

Aus dem Department für Veterinärwissenschaften
der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München
Arbeit angefertigt unter der Leitung von Univ.- Prof. Dr. Eckhard Wolf

Angefertigt am
Institut für Unfallchirurgische Forschung und Biomechanik
der Universität Ulm
(Prof. Dr. Anita Ignatius und Prof. em. Dr. Lutz Claes)

**Entwicklung und histomorphologische Charakterisierung
eines metaphysären Frakturheilungsmodells am Großtier**

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

vorgelegt von
Martina Reusch
aus Tübingen

München 2011

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

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Braun

Berichterstatter: Univ.-Prof. Dr. Wolf

Korreferent: Univ.-Prof. Dr. Matis

Tag der Promotion: 12. Februar 2011

Meiner Familie

1	Einleitung	1
1.1	Einführung	1
1.2	Knochenentwicklung und Knochenmorphologie	4
1.2.1	Desmale Osteogenese	4
1.2.2	Chondrale Osteogenese	5
1.2.3	Kortikaler und spongiöser Knochen	6
1.2.4	Geflecht- und Lamellenknochen	8
1.3	Frakturheilung und Knochenregeneration	10
1.3.1	Begriffsdefinition	10
1.3.2	Primäre / direkte Frakturheilung	11
1.3.3	Sekundäre / indirekte Frakturheilung	12
1.3.4	Einflüsse auf die Frakturheilung	16
1.4	Metaphysäre Fraktur	21
1.4.1	Beschreibung und Bedeutung der metaphysären Fraktur	21
1.4.2	Arbeiten zur metaphysären Frakturheilung	22
1.5	Ziel dieser Studie	28
2	Material und Methoden	29
2.1	Tierversuch	29
2.1.1	Versuchstiere	29
2.1.2	Haltung und Fütterung	29
2.1.3	Metaphysäres Frakturmodell	30
2.1.4	Einteilung der Gruppen	31
2.2	Aufarbeitung der Proben	40
2.2.1	Präparation und Röntgen	40
2.2.2	Periphere quantitative Computertomographie (pQCT)	41
2.2.3	Zerteilung des Knochens	43
2.2.4	Biomechanik (Eindrücktests)	44
2.2.5	Mikro-Computertomographie (μ CT)	47
2.2.6	Histologie	48
2.2.7	Statistik	51

3	Ergebnisse	52
3.1	Klinischer Verlauf	52
3.1.1	Aktivitätsmessung	54
3.1.2	Bodenreaktionskraftmessung	55
3.2	Makroskopische und röntgenologische Befunde	57
3.3	Periphere quantitative Computertomographie (pQCT)	59
3.4	Biomechanik (Eindrückttests)	63
3.5	Mikro-Computertomographie (μCT)	66
3.6	Histologie	67
3.6.1	Qualitative Gewebeuntersuchung	67
3.6.2	Quantitative Gewebedifferenzierung	71
3.6.3	Fluoreszenzmikroskopische Untersuchung	76
4	Diskussion	78
4.1	Diskussion der Methodik	78
4.1.1	Tiermodell	78
4.1.2	Versuchsdesign	80
4.1.3	Auswertungsparameter	86
4.2	Diskussion der Ergebnisse	89
4.3	Chancen des Verfahrens und Ausblick	105
5	Zusammenfassung	108
6	Summary	110
7	Abbildungsverzeichnis	111
8	Literaturverzeichnis	116
9	Danksagung	135

Abkürzungsverzeichnis

BMD	bone mineral density / Knochenmineraldichte
ccm	Kubikzentimeter
CT	Computertomographie
EI	Elastizitätsmodul E x Flächenträgheitsmoment I
el 1 / 2	Bereich von Nullpunkt bis Anfang / Ende des linearen Bereichs
F	Kraft
Fa.	Firma
FE	Finite-Elemente
FEM	Finite-Elemente-Modell
HA	Hydroxylapatit
IFB	interfragmentäre Bewegung
IFD	interfragmentäre Dehnung
i.m.	intramuskulär
i.v.	intravenös
KGW	Körpergewicht
Lig.	Ligamentum
Lnn.	Lymphknoten
l.m.	latero-medial
M.	Muskulus
μCT	Mikro - Computertomographie
μm	Mikrometer
n	Anzahl
NaCl	Natriumchlorid (Kochsalz)
p	Signifikanzniveau / Irrtumswahrscheinlichkeit
PMMA	Polymethylmethacrylat
prae OP	prae operationem / vor der Operation
post OP	post operationem / nach der Operation
pQCT	periphere quantitative Computertomographie
ROI	Region Of Interest
S	Schaf
s.c.	subkutan
UFB	Institut für Unfallchirurgische Forschung und Biomechanik

1 Einleitung

1.1 Einführung

Jährlich werden laut Angaben des statistischen Bundesamts in der Bundesrepublik Deutschland knapp eine Million Menschen aufgrund von Knochenbrüchen (Frakturen) chirurgisch versorgt. Dazu gehören sehr häufig auch Fragilitätsfrakturen, die ohne adäquate Krafteinwirkung zustande kommen. Diese Frakturen sind eine klassische Komplikation bei Osteoporose und treten hauptsächlich im spongiosen Knochen der Metaphyse auf (Jakob et al., 2007). Daher besteht zwischen metaphysären Knochenfrakturen und dem Krankheitskomplex der Osteoporose ein enger, klinisch bedeutsamer Zusammenhang.

Osteoporose ist nach international anerkannter Definition eine multifaktoriell bedingte systemische Skeletterkrankung, die durch eine fortschreitende Abnahme der Knochenmasse und Verschlechterung der Mikroarchitektur des Knochengewebes gekennzeichnet ist. Daraus entsteht eine reduzierte Festigkeit und erhöhte Frakturneigung des Knochens (National Institutes of Health, 2000). Weltweit sind nach aktuellen Zahlen mehr als 45 Millionen Menschen von Osteoporose betroffen, wobei die Frakturhäufigkeit um ein Vielfaches das Vorkommen von Brustkrebs, Herzinfarkt und Schlaganfall zusammen übersteigt (Stepnick, 2004). Die Inzidenz sowohl der Grunderkrankung als auch der Komplikationen und demzufolge die finanzielle Belastung wird sich aufgrund des demographischen Wandels Schätzungen zufolge in den nächsten 25 Jahren verdoppeln (U.S.CensusBureau, 2008). Jede dritte Frau und jeder fünfte Mann erleiden im Laufe ihres Lebens eine osteoporosebedingte Fraktur (Kanis et al., 2008; Kanis et al., 2004; Melton und Heaney, 2003). Diese sind vor allem im trabekulär vernetzten metaphysären Knochen des distalen Radius, des proximalen Femur und den Segmenten der Wirbelsäule lokalisiert (Jakob et al., 2007; Ringe, 1997). Der Hauptanteil der Frakturen im metaphysären Knochen tritt bei über 65-jährigen, oft weiblichen, osteoporotischen Personen auf und ist bisher häufig ungenügend und nicht adäquat behandelbar (Ackerman und Jupiter, 1988; Riggs, 1991; Ringe, 1995; Schatzker, 1990). Dies kann abgesehen von den wirtschaftlichen und finanziellen Konsequenzen gerade bei älteren Patienten und deren Mitmenschen weitreichende

Auswirkungen besitzen (Mosekilde, 2000; Silver und Einhorn, 1995; Smith et al., 1990). Neben Schmerzen und möglicher Berufs- oder Erwerbsunfähigkeit haben Frakturen auch psychische Folgen, die in Form von Angst und Depressionen zu einer eingeschränkten Lebensweise und dem Verlust der Unabhängigkeit führen können. Die Lebenserwartung der Betroffenen ist dadurch nachweislich vor allem im Alter verkürzt. Demzufolge sterben rund 20 % der Patienten nach einer Schenkelhalsfraktur innerhalb des ersten Jahres. Etwa 50 % der betroffenen älteren Menschen sind nach einer Fraktur von externer Pflege abhängig oder im Alltag eingeschränkt und nur rund 30 % der metaphysären Frakturen heilen problemlos (Minne und Pfeifer, 2003).

Trotz ihrer herausragenden klinischen Relevanz wurde der Frakturheilung in der Metaphyse bisher nur wenig Interesse geschenkt und ihr Verlauf kaum untersucht. Unser Wissen über den Ablauf der Frakturheilung basiert überwiegend auf experimentellen Studien am diaphysären Knochen. Generell wird jedoch angenommen, dass metaphysäre Frakturen im Vergleich zu diaphysären Frakturen aufgrund der ungleichen Knochenstruktur verschieden heilen (Shefelbine et al., 2005; Stürmer et al., 2010). In der Diaphyse heilt der kortikale Knochen häufig über enchondrale Ossifikation mit Bildung eines externen Kallus, dessen Ausmaße von der Stabilität der Fixation abhängig sind (Claes et al., 1997; Claes et al., 1995a). Die Heilung des spongiösen Knochens in der Metaphyse verläuft meist desmal durch direkte Auflagerung neuer Knochensubstanz auf bereits bestehende Trabekel bzw. durch neugebildete Geflechtknochenstrukturen, jedoch ohne oder mit nur geringer Ausbildung von Knorpelgewebe und externem periostalen Kallus (Jarry und Uthoff, 1971; Uthoff und Rahn, 1981). Metaphysärer Knochen scheint eine größere Heilungskapazität zu besitzen, was bei Untersuchungen mittels Distraktionsosteogenese in Tibien von Hunden im Vergleich zum diaphysären Knochen dargestellt werden konnte. Dabei zeigte sich eine signifikant höhere Knochenbildungs- sowie Knochenmineralisationsrate im metaphysären Bereich (Aronson und Shen, 1994). Diese Erkenntnisse erklären sich möglicherweise durch die große aktive trabekuläre Oberfläche des spongiösen Knochens, dessen besserer Vaskularisierung und des dickeren, zellreicheren Periosts (Charnley und Baker, 1952; Jarry und Uthoff, 1971).

Die Beeinflussung der Frakturheilung durch ihre biomechanische Umgebung wurde für den Knochen der Diaphyse eingehend bestätigt (Claes et al., 1997; Claes et al., 2002a; Claes und Heigele, 1999; Claes et al., 1995a; Epari et al., 2006; Goodship und Kenwright, 1985; Kenwright und Goodship, 1989). Als Maß für die Stabilität einer Fraktur dient hauptsächlich die interfragmentäre Bewegung (IFB), also die Bewegung der Knochenfragmente innerhalb des Fraktur- bzw. Osteotomiespalts. Die Stabilisierung dieser Fragmente geschieht durch die operative Versorgung der Fraktur mittels Osteosynthese und besitzt eine entscheidende Auswirkung auf den Verlauf und den Erfolg der Frakturheilung. Hierdurch soll eine weitere Gewebeschädigung verhindert, Schmerzen verringert und die Knochenfragmente in ihre ursprüngliche, anatomisch korrekte Lage zurückversetzt sowie fixiert werden. In Abhängigkeit von der Spaltbreite ergibt sich aus der IFB die interfragmentäre Dehnung (IFD). Diese ist definiert als relative Längenänderung ($\Delta L / L$) und führt zur Entstehung mechanischer Reize, die die Regenerationsvorgänge im Knochen steuern. Durch eine zu kleine IFD ist der Reiz zur Knochenneubildung gering und die Heilung verläuft verzögert. Eine zu hohe IFD kann die Knochenheilung ebenfalls hemmen und zur Bildung von Pseudarthrosen führen. Computersimulatorische und zellbiologische Studien haben ergeben, dass IFD-Werte unterhalb von 5 % zu direkter desmaler Knochenbildung führen, während IFD-Werte bis zu 15 % vor allem enchondral über die Bildung von Knorpelgewebe heilen (Augat et al., 2005; Claes und Heigele, 1999). Um die Frakturheilung zu begünstigen werden daher bei Osteosynthesen IFD innerhalb dieses optimalen Wertebereichs angestrebt (Augat et al., 1998b; Claes et al., 1997; Goodship und Kenwright, 1985). Für die wenigen durchgeführten Studien zur Heilung der Metaphyse waren die biomechanischen Bedingungen im Heilungsgebiet jedoch nicht bekannt und weder standardisiert noch kontrollierbar (Jarry und Uthoff, 1971; Stürmer et al., 2010; Uthoff und Rahn, 1981).

Mithilfe eines charakterisierten Tiermodells sollen die Abläufe und Besonderheiten während der Frakturheilung im metaphysären Knochen untersucht und mit den Erkenntnissen der diaphysären Knochenheilung verglichen werden. Um die Heilung mit dem Einfluss der IFB und der resultierenden IFD im Frakturbereich in Korrelation setzen zu können, war es das Ziel der vorliegenden Studie ein standardisiertes und reproduzierbares Großtiermodell zu entwickeln, welches mechanisch kontrollierbar unterschiedliche Grade der Frakturstabilisierung ermöglicht.

1.2 Knochenentwicklung und Knochenmorphologie

Der Knochen gehört zu den härtesten Geweben des menschlichen Körpers und dient abgesehen von seiner für den Organismus wichtigen metabolischen Funktion, als Stütze des Skelettsystems, Schutz der inneren Organe sowie zur Formgebung des Körpers. Das Knochengewebe besteht aus einem Verband von Knochenzellen (Osteozyten), die von extrazellulärer Matrix umschlossen sind. Daneben sind die für den Knochenaufbau verantwortlichen Osteoblasten sowie die für den Knochenabbau zuständigen Osteoklasten beteiligt. Knochengewebe besitzt eine Trockenmasse von ca. 80 %, die sich zu etwa einem Drittel aus organischen und zu etwa zwei Dritteln aus anorganischen Bestandteilen zusammensetzt. Der organische Anteil besteht überwiegend aus Kollagen Typ I und zu ca. 5 % aus nicht-kollagenen Proteinen, während der anorganische Anteil hauptsächlich durch Hydroxylapatit gebildet wird. Dieses dient als Speicher verschiedener Mineralstoffe wie Carbonat, Natrium, Magnesium, Kalium, Chlor und Fluor im Knochen (Einhorn, 1998; Hees und Sinowatz, 2000; Sheldon und Wilson, 1994; van den Berg, 1999).

Im Folgenden werden die bei der Knochenentwicklung (Osteogenese) während der Embryogenese ablaufenden biologischen Vorgänge beschrieben, die im Weiteren auch für die Frakturheilung von Bedeutung sind. Es werden grundsätzlich zwei Arten der Knochenbildung unterschieden: die desmale und die chondrale Osteogenese.

1.2.1 Desmale Osteogenese

Die desmale Knochenneubildung verläuft ohne die Ausbildung einer knorpeligen Zwischenstufe, weshalb man sie auch als direkte Osteogenese (Osteogenesis membranacea) bezeichnet (Abb. 1). Der Knochen entsteht hierbei direkt aus Bindegewebe in dem sich aus Gruppen von Mesenchymzellen bestehende, primäre Knochenbildungskerne entwickeln. Mesenchymzellen sind embryonale Stamm- und Vorläuferzellen aus denen die spezifischen Zellen des adulten Binde- und Stützgewebes sowie weitere Zellarten wie z.B. glatte Muskelzellen hervorgehen.

Sie differenzieren sich unter anderem zu Osteoblasten, welche durch die Freisetzung von Hydroxylapatitkristallen und deren Einlagerung in die Kollagenfibrillen die von den Osteozyten abgeschiedene proteoglykanhaltige Interzellulärsubstanz (Osteoid) kalzifizieren. Durch diese Form der Ossifikation entstehen hauptsächlich die flachen Knochen des Schädeldaches, des Gesichtsschädels und des Schulterblattes (Junqueira und Carneiro, 1996; Liebich, 1993; Rhinelander, 1974; van den Berg, 1999).

1.2.2 Chondrale Osteogenese

Die chondrale Knochenneubildung (Osteogenesis cartilaginea) beginnt in der frühen Embryonalphase und verläuft über die Ausbildung einer knorpeligen Zwischenstufe, weshalb sie auch indirekte Ossifikation genannt wird (Abb. 2). Aus dem Mesenchym entsteht ein formgebendes Modell des Knochens bestehend aus Faserknorpel. Diese als Primordialskelett oder Ersatzknochen bezeichneten knorpeligen Skelettsegmente garantieren die zur Knochenbildung notwendige Stabilität. Sie werden bis zum Ende der Entwicklung abgebaut und durch knöcherne Strukturen ersetzt.

In Abhängigkeit von der Form des Knochens setzt sich die chondrale Ossifikation aus der zuerst auftretenden perichondralen und der anschließenden enchondralen Ossifikation zusammen.

Bei der perichondralen Ossifikation bildet sich um die Oberfläche der knorpeligen Knochenvorstufe eine Knochenmanschette. Hierzu sondern sich Osteoblasten von der den Knorpel umhüllenden Knochenhaut (Perichondrium) ab und produzieren Kollagen und Knochengrundsubstanz. Somit entstehen nach desmale Vorbild Knochen und Bindegewebe. Das Perichondrium wird zum Periost, das von der Knochenmitte aus in Richtung beider Epiphysen verläuft. Bei der darauffolgenden enchondralen Ossifikation werden die vorhandenen mineralisierten Knorpelstrukturen über mehrere Stufen von Osteoklasten abgebaut und über die Synthese von Knochengrundsubstanz vollständig durch Geflechtknochen ersetzt (Junqueira und Carneiro, 1996; van den Berg, 1999).

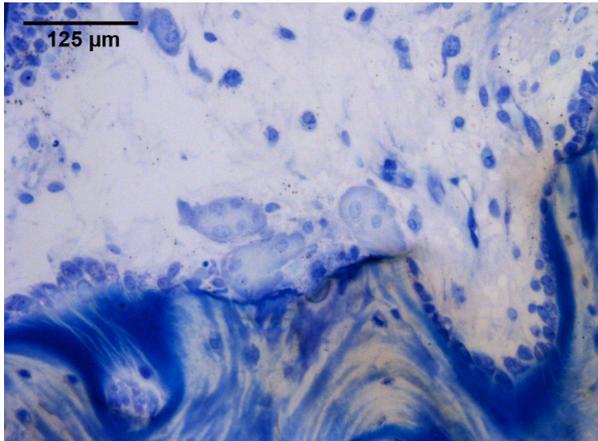


Abb. 1: Desmale Osteogenese mit aktiven Osteoklasten und Osteoblasten im Femur eines Schafes, Paragon-Färbung. 200-fache Vergrößerung; (Quelle: UFB).

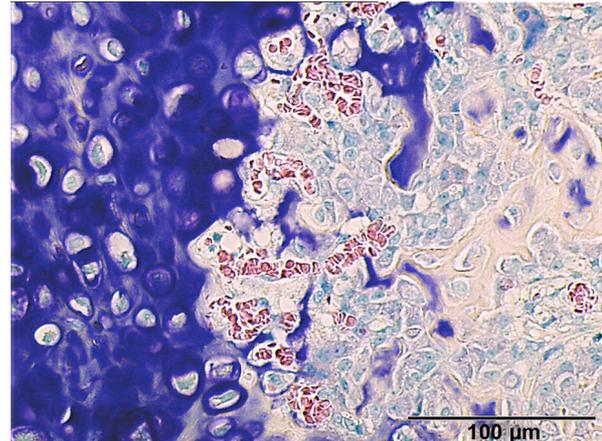


Abb. 2: Chondrale Osteogenese mit Bildung von Knorpelgewebe und Umbau zu Knochen im Femur eines Schafes, Paragon-Färbung. 100-fache Vergrößerung; (Quelle: UFB).

1.2.3 Kortikaler und spongiöser Knochen

Der Knochen ist in verschiedene Regionen unterteilt, die sich strukturell und funktional voneinander unterscheiden. Alle röhrenförmigen Knochen sind aus einer Diaphyse (Knochenschaft) aufgebaut, welche jeweils von einer Epiphyse und einer Metaphyse an beiden Enden begrenzt wird (Abb. 3).

Die Diaphyse besteht aus einer äußeren kompakten Knochenschicht (Kortikalis), die das für die Blutgefäßversorgung des Knochens zuständige Knochenmark umgibt. Etwa 80 % des knöchernen Skeletts sind aus kortikalem Knochen aufgebaut, der sich in lamellären Schichten mineralisierter kollagener Fasern anlagert. Diese Konstruktion in Form einer sehr stabilen Röhre fördert die Belastbarkeit des Knochens vor allem hinsichtlich Biege- und Rotationskräften. Zusätzlich wird die Kortikalis oberflächlich von Knochenhaut (Periost) überzogen, welche zum Schutz des Knochengewebes dient und an dessen Bildung und Ernährung beteiligt ist. Dazu ist das Periost sowohl reich an Gefäßen und Nervenfasern als auch an hochgradig proliferationsfähigen Zellen. Das Knocheninnere ist von einem lockeren Verband osteogener Zellen (Endost) überzogen.

Im Vergleich dazu ist die Metaphyse bzw. die während des Wachstums vorhandene Epiphyse vollständig aus schwammartig vernetzten, mineralisierten Knochenbälkchen (Trabekel) aufgebaut. Diese sind in Form eines dreidimensionalen Gerüsts (Spongiosa) angeordnet und ebenfalls von Endost überzogen. Spongiöser Knochen findet sich hauptsächlich in den Wirbelkörpern und an den Enden langer Röhrenknochen wie Femur und Radius, die häufig in engem Kontakt zu den Gelenkflächen stehen (Abb. 3). Das trabekuläre Bauprinzip der Spongiosa ermöglicht die Einsparung von Knochensubstanz und dient dadurch zur Verringerung des Gewichts bei gleichbleibend hoher Stabilität des Knochens. Durch die Dicke und die räumliche Anordnung der Trabekel ermöglicht dieser Aufbau eine dynamische Anpassung des Knochengewebes an verschiedene mechanische Belastungssituationen durch aktive Modellierung entlang der Kraftlinien (Trajektorien) (Junqueira und Carneiro, 1996; Remedios, 1999; van den Berg, 1999; Webb und Tricker, 2000).

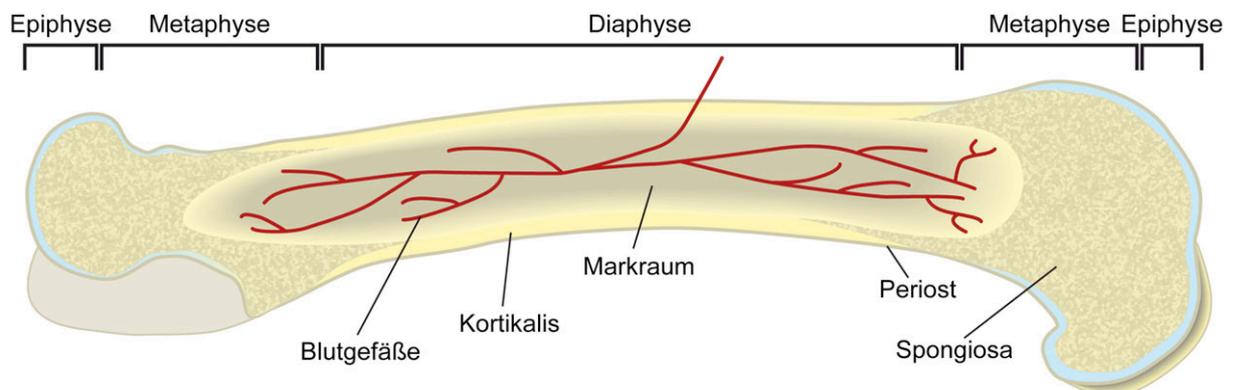


Abb. 3: Längsschnitt durch einen Röhrenknochen (Femur); schematischer Aufbau des Knochens in die drei Bereiche: Diaphyse, Metaphyse und Epiphyse mit ihren jeweiligen kortikalen und spongiösen Strukturen.

1.2.4 Geflecht- und Lamellenknochen

Bei desmaler und chondraler Ossifikation entsteht als erste Form des Knochens von Kortikalis und Spongiosa der sogenannte Geflecht- oder Faserknochen. Dieser wird anschließend durch den Prozess des Knochenremodelings zu Lamellenknochen umgebaut (Frost, 1989b; Hees und Sinowatz, 2000; Junqueira und Carneiro, 1996).

Geflechtknochen entsteht in Regionen, in denen möglichst schnell Knochen gebildet werden muss. Dies ist der Fall bei der Knochenneubildung sowohl am sich entwickelnden (embryonalen) Knochen während des Wachstums als auch bei der Frakturheilung. Durch die Formation von ungeordnet vorliegenden Kollagenfaserbündeln entsteht eine dreidimensionale trabekuläre Netzstruktur, die sich am Verlauf bereits ausgebildeter Kapillaren orientiert (Abb. 4). Sie ist nicht entsprechend der mechanischen Beanspruchung des Knochens ausgerichtet (Frost, 1989a, b). Dadurch fehlt im Vergleich zum Lamellenknochen die geordnete dichte Lamellenbildung. Im Unterschied zu diesem weißt Geflechtknochen jedoch mehr Knochenzellen (Osteozyten) und eine höhere Wachstumsrate auf. Zudem sind im Geflechtknochen weniger Mineralien mit kleineren Kristallen eingelagert, wodurch er deutlich flexibler, aber auch labiler gegenüber einwirkenden Kräften ist. (Junqueira und Carneiro, 1996; Sheldon und Wilson, 1994; van den Berg, 1999).

Lamellenknochen stellt die endgültige und ausgereifte Form des Knochens dar, die den in der Entwicklung vorhergehenden, unreifen Geflechtknochen ersetzt. Daher wird Lamellenknochen auch als Ersatzknochen bezeichnet. Er entsteht deutlich langsamer als Geflechtknochen, ist aber stabiler und besser organisiert (Abb. 5). Die einzelnen sehr dünnen Lamellen (3 - 7 μm) sind parallel zur Knochenoberfläche aus schraubenförmig angeordneten, in verkalkte Grundsubstanz eingebetteten Kollagenfasern und Osteozyten aufgebaut. Dabei lagern sie sich meist zirkulär um einen von Blutgefäßen, Nerven und einer dünnen Bindegewebsschicht durchzogenen Zentralkanal (Haversscher Kanal).

Diese als Osteone definierten Strukturen sind im kompakten Knochen der Kortikalis regelmäßig entlang dessen Längsachse ausgerichtet. In der Spongiosa sind die Lamellen hingegen unregelmäßiger und nicht konzentrisch als flache, nahezu parallele Strukturen entsprechend der Richtung der mechanischen Beanspruchung des Knochens angeordnet (Einhorn, 1998; Hees und Sinowitz, 2000; Junqueira und Carneiro, 1996; Sheldon und Wilson, 1994; van den Berg, 1999).

Plexiformer Knochen stellt die Kombination aus Geflecht- und Lamellenknochen dar. Er bildet sich schneller, als lamellärer Knochen und besitzt verglichen mit Geflechtknochen eine höhere mechanische Stabilität über einen langen Zeitraum. Aufgrund seiner Organisation bietet er eine große Oberfläche, mit deren Hilfe die geschädigten Strukturen durch Knochenumbau schnell wiederhergestellt werden können. Dadurch erzielt dieser Knochen innerhalb eines kurzen Zeitraums eine hohe Festigkeit und Steifigkeit, was vor allem bei großen und schnell wachsenden Tieren wie Schafen und Kühen mit hohen Knochenumbauraten von Bedeutung ist.

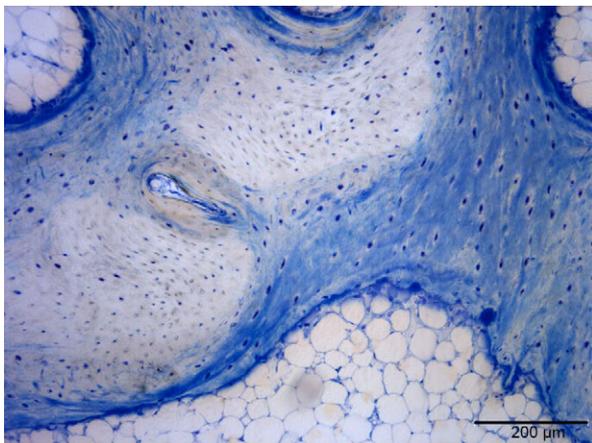


Abb. 4: Geflechtknochen, Femur Schaf. 100-fache Vergrößerung; (Quelle: UFB).

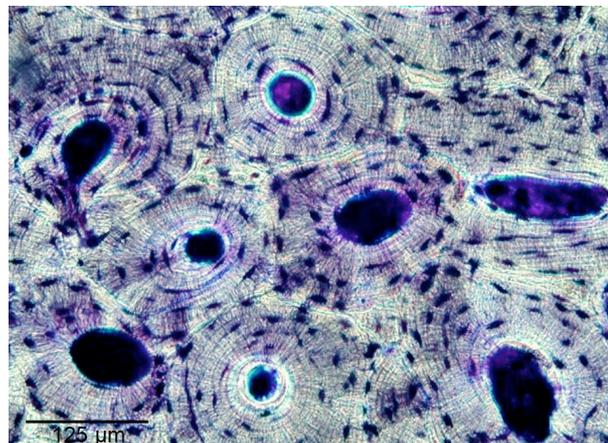


Abb. 5: Lamellenknochen mit Osteonen aus konzentrisch angeordneten Lamellen und Haversschen Kanälen in deren Mitte, Femur Ratte. 200-fache Vergrößerung; (Quelle: UFB).

1.3 Frakturheilung und Knochenregeneration

1.3.1 Begriffsdefinition

Eine Fraktur wird als Folge mechanischer Belastungen beschrieben, die im Knochen zu Spannungen führen, welche dessen mechanische Festigkeit übersteigen (Perren, 1992; Simmons, 1985). Dadurch kommt es zu einer partiellen oder vollständigen Unterbrechung der Kontinuität des Knochens. Bricht ein gesunder Knochen durch äußere Gewalteinwirkung, so spricht man von einer akuten traumatischen Fraktur. Ohne angemessenes Trauma entstehende Frakturen hingegen werden pathologische Frakturen genannt. Hierzu zählen z.B. infolge von Knochenzysten oder -tumoren aber auch aufgrund von Osteoporose auftretende Frakturen. Knochen kann sowohl akut brechen und so auf eine einmalige Überlastung seiner maximalen Materialeigenschaften reagieren oder als sogenannte chronische Fraktur unter zyklischer Belastung ermüden. Eine Verbindung zwischen den Knochenenden wird durch die frakturbedingt entstandene Beweglichkeit verhindert. Die Behebung der Instabilität und das Erreichen einer Kontinuität durch eine Gewebeneubildung im frakturierten Knochen bezeichnet man als Frakturheilung. Das Ziel der chirurgischen Frakturversorgung ist es, mithilfe einer geeigneten Osteosynthese die Frakturrenden zu reponieren und anschließend je nach Methode zu fixieren, um die Rückkehr zur physiologischen Beweglichkeit zu unterstützen und die Funktion des betroffenen Knochens wiederherzustellen (Perren, 1992; Willenegger et al., 1971). Im Gegensatz zu allen anderen Gewebearten, bei denen das verletzte Gewebe stets durch eine bindegewebige Narbe ersetzt wird, tritt bei der Frakturheilung keine Narbenbildung auf. Das geschädigte Gewebe regeneriert durch die Entstehung neuen Knochens vollständig und ist in Struktur und Funktion nicht vom gesunden Knochen zu unterscheiden (Brighton, 1984; McKibbin, 1978). Die Frakturheilung verläuft nach ähnlichen Prinzipien wie die Entwicklung des Knochens. Sie hängt von multiplen Faktoren ab, wobei zum einen die genetische Prädisposition, das Alter sowie der Ernährungs- und Gesundheitszustand des Betroffenen, zum anderen der vorliegende Frakturtyp und die am Frakturspalt vorherrschenden mechanischen und biologischen Bedingungen von Bedeutung sind (Augat et al., 2005; Einhorn, 1998; Perren, 1992). Abhängig davon unterscheidet man zwischen der primären und der sekundären Frakturheilung.

1.3.2 Primäre / direkte Frakturheilung

Die primäre oder direkte Frakturheilung verläuft ausschließlich über desmale Knochenneubildung, ohne die Ausbildung von Knorpel oder bindegewebigem peri- und endostalem Frakturkallus (callus = lat. Schwiele) (Yamagishi und Yoshimura, 1955). Diese direkte osteonale Heilung tritt nur dann auf, wenn die frakturierten Knochenenden in einem, nahezu dem Ursprungszustand entsprechenden, engen Kontakt stehen (McKibbin, 1978). Weitere Voraussetzungen dafür sind eine stabile Fixation der Fragmente sowie eine ausreichende Blutversorgung und Vitalität der Frakturenden. Für die Vaskularisierung dienen bei der primären Knochenheilung ausschließlich die Gefäße des Markraums (Rhineland, 1974). Je nach Ausmaß des vorhandenen Frakturspalts erfolgt die Heilung als Kontakt- oder Spaltheilung (Rhineland, 1968; Schenk, 1978; Willenegger et al., 1971).

Kontaktheilung:

Die osteonale Überbrückung des Frakturspalts ist nur dann möglich, wenn die Frakturenden direkten Flächenkontakt besitzen und der Frakturspalt nicht breiter als 0,2 mm ist. Bei der Kontaktheilung bohren kegelförmig angeordnete Osteoklasten einen Tunnel mit ca. 0,3 mm Durchmesser von einem zum anderen Knochenfragment. Daraufhin folgen eine kapillare Gefäßschlinge und Begleitzellen, aus denen sich Osteoblasten bilden. Diese kleiden den Kanal mit neuem lamellären Knochen aus und verzahnen dadurch die Frakturenden fest miteinander (Perren, 1979; Rahn et al., 1971; Stürmer, 1987; Willenegger et al., 1971).

Spaltheilung:

Diese Form der Frakturheilung läuft überall dort ab, wo sich die Frakturenden nicht direkt berühren und ein maximal 0,5 mm breiter Frakturspalt besteht. Dies ist häufig der Fall, da selbst bei makroskopisch exakter Reposition kein völlig kongruenter Flächenkontakt der Frakturenden erzielt werden kann. Der Spalt wird zunächst mit nicht optimal ausgerichtetem, dem Verlauf der Kapillaren quer zur Knochenlängsachse folgendem Geflechtknochen aufgefüllt. Nach einigen Wochen wird dieser durch die Bildung längsaxial orientierter Osteone ersetzt.

Bei größeren Frakturspaltbreiten ist eine primäre Heilung nicht mehr möglich (Perren, 1979; Schenk und Willenegger, 1977; Stürmer, 1987; Willenegger et al., 1971).

1.3.3 Sekundäre / indirekte Frakturheilung

Wenn durch einen Frakturspalt oder eine nicht bzw. nur ungenügend mechanisch fixierte Fraktur interfragmentäre Bewegungen im Frakturspalt auftreten, kommt es zur sekundären Frakturheilung. Die Mehrheit der Knochenbrüche heilt über diesen sekundären Weg unter vorwiegend enchondraler Ossifikation. Da eine Anlagerung von neugebildetem Knochen sowie eine adäquate Durchblutung nicht erzielt werden können, wird ein temporäres Ersatzgewebe in Form eines periostalen und endostalen Kallus gebildet. Dieses unreife reparative Kallusgewebe besteht aus schlecht strukturiertem Knochen (Geflechtknochen), Knorpel und Bindegewebe und wird anschließend zur Wiederherstellung der ursprünglichen Struktur in qualitativ hochwertigeres Knochengewebe (Lamellenknochen) umgebaut. Die sekundäre Knochenheilung umfasst mehrere Phasen, die fließend ineinander übergehen und sich teilweise überlappen (Braun und Ruter, 1996; Brighton, 1984; Einhorn, 1998; Frost, 1989a; McKibbin, 1978; Perren, 1992; Willenegger et al., 1971):

- Entzündungsphase (Dauer 1 – 3 Tage)
- Reparaturphase: - Granulationsphase (Dauer ca. 3 Wochen)
- Phase der Kallushärtung (Dauer 3 – 4 Monate)
- Umbauphase - Modeling und Remodeling (Dauer Monate bis Jahre)

Die **Entzündungsphase** dauert etwa 1 – 3 Tage und beginnt mit dem Eintritt der Fraktur. Dadurch werden die beteiligten Blutgefäße zerrissen und im umliegenden Knochen, Knochenmark und Weichgewebe entwickelt sich ein Hämatom. Die natürliche Blutgerinnung (Hämostase) bewirkt eine geringfügige Stabilisierung der Fraktur. Nekrotisches Material aus dem beschädigten Weichgewebe, dem Periost und dem Markraum löst in Verbindung mit dem Austritt entzündlichen Exsudats und dem vorhandenen Sauerstoffmangel eine starke Entzündungsreaktion aus (Brand, 1987). Diese führt zu Vasodilatation sowie zu überschießender Kapillareinsprossung in das Hämatom und dadurch zu einer verstärkten Vaskularisierung im Heilungsgebiet. Aufgrund der posttraumatischen Perfusionssteigerung verbessert sich einerseits die Sauerstoffversorgung der vorhandenen ortsständigen Zellen, andererseits gelangen vermehrt hämatopoetische Stammzellen ins Entzündungsgebiet. Aus diesen Zellen entwickeln sich neutrophile Granulozyten,

Makrophagen und Mastzellen (Rhineland, 1968, 1974). Die vom Knochenmark einwandernden mesenchymalen Stammzellen stellen die Vorläuferzellen (Spindelzellen / Osteoprogenitorzellen) der Osteoblasten dar und differenzieren sich zu Zellen des Binde- und Stützgewebes (McKibbin, 1978; Young, 1962). Mit Beginn der Reparaturphase 3 – 4 Tage nach Frakturereignis wird das nekrotische Gewebe abgebaut (Frost, 1989b).

Die etwa 3 Wochen dauernde **Granulationsphase** beginnt, wenn Schmerzhaftigkeit und Schwellung der Fraktur abklingen und endet damit, dass die Knochenfragmente durch fibröses oder knorpeliges Gewebe miteinander verbunden sind (Brighton, 1984). Das Frakturhämatom wird während dieser Phase mit fibroblastenreichem Granulationsgewebe, neu gebildetem Kollagen sowie weiteren Kapillaren und Mineraldepots durchsetzt. Zudem bauen Osteoklasten, Makrophagen und Riesenzellen weiterhin das tote Knochengewebe und die übrigen Blutgerinnsel ab (Brighton, 1984; Frost, 1989a; Willenegger et al., 1971). Nicht resorbierbare Teile des Hämatoms werden durch das Granulationsgewebe organisiert. Der dadurch entstehende weiche Frakturkallus stellt eine erste bindegewebige Verbindung zwischen den Knochenenden dar.

