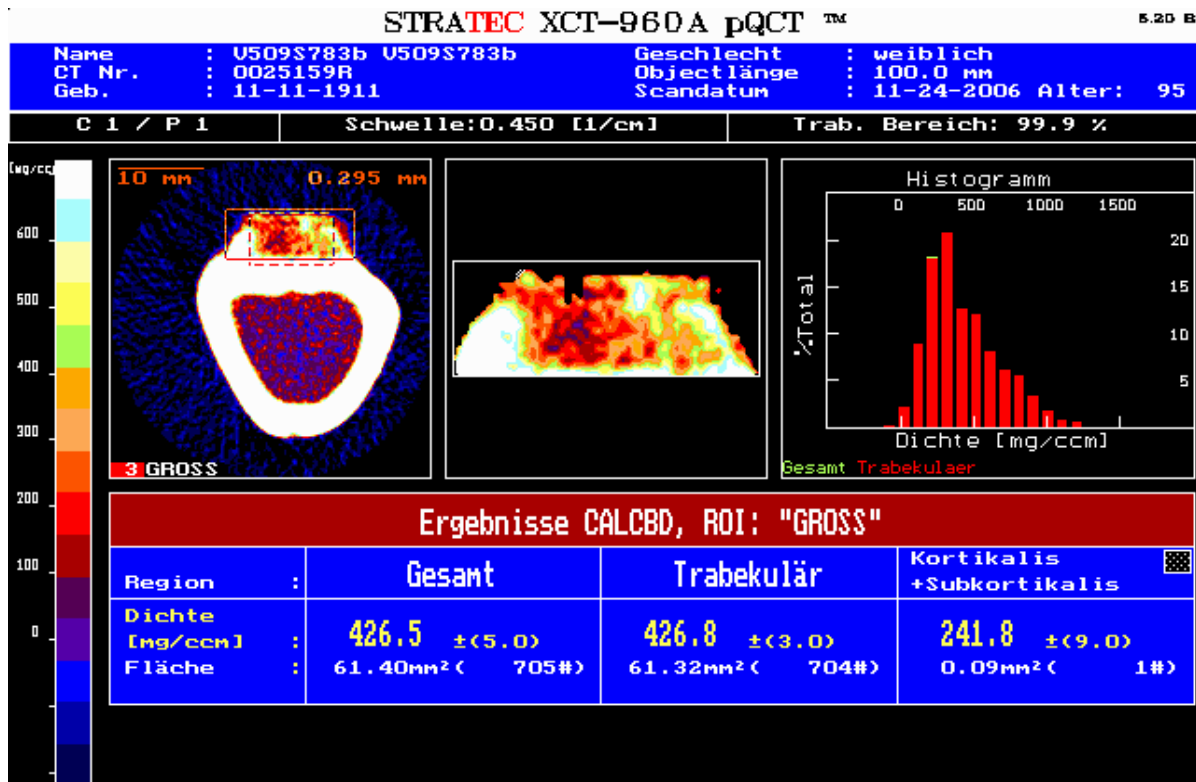


Abb. 17: Bildschirmfoto der Auswertung eines p-QCT-Schnittes für den ROI_{groß}.

Für jeden Schnitt wurden manuell die rechteckigen ROIs festgelegt. Anhand eines durch die Auswertesoftware erstellten Histogramms (Abb. 17) konnte die Grenze zwischen Kortikalis und Kallus genau ermittelt werden, was einen Ausschluss kortikaler Anteile aus dem ROI ermöglichte. Um die Grenze festzulegen wurde bei jedem Schaf die durchschnittliche Dichte der intakten tibialen Kortikalis bestimmt. Für jeden ROI errechnete die Auswertungssoftware automatisch die Gesamtdichte in mg/cm^3 und die Gesamtfläche in mm^2 . Aufgrund der Tatsache, dass die Schichtdicke der CT-Schnitte 1 mm beträgt, konnten die Flächenanteile direkt in Volumenanteile umgerechnet werden.

2.2.3 Zerteilung der Knochenprobe

Anschließend erfolgte eine weitere Zerteilung der Knochenprobe mittels einer Diamantbandsäge (Fa. PSI-Grünwald-Exakt, Laudenbach) (Abb. 18).

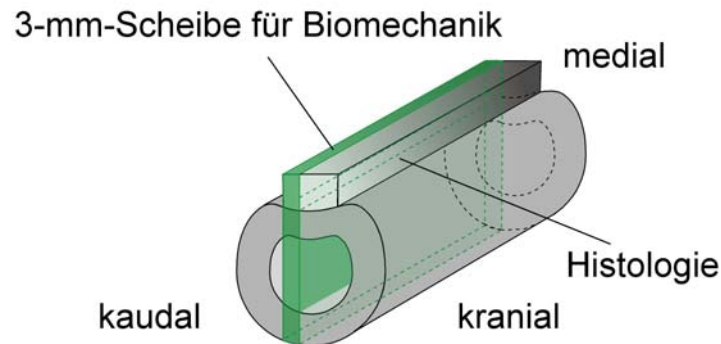


Abb. 18: Schneideschema zur Herstellung der Knochenscheibe (grün) aus der kaudalen Kallushälfte für den biomechanischen Test. Der kraniale Rest wurde für die Histologie verwendet.

Zunächst wurde die Knochenprobe ein wenig kaudal der Mitte des Kallusbereichs durch einen Längsschnitt in eine kaudale und eine kraniale Hälfte zerteilt (Abb. 18).

Nach diesem Längsschnitt wurde der kraniale Teil für die Histologie asserviert.

Am kaudalen Teil wurde mit einem feinen Schleifpapier vorsichtig der Knochen abgetragen. Ziel war es, die kaudale Lochreihe der Bohrungen in den Markraum genau mittig zu treffen. Ausgehend von den Bohrlöchern wurde mit der Diamantbandsäge (Fa. PSI-Grünwald-Exakt, Laudenbach) eine 3 mm dicke Knochenscheibe für die biomechanische Testung aus dem kaudalen Kallusbereich herausgesägt.

Während der gesamten Präparation und während der folgenden Untersuchungen wurden die Präparate mit 0,9 %iger Kochsalzlösung feucht gehalten.

2.2.4 Biomechanik (Eindrücktests)

Die Qualität und mechanische Belastbarkeit des Kallusgewebes wurde an einer Materialprüfmaschine (Mod. Z010; Fa. Zwick, Ulm) getestet.

Dazu wurden Eindrücktests an einem 3 mm dicken Kalluslängsschnitt durchgeführt. Der Kalluslängsschnitt wurde am Tag der Tötung nach dem Schneideschema aus Abb. 18 gewonnen und geröntgt. Anschließend wurde der Längsschnitt bei -20 °C tiefgefroren. Die Proben wurden am Tag der biomechanischen Testung in NaCl aufgetaut und anschließend mittels zweier Klemmbacken auf einer Lochplatte der Prüfmaschine fixiert und getestet (Abb. 19, Abb. 20).

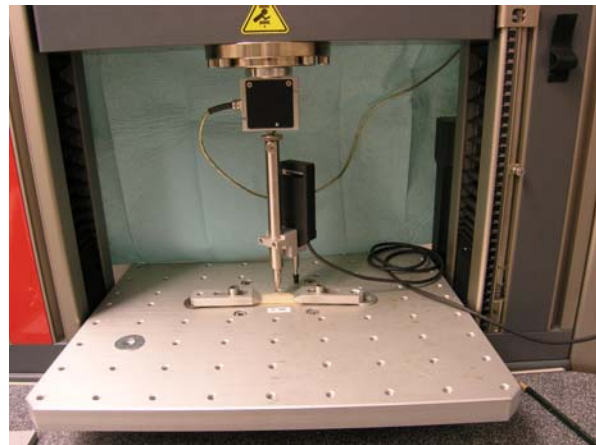
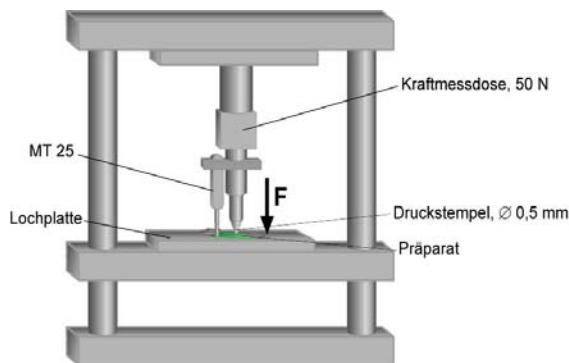


Abb. 19: Schematische Darstellung des Versuchsaufbaus. F = einwirkende Kraft; MT 25 = Messtaster 25.

Abb. 20: Bildliche Darstellung des Versuchsaufbaus.

Ermittelt wurde anhand einer Kraft-Weg-Kurve die Steifigkeit (Abb. 21) der verschiedenen Areale des Kallusgewebes. Es wurden verschiedene Druckpunkte festgelegt. Mit einem Druckstempel ($\varnothing 0,5\text{ mm}$) wurde an diesen Punkten zerstörungsfrei getestet. Die aufzuwendende Kraft wurde anhand einer 50-N-Messdose ermittelt. Mit einem Messtaster (Heidenhain MT 25; Firma Heidenhain, Traunreut) wurde der Weg gemessen. Die Vorkraft betrug $0,2\text{ N}$. Als Maximalkraft und Abbruchkriterium der Messung wurden 30 N festgelegt.

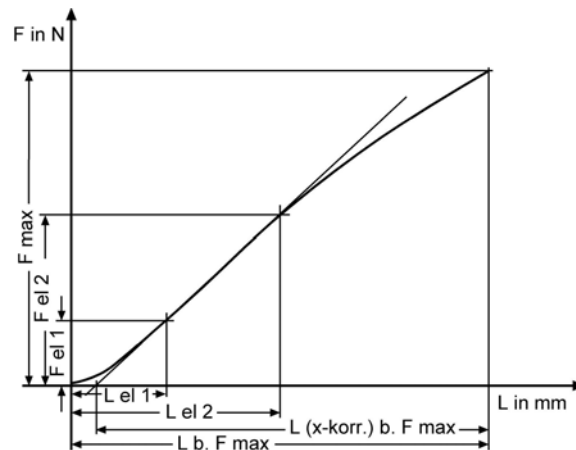


Abb. 21: Kraft-Weg-Kurve zur Ermittlung der Steifigkeit des Materials aus der Steigung der Kurve.

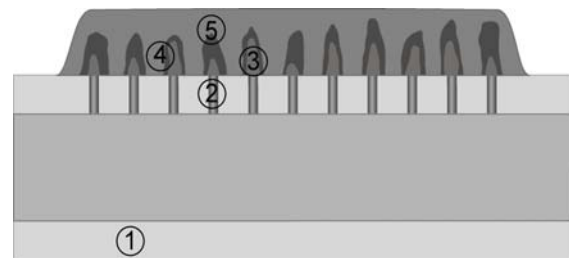
$$\text{Steigung} = \frac{(F_{el2} [N] - F_{el1} [N])}{(L_{el2} [mm] - L_{el1} [mm])}$$

Für die biomechanische Testung wurden für die Distraktionsgruppe 5 Druckpunkte festgelegt. Zuerst erfolgte eine Messung der Steifigkeit der Kortikalis auf der dem Kallus abgewandten Seite der Tibia als Referenzwert. Anschließend wurde die Steifigkeit des neu gebildeten Knochens in den Bohrlöchern und an drei unterschiedlichen Punkten der entstandenen Kalluszapfen ermittelt (Abb. 22).

Abb. 22: Kalluslängsschnitt (3 mm dick).

Druckpunkte Distraktionsgruppe:

1. auf der Gegenkortikalis als Referenzwert
2. zentral in den gut angeschnittenen Bohrlöchern
3. zentral in den entstandenen Kalluszapfen, ca. 1mm über der Kortikalis
4. im Randbereich dieser Kalluszapfen, ebenfalls knapp über der Kortikalis
5. zentral im Spitzenbereich der entstandenen Kalluszapfen (Variation je nach Zapfenlänge)



Die Druckpunkte 1 und 2 wurden in der Kontrollgruppe ebenfalls ermittelt. Da hier keine regelmäßige Kallusformation zu beobachten war, wurden standardisiert drei weitere Druckpunkte im Abstand von 1, 2, und 3 mm zur Kortikalis getestet, um einen durchschnittlichen Steifigkeitswert in Abhängigkeit zum Abstand zur Kortikalis zu erhalten.

2.2.5 μ -CT

Nach der biomechanischen Testung wurde exemplarisch bei einem Teil der Knochenproben eine Mikro-Computertomographie durchgeführt, um die genaue Struktur des Kallusgewebes bildlich darzustellen. Für die μ -CT-Analyse stand ein Stratec Fan-Beam- μ -Scope (Fa. Stratec Medizintechnik, Pforzheim) mit der dazugehörigen Auswertesoftware (Version 2.10) zur Verfügung.

Proben aus dem Kallus wurden in einem mit Alkohol gefüllten Eppendorf-Gefäß in die Probenhalterung des CT-Geräts eingespannt. Es wurde jeweils die gesamte kaudale Lochreihe der Bohrungen in den Markraum ausgewertet. Anfangs wurde ein Übersichtsscan mit einer Auflösung von 30 μ m erstellt. Die Position der ca. 1100 CT-Schnitte wurde anschließend manuell festgelegt. Die eigentlichen Querschnitte wurden bei einer Auflösung von 29 μ m und einer Schnittdicke von ebenfalls 29 μ m angefertigt. Die zweidimensionalen Querschnitte wurden mit Hilfe der Software VG Studio Max 1.0[®] (Fa. Volume Graphics GmbH, Heidelberg) zum dreidimensionalen Gesamtbild zusammengefügt. Am dreidimensionalen Bild konnte die Struktur des Kallusgewebes auf Höhe der kaudalen Bohrlochreihe und die Struktur des Kallus im Randbereich der Titanplatte an der periostalen Schnittkante beurteilt werden.

2.2.6 Histologie

2.2.6.1 Herstellung der Dünnschliffpräparate

Die Herstellung der histologischen Präparate erfolgte durch die Trenn-Dünnschliff-Technik nach Prof. Donath am unentkalkten Knochen. Die Knochenstücke wurden anhand eines projektspezifischen Schneideschemas (Abb. 18) noch im unfixierten Zustand an einer Diamantbandsäge (Fa. PSI-Grünwald-Exakt, Laudenbach) zersägt. Nach einem Längsschnitt durch die Mitte des Kallusbereichs wurde der gesamte kraniale Teil einschließlich der kranialen Bohrlochreihe für die Histologie verwendet. Die für die Histologie vorgesehenen Proben wurden nach der Präparation in einer abgepufferten, neutralen, 4 %igen Formaldehydlösung über 3 bis 5 Tage unter Lichtausschluss fixiert. Danach wurden die formalinfixierten Präparate über 3 Stunden unter lauwarmem Wasser formalinfrei gespült und anschließend entwässert. Die Entwässerung der Präparate erfolgte in der aufsteigenden Alkoholreihe. Dafür wurde vergälltes Ethanol (40 %, 70 %, 80 %, 90 %, 96 % und 3x 100 %) verwendet. Schließlich wurden die Proben mit Xylol entfettet. Als Einbettmedium zur

Kunststoffinfiltration und Aushärtung wurde ein Methylmethacrylat-Monomer (Fa. Röhm, Darmstadt) verwendet.

2.2.6.2 Schnittebenen der Dünnschliffpräparate

Wie oben bereits beschrieben, wurde nach longitudinalem Längsschnitt durch den Kallusbereich der Tibia der kraniale Teil für die histologische Auswertung verwendet. Um eine standardisierte quantitative histologische Auswertung zu ermöglichen, wurde als Schnittebene die kraniale Bohrlochreihe gewählt. Nach Vorschleifen bis auf Höhe der Bohrlochreihe wurde der PMMA-Block (PMMA = Polymethylmethacrylat) auf einen Objektträger aufgeklebt. Anschließend wurde mit der Diamantbandsäge eine ca. 200 µm dicke Scheibe gewonnen. Dann erfolgte eine Reduzierung der Schnittdicke auf ca. 70 µm mit der Tischschleifmaschine (T6250/1; Fa. Jean Wirtz Hahn & Kolb, Stuttgart). Die Schnittdicke wurde während des Schleifvorgangs wiederholt mit einer Digital-Messschraube kontrolliert. Mit einem Mikroschleifsystem (Fa. PSI-Grünwald-Exakt, Laudenbach) wurde die für die histologische Untersuchung relevante Oberfläche so lange angeschliffen, bis die Oberfläche des Gewebeblocks glänzend und gut sichtbar dargestellt werden konnte. Abschließend wurden beide Seiten des Objektträgers mit einer Polierscheibe poliert.

2.2.6.3 Paragon-Färbung

Als Färbung für die anschließende Gewebedifferenzierung wurde die Paragon-Färbung gewählt. Dazu wurde eine selbst hergestellte Farbstoffmischung benutzt (Tabelle 1).

Tabelle 1: Reagenzien für die Paragon-Färbung.

Reagenz	Hersteller	Artikelnummer
Ethanol, absolut p.a.	Merck	Art.-Nr. 1.00983
Ameisensäure p.a.	Merck	Art.-Nr. 1.00264
Ethanol vergällt 99,8 %	Hausapotheke	Fassware
Toluidinblau O	Chroma	Art.-Nr. 1 B 481
Bas. Fuchsin	Chroma	Art.-Nr. 1 A 308
VLC 7200	PSI Grünwald	Art.-Nr. 5100

In der Paragon-Färbung stellen sich bei einem pH von 10 Zellkerne und basophiles Zytoplasma blau dar, ebenso Osteoidsäume und Weichgewebe. Mineralisierte Matrix stellt sich je nach Mineralisierungsgrad ungefärbt bzw. zartrosa bis rot-violett dar.

2.2.6.4 Gewebedifferenzierung (quantitativ, qualitativ)

Ziel der Gewebedifferenzierung war es, die gewebliche Zusammensetzung des Kallusgewebes sowohl qualitativ als auch quantitativ zu erfassen.

2.2.6.4.1 Qualitative Auswertung

Bei der qualitativen Auswertung wurde der Kallusbereich bei verschiedenen Vergrößerungen unter dem Durchlichtmikroskop (Axiophot[®]; Fa. Zeiss, Oberkochen) untersucht und deskriptiv für verschiedene Fragestellungen bewertet. Das Augenmerk galt hier vor allem folgenden Punkten:

- Art der vorherrschenden Ossifikation (desmal, enchondral)
- Anwesenheit von Knorpelgewebe und Blutgefäßen
- Anwesenheit von Entzündungszellen
- Kontakt zwischen Platte und Knochen
(anhand von Knochenresten an den entfernten Platten)
- Art des Weichgewebes
(lockeres, straff organisiertes oder wabiges Bindegewebe, Zellreichtum)
- Anzeichen für Knochenvitalität, Knochenumbau und Remodelling
(Osteoklasten, osteoblastäre Aktivität)
- Plattenabrieb

2.2.6.4.2 Quantitative Auswertung

Zur quantitativen Auswertung wurde das Punktezählverfahren herangezogen. Die Auswertung erfolgte am Durchlichtmikroskop (Axiophot[®]; Fa. Zeiss, Oberkochen) mit einem Netzokular. Mittels des Netzokulars und eines Kreuztisches wurden pro Netzraster 100 Punkte ausgezählt, wobei jeder Kreuzungspunkt des Netzgitters einer bestimmten Gewebeart zugeordnet wurde. Während des Zählens wurden Art und Anzahl der Gewebepunkte mittels eines Zählgerätes erfasst (Abb. 23). Der Kallusbereich wurde bei 100-facher Vergrößerung meanderförmig abgefahren.

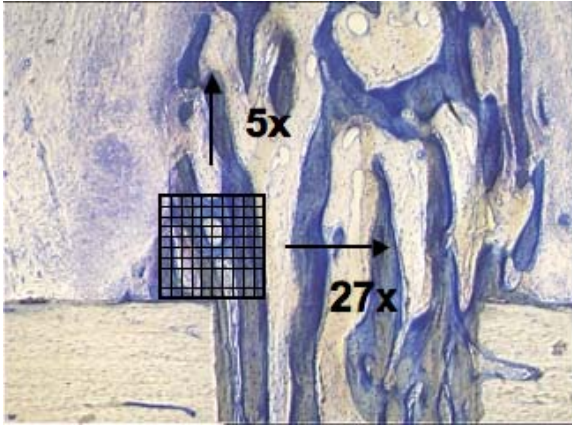


Abb. 23: Schematische Darstellung des Punktezählverfahrens mit Angabe der Anzahl der horizontalen (27) und vertikalen (5) NetZRaster an einem Ausschnitt eines histologischen Schnittbildes (Raster nicht maßstabsgetreu). Paragon-Färbung, 25-fache Vergrößerung.