Bei der sekundären Frakturheilung können zwei Formen unterschieden werden, die während der Frakturheilung parallel zueinander ablaufen. Endostal, periostnah und peripher ist häufig eine desmale Ossifikation zu beobachten, da in diesen Gebieten mechanische Ruhe und eine adäquate Blutversorgung mit sauerstoffreichen Verhältnissen bestehen. Die Osteoblasten beginnen bereits nach 3 – 4 Tagen etwas entfernt vom Frakturspalt mit der schnellen Neubildung eines periostalen Kallus, der auf den Frakturspalt zuwächst und diesen primär verbindet (Einhorn, 1992). Gleichzeitig verläuft die Heilung im Zentrum dieses Kallus bei geringerer Sauerstoffversorgung und häufig größeren Gewebedehnungen fast ausschließlich über enchondrale Ossifikation (Abb. 6, Abb. 7) (Claes et al., 2000b). Zur vollständigen Überbrückung der Fraktur formiert sich bewegungsabhängig Faserknorpel im Frakturspalt. Das Gleichgewicht zwischen den beiden Ossifikationsformen hängt in erster Linie von der mechanischen Stabilität der Fraktur ab. Je größer die interfragmentäre Bewegung, desto mehr nimmt die enchondrale Komponente zu.

Wenn die Knochenenden durch das neugebildete Gewebe (weicher Kallus) fest verbunden sind, härtet es durch Mineralisierung der Knochengrundsubstanz sowie des Faserknorpels in der Phase der **Kallushärtung** aus. Durch einsprossende Blutgefäße können Zellen in den Knorpel gelangen, die zu Osteoklasten und Osteoblasten differenzieren. Osteoklasten bauen das Knorpelgewebe ab und Osteoblasten einen belastbaren, porösen und gut durchbluteten Geflechtknochen auf. Dessen Steifigkeit ist mit der vollständigen Überbrückung der Fraktur nach etwa 3 – 4 Monaten ausreichend, um eine unbeeinträchtigte Knochenfunktion zu gewährleisten (Braun und Ruter, 1996; Brighton, 1984; Claes et al., 1998). Kontur und Durchmesser des Knochens sowie die Orientierung der Trabekel entlang der Kapillaren unterscheiden sich jedoch vom intakten Knochen.

Die ursprüngliche Knochenstruktur wird bei jeder Frakturheilung in der **Umbauphase (Remodeling)** rekonstruiert. Der ungeordnete Geflechtknochen im Frakturspalt wird durch mechanisch stärker belastbaren Lamellenknochen ersetzt (Einhorn, 1998; Perren, 1979). Während dieses Vorgangs richten sich die Osteone entlang der Hauptbelastungslinien longitudinal zum Knochen aus und der überflüssige knöcherne Kallus wird abgebaut (Cruess und Dumont, 1975). Durch das Remodeling wird nach mehreren Monaten bis Jahren die Knochen- und Markraumkontur wiederhergestellt, so dass die Struktur der eines intakten Knochens entspricht.

Die Vorgänge des Remodelings laufen auch beim gesunden Knochen lebenslang während des physiologischen Umbauprozesses ab und ermöglichen dem Knochen, sich zu erneuern und zerstörte Areale funktionell wieder herzustellen (Frost, 1989a; Perren, 1992). Dabei ist die Umsatzrate stark altersabhängig und nimmt im Laufe des Lebens deutlich ab (Geneser, 1990). Bis zum Alter von etwa 40 – 45 Jahren findet im Skelett des Menschen eine Zunahme der Knochenmasse sowie der -dichte statt und die Mikroarchitektur des Knochens wird verstärkt (Götte und Dittmar, 2001). Anschließend unterliegt der Knochen altersbedingten Abbauprozessen.

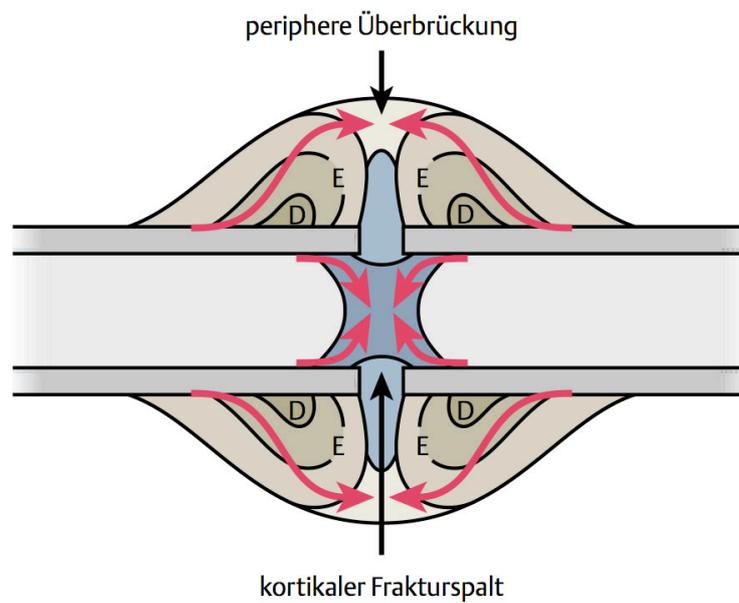


Abb. 6: Die Knochenneubildung bei einer diaphysären Fraktur beginnt frakturfern mit desmaler Knochenneubildung (D) und geht in Richtung zur Frakturspaltmitte hin in eine enchondrale Knochenneubildung (E) über. Wenn der Kallus peripher knöchern überbrückt ist, kann die eigentliche Fraktur heilen (Claes, 2006).

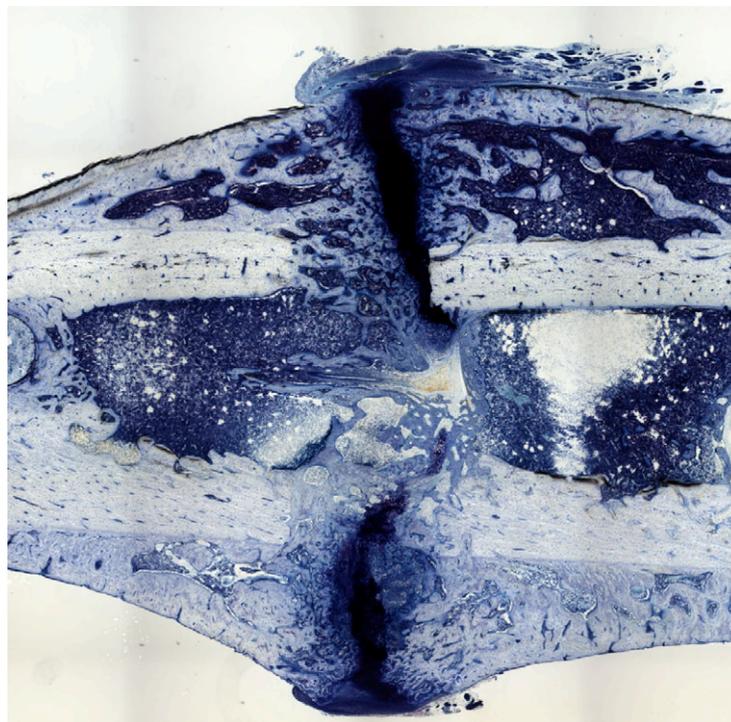


Abb. 7: Diaphysäre Fraktur einer Rattentibia im histologischen Schnittbild mit Kallusbildung oberhalb und unterhalb des mittig liegenden Frakturspalts, Paragon-Färbung; (Quelle: UFB).

1.3.4 Einflüsse auf die Frakturheilung

Die Frakturheilung wird von biologischen (Einhorn, 2005; McKibbin, 1978) und biomechanischen Parametern (Claes et al., 1997; Goodship und Kenwright, 1985) beeinflusst. Die biologischen Einflussfaktoren auf die Heilung sind eng verbunden mit einer ausreichenden Durchblutung des Heilungsgebiets. Biomechanisch hingegen wird die Frakturheilung vor allem durch die Belastung der Gliedmaße, die Stabilität der Osteosynthese oder Frakturfixation sowie durch die Größe des Fraktur- oder Osteotomiespalts beeinflusst. Nach Erkenntnissen aus experimentellen Studien wirken sich bereits die initialen postoperativen biomechanischen Bedingungen entscheidend auf den Ablauf der gesamten Knochenheilung aus (Epari et al., 2006; Klein et al., 2003). Auf die einzelnen Faktoren soll im Folgenden näher eingegangen werden.

Einfluss der Durchblutung auf die Frakturheilung

Durch die Entstehung einer Fraktur oder Osteotomie und das damit verbundene Trauma kommt es zu Gewebe- und Gefäßschäden. Diese können zur Beeinträchtigung der Vaskularisierung und folglich der knöchernen Heilung im Frakturgebiet führen. Untersuchungen haben jedoch gezeigt, dass nur gravierende Durchblutungsstörungen die Knochenheilung negativ beeinflussen (Utvag et al., 2003). Intraoperative Maßnahmen und eine dadurch kurzfristige, geringfügige Traumatisierung des Weichgewebes haben unbedeutende und schnell überwundene Konsequenzen für die Knochenheilung (Claes et al., 2006). Weiterhin konnte dargestellt werden, dass die Durchblutung in engem Zusammenhang mit den mechanischen Bedingungen im Frakturgebiet steht. Eine stabilere Fixation führt zu einer verbesserten Vaskularisierung, wohingegen eine instabile Situation die Revaskularisierung im Heilungsgebiet verzögert (Claes et al., 2002a).

Belastung der operierten Extremität und Stabilität der Osteosynthese

Obwohl die alleinige externe Ruhigstellung bereits zu einer Heilung führen kann, liegt im Folgenden der Fokus jedoch auf operativ versorgten und stabilisierten Frakturen. Die Stabilität der Fixation ist in Verbindung mit der Belastung der operierten Gliedmaße für die auf das Frakturheilungsgebiet einwirkenden Kräfte verantwortlich.

Diese Kräfte setzen sich zusammen aus den muskulären Kräften und den äußeren Kräften, welche überwiegend den Auftritts- bzw. Bodenreaktionskräften entsprechen (Duda et al., 1998). Dabei kommt es sowohl zu Kompression als auch zu Scher-, Torsions- und Biegemomenten im Frakturgebiet. Je nach einwirkender Kraft wird die Heilung unterschiedlich beeinflusst, wobei axiale Kompression unterstützend, Zug- und Scherkräfte überwiegend beeinträchtigend auf den Heilungsverlauf wirken (Augat, 2003a; Kenwright et al., 1991).

Die Stabilität der Frakturfixation wird durch die Steifigkeit des verwendeten Osteosyntheseverfahrens festgelegt. Aus der Belastung des frakturierten Knochens und der Stabilität der Osteosynthese resultiert die biomechanische Größe der interfragmentären Bewegung (IFB). Die IFB ist die Verschiebung der Knochenfragmente innerhalb des Frakturspalts, bezogen auf die unbelastete Ausgangssituation und führt dort zu einer Deformation des Gewebes.

In experimentellen Studien an Schafen konnte röntgenologisch und histologisch nachgewiesen werden, dass die IFB mit der Höhe der Extremitätenbelastung ansteigt (Augat et al., 1996; Claes et al., 2000b; Kenwright und Goodship, 1989; Schell et al., 2005). Bei einer sehr steifen Frakturfixation oder Osteosynthese entsteht wenig IFB, wohingegen eine flexible Fixation größere IFB zulässt (Goodship et al., 1998).

Frakturgeometrie (Fraktur- oder Osteotomiespaltbreite)

Ein weiterer entscheidender Einflussfaktor auf die Frakturheilung ist die Frakturgeometrie und somit die Breite des Frakturspalts nach durchgeführter Fixation oder Osteosynthese. Experimentell konnte im Großtiermodell am Schaf nachgewiesen werden, dass mit einer Zunahme der Frakturspalt- bzw. Osteotomiespaltbreite die Frakturheilung signifikant verzögert abläuft (Claes et al., 1997; Claes et al., 2003). So förderte eine IFB von 0,2 mm bis 1 mm die Frakturheilung bei Mensch und Tier, wohingegen Bewegungen von mehr als 2 mm beeinträchtigende Auswirkungen auf diese besaßen (Wolf et al., 1998). Stürmer hält IFB von 0,5 mm bis 1 mm für ideal, wobei diese Werte den Vektor aus aufgetretener Kompression und Scherung darstellten (Stürmer, 1996). Auch eine Studie an frakturierten humanen Tibien bestätigte diese Ergebnisse, wobei hier die gemessene Heilungszeit umso länger dauerte, je größer der im Röntgenbild erkennbare

Frakturspalt war (Claes et al., 2000b). Bei zu großen Frakturspalten sowie einer entsprechenden Instabilität mit großer IFB besteht die Möglichkeit, dass die Fraktur nicht überbrückt werden kann und eine Heilung völlig ausbleibt. Dies kann zur Entstehung einer Pseudarthrose führen (Claes und Augat, 1995; Claes et al., 2000b).

Interfragmentäre Gewebedehnung (IFD)

In Abhängigkeit von der Breite des Fraktur- oder Osteotomiespalts ergibt sich aus der IFB die interfragmentäre Gewebedehnung (IFD), die zur mechanischen Verformung der an der Knochenheilung beteiligten Zellen führt. Dadurch stellt sie den entscheidenden Reiz für die Differenzierung und Entstehung verschiedener knochenbildender Zellen dar und ist die wichtigste Größe für die mechano-biologische Beeinflussung der Frakturheilung (Kaspar et al., 2002). Ihre näherungsweise Berechnung geschieht durch Division der IFB durch die Breite des Frakturspalts. Tatsächlich ist die IFD jedoch inhomogen über das Heilungsgebiet verteilt und kein durchgängig einheitlicher Wert, sondern ein Wertebereich, der sich mittels Finite-Elemente-Analyse eines Frakturheilungsmodells berechnen lässt (Wehner et al., 2010).

Es wurden eine Reihe unterschiedlicher Theorien zur mechanisch induzierten Gewebedifferenzierung veröffentlicht. Diese stammen von den Arbeitsgruppen um Roux, Pauwels, Perren und Carter (Carter et al., 1998; Carter et al., 1988; Claes und Heigele, 1999; Pauwels, 1973; Perren und Cordey, 1980; Perren, 1979). Roux vertrat die Ansicht, dass Druck zur Bildung von Knochengewebe, Schub zur Bildung von Knorpelgewebe und Zug zur Bildung von Bindegewebe führt (Pauwels, 1973). Pauwels war aufgrund dieser Theorie und seinen eigenen Untersuchungen zu dem Ergebnis gelangt, dass nur zwei die Zelldifferenzierung beeinflussende mechanische Reize durch Verformung existieren. Zur Bildung von Bindegewebe und Kollagen kommt es durch eine gestaltändernde Dehnung, zur Bildung von Knorpelgewebe durch hydrostatischen Druck. Für die Entstehung von Knochengewebe gibt es nach Pauwels keinen spezifischen mechanischen Reiz. Er war der Meinung, dass sich Vorläuferzellen des Knochengewebes nur dort bilden können, wo ein schützendes, die mechanische Beanspruchung aufnehmendes Gerüst aus vorhandenen Gewebestandteilen bereits besteht. Somit entwickelt sich Knochen nur über den Weg des vorhergegangenen Bindegewebes oder Knorpels über desmale oder

chondrale Ossifikation (Pauwels, 1973). Perren zufolge ist die Gewebedehnung der einzige mechanische Reiz im Frakturspalt. Am Anfang der Frakturheilung treten demnach meist hohe Bewegungen auf und es wird nur wenig mechanisch belastbares Granulationsgewebe gebildet. Erst mit zunehmender Steifigkeit dieses Gewebes kann Bindegewebe entstehen, das schließlich durch Knorpel- und Knochengewebe ersetzt wird. Ein gewisser Dehnungsreiz ist somit für die Zellproliferation notwendig, zuviel Dehnung führt hingegen zur Zerstörung von vorhandenem Gewebe und verhindert dessen weitere Differenzierung (Perren und Cordey, 1980; Perren, 1979). Aufgrund dieser Grundlagen erarbeitete die Gruppe um Claes eine neue Gewebedifferenzierungshypothese, in welcher erstmals quantitative Bereiche bezüglich der mechanischen Stimuli definiert wurden (Claes et al., 2000b; Claes und Heigele, 1999; Claes et al., 1998).

Entscheidend für die Differenzierung des im Frakturspalt liegenden Reparationsgewebes sind sowohl die Größe der im Frakturspalt wirkenden IFD, wie auch die der im Frakturspalt auftretenden hydrostatischen Drücke (MPa). Untersuchungen zufolge kommt es bei geringen Dehnungen im Bereich zwischen $\pm 5\%$ und hydrostatischen Drücken im Bereich von $\pm 0,15$ MPa hauptsächlich zu desmaler Ossifikation (Abb. 8, Bereich A). Ist die Gewebedehnung jedoch im Bereich von $\pm 15\%$ und der kompressive hydrostatische Druck geringer als $-0,15$ MPa, tritt überwiegend enchondrale Ossifikation auf (Abb. 8, Bereich B). Bei Dehnungen und hydrostatischen Drücken die außerhalb des bisher genannten Wertebereichs liegen, wird durch die Entstehung von Bindegewebe oder Faserknorpel die Knochenbildung verhindert (Abb. 8, hellgrauer Bereich) (Claes, 2006; Claes et al., 1997; Claes und Heigele, 1999). Durchgeführte Zellkulturstudien bestätigten diese im Finite-Elemente-Modell (FEM) berechneten Daten der Gewebedifferenzierungshypothese (Claes et al., 1998; Neidlinger-Wilke et al., 1994).

Die Untersuchungen von Claes et al. zeigen, dass zur knöchernen Heilung einer Fraktur immer ein gewisses Maß an IFB bzw. IFD innerhalb eines adäquaten Frakturspalts notwendig ist. Dadurch wird die Zelldifferenzierung und folgend ein Knochenneubildungsreiz induziert. Bei sehr geringen IFD unterhalb von $0,005$ - $0,01\%$, in Ausnahmefällen bis zu $0,04\%$ sowie einem hydrostatischen Druck von ca. $1 - 2$ MPa, bleibt der Reiz zur Knochenneubildung vollständig aus und es kommt zur Resorption des bestehenden Knochens (Frost, 2004; Rubin und Lanyon, 1987;

Shefelbine et al., 2005). Bei zu großer IFD zeigt sich eine unzureichende Vaskularisierung des Gewebes im Heilungsgebiet (Claes et al., 2002a; Lienau et al., 2005). Die Differenzierung des Gewebes im Frakturspalt wird verhindert und die Knochenneubildung und -heilung dadurch gehemmt (Aalto, 1986; Goodship und Kenwright, 1985; Kenwright und Goodship, 1989; Sarmiento et al., 1977). Zwischen den Fragmentenden und den Kallusspangen bleibt eine persistente Faserknorpelschicht bestehen (Claes, 2006). Dies kann zum vollständigen Ausbleiben der Heilung und der Entstehung einer hypertrophen Pseudarthrose führen (Claes et al., 1997; Claes et al., 2000b; Epari et al., 2006; Müller et al., 1968). IFD im Bereich zwischen diesen beiden Extremen können die desmale und enchondrale Ossifikation stimulieren (Claes et al., 1997; Claes et al., 2000b; Claes et al., 1995a; Goodship und Kenwright, 1985).

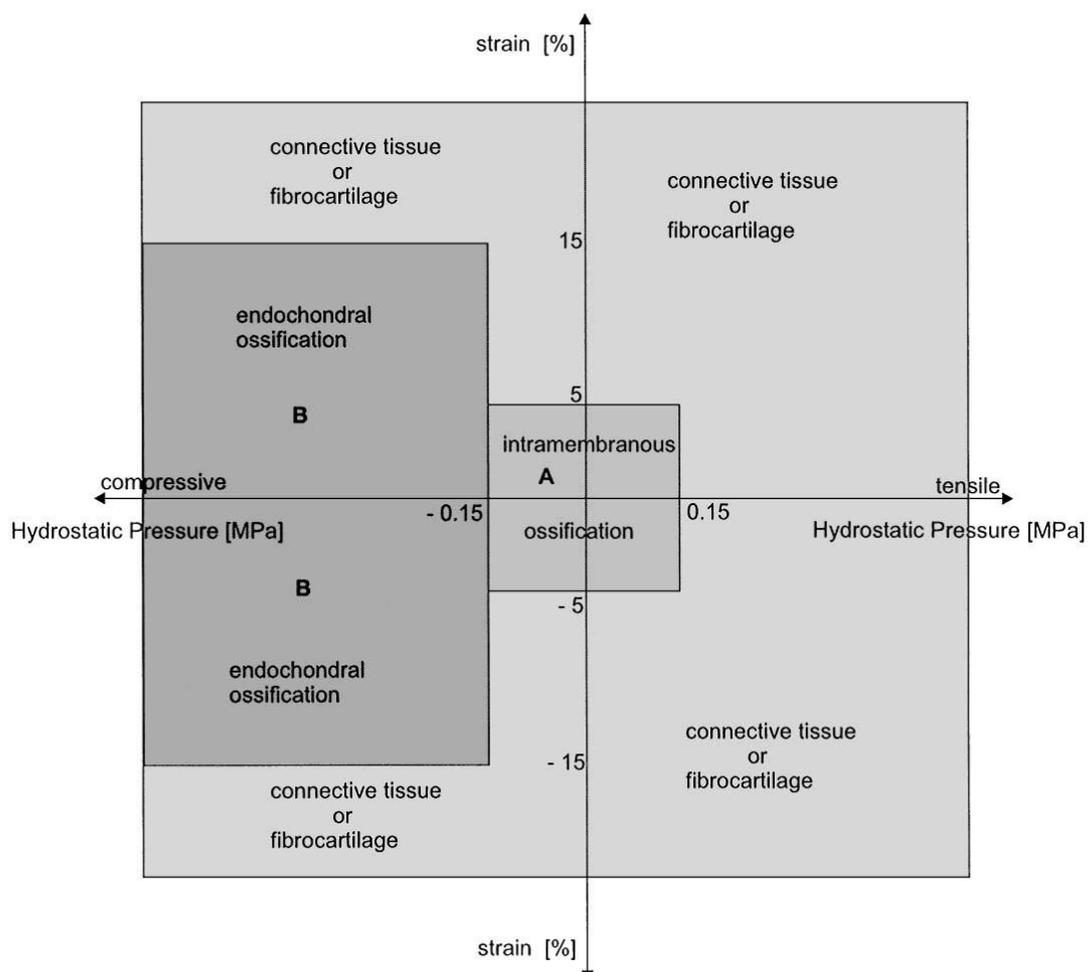


Abb. 8: Schema der zu erwartenden Gewebedifferenzierung in Abhängigkeit von den im Frakturgebiet wirkenden Kräften (Abszisse: Hydrostatischer Druck in MPa; Ordinate: Dehnung in %) (Claes und Heigele, 1999).

1.4 Metaphysäre Fraktur

1.4.1 Beschreibung und Bedeutung der metaphysären Fraktur

Die netzartige regelmäßige Struktur des spongiösen Knochens der Metaphyse ist für dessen Stabilität essentiell. Ein Verlust an mineralisierter Knochensubstanz führt von einer verminderten Knochenqualität und Strukturverlust über schwerwiegende Instabilität bis hin zur Frakturierung des Knochens. Die Kompressionssteifigkeit im metaphysären Knochen nach Verlust einer trabekulären Knochenstrebe konnte mit einem um den Faktor 4 verminderten Wert quantifiziert werden (Atkinson, 1967).

Die Möglichkeiten den Knochen adäquat osteosynthetisch zu versorgen und zu stabilisieren, sind unzureichend. Einerseits ist dies anatomisch bedingt, da an den spongiösen gelenknahen Knochenenden meist Muskulatur oder Sehnen ansetzen deren resultierenden Kräfte eine korrekte Stabilisation erschweren. Andererseits ist aufgrund der metaphysären Knochenstruktur und der geringen Größe der Fragmente eine stabile Fixation von Implantaten oft nicht möglich (Barrios et al., 1993; Chen et al., 2004; Cornell, 2003; Ebraheim et al., 1995). Da zudem die Primärstabilität im weichen spongiösen Knochen geringer ist als im kortikalen, sind metaphysäre Frakturen schwieriger zu behandeln als Frakturen im diaphysären Knochen (Yang et al., 1995). Im Verlauf der Heilung metaphysärer Frakturen zeigten sich sehr häufig Verzögerungen und Komplikationen infolge von Verlust oder Kompression des spongiösen Knochens. Das konnte zu Unregelmäßigkeiten in der darüberliegenden Gelenkfläche führen, die möglicherweise in einer posttraumatischen Osteoarthritis resultieren (Tsiridis et al., 2007). Eine nicht-operative Behandlung metaphysärer Frakturen führte jedoch häufig zu schwerwiegenden Verformungen des Knochens und zu Gelenkversteifungen (Digby et al., 1983). In 2 – 10 % aller metaphysären Frakturen stellte sich keine Heilung ein. Nach der chirurgischen Versorgung traten bei 4 – 40 % der Behandelten Fehlstellungen und bei 1 – 10 % Implantatversagen auf. Ein Anteil von 3 – 23 % aller Patienten musste ein weiteres Mal operiert werden (Sterck et al., 1998; Syed et al., 2004). Die Häufigkeit eines mechanischen Implantatversagens war bei Frakturen im metaphysären Knochen signifikant erhöht (Barrios et al., 1993). Durch eine zusätzlich vorhandene Osteoporose stieg diese Zahl auf 10 – 25 % aller Fälle an (Cornell, 2003; Cornell et al., 2003).

1.4.2 Arbeiten zur metaphysären Frakturheilung

Obwohl die Heilung metaphysärer Frakturen bisher kaum untersucht wurde, wird generell angenommen, dass sie aufgrund ihrer verschiedenartigen Struktur im Vergleich zu Frakturen am diaphysären Knochen unterschiedlich heilen (Einhorn, 2005; Jarry und Uhthoff, 1971; Stürmer et al., 2010). In vielen Studien wurden Bohrlochmodelle im spongiösen Knochen erstellt (Kon et al., 2010; Theiss et al., 2005; Uusitalo et al., 2001). Diese metaphysären Defekte entsprechen jedoch keinen Frakturheilungsmodellen, sondern dienen zur Untersuchung von Einheilung und Verhalten verschiedener Implantate und Wirkstoffe im Knochen (Aspenberg et al., 2008; Morgan et al., 2008; Tsiridis et al., 2007). Die wenigen durchgeführten Studien zur Heilung des metaphysären Knochens werden im Folgenden dargestellt.

1.4.2.1 Klinische Arbeiten

In der einzig relevanten klinischen und radiologischen Studie zur metaphysären Frakturheilung am Menschen konnte die Gruppe um Charnley zeigen, dass metaphysäre Frakturen meist ohne Ausbildung eines externen Kallus heilten (Charnley und Baker, 1952). Die eigentliche Überbrückung des Frakturspalts geschah durch laterale Ausdehnung des Knochengewebes an den Kontaktstellen, wodurch sich die Trabekel indirekt verbanden. Es entwickelte sich ein engmaschiger spongiöser Knochenbereich an der Verbindungslinie, der sich stabiler und dicker darstellte als die umgebende Spongiosa. Sie konnten weiterhin nachweisen, dass unter den stabilen Bedingungen einer operativen Versteifung des Kniegelenks (Arthrodese) die Heilung zwischen beiden Knochenoberflächen über desmale Ossifikation ablief. Im Frakturspalt wurde nur ein schmaler Streifen an dichtem Bindegewebe und keinerlei Knorpel oder knorpeliges Gewebe gebildet. Den Untersuchungen zufolge war die Geschwindigkeit der Revaskularisierung und der Heilung im spongiösen um ein Vielfaches höher als im kortikalen Knochen. Begründet wurde dies dadurch, dass die Osteoblastenaktivität sowohl mit der endostalen als auch mit der periostalen Knochenoberfläche korreliert. Die totale Oberfläche des spongiösen Knochens ist aufgrund der trabekulären Struktur sehr groß, im kortikalen Knochen hingegen ist sie auf die Auskleidung der Haversschen Kanäle begrenzt (Charnley und Baker, 1952).

1.4.2.2 Experimentelle Arbeiten

Die erste bedeutsame tierexperimentelle Studie, in der der Heilungsprozess von diaphysären und metaphysären Frakturen verglichen wurde, führten Jarry und Uhthoff 1971 röntgenologisch und histologisch an Femora von insgesamt 300 Ratten durch (Jarry und Uhthoff, 1971). Die Tiere verteilten sie gleichmäßig in eine Gruppe mit „stabiler, nicht verschobener metaphysärer Fraktur“, eine Gruppe mit „instabiler und verschobener metaphysärer Fraktur“ sowie eine Gruppe mit „diaphysärer Fraktur“. Unter stabilen Bedingungen konnten Jarry et al. im metaphysären Knochen direkte desmale trabekuläre Heilung beobachten. Von beiden Seiten des Frakturspalts wurden an Dicke zunehmende Knochenlamellen gebildet. Diese lagerten sich mehr und mehr in Richtung Spaltmitte an und überbrückten somit den Frakturspalt. Unter stabiler Fixation trat weder Knorpelbildung noch enchondraler Knochen auf.

Bei der metaphysären Heilung der instabilen Gruppe war nur ein kleiner Teil des neugebildeten mesenchymalen Gewebes fibrös, wohingegen der größere Teil knorpelig war und anschließend durch Knochen ersetzt wurde. Aufgrund der vorhandenen Instabilität kam es zu einer verzögerten Überbrückung mit deutlich sichtbaren und kompakten Trabekeln. Weiterhin stellte sich periostal eine knöchern - knorpelige Reaktion und Kallusbildung dar. Diese Art der Fixation heilte sowohl direkt desmal, als auch indirekt über enchondrale Ossifikation.

Die Heilung im diaphysären Knochenbereich verlief unter instabilen Bedingungen charakteristisch über Kallusbildung, Überbrückung und enchondrale Ossifikation. Unter rigider Fixation konnten diaphysäre Frakturen auch durch direkte Knochenbildung ohne Kallus heilen (Jarry und Uhthoff, 1971; Müller et al., 1968; Perren und Cordey, 1980; Perren, 1979; Perren, 1992; Willenegger et al., 1971).

Die Studie von Jarry und Uhthoff fand mit einer großen Tierzahl statt und verglich mehrere Fraktur- und Immobilisationstypen (Jarry und Uhthoff, 1971). Die Frakturen wurden jedoch nicht unter standardisierten Bedingungen erstellt. Bei allen Arten von Frakturen waren die biomechanischen Gegebenheiten in den Gruppen nicht kontrolliert, somit konnten die Erkenntnisse nicht in Bezug zur interfragmentären Bewegung und der entstehenden interfragmentären Dehnung gesetzt werden.

Eine Folgestudie dieser Arbeitsgruppe wurde an einer geringen Anzahl Ratten, Kaninchen und Hunden durchgeführt. Allen Tieren wurden Schrägosteotomien bzw. inkomplette Osteotomien am distalen Femur gesetzt (Uthhoff und Rahn, 1981). Uthhoff et al. postulierten, dass die durch die Kniegelenksdruckkraft entstehende IFB bei einem Frakturheilungsmodell stark von der Aktivität und der Belastung der Extremitäten abhing. Diese konnte bei stabilen und flexiblen Osteosynthesen unterschiedlich sein, wurde jedoch auch in dieser Studie nicht definiert. Die Ergebnisse vorangegangener Untersuchungen zur metaphysären Knochenheilung unter interfragmentär „stabilen“ Bedingungen konnten bestätigt werden (Uthhoff und Rahn, 1981). Es zeigte sich eine große osteoblastäre Aktivität auf beiden Seiten der Osteotomie. Dadurch verdickten sich bei schmaler Osteotomie die existierenden Knochentrabekel durch Ablagerung von Lamellen- oder Geflechtknochen und wuchsen ähnlich der Kontaktheilung aufeinander zu. Bei größerer Breite wurde der Spalt erst durch loses gut durchblutetes Bindegewebe aufgefüllt und anschließend durch Aneinanderreihung von Geflecht- und Lamellenknochen ähnlich der Spaltheilung überbrückt. Bezüglich der Heilung unter instabilen Bedingungen konnten die Erkenntnisse aus der vorherigen Studie ebenfalls bestätigt werden. Uthhoff et al. stellten fest, dass bei Einwirkung von interfragmentären Scherkräften auf eine nahezu stabile metaphysäre Fraktur keine Überbrückung stattfand. Einzig bei rotationsinstabilen Torsionsfrakturen bildete sich fibrocartilaginöser Kallus im Bereich des Frakturspalts. Diese Art der metaphysären Fraktur ähnelte einer diaphysären Schafffraktur und heilte mit einem periostalen Überrückungskallus über enchondrale Ossifikation verzögert oder gar nicht (Non-Union) (Uthhoff und Rahn, 1981).

Zu denselben Erkenntnissen kam die Arbeitsgruppe um Draenert in einer Studie die primär der Etablierung histologischer Methoden galt (Draenert und Draenert, 1979). Sie führten eine bilaterale Hemiosteotomie der proximalen Tibien von Hunden durch, die sie mit einer internen Platte stabilisierten. Anhand dieses Modells untersuchten sie die Heilung in wöchentlichen Abständen. Es stellte sich nach einer Woche im 80 – 300 µm breiten Spalt die Bildung von Geflechtknochen dar, dessen Trabekel nach zwei Wochen eine konzentrische lamelläre Verstärkung aufwiesen.

Die Knochen trabekel im Spalt wurden durch eine Verstärkung der spannungsorientierten spongiösen Trabekel um den Osteotomiespalt herum unterstützt. Vier Wochen post OP war der Osteotomiespalt überbrückt und die Resorption des unterstützenden Gerüsts begann. Nach weiteren sechs Wochen war das Gewebe bis auf den ursprünglichen Zustand resorbiert (Draenert und Draenert, 1979). Einhorn et al. postulierten ebenfalls, dass die metaphysäre im Gegensatz zur diaphysären Knochenheilung mit einer Knochenneubildung innerhalb der bereits existierenden Trabekel ablief und externe Kallusbildung dabei eine unbedeutende Rolle spielte (Einhorn, 2005).

Die Gruppe um Schatzker konnte im metaphysären Knochen nur eine interne Kallusbildung nachweisen, jedoch die Ergebnisse aufgrund unterschiedlicher Fixation bestätigen (Schatzker et al., 1989). Sie fixierten in ihrer Studie die am Ellbogen von zwanzig Mischlingshunden gesetzten Osteotomien mittels Spanndrähten aus Metall. Dabei traten in verschiedenen Gebieten der Osteotomie drei unterschiedliche Stabilitätsgrade auf. Sie konnten darstellen, dass unter absolut stabilen Fixationsbedingungen spongiöser Knochen über direkte Knochenneubildung heilte. Dabei wurde der Frakturspalt von mesenchymalen Stammzellen ausgefüllt, die über den direkten Weg in Knochen umgebaut wurden und keine knorpelige Phase durchliefen. In Bereichen in welchen keine vollständig stabile Situation herrschte, konnte ein Stabilitätsgradient und resultierend ein Dehnungsgradient nachgewiesen werden. In Bereichen, in denen die Dehnung im Spalt nicht höher als die von Knorpelgewebe tolerierte Dehnung war, bildete sich ein interner knorpeliger Kallus im Osteotomiespalt. Dadurch kam es zur vollständigen Heilung über enchondrale Ossifikation. In Gebieten, in welchen die von Knorpel tolerierte Dehnung überschritten wurde, zeigte sich nur fibröses Gewebe im Osteotomiespalt. Es konnte dargestellt werden, dass es unter dem Einfluss unterschiedlicher Kräfte zu unterschiedlichen Dehnungen im Verlauf des Osteotomiebereichs kam (Schatzker et al., 1989). Die Ergebnisse bestätigten sich durch Arbeiten von Perren et al., die darauf hinwiesen, dass das im Frakturspalt gebildete Gewebe den unterschiedlichen Dehnungen entspricht, welchen die einzelnen Zellen ausgesetzt waren (Perren und Cordey, 1980).

Kürzlich etablierte die Arbeitsgruppe Stürmer der Universität Göttingen ein metaphysäres Frakturmodell am Kleintier, um die Auswirkungen medikamentöser Therapien (z.B. Östrogen, Bisphosphonate, Phytoöstrogene) auf die Heilung des metaphysären Knochens ovariectomierter Ratten zu untersuchen (Stürmer et al., 2010; Stürmer et al., 2009). Allerdings scheint fraglich, ob das Modell tatsächlich den spongiösen Knochen repräsentiert, da sich nur wenige Knochen trabekel im Bereich der Lokalisation der Osteotomie an der proximalen Rattentibia befinden. Der 0,5 mm breite Sägeschnitt in der proximalen Tibia wurde mit einer biomechanisch nicht charakterisierten Titanplatte intern unter standardisierten Bedingungen fixiert. Anhand dieses Frakturmodells konnten Effekte verschiedener medikamentöser Therapien auf die Struktur und Stabilität des Knochens nachgewiesen werden. Durch die Mikrobewegungen unterhalb der Plattenosteosynthese entstand ein kleiner periostaler Kallus. Wie alle bisherigen Modelle ist auch dieses biomechanisch nicht charakterisiert und aufgrund der Größe des Rattenskeletts limitiert.

Die Ergebnisse dieser Studien bestätigen eine desmale und direkte Knochenheilung durch Zunahme der endostalen trabekulären Aktivität und folglich der Trabekeldicke im fraktur nahen spongiösen Knochengebiet unter stabilen Bedingungen. Neugebildeter Knochen lagert sich auf bestehenden Knochen trabekeln ab. Der spongiöse Knochen heilt in allen stabilen Situationen periostal über fibröse Hyperplasie und ohne die Ausbildung von Knorpelgewebe und externen Kallus. Unter Einfluss einer geringen interfragmentären Bewegung wird teilweise ein kleiner periostaler Kallus gebildet. Mehrheitlich verläuft auch hier die Heilung über desmale Ossifikation. Bei instabileren Verhältnissen verläuft die Heilung über enchondrale Ossifikation mit Bildung von Knorpelgewebe (Charnley und Baker, 1952; Chen et al., 2004; Einhorn, 2005; Jarry und Uthoff, 1971; Stürmer et al., 2010; Uthoff und Rahn, 1981; Uusitalo et al., 2001).

Es hat den Anschein, dass der metaphysäre Knochen im Vergleich zum diaphysären Knochen eine größere Heilungskapazität besitzt. Bereits Jarry et al. bemerkten eine schnellere Knochenbildung und eine größere Menge an Knochen im Rattenmodell. Begründet wurde dieses Ergebnis mit dem größeren Durchmesser und der entsprechend größeren aktiven Knochenoberfläche der Trabekel des metaphysären

Knochens. Als Zeitraum für die Osteoidreifung gab die Arbeitsgruppe um Jarry beim metaphysären Knochen 17 – 40 Tage, bei einer diaphysären Fraktur 25 – 55 Tage nach dem Auftreten der Fraktur an (Jarry und Uhthoff, 1971). Diese Erkenntnisse erzielten auch Charnley und Baker in klinischen Studien am Menschen (Charnley und Baker, 1952).

Die Heilungskapazität wurde weiterhin in einer experimentellen Studie mittels Distraktionsosteogenese metaphysärer und diaphysärer Knochenbereiche an Tibien von Hunden verglichen. Es stellte sich auch hier eine signifikant höhere Knochenbildungsrate und -mineralisationsrate im metaphysären Gebiet dar (Aronson und Shen, 1994; Denny, 1980). Die Beobachtungen wurden ebenfalls mit der größeren aktiven Knochenoberfläche der Trabekel im metaphysären Knochen begründet. Dadurch entsteht eine höhere Kontaktfläche des Knochens in diesem Gebiet. Metaphysärer Knochen weist eine bessere Durchblutung sowie ein dickeres Periost auf, welches dadurch eine größere Anzahl an Zellen beinhaltet (Charnley und Baker, 1952; Fan et al., 2008; Schatzker, 1990). Diese lokal vorhandenen Zellen führen zu einer schnellen Immunantwort. Der trabekuläre Knochen dient zudem als Gitternetz zur Anlagerung neuen Knochengewebes. Alle diese Faktoren führen zu einem Anstieg des osteogenen Potentials im metaphysären Knochen im Vergleich zum diaphysären Knochen (Bassett, 1984; King und Schatzker, 1991).

1.5 Ziel dieser Studie

Die fehlende biomechanische Standardisierbarkeit und Kontrollierbarkeit stellt die Problematik aller Knochenheilungsstudien dar, die bisher im metaphysären Bereich durchgeführt wurden. Es ist nicht bekannt, ob die bei der diaphysären Frakturheilung vorherrschenden mechanischen Bedingungen auch für die Heilung im metaphysären Knochen zutreffen und wie die optimalen biomechanischen Parameter für die trabekuläre Knochenheilung aussehen müssen.

Daher stellen sich vor allem folgende Fragen:

- Wie gestaltet sich ein geeignetes Frakturmodell für biomechanisch standardisierte und kontrollierbare Untersuchungen im metaphysären Knochenbereich?
- Verläuft die metaphysäre Frakturheilung unter ähnlichen Bedingungen wie die diaphysäre Frakturheilung?
- Welche Zusammensetzung bezüglich des Gewebes weist der neugebildete Knochen auf und welche Art der Ossifikation ist zu beobachten?
- Lässt sich die Knochenheilung in einem *in vivo* Modell am Schaf mit den im FE-Modell und *in vitro* bestimmten biomechanischen Parametern in Bezug bringen?

Aus diesem Grund war es das Ziel der vorliegenden Arbeit, erstmals ein standardisiertes und biomechanisch charakterisiertes metaphysäres Frakturheilungsmodell im Großtiermodell am Schaf zu etablieren, an welchem der Einfluss von interfragmentärer Dehnung auf die Knochenheilung unter stabilen und flexiblen Fixationsbedingungen untersucht werden konnte. Daraus lassen sich grundlegende Erkenntnisse über den Verlauf und die Besonderheiten der metaphysären Knochenheilung erarbeiten. Weiterhin bietet sich die Möglichkeit, die biomechanischen Bedingungen der metaphysären Knochenheilung mit denen des diaphysären Knochens zu vergleichen.

2 Material und Methoden

2.1 Tierversuch

Das Tierversuchsvorhaben zur Untersuchung des Einflusses definierter interfragmentärer Bewegung auf die Knochenheilung in der Metaphyse wurde vom zuständigen Regierungspräsidium Tübingen gemäß des Tierschutzgesetzes in der Fassung der Bekanntmachung vom 18. Mai 2006 genehmigt (Reg.-Nr. 875, Genehmigung am 28. Februar 2007).

2.1.1 Versuchstiere

Für die Entwicklung des Frakturheilungsmodells wurden zwölf weibliche, skelettal ausgewachsene Schwarzkopfschafe operiert. Bereits drei Wochen vor Versuchsbeginn wurden diese mit einem Tiertransportunternehmen aus der Zucht eines Schäfers ans Zentrale Tierforschungszentrum der Universität Ulm (Standort Oberberghof) gebracht, in welchem der gesamte Versuch durchgeführt wurde. Aufgrund der Zahnaltersbestimmung (Nickel et al., 1992) wurde das Alter der Schwarzkopfschafe auf drei bis sechs Jahre bestimmt (5 ± 1 Jahre). Das Gewicht der Tiere betrug zu Operationsbeginn $80,7 \pm 10,9$ kg und blieb über den gesamten Versuchszeitraum konstant.

2.1.2 Haltung und Fütterung

Die Haltung, Fütterung und Pflege der Schwarzkopfschafe erfolgte streng nach den Vorgaben des Tierschutzgesetzes und den Richtlinien der FELASA (Federation of European Laboratory Animal Science Associations).

Die Tiere waren in Gruppen von je sechs Schafen in 12 x 4 m großen Tiefstreuboxen auf Stroh- und Sägespaneinstreu aufgestellt. Jeweils die erste Woche post OP wurden immer zwei Schafe in einer kleineren Box (4 x 4 m) mit genannter Einstreu untergebracht. Alle Tiere konnten sich jederzeit frei bewegen und ihren Wasserbedarf über Selbsttränken decken.

Die Fütterung bestand aus Heu *ad libitum* sowie geringen Mengen an Graspellets und pelletiertem Zucht- und Haltungsfutter für kleine Klauentiere (Altromin 0133, Fa. Altromin GmbH, Lage). Ihr Tagesablauf unterlag einem natürlichen Tag-Nacht-Rhythmus von 12 Stunden (Licht 6 – 18 Uhr). Über den gesamten Versuchszeitraum hinweg wurden regelmäßig Kotproben der Tiere auf Parasiten hin untersucht. Bei Bedarf erhielten die Schafe das Breitspektrum-Antiparasitikum Moxidectin (Cydectin® 0,1 %; 1 ml / 5 kg KGW per os; Fa. Fort Dodge Veterinär GmbH, Würselen). Zur Prophylaxe des Befalls mit Läusen, Haarlingen, Weide- und Schaflausfliegen wurde Deltamethrin (Butox® 7,5 pour on; Fa. Hoechst, Wiesbaden) angewendet.

2.1.3 Metaphysäres Frakturmodell

Zur Erstellung der metaphysären Osteotomie wurde an der medialen Fläche der distalen Femurtrochlea des rechten Hinterbeines eine Sägelehre angebracht (Eigenkonstruktion des Instituts (Abb. 13). Diese Lokalisation zeichnet sich dadurch aus, dass sie hauptsächlich von Gelenkkapsel, Haut und Unterhaut bedeckt wird, weshalb die Muskulatur durch den Eingriff überwiegend nicht betroffen ist.

Mithilfe einer oszillierenden Säge wurde standardisiert ein nach proximal geöffneter, ca. 21 mm langer und 3 mm breiter Osteotomiespalt im spongiosen Knochen der Trochlea erstellt. Am distalen Spaltende blieb eine 15 mm breite Knochenbrücke bestehen, die das craniale Knochenreststück mit der Kondyle verband (Abb. 9). Nach Reposition der Patella in ihre ursprüngliche Lage bewirkten die Kräfte des proximal an der Patella wirkenden $M. quadriceps F_Q$ sowie der distal an der Patella ansetzenden Patellarsehne F_{PT} unter Belastung der Gliedmaße eine resultierende Kraft F_R (Abb. 9). Diese Kraft F_R führte zu einer Durchbiegung der Knochenbrücke und dadurch zu Dehnungen innerhalb des Osteotomiespaltbereichs. Um die interfragmentäre Bewegung im Spalt zu begrenzen, wurde durch ein im proximalen Spaltende fixiertes Stahlimplantat diese Durchbiegung kontrollierbar eingeschränkt.

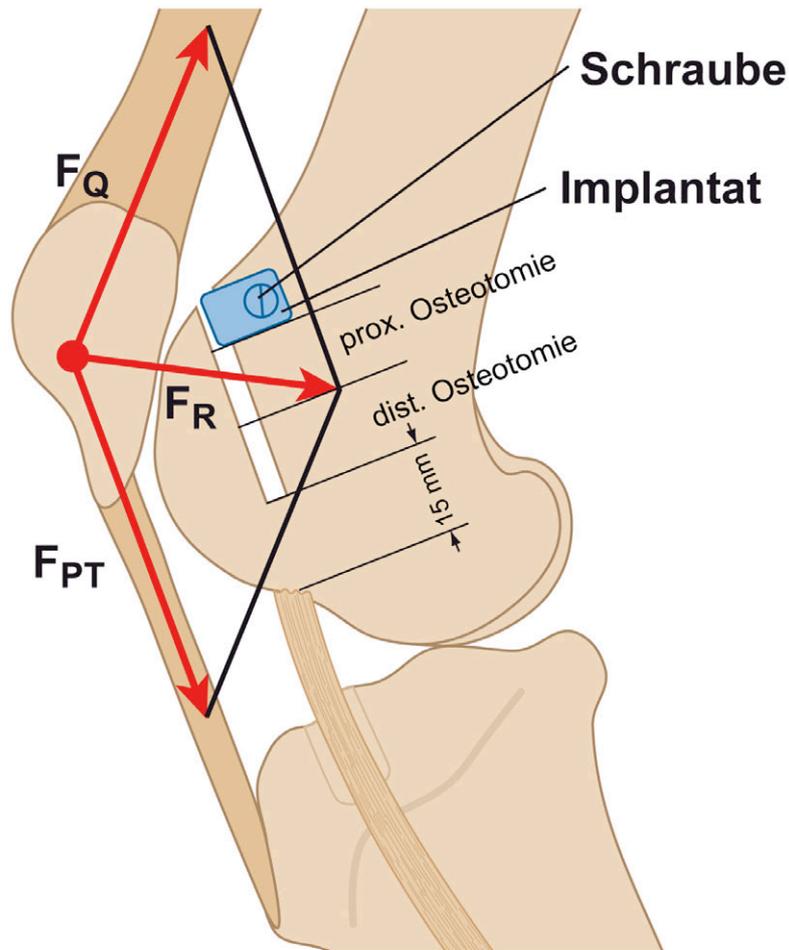


Abb. 9: Metaphysäres Frakturmodell in der Femurkondyle des Schafes: die Kräfte des proximal an der Patella wirkenden M. quadriceps F_Q sowie der distal an der Patella ansetzenden Patellarsehne F_{PT} bewirken unter Belastung der Gliedmaße eine resultierende Retropatellarkraft F_R ; diese Kraft F_R führt zur Durchbiegung des Knochenreststückes und bewirkt innerhalb des Osteotomiespalts interfragmentäre Dehnungen.

2.1.4 Einteilung der Gruppen

Die Schwarzkopfschafe wurden vor Versuchsbeginn randomisiert in zwei Gruppen eingeteilt. Je sechs Tiere erhielten eine stabil fixierte bzw. eine flexibel fixierte Osteotomie. Zwischen den Gruppen bestanden weder Gewichts- noch Alters- oder Haltung Unterschiede. Die Zeit nach der Operation bis zur Tötung (Standzeit) betrug bei allen Tieren beider Versuchsgruppen immer acht Wochen. Ein Schaf aus der flexibel fixierten Gruppe verstarb in der sechsten Woche post OP aufgrund unbekannter Ursache. Somit konnten insgesamt elf Tiere in die endgültige Auswertung einbezogen werden.

2.1.4.1 Anästhesie und Operationsvorbereitung

Die Tiere fasteten 48 Stunden vor der Operation bei freiem Zugang zum Trinkwasser über Selbsttränken. Dadurch konnte das Risiko einer durch die Intubation ausgelösten Regurgitation und Aspiration von Panseninhalt minimiert werden. Zur Prämedikation wurde den zu operierenden Schafen 1,2 mg/kg Körpergewicht Xylazin (Rompun® 2 % ig; Fa. Bayer, Leverkusen) subkutan an der seitlichen Brustwand injiziert. Nach einer Wartezeit von etwa 10 Minuten erfolgte der Transport des sedierten Tieres in den OP-Vorbereitungsraum. Dort wurde in rechter Seitenlage auf dem Tisch nach Rasieren, Säubern und Desinfizieren des linken Ohres ein Venenverweilkatheter (Vasofix Braunüle 20 G ¼, Fa. Braun, Melsungen) in die Vena auricularis lateralis (ersatzweise auch Vena auricularis intermedia) gelegt und mit Leukoplast®-Tape (Leukoplast® hospital, Fa. BSN medical, Hamburg) an der Ohrmuschel fixiert. Die Narkoseeinleitung erfolgte durch intravenöse Gabe von Thiopental-Natrium (Trapanal®, 2,5 g; Fa. Byk Gulden, Konstanz) in einer Dosierung von 0,01 g/kg KGW bzw. nach Wirkung. Umgehend nach dem Ausbleiben des Schluckreflexes wurden die Tiere mit einem Tubus der Größe 10 intubiert. Zur Einleitung der Inhalationsnarkose wurde 3 % Isofluran, zur Aufrechterhaltung 1-2 % Isofluran in der Atemluft bei Spontanatmung verwendet. Während des gesamten Operationszeitraums fand eine Kontrolle der Kreislaufparameter statt. Um ein Aufgasen des Pansens zu verhindern, erhielten die Schafe zusätzlich eine Pansensonde. Da die Augenlider während der Narkose geöffnet waren, wurde die Augenoberfläche zum Schutz vor Austrocknung und Licht mit Augengel (Vidisic®; Fa. Dr. Gerhard Mann GmbH, Berlin) und Tupfern abgedeckt.

Zur Vorbereitung des OP-Feldes wurde die rechte Hintergliedmaße oberhalb der Klaue bis über die gesamte Gliedmaßen- und Bauchregion großzügig geschoren, mit Wundbenzin entfettet, gewaschen und anschließend mit 70 % igem Alkohol und Sterilium® (Fa. Bode Chemie, Hamburg) desinfiziert. Die Tiere wurden in den Operationsraum überführt und dort in Rückenlage mit ausgebundenen unterpolsterten Gliedmaßen sowie Bauchgurt auf dem OP-Tisch fixiert. Das rechte Hinterbein verblieb unbefestigt. Nach Abschluss der Lagerung fand nochmals eine Desinfektion des Operationsfeldes statt (Kodan®-Spray, Fa. Schülke & Mayr GmbH,

Norderstedt). Die Tiere wurden mit Ausnahme des Kopf- und Operationsbereichs, mit mehreren Lagen steriler Tücher großflächig abgedeckt, wobei die Klaue des rechten Hinterbeines zusätzlich mit zwei sterilen Handschuhen und zwei Bauchtüchern umhüllt wurde. Zu Beginn der Operation wurde den Tieren jeweils s.c. zur antibiotischen Abdeckung 10 mg/kg KGW Amoxicillin (Amoxicillin 15 % , Fa. WDT, Garbsen), sowie zur postoperativen Analgesie 4 mg/kg KGW Carprofen (Rimadyl[®], Fa. Pfizer, Karlsruhe) injiziert. Während der gesamten Operationsdauer erhielten die Schafe zur Kreislaufstabilisation physiologische Kochsalzlösung (Isotone NaCl-Lösung 0,9 %, Fa. B. Braun, Melsungen) als Dauertropfinfusion über die Ohrvene und waren zum Schutz vor Hypothermie bei einer Temperatur von etwa 38° C auf einem Wärmekissen gelagert.

2.1.4.2 Operatives Vorgehen

Zugang

Ein ca. 15 cm langer Hautschnitt erfolgte in proximo-distaler Richtung an der cranio-medialen Fläche des Kniegelenks. Dieser Schnitt wurde ca. 5 cm proximal der Patella angesetzt und in distale Richtung entlang des Knochenverlaufs fortgeführt (Abb. 10). Entsprechend dazu wurden anschließend die Unterhautschichten vorsichtig durchtrennt, bis die Kniegelenkkapsel darstellbar war. Der Zugang zum rechten Kniegelenk erfolgte durch eine Stichinzision medial auf Höhe des Patellargleitlagers. Ausgehend von dieser wurde die Kniegelenkkapsel T-förmig sowohl in distale und proximale als auch in caudale Richtung hin eröffnet. Die Patella wurde bei gestreckter Gliedmaße anschließend nach lateral luxiert und die Femurkondyle so weit wie möglich freigelegt (Abb. 11). Über die gesamte Operationsdauer hinweg wurden das Gelenk und die Muskulatur mittels NaCl-getränkter Tupfer feucht gehalten.

Sägevorrichtung

Zur Orientierung für das Anbringen der Sägelehre wurde auf der medialen Kondylenfläche der Osteotomieverlauf markiert. Dieser verlief zwischen dem proximalsten Anteil der Gelenkfläche und der distalen Einziehung am Wendepunkt der Kondylenfläche zur caudalen Trochlea. Auf dieser Geraden wurde in einem Abstand von 15 mm zum distalen Ende der erste Spickdraht (ø 1,5 mm, L150,0;

LX135S Fa. Aesculap, Tuttlingen) gesetzt (Abb. 12). Dieser Draht verlief entsprechend der später folgenden Osteotomie parallel zur darüberliegenden Kondylengleitfläche von medial nach lateral durch den Knochen und diente als Orientierungspunkt für alle weiteren Schritte. Nach Setzen eines zweiten Spickdrahtes (\varnothing 1,5 mm) konnte die U-förmige Sägevorrichtung standardisiert ausgerichtet werden. Sie wurde daraufhin mit zwei Stahldrähten (\varnothing 1,5 mm) sowie einer Spongiosaschraube (\varnothing 3,0 mm) am Knochen fixiert (Abb. 13).

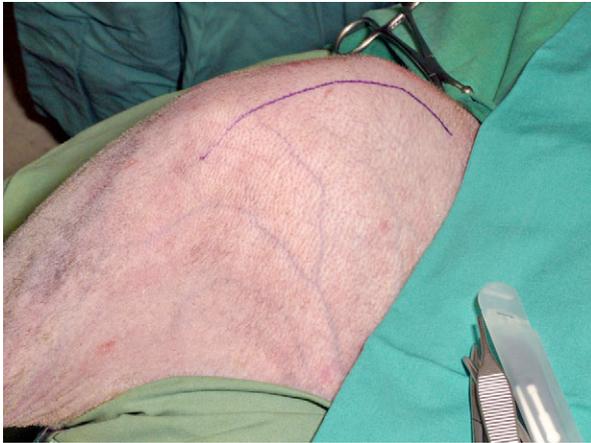


Abb. 10: Markierung des Hautschnittes.

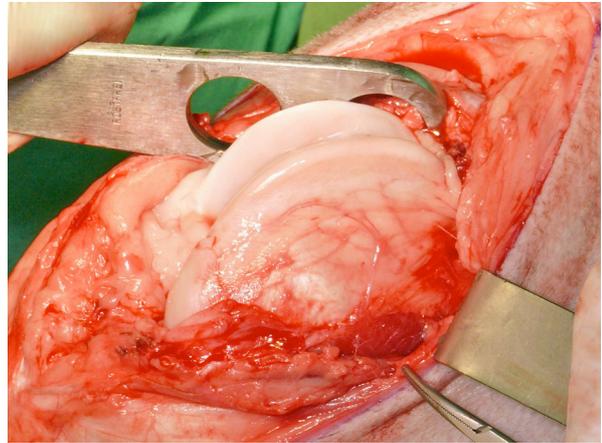


Abb. 11: Darstellung der freiliegenden rechten Femurkondyle nach Zugang.



Abb. 12: Setzen des ersten Spickdrahtes parallel zur Femurkondyle als Orientierung für die weiteren Schritte bei der Anbringung der Sägelehre.

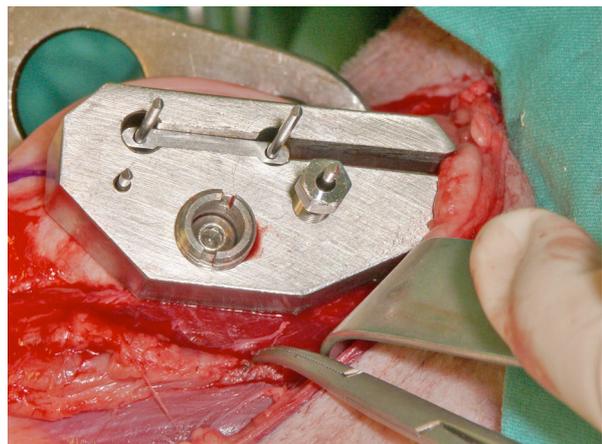


Abb. 13: Aufsicht auf die fixierte Sägelehre.

Osteotomie

Unter ständiger Kühlung durch Spülung mit isotoner Kochsalzlösung wurde zuerst der cranial und anschließend der caudal liegende Sägeschnitt ausgehend von der medialen Trochleafläche durchgängig bis auf die laterale Seite geführt. Dazu lag das Sägeblatt (Evolution 0005.SY und 0003.SY, Fa. Komet Medical[®], Gebr. Brasseler, Lemgo) der oszillierenden Säge (Fa. Synthes, Tuttlingen) mit seiner gesamten Fläche plan an der vormontierten Sägevorrichtung an, wodurch ein exakt 3 mm breiter Osteotomiespalt erzeugt wurde (Abb. 14). Distal blieb eine Knochenbrücke als Verbindung zwischen dem cranialen Knochenstück und dem übrigen Femur bestehen (Abb. 15). Der Osteotomiespalt wurde daraufhin durch Spülung mit NaCl von entstandenen Knochenspänen befreit und die Sägelehre entfernt.

Implantat

Nach Erstellen der Osteotomie erfolgte das Einsetzen des die Bewegung begrenzenden Stahlimplantates am proximalen Ende des ca. 21 mm langen Osteotomiespalts. Die beiden Versuchsgruppen wurden dabei mit zwei unterschiedlichen Implantaten ausgestattet (Abb. 16). Bei der stabil fixierten Gruppe wurde im 3 mm breiten Spalt passgenau ein 3 mm dickes Stahlimplantat eingesetzt. Somit konnte in dieser Gruppe initial keine interfragmentäre Bewegung entstehen. Bei der flexibel fixierten Gruppe wurde ein nur 2 mm dickes Stahlimplantat eingesetzt, das der caudalen Knochenoberfläche im Osteotomiespalt plan auflag und unter Gehbelastung des Schafes bis zu 30 % interfragmentäre Dehnung zuließ (Abb. 17).

Wundverschluss

Nach abschließender Spülung der Osteotomie und des umliegenden Gewebes mit NaCl wurde die Patella reluxiert. Das Vernähen von Gelenkkapsel, Muskulatur und Unterhaut erfolgte mit einer resorbierbaren Nadel-Faden-Kombination Vicryl[®] 2-0 (Fa. Ethicon, Norderstedt) in zwei bis drei Schichten mittels Einzelknopfnah oder bei Adaptation unter erhöhter Spannung durch U-Hefte (horizontale rückläufige Naht). Die Haut wurde mit einer nicht-resorbierbaren Nadel-Faden-Kombination Resolon[®] 3-0 (Fa. Resorba, Nürnberg) durch Einzelknopfnah adaptiert.

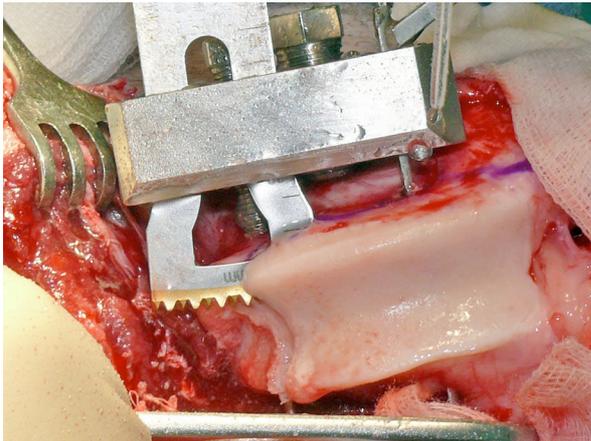


Abb. 14: Sägen des Osteotomiespalts durch die rechte Femurkondyle mittels oszillierender Säge und Sägelehre.

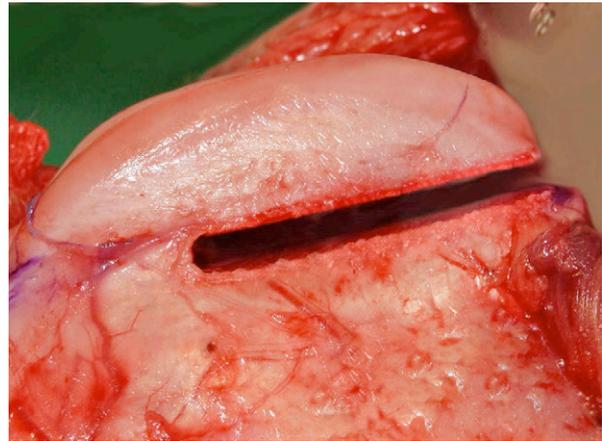


Abb. 15: Seitliche Ansicht des Osteotomiespalts ohne Implantat.



Abb. 16: Implantate mit einer Dicke von 2 mm (vorn) und 3 mm (hinten).

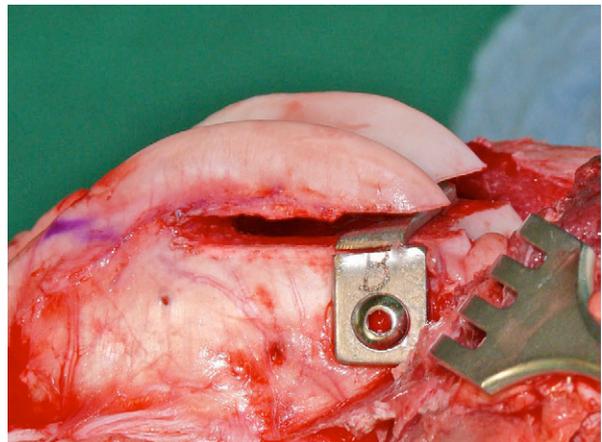


Abb. 17: Osteotomiespalt mit eingesetztem 2 mm - Implantat im proximalen Spaltbereich.

Postoperative Versorgung

Die operierte Gliedmaße wurde nach dem Wundverschluss sorgfältig mit isotonischer Kochsalzlösung sowie Hautantiseptikum (FrekaDerm[®], Fa. Fresenius, Bad Homburg) gereinigt, desinfiziert und anschließend die Wunde mit einem Pflaster (Leukomed[®], Fa. BSN medical GmbH, Hamburg) abgedeckt. Vom Metatarsus bis über das Knie wurde zudem ein weicher Polsterverband (Stülpa[®] 4R, Fa. Hartmann, Heidenheim) angebracht. Bei nachlassender Narkosetiefe wurden die Tiere in Seitenlage verbracht und die Pansensonde entfernt. Nach Wiedereinsetzen des Schluckreflexes fand die Extubation statt und der Kopf der Schafe wurde tiefer gelagert um eine Aspiration zu vermeiden.

Danach erfolgte eine postoperative Röntgenkontrolle der operierten Gliedmaße in latero-medialem Strahlengang (AJEX 140 H, Fa. AJEX Meditech Ltd., Südkorea). Für die Aufnahmen wurden je nach Dicke der Hintergliedmaßenmuskulatur eine Spannung im Bereich von 65 ± 5 kV, eine Stromstärke von $3,5 \pm 0,5$ mAs und ein Fokus-Film-Abstand von 100 cm gewählt. Jedes Tier wurde in seiner Aufwachbox solange beaufsichtigt, bis es nach der Narkose wieder sicher stehen konnte. In den ersten drei postoperativen Tagen erhielten die Schafe zur Infektionsprophylaxe 10 mg/kg KGW Amoxicillin s.c. (Amoxicillin 15 %, Fa. WDT, Garbsen) sowie als Analgetikum 4 mg/kg KGW Carprofen s.c. (Rimadyl[®], Fa. Pfizer, Karlsruhe).

2.1.4.3 Pflege der Tiere

In der ersten Woche post OP wurde der Verband täglich erneuert und die Wunde mit einem alkoholischen Hautantiseptikum (FrekaDerm[®], Fa. Fresenius, Bad Homburg) gereinigt und desinfiziert. Über die gesamte Dauer des Versuches wurden Wunde, rektale Körpertemperatur und Allgemeinbefinden der Tiere regelmäßig kontrolliert. Vereinzelt traten Schwellungen oder Rötungen im Operationsbereich auf, die Wundheilung verlief jedoch komplikationslos. Bei einem Schaf bestand der Verdacht einer Infektion aufgrund von Symptomen wie erhöhter Temperatur, reduziertem Fressverhalten und geringer Bewegung. Diesem wurde an drei aufeinanderfolgenden Tagen zur antibiotischen Behandlung und Schmerzmedikation zweimal täglich 10 mg/kg KGW Amoxicillin (Amoxicillin 15 %, Fa. WDT, Garbsen) sowie einmal täglich 4 mg/kg KGW Carprofen (Rimadyl[®], Fa. Pfizer, Karlsruhe) s.c. injiziert.

2.1.4.4 Röntgen und Applikation von Fluoreszenzfarbstoffen

Um den Fortschritt der Heilung zu untersuchen, wurde zusätzlich zur postoperativen Röntgenkontrolle bei jeweils drei Schafen pro Gruppe in der dritten postoperativen Woche eine weitere Röntgenaufnahme durchgeführt. Dafür wurden die Schafe mit denselben Einstellungen (vgl. 2.1.4.2) im latero-medialen Strahlengang geröntgt. Zur Beurteilung der Knochenneubildungsdynamik über den Heilungszeitraum erfolgte an zwei verschiedenen Zeitpunkten die Markierung des neugebildeten Knochens mithilfe von Fluoreszenzfarbstoffen. Die Farbstoffe Calceingrün (10 mg/kg KGW; i.v.,

Calceingrün, Fa. Synopharm, Barsbüttel) und Tetrazyklin (25 mg/kg KGW; i.v., Tetrazyklinhydrochlorid, Fa. Caelo GmbH, Hilden) wurden den Tieren vier bzw. sechs Wochen post OP langsam über die Vena jugularis injiziert. Für den Calceinfarbstoff wurde die pulverförmige Ausgangssubstanz in destilliertem Wasser gelöst (10 mg/ml) und diese Lösung dann mit einem Sterilfilter (Porengröße 0,2 µm) unmittelbar vor Injektion steril filtriert. Der Farbstoff Tetrazyklin wurde direkt vor der Injektion 1:3 mit isotoner NaCl-Lösung verdünnt. Da sich der Fluoreszenzfarbstoff in den ersten zwei bis drei Tagen nach Injektion im neu mineralisierten Gewebe einlagert, lässt sich post mortem der Verlauf der Mineralisationsfront zum gewählten Injektionszeitpunkt im histologischen Schnitt ermitteln. Unter fluoreszierendem Licht zeigten sich die gewählten Farbstoffe bei einer Wellenlänge von 490 – 530 nm als grüne (Calceingrün) und von 390 – 560 nm als gelbe (Tetrazyklin) Farbbanden, anhand deren Abstand die Knochenneubildungsrate zwischen den Injektionen festgestellt werden kann.

2.1.4.5 Aktivitäts- und Bodenreaktionskraftmessung

Um den Heilungsverlauf beurteilen zu können, fanden im Zeitraum von einer Woche prae OP bis zur Tötung der Tiere wöchentlich Aktivitätsmessungen mittels Schrittzähler sowie Bodenreaktionskraftmessungen statt. Dazu wurde am Metatarsus der nicht operierten Gliedmaße einzelner Tiere beider Gruppen (je n = 4) für jeweils drei aufeinanderfolgende Tage mittels eines elastischen Bandes ein Schrittzähler befestigt (Stepwatch[®], Fa. Orthocare, USA) (Abb. 18). Zusätzlich wurden alle Schafe über eine drucksensitive Messplattform (Bodenreaktionskraft) geführt, welche die maximale Auftrettskraft und die maximale Kontaktfläche der einzelnen Gliedmaßen aufzeichnete (Messplattform emed-M[®], Fa. novel GmbH, München; (Abb. 19, Abb. 20).



Abb. 18: Der Schrittzähler wurde zur Messung der Aktivität am Metatarsus des Schafes befestigt.

Dieser Vorgang wurde mit den Tieren bereits praeoperativ geübt. Um dieselben Bedingungen zu gewährleisten, wurden alle Schafe über den gesamten Versuchszeitraum mit möglichst konstanter Ganggeschwindigkeit immer von derselben Person über die Messplattform geführt. Es wurden von jedem Tier mindestens sechs vollständige Belastungskurven jeder Hinter- und Vordergliedmaße aufgezeichnet. Die daraus erzielten maximalen Auftrittskräfte wurden auf das individuelle Körpergewicht jedes Tieres normiert.

Anhand der Aktivitätsmessung bzw. der vertikalen Bodenreaktionskraftmessung konnte jeweils eine Verlaufskurve erstellt werden, die Aussagen über den Grad der Aktivitätsminderung bzw. die Entlastung der Gliedmaße und die Verteilung des KGW aufgrund der Operation zuließ.



Abb. 19: Schaf über EMED-Plattform laufend (Plattform zum Schutz in weißes Tuch gepackt, das die Messung nicht beeinflusst).



Abb. 20: EMED-Gangmessplattform (610 x 320 mm²); die schwarze Fläche ist die Sensorfläche (240 x 380 mm²).

2.1.4.6 Tötung

Die Tötung der Tiere erfolgte acht Wochen nach der Operation durch Betäubung mittels Bolzenschuss und unmittelbar folgendem Entbluten durch geschultes Personal des Tierforschungszentrums Ulm.

2.2 Aufarbeitung der Proben

2.2.1 Präparation und Röntgen

Beide Femura wurden explantiert und Haut sowie Muskulatur vorsichtig abpräpariert. Im Kniebereich wurde die Gelenkkapsel eröffnet, das Femur von der Tibia getrennt und sorgfältig vom restlichen Weichgewebe befreit. Im Anschluss an die Präparation wurde von den Knochen beider Seiten vergleichend vor und nach Entfernung des Implantates im latero-medialen und cranio-caudalen Strahlengang eine Kontaktröntgenaufnahme im Tischröntgengerät (Faxitron 43805N X-Raysystem, Fa. HP, USA) angefertigt (Spannungen 63 kV, Belichtungszeit 3 min). Der Zustand der präparierten Femora wurde zwischen den einzelnen Arbeitsschritten in verschiedenen Ebenen dokumentiert und fotografiert (Olympus Digitalkamera C-5060, Fa. Olympus Corporation, Japan). Währenddessen wurde der Knochen ständig mit in physiologischer NaCl-Lösung getränkten Kompressen feucht gehalten. Femurschaft und caudaler Anteil der Femurkondylen wurden parallel zum Osteotomiespalt ca. 2 cm caudal von diesem mit einer Diamantbandsäge (Fa. PSI-Grünwald-Exakt, Laudenbach) abgesägt (Abb. 21). Vor der weiteren Zerteilung des Knochens wurde das Implantat entfernt und eine Messung im peripheren quantitativen Computertomograph (pQCT) durchgeführt. Die Aufarbeitung des nicht-operierten linken Femurs fand entsprechend statt.

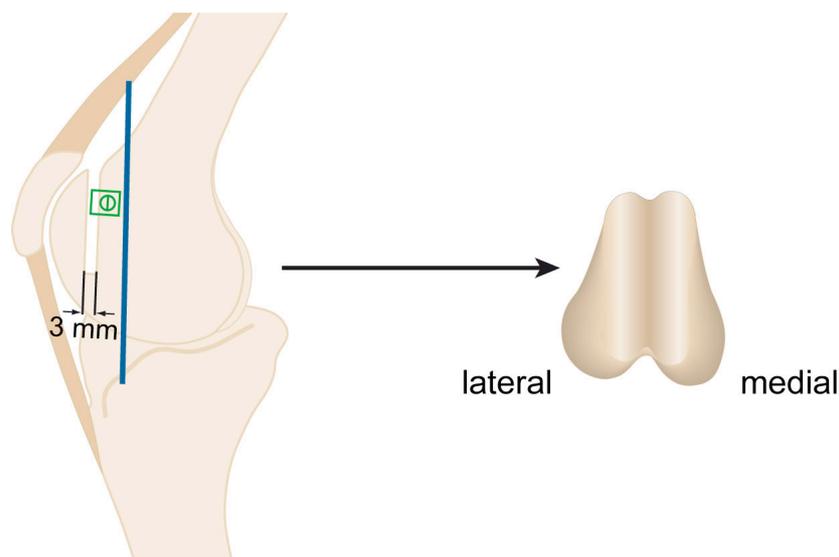


Abb. 21: Sägeschnitt (blaue Linie) durch die Femurtrochlea zur weiteren Verarbeitung des Präparates.

2.2.2 Periphere quantitative Computertomographie (pQCT)

Anhand der peripheren quantitativen Computertomographie (pQCT) lässt sich die Mineraldichte des Knochengewebes (BMD = bone mineral density in mg Hydroxylapatit HA/ccm) untersuchen. Diese kann im pQCT (XCT 960A, Fa. Stratec Medizintechnik, Pforzheim) anhand hochauflösender Schnitte mit einer Voxelgröße von 0,295 x 0,295 x 1 mm bestimmt werden.

Vor Beginn einer neuen Messserie eines Tages wurde mit einem Standardphantom (Phantom 0.495, Nr. 91068) mit bekannter Hydroxylapatit-Dichte (262 mg/ccm) eine Referenzmessung zur Kalibrierung des Gerätes durchgeführt. Die Abweichung zwischen den einzelnen Referenzmessungen lag unter 3 %. Zur Bestimmung der Mineraldichte wurde die Femurtrochlea (Abb. 21) in eine mit NaCl-angefeuchtete Kompresse gewickelt und mit Parafilm (Pechiney, Chicago, USA) luftdicht umschlossen. Das so präparierte Knochenstück wurde zentral im Scanschacht positioniert (Abb. 23).

Als Startpunkt für den 30 mm langen Übersichtsscan (Scoutview) wurde das distale Ende des Osteotomiespalts gewählt. Der Übersichtsscan bestand aus fünfzehn Horizontalschnitten in fortlaufenden parallelen Sagittalebene mit einer Schichtdicke und einem Abstand von jeweils 1 mm.

Zur Bestimmung der BMD wurden vier je 1 mm dicke Schnittebenen im Abstand von je 5 mm angefertigt, deren Position anhand der farbcodierten Rasteraufnahme des zweidimensionalen Scoutviews manuell festgelegt wurde. Die erste Schnittebene war unmittelbar proximal des distalen Spaltendes innerhalb des Osteotomiespalts platziert. Jeweils zwei Schnittebenen befanden sich in der distalen und zwei in der proximalen Spalthälfte (Abb. 22). Mithilfe der Gerätesoftware (Stratec XCT-960A, Version 5.20) wurden die einzelnen Schnittebenen bei einem Schwellenwert von 0 mg HA/ccm ausgewertet. Dafür wurden manuell in jeder Schnittebene drei rechteckige Regionen von Interesse (regions of interest = ROIs) mit einer standardisierten Höhe von jeweils 3 mm definiert. Die ROI_{Spalt} beinhaltete den Osteotomiespalt (Abb. 24). Die Knochendichte in der Spaltumgebung wurde durch zwei weitere ROIs untersucht (ROI_{oben} und ROI_{unten}), die je 1,25 mm oberhalb bzw. unterhalb des entsprechenden Osteotomiespaltrandes parallel verliefen (Abb. 24). Als seitliche Begrenzung aller ROIs wurde die kortikale Knochenoberfläche definiert.