Bei der gewählten Vergrößerung entsprach ein Raster einer Fläche von 1,23 x 1,23 mm. Als Auswertungsfenster wurde der Kallusbereich zwischen ursprünglicher Plattenauflagefläche und Kortikalis festgelegt. Zwei Raster proximal des proximalsten Bohrlochs wurde mit der Zählung begonnen. Die Raster wurden in distaler Richtung aneinandergesetzt, so dass insgesamt 27 Raster entlang der Kortikalis ausgezählt wurden. Anschließend wurden ausgehend von der ersten Reihe vier weitere Reihen zu je 27 Rastern im restlichen Kallusgewebe ausgezählt. Insgesamt wurden also pro Schnitt 135 Raster (27 x 5) und somit 13500 Netzpunkte ausgewertet. Dadurch war eine Unterteilung des Kallusbereichs in fünf verschiedene Regionen mit unterschiedlichem Abstand zur Kortikalis möglich. Ausgewertet wurden alle Gewebepunkte in diesem Bereich. Eine Differenzierung erfolgte nach folgenden Gewebearten:

- Bindegewebe
- Knochen
- Knochenmark
- Osteoid
- Knorpel

Aus dem Ergebnis der Punktezählung wurden die prozentualen Anteile der jeweiligen Gewebearten bestimmt.

2.2.6.5 Fluoreszenzhistologische Untersuchung

Die histologischen Schnitte wurden unter Fluoreszenzlicht ausgewertet, um ein Bild über den Mineralisierungsgrad des Kallusgewebes zu verschiedenen Zeitpunkten der Distractionsbehandlung zu erhalten. Die fluoreszenzhistologische Auswertung erfolgte bei

25-facher Vergrößerung unter dem Axiophot-Photomikroskop (Axiophot®; Fa. Zeiss, Oberkochen). Die Bilder der Auswertung wurden mit der integrierten Videokamera (CCD-Kamera KAM 02; Fa. Kontron, München) dokumentiert und mittels des Bildverarbeitungsprogramms Analysis® (Fa. Soft Imaging Systems, Münster) ausgewertet. Für die Messung wurde ein Fluoreszenzfilter verwendet, welcher die beiden Fluoreszenzfarbstoffe Calceingrün und Tetrazyklin zusammen abbilden kann (Filter 3, Wellenlänge 450–490 nm). Gemessen wurde die Höhe der Mineralisierungsfront, also der Abstand zwischen kortikalisferstem Punkt der Fluoreszenzmarkierung und der Kortikalis zu den jeweiligen Injektionszeitpunkten (Abb. 24).

Es wurden vier Parameter ermittelt:

Messung 1: Höhe Calceingrün

Messung 2: Höhe Tetrazyklin

Messung 3: Höhe des gesamten knöchernen Kallus

Messung 4: Bohrlochdurchmesser

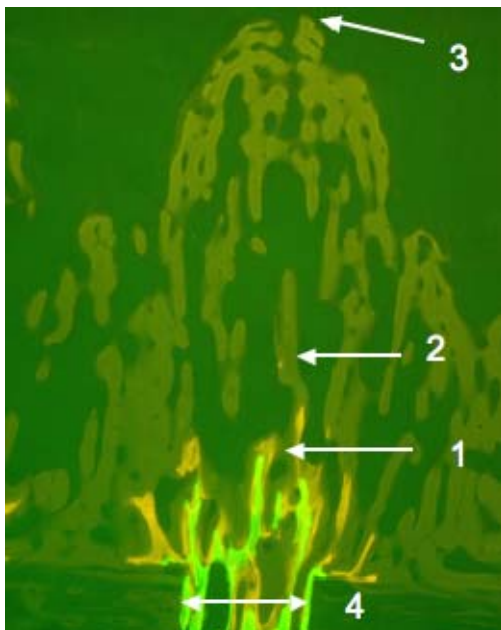


Abb. 24: Schematische Darstellung der Messlokalisationen am Beispiel eines Kalluszapfens eines Tieres der Distractionsgruppe:

1 = Höhe Calceingrün

2 = Höhe Tetrazyklin

3 = Höhe des knöchernen Kallus

4 = Bohrlochdurchmesser

Die Messung der Punkte 1 bis 3 erfolgte ausgehend von der kortikalen Oberfläche.

Nur über Bohrlochern, die gut getroffen waren und im Anschnitt mindestens einen Durchmesser von 0,9 mm hatten, wurde gemessen.

2.2.7 Statistik

Bei allen quantitativen Auswerteverfahren (pQCT, Gewebedifferenzierung, Fluoreszenzhistologie, Biomechanik) wurde nach Übertragung der Werte in Excel-Tabellen (Microsoft® Excel® 2004) der Median ermittelt. Als Statistikprogramm zur Berechnung der Signifikanzen wurde JMP® (Version 5.0.1.2) der Fa. SAS Institute (JMP, SAS Institute, Cary, N.C., USA) herangezogen. Die Berechnung statistisch signifikanter Unterschiede erfolgte mit dem Wilcoxon-Test für nicht normalverteilte Stichproben, da aufgrund der geringen Tierzahl ($n = 20$) nicht von einer Normalverteilung der Werte ausgegangen werden konnte. Es wurde jeweils die Distraktionsgruppe ($n = 10$) mit der Kontrollgruppe ($n = 10$) verglichen. Als statistisch signifikant (*) wurden Werte mit $p < 0,05$ angesehen. Es wurde multipel getestet und zur Vermeidung einer α -Fehlerkumulation nach Bonferroni angepasst.

3 Ergebnisse

3.1 Klinischer Verlauf

Die Operation verlief bei allen Tieren problemlos. Die durchschnittliche Operationszeit betrug 1 h und 10 min. Zwei Tiere (S 763 und S 774) aus der Distraktionsgruppe mussten wegen postoperativer Frakturen durch eine intravenöse Injektion von Pentobarbital-Natrium (Narkoren[®]; Fa. Merial GmbH, Hallbergmoos) euthanasiert werden.

Bei einigen Tieren der Kontrollgruppe war in den ersten Tagen nach der OP eine leichte Sekretion seröser Flüssigkeit an den Hautdurchtrittsstellen der Schanz-Schrauben festzustellen. Nach ca. zehn Tagen war diese Sekretion bei keinem der Tiere mehr zu beobachten.

Ein Tier wurde zehn Tage p.o. aufgrund erhöhter Körpertemperatur über drei Tage antibiotisch behandelt, woraufhin sich die Körpertemperatur normalisierte.

Alle anderen Tiere zeigten über den gesamten Versuchszeitraum ein ungestörtes Allgemeinbefinden und volle Belastung der operierten Gliedmaße.

Auf den nach vierwöchiger Standzeit angefertigten Röntgenaufnahmen konnten erste Unterschiede in der Kallusqualität zwischen den beiden Gruppen festgestellt werden. Bei den Tieren der Kontrollgruppe zeigte sich nur eine unregelmäßige Kallusreaktion direkt über der plangefrästen Kortikalis (Abb. 25). Bei den Tieren der Distraktionsgruppe waren über den Bohrungen in den Markraum röntgendichte, in Distraktionsrichtung ausgerichtete Kalluszapfen zu beobachten (Abb. 26).

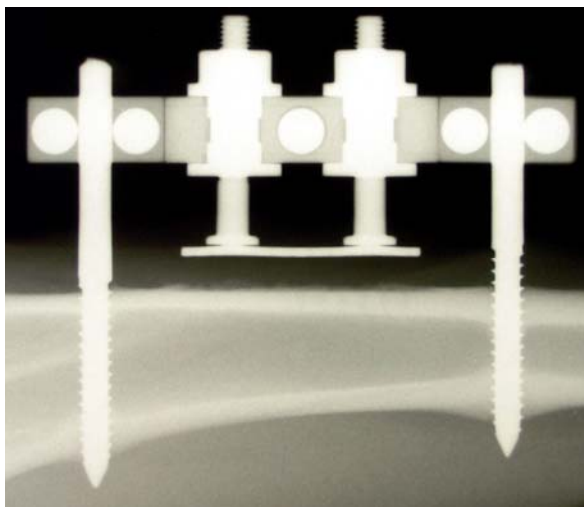


Abb. 25: Röntgenbild eines Schafes der Kontrollgruppe (S 768) 4 Wochen p.op.

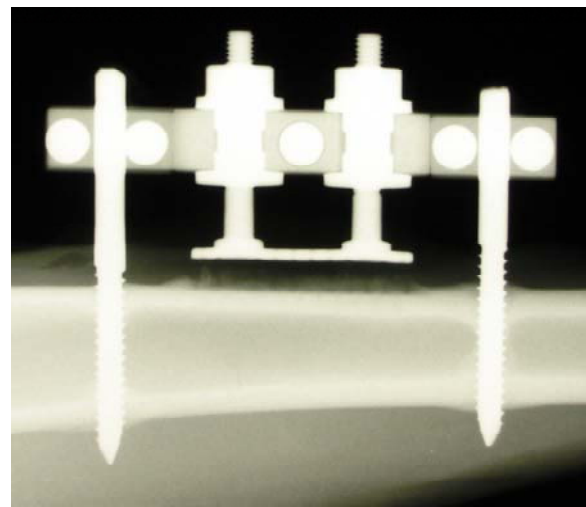


Abb. 26: Röntgenbild eines Schafes der Distraktionsgruppe (S 766) 4 Wochen p.op.

3.2 Präparation und postmortales Röntgen im Faxitron

Bei der Präparation der operierten Gliedmaße waren keine makroskopisch sichtbaren Anzeichen für Entzündungsprozesse zu finden. Auch die bindegewebigen Schichten über den Kanten der Titanplatte zeigten keinerlei Anzeichen von Entzündung oder Nekrose.

Nach Entfernung des stützenden Fixateurs war die Titanplatte bei allen Tieren der Kontrollgruppe leicht zu bewegen und abzulösen, da nur eine lockere bindegewebige Verbindung zum Knochen bestand (Abb. 28).

Bei den Tieren der Distraktionsgruppe dagegen war die Platte in allen Fällen fest über einen größtenteils knöchernen Kallus mit der Kortikalis verbunden. Die Ablösung der fest anhaftenden Titanplatte war hier nur mit dem Skalpell unter Aufwendung beträchtlicher Kräfte möglich. Bei einigen Tieren blieben kleine Teile des knöchernen Kallus an der Titanplatte haften (Abb. 27).

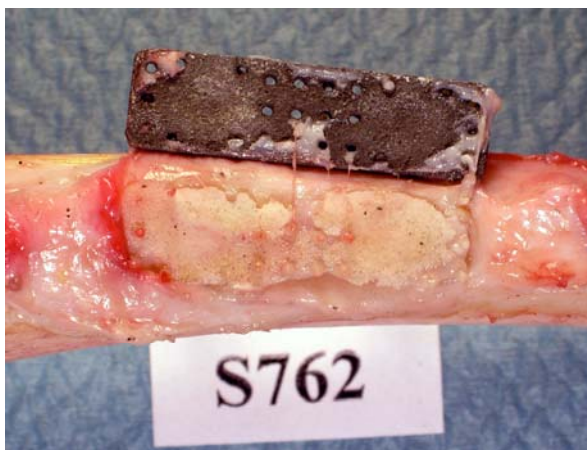


Abb. 27: Präparation einer Tibia der Distraktionsgruppe (S 762). Unter der Platte ist geflechtartiger Knochen zu sehen.



Abb. 28: Präparation einer Tibia der Kontrollgruppe (S 777). Im Kalluslängsschnitt ist unter der Plattenauflagefläche nur Bindegewebe zu sehen.

Anhand der im Faxitron-Tischröntgengerät erstellten Kontaktröntgenaufnahmen des Knochens mit Fixateur (Abb. 29, Abb. 30), bzw. anhand von Aufnahmen des Kalluslängsschnitts (Abb. 31, Abb. 32), konnte die unterschiedliche Kallusqualität in den beiden Gruppen bestätigt werden. Auch hier waren in der Distraktionsgruppe pyramidenförmige Kalluszapfen vorzufinden. In einigen Fällen war der Kallus in der Distraktionsgruppe vollständig knöchern.

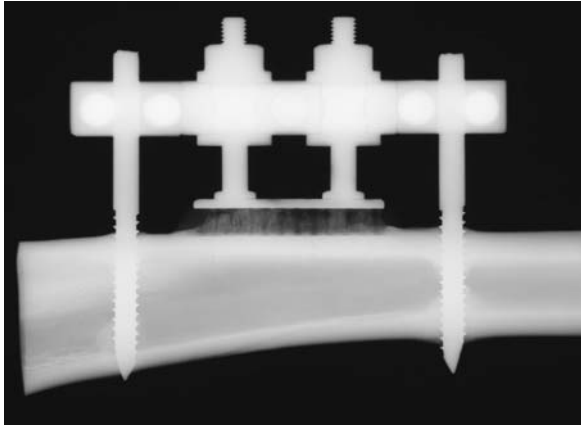


Abb. 29: Faxitron-Kontaktröntgenbild einer Tibia der Distraktionsgruppe (S 776).

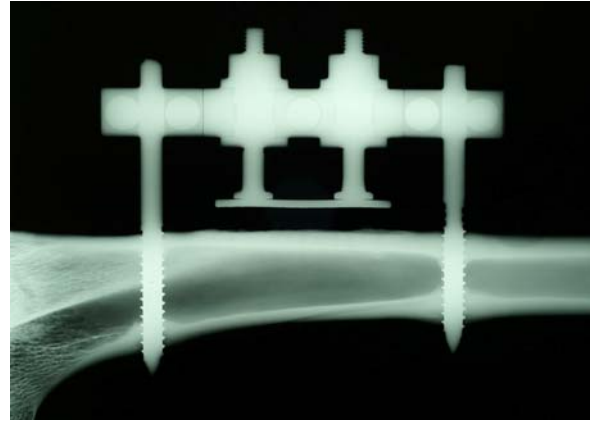


Abb. 30: Faxitron-Kontaktröntgenbild einer Tibia der Kontrollgruppe (S 768).

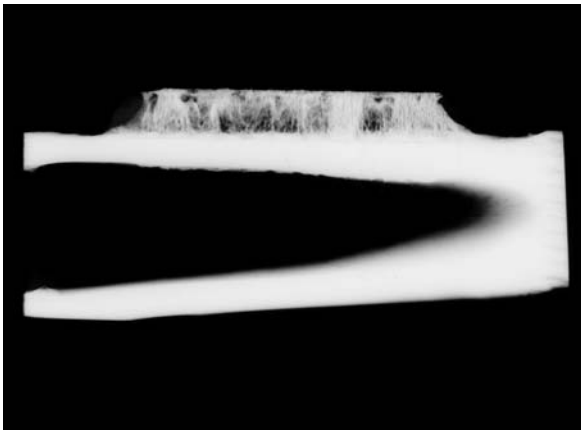


Abb. 31: Faxitron-Kontaktröntgenbild des Kalluslängsschnitts eines Schafes der Distraktionsgruppe (S 783).

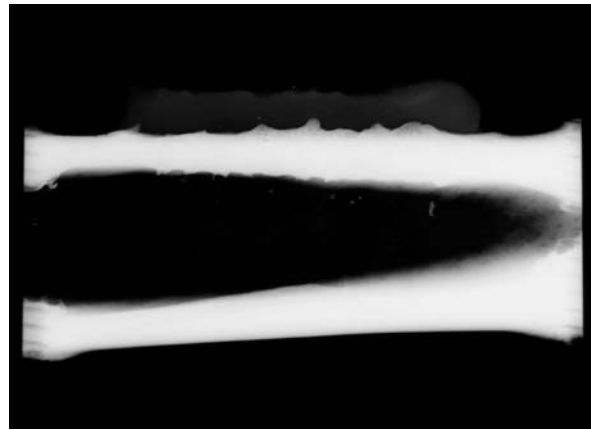


Abb. 32: Faxitron-Kontaktröntgenbild des Kalluslängsschnitts eines Schafes der Kontrollgruppe (S 775).

3.3 pQCT

Die Auswertung der peripheren quantitativen Computertomographie konnte die bereits röntgenologisch feststellbaren Unterschiede quantifizieren. Dargestellt sind im Folgenden die wesentlichen Ergebnisse der Bestimmung der Knochenmineraldichte und des Kallusvolumens für die Fläche zwischen Titanplatte und Kortikalis (ROI_{klein}) und für den $ROI_{\text{groß}}$, der auch die distraktionsbedingten Knochenzubildungen im Randbereich der Platte mit einschließt (Abb. 16). Ausgewertet wurden die beiden ROIs bei den Schwellwerten 0,2 und 0,45 (1/cm). Die als Referenzwert ermittelte durchschnittliche Dichte der Kortikalis lag in der Kontrollgruppe bei $1426 (\pm 33) \text{ mg/cm}^3$ und in der Distraktionsgruppe bei $1411 (\pm 14) \text{ mg/cm}^3$.

Die Auswertung der Schnitte bei einem Schwellwert von 0,2 (1/cm), gab Aufschluss über die durchschnittliche Dichte des zwischen Titanplatte und Kortikalis befindlichen Gewebes. Die Distraktionsgruppe wies für den ROI_{klein} eine gegenüber der Kontrollgruppe signifikant höhere Knochenmineraldichte auf (Abb. 33).

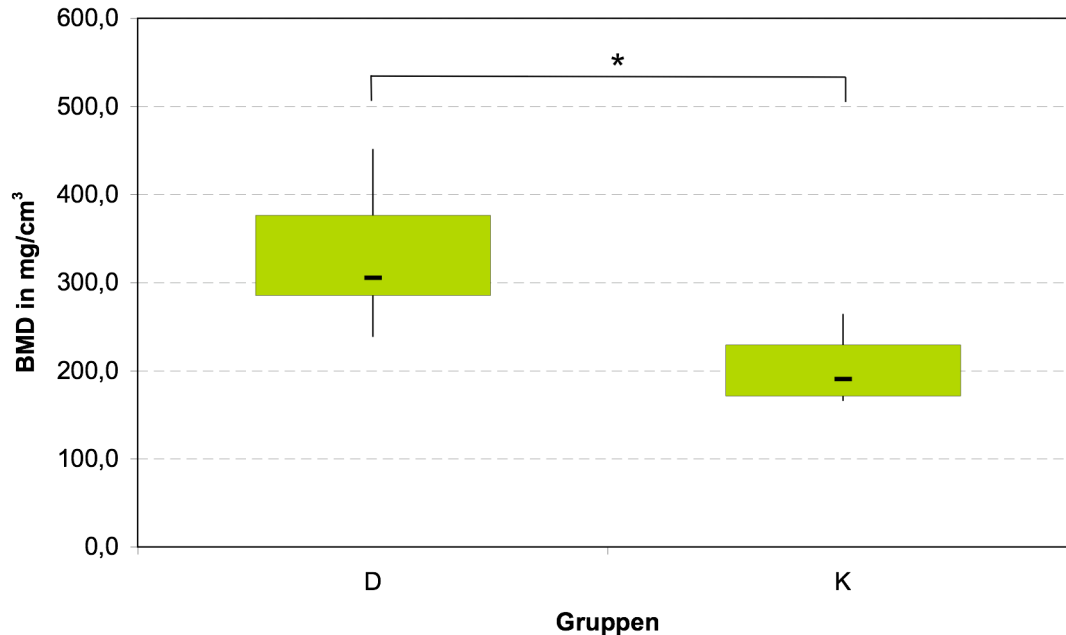


Abb. 33: Knochenmineraldichte in mg/cm^3 bei einem Schwellwert für den Schwächungskoeffizienten von 0,2 (1/cm) für den ROI_{klein} . D = Distraktionsgruppe (n = 10), K = Kontrollgruppe (n = 10), * = $p < 0,05$.

Bei der Berechnung des Kallusvolumens zeigte sich in der Distractionsgruppe für den ROI_{klein} beim Schwellwert von $0,2/\text{cm}$ ein gegenüber der Kontrollgruppe ebenfalls signifikant höherer Wert (Abb. 34).

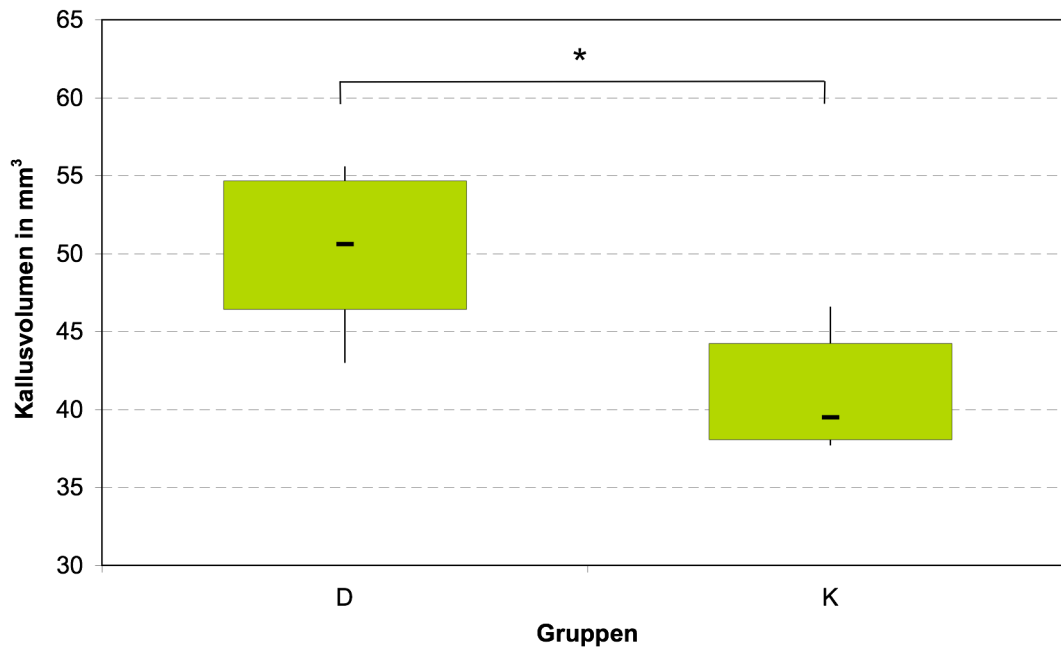


Abb. 34: Kallusvolumen bei einem Schwellwert für den Schwächungskoeffizienten von $0,2$ ($1/\text{cm}$) für den ROI_{klein} . D = Distractionsgruppe ($n = 10$), K = Kontrollgruppe ($n = 10$), * = $p < 0,05$.