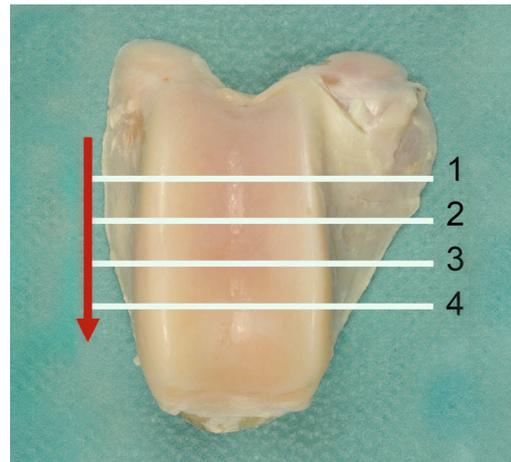
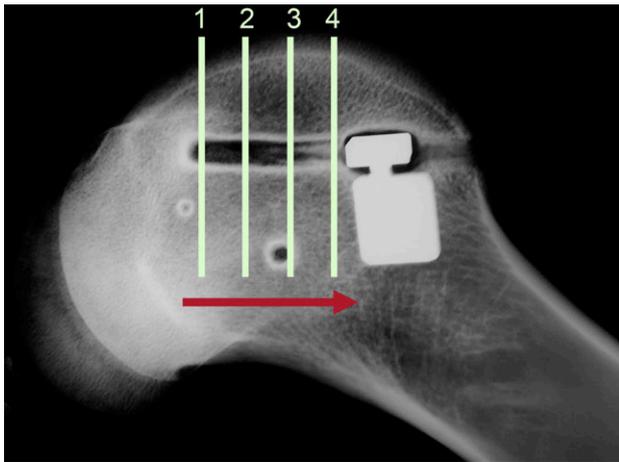


Abb. 22: Schematische Darstellung der Schnittebenen der pQCT-Messung; links: Faxitronaufnahme Femurkondyle Im.; rechts: Aufsicht von cranial auf Femurkondyle; Querschnitt 1 und 2 befinden sich in der distalen, 3 und 4 in der proximalen Spalthälfte; gemessen wurde von distal nach proximal (Pfeil).

Anschließend errechnete die Auswertungssoftware für jede ROI die Gewebdichte in mg HA/ccm. Dazu wurden die ROIs aller Bereiche mindestens fünfmal neu eingezeichnet und der Mittelwert aus diesen Messungen ermittelt. Dasselbe Prinzip galt für die nicht osteotomierten linken Femurkondylen, in welchen entsprechend der Lokalisation der Schnittebenen und der ROIs im rechten Femur ebenfalls je Querschnitt drei ROIs markiert und in gleicher Art und Weise ausgewertet wurden (Abb. 24).

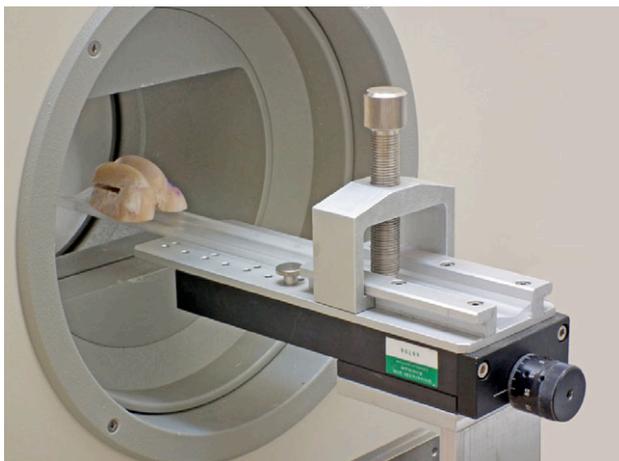


Abb. 23: pCT-Röhre mit zentral positioniertem Präparat auf der Justier-Acrylglaschiene.

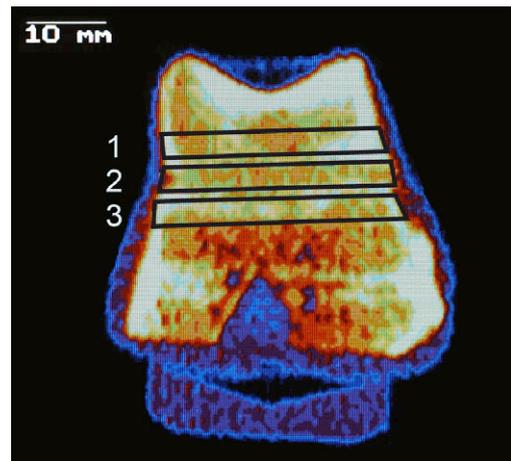


Abb. 24: Darstellung der drei für die Auswertung herangezogenen ROIs an einem Querschnitt der Femurkondyle.
 1 = ROI_{oben} (oberhalb)
 2 = ROI_{Spalt} (Mitte)
 3 = ROI_{unten} (unterhalb)

2.2.3 Zerteilung des Knochens

Nach der Messung im pQCT erfolgte die weitere Zerteilung der Knochenprobe mittels einer Diamantbandsäge (Fa. PSI-Grünwald-Exakt, Laudenbach). Zunächst wurde der Knochen am tiefsten Punkt der Trochlea mittig zwischen beiden Femurkondylen durch einen Längsschnitt in eine mediale und eine laterale Hälfte zerteilt (Abb. 25, Mitte oben).

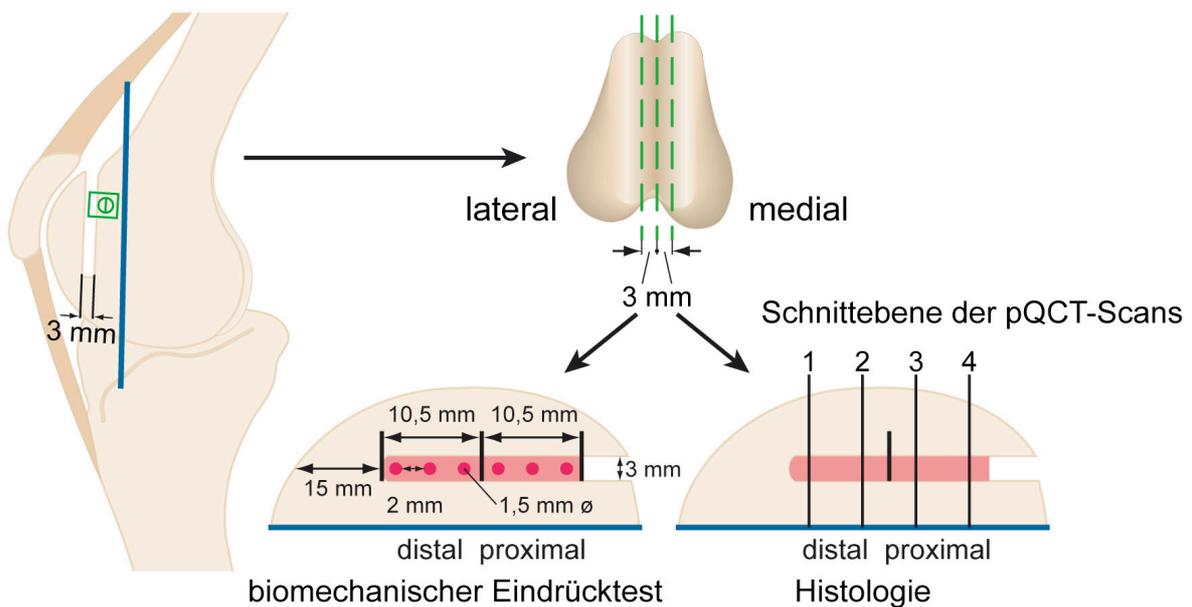


Abb. 25: Schnittschema zur Teilung der Femurkondyle in zwei gleiche Hälften; zur biomechanischen Testung aus der lateralen (links), zur histologischen Auswertung aus der medialen Hälfte (rechts).

Anschließend an diesen Längsschnitt wurde jeweils an beiden Hälften im Abstand von ca. 3,2 mm (incl. Sägeverschnitt) ein weiterer, parallel verlaufender Längsschnitt durchgeführt (Abb. 25, Mitte oben). Dadurch erhielt man eine 3 mm dicke laterale bzw. mediale Knochenplatte für die biomechanische Testung bzw. für die computertomographische und histologische Untersuchung. Während der gesamten Präparation und den folgenden Untersuchungen wurden die Präparate mit 0,9 % iger NaCl-Lösung feucht gehalten. Der Zustand der medialen, 3 mm dicken Knochenplatte jedes Tieres wurde sowohl fotografisch als auch röntgenologisch (20 kV, 5 min; Faxitron 43805N X-Raysystem, Fa. HP, USA) dokumentiert. Anschließend wurde der Knochen in Formaldehyd (4 %) fixiert. Dieses Protokoll fand entsprechend für die nicht-operierte linke Seite Verwendung.

2.2.4 Biomechanik (Eindrücktests)

Die mechanische Belastbarkeit und Qualität des neugebildeten Knochens in und um den Osteotomiespalt wurde mithilfe einer Materialprüfmaschine (Modell Z010, Fa. Zwick, Ulm) getestet. Hierzu wurden Eindrücktests (Indentationstests) an der 3 mm dicken, lateralen Knochenscheibe aus dem Osteotomiebereich durchgeführt (Abb. 25, Abb. 29). Diese wurde bei Raumtemperatur und ständiger Feuchthaltung durch NaCl auf eine Druckplatte gelegt. Die Scheibe war dabei immer flach und auf ihrer lateralen Fläche positioniert. Für den Eindrücktest wurde ein zylindrischer Druckstempel (\varnothing 1,5 mm), ein Kraftaufnehmer ≤ 500 N mit einer Genauigkeit von $\leq 0,3$ % (Messdose Typ KAF-TC, Fa. A.S.T. / Zwick, Ulm) und ein Wegaufnehmer-Laser mit einer Genauigkeit von $\leq 0,2$ % (Messbereich 20 mm; IL-D220-20, Fa. Micro-Epsilon, Ortenburg) verwendet (Abb. 26, Abb. 27).

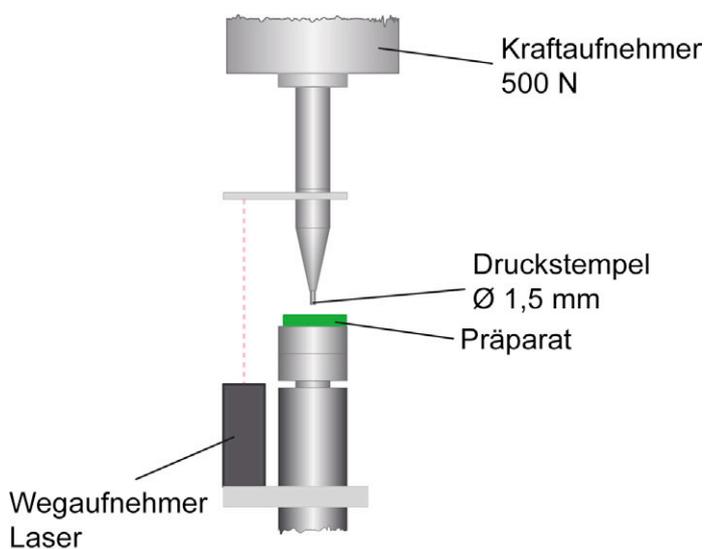


Abb. 26: Schematische Darstellung des Versuchsaufbaus für die biomechanische Eindrücktestung.



Abb. 27: Photographische Darstellung des Versuchsaufbaus der Eindrücktestung.

Während der Messung wurde eine Vorkraft von 0,2 N aufgebracht und der Stempel mit einer Prüfgeschwindigkeit von 1 mm/min senkrecht auf die Knochenscheibe gedrückt. Der seitlich angebrachte Lasersensor erfasste die Eindrücktiefe. Die einzelnen Messwerte wurden jeweils in einer Kraft-Weg-Kurve aufgetragen, aus deren Steigung sich die Steifigkeit (in N/mm) des Gewebes ermitteln ließ. Diese wurde im linearen Verlauf der Kraft-Dehnungskurve im Bereich unter 10 % Dehnung bestimmt. In nahezu allen Fällen grenzte dieser lineare Bereich an die 10 % Dehnungsmarke (10 % L₀) (Abb. 28). Um die Steifigkeit unabhängig von Schwankungen in der Probenhöhe und vom Durchmesser des Stempels zu machen, wurden die erhaltenen Kraftwerte anschließend auf die jeweilige Höhe der Knochenscheibe an der Eindrückstelle bezogen und korrigiert.

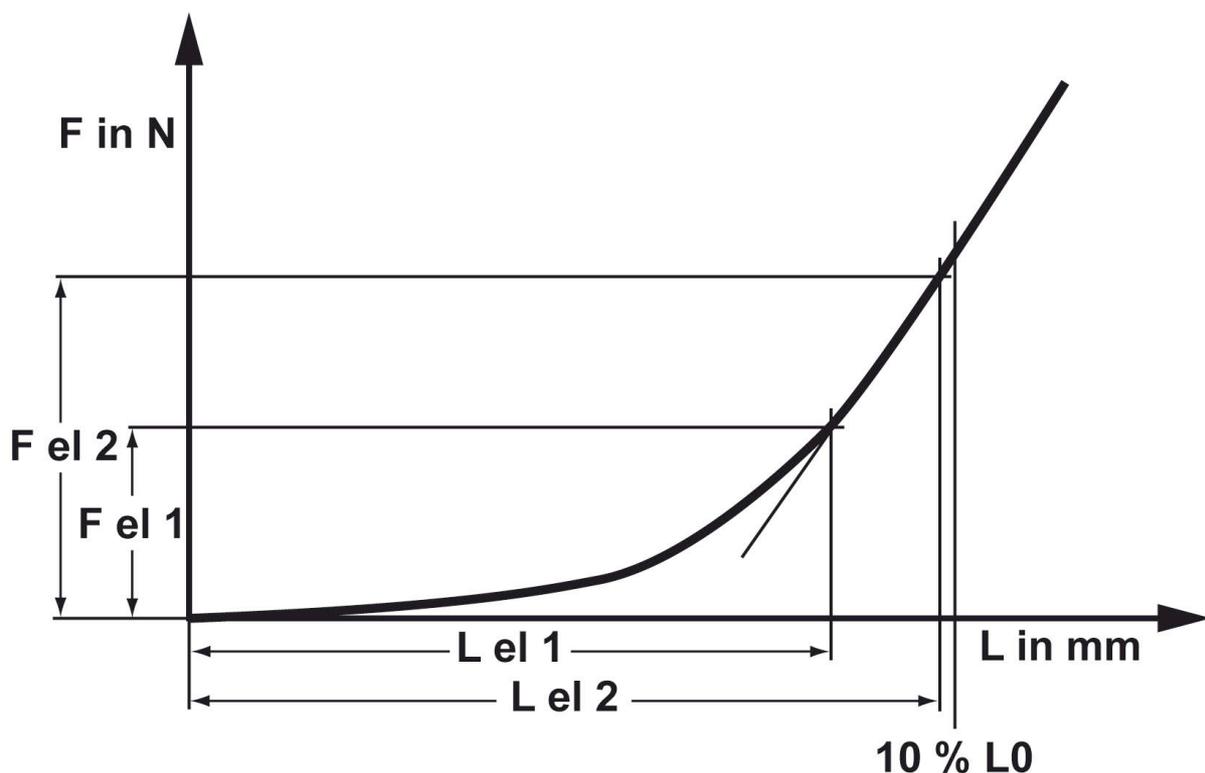


Abb. 28: Kraft-Weg-Kurve zur Ermittlung der Steifigkeit des Materials aus der Steigung der Kurve; Abszisse: Länge (L) in mm; Ordinate: Kraft (F) in N.

$$\text{Steifigkeit (Steigung)} = \frac{F_{el 2} [N] - F_{el 1} [N]}{L_{el 2} [mm] - L_{el 1} [mm]}$$

Für die biomechanische Testung wurden nach einem standardisierten Schema verschiedene Druckpunkte innerhalb sowie ober- und unterhalb des Osteotomiespalts festgelegt (Abb. 31). Der Bereich innerhalb des Osteotomiespalts bestand aus sechs Druckpunkten, die in eine distale und eine proximale Spalthälfte mit je drei Druckpunkten (D1, D2, D3 bzw. D4, D5, D6) unterteilt wurden (Abb. 30). Aus den drei Werten jeder Hälfte wurde jeweils der Mittelwert gebildet.

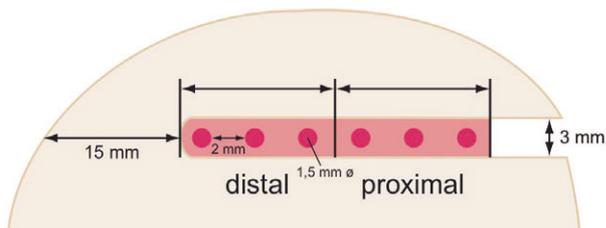
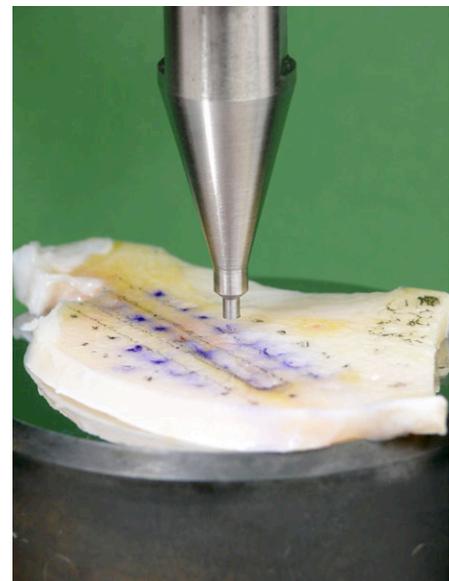


Abb. 29 (oben): Schema der Druckpunkte innerhalb des Osteotomiespalts (Defektbereich D); drei Messpunkte liegen in der distalen, drei in der proximalen Spalthälfte.

Abb. 30 (rechts): 3 mm Knochenscheibe liegt plan auf der Druckplatte – die markierten Druckmesspunkte wurden zur Bestimmung ihrer Steifigkeit nacheinander mit einem Stempel (\varnothing 1,5 mm) gedrückt.



Um einen durchschnittlichen Steifigkeitswert in Abhängigkeit zum Abstand zum Defektbereich zu erhalten, wurden weitere Punkte im Bereich außerhalb des Osteotomiespalts gemessen (GG, GD, KD, KK, Abb. 31). In Anlehnung an das Schema für die übrigen Auswertungen (Abb. 22, Abb. 32) wurde dafür im Abstand von 2 mm bzw. 5 mm zur Osteotomiespaltbegrenzung die Steifigkeit der entsprechenden drei Punkte oberhalb (GD und GG) und unterhalb (KD und KK) erfasst und ebenfalls gemittelt (Abb. 31). Dieses Verfahren wurde an der nicht-operierten linken Knochenscheibe gleichermaßen durchgeführt.

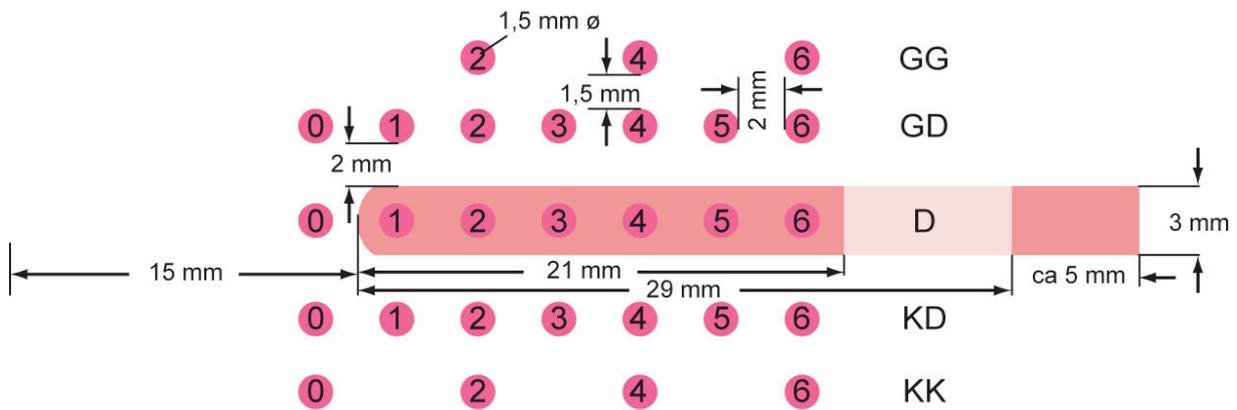
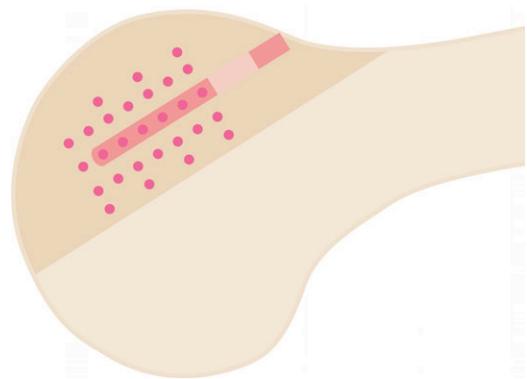


Abb. 31: Schema der Druckpunkte aller Druckbereiche (oben) und deren Lage in der Femurkondyle (rechts):

- GD: spongiöser Bereich 2 mm oberhalb von D
- GG: spongiöser Bereich 5 mm oberhalb von D
- D: zentral im Spalt / Defekt
- KD: spongiöser Bereich 2 mm unterhalb von D
- KK: spongiöser Bereich 5 mm unterhalb von D



2.2.5 Mikro-Computertomographie (μ CT)

Um die Struktur des neugebildeten Gewebes im Osteotomiespalt zu untersuchen, wurde eine Mikro-Computertomographische Analyse mit dem μ CT (Fan-Beam- μ -Scope, Fa. Stratec Medizintechnik, Pforzheim) und der dazugehörigen Auswertesoftware (Version 2.10) durchgeführt. Dazu wurden die rechten und linken medialen Knochenscheiben aller Tiere gemessen. Die Präparate wurden mit senkrecht orientiertem Osteotomiespalt, in einem mit Formaldehyd (4 %) gefüllten Plexiglasgefäß in der Probenhalterung des μ CT-Geräts befestigt. Zuerst wurde ein Übersichtsscan (Scoutview) von proximal nach distal mit einer Auflösung von 90 μ m erstellt. Daraufhin konnte die Position der ca. 800 Schnitte manuell so definiert werden, dass sie die gesamte Länge des Osteotomiespalts umfassten. Die Querschnitte wurden bei einer räumlichen Auflösung von 90 x 90 x 90 μ m (40 kV, 160 μ A) im Abstand von 90 μ m gescannt. Zur Beurteilung der Struktur des Knochens in und um den Osteotomiespalt herum wurden die gescannten aufeinanderfolgenden Querschnitte mithilfe der Software VGStudio MAX[®] (Vers.1.0, Fa. Volume Graphics GmbH, Heidelberg) zu einem dreidimensionalen Gesamtbild zusammengefügt.

2.2.6 Histologie

2.2.6.1 Herstellung der Dünnschliffpräparate

Die im μ CT gescannten medialen Knochenscheiben (Abb. 25) wurden nachfolgend für die histologische Auswertung aufbereitet. Diese erfolgte mittels Trenn-Dünnschliff-Technik nach Prof. Donath am unentkalkten Knochen (Romeis, 1989). Hierzu wurde der Knochen über vier bis fünf Tage unter Lichtausschluss in einer abgepufferten, neutralen, 4 % igen Formaldehydlösung fixiert. Anschließend wurden die Präparate über vier Stunden unter fließendem, lauwarmem Wasser gespült und daraufhin in einer aufsteigenden Alkoholreihe mit vergälltem Ethanol (40 %, 70 %, 80 %, 90 %, 96 % und 3 x 100 %) entwässert. Es folgte die Entfettung der Proben in Xylol und die anschließende Überführung in ein Einbettmedium aus einem Methylmethacrylat-Monomer (Fa. Röhm, Darmstadt) zur Infiltration und Aushärtung mit Kunststoff. Unter Zugabe eines Reaktionsbeschleunigers (Benzoylperoxid, Fa. Merck, Darmstadt) härtete der Kunststoff im sauerstoffundurchlässigen, verschlossenen Gefäß nach fünf bis sechs Wochen zu einem kompakten Block aus. Der entstandene polymerisierte Polymethylmethacrylat (PMMA) - Block wurde auf einen Kunststoff-Objektträger aufgeklebt und der Kunststoff soweit abgeschliffen (Mikroschleifsystem, Fa. Exact, Norderstedt), dass das Knochenpräparat an der Oberfläche lag. Davon wurde nun mit einer Diamantbandsäge (Trennschleifsystem, Fa. Exact, Norderstedt) eine ca. 200 μ m dicke Scheibe abgetrennt, deren Schnittdicke mit einer Tischschleifmaschine (T6250/1; Fa. Jean Wirtz Hahn & Kolb, Stuttgart) auf ca. 70 μ m reduziert wurde.

Die für die histologische Untersuchung relevante Oberfläche wurde mit einem Mikroschleifsystem (Fa. PSI - Grünewald-Exakt, Laudenbach) so lange angeschliffen bis die Oberfläche des Gewebeblocks vollständig plan war. Schließlich wurden beide Seiten des Objektträgers glänzend poliert, damit mikroskopisch klar sichtbare Strukturen dargestellt werden konnten.

2.2.6.2 Paragon-Färbung

Die Färbung der Schlicke für die anschließende Gewebedifferenzierung erfolgte nach Paragon (Romeis, 1989). Dazu kam eine Farbstoffmischung aus 30 % igem absoluten Ethanol (1000 ml), Toluidinblau O (7,3 g) sowie basischem Fuchsin (2,7 g) zum Einsatz (Fa. Chroma-Schmid, Köngen). Diese Stammlösung wird im Verhältnis 1 : 3 mit destilliertem Wasser verdünnt und auf einen pH-Wert von 10 eingestellt. In der Paragon-Färbung stellen sich alle Zellkerne, basophiles Zytoplasma, Osteoidsäume und Weichgewebe in verschiedenen Blautönen dar. Mineralisierte Matrix scheint je nach Mineralisationsgrad ungefärbt bzw. zartrosa bis violett.

2.2.6.3 Qualitative und quantitative Gewebedifferenzierung

Histologisch wurde die Zusammensetzung des neugebildeten Gewebes im Osteotomiespalt sowohl qualitativ deskriptiv als auch quantitativ untersucht. Die quantitative Auswertung der Präparate fand bei einer 100-fachen Vergrößerung am Durchlichtmikroskop (Axiophot[®], Fa. Zeiss, Oberkochen) statt. Dazu wurde das sogenannte Punktezählverfahren mithilfe eines Netzokulars / Rasterobjektivs angewandt. Dieses Objektiv bildete ein Gitternetzraster mit 10 x 10 Zählpunkten auf dem Präparat ab. Bei der gewählten Vergrößerung entsprach das Raster einer Fläche von 1,25 x 1,25 mm und der Abstand der einzelnen Punkte lag bei 0,125 mm. Jedem Kreuzungspunkt des Netzgitters wurde eine bestimmte Gewebeart zugeordnet und insgesamt pro Netzraster 100 Punkte ausgezählt. Mittels eines Zählgerätes konnten Art und Anzahl der jeweiligen Gewebepunkte im Präparat erfasst werden, die anhand eines Schemas in sechs annähernd gleich große Bereiche aufgeteilt wurden (Abb. 32). Die ersten beiden Zählbereiche umfassten den gesamten Osteotomiespalt, der zu gleichen Teilen in eine distale und eine proximale Hälfte aufgeteilt wurde. In Anlehnung an das Schema der biomechanischen Eindrücktestung (Abb. 31) lag ein weiterer Bereich jeweils ober- und unterhalb des distalen sowie des proximalen Spaltbereichs. Jede einzelne dieser Regionen wurde mit dem Zählraster mäanderförmig abgefahren und ausgezählt, was eine Anzahl von je 1600 – 1800 Zählpunkten pro Bereich ergab. Die Einteilung des untersuchten Gewebes erfolgte in die vier Gruppen Knochen, Osteoid, Knorpel und Weichgewebe, aus welchen der entsprechende prozentuale Anteil errechnet wurde.

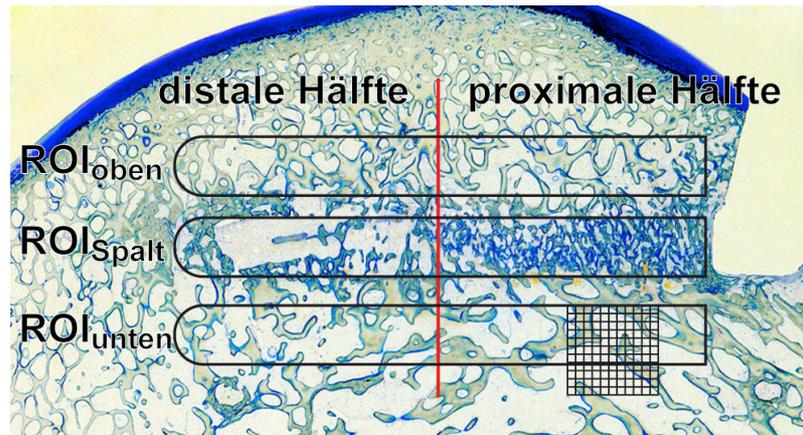


Abb. 32: Schematische Darstellung des Punktezählverfahrens mit Angabe der sechs unterschiedlichen Bereiche; Netzraster liegt exemplarisch in einem Ausschnitt eines histologischen Schnittes (nicht maßstabsgetreu).

Zudem wurde der Osteotomiebereich bei verschiedenen Vergrößerungen qualitativ deskriptiv bewertet. Besondere Beachtung fanden hierbei die Art der vorherrschenden Ossifikationsform und der Kontaktbereich zwischen Knochen und Implantat. Weiterhin wurde nach Anzeichen für Knochenvitalität, Knochenumbau und Remodeling gesucht, wozu z.B. eine Erhöhung der Osteoklastenanzahl oder der osteoblastären Aktivität zählten.

2.2.6.4 Fluoreszenzmikroskopische Untersuchung

Durch die Injektion der Fluoreszenzfarbstoffe zu unterschiedlichen Zeitpunkten (Calceingrün vierte Woche post OP, Tetrazyklin sechste Woche post OP) konnte in den histologischen Schnitten der Verlauf des Mineralisierungsgrades im Osteotomiespalt zusätzlich fluoreszenzmikroskopisch analysiert werden. Dies geschah bei 25-facher Vergrößerung mittels eines Fluoreszenzfilters (Blue- / Green FP; Excitation filter BP 385/15 und BP 485/20, Fa. Leica Microsystems GmbH, Mannheim), durch den die injizierten Farbstoffe Calceingrün und Tetrazyklin am Durchlichtmikroskop (Leica DMI6000B, Fa. Leica Microsystems GmbH, Mannheim) dargestellt werden konnten. Die Schnitte wurden photographisch dokumentiert (Kamera Leica DFC 420C) und qualitativ deskriptiv ausgewertet (Leica Application Suite, Advanced Fluorescence 2.2.0 build 4765, Fa. Leica Microsystems GmbH). Zur besseren Darstellung und Abgrenzung der beiden Fluoreszenzbanden wurde die gelbe Färbung des Tetrazyklins durch eine rote Falschfarbe ersetzt (Abb. 33).

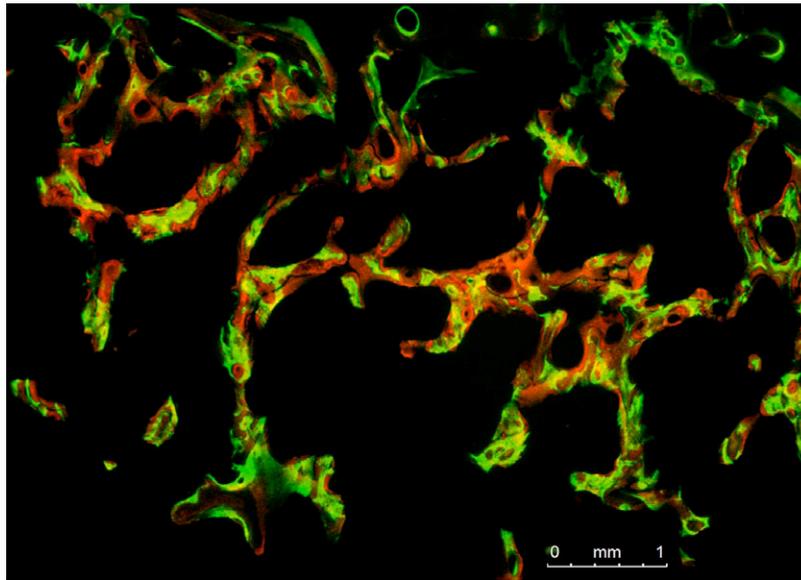


Abb. 33: Schematische Darstellung eines Bereichs innerhalb des Osteotomiespalts unter fluoreszierendem Licht; die grünen Banden repräsentieren das in der vierten Woche post OP injizierte Calceingrün, die roten Banden das in der sechsten Woche injizierte Tetrazyklin.

2.2.7 Statistik

Bei allen quantitativen Auswertungsverfahren (pQCT, Biomechanik, Gewebedifferenzierung, Fluoreszenzmikroskopie) wurden die Werte in ein Tabellenkalkulationsprogramm übertragen (Microsoft[®] Excel[®] 2007) und Mittelwert sowie Standardabweichung ermittelt. Statistische Berechnungen wurden mit JMP[®] (Version 5.0.1.2, Fa. SAS Institute, Cary, N.C., USA) durchgeführt, wobei statistisch signifikante Unterschiede mit dem nicht-parametrischen Wilcoxon Rank Sum-Test für unverbundene, nicht-normalverteilte Stichproben ermittelt wurden. Dieser Test wurde angewendet, da aufgrund der geringen Tierzahl ($n = 12$) nicht von einer Normalverteilung der Werte ausgegangen werden konnte. Als statistisch signifikant gelten mit (*) gekennzeichnete Werte mit $p \leq 0,05$. Es wurde jeweils die stabil fixierte ($n = 6$) und die flexibel fixierte ($n = 5$) Tiergruppe sowie die Kontrollgruppe aus allen nicht-operierten Präparaten des linken Femurknochens ($n = 11$) miteinander verglichen. Die graphische Darstellung der Werte in den Diagrammen erfolgte in Form von Mittelwerten und Standardabweichung.

3 Ergebnisse

3.1 Klinischer Verlauf

Die Operation verlief bei allen Schafen komplikationslos. Im Durchschnitt betrug die Operationszeit ca. 2 $\frac{3}{4}$ Stunden, die Vor- und Nachbereitungszeit etwa 1 $\frac{1}{2}$ Stunden. In den ersten beiden Wochen post OP entlastete ein Teil der Tiere beider Gruppen teilweise die operierte Gliedmaße. Bei zwei Tieren aus jeder Gruppe bildete sich im Operationsbereich cranial des Kniegelenks eine leichte Flüssigkeitsansammlung im Unterhautgewebe, die über den gesamten Versuchszeitraum erhalten blieb. Diese stellte sich jedoch weder vermehrt rot oder warm noch schmerzhaft dar und schränkte die Schafe in keiner Weise ein. Alle Tiere zeigten eine ungestörte Wundheilung. Ein Schaf wurde aufgrund des Verdachts einer Infektion über die Dauer von drei Tagen antibiotisch und analgetisch versorgt, die anderen Tiere zeigten über die gesamte Standzeit hinweg ein ungestörtes Allgemeinbefinden.

Drei Wochen nach der Operation wurden von einzelnen Tieren aus den beiden Operationsgruppen Röntgenaufnahmen des rechten Kniegelenks angefertigt. Die Positionierung der Röntgenplatte war durch die starke Muskulatur der Tiere im Kniebereich erschwert. Eine lotrechte Durchleuchtung des Spalts war kaum möglich, weshalb auf eine röntgenologische Beurteilung über den Verlauf der Heilung, verzichtet wurde.

Durch einzelne Röntgenbilder konnte jedoch exemplarisch dargestellt werden, dass sich die beiden Osteotomieeränder bei Entlastung der Gliedmaße parallel im Abstand von 3 mm befanden (Abb. 34 a / b). Bei der stabil fixierten Tiergruppe lag das Implantat sowohl bei Entlastung als auch bei Belastung beiden Osteotomieerändern direkt an (Abb. 34 a). Bei flexibler Fixation wurden unter Belastung beide Seiten des Osteotomiespalts keilförmig zusammengedrückt, was wie erwünscht zu einer Durchbiegung der Osteotomie bis zu deren Begrenzung in Form des Implantates und zu interfragmentären Dehnungen im Spaltbereich führte (Abb. 34 c).

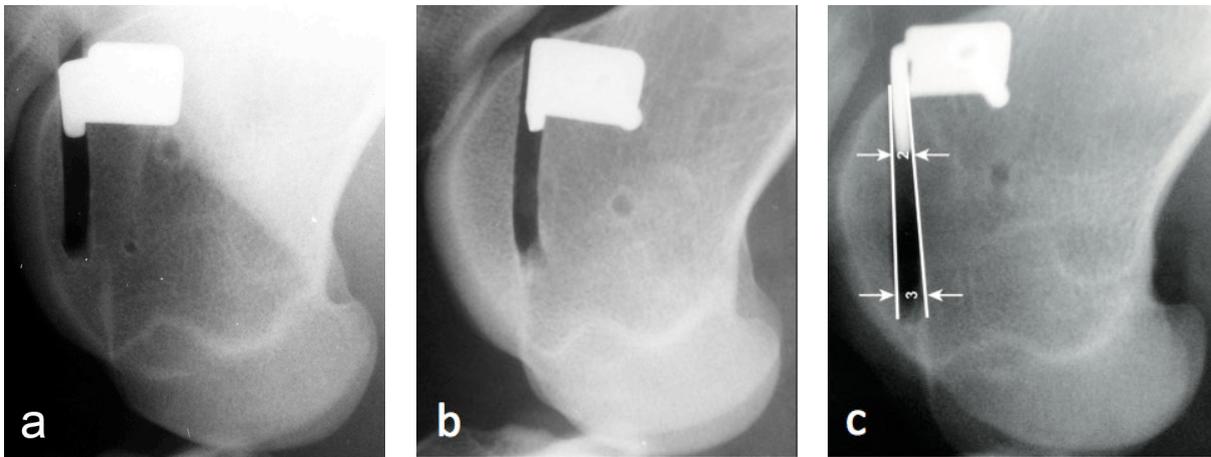


Abb. 34: Röntgenbilder von Schafen der stabil (a) und flexibel (b / c) fixierten Operationsgruppe – 3 Wochen post OP im latero-medialen Strahlengang:

Im nicht belasteten Zustand liegen die Ränder des Osteotomiespalts parallel.

(a) Das Implantat liegt beiden Osteotomierändern direkt an.

(b) Zwischen dem Implantat und dem cranialen Knochen ist ein 1 mm breiter, freier Spalt zu sehen.

Im belasteten Zustand

(c) Die Ränder des Osteotomiespalts sind proximal keilförmig um ca. 30 % zusammengedrückt, wobei die Durchbiegung durch das Implantat begrenzt wird.

3.1.1 Aktivitätsmessung

In den über die Standzeit der Tiere prae- sowie post OP wöchentlich mittels eines Schrittzählers durchgeführten Aktivitätsmessungen (sh. Abb. 18) zeigten die Tiere beider Gruppen über den gesamten Heilungsverlauf eine nahezu identische Aktivität. Beide Versuchsgruppen wiesen in der Woche nach der Operation einen deutlichen Aktivitätsabfall um 48 % (stabil) bzw. 44 % (flexibel) im Vergleich zum prae OP-Wert auf. Anschließend fand ein langsamer Aktivitätsanstieg aller Tiere über den Versuchszeitraum von acht Wochen hinweg statt. Die Schafe der stabilen Gruppe erreichten zum Zeitpunkt des Versuchsendes etwa 80 % ihrer Ausgangsaktivität, die Schafe der flexiblen Gruppe etwa 84 % (Abb. 35).

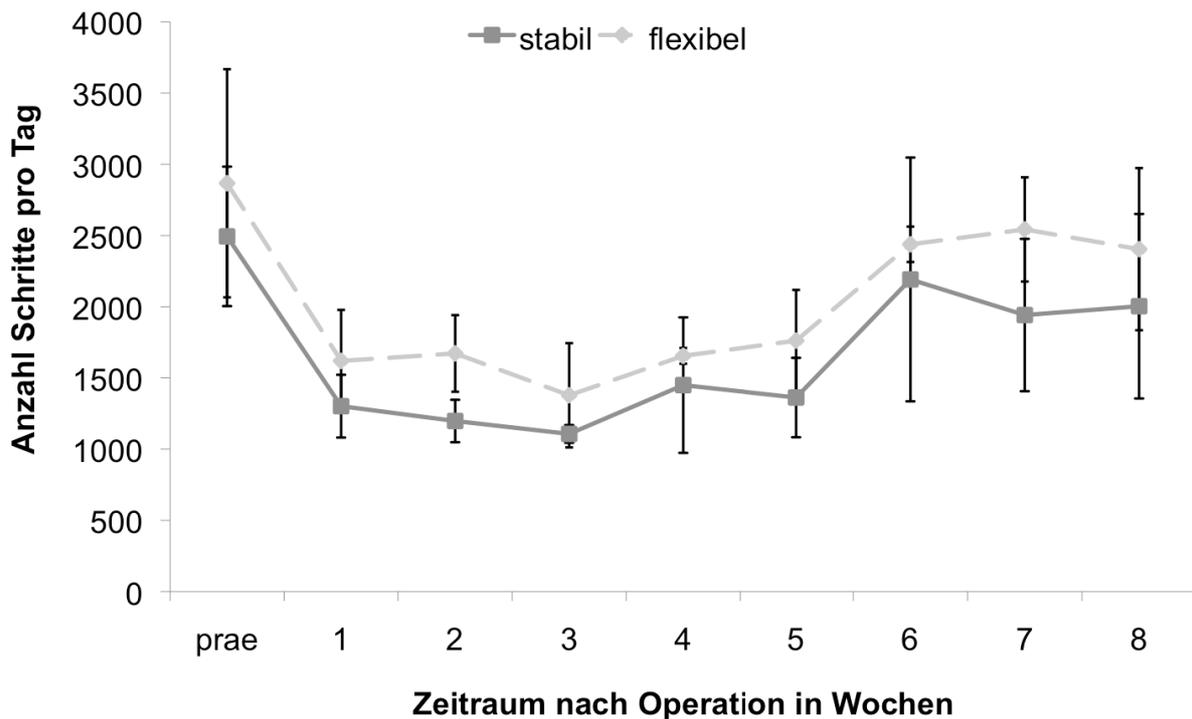


Abb. 35: Aktivitätsmessung prae OP und post OP (stabil / flexibel jeweils n = 4).

3.1.2 Bodenreaktionskraftmessung

Bei der Bodenreaktionskraftmessung wurden die vertikalen Auftrittskräfte der einzelnen Tiere für jede Gliedmaße getrennt bestimmt (sh. Abb. 19 und Abb. 20). Um die Auswirkung der Operation auf die Belastung der Gliedmaßen darzustellen, wurden die postoperativen Werte auf die praeoperativen Werte bezogen. Die operierten Tiere beider Versuchsgruppen schonten in der Woche nach der OP die betroffene rechte Hintergliedmaße deutlich und belasteten diese nur zu etwa 60 %. Die Auftrittskraft stieg mit jeder weiteren Woche in beiden Gruppen wieder an. Zwischen den Versuchsgruppen stellten sich über den gesamten Heilungsverlauf hinweg keine Unterschiede dar. Zum Ende der Standzeit betrug die Bodenreaktionskraft aller operierten Tiere ca. 90 % des praeoperativen Wertes (Abb. 36).

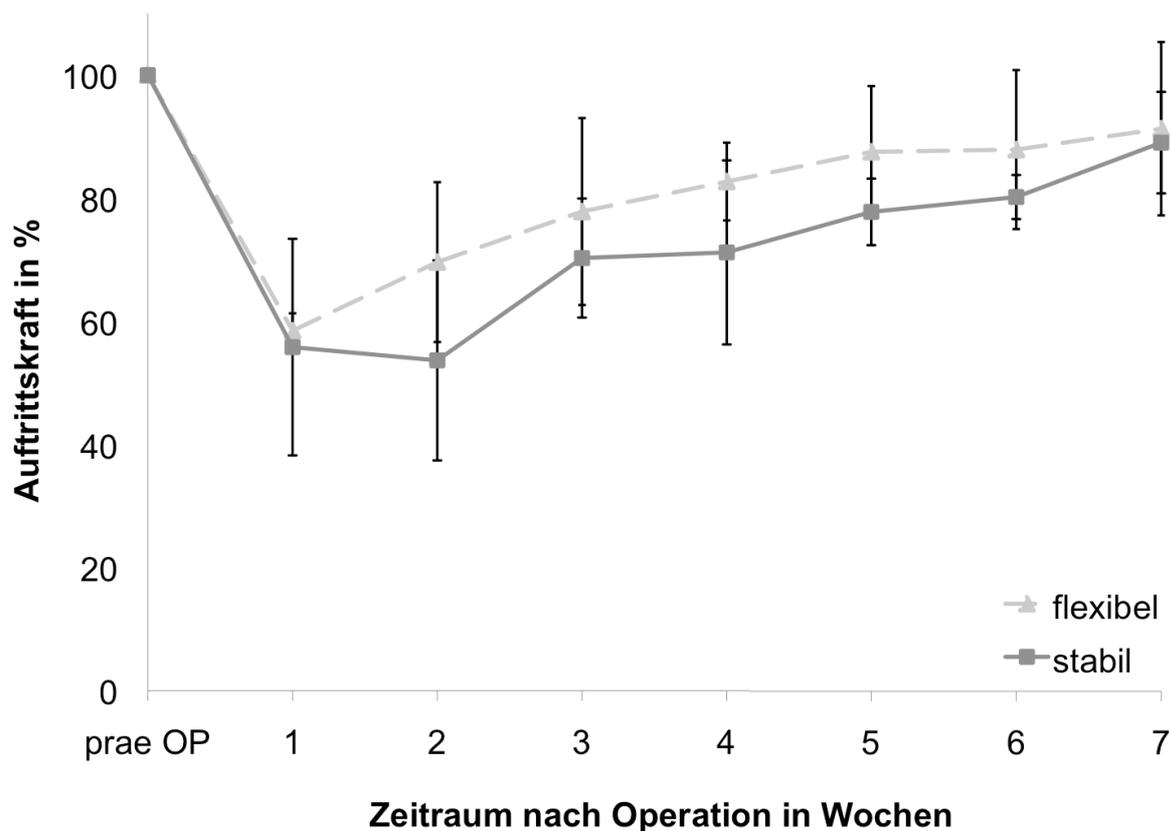


Abb. 36: Bodenreaktionskraftmessung der rechten operierten Hintergliedmaße bezogen auf die prae OP-Werte (stabil / flexibel jeweils n = 4).

Die Berechnung der prozentualen Verteilung der Bodenreaktionskräfte auf die einzelnen Extremitäten ergab Unterschiede zwischen den Vorder- und Hintergliedmaßen. Da sich die Werte der jeweiligen Gliedmaße in beiden Operationsgruppen immer nur geringgradig unterschieden, wurde hier der Mittelwert aller gemessenen Tiere ($n = 8$) dargestellt.

Die beiden Vordergliedmaßen wurden mit jeweils etwa 62 % des KGW grundsätzlich stärker belastet als die Hintergliedmaßen mit jeweils etwa 47 %. Die maximale Auftrittskraft der rechten Hintergliedmaße von 46 % KGW prae OP halbierte sich nahezu in der ersten Woche post OP auf 26 % KGW. Diese postoperative Entlastung führte jedoch nicht zu einer vermehrten Belastung der übrigen drei Extremitäten (Abb. 37).

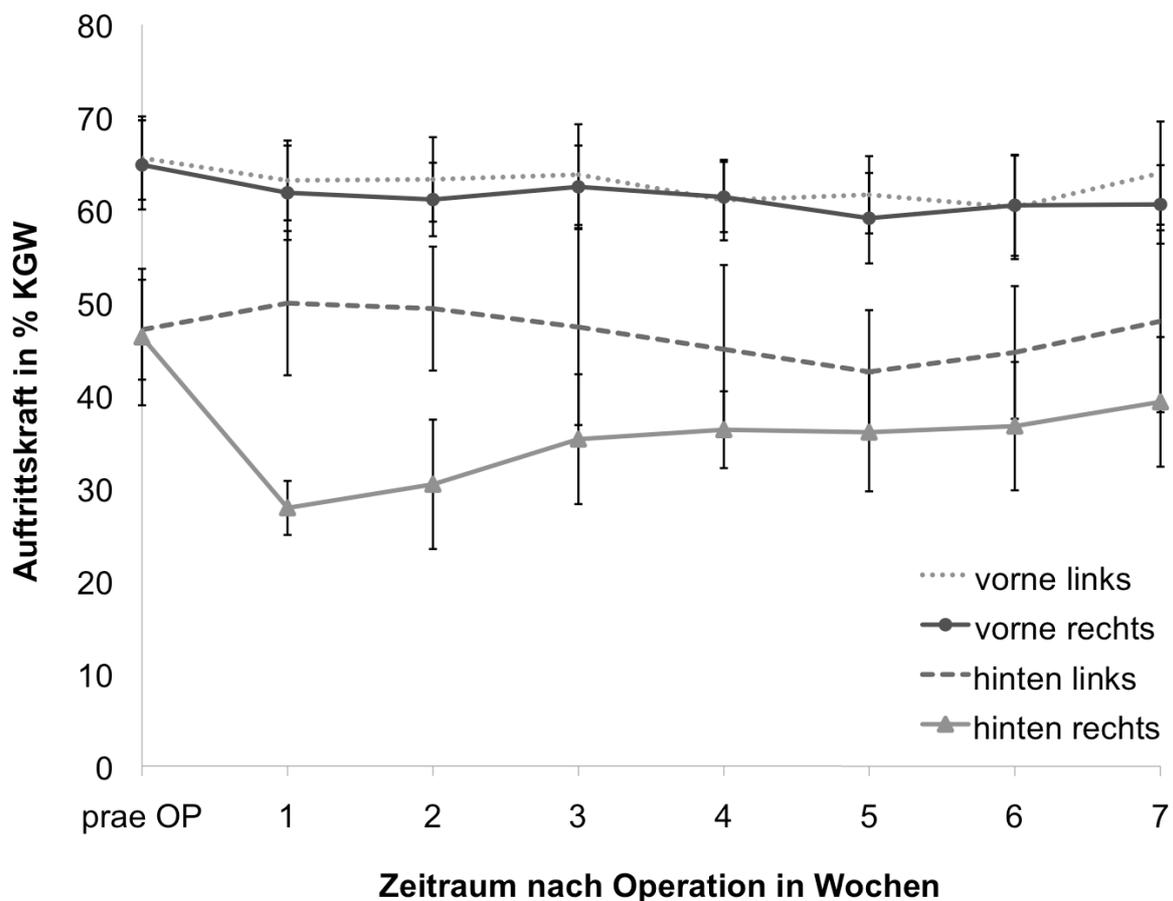


Abb. 37: Prae und post OP-Messungen bezogen auf das Körpergewicht des jeweiligen Tieres; Mittelwerte aller gemessenen Tiere aus beiden Operationsgruppen ($n = 8$).

3.2 Makroskopische und röntgenologische Befunde

Bei der Präparation der operierten Gliedmaße konnten makroskopisch bei keinem Tier Entzündungsprozesse wie z.B. Veränderungen regionaler Lymphknoten festgestellt werden. Einige Schafe wiesen innerhalb des eröffneten Kniegelenks eine vermehrte Ansammlung von Flüssigkeit auf. Diese war klar und farblos sowie von wässriger bis synovialer Konsistenz. Bei einem Teil der Tiere beider Gruppen entwickelte sich proximal über dem offenen Ende des Osteotomiespalts neugebildetes Gewebe, das vermutlich durch die Reibung der Patella an der knorpeligen proximalen Spaltkante zustande kam. Das Implantat konnte meist ohne Kraftaufwand aus dem Osteotomiespalt entfernt werden. Hierbei wurden keinerlei Unterschiede zwischen den beiden Fixationsgruppen festgestellt. Weder unter stabilen noch unter flexiblen Bedingungen konnte eine externe Kallusbildung im Bereich des Osteotomiespalts beobachtet werden. Hier stellte sich bei allen Tieren eine nahezu eben aufgefüllte oder leicht eingesunkene Anordnung des neugebildeten Gewebes gegenüber der ursprünglichen Knochenoberfläche der Trochlea dar (Abb. 38). Im Osteotomiespalt der Schafe aus der flexibel fixierten Gruppe war der 1 mm breite Bereich zwischen Implantat und Knochen mit Bindegewebe ausgefüllt (Abb. 39). Bei fast allen Tieren beider Gruppen bildete sich nahe dem proximalen Spaltende am Übergang zwischen Knochen und Metallimplantat der mineralisierte Knochen zurück (Abb. 40, Abb. 41).



Abb. 38: Präparation eines Femurs der stabil fixierten Versuchsgruppe (S 88); Ansicht von medial.



Abb. 39: Knochenscheibe aus dem Osteotomiebereich eines flexibel fixierten Schafes (S 876); der leere Bereich entspricht der Lage des Implantates, links davon verläuft der Osteotomiespalt mit neugebildetem Gewebe.



Abb. 40: Faxitron-Kontaktröntgenbild (l.m.) post mortem, Femur eines stabil fixierten Tieres (S 88) nach Entfernung des Implantates.



Abb. 41: Faxitron-Kontaktröntgenbild (l.m.) post mortem, Femur eines flexibel fixierten Tieres (S 77) mit einem 2 mm-Implantat.

Mittels der Kontaktröntgenaufnahmen des Knochens (Abb. 40, Abb. 41) sowie der Knochenscheibe aus dem Osteotomiebereich (Abb. 39, Abb. 42, Abb. 43) konnte der unterschiedliche Verlauf der Knochenneubildung in den beiden Gruppen gezeigt werden. Hier war zu erkennen, dass in der distalen Osteotomiespalthälfte der stabil fixierten Tiergruppe kaum mineralisiertes Gewebe gebildet wurde (Abb. 42). Im entsprechenden Bereich der flexibel fixierten Gruppe zeigte sich hingegen bereits neugebildeter Knochen (Abb. 43). In der proximalen Spalthälfte waren zwischen den Präparaten beider Versuchsgruppen röntgenologisch keine Unterschiede feststellbar und es konnte bei allen Schafen mineralisiertes Gewebe nachgewiesen werden.

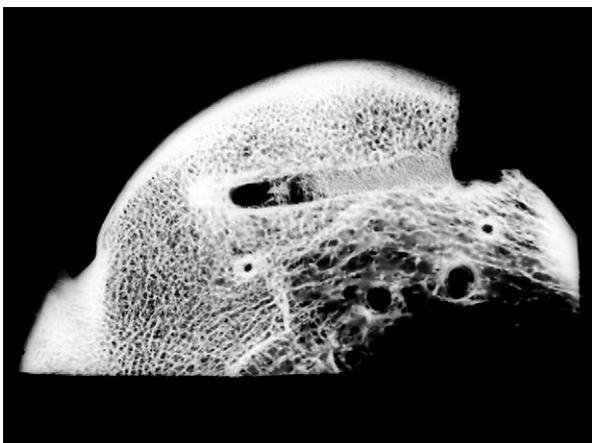


Abb. 42: Faxitron-Kontaktröntgenbild (l.m.) einer Knochenscheibe aus dem Osteotomiebereich eines Schafes der stabil fixierten Gruppe (S 86).



Abb. 43: Faxitron-Kontaktröntgenbild (l.m.) einer Knochenscheibe aus dem Osteotomiebereich eines Schafes der flexibel fixierten Gruppe (S 14).

3.3 Periphere quantitative Computertomographie (pQCT)

Die Auswertung der Knochenmineraldichte (BMD) mittels peripherer, quantitativer Computertomographie ermöglichte die Quantifizierung der bereits röntgenologisch feststellbaren Unterschiede. Nachfolgend werden die grundlegenden Ergebnisse dieser Messungen innerhalb (ROI_{Spalt}), sowie ober- (ROI_{oben}) und unterhalb (ROI_{unten}) des Spalts (sh. Abb. 24) für die stabile, flexible und contra-laterale intakte Versuchsgruppe dargestellt. Die Schnittebenen (Scan Ebenen) 1 und 2 lagen in der distalen Spalthälfte. Die im weiteren Osteotomieverlauf anschließenden Schnittebenen 3 und 4 repräsentierten die proximale Spalthälfte (sh. Abb. 21 und Abb. 22). Als Referenzwert für den gesunden Knochen diente der, dem Osteotomiespalt in der operierten Gliedmaße entsprechende Bereich in der contra-lateralen Femurkondyle.

Die Knochenmineraldichte war in beiden Operationsgruppen am distalen Ende des Osteotomiespalts am geringsten und stieg jeweils nach proximal hin an (Abb. 44). Die stabil fixierte Gruppe wies distal im ROI_{Spalt} gegenüber der flexibel fixierten Gruppe eine signifikant geringere Knochenmineraldichte auf (* $p = 0,0005$) (Abb. 45). In Scan Ebene 1 nahe des distalen Spaltendes besaßen die Tiere der stabil fixierten Gruppe eine um 36 % (* $p = 0,008$), an Lokalisation 2 eine um 25 % (* $p = 0,02$) geringere Knochenmineraldichte auf, als die Tiere der flexibel fixierten Gruppe. Im Vergleich der proximalen Spalthälften beider Operationsgruppen konnten keine signifikanten Unterschiede der Dichtewerte dargestellt werden (Abb. 44, Abb. 45). Innerhalb der stabil fixierten Tiergruppe war die Knochenmineraldichte im distalen signifikant geringer als im proximalen Spaltbereich (* $p = < 0,0001$) (Abb. 45).

Im entsprechenden Bereich des intakten Knochens der contra-lateralen Trochlea verhielt sich die Knochenmineraldichte mit 344 ± 59 mg/ccm in der distalen Spalthälfte und 361 ± 62 mg/ccm in der proximalen Spalthälfte über den gesamten Osteotomieverlauf hinweg nahezu konstant (Abb. 44).

In der distalen Spalthälfte wurde für die stabile Gruppe eine um fast ein Drittel signifikant geringere Dichte ermittelt (* $p = 0,004$) als im entsprechenden Gebiet des

intakten contra-lateralen Knochens. Am deutlichsten war diese signifikant geringere Dichte der Präparate der stabil fixierten Gruppe in der Scan Ebene 1 (*p = 0,008).

Die flexible Gruppe jedoch wies gegenüber der Kontrollgruppe im distalen Bereich keine Unterschiede auf (Abb. 44, Abb. 45).

In der proximalen Spalthälfte war die durchschnittliche Knochenmineraldichte sowohl in der stabilen als auch in der flexiblen Operationsgruppe im Vergleich zur intakten Kontrollgruppe erhöht. Die stabil fixierte Tiergruppe hatte hier eine um ca. 15 % höhere Knochenmineraldichte als die contra-laterale Gruppe (*p = 0,04) (Abb. 45).

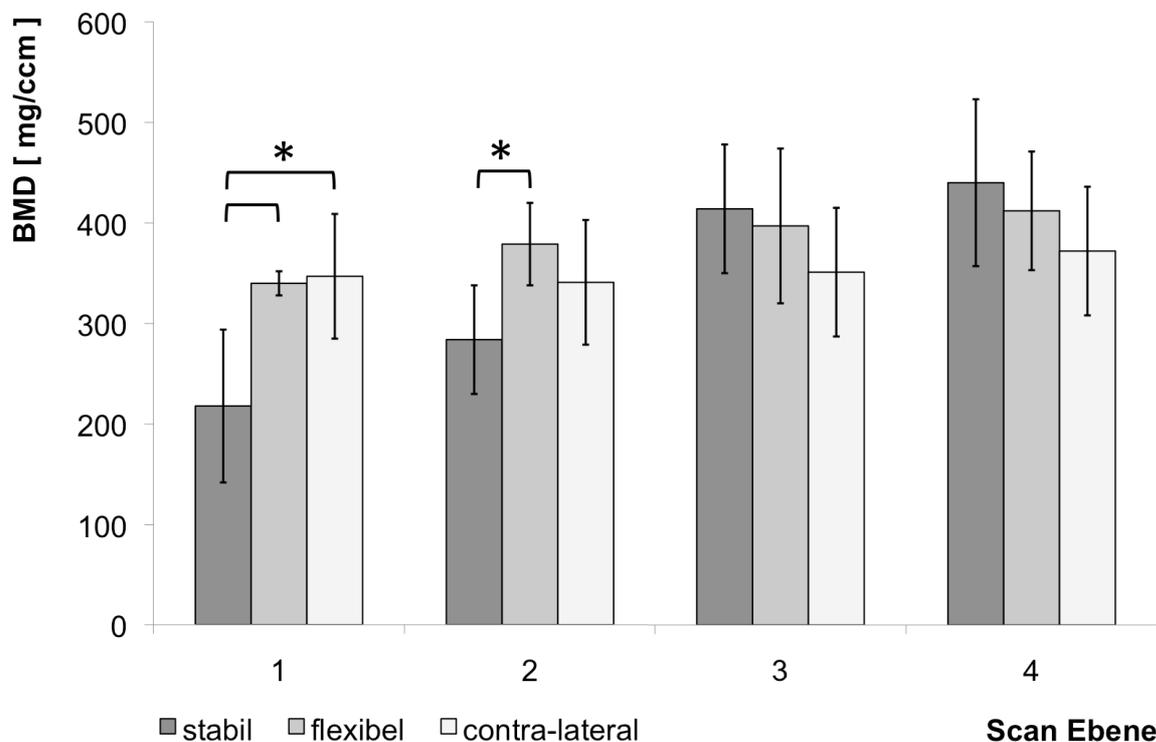


Abb. 44: Knochenmineraldichte in mg/ccm im Osteotomiespalt (ROI_{Spalt}); vier Scan Ebenen von distal nach proximal (stabil n = 6, flexibel n = 5, contra-lateral n = 8); * = p ≤ 0,05.

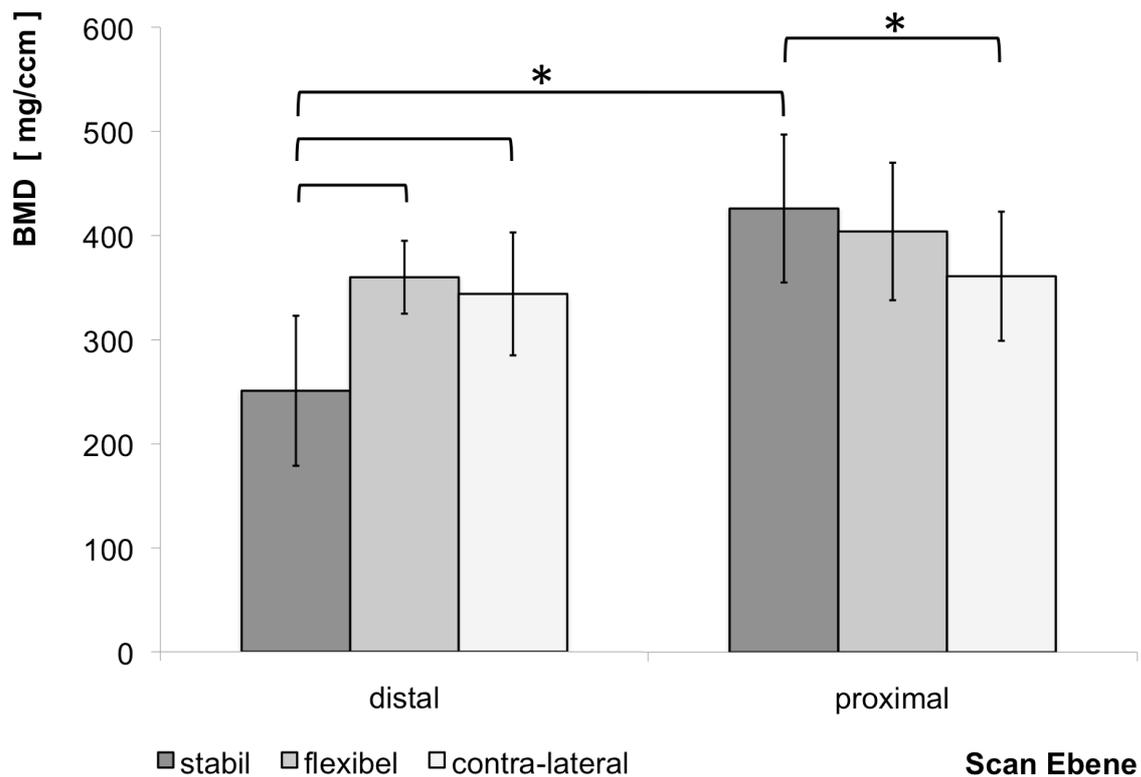


Abb. 45: Knochenmineraldichte in mg/ccm im Osteotomiespalt (ROI_{Spalt}); je zwei Scan Ebenen in einen Bereich zusammengefasst (stabil $n = 6$, flexibel $n = 5$, contra-lateral $n = 8$); * = $p \leq 0,05$.

Die Auswertung des Bereichs oberhalb des Osteotomiespalts (ROI_{oben}) ergab für die jeweilige Gruppe über den gesamten Spaltverlauf hinweg die nahezu gleiche Dichte. Die Knochen der stabil fixierten Tiere zeigten jedoch an jeder der vier Schnittebenen eine tendenziell geringere Dichte, verglichen mit denen, der flexibel fixierten Tieren. Die stabile und die contra-laterale Gruppe unterschieden sich nicht voneinander. Die Präparate der flexiblen Gruppe hatten gegenüber denen der contra-lateralen Gruppe an dieser Lokalisation eine signifikant höhere Knochendichte (* p von 1 - 4 = 0,03; 0,005; 0,02; 0,01) (Abb. 46).

Unterhalb des Osteotomiespalts waren bezüglich der Knochenmineraldichte keine Unterschiede zwischen den drei Vergleichsgruppen zu erkennen. Lediglich nahe am proximalen Spaltende (Scan Ebene 4) war die Knochenmineraldichte der stabil fixierten Operationsgruppe tendenziell und die der flexibel fixierten signifikant höher als die BMD der contra-lateralen Kontrollgruppe (* $p = 0,003$) (Abb. 47).

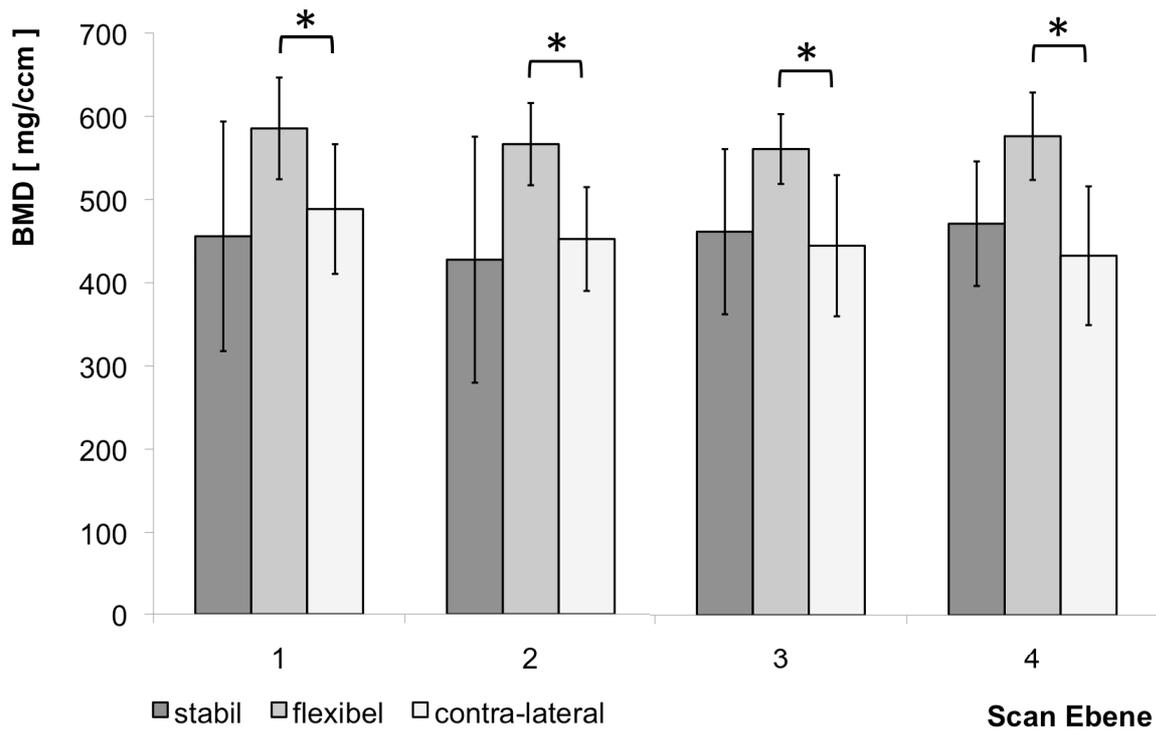


Abb. 46: Knochenmineraldichte in mg/ccm oberhalb des Osteotomiespalts (ROI_{oben}); vier Scan Ebenen von distal nach proximal (stabil n = 6, flexibel n = 5, contra-lateral n = 8); * = p ≤ 0,05.

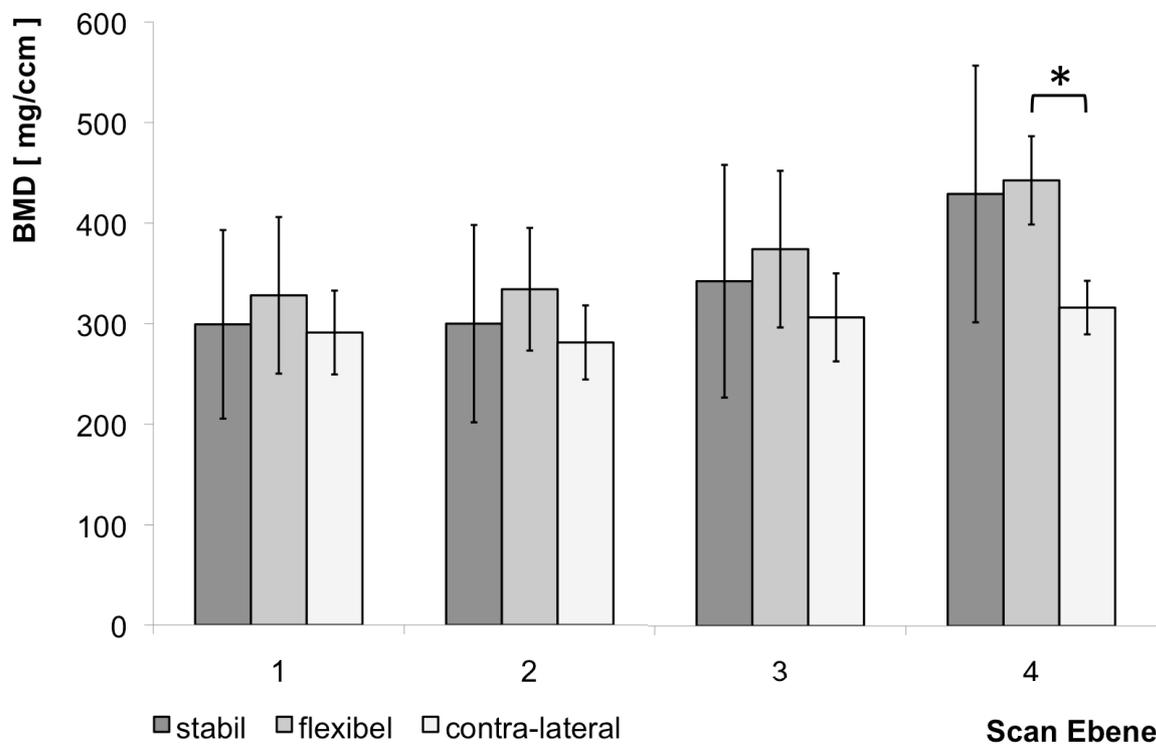


Abb. 47: Knochenmineraldichte in mg/ccm unterhalb des Osteotomiespalts (ROI_{unten}); vier Scan Ebenen von distal nach proximal (stabil n = 6, flexibel n = 5, contra-lateral n = 8); * = p ≤ 0,05.

3.4 Biomechanik (Eindrücktests)

Die mechanischen Materialeigenschaften des neugebildeten Gewebes innerhalb des Osteotomiespalts sowie des umgebenden Gewebes wurden mittels biomechanischer Eindrücktestung untersucht (sh. Abb. 26 und Abb. 27).

Das neugebildete Gewebe in der distalen Hälfte der Osteotomie war in der stabil fixierten Tiergruppe tendenziell weniger steif als in der flexibel fixierten Gruppe. In der proximalen Hälfte hatten beide Gruppen eine nahezu identische Steifigkeit. Innerhalb der stabil fixierten Gruppe war der distale Spaltbereich im Vergleich zum proximalen Bereich nur halb so steif ($p = 0,055$).

Die Präparate beider osteotomierter Gruppen besaßen im distalen Bereich nur etwa die Hälfte der Steifigkeit des Knochens der contra-lateralen Kontrollgruppe an derselben Lokalisation (Abb. 48 links). Diese Unterschiede waren jedoch aufgrund der hohen Varianz der Werte nicht signifikant. In der proximalen Osteotomiehälfte unterschieden sich alle drei Vergleichsgruppen mit einer durchschnittlichen Steifigkeit von ca. 54 N/mm nicht voneinander (Abb. 48 rechts).

Die Steifigkeit des Knochens oberhalb und unterhalb des Osteotomiespalts sowie im Bereich vor dem distalen Spaltende zeigte bei allen drei untersuchten Gruppen tendenziell eine Abnahme in proximale sowie caudale Richtung (Abb. 49, sh. Abb. 31). In 5 mm Entfernung vom Osteotomiespalt in Richtung Patellargleitfläche war die Steifigkeit des untersuchten Gewebes der flexibel fixierten Tiere um etwa das 5-fache höher als der Wert der stabil fixierten ($p = 0,07$) bzw. nicht-operierten Tiere ($*p = 0,02$). Ebenso war die Steifigkeit der Präparate der flexiblen Gruppe im Bereich von 2 mm Abstand zum Spalt in Richtung Patella innerhalb der distalen Osteotomieregion signifikant um ca. 50 % höher als die der nicht-operierten Seite ($*p = 0,05$). Stabil fixierte und nicht-operierte Tiere der contra-lateralen Seite unterschieden sich an diesen Lokalisationen nicht voneinander (Abb. 49).

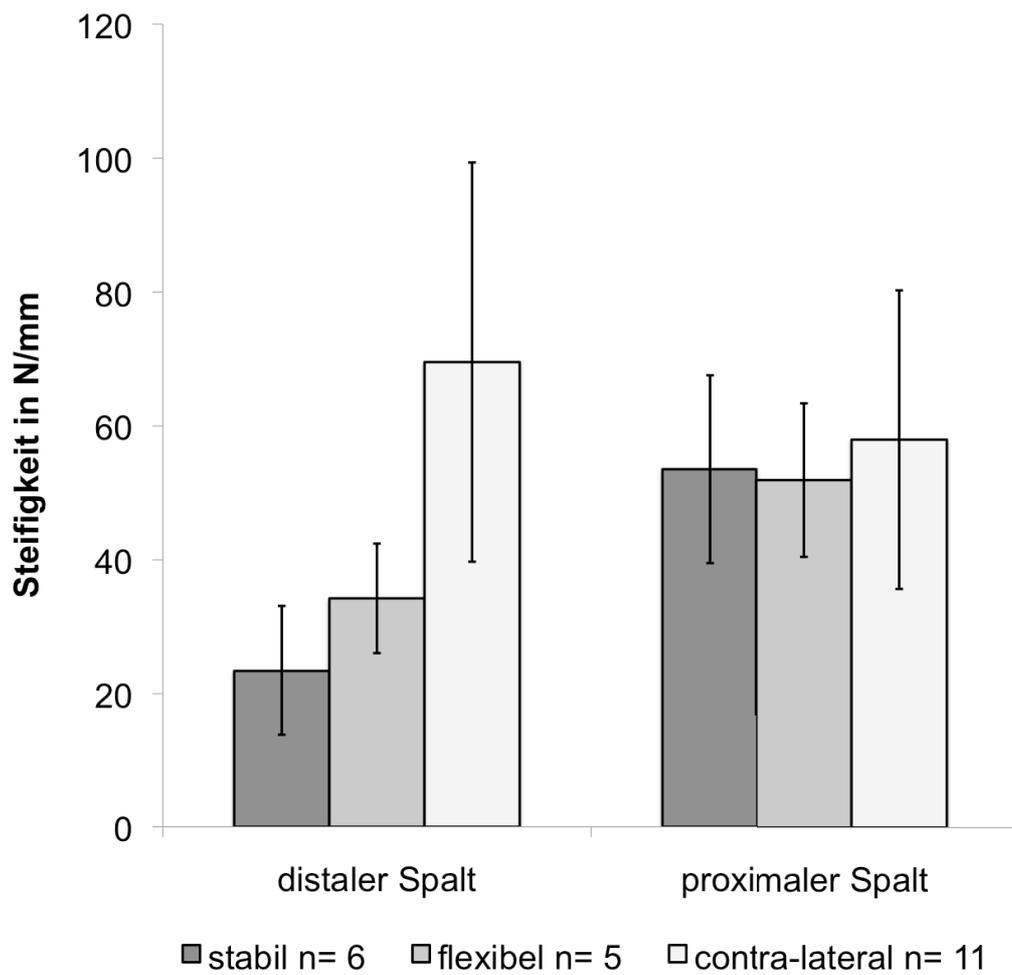


Abb. 48: Steifigkeitswerte der Druckpunkte innerhalb des Osteotomiespalts in der distalen und proximalen Spalthälfte (stabil n = 6, flexibel n = 5, contra-lateral n = 11).