Die Auswertung bei einem Schwellwert von $0,45$ ($1/\text{cm}$) schloss alle bindegewebigen Kallusanteile aus der Berechnung aus und gab somit ein Bild über die Dichte und das Volumen der knöchernen Kallusanteile. Die Knochenmineraldichte des Gewebes unter der Titanplatte (ROI_{klein}) unterschied sich in den beiden Gruppen nicht signifikant. Die knöchernen Kallusanteile in der Kontrollgruppe zeigten eine geringgradig höhere Knochenmineraldichte als jene der Distractionsgruppe. Der Volumenanteil an knöchernem Kallus war jedoch in der Kontrollgruppe deutlich geringer als in der Distractionsgruppe (Abb. 35).

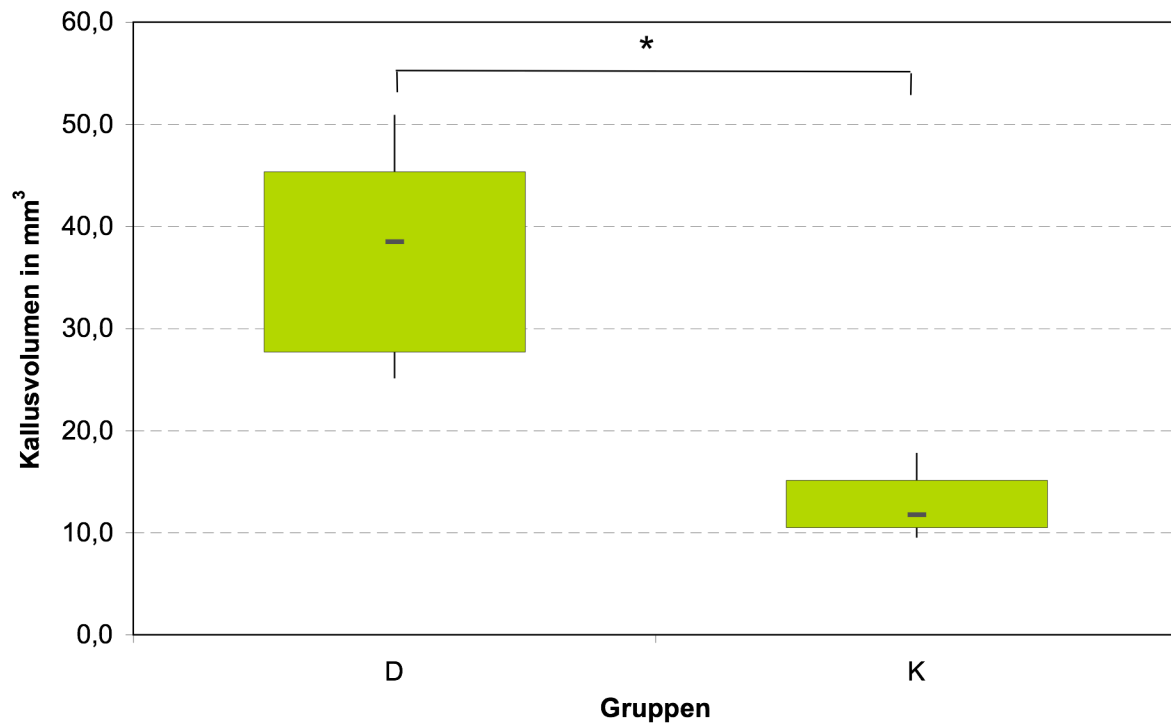


Abb. 35: Kallusvolumen bei einem Schwellwert für den Schwächungskoeffizienten von 0,45 (1/cm) für den ROI_{klein}. D = Distaktionsgruppe (n = 10), K = Kontrollgruppe (n = 10), * = p < 0,05.

Ein noch deutlicherer Volumenunterschied war bei Einbeziehung der distraktionsbedingten Knochenzubildungen im Randbereich der Titanplatte (ROI_{groß}) zu verzeichnen.

Hier wies die Distaktionsgruppe beim Schwellwert von 0,45 (1/cm) ein 3,8-fach höheres Volumen an knöchernem Kallus auf (Abb. 36).

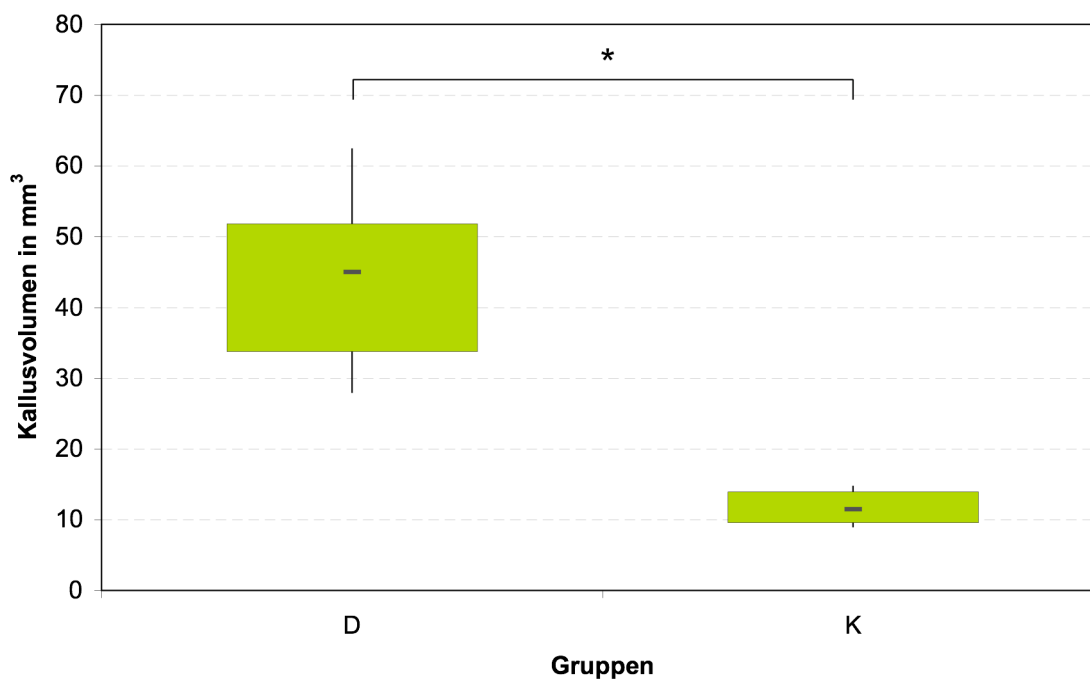


Abb. 36: Kallusvolumen bei einem Schwellwert für den Schwächungskoeffizienten von 0,45 (1/cm) für den ROI_{groß}. D = Distaktionsgruppe (n = 10), K = Kontrollgruppe (n = 10), * = p < 0,05.

Zusammenfassend waren in der Distaktionsgruppe bei beiden Schwächungskoeffizienten gegenüber der Kontrollgruppe signifikant höhere Volumenanteile an Kallus zu finden. Die Dichte der knöchernen Kallusanteile war in beiden Gruppen ähnlich.

3.4 μ -CT

Die exemplarisch erstellten μ -CT-Bilder lieferten ein dreidimensionales Bild der Kallusformation in der Distraktionsgruppe. Es war deutlich eine zapfenförmige Knochenbildung über den Bohrlöchern zu sehen (Abb. 37, Abb. 39). Die zapfenförmigen knöchernen Strukturen über den Bohrlöchern reichten nicht in allen Fällen bis auf Höhe der Titanplatte. Sie waren von geflechtartiger Struktur und in einigen Fällen war ein zentraler Hohlraum zu sehen. Unter der Titanplatte war meist eine durchgehende Knochenplatte nachweisbar (Abb. 37).

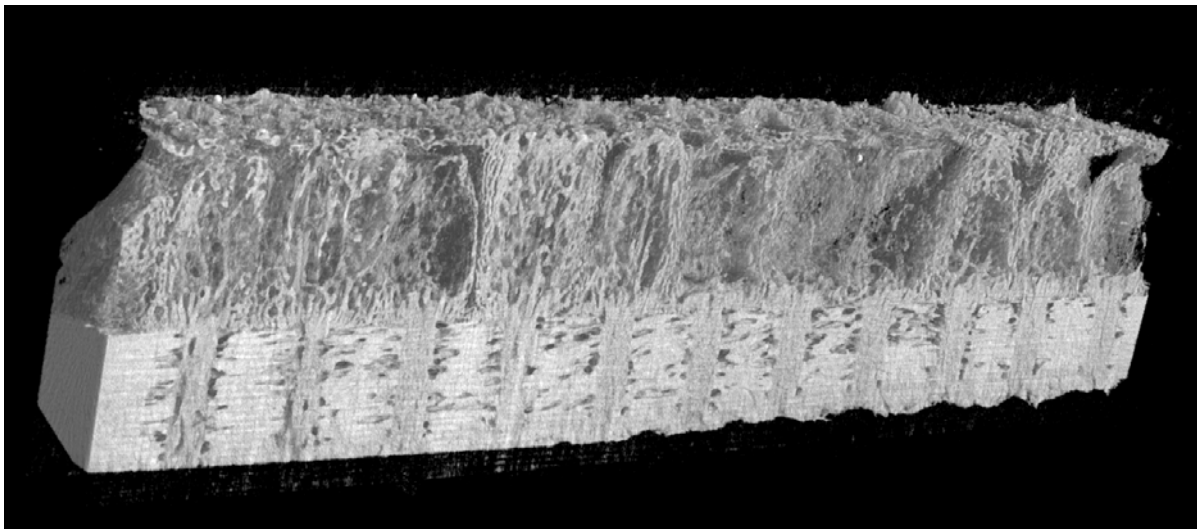


Abb. 37: Dreidimensionale Darstellung der μ -CT-Schnitte eines Kalluslängsschnittes mit Sicht auf den Anschnitt der kaudalen Bohrlochreihe. Distraktionsgruppe, Schaf 783.

Im Randbereich der Platte konnte ein im Vergleich zum Bereich über den Bohrlöchern dichter und homogener knöcherner Kallus nachgewiesen werden (Abb. 38). Der knöcherne Kallus im Randbereich der Titanplatte ist auf die periostale Kallusreaktion an der Schnittkante des Periosts zurückzuführen.

Bei dem Schaf aus dem Zusatzversuch, bei dem unter Verzicht auf die den Markraum eröffnenden Bohrungen eine Distraktionsbehandlung durchgeführt wurde, konnte der dichte und homogene Kallus im Randbereich der Platte ebenfalls nachgewiesen werden. Zentral unter der Platte war jedoch bei diesem Schaf nur bindegewebiger Kallus zu sehen.

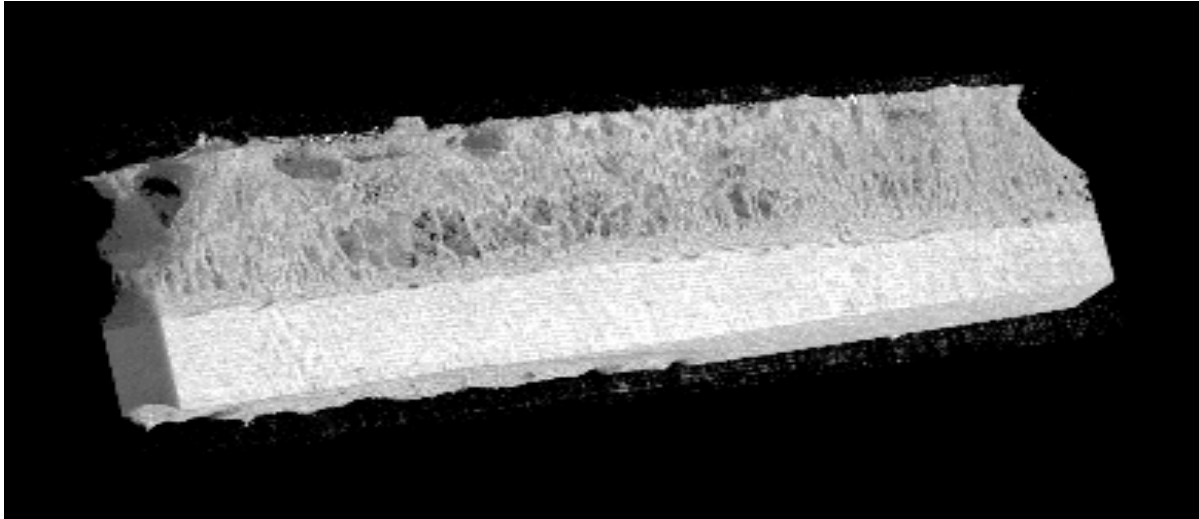


Abb. 38: Dreidimensionale Darstellung der μ -CT-Schnitte eines Kalluslängsschnittes mit Sicht auf die distraktionsbedingte Kallusbildung im Randbereich der Platte. Distraktionsgruppe, Schaf 783.

Der Knochen in den Bohrlöchern zeigte eine Ausrichtung in Distraktionsrichtung. Die in einigen Bohrlöchern sichtbaren Blutgefäßkanäle zeigten ebenfalls einen Verlauf parallel zur Distraktionsrichtung (Abb. 39).

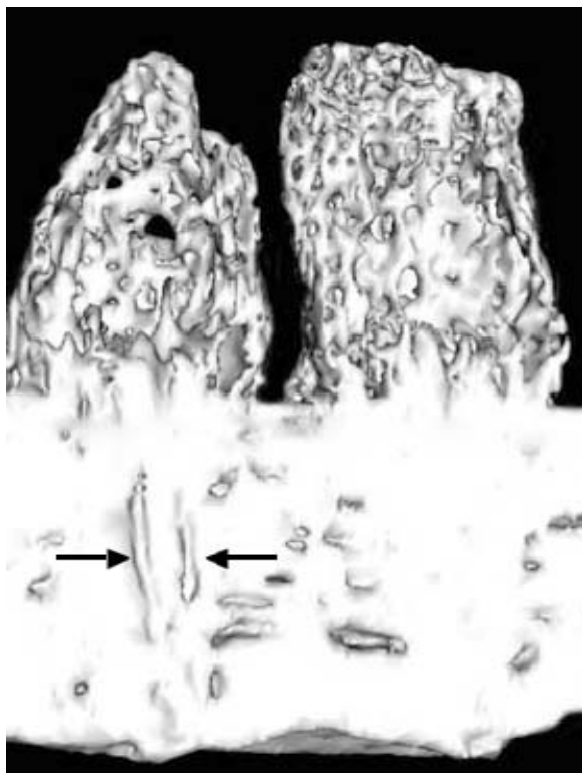


Abb. 39: Dreidimensionale Darstellung eines μ -CT-Schnittes zweier Kalluszapfen mit dem Programm Osirix (Osirix, Version 2.4). Die schwarzen Pfeile im Bild zeigen den in Distraktionsrichtung gerichteten Verlauf zweier Gefäßkanäle im Bohrloch. Außerdem ist die geflechtartige Struktur der durch Distraction entstandenen Kalluszapfen zu erkennen. Distraktionsgruppe, Schaf 765.

3.5 Biomechanik

Die biomechanische Testung der Kalluslängsschnitte lieferte Aufschlüsse über die mechanischen Materialeigenschaften des untersuchten Gewebes. Die als Referenzwert ermittelte Steifigkeit der Kortikalis beider Gruppen war nicht signifikant unterschiedlich. Bei der Bestimmung der Steifigkeitswerte des neugebildeten Knochens im Bohrloch ergab sich für die Distraktionsgruppe eine um 18,9 % höhere Steifigkeit. Der Unterschied war jedoch nicht signifikant. In der Distraktionsgruppe waren zwischen Druckpunkt 4 (seitlich am Zapfen), Druckpunkt 3 (zentral im Zapfen) und Druckpunkt 5 (Zapfenspitze) abnehmende Steifigkeitswerte zu beobachten. In der Kontrollgruppe nahm mit zunehmendem Abstand der Druckpunkte zur Kortikalis (1 mm, 2 mm, 3 mm) die Gewebesteifigkeit ebenfalls ab.

Die Druckpunkte 3 (zentral im Zapfen, 1 mm über der Kortikalis) und 4 (seitlich im Zapfen, 1 mm über der Kortikalis) der Distraktionsgruppe wurden mit dem Wert für Druckpunkt 3 der Kontrollgruppe (zentral 1 mm über der Kortikalis) verglichen. Bei beiden Vergleichen waren die Unterschiede zwischen den Gruppen nicht signifikant (Tabelle 2).

Der einzige signifikante Unterschied zeigte sich beim Vergleich der Steifigkeitswerte der Kalluszapfenspitze der Distraktionsgruppe mit den Steifigkeitswerten 3 mm über der Kortikalis in der Kontrollgruppe. An dieser Messlokalisation war für die Distraktionsgruppe eine signifikant höhere Gewebesteifigkeit nachweisbar (Abb. 40).

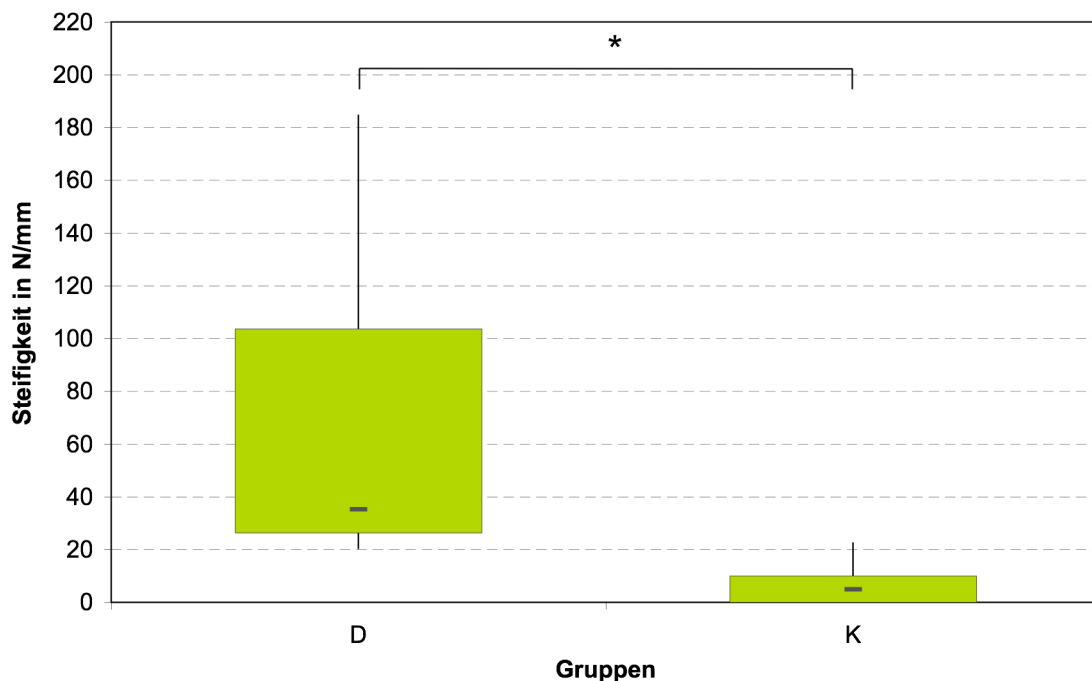


Abb. 40: Steifigkeitswerte von Druckpunkt 5 (Zapfenspitze) der Distraktionsgruppe (D; n = 9) verglichen mit den Steifigkeitswerten von Druckpunkt 5 (zentral über dem Bohrloch, 3 mm über der Kortikalis) der Kontrollgruppe (K; n = 10), * = $p < 0,05$.

Tabelle 2: Steifigkeitswerte im biomechanischen Eindrückttest an verschiedenen Lokalisationen des Geweberegenerats. Angegeben sind die Werte für den Median und in Klammern der Interquartilbereich (25-%- und 75-%-Quartile).

Lokalisation der Druckpunkte	Distraktion	Kontrolle
1 Kortikalis	1220 (1018 – 1399)	1211 (1122 – 1330)
2 Bohrloch	582 (432 – 766)	460 (419 – 568)
3 zentral über dem Bohrloch in 1 mm Abstand zur Kortikalis	66 (43 – 122)	112 (73 – 140)
4 seitlich des Bohrlochs 1 mm über der Kortikalis	121 (96 – 185)	112 (73 – 140)

3.6 Histologie

3.6.1 Gewebedifferenzierung

3.6.1.1 Qualitativ

Schon bei makroskopischer Betrachtung der Schnitte war in der Distraktionsgruppe mehr knöcherner Kallus zu erkennen (Abb. 41, Abb. 42). Der Kallus reichte in der Distraktionsgruppe in den meisten Fällen bis zur Auflagefläche der Titanplatte. Als bedeutendes Resultat der qualitativen Gewebedifferenzierung kann das Fehlen von Knorpelzellen angesehen werden. In keinem der angefertigten Schnitte konnten knorpelige Strukturen nachgewiesen werden. Sowohl der Distraktionskallus als auch die unregelmäßige Kallusreaktion in der Kontrollgruppe waren durch rein desmale Osteogenese entstanden. Der knöcherne Kallus bestand größtenteils aus Geflechtknochen. Nur direkt über der Kortikalis waren vereinzelt Osteone als erste Anzeichen des Umbaus in lamellären Knochen nachzuweisen (Abb. 50).

Über den Bohrlöchern der Distraktionsgruppe waren in Distraktionsrichtung ausgerichtete pyramidenförmige Kalluszapfen zu erkennen (Abb. 43). Der Kallus in der Kontrollgruppe erschien direkt über der Kortikalis zwar dichter als der Kallus der Distraktionsgruppe, war aber ungerichtet und weit weniger umfangreich. Im gesamten Kallusbereich waren in

unterschiedlicher Dichte und Stärke Blutgefäße erkennbar (Abb. 46). In den Bohrlöchern verliefen sie quer zur angrenzenden Kortikalis, also in Bohrloch- und Distraktionsrichtung ausgerichtet. Auch in der Kontrollgruppe war in den Bohrlöchern dieser Blutgefäßverlauf zu beobachten. In der Distraktionsgruppe war auch in den durch die Distraktion entstandenen Kalluszapfen eine Ausrichtung der Blutgefäße in Distraktionsrichtung zu beobachten (Abb. 46).

Der große Bindegewebsanteil in der Kontrollgruppe bestand aus ungerichtetem, lockerem Bindegewebe. Die bindegewebigen Strukturen in der Distraktionsgruppe waren vor allem im Randbereich der Kalluszapfen kollagenreicher. Die Kollagenfasern zeigten hier weitgehend eine Ausrichtung entlang des Distraktionsvektors (Abb. 44). Die wabigen Strukturen in den Kalluszapfen der Distraktionsgruppe waren reich an Fettzellen und entsprachen in ihrer Zusammensetzung dem im Markraum vorzufindenden Fettmark (Abb. 51). Sie wurden deshalb in der quantitativen Auswertung als Knochenmark definiert. Bei den Tieren mit Distraktionsbehandlung konnte eine hohe osteoblastäre Aktivität mit starker Osteoidbildung beobachtet werden (Abb. 47).

Osteoklasten als Zeichen für einen stattfindenden Knochenumbau oder Knochenabbau waren vor allem bei den Tieren der Kontrollgruppe zu beobachten (Abb. 48).

Entzündungszellen als Anzeichen einer durch das Implantat verursachten Abstoßungs- oder Entzündungsreaktion konnten nicht nachgewiesen werden. In einem exemplarischen Schnitt durch eine Titanplatte konnten anhaftende Kallusanteile nachgewiesen werden (Abb. 45). Es bestand direkter Kontakt zwischen den knöchernen Kallusanteilen und der Titanplatte.

Bei mehreren Schnitten konnte Plattenabrieb, bzw. eine abgeriebene HA-Beschichtung im Kallusbereich, v. a. im Bereich direkt unter der entfernten Platte nachgewiesen werden (Abb. 49). Der Plattenabrieb war in beiden Gruppen zu beobachten. In der Distraktionsgruppe war der Abrieb nur direkt am Auflagebereich der entfernten Titanplatte zu finden und eventuell auf das Entfernen der Titanplatte mit dem Skalpell zurückzuführen. In der Kontrollgruppe waren auch in kortikalisnäheren Bereichen des bindegewebigen Kallus Abriebpartikel zu finden.

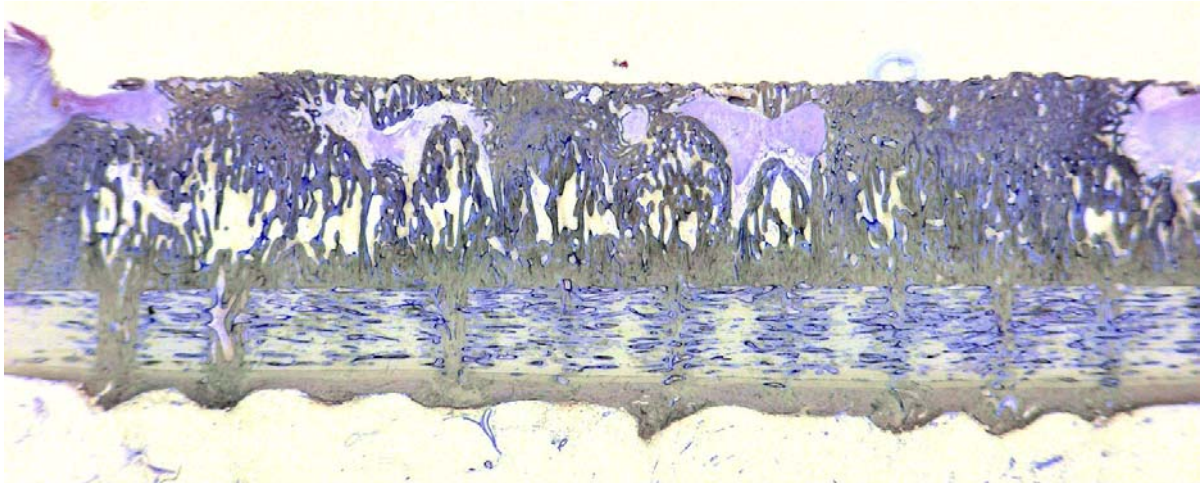


Abb. 41: Übersichtsaufnahme eines histologischen Schnittes der Distractionsgruppe. Paragon-Färbung. (Spiegelreflexkamera, Konica Minolta; Dynax 5; Japan).

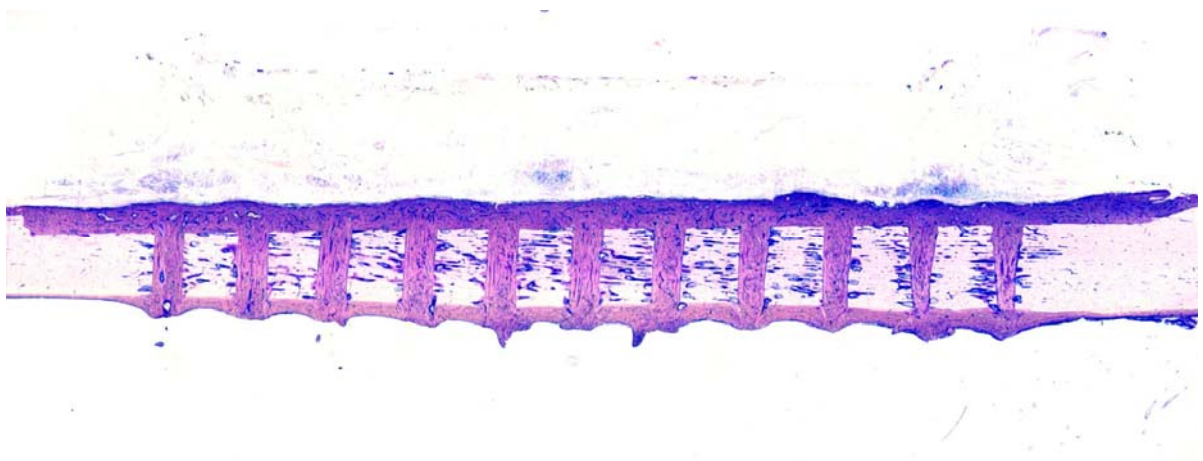


Abb. 42: Übersichtsaufnahme eines histologischen Schnittes der Kontrollgruppe. Paragon-Färbung. (Spiegelreflexkamera, Konica Minolta; Dynax 5; Japan).



Abb. 43: Distractionsgruppe. Kalluszapfenspitze mit desmaler Ossifikation. Paragon-Färbung. 25-fache Vergrößerung.

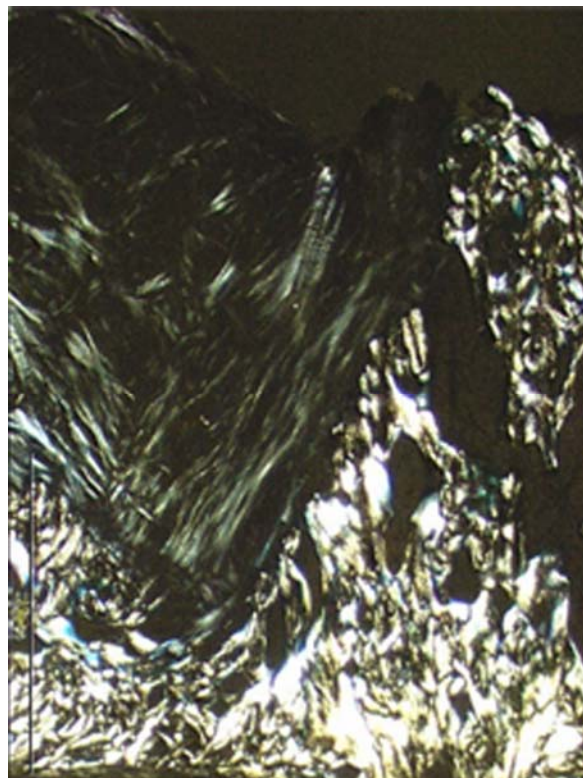


Abb. 44: Distractionsgruppe. Polarisationsmikroskopische Aufnahme mit weitgehend in Distractionsrichtung verlaufenden Kollagenfaserbündeln zwischen zwei Kalluszapfen. Paragon-Färbung. 12,5-fache Vergrößerung.

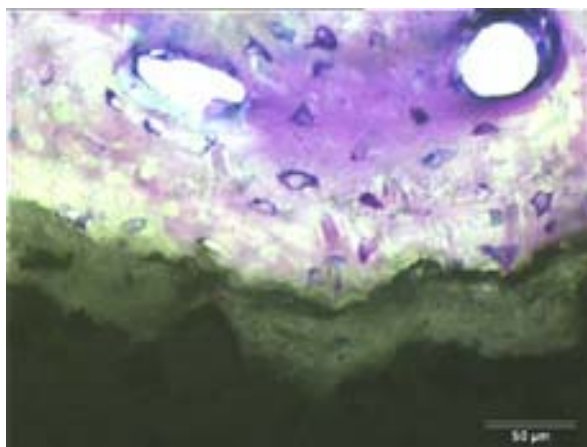


Abb. 45: Distractionsgruppe. Kontaktfläche zwischen Titanplatte (unten im Bild) und knöchernem Kallus (oben im Bild). Paragon-Färbung. 200-fache Vergrößerung.

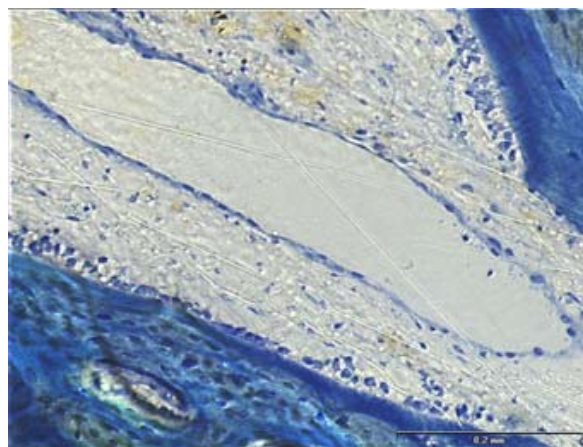


Abb. 46: Distractionsgruppe. Vene im Kalluszapfen. Paragon-Färbung. 100-fache Vergrößerung.



Abb. 47: Distractionsgruppe. Osteoblastensäume entlang der Knochen trabekel des Kalluszapfens. Paragon-Färbung. 100-fache Vergrößerung.

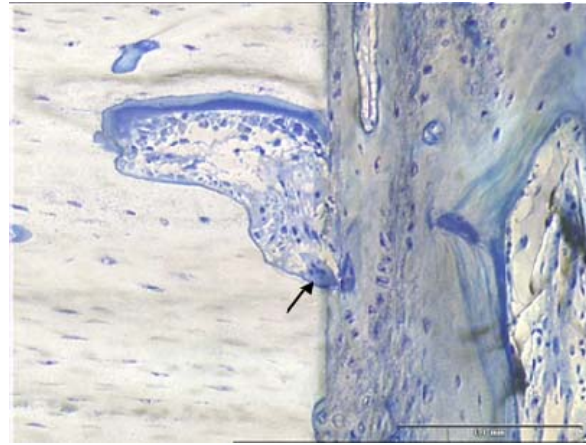


Abb. 48: Osteoklast an der Grenze zwischen Kortikalis (links im Bild) und Bohrkanal (rechts im Bild). Paragon-Färbung. 200-fache Vergrößerung.

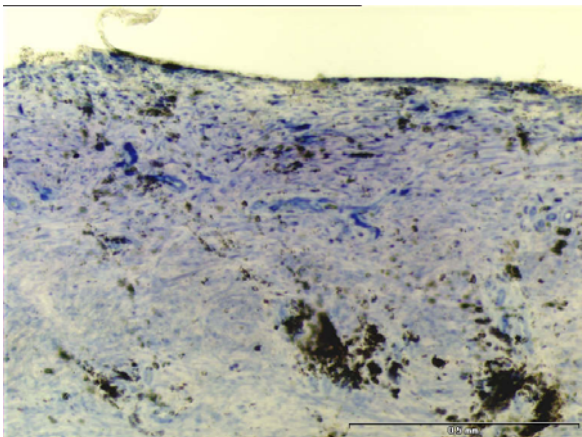


Abb. 49: Kontrollgruppe. Plattenabriebpartikel im Bindegewebe unter der Auflagefläche der Platte. Paragon-Färbung. 100-fache Vergrößerung.

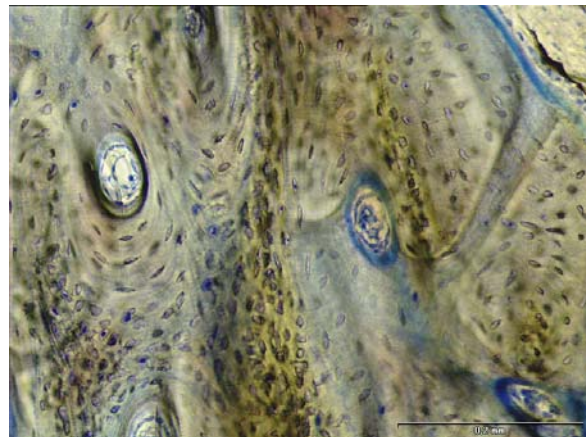


Abb. 50: Distractionsgruppe. Osteone direkt über der Kortikalis als erste Anzeichen des Umbaus des Geflechtknochens in Lamellenknochen. Paragon-Färbung. 200-fache Vergrößerung.

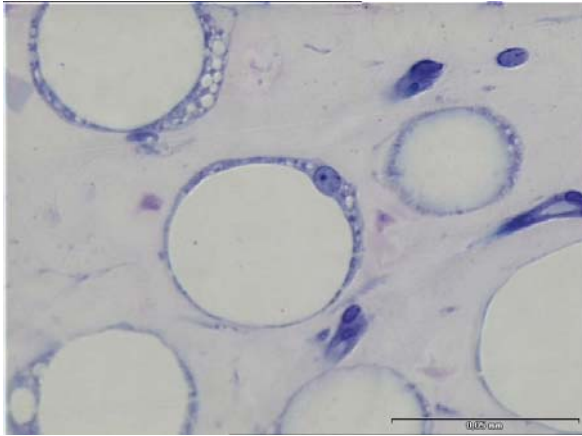


Abb. 51: Distaktionsgruppe. Fettzellen im lockeren, knochenmarkähnlichen Bindegewebe im Kalluszapfen. Paragon-Färbung. 400-fache-Vergrößerung.

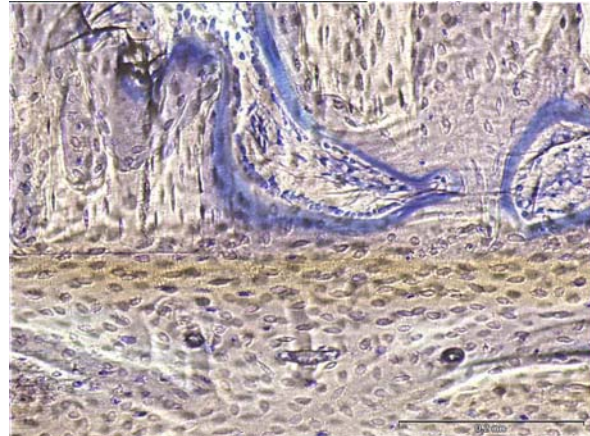


Abb. 52: Grenze zwischen Bohrloch (unten im Bild) und Kortikalis. Die Osteozyten sind entlang des Bohrlochverlaufs ausgerichtet. Paragon-Färbung. 100-fache-Vergrößerung.

3.6.1.2 Quantitativ

Bei der Punktezählmethode zeigten sich zwischen den beiden Gruppen signifikante Unterschiede in der Gewebezusammensetzung. Die prozentuale Kallusfläche (definiert als % Knochen + % Knochenmark) war in der Distractionsgruppe 2,3-fach höher als in der Kontrollgruppe (Abb. 53).

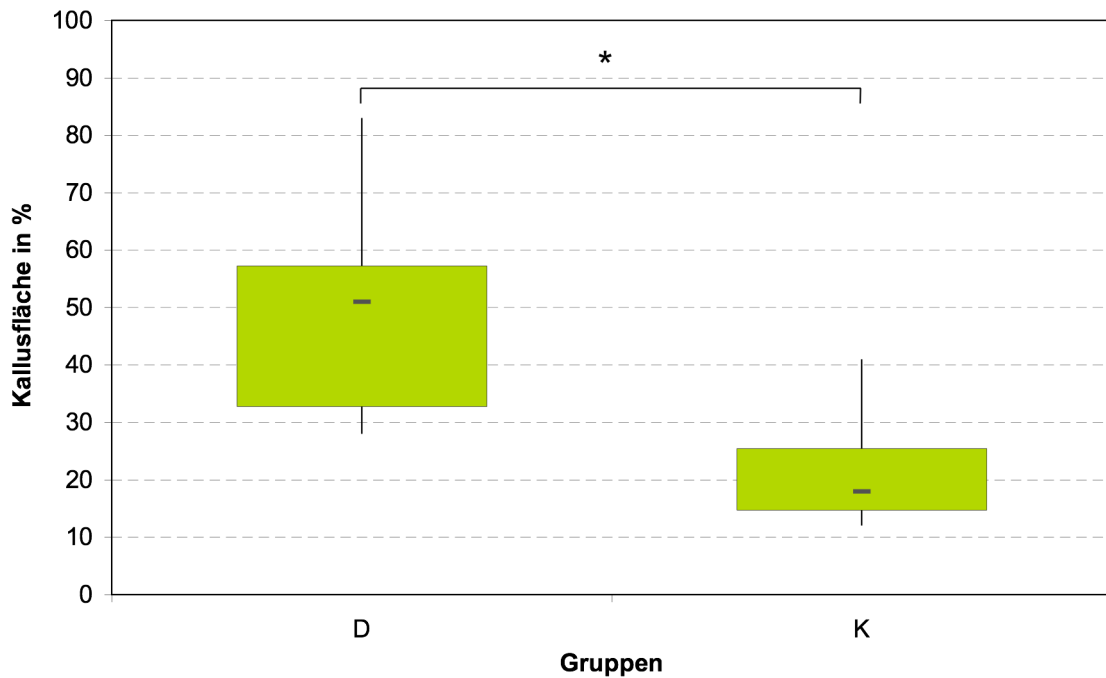


Abb. 53: Prozentuale Kallusfläche. D = Distractionsgruppe (n = 10), K = Kontrollgruppe (n = 10),
* = $p < 0,05$.

In Abhängigkeit vom Abstand zur Kortikalis war eine abnehmende Kallusfläche zu beobachten. Nur ab einem Abstand von 3,7 mm zur Kortikalis war in der Distractionsgruppe wieder eine prozentuale Zunahme an Kallusfläche zu beobachten (Abb. 55). Dies ist auf die Knochenplatten direkt unter der Auflagefläche der Titanplatte zurückzuführen.