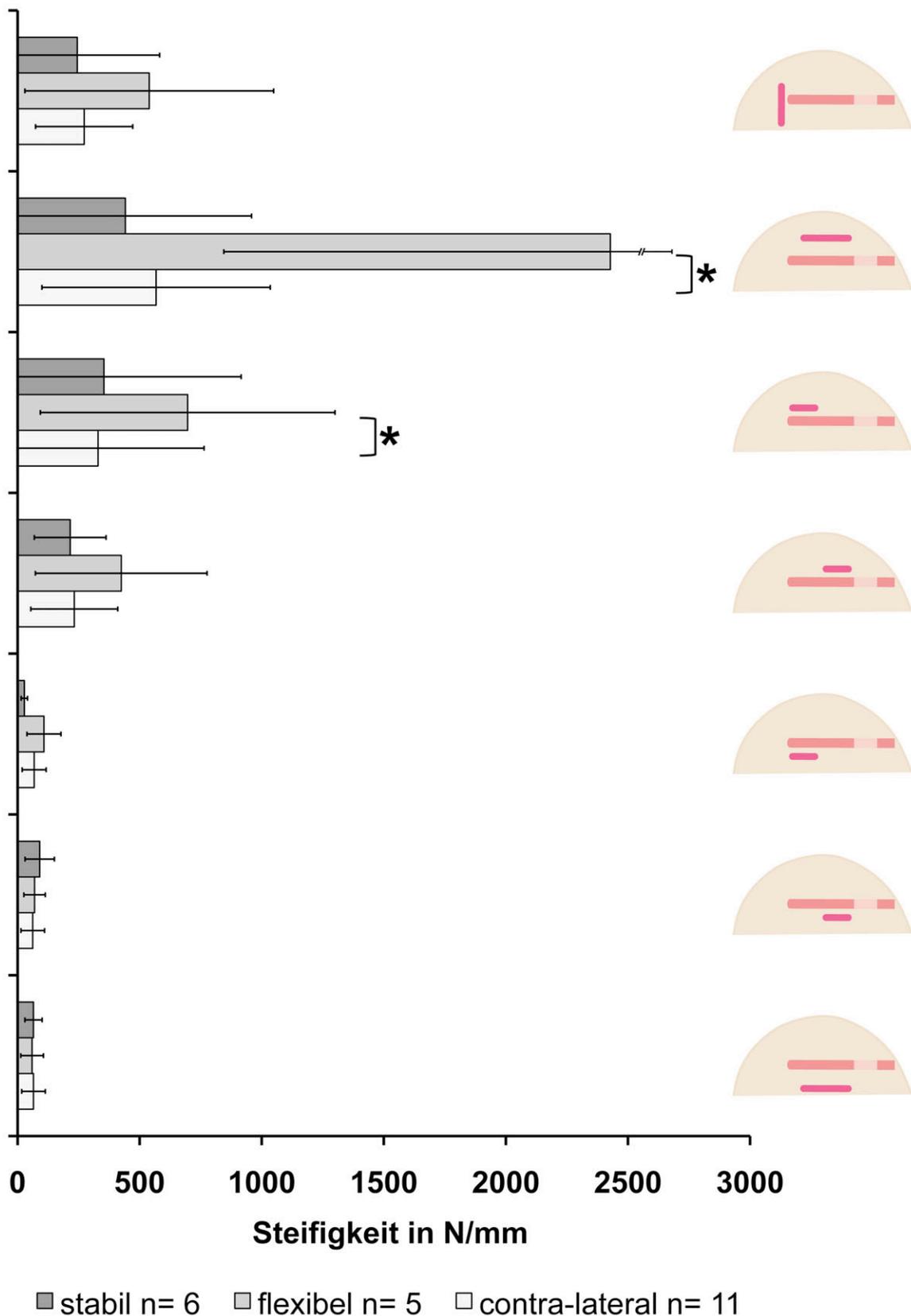


Abb. 49: Steifigkeitswerte von Druckpunkten inner-, ober- und unterhalb des Osteotomiespalts; rechts im Diagramm ist die Knochenscheibe mit der jeweils entsprechenden Lokalisation der Steifigkeitsmessung in dunkelrot in Bezug zum hellroten Osteotomiespalt dargestellt (stabil n = 6, flexibel n = 5, contra-lateral n = 11); * = $p \leq 0,05$.

3.5 Mikro-Computertomographie (μ CT)

Die von der rechten und linken Knochenscheibe eines jeden Schafes erstellten μ CT-Bilder ermöglichten eine dreidimensionale Darstellung der Knochenneubildung im und um den Osteotomiebereich. Aufgrund dieser Rekonstruktionen konnte der bisher beschriebene Unterschied zwischen beiden Operationsgruppen sowie den beiden Spalthälften bestätigt werden.

Im distalen Spaltbereich fand sich bei den Tieren der flexiblen Gruppe mehr neugebildetes Gewebe als bei den Tieren der stabilen Gruppe. Bei dieser war distal ein deutlich größerer, nicht mineralisierter Hohlraum zu erkennen, wohingegen in der flexiblen Tiergruppe überwiegend dichte, geflechtartige Strukturen das distale Spaltende ausfüllten. Im proximalen Spaltbereich konnten in beiden Gruppen ähnlich dichte, knöcherne Strukturen nachgewiesen werden (Abb. 50, Abb. 51).

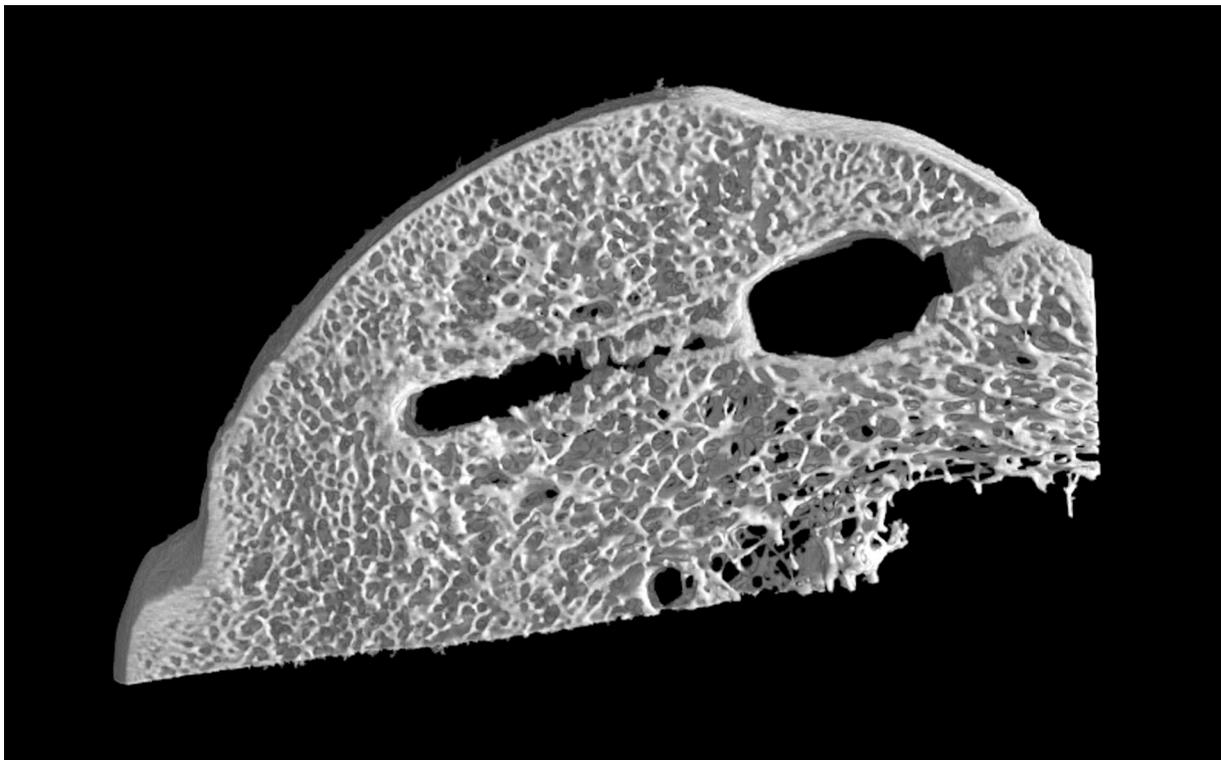


Abb. 50: Dreidimensionale Darstellung der μ CT-Schnitte einer Knochenscheibe aus dem Osteotomiebereich mit Sicht auf den Osteotomiespalt. In der distalen Spalthälfte befindet sich kaum neugebildetes mineralisiertes Gewebe. Der Implantatbereich stellt sich als Hohlraum dar. Stabile Gruppe (S 44).

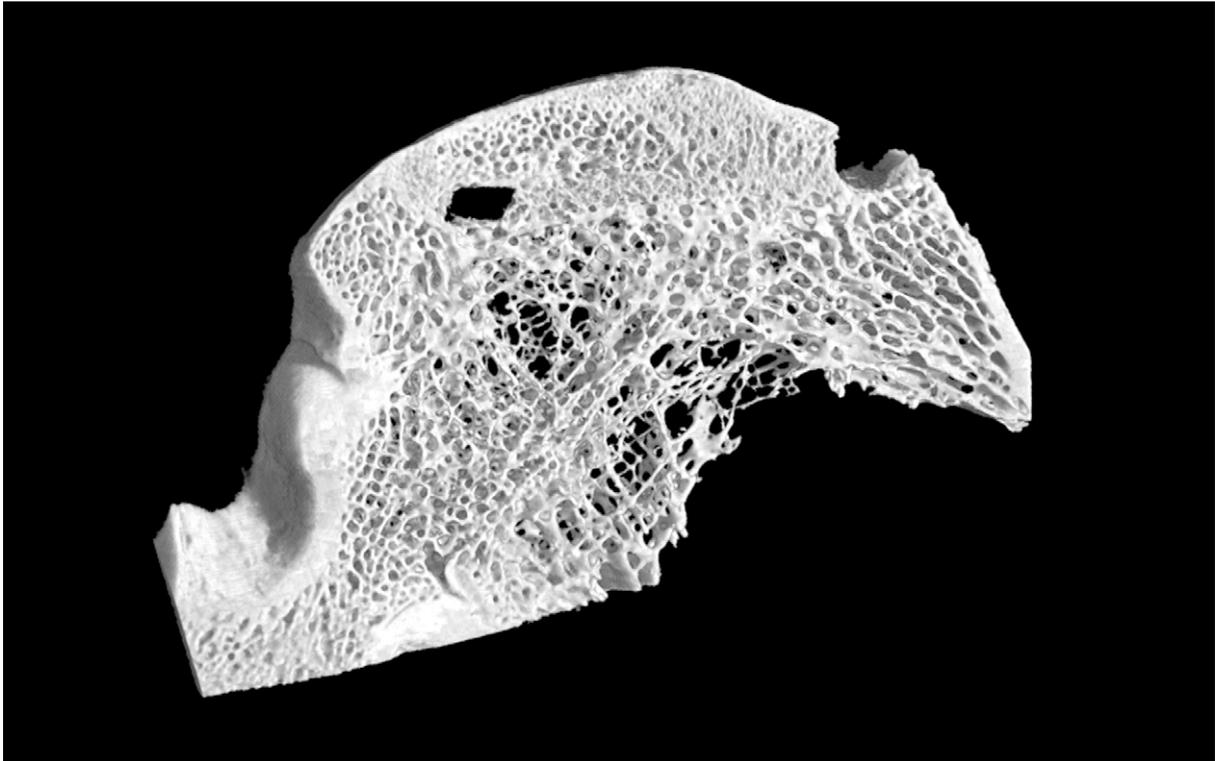


Abb. 51: Dreidimensionale Darstellung der μ CT-Schnitte einer Knochenscheibe aus dem Osteotomiebereich mit Sicht auf den Osteotomiespalt. In der distalen Spalthälfte befindet sich deutlich sichtbar neugebildetes mineralisiertes Gewebe. Der Implantatbereich stellt sich als Hohlraum dar. Flexible Gruppe (S 11).

3.6 Histologie

3.6.1 Qualitative Gewebeuntersuchung

In der qualitativen Auswertung der Dünnschliffhistologie fanden sich im distalen Osteotomiebereich der stabil fixierten Gruppe nur wenige dünne Knochen trabekel, umgeben von einer großen Menge an nicht mineralisiertem, fibrösem und ungerichteten Bindegewebe. Der Anteil nicht mineralisierter Grundsubstanz ohne Zellen (Osteoid) war ebenfalls sehr gering. Nur an den Knochenbälkchen der Spaltränder konnte ein Knochenanbau in Form von Osteoidbanden gesehen werden (Abb. 53). Knorpelgewebe trat nahezu nicht auf (Abb. 52, S 1 / s 1).

Unter flexiblen Fixationsbedingungen war an dieser Lokalisation deutlich mehr neugebildeter Geflechtknochen und Osteoid zu finden. Die vernetzten Trabekel waren von Osteoidbanden gesäumt und dicker als unter stabiler Fixation. Sie waren außerdem dicker als die Knochen trabekel der contra-lateralen gesunden Seite. Osteoklasten als Anzeichen für einen stattfindenden Knochenumbau oder -abbau waren vor allem bei den Tieren der flexiblen Gruppe zu finden (Abb. 55). Weiterhin konnten Inseln aus chondroiden Zellen, jedoch in keinem Fall Faserknorpelbildung beobachtet werden (Abb. 52, F 1 / f 1).

Im proximalen Osteotomiespalt stellte sich in beiden Gruppen deutlich dichter und mengenmäßig mehr neugebildeter Geflechtknochen als in der distalen Spalthälfte. Es zeigten sich dicke Knochen trabekel mit einem hohen Anteil an Osteoblasten und deutlichen Osteoidbanden bei allen Tieren (Abb. 54). Der Verlauf der Knochenbildung ging in allen Fällen von den beiden Spalträndern aus in Richtung Spaltmitte. Es waren bei den Tieren beider Fixationsgruppen Chondroblasten und knorpeliges Gewebe zu sehen (Abb. 52, S 2 / s 2 und F 2 / f 2). Bei drei Tieren aus der flexiblen Gruppe wurde außerdem die Bildung von Faserknorpel festgestellt. Dieser ordnete sich in Form von Banden längs in der Spaltmitte an (Abb. 52, F 2 / f 2; Abb. 56).

Im Bereich um das distale Spaltende herum stellte sich das mineralisierte Knochengewebe in der flexibel fixierten Gruppe im Vergleich zu intaktem und stabil fixiertem Knochen vermehrt dar und die Knochen trabekel waren dichter (Abb. 57). In keiner Gruppe konnten Entzündungszellen als Anzeichen einer Reaktion auf das Implantat im proximalen Osteotomiespalt oder einer Entzündungsreaktion nachgewiesen werden. Um das Implantat herum konnte in einigen Fällen bei Tieren beider Gruppen eine dünne Schicht Bindegewebe beobachtet werden, wodurch kein direkter Kontakt mehr zwischen Metall und Knochen bestand (Abb. 58). In keinem Präparat konnte ein Implantatabrieb festgestellt werden.

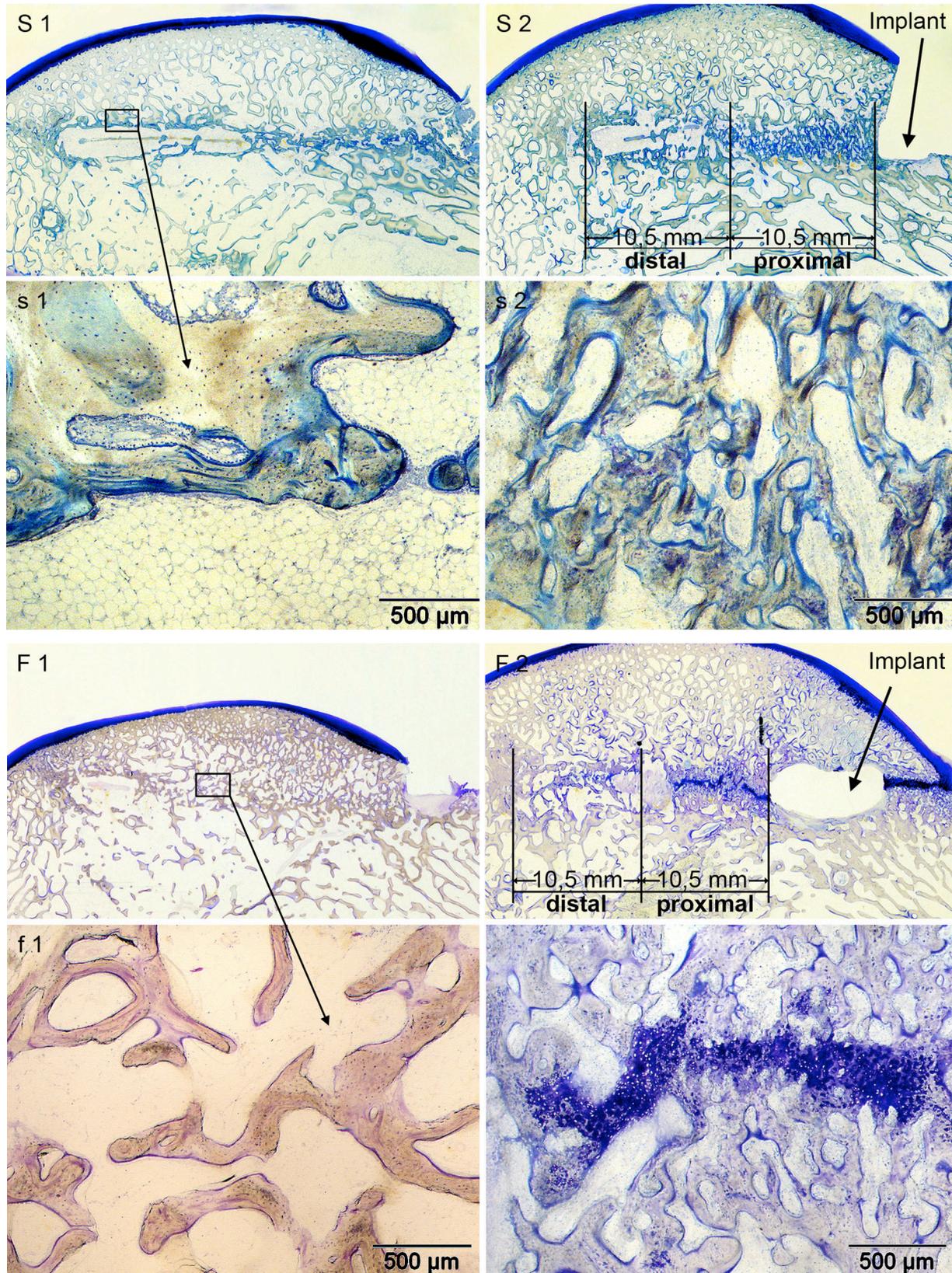


Abb. 52: Übersichtsaufnahme eines histologischen Schnittes von zwei Tieren der stabil (S 1 / S 2) und der flexibel (F 1 / F 2) fixierten Operationsgruppe; darunter jeweils die Vergrößerung eines typischen Ausschnitts des Knochen- sowie neubaus aus dem distalen (s 1 / f 1) bzw. dem proximalen (s 2 / f 2) Spaltbereich dieses Tieres mit den für die Ergebnisse relevanten Strukturen und Geweben.

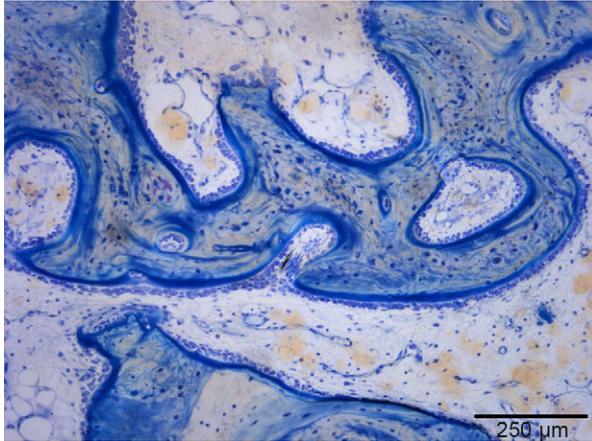


Abb. 53: Stabil fixierte Gruppe – distale Hälfte: Osteoid und Osteoblastensäume entlang der Knochen trabekel am Osteotomiespaltrand. 100-fache Vergrößerung.

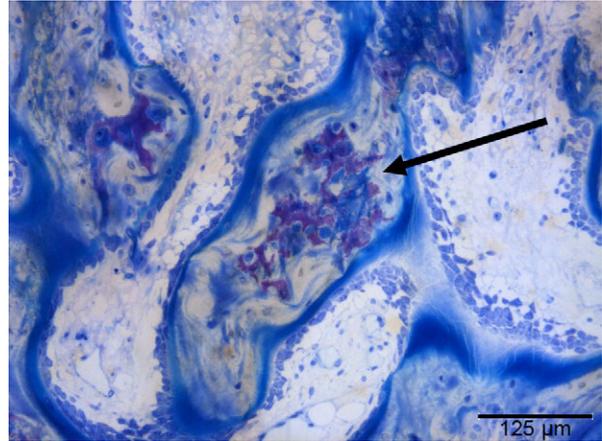


Abb. 54: Stabil fixierte Gruppe – proximale Hälfte: Knochen trabekel mit Osteoidsäumen und Osteoblasten sowie vereinzelt Knorpelzellen (Pfeil). 200-fache Vergrößerung.

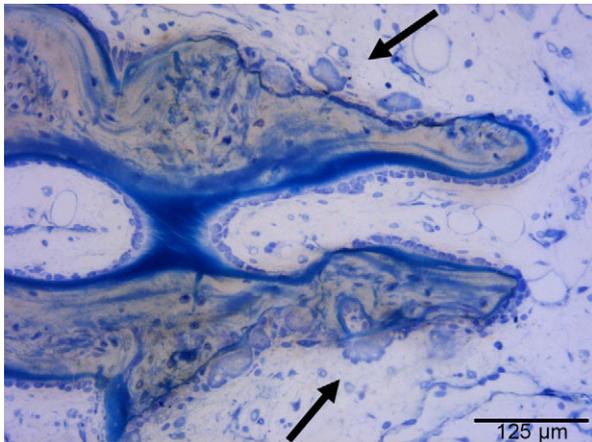


Abb. 55: Flexibel fixierte Gruppe – distale Hälfte: Osteoklasten (Pfeil) und Osteoblasten beim Umbau des neugebildeten Knochengewebes. 200-fache Vergrößerung.

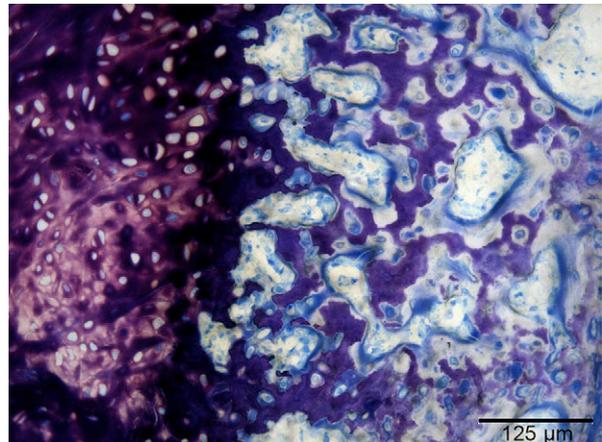


Abb. 56: Flexibel fixierte Gruppe – proximale Hälfte: Faserknorpel (lila / violett) im Umbau zu mineralisiertem Knochengewebe (blau). 200-fache Vergrößerung.

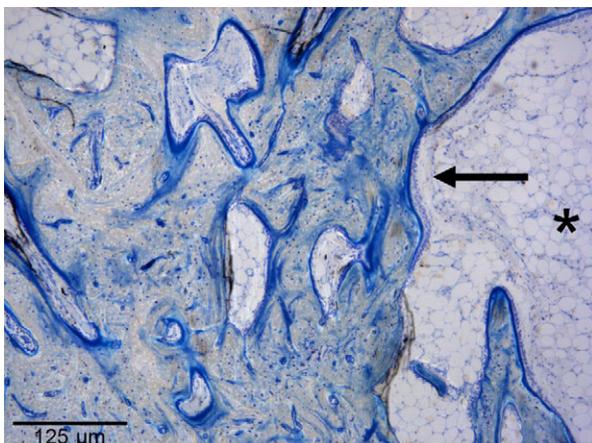


Abb. 57: Flexibel fixierte Gruppe: Verdickung der Knochen trabekel (Pfeil) im Bereich um das distale Spaltende (*). 200-fache Vergrößerung.

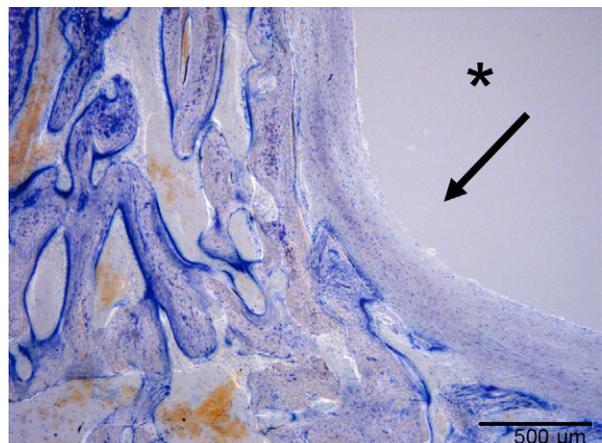


Abb. 58: Stabil fixierte Gruppe: bindegewebige Schicht (Pfeil) im Bereich um das Implantat (*). 50-fache Vergrößerung.

3.6.2 Quantitative Gewebedifferenzierung

Bei der histologischen Auswertung der quantitativen Gewebeanteile zeigten sich in der distalen Spalthälfte zwischen beiden operierten Gruppen signifikante Unterschiede. Die stabile Gruppe wies im Vergleich zur flexiblen Fixationsgruppe 65 % weniger neugebildeten Knochen (* $p = 0,02$), sowie 94 % weniger Osteoid (* $p = 0,02$) auf. Der Anteil an Weichgewebe war in der stabilen Gruppe entsprechend signifikant höher (* $p = 0,01$). Der prozentuale Anteil des neugebildeten Knochengewebes im proximalen Spaltbereich lies keine Unterschiede zwischen beiden Fixationsgruppen nachweisen ($p = 0,78$; Tabelle 1). Dies galt ebenfalls für die anderen untersuchten Gewebearten in diesem Gebiet (Abb. 60). Im Vergleich beider Spalthälften der stabil fixierten Tiergruppe war der Knochenanteil des distalen signifikant geringer als der des proximalen Bereichs (* $p = 0,03$) (Abb. 59, Abb. 60).

Bezogen auf die intakte Kontrollseite stellte sich distal im Osteotomiespalt der stabilen Gruppe ein um ca. 30 % geringerer Knochenanteil dar, wohingegen die flexible Gruppe sich nicht von der Kontrollgruppe unterschied (Abb. 59). Der Anteil an Osteoid zeigte im Spaltbereich beider operierter Gruppen einen signifikant höheren Wert gegenüber der intakten Kontrollgruppe, was aus deren vernachlässigbar geringem Osteoidgehalt resultierte (stabil * $p = 0,03$ und flexibel * $p = 0,058$).

Im Verhältnis zum intakten, wiesen die operierten Knochenbereiche proximal einen tendenziell höheren Anteil an Knochengewebe auf. Entsprechend geringer war das Vorkommen von Weichgewebe, was zu einem signifikant höheren Wert der intakten gegenüber der flexiblen Tiergruppe führte (* $p = 0,01$, Tabelle 1). Knorpel und Osteoid waren in den intakten Knochenbereichen nahezu nicht vorhanden und daher sowohl in der stabilen (Osteoid * $p = 0,003$) als auch in der flexiblen Gruppe (Osteoid * $p = 0,005$) signifikant erhöht (Abb. 60)

Tabelle 1: Relativer Gewebeanteil in % der Gesamtmenge in beiden Osteotomiespalthälften als Mittelwert / Standardabweichung; * = $p \leq 0,05$ stabil vs. flexibel, § = $p \leq 0,05$ operiert vs. contra-lateral.

Messung	stabile Gruppe (n=6)		flexible Gruppe (n=5)		contra-laterale Gruppe (n=7)	
	distal	proximal	distal	proximal	distal	proximal
Knochen (%)	17 ± 8 *	33 ± 8	28 ± 1 *	35 ± 7	25 ± 5	26 ± 5
Osteoid (%)	2 ± 1 *§	5 ± 3 §	4 ± 1 *§	4 ± 1 §	0,2 ± 0,1	0,2 ± 0,1
Knorpel (%)	0,1 ± 0,1	7 ± 9	0,6 ± 1	6 ± 6	-	-

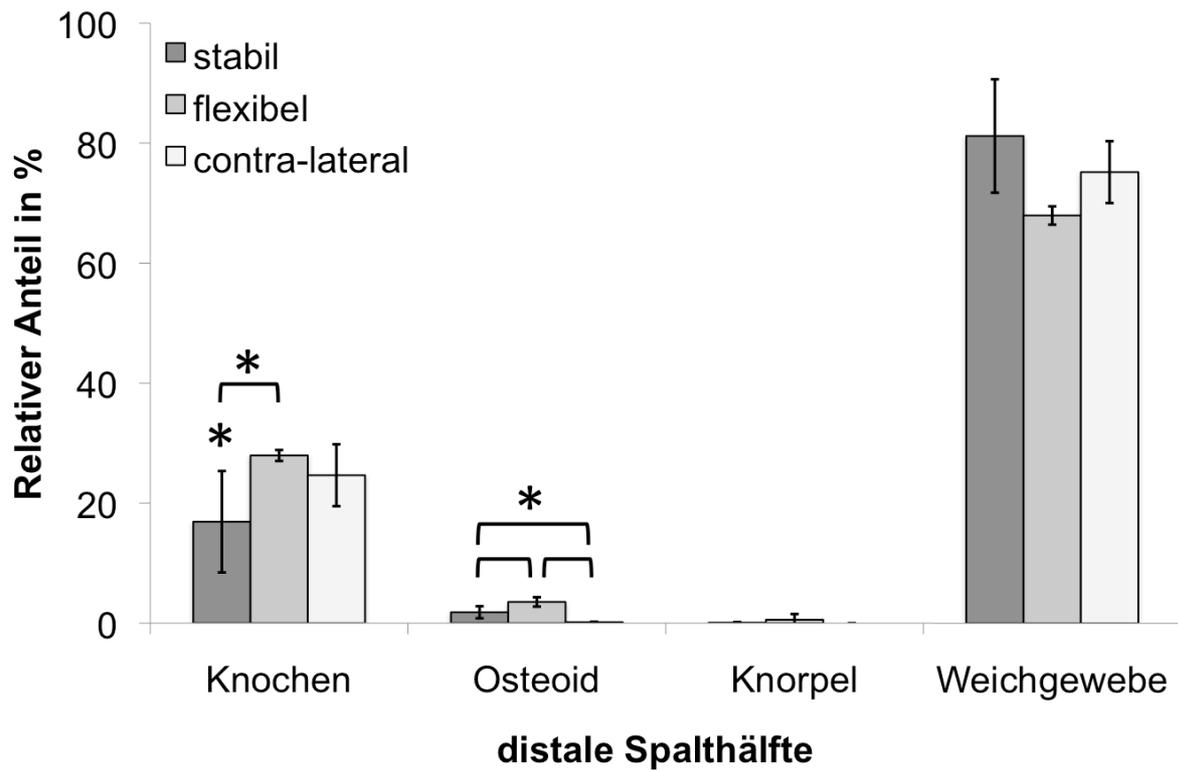


Abb. 59: Prozentuale Gewebezusammensetzung aller ermittelten Gewebepunkte im distalen Spaltbereich (stabil n = 6, flexibel n = 5, contra-lateral n = 7); * = $p < 0,05$.

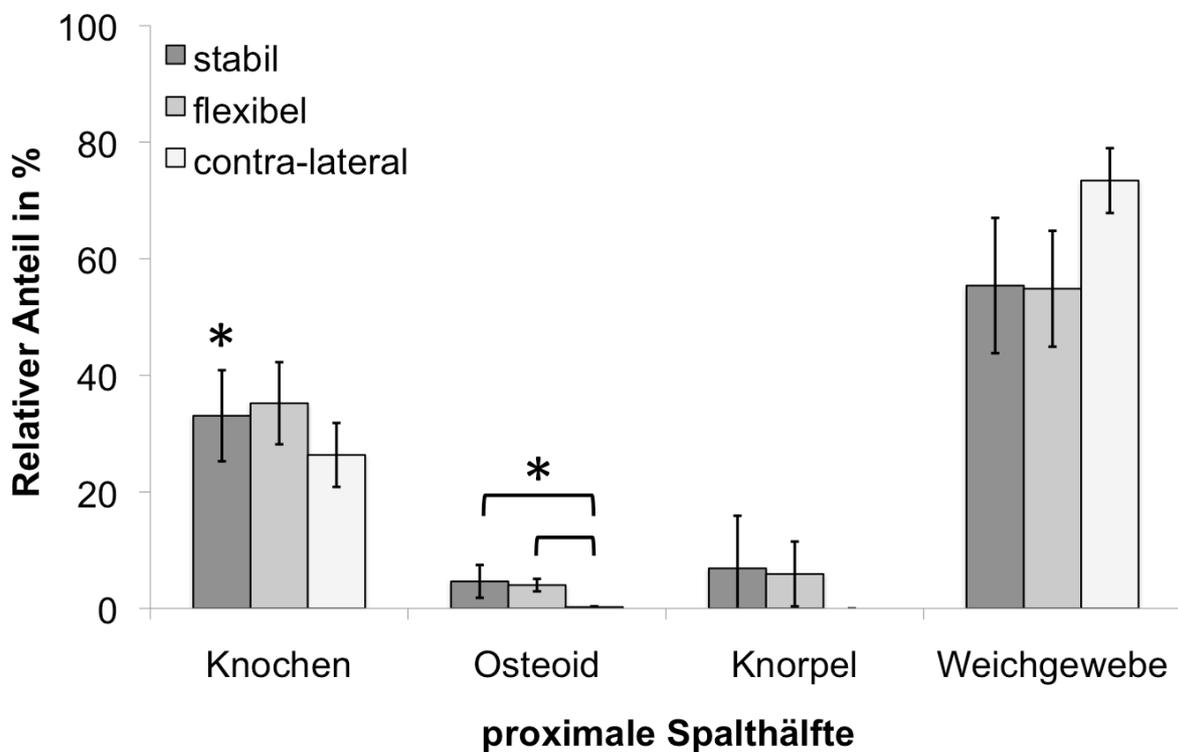


Abb. 60: Prozentuale Gewebezusammensetzung aller ermittelten Gewebepunkte im proximalen Spaltbereich (stabil n = 6, flexibel n = 5, contra-lateral n = 7); * = $p \leq 0,05$.

In beiden Operationsgruppen wurden die Änderungen der Gewebezusammensetzung in Abhängigkeit vom Abstand zur Osteotomie ermittelt (sh. Abb. 32). In den Bereichen oberhalb des Osteotomiespalts fand sich sowohl distal als auch proximal ein tendenziell geringerer Anteil an Knochen in der stabilen als in der flexibel fixierten Gruppe. Die Präparate der stabilen Gruppe und die der contra-lateralen Seite unterschieden sich im gesamten Bereich oberhalb des Spalts nicht voneinander. Die flexibel fixierten Tiere zeigten in der distalen Osteotomiehälfte ca. 32 % (* $p = 0,005$), in der proximalen ca. 42 % (* $p = 0,03$) signifikant mehr Knochengewebe als die Kontrollgruppe und tendenziell mehr als die stabile Gruppe. Der Anteil an Weichgewebe war im Spaltbereich der flexiblen Tiere deutlich geringer als in beiden anderen Gruppen. Gegenüber der contra-lateralen Seite war dieser Unterschied signifikant (distal * $p = 0,058$ und proximal * $p = 0,01$). Der Osteoidgehalt war in den operierten signifikant höher als in der intakten Gruppe, in der nahezu kein Osteoid vorhanden war (Abb. 61, Abb. 62).

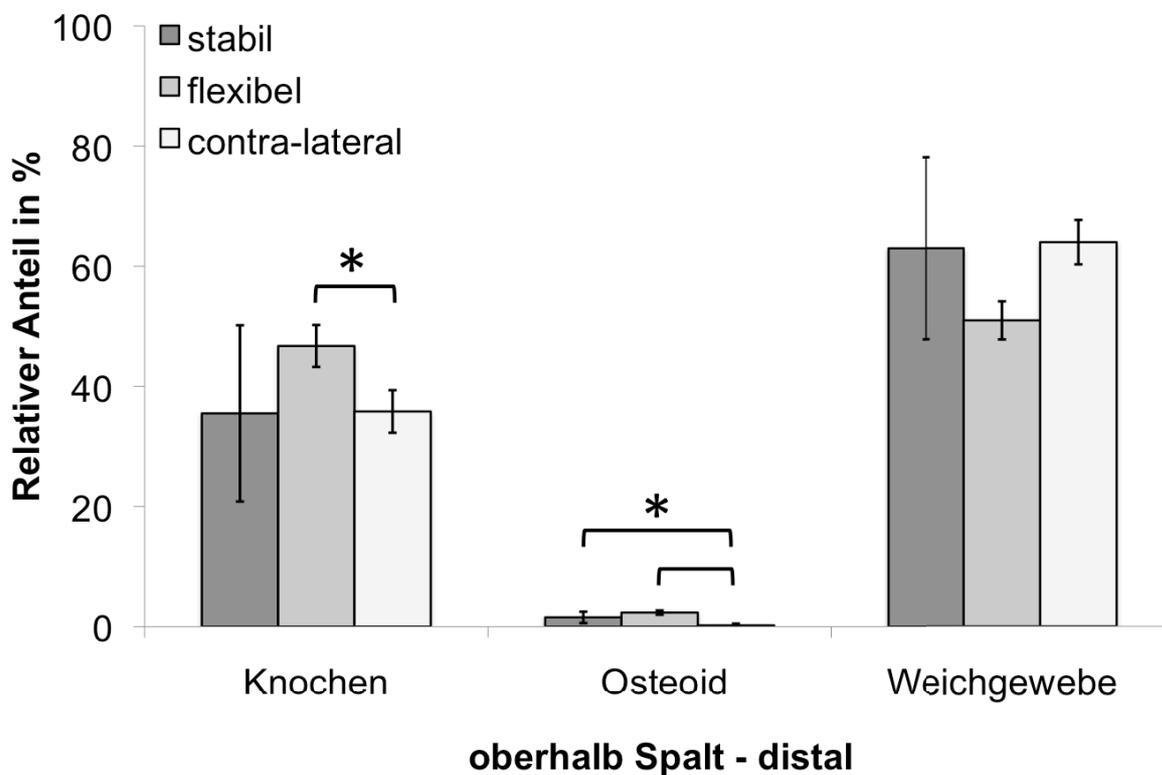


Abb. 61: Prozentuale Gewebezusammensetzung aller ermittelten Gewebepunkte oberhalb des distalen Spaltbereichs (stabil $n = 6$, flexibel $n = 5$, contra-lateral $n = 7$); * $p \leq 0,05$.