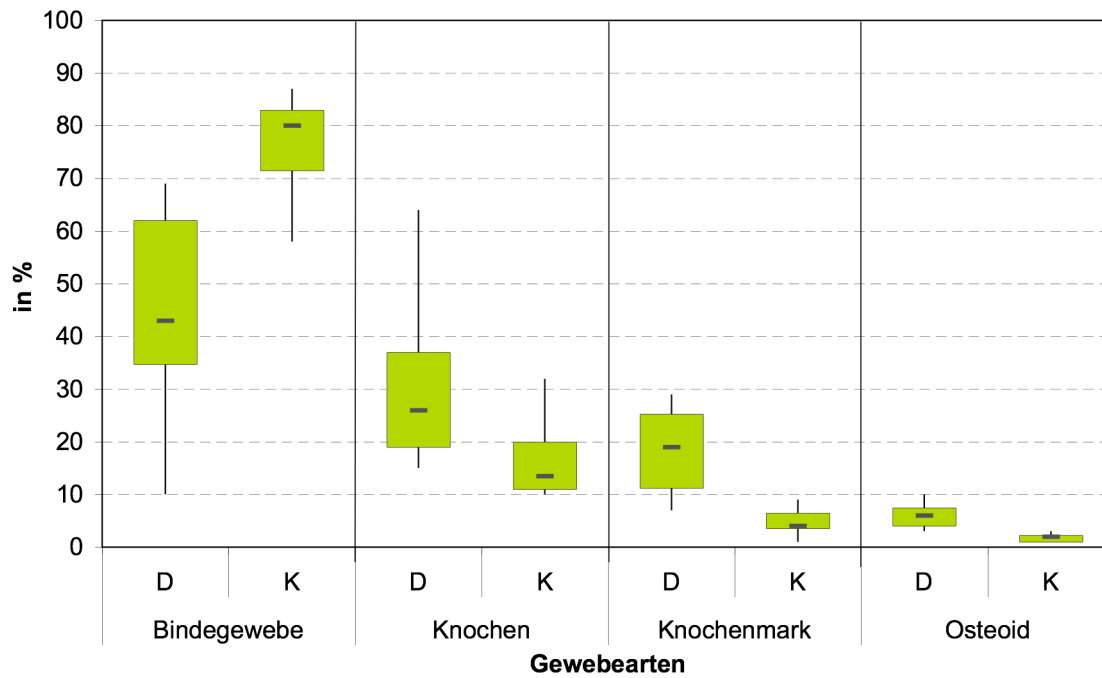


Abb. 54: Prozentuale Gewebezusammensetzung aller bei der Punktezählmethode ermittelten Gewebepunkte. D = Distaktionsgruppe (n = 10), K = Kontrollgruppe (n = 10).

Durch die für die Punktezählung vorgenommene Unterteilung der Kallusfläche in 5 Zählreihen zu je 27 Netzzustern konnte für die beiden Gruppen auch die Änderung der Gewebezusammensetzung in Abhängigkeit vom Abstand zur Kortikalis ermittelt werden (Abb. 55). In den weiter von der Kortikalis entfernten Zählreihen 2 bis 5 waren knöcherne Kallusanteile zunehmend nur noch in der Distaktionsgruppe zu finden. In der ersten Zählreihe direkt über der angefrästen Kortikalis wies die Kontrollgruppe eine höhere Anzahl an Knochenpunkten und somit einen dichteren knöchernen Kallus auf als die Distaktionsgruppe (Tabelle 3).

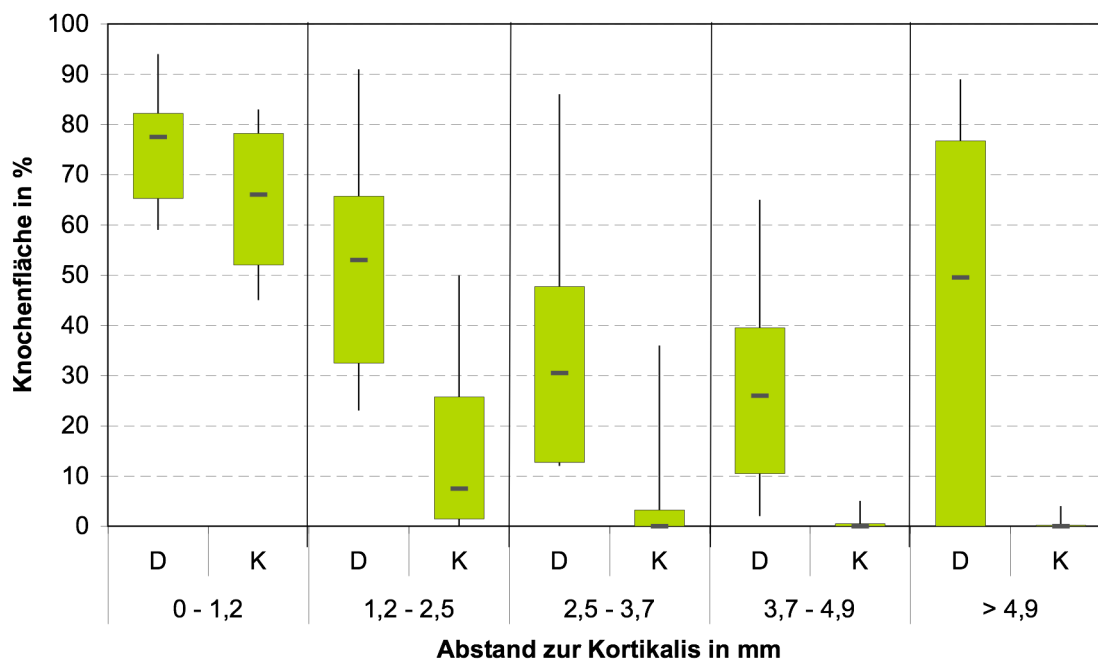


Abb. 55: Prozentualer Anteil der Knochenfläche in Abhängigkeit vom Abstand der Zählreihen zur Kortikalis. D = Distractionsgruppe (n = 10), K = Kontrollgruppe (n = 10).

Die prozentuale Gewebezusammensetzung in den einzelnen Zählreihen ist in Tabelle 3 wiedergegeben.

Tabelle 3: Vergleich der prozentualen Gewebezusammensetzung in den einzelnen Zählreihen unter Angabe des Medians und der 25%- bzw. 75%-Quartile; D = Distractionsgruppe (n = 10), K = Kontrollgruppe (n = 10).

Abstand zur Kortikalis in mm	Bindegewebe		Knochen		Knochenmark		Osteoid	
	D	K	D	K	D	K	D	K
Reihe 1 (0 - 1,2)	14 (6 - 27)	27 (17 - 42)	45 (39 - 58)	49 (43 - 64)	26 (16 - 37)	14 (13 - 18)	8 (7 - 10)	6 (5 - 8)
Reihe 2 (1,2 - 2,5)	42 (26 - 64)	91 (50 - 98)	19 (17 - 37)	6 (2 - 20)	29 (15 - 35)	2 (1 - 6)	7 (4 - 9)	2 (0 - 2)
Reihe 3 (2,5 - 3,7)	65 (47 - 85)	100 (96 - 100)	16 (8 - 32)	0 (0 - 3)	13 (5 - 20)	0 (0 - 1)	4 (2 - 7)	0 (0 - 0,2)
Reihe 4 (3,7 - 4,9)	70 (56 - 88)	100 (100 - 100)	17 (8 - 27)	0 (0 - 0,3)	5 (3 - 11)	0 (0 - 0,3)	4 (1 - 6)	0 (0 - 0)
Reihe 5 (>4,9)	25 (0 - 54)	100 (99 - 100)	37 (0 - 54)	0 (0 - 0,3)	11 (0 - 18)	0 (0 - 0)	4 (0 - 6)	0 (0 - 0)

3.6.2 Fluoreszenzhistologische Untersuchung

Bei der Auswertung der Ergebnisse der fluoreszenzhistologischen Untersuchung waren für alle drei Messungen (Abstand von Calceingrün zur Kortikalis, Abstand von Tetrazyklin zur Kortikalis und endgültige Höhe des Knochenzapfens) signifikante Unterschiede zwischen den beiden Versuchsgruppen nachweisbar.

Schon 20 Tage p.op. zeigte sich in der Distractionsgruppe eine durch die Einlagerung von Calceingrün gekennzeichnete Mineralisation in kortikalisferneren Bereichen als in der Kontrollgruppe (Abb. 56). In der Kontrollgruppe war die Mineralisierung des Kallus im Mittel noch nicht einmal über die Bohrlöcher fortgeschritten (Abb. 56).

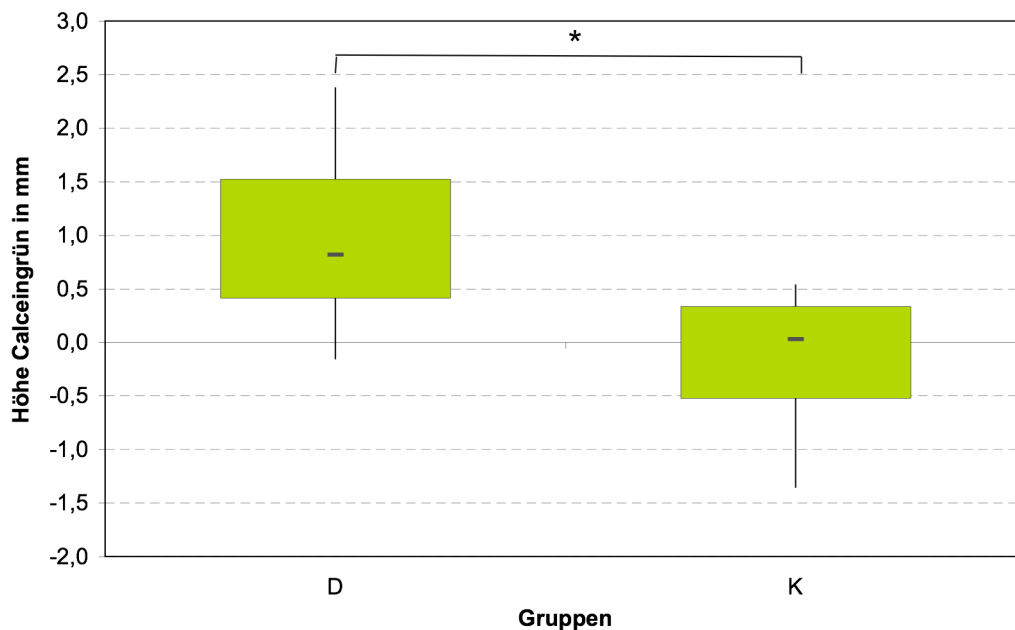


Abb. 56: Vergleich der Höhe der Calceingrünfront zwischen Distractionsgruppe (D; n = 9) und Kontrollgruppe (K; n = 9); * = $p < 0,05$. Das Mineralisationsbild entspricht den Verhältnissen ca. 20 Tage p.op.

Auch bei der Messung des Abstands des eingelagerten Tetrazyklins zur Kortikalis 30 Tage p.op. war der Unterschied zwischen den beiden Gruppen signifikant ($p = 0,0062$, Abb. 57). Jedoch war auch in der Distractionsgruppe zu diesem Zeitpunkt nur vereinzelt eine Mineralisation des Kallus über mehr als die halbe Distractionsstrecke nachweisbar (Abb. 57).

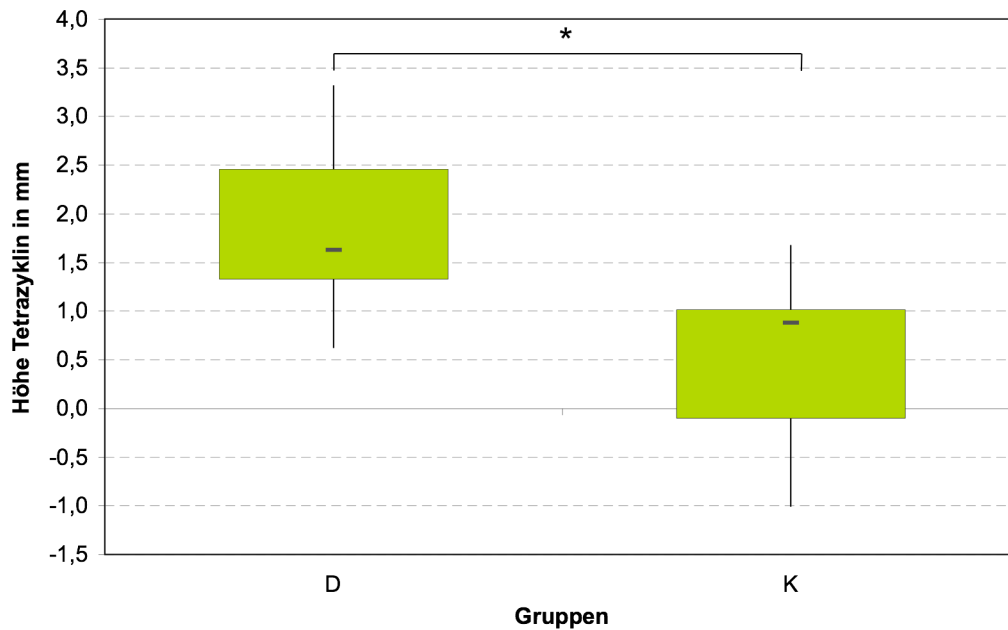


Abb. 57: Vergleich der Höhe der Tetrazyklinfront zwischen Distractionsgruppe (D; n = 9) und Kontrollgruppe (K; n = 9); * = $p < 0,05$. Das Mineralisationsbild entspricht den Verhältnissen ca. 30 Tage p.op.

Der größte Unterschied zwischen den beiden Gruppen in Bezug auf die Mineralisation des Kallus zeigte sich am Tötungszeitpunkt 70 Tage p.op. (Abb. 58). Die ermittelten Werte entsprachen der Höhe der Knochenzapfen in der Distractionsgruppe bzw. der Höhe der unregelmäßigen Kallusreaktion in der Kontrollgruppe zu Versuchsende.

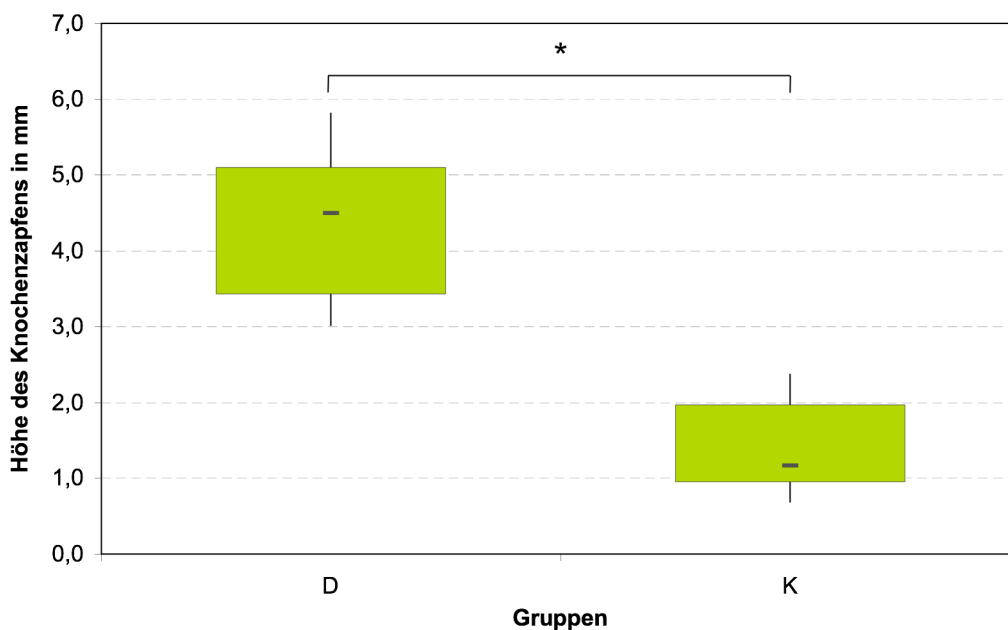


Abb. 58: Vergleich der Höhe des knöchernen Kallus zwischen Distractionsgruppe (D; n = 9) und Kontrollgruppe (K; n = 9); * = $p < 0,05$; Das Mineralisationsbild entspricht den Verhältnissen zum Tötungszeitpunkt 10 Wochen p.op.

3.7 Ergebnisse des Zusatzversuchs

Bei den im Zusatzversuch operierten Schafen, bei denen auf die Bohrungen in den Markraum verzichtet wurde, zeigte sich der Einfluss der den Markraum eröffnenden Bohrungen auf die Kallusbildung. Bei Schaf 784, bei dem die Titanplatte nach dem Protokoll der Distractionsgruppe distrahiert wurde, haftete die Titanplatte fest am seitlich der Platte entstandenen knöchernen Kallus. Diese knöchernen Kallusanteile seitlich der Titanplatte sind durch den distraktionsbedingten Dehnungsreiz auf die Periostschnittkante zu erklären. Unter der Platte war nur Gewebe von bindegewebiger Dichte zu finden (Abb. 59). Das Ergebnis zeigte somit, dass sowohl die Blutgefäßversorgung aus den Markraumgefäßen, als auch die Blutgefäßversorgung über Periost und Bindegewebe wichtig ist für den Aufbau eines belastungsfähigen Kallus.

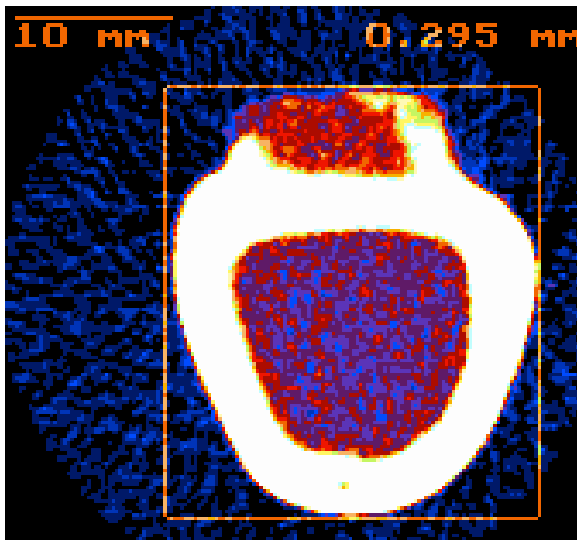


Abb. 59: pQCT-Schnitt zur Darstellung der geweblichen Zusammensetzung des Kallusregenerats von Schaf 784, welches ohne die den Markraum eröffnenden Bohrungen einer Distractionsbehandlung unterzogen wurde. Unter der Plattenauflagefläche ist größtenteils Bindegewebe, nur seitlich der Platte sind knöchernen Strukturen nachweisbar.

4 Diskussion

Mit der vorliegenden Studie konnte erstmals eine dehnungsinduzierte Knochenneubildung mit Hilfe eines synthetischen Implantats durch Distraction lateral zur kortikalen Oberfläche des Knochens erreicht werden. Die Hypothese, dass es, analog zur klassischen Kallusdistraction, auch zwischen synthetischer Materialoberfläche und Knochenoberfläche zur Knochenneubildung durch einen Distractionreiz kommt, konnte somit bewiesen werden. Die osteokonduktive HA-beschichtete Titanplatte eignete sich, um eine Knochenneubildung an der kortikalen Oberfläche des Knochens durch Distraction zu induzieren.

Die übereinstimmenden Ergebnisse aller Teiluntersuchungen zeigten, dass das gewählte Tiermodell und das Osteosyntheseverfahren sowie alle anderen Versuchsparameter geeignet waren, um den Beweis der Durchführbarkeit des neuen Distractionverfahrens erbringen zu können. Durch das neue laterale Distractionverfahren ließ sich mechanisch belastbarer Knochen erzeugen. Der Nachweis der Beständigkeit des neu entstandenen Knochens muss in weiterführenden Studien über einen längeren Versuchszeitraum noch erbracht werden.

Bemerkenswert ist die Tatsache, dass der durch laterale Distraction entstandene neue Knochen rein desmalen Ursprungs ist. Diese Form der direkten Osteogenese ist für die Kallusdistraction charakteristisch, in Reinform ohne Areale der indirekten enchondralen Ossifikation aber nur selten zu beobachten (Ilizarov 1990; Aronson 1991; Gaggl et al. 2000; Amir et al. 2006b). Bereits Ilizarov konnte bei stabiler Konfiguration seines Fixateur externe ebenfalls direkte Osteogenese ohne Knorpelformation erreichen (Ilizarov 1990). Die rein desmale Ossifikation in der vorliegenden Studie ist durch die hohe Stabilität der Osteosyntheseanordnung zu erklären. Der Knochen musste bei dem neuen Verfahren nicht durchtrennt werden und wurde zudem durch einen sehr stabilen Fixateur externe gestützt. Da die desmale Osteogenese nur bei guter Sauerstoffsättigung des Gewebes im Distractionsspalt stattfindet, belegt der Befund auch eine ausreichende Blutgefäßversorgung des Kallusregenerats.

In der folgenden Diskussion sollen alle relevanten Ergebnisse der Studie, die Versuchsparameter und mögliche klinische Einsatzgebiete des Verfahrens sowie konkurrierende Verfahren diskutiert werden.

4.1 Diskussion der Ergebnisse

Die Ergebnisse der Teiluntersuchungen zeigen allesamt einen deutlichen Unterschied in der Kalluszusammensetzung und dem Kallusvolumen der beiden Gruppen. Bei den Tieren der Distraktionsgruppe war radiologisch, histologisch und im CT ein weit größeres Volumen an knöchernem Kallus nachweisbar.

Die Knochenmineraldichte und das Volumen des knöchernen Kallus wurden mittels pQCT bestimmt. Die Bestimmung dieser Parameter im pQCT ist eine zuverlässige Methode um den Mineralisierungsgrad des Kallus bestimmen zu können. Zudem kann die mechanische Stabilität des Kallusregenerats aufgrund der im pQCT gewonnenen Daten bereits abgeschätzt werden (Augat et al. 1997). In der vorliegenden Studie wurden pro Knochenprobe nur drei pQCT-Schnitte erstellt. Grund für diese geringe Anzahl an Schnitten war das Bestreben, die Knochenproben nur möglichst kurz in die CT-Röhre einspannen zu müssen. Dadurch sollte eine einsetzende Autolyse der Präparate vor den noch ausstehenden histologischen und biomechanischen Auswertungen minimiert werden. In der pQCT-Auswertung konnte für die knöchernen Kallusanteile in der Kontrollgruppe ein gegenüber der Distraktionsgruppe geringfügig höherer Wert für die Knochenmineraldichte nachgewiesen werden. Der knöcherne Kallus in der Kontrollgruppe war jedoch von weit geringerem Volumen als der Kallus in der Distraktionsgruppe und beschränkte sich auf den Bereich direkt über der Kortikalis. Die höhere Dichte bei gleichzeitig niedrigerem Volumen kann durch die Struktur des Kallus in der Kontrollgruppe erklärt werden. Die Schafe der Kontrollgruppe zeigten direkt über der plangefrästen Kortikalis eine ausgeprägte, dichte aber wenig voluminöse Kallusreaktion. Schafe zeigen aufgrund ihrer gegenüber dem Menschen größeren Stoffwechselaktivität und ihres ausgeprägten regenerativen Potentials eine deutliche Reaktion auf durch experimentelle Manipulation gesetzte Schäden an Periost und Knochen (Stürmer und Schuchardt 1980). Die unregelmäßige und ungerichtete Kallusreaktion in der Kontrollgruppe ist deshalb sicherlich auf die Irritation des gefensterten Periosts bzw. der plangefrästen Kortikalis zurückzuführen. Das Ergebnis der hohen Knochendichte in der Kontrollgruppe direkt über der Kortikalis, konnte auch in der histologischen Auswertung und durch die in der biomechanischen Testung ermittelten hohen Steifigkeitswerte der Knochenproben der Kontrolltiere in kortikalisnahen Bereichen bestätigt werden.

Als wichtigstes Ergebnis der CT-Auswertung kann jedoch das signifikant höhere Volumen an knöchernem Kallus in der Distraktionsgruppe angesehen werden. Bei einigen Tieren der Distraktionsgruppe war der Kallus fast komplett knöchern durchbaut. Dies konnte auch in den exemplarisch erstellten dreidimensionalen μ -CT-Bildern dargestellt werden.

Durch die biomechanische Testung sollten Erkenntnisse über die mechanische Stabilität des Kallusregenerats gewonnen werden. Die biomechanische Testung stellt eine verlässliche Methode dar, die Steifigkeit von Kallus- oder Knochenproben zu ermitteln (Li et al. 2007). Die Ergebnisse der Eindrücktests zeigten, dass der entstandene Kallus in der Distraktionsgruppe mechanisch noch wenig belastbar ist. Dies ist durch die spongiöse Struktur des Kallus zu erklären. Bei fortschreitendem Umbau des Kallus in Lamellenknochen ist jedoch auch mit einer zunehmenden mechanischen Belastbarkeit des Kallusregenerats zu rechnen. Im Vergleich zu einer Studie über die Eindrücksteifigkeit von Frakturkallusproben zeigte der entstandene Kallus eine geringere Eindrücksteifigkeit (Augat et al. 1996). Aufgrund unterschiedlicher Versuchsparameter (Druckstempeldurchmesser, Kallusscheibendicke usw.) sind die Werte der aktuellen Studie mit anderen Studien zur Eindrücksteifigkeit aber nur bedingt zu vergleichen. In der Distraktionsgruppe war bei den Werten für die Steifigkeit des neuen Knochens in den Bohrlöchern eine große Streuung zu beobachten. Dies ist vermutlich auf die in einigen Bohrlöchern vorzufindenden großen Blutgefäßkanäle zurückzuführen. Die Osteozyten in den Bohrlöchern waren interessanterweise in Distraktionsrichtung ausgerichtet, also quer zum Verlauf der Osteozyten in der Kortikalis. Diese Ausrichtung der Knochenzellen in den Bohrlöchern quer zur Kortikalis war auch in der Kontrollgruppe zu beobachten. In einer früheren Studie zur knöchernen Regeneration in größeren Bohrlochdefekten wurde am Defektrand ebenfalls eine Orientierung entlang der Bohrlochwand, also senkrecht zur Knochenlängsachse gefunden. Die Auffüllung des Bohrlochdefekts im Zentrum erfolgte dort aber mit unregelmäßig orientiertem Knochen und anschließendem Knochenumbau zu Lamellenknochen mit in Längsrichtung des Knochens ausgerichteten Osteonen (Claes et al. 1995).

In der histologischen Auswertung konnte das Kallusgewebe quantitativ und qualitativ genauer beurteilt werden. Neben den quantitativen Unterschieden des knöchernen Kallusanteils zwischen den beiden Gruppen war hier vor allem die rein desmale Osteogenese bemerkenswert. Sowohl in den Bohrlöchern beider Gruppen, als auch in den knöchernen Kallusanteilen waren keine Areale enchondraler Osteogenese zu finden. Dieses Ergebnis stimmt mit Beobachtungen von Ilizarov überein, der bei Distraction unter stabiler Anordnung der Ringe seines Fixateur externe ebenfalls rein desmale Osteogenese beobachten konnte (Ilizarov 1990). Für das Ossifikationsverhalten im Bohrlochdefekt konnte dies auch in Studien von Claes et al. gezeigt werden (Claes et al. 1995). In einer Studie von Gaggl et al. zur lateralen Distraction eines implantattragenden Knochenfragments am Kieferkamm konnte

überwiegend desmale Ossifikation mit nur vereinzelten Arealen enchondraler Osteogenese gezeigt werden (Gaggl et al. 2000).

Mittels der fluoreszenzhistologischen Untersuchung konnte ein Bild über den Mineralisierungsgrad des Kallus zu verschiedenen Zeitpunkten gewonnen werden.

Die in beiden Gruppen bei der Messung der Calceingrün- bzw. Tetrazyklinhöhen teils ausbleibenden Anfärbungen im Kallusbereich resultieren aus der Tatsache, dass zu den Einlagerungszeitpunkten der beiden Fluoreszenzfarbstoffe die Mineralisationsfront teilweise noch nicht über die Bohrlöcher hinausreichte. Die Ergebnisse der fluoreszenzhistologischen Untersuchung zeigten, dass der größte Teil der Mineralisation des Distraktionskallus erst in der Konsolidierungsphase nach Beendigung der Distraction stattfand.

Die Ergebnisse der Zusatzstudie mit Distraktionsbehandlung ohne die den Markraum eröffnenden Bohrungen zeigten, dass eine Knochenbildung unter der Platte nur durch einen Anschluss an die Gefäße des Markraums möglich ist. Auch in der Frakturheilung wird von einigen Autoren der Markraumdurchblutung die Hauptaufgabe im Heilungsprozess zugeordnet (Rahn 1976; Shapiro 1988). Die an der Schnittkante des Periosts entstandenen Knochenzapfen belegen jedoch, dass ein Teil des neu gebildeten Knochens auch auf das osteogenetische Potential des Periosts zurückzuführen ist.

4.2 Diskussion der Methodik

4.2.1 Tiermodell

Für die Prüfung des neuen Verfahrens war es wichtig, ein Versuchstier zu wählen, dessen knöcherne Regenerationsprozesse denen des menschlichen Knochens weitestgehend entsprechen. Schafe und Hunde gelten, was diese knöchernen Regenerationsprozesse betrifft, als dem Menschen am ähnlichsten (Lippuner et al. 1992). Das ovine Skelett hat zudem ähnliche Ausmaße wie das humane Skelett und auch die mechanischen Belastungen sind durch das ähnliche Körpergewicht mit denen des Menschen vergleichbar (Stürmer 1987; Newman et al. 1995). Schafe und Menschen zeigen außerdem ein ähnliches Bild des Einwachsens von Knochen in poröse Implantate (Willie et al. 2004). Schafe haben jedoch eine gegenüber dem Menschen signifikant höhere Knochendichte (Liebschner 2004), was bei der Bewertung der Ergebnisse der CT-Messungen berücksichtigt werden muss. Beim Schaf muss insbesondere die höhere Stoffwechsellkapazität und die damit verbundene größere Heilungskapazität beachtet werden (Stürmer und Schuchardt 1980; Claes 1992). Für den Versuch wurden deshalb Tiere mit einem vergleichsweise hohen Durchschnittsalter

verwendet, deren knöcherne Regenerationsfähigkeit im Vergleich zu juvenilen Tieren herabgesetzt ist. Jüngere Individuen haben ein höheres osteogenes Potential. Aus klinischen Studien ist bekannt, dass der juvenile Knochen den Vorteil einer schnelleren Osteogenese bietet (Fischgrund et al. 1994). Durch das hohe Durchschnittsalter der Tiere konnte somit eine Annäherung an die Situation beim Menschen erreicht werden. Zudem deuten die Ergebnisse darauf hin, dass die laterale Kallusdistraktion mit einem synthetischen Implantat auch für den älteren Patienten eine vielversprechende Behandlungsmethode sein könnte.

Das Schaf hat sich als Versuchstier für Studien zur Kallusdistraktion bewährt (Steen und Fjeld 1989; Reichel et al. 1998; Claes et al. 2000a; Gaggl et al. 2000; Hente et al. 2004). Zudem kann am Institut für Unfallchirurgische Forschung und Biomechanik der Universität Ulm auf langjährige Erfahrung mit Studien am Schaf zurückgegriffen werden (Claes et al. 1985; Claes et al. 1997; Claes et al. 2000a; Augat et al. 2003; Schorlemmer et al. 2003; Claes et al. 2008). Aufgrund dieser Tatsachen wurde das Schaf auch in der vorliegenden Studie als Versuchstier gewählt. Um möglichst ähnliche physiologische und anatomische Gegebenheiten zu erreichen wurden ausschließlich Bayrische Bergschafe verwendet. Die Tiere wurden allesamt aus derselben Zucht bezogen.

4.2.2 Modell und Versuchsparameter

Da es sich bei dem in der Studie untersuchten Verfahren um einen ganz neuen Ansatz zur Knocheninduktion handelt, konnte bei der Wahl der Versuchsparameter nur eingeschränkt auf die Erfahrungen experimenteller und klinischer Studien der klassischen Kallusdistraktion zurückgegriffen werden. Es gelang jedoch auf Anhieb, geeignete Versuchsparameter für eine erfolgreiche Distraktionsbehandlung mit dem synthetischen Implantat zu wählen.

Bei der Distraktion mittels eines Implantats ist im Gegensatz zur klassischen Kallusdistraktion nur eine osteoinduktive Knochenfläche vorhanden. Für den Erfolg des Konzeptes war es somit wichtig, die Oberfläche des Implantats für Knochenzellen so attraktiv wie möglich zu gestalten. Als Implantat wurde eine Titanplatte mit rauer Oberfläche und einer HA-Beschichtung gewählt. Eine Übertragung der Distraktionsreize auf den Raum zwischen der Knochenoberfläche und dem Implantat kann nur erreicht werden, wenn sich an der Implantatoberfläche Knochen oder zumindest eine geeignete bindegewebige Struktur anlagern kann. Von Titan ist bekannt, dass es eine gute Biokompatibilität aufweist und dass sich Knochenzellen ohne bindegewebige Zwischenschicht an seiner Oberfläche anlagern können (Wintermantel und Ha 1996; Ignatius et al. 1997). Für ein gutes Einwachsen von Knochenzellen, hat sich eine raue Titanoberfläche als besonders günstig erwiesen (Groessner-

Schreiber und Tuan 1992). Durch die Beschichtung der rauen Titanoberfläche mit Hydroxylapatit sollte die Attraktivität der Titanoberfläche für Knochenzellen erhöht werden. Beim Hydroxylapatit ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$) handelt es sich um ein langsam resorbierbares Kalziumphosphat mit osteokonduktiven Eigenschaften. Durch die bioaktive HA-Beschichtung kann eine innige Verbindung zwischen Implantatmaterial und Gewebe erreicht werden (Ducheyne und Qiu 1999). In Studien von Soballe et al. konnte gezeigt werden, dass eine Hydroxylapatitbeschichtung die Knochenbildung sogar bei einem Abstand von 1 mm zwischen Knochen und Implantat fördert. Dies ist sowohl bei stabiler als auch bei unstabiler Fixierung der Fall (Soballe et al. 1992; Soballe 1993).

Um eine Blutgefäßversorgung auch ausgehend vom extraossären Bindegewebe zu ermöglichen, wurde die Titanplatte zusätzlich mit Löchern versehen (Abb. 5). Die Löcher in der Titanplatte sollten eine bei der Frakturheilung auftretende „extraossäre Blutversorgung“ des Kallus ausgehend von den periossären Bindegewebsstrukturen ermöglichen (Rhineland 1974). Bei der Präparation der Proben konnten bindegewebige bzw. knöcherne Strukturen in diesen Löchern der Titanplatte nachgewiesen werden. Diese Strukturen verstärkten den Kontakt zwischen Platte und Kallus. Die Strukturen in den Löchern der Platte wurden bei der Ablösung der Platte vom Kallus jedoch stark beschädigt. Deshalb konnte der sichere Nachweis einer Blutgefäßversorgung ausgehend vom periossären Bindegewebe nicht erbracht werden.

Der Fixateur externe zur Befestigung der Titanplatte am Knochen konnte mittels der beiden Schanzschen Schrauben gut im diaphysären Knochen verankert werden. Insgesamt kann aufgrund der fehlenden Osteotomie von einem sehr stabilen System ausgegangen werden. Auswirkungen der physiologischen Gliedmaßenbelastung auf den distrahierten Bereich waren somit weder im Sinne erwünschter axialer Mikrobewegungen noch im Sinne unerwünschter Scherbewegungen in größerem Umfang zu erwarten gewesen. Die hohe Stabilität des Systems und die fehlende Stimulation des Regenerates durch eine belastungsbedingte zyklische Verformung ist eine mögliche Ursache für die lange Zeit bis zur Mineralisation und Konsolidierung des Kallus.

Bei den bisherigen Studien zur Kallusdistraction wurden die Substrukturen des Knochens (Osteone, Canaliculi) durch die Osteotomie oder Kortikotomie stets eröffnet. Dadurch war eine Freisetzung von Zellen und biologischen Faktoren aus der Matrix und den eröffneten Gefäßen gewährleistet. In der vorliegenden Studie sollte diese Eröffnung der Substrukturen des Knochens und die Blutversorgung des Kallusregenerates durch eine Resektion des Periosts und ein Anfräsen der kortikalen Oberfläche erreicht werden. In einer Studie zur

lateralen Distraction eines Knochensegments von Matsuyama et al. wurde das Periost über dem zu distrahierenden Kortexfragment wieder vernäht (Matsuyama et al. 2005). Dies brachte den Vorteil, dass das gesamte osteogene Potential des Periosts in Form seiner inneren, osteoblasten- und gefäßreichen Kambiumschicht über dem Distractionsfragment erhalten werden konnte. Der Nachteil dieser Vorgehensweise war jedoch, dass der Distractionsreiz auch auf das extrem schmerzempfindliche Periost übertragen wurde. Die Distraction war in der Studie von Matsuyama et al. deshalb nur unter andauernder Schmerzmedikation durchführbar (Matsuyama et al. 2005). In der vorliegenden Studie wäre ein Vernähen des straff am Knochen anliegenden Periosts über der Titanplatte nicht möglich gewesen. Durch die Eigenhöhe der Titanplatte wäre der Abstand zum Knochen für eine Naht zu groß gewesen. Auch die Tatsache, dass beim Schaf allein schon eine mechanische Reizung des Periosts zu einer ausgeprägten Kallusreaktion führt, die beim humanen Patienten in diesem Maße nicht zu beobachten ist, rechtfertigt die vorgenommene Resektion des Periosts. Um trotzdem eine ausreichende Gefäßversorgung des Kallusregenerats zu gewährleisten, wurde durch Bohrungen in den Markraum eine Blutgefäßversorgung, ausgehend von den Markraumgefäßen, ermöglicht. Die Bedeutung dieser vom Markraum ausgehenden Blutgefäßversorgung konnte durch die ausbleibende Kallusbildung bei dem Tier der Zusatzstudie ohne die den Markraum eröffnenden Bohrungen belegt werden. Ein alleiniges Anfräsen der Kortikalis konnte bei diesem Tier kein zufriedenstellendes Distractionsergebnis bewirken. Der Bereich unter der Titanplatte wurde hier nur bindegewebig aufgefüllt.

Ein weiterer für den Erfolg der Distractionsbehandlung wichtiger Faktor ist die Latenzzeit bis zum Beginn der Distraction. Bei der klassischen Kallusdistraction beträgt sie fünf bis zehn Tage (Ilizarov 1990; Yasui et al. 1993; Hankemeier et al. 2004). Während der Latenzzeit beginnt die Osteoidbildung an periostalen Oberflächen. Die in der Literatur angegebenen Zeitfenster für die Latenzzeit beziehen sich jedoch allesamt auf Distractionsanordnungen mit zwei knöchernen und somit osteoinduktiven Grenzflächen. Aufgrund der Tatsache, dass in der vorliegenden Arbeit auf der einen Seite zwar eine osteoinduktive Knochenfläche, auf der anderen Seite jedoch nur eine allenfalls osteokonduktive synthetische Materialoberfläche vorlag, wurde eine vergleichsweise lange Latenzzeit von zehn Tagen festgelegt.

In der Literatur zur Distractionsosteogenese wird für den diaphysären Knochen eine Distractionsrate zwischen 0,5 – 1 mm pro Tag angegeben, wobei bei einer Rate von 1 mm pro Tag die besten Ergebnisse erzielt wurden (Ilizarov 1989b; Aronson 1991; Yasui et al. 1993;

Aronson 1994b; Li et al. 1997). Bei der lateralen Kallusdistraction wurden meist ebenfalls Distaktionsraten von 0,5 – 1 mm pro Tag gewählt (Ilizarov 1989a; Block et al. 1996; Ayoub et al. 2001; Matsuyama et al. 2005; Nosaka et al. 2005; Amir et al. 2006b; Amir et al. 2006a). Bessere Distaktionsergebnisse lassen sich grundsätzlich durch eine höhere Distaktionsfrequenz, d.h. eine Distraction in mehreren kleinen Verschiebungen pro Tag, oder idealerweise durch eine kontinuierliche Distraction erzielen (Wiedemann 1994). Aufgrund dieser Erkenntnisse und wiederum der Tatsache Rechnung tragend, dass im vorliegenden Ansatz nur eine Knochenfläche die Osteoidbildung übernehmen kann, wurde die Titanplatte zweimal täglich um 0,266 mm vom Knochen weg distrahiert.

Die Zeitspanne für die an die zehntägige Distaktionszeit anschließende Konsolidierungsphase wird in der Regel doppelt so lange gewählt wie die Distaktionszeit (Ilizarov 1990). Während der Konsolidierungszeit schreitet die Mineralisation des Kallus rasch voran. Aus anderen Studien ist bekannt, dass die Mineralisation des Kallus ca. sieben bis acht Wochen post distractionem ihren Höhepunkt erreicht (Reichel et al. 1998; Matsuyama et al. 2005). In der vorliegenden Studie wurde anfangs eine Konsolidierungszeit von 20 Tagen festgelegt. Bei röntgenologischen Untersuchungen zeigte sich jedoch, dass das Kallusregenerat nach dieser Zeit noch kaum verknöchert war. Die Konsolidierungszeit wurde deshalb auf 50 Tage verlängert. Die vergleichsweise lange Konsolidierungszeit ist wie schon erwähnt vermutlich auf die mangelnde mechanische Stimulation des Kallusregenerates zurückzuführen. Um die Konsolidierungszeit des Kallus zu verkürzen, müsste das Kallusregenerat in weiteren experimentellen Studien gezielten zyklischen Verformungen ausgesetzt werden. Eine kontrollierte Destabilisierung und Dynamisierung der Osteosyntheseanordnung, bzw. eine gezielte Distraction und Kompression des lateral distrahierten Kallus könnte analog zu den Erfahrungen aus der klassischen Kallusdistraction zu einer Verbesserung des Distaktionsergebnisses mit einer schnelleren Konsolidierung des Kallus führen (Ilizarov 1967; Aro und Chao 1990; Ilizarov 1990; Aronson 1994a; Claes et al. 2000a; Claes et al. 2008).