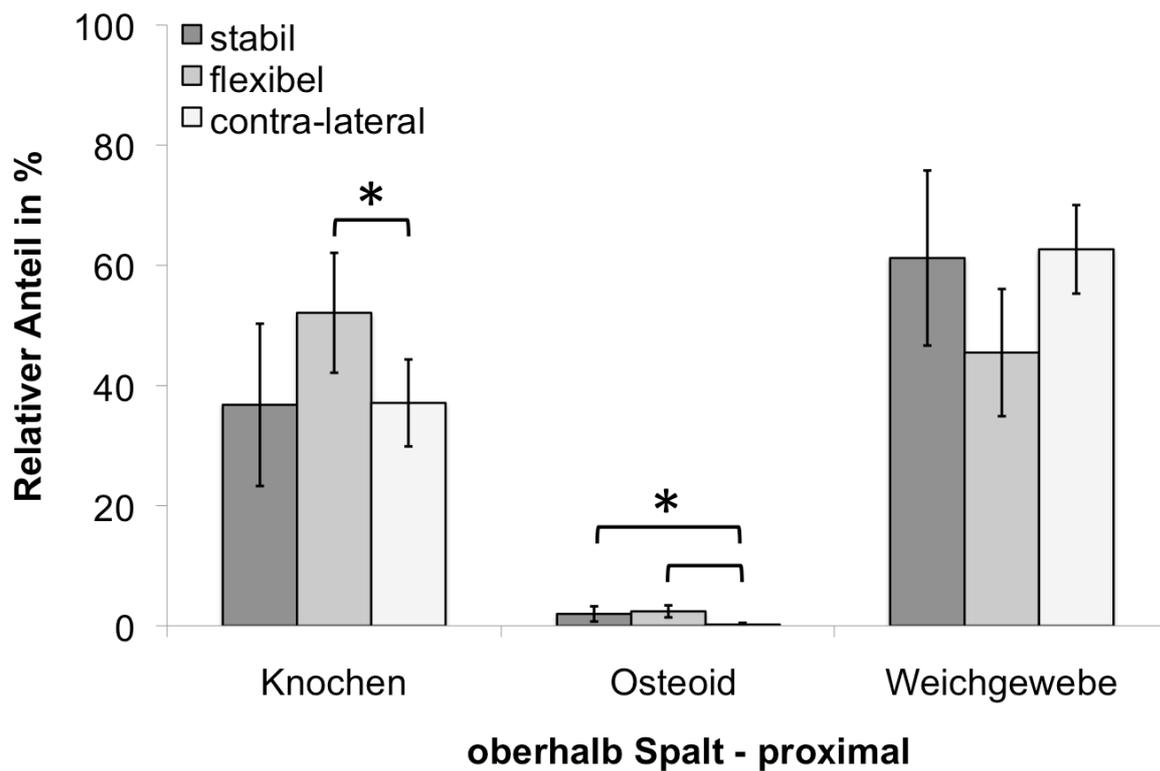


Abb. 62: Prozentuale Gewebezusammensetzung aller ermittelten Gewebepunkte oberhalb des proximalen Spaltbereichs (stabil n = 6, flexibel n = 5, contra-lateral n = 7); * = $p \leq 0,05$.

Unterhalb des Osteotomiespalts waren sowohl distal als auch proximal keine signifikanten Unterschiede in der Gewebezusammensetzung zwischen allen drei Tiergruppen zu erkennen. Im distalen Bereich stellte sich mit ca. 20 % der geringste Anteil an Knochengewebe aller untersuchten Knochenbereiche dar. Als einziger Unterschied war wiederum der, gegenüber den operierten Tieren signifikant geringere Osteoidgehalt der Präparate der contra-lateralen Gruppe in diesem Gebiet zu nennen (Abb. 63, Abb. 64).

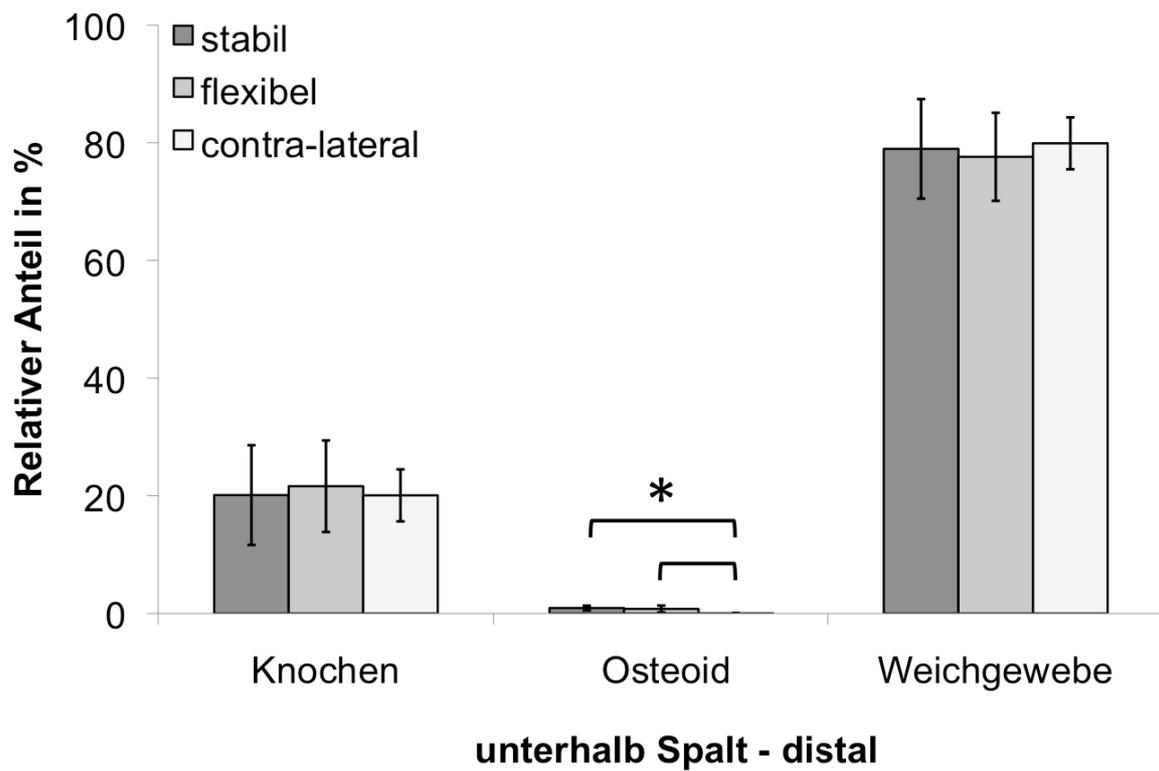


Abb. 63: Prozentuale Gewebezusammensetzung aller ermittelten Gewebepunkte unterhalb des distalen Spaltbereichs (stabil n = 6, flexibel n = 5, contra-lateral n = 7); * = $p \leq 0,05$.

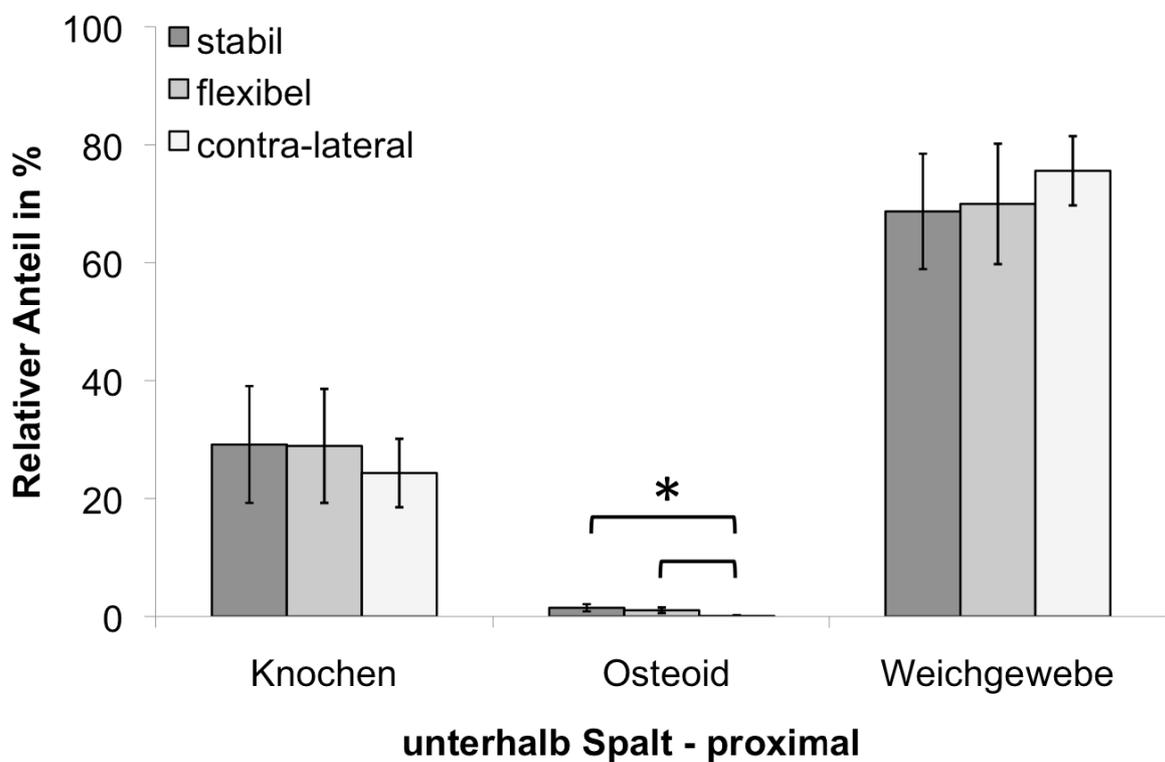


Abb. 64: Prozentuale Gewebezusammensetzung aller ermittelten Gewebepunkte unterhalb des proximalen Spaltbereichs (stabil n = 6, flexibel n = 5, contra-lateral n = 7); * = $p \leq 0,05$.

3.6.3 Fluoreszenzmikroskopische Untersuchung

Die Auswertung der fluoreszenzmikroskopischen Untersuchung konnte aufgrund fehlender Abgrenzbarkeit der neugebildeten, ungeordneten Knochenstrukturen und des teilweise stattgefundenen Remodelings, nicht quantitativ bestimmt werden. Da keine abgrenzbaren Banden zur definierten Abstandsmessung vorlagen, wurde diese Auswertung qualitativ deskriptiv durchgeführt.

Bei der stabil fixierten Gruppe konnte im distalen Spaltbereich aufgrund des fehlenden mineralisierten Gewebes kaum Fluoreszenz beobachtet werden. Hier lagerten sich beide Farbstoffe hauptsächlich im Bereich um das distale Spaltende herum an (Abb. 65 oben links). Die in der vierten Woche post OP durch Einlagerung von Calceingrün (Wellenlänge 490 bis 530 nm) gekennzeichnete Mineralisation zeigte sich vor allem im neugebildeten Gewebe im Osteotomiespalt der flexibel fixierten Gruppe (Abb. 65 unten links). Im Gebiet nahe der beiden Spaltränder konnten dadurch sowohl in der distalen als auch in der proximalen Spalthälfte grün fluoreszierende Strukturen beobachtet werden (Abb. 65 unten). Proximal ließ sich in beiden Gruppen eine tendenziell höhere Anlagerung des Calceinfarbstoffes in Richtung Spaltmitte erkennen (Abb. 65 rechts).

Mit der Gabe von Tetrazyklin (Wellenlänge 390 bis 560 nm) konnte gezeigt werden, dass bei den meisten Tieren beider Gruppen sechs Wochen post OP der Spalt im proximalen Bereich überbrückt war. An die grünen Mineralisationszonen schlossen sich fließend durch Tetrazyklin rot fluoreszierende Strukturen an, die beide Osteotomieseiten miteinander verbanden (Abb. 65). Die stabil fixierten Tiere zeigten distal nur im Bereich der Spaltränder rote Fluoreszenz (Abb. 65 oben links). Vor allem bei den flexiblen Tieren konnten im distalen Bereich rote und grüne Strukturen gesehen werden, die meist ebenfalls eine Überbrückung des Spalts anzeigten (Abb. 65 unten links).

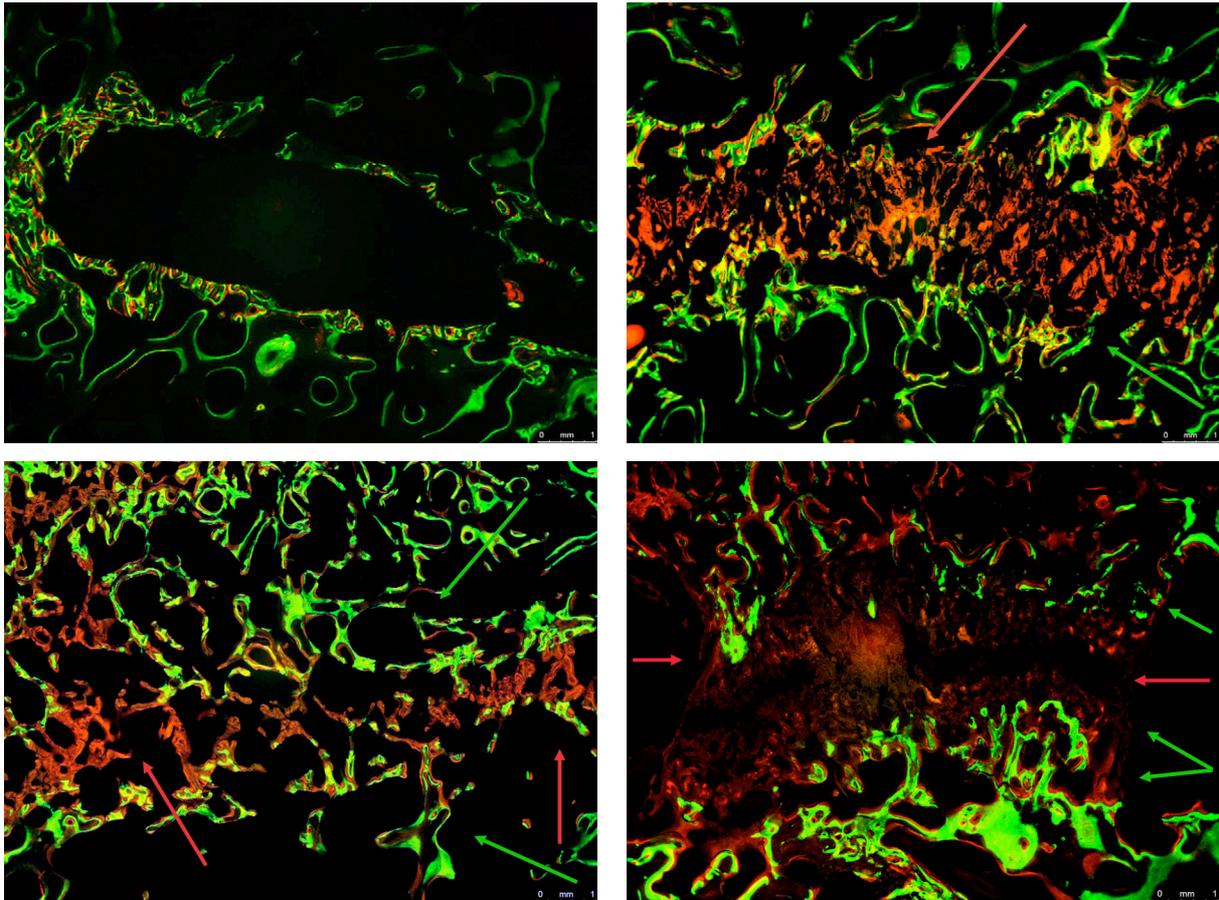


Abb. 65: Histologische Schnitte der Fluoreszenzfärbung: angeordnet in Lage und Tier entsprechend den Bildern der histologischen Auswertung (Abb. 52 und Abb. 52); oben stabile und unten flexible Tiere, jeweils links distaler und rechts proximaler Spaltbereich; grün = Calceingrün, rot = Tetracyclin (Färbung ursprünglich gelb, aber aufgrund verbesserter Darstellbarkeit in Falschfarbe rot geändert).

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass die Tiere der stabil fixierten Gruppe in der distalen Spalthälfte eine geringere Knochenmineraldichte, weniger neugebildeten Knochen und Osteoid sowie eine geringere Steifigkeit dieses neugebildeten Gewebes aufwiesen, als die Präparate der flexibel fixierten und der nicht-operierten Gruppe. Die flexibel fixierte Tiergruppe zeigte eine Knochenmineraldichte und einen Anteil an neugebildetem Knochen, der dem intakten Knochen entsprach, jedoch eine geringere Steifigkeit als dieser besaß.

In der proximalen Spalthälfte unterschieden sich beide operierten Gruppen nicht voneinander, hatten jedoch eine höhere Knochenmineraldichte und mehr neugebildetes Knochengewebe als der intakte Knochen in der Kontrollgruppe. Die Steifigkeit aller drei Gruppen war hier vergleichbar.

4 Diskussion

Das Ziel der vorliegenden Studie war es, erstmalig die metaphysäre Knochenheilung unter biomechanisch definierten Bedingungen zu erforschen. Die übereinstimmenden Ergebnisse aller Auswertungsmethoden zeigten, dass das von uns entwickelte Tiermodell am Schaf geeignet war, die gewählte Fragestellung zu untersuchen. Die erzielten Erkenntnisse bestätigten, dass die metaphysäre Knochenheilung ähnlichen biomechanischen Bedingungen folgt, wie die diaphysäre Heilung.

4.1 Diskussion der Methodik

4.1.1 Tiermodell

Grundsätzlich stellt sich die Frage, ob das Schaf aus makroskopischer und biomechanischer Sicht als Modelltier zur Untersuchung der metaphysären Frakturheilung geeignet ist. Bei der Auswahl der Tierart zur Entwicklung eines metaphysären Frakturheilungsmodells war es von Bedeutung, die gewonnenen experimentellen Untersuchungsergebnisse weitestgehend auf die beim Menschen zu erwartenden Verhältnisse übertragen zu können. Bei Schafen und Hunden entsprechen die knöchernen Regenerationsprozesse und das Knochenremodeling denen des menschlichen Knochens (Aerssens, 1998; Chavassieux, 1990; den Boer et al., 1999; Lippuner et al., 1992; Wissing, 1986; Wissing et al., 1990). Trabekuläre Umbauprozesse im Knochen von Hunden zeigen jedoch eine sehr hohe Variabilität zwischen den unterschiedlichen Lokalisationen und Rassen (Kimmel und Jee, 1982). Das Heilungsbild von Schafen und Menschen ist bei experimentell bedingten Manipulationen wesentlich homogener als das von Hunden. Dies erleichtert die Interpretation der Ergebnisse im Schafmodell und deren Vergleich mit dem Menschen (Wissing et al., 1990). Die Durchführung von Studien an Hunden ist wegen deren Status als Schutz- und Begleittier zudem ethisch sehr umstritten (Auer et al., 2007; Pearce et al., 2007). Schafe stellen mit ihrem ruhigen und anpassungsfähigen Verhalten ein im Handling vergleichsweise unkompliziertes Großtiermodell dar (Martini et al., 2001; Newmann et al., 1995).

Durch ähnliche knöcherne Dimensionen sowie einem vergleichbaren Körpergewicht kommen die auf den Knochen einwirkenden mechanischen Belastungen den Verhältnissen beim Menschen nahe (Gerhart et al., 1993; Martini et al., 2001; Newmann et al., 1995). Die Mineralzusammensetzung des ovinen Knochens ist mit der des humanen Knochens vergleichbar (Ravaglioli et al., 1996). Schafe haben jedoch gegenüber dem Menschen eine signifikant höhere Knochenmineraldichte und -festigkeit (Liebschner, 2004; Nafei et al., 2000).

Weiterhin sind die mikroskopischen und histologischen Unterschiede bzw. Gemeinsamkeiten des Schafes im Vergleich zum Menschen zu berücksichtigen. Im Wachstum befindliche Schafe und Menschen besitzen vor allem plexiformen Knochen mit einer primären Knochenstruktur, der eine Kombination aus Geflecht- und Lamellenknochen darstellt (Newmann et al., 1995; Schenk und Willenegger, 1977). Beim humanen Knochen liegt bereits mit Abschluss der skelettalen Reife eine sekundäre Knochenstruktur mit Osteonen vor (Eitel et al., 1981; Newmann et al., 1995). Diese entstehen beim Schaf erst durch Remodeling des Knochens. Hierdurch bilden sich auch beim Schaf sekundäre Strukturen mit Osteonen und Haversschen Systemen aus (Auer et al., 2007; Liebschner, 2004; Newmann et al., 1995), die beim Menschen jedoch eine größere Anzahl erreichen können (Hillier und Bell, 2007). Hinsichtlich der Gefäßversorgung und Vaskularisation im Knochen bestehen zwischen Schafen und Menschen keine bedeutsamen Unterschiede. Das Schaf besitzt im Vergleich zum Menschen eine deutlich höhere Stoffwechsellkapazität und daraus folgend eine vermehrte Heilungskapazität (Claes, 1992; Stürmer und Schuchardt, 1980b). Das osteogene Potential juveniler Tiere ist höher als das älterer, was sich klinischen Studien zufolge in einer schneller ablaufenden Osteogenese dieser Knochen auswirkt (Fischgrund et al., 1994; Nunamaker, 1998). Deshalb wurden für die vorliegende Studie Schafe mit einem relativ hohen Durchschnittsalter ausgewählt, deren altersbedingt abnehmende knöcherne Regenerationsfähigkeit und die histologische Knochenstruktur der des adulten Menschen nahe kommen.

Im Hinblick auf die Größe des Skeletts wie auch auf Form und Struktur sowie Vaskularisation, biomechanische Belastung und Regeneration des Knochens, ist das Schaf folglich anderen Modelltierspezies überlegen (Auer et al., 2007; den Boer et al., 1999; Newmann et al., 1995; Nuss et al., 2006; Pearce et al., 2007; Wissing et al., 1990).

Es bewährte sich als Modelltier in zahlreichen Frakturheilungsstudien am gesunden sowie osteoporotischen Knochen (Augat et al., 2000; Dumont et al., 2009; Egermann et al., 2008; Lill et al., 2002; Lill, 2003; Turner, 2001), was durch langjährige Erfahrung mit Frakturheilungsstudien an Schafen im Institut für Unfallchirurgische Forschung sowie in anderen Institutionen bestätigt werden kann (Augat, 2003a; Claes et al., 2008; Claes et al., 1997; Claes et al., 2000a; Klein et al., 2003; Schell et al., 2008; Schorlemmer et al., 2003; Schorlemmer et al., 2005). Deshalb wurde diese Tierart zur Entwicklung eines metaphysären Modells im Großtier gewählt.

4.1.2 Versuchsdesign

Defektmodell

Bisher gab es kein Modell zur Untersuchung der metaphysären Frakturheilung im Großtier, das die biomechanischen Bedingungen im Fraktur- bzw. Osteotomiespalt während der Knochenheilung berücksichtigte. Studien zur Frakturheilung im Bereich des metaphysären Knochens wurden meist unter nicht hinreichend standardisierten und deshalb nicht reproduzierbaren Bedingungen durchgeführt (Jarry und Uhthoff, 1971; Uhthoff und Rahn, 1981). Da bei der Wahl der Versuchsparameter somit nur in geringem Umfang auf Erfahrungswerte aus früheren experimentellen und klinischen metaphysären Studien zurückgegriffen werden konnte, mussten wir in der vorliegenden Studie einen völlig neuen Ansatz zur Erforschung der Frakturheilung in dieser Region des Knochens entwickeln. Hierfür dienten überwiegend Daten aus Frakturheilungsuntersuchungen an der Knochendiaphyse. Hier wurde aufgrund der sehr guten Reproduzierbarkeit und einfacheren Osteosynthesebedingungen häufig ein Osteotomiemodell unter Schonung des Periosts gewählt (Stürmer und Schuchardt, 1980a). Diese Methode wurde auch zur Etablierung eines Kleintiermodells für Untersuchungen der metaphysären Frakturheilung unter überwiegend stabilen Bedingungen angewandt, bei welcher eine Osteotomie an der Rattentibia mittels einer Titanplatte fixiert wurde (Kolios et al., 2009; Stürmer et al., 2010; Stürmer et al., 2009; Stürmer et al., 2006).

Spaltgeometrie

Für die erforderliche Spaltbreite der Osteotomie gab es keine Ansatzpunkte in Form von Großtierstudien im metaphysären Knochenbereich. Aus Studien an der Diaphyse ist jedoch bekannt, dass die Breite des Fraktur- oder Osteotomiespalts einen großen Einfluss auf die Heilung besitzt. In früheren diaphysären Frakturheilungsstudien im Schaf wurde mehrfach eine Spaltbreite von 3 mm als geeignet befunden (Claes et al., 1997; Kaspar et al., 2005; Klein et al., 2004; Krischak et al., 2002; Schell et al., 2008). Diese war nicht zu groß, um eine knöcherne Heilung zu verhindern und andererseits so groß, dass die Heilung nicht zu schnell ablaufen sowie aufgrund unterschiedlicher IFB einen deutlichen Verlauf zeigen konnte.

Die Größe des Frakturspalts korreliert mit der Heilungszeit des Knochens (Claes et al., 1992). Zu große Frakturspaltbreiten führen zu Verzögerung oder zum Ausbleiben der Heilung (Claes und Augat, 1995). Dies stellte sich in Studien am Femur von Schafen dar, bei denen eine Osteotomie mit einer Spaltbreite von 5 mm bzw. 5,7 mm nur verzögert heilte bzw. nicht überbrückt wurde (Claes et al., 1997; Claes et al., 2003). Diese Erkenntnisse wurden an der Tibia im Schafsmodell mit einer Osteotomiespaltbreite von 6 mm (Claes et al., 1998), sowie bei der Heilung humaner Knochen bestätigt (Claes et al., 2002b; Claes et al., 1992). Das Verhalten war unabhängig von der Verschiebung der Fragmente um mehrere Millimeter, die bei klinisch auftretenden Frakturen häufig vorliegt.

Frühere Studien im diaphysären Knochen belegten, dass die Heilungsgeschwindigkeit umso schneller und die Qualität des neugebildeten Gewebes umso besser war, je geringer der Abstand zwischen den gegenüberliegenden Seiten der Fraktur war. Dies hatte zur Folge, dass in Modellen mit kleinen Spaltbreiten von ≤ 2 mm keine signifikanten Unterschiede im Heilungsverlauf mechanisch unterschiedlicher Gruppen gefunden werden konnten (Aro und Chao, 1993; Claes et al., 1997).

Diese Grundlagen wurden in der vorliegenden Studie mit einem 3 mm breiten Osteotomiespalt berücksichtigt, der mittels einer speziellen Sägelehre und anhand einer standardisierten Methodik sehr präzise erstellt werden konnte.

Implantate

Die Auswahl eines geeigneten Implantatwerkstoffes erfordert die Berücksichtigung von Anwendungsort, Anwendungsdauer sowie der im Körper zugewiesenen Funktion und der Eigenschaften des biologischen Milieus am Anwendungsort. Da für die Anforderungen dieser Studie hauptsächlich die mechanische Komponente bedeutsam war, wurden die verwendeten Implantate von 3 mm bzw. 2 mm Dicke aus chirurgischem Stahl gefertigt. Dieser weist eine höhere Steifigkeit auf als andere Metalle, wie z.B. Titankomponenten und ist dadurch mechanisch belastbarer (Thull, 2002). Zudem besitzt der Werkstoff Stahl eine hohe Biokompatibilität, wodurch Interaktionen mit dem biologischen Umfeld aus extrazellulären Flüssigkeiten, Zellen und Geweben vermieden werden. Da in dieser Studie eine Zelladhäsion an das als Abstandhalter dienende Implantat unerwünscht war, besaß dieses allseits eine glatte, unbeschichtete Oberfläche. Somit konnte gewährleistet werden, dass keine Verbindung zwischen Implantat und Knochen entstand, was vor allem unter flexibler Fixation die Ergebnisse beeinflusst hätte.

Die Position des Implantates wurde so gewählt, dass die Länge des Osteotomiespalts von ca. 21 mm bei allen Tieren unabhängig von den anatomischen Gegebenheiten ähnlich war. Dadurch war es in Einzelfällen möglich, dass das Implantat am proximalen Spaltende etwas über diesen hinaus reichte. Dies konnte zu leichten Abriebserscheinungen an der Oberfläche der Patella führen, die für die weitere Auswertung jedoch keine Konsequenzen nach sich zogen.

Interfragmentäre Bewegung und interfragmentäre Dehnung

In experimentellen Studien am Schaf mit einem 3 mm breiten Osteotomiespalt konnten während der frühen Frakturheilungsphase im diaphysären Knochen passive Bewegungen durch Zusammendrücken des Spalts um 0,5 mm und resultierender IFD von 17 % die Heilung begünstigen, wohingegen Bewegungen um 2 mm und IFD von 67 % die Heilung verhinderten (Kenwright und Goodship, 1989).

Weiterhin konnte im Schafmodell ein Bereich von 0,2 mm IFB mit 7 % IFD und 1 mm IFB mit 31 % IFD eingegrenzt werden, der bei einer Spaltbreite von etwa 2 mm optimale Bedingungen für die Frakturheilung in der Diaphyse bot. Bei größeren Spaltbreiten bis zu 6 mm führte die resultierende IFD von 31 % zu einer verzögerten

Heilung oder zum Ausbleiben der Spaltüberbrückung in der Osteotomie (Claes et al., 1998). In Bereichen mit sehr kleinen IFD bis zu 0,04 % konnte ebenfalls keine Heilung festgestellt werden und es kam teilweise zur Resorption knöcherner Strukturen (Frost, 2004).

Um unterschiedliche Stabilisierungsgrade zu erreichen, wurden die Gruppen mit zwei verschiedenen Implantaten innerhalb des Spalts ausgestattet. Die von uns mithilfe dieser unterschiedlichen Implantate für eine „stabil“ und eine „flexibel“ fixierte Fraktur gewählten Stabilisierungsgrade lagen innerhalb eines Bereichs, der in früheren Studien zu einer Heilung führte, wodurch erfolgversprechende Bedingungen gegeben waren.

Aufgrund von minimalen Bewegungen zwischen Implantat und Knochen kam es im Gebiet um das Implantat zu osteoresorptiven Vorgängen und der Bildung einer Bindegewebsschicht. Diese beeinflusste und erhöhte die initiale IFB im Bereich um das Implantat herum und musste folglich bei der Berechnung der IFD berücksichtigt werden. Die IFD wurde aufgrund der weichen Bindegewebsschicht ebenfalls erhöht. Die Bildung von Bindegewebe an einer mechanisch nicht stabilen Berührungs- oder Grenzfläche ist ein bereits aus der Literatur bekanntes Phänomen und geschieht frühzeitig in den ersten Wochen nach der Implantation (Soballe et al., 1992). Auf der Grundlage der mechanischen Eigenschaften von Bindegewebe (Hori und Lewis, 1982) nahmen wir an, dass die Bindegewebsschicht mit einer Dicke von 0,4 mm zu ungefähr 75 % komprimiert werden konnte. Dies führte Berechnungen zufolge zu einer zusätzlichen IFB von ca. 0,3 mm im Osteotomiespalt. Aus diesem Grund wurde eine initiale IFB am proximalen Spaltende von ca. 0,3 mm in der stabilen, sowie ca. 1,3 mm in der flexiblen Gruppe angenommen.

Selbst unter Annahme derartiger biomechanischer Veränderungen unterschied sich die stabile Gruppe hinsichtlich ihrer Stabilität noch deutlich von der flexiblen Gruppe. Unterschiede in der Dicke der Bindegewebsschicht von $\pm 0,1$ mm haben nur geringe Veränderungen im Dehnungsverlauf entlang des Osteotomiespalts zur Folge und somit nur eine geringe Auswirkung auf das grundsätzliche Ergebnis der vorliegenden Studie (Abb. 67).

Belastung der Fraktur bzw. Osteotomie

Zur Untersuchung der IFB und des Verlaufs der Knochenheilung spielt die Belastung auf die Fraktur bzw. Osteotomie eine große Rolle (Augat et al., 1996; Claes et al., 1997; Goodship und Kenwright, 1985). In der vorliegenden Studie führte diese mechanische Belastung zur Entstehung einer retro-patellaren Kraft, die die Durchbiegung der Trochlea bewirkte. Diese Durchbiegung nimmt Einfluss auf die IFD innerhalb des Osteotomiespalts und wird durch das Implantat am proximalen Spaltende begrenzt. Um die tatsächlich auf den Osteotomiespalt einwirkende Kraft und deren Auswirkungen auf die Ergebnisse dieser Studie zu ermitteln, wurde anhand eines bereits in früheren Untersuchungen etablierten Verfahrens die vertikale Bodenreaktionskraft aller Gliedmaßen der Schafe beider Versuchsgruppen bestimmt (Seebeck et al., 2005).

Es ist bekannt, dass die Ganggeschwindigkeit nur einen untergeordneten Einfluss auf die maximale Belastung der Gliedmaßen und Gelenke besitzt (Bergmann et al., 1984). Dennoch wurde, um die Durchführung der Messungen zu standardisieren, die Geschwindigkeit analog zu früheren Studien so konstant wie möglich gehalten und das Schaf während der Messung immer von derselben Person geführt (Duda et al., 1998; Kim und Breur, 2008; Seebeck et al., 2005). Die Tiere wurden vor Versuchsbeginn an Halsband und Leine sowie an die Messplattform gewöhnt. Das Körpergewicht (KGW) besitzt einen entscheidenden Einfluss auf die Ergebnisse der vertikalen Bodenreaktionskraftmessung, weshalb die gemessenen Werte jeweils auf das Gesamtgewicht des entsprechenden Schafes bezogen wurden. Es konnte belegt werden, dass schwere Tiere im Vergleich zu leichteren Tieren hinsichtlich des KGW keine höhere Gliedmaßenbelastung aufweisen (Browning et al., 2009). Der für die Hintergliedmaßen ermittelte praeoperative Wert der maximalen Bodenreaktionskraft lag in beiden Versuchsgruppen mit ca. 47 % des KGW im Bereich der bereits in früheren Studien an Schafen ermittelten Werte. Die Gruppe um Tappert zeigte eine Bodenreaktionskraft der Hintergliedmaße von 35 – 50 % des KGW (Tapper et al., 2006). Für die beiden Vordergliedmaßen betrug die Belastung in beiden Gruppen ca. 62 % des KGW. Unterstützend konnten Kim und Breur in ihrer Studie zur Bodenreaktionskraftmessung bei Schafen einen Mittelwert von ca. 53 % des KGW für die Vordergliedmaßen und ca. 39 % des KGW für die Hintergliedmaßen ermitteln (Kim und Breur, 2008).

Dies zeigt in Übereinstimmung mit den Ergebnissen der vorliegenden Studie, dass Schafe grundsätzlich unter deutlicher Mehrbelastung der vorderen Extremität eine andere Gewichtsverteilung und einen anderen Kurvenverlauf der vertikalen Bodenreaktionskraft aufweisen als andere Tierarten. Die interindividuellen Schwankungen der Ergebnisse der vertikalen Bodenreaktionskraftmessungen zwischen den einzelnen Schafen liegen in der vorliegenden Studie mit ca. 19 – 30 % im Rahmen derer aus früheren Untersuchungen (Duda et al., 1998; Tapper et al., 2006).

Versuchsdauer

Die Versuchsdauer von acht Wochen zwischen Operation und Untersuchung der knöchernen Heilung wurde aufgrund langjähriger Erfahrungen in Studien zur diaphysären Frakturheilung an Schafen festgelegt, bei denen innerhalb dieses Zeitraums eine normale Heilung stattfand (Augat, 2003a; Claes et al., 2008; Claes et al., 2003; Epari et al., 2006; Kaspar et al., 2005). Bei einer zu kurzen Versuchsdauer wäre die Fraktur noch nicht ausreichend geheilt und zuverlässige Aussagen über den Heilungsverlauf nicht möglich. In Untersuchungen am Hundemodell, deren Knochenheilung einem dem Schaf ähnlichen Zeitverlauf folgt, stellte sich bereits nach sechs Wochen eine große Menge Knorpel und eine peripher beginnende Verknöcherung dar (Egger et al., 1993). In einer Studie an Schafen wurde belegt, dass im Zuge der Frakturheilung die Beweglichkeit im Frakturspalt abnimmt und nach etwa acht Wochen praktisch keine Bewegung mehr nachweisbar ist. Diese Situation spricht für eine stattgefundene Überbrückung des Frakturspalts der Tiere (Claes et al., 1995a). Die Knochenheilung der Schafe ist somit nach diesem Zeitraum bereits sehr weit fortgeschritten, jedoch noch nicht vollständig abgeschlossen. Bei zu langen Standzeiten ist der Knochen nahezu geheilt und befindet sich im Prozess des Remodelings, wodurch der Verlauf des Heilungsprozesses nicht mehr eindeutig beurteilbar ist. Durch enchondrale Ossifikation entstandener Knorpel wäre demnach bereits durch Knochengewebe ersetzt. Dies konnte auch in einer metaphysären Frakturheilungsstudie an Hunden festgestellt werden, in deren proximaler Tibia eine Hemiosteotomie erstellt wurde. Diese war bereits nach vier Wochen überbrückt und nach insgesamt zehn Wochen knöchern verbunden (Draenert und Draenert, 1979).

4.1.3 Auswertungsparameter

Computertomographische Methoden

Die Knochenmineraldichte des neugebildeten Gewebes im Osteotomiespalt sowie in dessen Umgebung wurde mittels der peripheren quantitativen Computertomographie (pQCT) untersucht. Die Bestimmung dieses Parameters im pQCT ist eine zuverlässige und etablierte Methode um den Mineralisierungsgrad zu ermitteln und die mechanische Stabilität des neugebildeten Gewebes abschätzen zu können (Augat et al., 1997; Krischak et al., 1999). Außerdem stellt diese Messung eine sehr gute Möglichkeit zur Qualitätsbestimmung des vorhandenen interfragmentären Gewebes anhand dessen Knochendichte und -strukturierung dar (Markel und Chao, 1993). Die Präzision der Methodik und der gemessenen Ergebnisse ist abhängig von der Strahlstabilität der Röntgenröhre (Genant et al., 1996), die vor jeder Messung mit einem Standard-Hydroxylapatit-Phantom kalibriert wurde. Der Präzisionsfehler lag bei 0,3 - 2,2 % (Augat et al., 1998a).