Eine Untersuchung aller Kombinationen dieser für den Distaktionserfolg wichtigen Einflussfaktoren hätte einen erheblichen tierexperimentellen Aufwand bedeutet. Allerdings ist es auf Anhieb gelungen, Distaktionsbedingungen zu wählen, die den Beweis der Durchführbarkeit des neuen Verfahrens erbringen konnten. Eine weitere Optimierung der Distaktionsbedingungen ist vor dem klinischen Einsatz der Methode jedoch unabdingbar.

Insbesondere eine Verkürzung der Fixateurtragezeit durch eine schnellere Konsolidierung des Distraktionskallus sollte angestrebt werden.

4.3 Chancen des Verfahrens und Ausblick

Die klassische Kallusdistraktion hat wie bereits erwähnt schon vielfach gezeigt, dass eine Schließung von Knochendefekten allein durch eine Stimulation der körpereigenen Knochenbildungsfähigkeiten möglich ist. Das neue laterale Distraktionsverfahren ermöglicht die Behandlung einer Vielzahl von Knochendefekten, die nach dem bisherigen Verfahren der Kallusdistraktion nicht oder nur unbefriedigend behandelt werden konnten. Durch die Verwendung von an die Knochenoberfläche angelegten Implantaten kann Knochen dadurch zukünftig auch ohne Kortikotomie oder Osteotomie lateral zur Achse des Knochens aufgebaut werden.

Vor allem Knochendefekte, die nicht den gesamten Querschnitt des Röhrenknochens betreffen, könnten mit dem neuen Verfahren behandelt werden. Solche Defekte treten z.B. nach einer Tumorresektion oder traumatisch bedingten Knochensubstanzverlusten auf. Aber auch Knochendefekte an nicht röhrenförmigen Knochen können durch das neue Distraktionsverfahren behandelt werden und unzureichende Knochensubstanz bedingt durch Defekt oder Atrophie, kann neu aufgebaut werden. Bislang wird bei derartigen Knochendefekten versucht, den Mangel an gesundem Knochen z.B. durch das Einbringen von autogenen, allogenen oder xenogenen Knochentransplantaten zu beseitigen. Autologe Knochentransplantate besitzen die höchste biologische Wertigkeit, als nachteilig erweisen sich aber hier die begrenzte Verfügbarkeit sowie die Schmerzen und die Infektionsgefahr am Entnahmeort der Transplantate (Gerngroß et al. 1982). Bei allogenen und xenogenen Knochentransplantaten muss ebenfalls auf die Infektionsgefahr und zudem auf die Gefahr eventueller Abstoßungsreaktionen hingewiesen werden (Chiapasco et al. 2006b). Synthetische Knochenersatzmaterialien befinden sich in experimenteller und klinischer Testung. Sie werden jedoch meistens mit autogenen Knochentransplantaten gemischt, um deren Volumen zu vergrößern. Zudem werden sie bislang nur sehr langsam resorbiert und die Wiederherstellung der normalen Knochenstruktur benötigt oft viele Jahre (Chiapasco et al. 2006b).

Insgesamt weisen alle konkurrierenden Verfahren des Knochenzugewinns erhebliche Nachteile und Probleme auf. Somit ist das neue, in dieser Studie vorgestellte Verfahren eine vielversprechende Alternative. Durch das neue Verfahren kann an beinahe jeder Stelle des Skelettes neuer Knochen aufgebaut werden. Neben dem Aufbau von Knochen am Ort des

Defekts oder der Atrophie ist auch ein Knochenaufbau an jeder anderen geeigneten Stelle des Skeletts mit anschließender Transplantation denkbar. Eine Schwächung der Entnahmestelle wäre nicht zu erwarten, da der entnommene Knochen an der Knochenoberfläche zusätzlich gebildet wurde. Aus Studien mit Knochentransplantaten ist bekannt, dass Transplantate desmalen Ursprungs eine höhere Überlebensrate zeigen als Transplantate enchondralen Ursprungs (Lin et al. 1990). Der durch desmale Ossifikation entstandene neue Knochen ist somit von hoher biologischer Wertigkeit.

Da es in der Literatur keine vergleichbaren Arbeiten gibt und es sich um ein komplett neues Verfahren handelt, kann die klinische Relevanz der Ergebnisse nur durch den Vergleich mit bestehenden Verfahren des Knochenersatzes beurteilt werden. Das neue laterale Distraktionsverfahren ist vor allem für den Ausgleich von ossären Defiziten am Kieferkamm eine vielversprechende Alternative zu den etablierten Behandlungsverfahren. Bislang wird dort ein Knochenaufbau über verschiedene Behandlungsverfahren versucht, die aber allesamt komplikationsreich sind (Chiapasco et al. 2006b).

Eine schon lange etablierte Methode des Knochenzugewinns stellt die Distraktionsosteogenese (DO) auch im Kieferbereich und bei der Korrektur von kraniofazialen Deformitäten dar, weshalb sie hier beispielhaft erwähnt werden soll. Nach Osteotomie am Kieferkamm ist durch intraorale intraossäre oder intraorale extraossäre Distraktoren eine natürliche Knochenformation in kurzer Zeit möglich (Gaggl et al. 2000; Rachmiel et al. 2001; Jensen et al. 2002; Raghoobar et al. 2002; Chiapasco et al. 2006a). Die Autoren konnten bei Distraktionsraten von 0,5 – 1 mm pro Tag einen vertikalen Knochenzugewinn von 3 – 15 mm erzielen. Vorteile der DO sind die geringere Morbidität aufgrund nicht notwendiger Implantatentnahme, die Steuerbarkeit des Knochenzugewinns, die Einsetzbarkeit bei einer Vielzahl von Defekten und die Tatsache, dass das Weichgewebe die Dehnung mitgehen kann (Chin und Toth 1996; Rachmiel et al. 2001; Raghoobar et al. 2002; Chiapasco et al. 2004). Von Nachteil bei den bisher beschriebenen klassischen Distraktionsverfahren sind die benötigte Osteotomie, die Gefahr der Sequesterbildung und die lange Behandlungsdauer.

Im Gegensatz dazu kann bei dem vorgestellten neuen Distraktionsverfahren auf eine Osteotomie verzichtet werden und zudem ist eine Knochenneubildung an beinahe jeder Lokalisation denkbar. An der Maxilla z.B. ist durch den pneumatisierten Sinus oft nicht genügend kortikaler Knochen zur Gewinnung eines Transportsegments vorhanden. Mit dem konventionellen Distraktionsverfahren konnten deshalb meist nur mandibuläre Defekte behandelt werden. Durch ein geeignetes synthetisches Implantat könnten mit dem neuen

Verfahren auch maxilläre Knochendefekte behandelt werden. Denkbar wäre weiterhin der Einsatz von genau an die Knochenoberfläche angepassten synthetischen, eventuell sogar resorbierbaren formbeständigen Implantaten. Die Kombination mit einer multidirektionalen Distraktionsapparatur, welche eine Modifikation des Distraktionsvektors in die verschiedenen Ebenen des Raumes ermöglicht, wäre ebenfalls denkbar.

Das neue Distraktionsverfahren ermöglicht außerdem bei der vertikalen Erhöhung des Kieferkamms und der horizontalen Verbreiterung schmaler Kieferabschnitte ganz neue Ansätze. Durch auf bestehenden Zähnen befestigte Distraktionsapparaturen könnte ein vertikaler bzw. horizontaler Knochenaufbau mit Hilfe eines synthetischen Implantates an atrophierten oder durch Tumorresektion geschwächten Kieferabschnitten erreicht werden. Dadurch könnte wieder ausreichend Knochen für eine Insertion von Zahnimplantaten erzeugt werden.

Alles in Allem eröffnet das neue Verfahren eine Vielzahl neuer Perspektiven für die Behandlung von Knochendefekten. Ziel muss es nun sein, die Versuchsparameter zu optimieren, damit eine zuverlässige und komplikationsarme klinische Anwendung des Verfahrens möglich wird.

4.4 Schlussfolgerungen

Aufgrund der Ergebnisse dieser Studie konnte gezeigt werden, dass sich durch laterale Distraction eines synthetischen Implantats Knochen lateral auf einer bestehenden Knochenoberfläche erzeugen lässt. Bei dem neugebildeten Knochen handelt es sich um ein knöchernes Gewebe, das ähnlich wie Spongiosa mit vielen Blutgefäßen und Knochenmark durchsetzt ist. Die biomechanische Qualität dieses jungen Knochens ist noch beschränkt. Bemerkenswert ist die Tatsache, dass der entstandene Distraktionskallus durch rein desmale Ossifikation entstanden ist und keine Anzeichen einer unerwünschten enchondralen Ossifikation zu finden waren. Eine wichtige Voraussetzung für das Gelingen des Verfahrens ist eine gute Versorgung des Distraktionsortes mit Blutgefäßen und pluripotenten Zellen. Diese wurde im vorliegenden Experiment durch das Anbohren des Markraumes gewährleistet.

Die Ergebnisse zeigen erstmals, dass eine Kallusdistraction auch ohne Kortikotomie oder Osteotomie mit Hilfe eines distrahierbaren Implantates möglich ist. Bis zum klinischen Einsatz des Verfahrens bedarf es noch weiterer Untersuchungen zur Abklärung wichtiger Fragestellungen. Insbesondere die Entwicklung des Distraktionskallus im weiteren zeitlichen

Verlauf und eine mögliche Beschleunigung des Kallusreifungsprozesses durch mechanische Belastung mit Hilfe zyklisch komprimierender Implantate sollten noch untersucht werden. Durch die Ergebnisse der vorgenommenen Zusatzstudie, in der zwei Schafe ohne Markraumb Bohrungen operiert wurden, konnte bereits gezeigt werden, dass sowohl die Markraumb Bohrungen, als auch die periostale Reaktion im Randbereich der Platte für den Erfolg der Distraktionsbehandlung wichtig sind. Weitere experimentelle Untersuchungen sind vor einem klinischen Einsatz des Verfahrens sinnvoll. Nach einer weiteren Optimierung der Versuchsparameter könnte das neue Verfahren eine wichtige Stellung in der Therapie von Knochendefiziten erlangen.

5 Zusammenfassung

Durch Kallusdistraction lässt sich Knochen über eine dehnungsinduzierte Stimulation der körpereigenen Knochenneubildungsmechanismen erzeugen. In allen bisherigen Studien zur Kallusdistraction wurden stets zwei knöcherne Grenzflächen schrittweise voneinander entfernt. Ziel der vorliegenden Studie war die Abklärung der Fragestellung, ob eine dehnungsinduzierte Knochenneubildung durch Kallusdistraction senkrecht zur Knochenlängsachse auch mit Hilfe eines synthetischen Implantates möglich ist. Eine Knochenneubildung sollte ohne Kortikotomie oder Osteotomie lateral zur Achse des Knochens erreicht werden.

Im Tierversuch wurde eine mit HA beschichtete Titanplatte bei weiblichen Bayerischen Bergschafen medial an die Kortikalis der rechten Tibia angelegt und mittels eigens dafür entwickeltem Fixateur externe befestigt. Der Knochen unter der Auflagefläche der Platte wurde zuvor deperiostiert, plangefräßt und anschließend der Markraum mit mehreren 1,1-mm-Bohrungen eröffnet. Nach einer Latenzzeit von zehn Tagen wurde bei den Tieren der Distractionsgruppe die Titanplatte über einen Zeitraum von zehn Tagen zweimal täglich um 0,266 mm vom Knochen weg distrahiert, während sie bei den Tieren der Kontrollgruppe direkt intra operationem auf 5,3 mm Abstand zum Knochen fixiert wurde. Bei den Tieren des Zusatzversuchs wurde auf die den Markraum eröffnenden Bohrungen verzichtet. Alle Tiere wurden zehn Wochen p.op. getötet.

In der Distractionsgruppe konnte zwischen Kortikalis und Titanplatte knöcherner Kallus nachgewiesen werden. Der Kallus war von spongiosaähnlicher Struktur und nur bedingt mechanisch belastbar. In der Kontrollgruppe befand sich zwischen Knochen und Titanplatte größtenteils weiches Bindegewebe und nur direkt über der plangefrästen Kortikalis war hier eine unregelmäßige Kallusreaktion zu beobachten. Diese Unterschiede konnten röntgenologisch, computertomographisch im pQCT, in einer biomechanischen Testung und histologisch bestätigt werden. In der histologischen Gewebedifferenzierung konnte zudem eine rein desmale Ossifikation nachgewiesen werden. Bei den Tieren des Zusatzversuchs befand sich zwischen Titanplatte und Knochen größtenteils Bindegewebe.

Das Ergebnis dieser Studie zeigt damit erstmals, dass eine Kallusdistraction senkrecht zur Knochenlängsachse auch ohne Kortikotomie oder Osteotomie mit Hilfe eines distrahierbaren Implantates möglich ist. Damit kann neuer Knochen zukünftig mit Hilfe eines synthetischen Implantates lateral auf Knochenoberflächen erzeugt werden. Die neue Technik eröffnet der

Distractionsosteogenese somit ein ganz neues Behandlungsspektrum. Vor allem bei Knochendefekten, die nicht den gesamten Querschnitt des Knochens betreffen und bei unzureichender Knochensubstanz insbesondere im Kieferbereich (z.B. bei der vertikalen Alveolarkammerhöhung) ermöglicht das neue Verfahren ganz neue und elegante Therapieansätze.

6 Summary

A new method to achieve lateral bone formation by distraction osteogenesis with a synthetic implant

During distraction osteogenesis tension stress is responsible for the formation of new bone. This was shown for distraction between two bony fragments in numerous studies. The aim of our study was now to achieve bone formation lateral to the bone axis without corticotomy or osteotomy.

In an animal experiment we placed a HA-coated titanium plate medial to the cortex of the right tibia of female mountain sheep. The bone beneath the plate was first deperiostated, planed and afterwards the medullar cavity was opened by 1.1 mm drill holes. In the distraction group after a ten day latency period the plate was distracted away from the bone in steps of two times 0.27 mm per day. For the animals of the control group the plate was fixed at a distance of 5.3 mm from the cortex direct intra operationem. The animals of the additional study group were distracted but operated without drillholes into the medullary cavity.

The animals were sacrificed 10 weeks post operationem.

For the distraction group osseous callus between the cortex and the titanium plate could be found. For the control group there was mostly soft tissue between the bone and the titanium plate. The animals of the additional study group also showed mostly soft tissue between the bone and the titanium plate despite a distraction treatment.

These differences were verified by radiographs, peripheral QCT, biomechanical testing and histology.

The histological tissue differentiation in addition showed only intra-membranous ossification in the distraction group.

The results of this study showed for the first time that bone formation lateral to the bone axis by callus distraction with a synthetical implant is possible. The results open a wide range of new treatment possibilities for bone defects and insufficient amounts of bone by distraction osteogenesis. Bony defects or insufficient bone mass of the alveolar ridge in particular could be treated with the new distraction method.

The results of this study can be seen as a first proof for the feasibility of the new distraction procedure with further research being needed to define the optimal treatment parameters.

7 Literaturverzeichnis

- Aalto, K (1986). "Structural changes in intact tubular bone after application of axial loads by external fixation." *Ann Chir Gynaecol* 75(1): 44-7.
- Aldegheri, R, Renzi-Brivio, L, Agostini, S (1989). "The callotasis method of limb lengthening." *Clin Orthop Relat Res* (241): 137-45.
- Amir, LR, Becking, AG, Jovanovic, A, Perdijk, FB, Everts, V, Bronckers, AL (2006a). "Formation of new bone during vertical distraction osteogenesis of the human mandible is related to the presence of blood vessels." *Clin Oral Implants Res* 17(4): 410-6.
- Amir, LR, Becking, AG, Jovanovic, A, Perdijk, FB, Everts, V, Bronckers, AL (2006b). "Vertical distraction osteogenesis in the human mandible: a prospective morphometric study." *Clin Oral Implants Res* 17(4): 417-25.
- Anderson, LD (1965). "Treatment of Ununited Fractures of the Long Bones; Compression Plate Fixation and the Effect of Different Types of Internal Fixation on Fracture Healing." *J Bone Joint Surg Am* 47: 191-208.
- Aro, HT, Chao, EY (1990). "Effect of Dynamic shear micromotion on fracture healing." *J Orthop Trauma* 4(2): 228.
- Aronson, J (1991). "The Biology of Distraction Osteogenesis." In: Bianchi Maiocchi A., Aronson J. (eds). *Operative principles of Ilizarov*. Willam and Wilkins, Baltimore: 42-52.
- Aronson, J (1994a). "Biological and clinical evaluation of distraction histogenesis." *Clin Orthop Relat Res* (301): 2-3.
- Aronson, J (1994b). "Experimental and clinical experience with distraction osteogenesis." *Cleft Palate Craniofac J* 31(6): 473-81; discussion 481-2.
- Aronson, J, Shen, X (1993). "Experimental healing of distraction osteogenesis comparing metaphyseal with diaphyseal sites." *Clin Orthop Relat Res* (301): 25-30.
- Aronson, J, Shen, X (1994). "Experimental healing of distraction osteogenesis comparing metaphyseal with diaphyseal sites." *Clin Orthop Relat Res* (301): 25-30.
- Augat, P, Burger, J, Schorlemmer, S, Henke, T, Peraus, M, Claes, L (2003). "Shear movement at the fracture site delays healing in a diaphyseal fracture model." *J Orthop Res* 21(6): 1011-7.
- Augat, P, Margevicius, K, Simon, J, Wolf, S, Suger, G, Claes, L (1998). "Local Tissue Properties in Bone Healing: Influence of Size and Stability of the Osteotomy Gap." *J Orthop Res* 16: 475-481.
- Augat, P, Merk, J, Genant, HK, Claes, L (1997). "Quantitative assessment of experimental fracture repair by peripheral computed tomography." *Calcif Tissue Int* 60(2): 194-9.
- Augat, P, Merk, J, Ignatius, A, Margevicius, K, Bauer, G, Rosenbaum, D, Claes, L (1996). "Early, full weightbearing with flexible fixation delays fracture healing." *Clin Orthop Relat Res* (328): 194-202.
- Ayoub, AF, Richardson, W, Koppel, D, Thompson, H, Lucas, M, Schwarz, T, Smith, L, Boyd, J (2001). "Segmental mandibular reconstruction by microincremental automatic distraction osteogenesis: an animal study." *Br J Oral Maxillofac Surg* 39(5): 356-64.
- Baumgart, R, Zeiler, C, Kettler, M, Weiss, S, Schweiberer, L (1999). "Fully implantable intramedullary distraction nail in shortening deformity and bone defects. Spectrum of indications." *Orthopade* 28(12): 1058-65.
- Bier, A (1905). "Die Bedeutung des Blutergusses für die Heilung des Knochenbruches. Heilung von Pseudarthrosen und von verspäteter Callusbildung durch Bluteinspritzung." *Med Klin* 1: 6.

- Bier, A (1923). "Über Knochenregeneration, über Pseudarthrosen und über Knochentransplantate." *Archiv für Klin. Chir* 127 (1923): 1-136.
- Block, MS, Chang, A, Crawford, C (1996). "Mandibular alveolar ridge augmentation in the dog using distraction osteogenesis." *J Oral Maxillofac Surg* 54(3): 309-14.
- Block, W (1923). "Ein neuer Distrkasiionsapparat und Spannbügel für die Drahtextension." *Zentralbl Chir* 46/47: 1688.
- Brand, R, Rubin, C, Eds. (1987). *Fracture Healing*. In: Albright JA, Brand RA (Hrsg). *The scientific basis of orthopaedics*.
- Braun, W, Rueter, A (1996). "Frakturheilung. Morphologische und physiologische Gesichtspunkte." *Unfallchirurg* 99(1): 59-67.
- Brighton, CT (1985). *Principles of fracture healing*. The American Academy of Orthopaedic Surgeons. Instruction Comisse. Leo XXII. The Masky Co., St.Louis.
- Carter, DR, Beaupre, GS, Giori, NJ, Helms, JA (1998). "Mechanobiology of skeletal regeneration." *Clin Orthop* 355: S41-55.
- Carter, DR, Blenman, PR, Beaupre, GS (1988). "Correlations between mechanical stress history and tissue differentiation in initial fracture healing." *J Orthop Res* 6(5): 736-48.
- Chiapasco, M, Ferrini, F, Casentini, P, Accardi, S, Zaniboni, M (2006a). "Dental implants placed in expanded narrow edentulous ridges with the Extension Crest device. A 1-3-year multicenter follow-up study." *Clin Oral Implants Res* 17(3): 265-72.
- Chiapasco, M, Romeo, E, Casentini, P, Rimondini, L (2004). "Alveolar distraction osteogenesis vs. vertical guided bone regeneration for the correction of vertically deficient edentulous ridges: a 1-3-year prospective study on humans." *Clin Oral Implants Res* 15(1): 82-95.
- Chiapasco, M, Zaniboni, M, Boisco, M (2006b). "Augmentation procedures for the rehabilitation of deficient edentulous ridges with oral implants." *Clin Oral Implants Res* 17 Suppl 2: 136-59.
- Chin, M, Toth, BA (1996). "Distraction osteogenesis in maxillofacial surgery using internal devices: review of five cases." *J Oral Maxillofac Surg* 54(1): 45-53; discussion 54.
- Claes, L (1992). "Die Bedeutung des Frakturspalts für die Knochenheilung." *Op-Journal* No 1, Jg 8: 11-15.
- Claes, L, Augat, P, Schorlemmer, S, Konrads, C, Ignatius, A, Ehrnthaller, C (2008). "Temporary distraction and compression of a diaphyseal osteotomy accelerates bone healing." *J Orthop Res*.
- Claes, L, Augat, P, Suger, G, Wilke, HJ (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, Burri, C, Gerngross, H, Mutschler, W (1985). "Bone healing stimulated by plasma factor XIII. Osteotomy experiments in sheep." *Acta Orthop Scand* 56(1): 57-62.
- Claes, L, Laule, J, Wenger, K, Suger, G, Liener, U, Kinzl, L (2000a). "The influence of stiffness of the fixator on maturation of callus after segmental transport." *J Bone Joint Surg Br* 82(1): 142-8.
- Claes, L, Wolf, S, Augat, P (2000b). "Mechanische Einflüsse auf die Kallusheilung." *Chirurg* 71(9): 989-94.
- Claes, LE, Heigele, CA (1999). "Magnitudes of local stress and strain along bony surfaces predict the course and type of fracture healing." *J Biomech* 32(3): 255-66.
- Claes, LE, Heigele, CA, Neidlinger-Wilke, C, Kaspar, D, Seidl, W, Margevicius, KJ, Augat, P (1998). "Effects of mechanical factors on the fracture healing process." *Clin Orthop Relat Res* (355 Suppl): S132-47.
- Claes, LE, Wilke, HJ, Kiefer, H (1995). "Osteonal structure better predicts tensile strength of healing bone than volume fraction." *J Biomech* 28(11): 1377-90.

- Codivilla, A (1904). "On the means of lengthening, in the lower limbs, the muscles and tissues which are shortened through deformity. 1904." *Clin Orthop Relat Res* (301): 4-9.
- Cole, JD, Justin, D, Kasparis, T, DeVlugt, D, Knobloch, C (2001). "The intramedullary skeletal kinetic distractor (ISKD): first clinical results of a new intramedullary nail for lengthening of the femur and tibia." *Injury* 32 Suppl 4: SD129-39.
- De Bastiani, G, Aldegheri, R, Renzi-Brivio, L, Trivella, G (1987). "Limb lengthening by callus distraction (callotaxis)." *J Pediatr Orthop* 7(2): 129-34.
- Delloye, C, Delefortrie, G, Coutelier, L, Vincent, A (1990). "Bone regenerate formation in cortical bone during distraction lengthening. An experimental study." *Clin Orthop Relat Res*(250): 34-42.
- Ducheyne, P, Qiu, Q (1999). "Bioactive ceramics: the effect of surface reactivity on bone formation and bone cell function." *Biomaterials* 20(23-24): 2287-303.
- Einhorn, TA (1992). "The biology of fracture healing." 3rd Conference of the International Society for Fracture Repair, (Brussels, Belgium): 1-15.
- Einhorn, TA (1998). "The cell and molecular biology of fracture healing." *Clin Orthop Relat Res* (355 Suppl): S7-21.
- Fink, B, Pollnau, C, Vogel, M, Skripitz, R, Enderle, A (2003). "Histomorphometry of distraction osteogenesis during experimental tibial lengthening." *J Orthop Trauma* 17(2): 113-8.
- Fischgrund, J, Paley, D, Suter, C (1994). "Variables affecting time to bone healing during limb lengthening." *Clin Orthop Relat Res* (301): 31-7.
- Frost, HM (1989). "The biology of fracture healing. An overview for clinicians. Part I." *Clin Orthop Relat Res*(248): 283-93.
- Gaggl, A, Schultes, G, Regauer, S, Ranftl, G, Kärcher Rasse, H, Dorffner, L, Forkert, G (2000). "Der Heilungsverlauf bei Alveolarkamm distraction. Eine Verlaufsstudie an Schafen." *Acta Chir Austriaca* Vol 32 (No 2): 76-81.
- Garcia, A, Somoza-Martin, M, Gandara-Vila, P, Saulacic, N, Gandara-Rey, JM (2004). "Horizontal alveolar distraction: a surgical technique with the transport segment pedicled to the mucoperiosteum." *J Oral Maxillofac Surg* 62(11): 1408-12.
- Gerngroß, H, Burri, C, Kinzl, L, Merk, J, Müller, GW (1982). "Komplikationen an den Entnahmestellen autologer Spongiosatransplantate." *Akt Traumatol* 12: 146-152.
- Glowacki, J, Shusterman, EM, Troulis, M, Holmes, R, Perrott, D, Kaban, LB (2004). "Distraction osteogenesis of the porcine mandible: histomorphometric evaluation of bone." *Plast Reconstr Surg* 113(2): 566-73.
- Goodship, AE, Kenwright, J (1985). "The influence of induced micromovement upon the healing of experimental tibial fractures." *J Bone Joint Surg [Br]* 67B(4): 650-5.
- Groessner-Schreiber, B, Tuan, RS (1992). "Enhanced extracellular matrix production and mineralization by osteoblasts cultured on titanium surfaces in vitro." *J Cell Sci* 101 (Pt 1): 209-17.
- Guichet, JM, Deromedis, B, Donnan, LT, Peretti, G, Lascombes, P, Bado, F (2003). "Gradual femoral lengthening with the Albizzia intramedullary nail." *J Bone Joint Surg Am* 85-A(5): 838-48.
- Hankemeier, S, Bastian, L, Gosling, T, Krettek, C (2004). "Principles of callus distraction." *Unfallchirurg* 107(10): 945-58; quiz 959.
- Hees, H, Sinowatz, F, Eds. (2000). "Histologie. Kurzlehrbuch der Zytologie und mikroskopischen Anatomie." Deutscher Ärzte-Verlag.
- Hente, R, Fuchtmeyer, B, Schlegel, U, Ernstberger, A, Perren, SM (2004). "The influence of cyclic compression and distraction on the healing of experimental tibial fractures." *J Orthop Res* 22(4): 709-15.

- Ignatius, A, Unterricker, K, Wenger, K, Richter, M, Claes, L, Lohse, P, Hirst, H (1997). "A new composite made of polyurethane and glass ceramic in a loaded implant model: a biomechanical and histological analysis." *J Mater Sci Mater Med* 8(12): 753-6.
- Ilizarov, GA, Ed. (1967). "Arthroplasty of the Major Joints. Invagination Anastomoses. Compression-Distraktion Osteosynthesis." Kurgan, USSR.
- Ilizarov, GA (1989a). "The tension-stress effect on the genesis and growth of tissues: Part II. The influence of the rate and frequency of distraction." *Clin Orthop* (239): 263-85.
- Ilizarov, GA (1989b). "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* (238): 249-281.
- Ilizarov, GA (1990). "Clinical application of the tension-stress effect for limb lengthening." *Clin Orthop Relat Res* (250): 8-26.
- Ilizarov, GA, Lediaev, VI, Shitin, VP (1969). "The course of compact bone reparative regeneration in distraction osteosynthesis under different conditions of bone fragment fixation (experimental study)." *Eksp Khir Anesteziol* 14(6): 3-12.
- Jensen, OT, Cockrell, R, Kuhike, L, Reed, C (2002). "Anterior maxillary alveolar distraction osteogenesis: a prospective 5-year clinical study." *Int J Oral Maxillofac Implants* 17(1): 52-68.
- Junqueira, LC, Carneiro, J, Eds. (1996). "Histologie: Zytologie, Histologie und mikroskopische Anatomie des Menschen unter Berücksichtigung der Histophysiologie." Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York.
- Karp, NS, Thorne, CH, McCarthy, JG, Sissons, HA (1990). "Bone lengthening in the craniofacial skeleton." *Ann Plast Surg* 24(3): 231-7.
- Kenwright, J, Goodship, AE (1989). "Controlled mechanical stimulation in the treatment of tibial fractures." *Clin Orthop Relat Res* (241): 36-47.
- Kenwright, J, Richardson, JB, Goodship, AE, Evans, M, Kelly, DJ, Spriggins, AJ, Newman, JH, Burrough, SJ, Harris, JD, Rowley, DI (1986). "Effect of controlled axial micromovement on healing of tibial fractures." *Lancet* 328(8517): 1185-1187.
- Kirschner, M (1909). "Ueber Nagelextension." *Beitr Klin Chir* 64: 266.
- Kirschner, M (1916). "Die künstliche Verlängerung von Beinen, die nach Frakturen, namentlich nach Schußfrakturen, mit starker Verkürzung geheilt sind." *Beitr Klin Chir* 100: 329.
- Klapp, R (1930). "Die Knochenbruchbehandlung mit Drahtzügen." Urban und Schwarzenberg, Berlin.
- Kojimoto, H, Yasui, N, Goto, T, Matsuda, S, Shimomura, Y (1988). "Bone lengthening in rabbits by callus distraction. The role of periosteum and endosteum." *J Bone Joint Surg Br* 70(4): 543-9.
- Langenbeck, Bv (1869). "Ueber krankhaftes Längenwachstum der Röhrenknochen und seine Verwertung für die chirurgische Praxis." *Berl Klin Wochenschr* 26(265).
- Li, G, Simpson, AH, Kenwright, J, Triffitt, JT (1997). "Assessment of cell proliferation in regenerating bone during distraction osteogenesis at different distraction rates." *J Orthop Res* 15(5): 765-72.
- Li, G, Viridi, AS, Ashhurst, DE, Simpson, AH, Triffitt, JT (2000). "Tissues formed during distraction osteogenesis in the rabbit are determined by the distraction rate: localization of the cells that express the mRNAs and the distribution of types I and II collagens." *Cell Biol Int* 24(1): 25-33.
- Li, X, An, YH, Wu, YD, Song, YC, Chao, YJ, Chien, CH (2007). "Microindentation test for assessing the mechanical properties of cartilaginous tissues." *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 80(1): 25-31.
- Liebschner, MA (2004). "Biomechanical considerations of animal models used in tissue engineering of bone." *Biomaterials* 25(9): 1697-714.

- Lin, KY, Bartlett, SP, Yaremchuk, MJ, Fallon, M, Grossman, RF, Whitaker, LA (1990). "The effect of rigid fixation on the survival of onlay bone grafts: an experimental study." *Plast Reconstr Surg* 86(3): 449-56.
- Lippuner, K, Vogel, R, Tepic, S, Rahn, BA, Cordey, J, Perren, SM (1992). "Effect of animal species and age on plate-induced vascular damage in cortical bone." *Arch Orthop Trauma Surg* 111(2): 78-84.
- Matsuyama, J, Ohnishi, I, Kageyama, T, Oshida, H, Suwabe, T, Nakamura, K (2005). "Osteogenesis and angiogenesis in regenerating bone during transverse distraction: quantitative evaluation using a canine model." *Clin Orthop Relat Res* (433): 243-50.
- McKibbin, B (1978). "The biology of fracture healing in long bones." *J Bone Joint Surg [Br]* 60-B(2): 150-162.
- Newman, E, Turner, AS, Wark, JD (1995). "The potential of sheep for the study of osteopenia: current status and comparison with other animal models." *Bone* 16(4 Suppl): 277S-284S.
- Nickel, R, Schummer, A, Seiferle, E (1992). "Lehrbuch der Anatomie der Haustiere." Band 2, 6. Auflage. Parey, Berlin, Hamburg.
- Nosaka, Y, Kitano, S, Wada, K, Komori, T (2002). "Endosseous implants in horizontal alveolar ridge distraction osteogenesis." *Int J Oral Maxillofac Implants* 17(6): 846-53.
- Nosaka, Y, Kobayashi, M, Kitano, S, Komori, T (2005). "Horizontal alveolar ridge distraction osteogenesis in dogs: radiographic and histologic studies." *Int J Oral Maxillofac Implants* 20(6): 837-42.
- Paley, D, Fleming, B, Catagni, M, Kristiansen, T, Pope, M (1990). "Mechanical Evaluation of External Fixators Used in Limb Lengthening." *Clin Orthop* (250): 50-57.
- Perren, SM (1979). "Physical and biological aspects of fracture healing with special reference to internal fixation." *Clin Orthop Relat Res* (138): 175-96.
- Rachmiel, A, Srouji, S, Peled, M (2001). "Alveolar ridge augmentation by distraction osteogenesis." *Int J Oral Maxillofac Surg* 30(6): 510-7.
- Raekallio, J, Makinen, PL (1968). "The appearance of esterases in healing fractures." *Acta Pathol Microbiol Scand* 73: 304.
- Raghoobar, GM, Liem, RS, Vissink, A (2002). "Vertical distraction of the severely resorbed edentulous mandible: a clinical, histological and electron microscopic study of 10 treated cases." *Clin Oral Implants Res* 13(5): 558-65.
- Rahn, BA (1976). "Die mehrfarbige Fluoreszenzmarkierung des Knochenbaus." *Chem. Rundschau* 28: 249.
- Rahn, BA, Gallinaro, P, Baltensperger, A, Perren, SM (1971). "Primary bone healing. An experimental study in the rabbit." *J Bone Joint Surg Am* 53(4): 783-6.
- Reichel, H, Lebek, S, Alter, C, Hein, W (1998). "Biomechanical and densitometric bone properties after callus distraction in sheep." *Clin Orthop Relat Res* (357): 237-46.
- Rhineland, FW (1968). "The normal microcirculation of diaphyseal cortex and its response to fracture." *J Bone Joint Surg Am* 50(4): 784-800.
- Rhineland, FW (1974). "Tibial blood supply in relation to fracture healing." *Clin Orthop Relat Res* (105): 34-81.
- Rhineland, FW, Baragry, RA (1962). "Microangiography in bone healing. Part I. Undisplaced closed fractures." *J Bone Joint Surg* 44A:1273.
- Sarmiento, A, Schaeffer, JF, Beckerman, L, Latta, LL, Enis, JE (1977). "Fracture healing in rat femora as affected by functional weight-bearing." *J Bone Joint Surg Am* 59(3): 369-75.
- Saulacic, N, Gandara-Vila, P, Somoza-Martin, M, Garcia-Garcia, A (2004). "Distraction osteogenesis of the alveolar ridge: a review of the literature." *Med Oral* 9(4): 321-7.

- Schenk, RK, Willenegger, HR (1977). "Histology of primary bone healing: modifications and limits of recovery of gaps in relation to extent of the defect (author's transl)." *Unfallheilkunde* 80(5): 155-60.
- Schorlemmer, S, Gohl, C, Iwabu, S, Ignatius, A, Claes, L, Augat, P (2003). "Glucocorticoid treatment of ovariectomized sheep affects mineral density, structure, and mechanical properties of cancellous bone." *J Bone Miner Res* 18(11): 2010-5.
- 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.
- Soballe, K (1993). "Hydroxyapatite ceramic coating for bone implant fixation. Mechanical and histological studies in dogs." *Acta Orthop Scand Suppl* 255: 1-58.
- Soballe, K, Hansen, ES, H, BR, Jorgensen, PH, Bunger, C (1992). "Tissue ingrowth into titanium and hydroxyapatite-coated implants during stable and unstable mechanical conditions." *J Orthop Res* 10(2): 285-99.
- Steen, H, Fjeld, TO (1989). "Lengthening osteotomy in the metaphysis and diaphysis. An experimental study in the ovine tibia." *Clin Orthop Relat Res*(247): 297-305.
- Stürmer, KM (1987). "Histomorphologie der Frakturheilung im Vergleich der Fixationsverfahren am Tibiaschaft". Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York.
- Stürmer, KM, Schuchardt, W (1980). "Neue Aspekte der gedeckten Marknagelung und des Aufbohrens der Markhöhle im Tierexperiment. III. Knochenheilung, Gefäßversorgung und Knochenumbau." *Unfallheilkunde* 83(9): 433-5.
- Trueta, J, Buhr, AJ (1963). "The Vascular Contribution to Osteogenesis. V. the Vasculature Supplying the Epiphysial Cartilage in Rachitic Rats." *J Bone Joint Surg Br* 45: 572-81.
- Wang, GJ, Dunstan, JC, Reger, SI, Hubbard, S, Dillich, J, Stamp, WG (1981). "Experimental femoral fracture immobilized by rigid and flexible rods (a rabbit model)." *Clin Orthop Relat Res* (154): 286-90.
- Weber, BG, Cech, O (1973). "Pseudarthrosen." Huber, Bern, Stuttgart, Wien.
- Wiedemann, M (1994). "Morphologische Grundlagen der Kallusdistraktion." *Zentralbl Chir* 119(8): 587-93.
- Willenegger, H, Perren, SM, Schenk, R (1971). "Primäre und sekundäre Knochenbruchheilung." *Chirurg* 42(6): 241-52.
- Willie, BM, Bloebaum, RD, Bireley, WR, Bachus, KN, Hofmann, AA (2004). "Determining relevance of a weight-bearing ovine model for bone ingrowth assessment." *J Biomed Mater Res A* 69(3): 567-76.
- Wintermantel, E, Ha, S-W (1996). *Biokompatible Werkstoffe und Bauweisen*. Springer, Berlin, Heidelberg.
- Yamagishi, M, Yoshimura, Y (1955). "The biomechanics of fracture healing." *J Bone Joint Surg Am* 37-A(5): 1035-68.
- Yasui, N, Kojimoto, H, Sasaki, K, Kitada, A, Shimizu, H, Shimomura, Y (1993). "Factors affecting callus distraction in limb lengthening." *Clin Orthop Relat Res* (293): 55-60.
- Yasui, N, Kojimoto, H, Shimizu, H, Shimomura, Y (1991). "The effect of distraction upon bone, muscle, and periosteum." *Orthop Clin North Am* 22(4): 563-7.
- Young, RW (1962). "Cell proliferation and specialization during endochondral osteogenesis in young rats." *J Cell Biol* 14: 357-70.

8 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich ganz herzlich bei Herrn Prof. Dr. Lutz Claes für die Möglichkeit der Promotion am Institut für Unfallchirurgische Forschung und Biomechanik und für seine große Unterstützung in allen privaten und arbeitsbezogenen Anliegen bedanken.

Mein herzlicher Dank gilt auch Frau Prof. Dr. Ulrike Matis für die Übernahme meiner Arbeit an der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität in München.

Besonders bedanken möchte ich mich bei Frau Dr. Sandra Schorlemmer für die Betreuung meiner Arbeit und bei Frau Prof. Dr. Anita Ignatius für die Korrektur meiner Entwürfe.

Frau Marion Tomo, Frau Melanie Göckelmann und vor allem Frau Uschi Maile gilt mein besonderer Dank für die Hilfe bei Präparation, Herstellung der Dünnschliffpräparate, OP-Vorbereitung und OP-Assistenz. Herrn Herbert Schmitt danke ich für den Entwurf des Fixateurs und die Hilfe bei der Lösung aller technischen Fragestellungen. Frau Patrizia Horny danke ich für die Hilfe bei der biomechanischen Auswertung.

Den Tierärzten des Tierforschungszentrums Oberberghof in Ulm, allen voran Frau Dr. Barbara Kuhnt möchte ich für die angenehme Zusammenarbeit und alle guten Ratschläge danken.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Wilhelm Gebel, Frau Karin Widl und Herrn Christian Ehrnthaller für die liebevolle Betreuung der Schafe und Herrn Albert Aigner für die Hilfe bei der Beschaffung der Schafe.

Allen Mitarbeitern des Institutes möchte ich danken für die schöne und lustige Zeit in ihrer Mitte, eine Zeit die meine Familie und ich in angenehmer Erinnerung behalten werden.

Meinen Eltern danke ich für eine wunderschöne Kindheit, ihre Unterstützung und ihr Verständnis in allen Lebensphasen, sowie für die Werte, die sie mir vermittelt haben.

Meiner Frau Hanna danke ich für ihre Aufmunterungen, ihre Hilfe und unseren kleinen Ferdinand, der während unserer Zeit in Ulm entstand.

9 Lebenslauf

Andreas Veezer

geboren am 10.11.1979 in Wangen im Allgäu

Eltern Helmut Veezer, Landwirtschaftsmeister
Claudia Theresia Veezer, geb. Moosmann, Hauswirtschafterin

Familienstand: verheiratet mit Hanna Maria Veezer, geb. Deplewski,
ein Kind (Ferdinand)

Schulausbildung:

1986 – 1990 Grundschule in Immenried
1990 – 1996 Realschule in Kißlegg
1996 – 1999 Agrarwissenschaftliches Gymnasium in Ravensburg
Abschluss: Abitur

Wehrdienst:

1999 – 2000 Sanitätssoldat in Horb am Neckar und Stetten a. k. M.

Studium:

2000 – 2006 Studium der Veterinärmedizin an der
Ludwig-Maximilians-Universität München
02.02.2006 Tierärztliches Staatsexamen
20.03.2006 Approbation als Tierarzt

Februar 2006 – Mai 2007 Doktorand am Institut für Unfallchirurgische Forschung
und Biomechanik der Universität Ulm

seit Juni 2007 Assistenztierarzt in der tierärztlichen Praxis Hans-Peter Muell
in Stöten am Auerberg