Ein wichtiger Einflussfaktor auf die Vergleichbarkeit der Messungen im pQCT ist die Positionierung der Knochenpräparate. Da das Gerät nur senkrechte Schnittbilder des auf der Auflageschiene gelagerten Knochens aufnimmt, wurde bei der Ausrichtung aller Präparate darauf geachtet, dass der Osteotomiespalt parallel zur Auflagefläche des Knochens im Gerät lag. So konnte eine Verfälschung der gemessenen Knochenmineraldichte aufgrund der inhomogenen Verteilung der Knochen trabekel im metaphysären Knochenbereich weitestgehend vermieden werden, die in früheren Studien ca. 0,7 - 4 % betrug (Genant et al., 1996; Takada et al., 1996). Da der Anfangspunkt der Messung mit dem Ende des Osteotomiespalts übereinstimmte, konnte eine vergleichbare Positionierung der Schnittebenen aller Proben gewährleistet werden. Um mögliche Unterschiede aufgrund der manuellen Festlegung der ROIs auszugleichen, wurden diese mindestens fünf Mal unabhängig voneinander eingezeichnet und die Werte anschließend gemittelt.

Anhand der Darstellung im μ CT war eine Analyse des gesamten neugebildeten Gewebes im Osteotomiespalt möglich, da im Vergleich zum pQCT auch die Bereiche zwischen den einzelnen Schnittebenen berücksichtigt werden konnten.

Biomechanische Eindrücktestung

Der Koeffizient von Belastung zu Verformung bezeichnet im viskoelastischen trabekulären Knochen die Steifigkeit des Materials. Dadurch ist die biomechanische Eindrücktestung eine verlässliche und etablierte Methode um die Steifigkeit von Knochen- und Kallusproben zu ermitteln (Li et al., 2007). Es handelt sich dabei um eine mit strukturellen Änderungen des Knochens verbundene zerstörende Druckprüfung, deren Genauigkeit höher ist als die einer nicht-zerstörenden Prüfung (Linde et al., 1992). Diese Untersuchung dient zum Nachweis der Festigkeit und der biomechanischen Stabilität der neugebildeten Strukturen innerhalb des Osteotomiespalts sowie der Veränderungen der Gewebequalität aufgrund von Anpassungsvorgängen des Knochens in der Umgebung des Spalts.

In den ersten 24 Stunden post mortem sowie bei Fixierung mit Formaldehyd verändern sich die mechanischen Eigenschaften des Knochens, weshalb die Eindrücktests sofort im Anschluss an die Präparation unter vergleichbaren Umgebungsbedingungen (20 –22 °C, NaCl) durchgeführt wurden (Fitzgerald, 1975, 1977; Wilke et al., 1996). Da trabekulärer Knochen anisotrop ist, würde ein Drucktest in unterschiedliche Richtungen unterschiedliche Ergebnisse liefern (Katz und Meunier, 1987; Keaveny et al., 2001). Daher lag jede Knochenscheibe der Druckplatte plan auf und wurde immer von ihrer medialen Seite aus eingedrückt.

Der Durchmesser des Eindrückstempels wurde so gewählt, dass eine möglichst große Fläche untersucht werden konnte. Er musste jedoch klein genug sein, um ausschließlich den Bereich des neugebildeten Gewebes innerhalb des Osteotomiespalts zu erfassen. Dies war bei einer Osteotomiespaltbreite von 3 mm durch einen Stempel mit \varnothing 1,5 mm gegeben. Aufgrund der inhomogenen, unsymmetrisch vernetzten trabekulären Gitterstruktur des metaphysären Knochens ergab sich in Einzelfällen die Situation, dass dieser Durchmesser zur Erfassung mehrerer Strukturen zu gering war (Keaveny et al., 2001; Krischak et al., 1999). Stattdessen drückte der Stempel direkt in einen Zwischenraum oder mittig auf einen Trabekel, wodurch es möglich war, dass die im Eindrücktest gemessenen Werte an solchen Lokalisationen sehr inhomogene Ergebnisse aufwiesen. Um die daraus entstehenden Abweichungen möglichst gering zu halten, wurden jeweils die drei in einem Bereich gemessenen Werte gemittelt.

Einige Punkte des Druckschemas lagen anatomiebedingt bereits im kortikalen Knochenbereich und wurden deshalb nicht in die Auswertung einbezogen. In der Literatur wurde für die Steifigkeit von spongiösem Knochen gegenüber Kompression ein stark variierender Wertebereich angegeben, der sich sehr deutlich in verschiedenen Bereichen des Knochens unterscheidet (Goldstein, 1987). Trabekulärer Knochen in der Umgebung der Kortikalis ist sehr viel steifer als trabekulärer Knochen in Richtung des Knochenschafts und des Markraums (Augat, 2003b). Diese Tatsache wurde in der vorliegenden Studie berücksichtigt, indem sowohl der Osteotomiespalt als auch dessen Umgebung in einzelnen definierten Regionen ausgewertet wurde.

Aufgrund der unterschiedlichen Versuchsparameter wie Durchmesser des Druckstempels oder Dicke und Lokalisation des untersuchten Knochens, sind die Werte der vorliegenden Studie mit anderen Studien zur Eindrücksteifigkeit nur eingeschränkt vergleichbar.

Histologie

Die mikroskopische Auswertung histologischer Schnitte mittels Punktezählverfahren gilt als eine seit langem etablierte Methode, um die während der Heilung gebildeten unterschiedlichen Gewebearten und deren Lokalisation zu evaluieren (Parfitt et al., 1987). Die histologischen Schnitte wurden zweidimensional ausgewertet, wobei verschiedene Studien dargestellt haben, dass die Ergebnisse dieser Auswertungen hinsichtlich ihrer Struktur und den Eigenschaften des Knochens sehr gut mit denen aus dreidimensionalen Auswertungen übereinstimmen (Feldkamp et al., 1989). Der gefärbte Dünnschliff eines jeden Schafes wurde von einer Person jeweils dreimal ausgezählt und gemittelt sowie stichprobenartig von einer weiteren Person verifiziert. Um bei zu analysierenden Komponenten, die nur etwa 20 % der Fläche in Anspruch nehmen den wahrscheinlichen relativen Fehler unterhalb von 5 % zu halten, ist es notwendig, mindestens 1000 Zählpunkte pro Bereich einzubeziehen (Weibel, 1963). Deshalb fand die Auszählung in allen sechs ausgewerteten ROIs mit der 100-fachen Vergrößerung statt, wodurch etwa 2000 Zählpunkte in die Berechnung des Ergebnisses eingingen.

4.2 Diskussion der Ergebnisse

Bisher gab es nur eine sehr begrenzte Anzahl an Studien, die sich mit der Heilung des metaphysären Knochens beschäftigten und an Ratten, Kaninchen oder Hunden durchgeführt wurden. Es konnte gezeigt werden, dass die metaphysäre Heilung im Tiermodell unabhängig von der Stabilität zu allen Zeitpunkten ohne die Bildung eines ausgeprägten externen Kallus stattfand (Draenert und Draenert, 1979; Jarry und Uhthoff, 1971; Uhthoff und Rahn, 1981). Auch in Untersuchungen am menschlichen Knie konnte im metaphysären Frakturbereich nur die Entwicklung eines fibrösen Kallus, jedoch keine periostale Kallusbildung dargestellt werden (Charnley und Baker, 1952). Die Kallusbildung nahm im spongiösen Knochen eine untergeordnete Stellung ein (Stürmer, 1996). Allen Untersuchungen zufolge bildete sich ein „interner Kallus“ fast ausschließlich in Form von Auflagerung neuen Knochengewebes auf einzelnen, bestehenden Spongiosabälkchen. Geflechtknochen füllte die kleinen Hohlräume auf und vernetzte die gebrochenen Spongiosatrabekel (Charnley und Baker, 1952; Draenert und Draenert, 1979; Jarry und Uhthoff, 1971; Stürmer et al., 2010; Uhthoff und Rahn, 1981). Diese Erkenntnisse bestätigten sich in der vorliegenden Studie. Im metaphysären Knochen konnte weder unter stabilen noch unter flexiblen Fixationsbedingungen eine signifikante periostale Kallusbildung entlang des Osteotomiebereichs festgestellt werden. Die Bildung neuen Knochens war überwiegend begrenzt auf das Gebiet innerhalb des Osteotomiespalts.

Eine flexibel fixierte Fraktur im diaphysären Knochen heilt jedoch unter dem Einfluss von IFB typischerweise mit Ausbildung eines externen Kallus. Die Ausprägung dieses Kallus hängt dabei stark von der Stabilität der Frakturfixation ab. Aufgrund dessen kann auch in der Diaphyse eine stabil fixierte Fraktur ohne oder mit geringer Kallusbildung heilen (Augat et al., 1998b; Claes, 2006; Claes et al., 2000b; Goodship und Kenwright, 1985). Ein Grund für das Ausbleiben von externer Kallusbildung im Bereich der Metaphyse ist vermutlich die große biologisch aktive Oberfläche des trabekulären Knochens im Vergleich zum kompakten Knochen der Diaphyse. Während bei der Heilung des kortikalen Knochens der Prozess der Knochenbildung überwiegend vom externen periostalen Gewebe ausgeht, bietet eine große interne Knochenoberfläche in Verbindung mit einer guten Vaskularisierung im trabekulären Knochen ein signifikantes Reservoir an Osteoblasten (Claes et al., 2002a).

Um die *in vivo* ermittelten Heilungsergebnisse der vorliegenden Studie mit den biomechanischen Bedingungen in Form der interfragmentären Dehnungswerte innerhalb des Osteotomiespalts in Beziehung setzen zu können, musste die IFD für die unterschiedlichen Lokalisationen im Spalt ermittelt werden. Dazu wurden zwei verschiedene Berechnungsmodelle an einer *in vitro* osteotomierten Femurkondyle entwickelt. Zum einen entstand mithilfe eines μ CT-Datensatzes ein FE-Modell, das unter Berücksichtigung der Materialeigenschaften des Präparates die IFD errechnen ließ. Zum anderen wurde ein Modell eines *in vitro* belasteten Präparates entwickelt, bei dem die gesamte Femurkondyle fixiert und in einem Winkel von 30° zur Osteotomielinie mit einer patello-femorale Kontaktkraft (F_R) belastet wurde (Abb. 67, oben) (Claes et al., 2009). In diesem Zustand, der auch *in vivo* durch Belastung der Gliedmaße vorherrscht, drückt die Patella auf die Trochlea, woraufhin der Osteotomiespalt komprimiert wird (Abb. 66). Mit Hilfe eines Implantates wurde die initiale Durchbiegung im Spalt bei der stabilen Gruppe auf 0 mm, bei der flexiblen Gruppe auf 1 mm IFB begrenzt.

Zur Validierung der im FE-Modell berechneten IFB wurden die Ergebnisse der biomechanischen Messung mit den simulatorisch im FE-Modell ermittelten Werten verglichen. Da die im FE-Modell kalkulierte IFB nur 8 % geringer war als die *in vitro* gemessene IFB, galt das FE-Modell einschließlich der Einschränkungen bei der Bestimmung der linear-elastischen Materialeigenschaften als valide (Claes et al., 2009). Anhand dieses validierten FE-Modells konnte nun in weiterführenden Auswertungen problemlos die IFD für jede beliebige Lokalisation innerhalb des Osteotomiespalts unter Einfluss jedes gewünschten Stabilitätsgrads berechnet werden.

Zum Vergleich der *in vivo* Ergebnisse mit den FE-Modell-Berechnungen mussten die Ausgangsbedingungen übereinstimmen. Dazu war entscheidend, dass die patello-femorale Kontaktkraft bei allen Tieren von Beginn des Versuches an in ausreichendem Maße auf den Osteotomiespalt übertragen wurde und zur gewünschten Kompression der Knochenbrücke mit der resultierenden IFD führte. Durch *in vivo* Studien zeigte sich, dass bereits eine Anspannung der Gliedmaßenmuskulatur in der Diaphyse zu IFB führen konnte, die den IFB während

des Ganges entsprachen (Duda et al., 2003). Die auf das Kniegelenk einwirkenden Kräfte setzen sich daher nicht nur aus den Auftrittskräften des Schafes, sondern auch aus den durch Muskelspannung bedingten Kräften zusammen. Berechnungen zufolge beträgt diese Hüftkontraktionskraft (F_H) im Schaf 125 % des KGW (Bergmann et al., 1999). Daraus konnte für ein 70 kg schweres Tier eine Hüftkontraktionskraft von 875 N ermittelt werden. Anhand dieser Kraft (F_H) war es möglich, die resultierende patello-femorale Kontaktkraft (F_R) zu berechnen, welche sich aus den Kräften der Quadrizeps- (F_Q) und der Patellarsehnen-Muskulatur (F_{PT}) entwickelt (Abb. 66) (Claes et al., 2009). Diese patello-femorale Kraft wird durch die Patella auf den Osteotomiespalt ausgeübt und beträgt bei Vollbelastung der Gliedmaße sowie einem Gewicht von 70 kg im Stand ca. 826 N.

In unserer *in vitro* Studie konnte festgestellt werden, dass die Durchbiegung der Knochenbrücke am distalen Teil der Trochlea ein lineares Verhalten aufweist und eine Biegesteifigkeit von 500 N/mm besitzt. Daraus resultierte, dass eine Kompressionskraft von 575 N ausreichend ist, um eine Durchbiegung des Spalts von 1 mm zu bewirken (Claes et al., 2009).

Anhand dieser Berechnungen reicht bereits eine Teilbelastung der operierten Gliedmaße von ca. 60 % aus, um den Osteotomiespalt im proximalen Teil vollständig von 3 mm bis zur Begrenzung durch das Implantat auf 2 mm zu komprimieren. Die Messungen der vertikalen Bodenreaktionskraft in der vorliegenden Studie ergaben, dass die Schafe beider Operationsgruppen die operierte Gliedmaße unmittelbar nach der Operation um ca. 40 % entlasteten, sich jedoch ab der zweiten Woche post OP stetig wieder ihren ursprünglichen Belastungswerten annäherten. Es bestanden zwischen beiden Gruppen bezüglich ihrer Bodenreaktionskräfte zu keiner Zeit Unterschiede, wodurch unterschiedliche mechanische Belastungen der operierten Gliedmaße ausgeschlossen werden konnten (Augat et al., 1996; Egger et al., 1993). Da die in dieser Studie untersuchten Tiere ein höheres Gewicht aufwiesen als die für die ursprünglichen Berechnungen herangezogenen 70 kg, war deren Hüftkontraktionskraft (F_H) und folglich auch die patello-femorale Kontaktkraft (F_R) höher als im Rahmen der Berechnungen angenommen. Daher bewirkten bereits geringere Belastungen eine vollständige Durchbiegung des Osteotomiespalts bis zu dessen Begrenzung durch das Implantat.

Die im Modell ermittelten IFD herrschten folglich auch *in vivo* vor, was zusätzlich durch die röntgenologischen Untersuchungen bestätigt wurde. Bei entlasteter Gliedmaße stellten sich beide Seiten des Osteotomiespalts parallel dar. Durch die Belastung kam es zu einer, wie im *in vitro*- bzw. FE-Modell berechneten, nahezu linearen Durchbiegung des Spalts (sh. Abb. 34) (Claes et al., 2009).

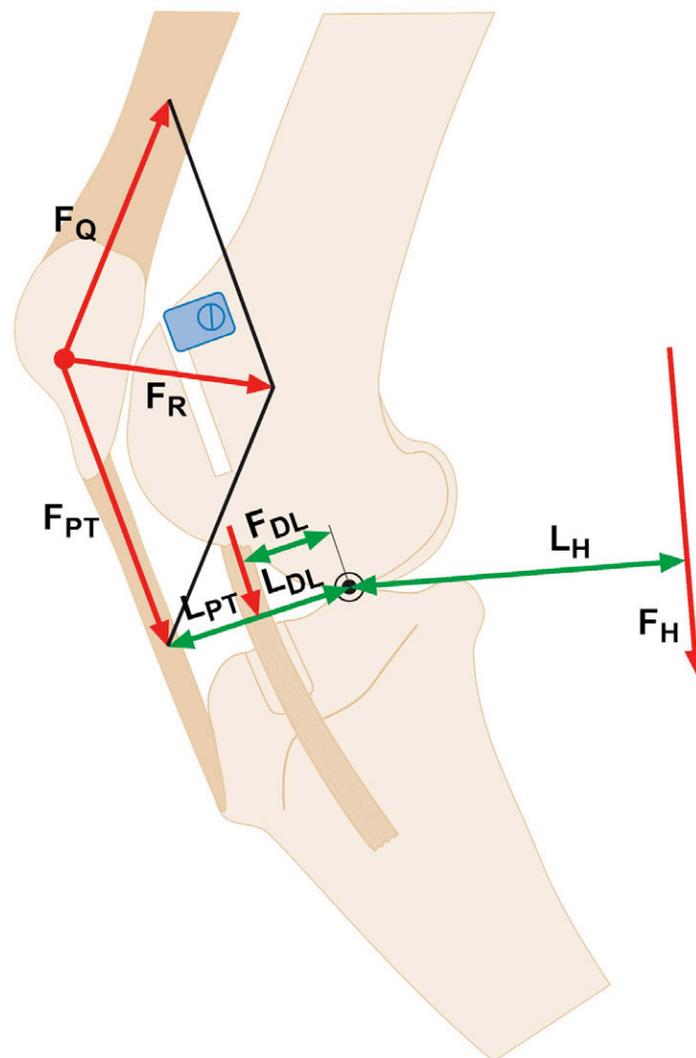


Abb. 66: Schema der relevanten, auf den Osteotomiespalt einwirkenden Kräfte; über den Drehpunkt (schwarzer Punkt) wird die aufgrund der Gliedmaßenbelastung auftretende Kraft F_H über weitere Kräfte (grüne Pfeile) mittels Patellarsehnen- (F_{PT}) und Quadrizepskraft (F_Q) als resultierende Kraft (F_R) auf den Osteotomiespalt übertragen und dieser entsprechend durchgebogen (Claes et al., 2009).

Die IFB war am höchsten am proximalen Spaltende der Osteotomie, im Bereich des Kontaktpunktes zwischen Implantat und ventraler Spaltoberfläche und nahm nach distal hin ab (Abb. 67). Das bedeutet, dass im distalen Bereich die knöcherne Verbindung auf eine einwirkende Kraft steifer reagierte und weniger Durchbiegung zuließ. Für die Abschätzung der IFD über den Verlauf des Osteotomiespalts wurde die Durchbiegung des Knochenfragments entlang des gesamten Spaltverlaufs berechnet und durch die Spaltbreite von 3 mm dividiert (Abb. 67). Dabei handelt es sich nicht um exakt zugeordnete Dehnungswerte, sondern immer um Dehnungsbereiche mit möglicher Varianz durch geringe Abweichungen innerhalb der Knochenstruktur und der Spaltbreite. Die berechnete IFB sowie die IFD wiesen ein nahezu lineares Verhältnis, bezogen auf den Osteotomiespaltverlauf auf. Die Kurve stellte sich unter stabilen Bedingungen nahezu linear, unter flexiblen Bedingungen geringgradig progressiv dar (Abb. 67, unten). Der Grund dafür waren vermutlich die nicht homogenen Materialeigenschaften des Knochens auf Basis der μ CT-Daten sowie der nicht gleichmäßige und einheitliche Querschnitt der Femurtrochlea.

Die für die Berechnungen relevanten Dehnungen wurden durch die Kompression des Osteotomiespalts hervorgerufen, wohingegen Dehnungen in anderen Richtungen keine Berücksichtigung fanden. Aufgrund dessen ergab sich für die IFD innerhalb der distalen Spalthälfte ein Bereich zwischen 1 – 5 % für die stabil und 6 – 20 % für die flexibel fixierten Tiere. In der proximalen Spalthälfte waren die Dehnungen beider Gruppen entsprechend höher bei 5 – 10 % für die stabil und 20 – 40 % für die flexibel fixierte Gruppe (Abb. 67, unten).

Trotz ähnlicher Auftrittskraft der Tiere beider Gruppen und dadurch vergleichbarer Gliedmaßenbelastungen waren die lokalen mechanischen Dehnungen am Osteotomiespalt unterschiedlich. Am distalen Ende des Osteotomiespalts traten die geringsten Gewebedehnungen und ebenfalls *in vivo* die geringsten Knochenmineral-dichtegehalte auf. Diese Werte stiegen in beiden Gruppen entsprechend zur Gewebedehnung in Richtung des proximalen Frakturspaltendes hin kontinuierlich an.

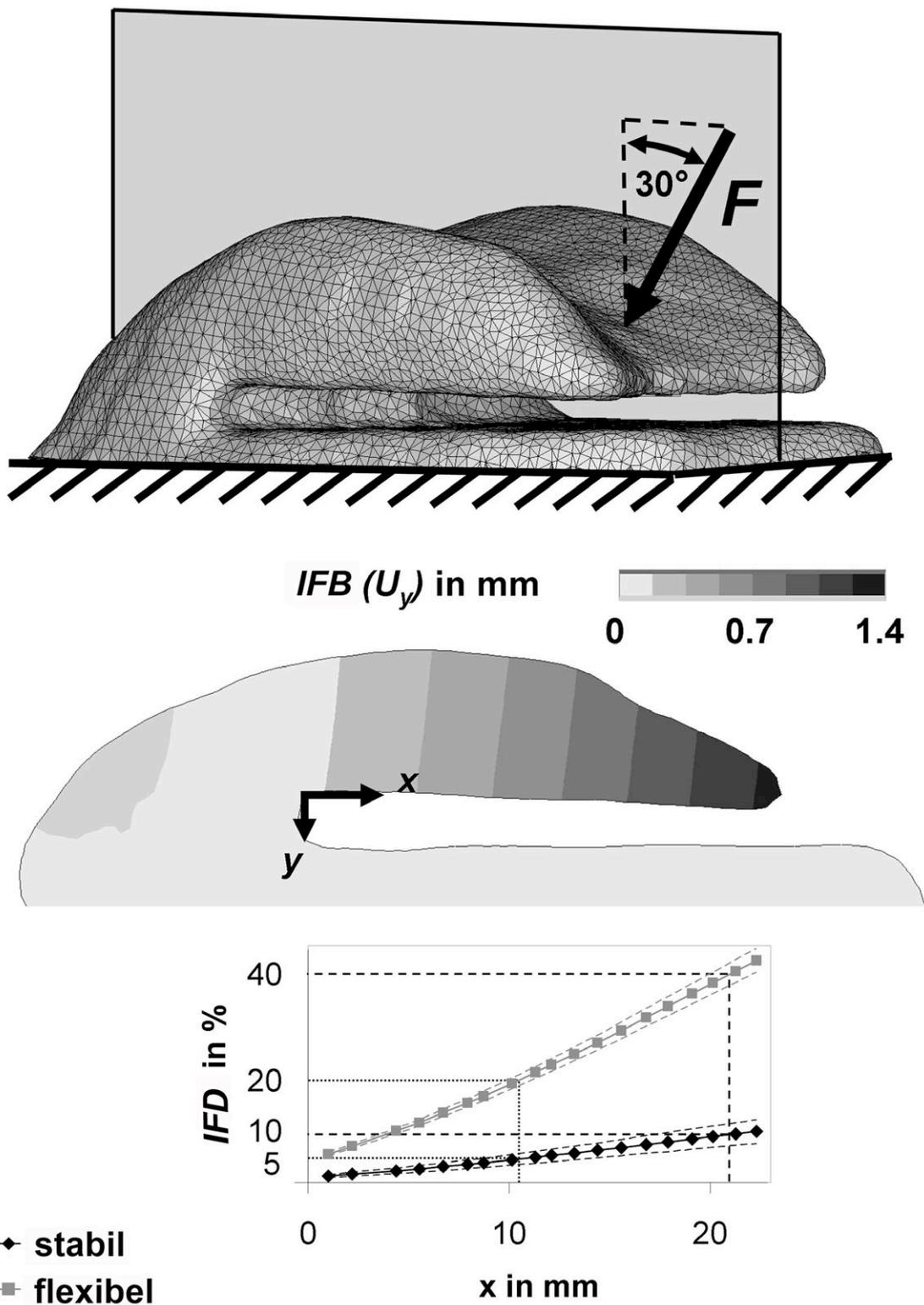


Abb. 67: FE-Modell der interfragmentären Bewegung (IFB) und resultierenden interfragmentären Dehnung (IFD) (y -Achse) über den Verlauf des Osteotomiespalts (3 mm) (x -Achse) unter stabil und flexibel fixierten Bedingungen; der Bereich auf der x -Achse zwischen 0 und 10 mm entspricht der distalen, der Bereich zwischen 10 und 20 mm der proximalen Osteotomiespalthälfte; die gestrichelten Linien geben die möglichen Abweichungen der IFD aufgrund eventueller Unterschiede ($\pm 0,1$ mm) in der Dicke der Bindegewebsschicht um das Implantat an. (Claes et al., 2009).

Unter stabilen Fixationsbedingungen mit IFD von $\leq 5\%$ war die BMD im distalen Osteotomiespalt signifikant geringer als die der flexibel fixierten und der nicht-operierten Tiergruppe. Dieser Befund wurde durch das geringere Auftreten mineralisierter Strukturen in der röntgenologischen und μ -computertomographischen Auswertung sowie der geringen Steifigkeit innerhalb des entsprechenden Spaltbereichs bestätigt. Eine beginnende Knochenneubildung war histologisch überwiegend nahe der bestehenden Knochen trabekel der Osteotomiespaltränder zu erkennen. Ein solches Verhalten wurde bereits in mehreren Studien im diaphysären Bereich beschrieben (Claes et al., 1995b; Sevitt, 1981). Bei den Tieren der stabil fixierten Gruppe stellten sich distal nur wenige dünne Knochenbälkchen, jedoch kein Knorpelgewebe dar, was auf eine verzögerte direkte Knochenheilung hinweist (Abb. 68). Somit wurden die Erkenntnisse bisheriger Studien bestätigt, wonach das Ausbleiben von Knorpelgewebe unter stabilen Bedingungen ein Anzeichen dafür ist, dass Knochenneubildung in der Metaphyse überwiegend verzögert und über desmale Ossifikation verläuft (Draenert und Draenert, 1979; Jarry und Uhthoff, 1971; Schatzker et al., 1989; Uhthoff und Rahn, 1981). Bei der Untersuchung der metaphysären Frakturheilung unter nahezu stabilen Bedingungen an der Tibia nicht-osteoporotischer Ratten konnten eine endostale Kallusheilung festgestellt werden. (Stürmer et al., 2010). Da sowohl das Modell als auch die zur Osteosynthese verwendete Titanplatte biomechanisch nicht charakterisiert waren, konnte eine Fixation der Knochenenden aller Tiere unter vollständig stabilen Bedingungen nicht nachweislich gewährleistet werden. Bei dieser Tierart ist zudem die Metaphyse sehr klein, wodurch sich nur wenige Knochen trabekel im Bereich der Lokalisation der Osteotomie in der proximalen Tibia befinden. Daher scheint es fraglich, ob dieses Modell tatsächlich den spongiösen Knochen repräsentierte. Die geringe Größe des Rattenskelettes ist ein nicht zu vernachlässigender, limitierender Faktor für verschiedene Untersuchungen. Dem gegenüber konnten mittels Fixation einer Osteotomie am Ellbogen von Hunden drei unterschiedliche Stabilitätsgrade erreicht werden. In beiden Studien wurde das unter stabilen Bedingungen im Frakturspalt auftretende Bindegewebe kontinuierlich direkt durch neuen Knochen ersetzt, wobei das Ausbleiben von Knorpelbildung darauf schließen lässt, dass die Heilung desmal ablief. Diese Ergebnisse konnten jedoch wiederum nicht mit den mechanischen Bedingungen innerhalb des Frakturspalts korreliert werden (Schatzker et al., 1989).

Eine IFD im Bereich von weniger als 5 % bewirkt somit eine Unterstimulierung der Knochenneubildung, die umso deutlicher ausfällt, je geringer die IFD ist (Abb. 67). Eine Voraussetzung zur Bildung von Geflechtknochen ist eine geringe IFB, wohingegen sich eine vollständige Ruhigstellung als nicht förderlich für die Heilung einer metaphysären Fraktur herausstellte (Schatzker et al., 1989). Eine absolut stabil fixierte Fraktur hatte kaum Möglichkeit zur Heilung, da die Osteosynthese die Kraftübertragung übernahm und dadurch der Knochen einen zu geringen Reiz zur Heilung erhielt (Stürmer, 1996). Dies wurde auch in Studien anderer Gruppen bestätigt, die bei IFD unterhalb von 50 – 100 $\mu\text{m/m}$ bzw. 0,005 – 0,01 %, in Ausnahmefällen bis zu 0,04 % keine Heilungstendenzen erkennen konnten. Durch diese geringen Dehnungen und der folglich unzureichenden Stimulation zur Knochenneubildung kam es teilweise zur Resorption bestehender Knochenstrukturen (Frost, 2004; Shefelbine et al., 2005). In einer Frakturheilungsstudie an Schafen wurden diese Erkenntnisse mittels verschiedener Fixationen von Kompressionsplatten an der Diaphyse der frakturierten Tibia unterstützt. Auf der der Osteosyntheseplatte gegenüberliegenden Knochenseite war durch die Durchbiegung des Knochens mehr IFD möglich. Dies führte dort zu einem höheren Knochenneubildungsreiz im Vergleich zum Knochen direkt unterhalb der stabil fixierten Platte, der teilweise Resorptionserscheinungen aufwies. In allen Gruppen bildete sich auf der gegenüberliegenden Seite der Osteosynthese schneller und vermehrt transkortikaler Kallus aus und das Remodeling verlief frühzeitiger als auf der Seite der Plattenbefestigung (Stoffel et al., 2000).

Diese Abhängigkeit der Knochenneubildung von einem gewissen Dehnungsreiz konnte vielfach auch am intakten Knochen festgestellt werden. Uthoff et al. stellten dar, dass es bei fehlender IFD aufgrund der Entlastung einer Gliedmaße zu reduzierter Knochenbildung sowie zu vermehrter Knochenresorption und -umbau der trabekulären Oberfläche des diaphysären und des metaphysären Knochens kam (Uthoff und Jaworski, 1978). Dieses Verhalten ließ sich ebenfalls bei vielen, mit lateralen winkelstabilen Osteosynthesen chirurgisch versorgten, metaphysären Frakturen im proximalen Humerus und Tibia und im distalen Femur nachweisen. Hier waren die auf die Fraktur einwirkenden Kräfte hauptsächlich Biegekräfte, welche zu sichtbar mehr Kallusbildung auf der medialen Seite und damit auf der der Osteosynthese gegenüberliegenden Seite des Knochens führten.

In unserer Studie wurden für die Tiere der flexibel fixierten Gruppe im distalen Spaltbereich bereits Dehnungen zwischen 6 und 20 % ermittelt (Abb. 67, Abb. 68). Diese führten zu einer signifikanten Steigerung der Knochenneubildung sowie zu einer höheren Knochen-mineraldichte gegenüber dem Bereich mit geringerer IFD. Schatzker et al. stellten diese verbesserte spongiöse Knochenheilung aufgrund einer geringen frühzeitigen Bewegung im Osteotomiespalt an Ellbogen von Hunden fest. Der Knochen aller Tiere heilte unter diesen Bedingungen sehr gut und ohne zurückbleibende Einschränkungen (Schatzker et al., 1989). In der vorliegenden Studie zeigten die Knochen der flexibel fixierten Schafe im Vergleich zum intakten Knochen zwar eine ähnliche BMD und einen ähnlichen Knochenanteil, ihre Steifigkeit hingegen war erkennbar geringer. Das lässt sich dadurch erklären, dass der neugebildete Knochen aufgrund der unvollständigen Mineralisation in seiner Qualität noch nicht der des intakten Knochens entspricht. Nachgewiesen wurden auch die Bildung verdickter Knochen trabekel sowie das Auftreten von Geflechtknochen vereinzelt Bereiche mit Ansammlungen von Knorpelzellen.

Im gesamten Bereich mit IFD zwischen 6 und 20 % konnte ein deutlicher Knochenumbauprozess festgestellt werden. Dieser war gekennzeichnet durch die, das Knochengewebe abbauenden Osteoklasten im Bereich des Osteotomiespalts und durch den anschließenden Ersatz dieses Gewebes durch in großer Anzahl osteoblastär neugebildete, dichte Knochen trabekel. Bei flexibler Fixation war die Knochenmineraldichte mit der des nicht-operierten Knochens identisch.

Die Ausfüllung des Spaltbereichs mit Geflechtknochen und die Anlagerung von lamellärem Knochen entlang der ursprünglichen spongiösen Trabekel konnte in mehreren Studien bei unterschiedlichen Tierarten belegt werden (Charnley und Baker, 1952; Draenert und Draenert, 1979; Jarry und Uhthoff, 1971; Uhthoff et al., 1987). Auch Stürmer et al. stellten eine Anlagerung von Geflechtknochen in kleinen Hohlräumen und auf Spongiosabälkchen dar, welche dadurch neu vernetzt wurden (Stürmer, 1996). Hieraus entstand eine dichte Knochenstruktur mit dicken Trabekeln, die vielfach als interner knorpeliger Kallus bezeichnet, durch enchondrale Ossifikation zu Knochen umgebaut wurde (Schatzker et al., 1989). Diese Erkenntnisse konnten in der vorliegenden Studie im distalen Spaltbereich der flexibel fixierten Tiere bestätigt werden.

Im proximalen Spaltbereich ergaben sich zwischen beiden Versuchsgruppen keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich deren Knochenmineraldichte sowie dem ermittelten Anteil neugebildeten Knochengewebes. Histologisch konnten in dieser Osteotomiehälfte in beiden Operationsgruppen dicht vernetzte Knochen trabekel mit einer hohen Umbauaktivität dargestellt werden, in denen sich auch Knorpelzellen befanden. Die Knochenheilung verlief folglich über enchondrale Ossifikation. Diese Ergebnisse ließen sich anhand der röntgenologischen und μ -computertomographischen Auswertung beider Gruppen bestätigen. Aufgrund des hohen Knochenanteils, war auch die hohe biomechanische Steifigkeit in beiden Fixationsgruppen erklärbar.

Somit förderte eine wie in der flexibel fixierten Gruppe auftretende IFD von über 20 % die Heilung nicht zusätzlich im Vergleich zur Heilung in der stabil fixierten Gruppe mit IFD zwischen 5 und 10 %. Bei einzelnen flexibel fixierten Tieren war diese hohe IFD die Ursache von Faserknorpelbildungen im proximalen Osteotomiespaltbereich. Unter nicht stabilen Bedingungen bestätigte sich dies bereits in früheren Studien, in welchen sowohl die Bildung von Faserknorpel als auch dessen Umbau zu Knochen über enchondrale Ossifikation nachgewiesen wurde (Jarry und Uthoff, 1971; Schatzker et al., 1989; Uthoff und Rahn, 1981).

Alle operierten Tiere hatten in der proximalen Osteotomiehälfte im Vergleich zu den intakten Kontrollen sowohl eine höhere Knochendichte als auch einen höheren Anteil an neugebildetem Knochen. Weiterhin zeigten sie aufgrund der hohen Umbauaktivität eine vermehrte Bildung von Osteoid und Knorpel. Dies deutete darauf hin, dass unter dieser interfragmentären Stimulation während der frühen Phase der Knochenheilung mehr Knochen gebildet wurde als zur Wiederherstellung der ursprünglichen gesunden Struktur benötigt wird. Beide Vergleichsgruppen waren biomechanisch dennoch ähnlich steif wie der intakte nicht-operierte Knochen. Da die Mineralisierung des neugebildeten Knochens noch unvollständig war, stellt sich dessen Qualität in den ersten Heilungswochen geringer dar als die des intakten Knochengewebes. Deshalb benötigten die operierten Tiere für eine mit dem intakten Knochen vergleichbare Gewebestabilität eine höhere Knochenmenge. Der Knochen musste nachfolgend im Remodelingprozess um- bzw. abgebaut werden, um seine ursprüngliche Knochenstruktur und -stabilität zu erhalten.

Die Menge an Knorpel in der proximalen Spalthälfte war in beiden operierten Gruppen vergleichbar. Der histologisch ausgewertete Anteil an Knorpelgewebe beinhaltet jedoch sowohl das enchondrale Ossifikationsgewebe als auch den gebildeten Faserknorpel. Der in der stabil fixierten Gruppe gefundene Knorpel bestand überwiegend aus enchondralem Gewebe, der der flexibel fixierten Gruppe häufig aus Faserknorpel. Faserknorpel wurde nur bei IFD-Werten von über 20 % in größerer Menge gebildet, die in der stabilen Gruppe nicht auftraten. Obwohl auch in der flexiblen Gruppe eine große Menge an neugebildetem Knochen dargestellt werden konnte, deutet der zunehmende Anteil an Faserknorpel darauf hin, dass hier eine kritische IFD erreicht wird, welche die knöcherne Überbrückung und dadurch die Heilung des Osteotomiespalts verzögert.

Diese Ergebnisse stimmen sowohl mit Beobachtungen an der Tibia des Menschen als auch an der des Hundes überein, die in Bereichen mit höherer IFB enchondral heilten und Faserknorpelbildung aufwiesen (Charnley und Baker, 1952; Draenert und Draenert, 1979). Die verringerte Menge an Knochen zugunsten von Faserknorpel im Osteotomiespalt mit einer höheren axialen IFB bestätigt sich durch die Ergebnisse früherer Studien. Hier wurde bei einer IFD von 9 % verglichen mit einer IFD von 32 % nahezu kein und daher signifikant weniger Faserknorpel gebildet (Claes et al., 1997; Claes et al., 2002a). In einem Modell am Schaf wurde ein 2 mm breiter diaphysärer Osteotomiespalt erstellt und dessen Heilung unter Berücksichtigung der IFD berechnet. Hierbei konnte bestätigt werden, dass in Bereichen mit mehr als 30 % IFD keine neue Knochenbildung mehr stattfand (Hente et al., 1991). Spongiöse Frakturen dürfen nicht zu flexibel fixiert werden, da sie unter diesen Bedingungen zu bindegewebiger Abdeckelung und Pseudarthrosebildung neigen. Wenn sich zwischen den Fraktarenden eine bindegewebige Grenzfläche gebildet hat, kann die Frakturheilung in der Regel auch über eine sekundäre Stabilisierung nicht mehr erreicht werden (Stürmer, 1996).

In beiden Fixationsgruppen konnten somit signifikante Unterschiede in der Zusammensetzung des im Osteotomiespalt neu gebildeten Gewebes zwischen distaler und proximaler Osteotomiespalthälfte radiologisch, computertomographisch, biomechanisch und histologisch bestätigt werden. Diese Ergebnisse stellen dar, dass das Ausmaß der IFD den Ablauf der metaphysären Frakturheilung maßgeblich

beeinflusst. Unterschiedliche Bereiche IFD können zu unterschiedlichen Heilungssituationen führen, wobei eine hohe Dehnung den Knochenneubuildungsreiz fördert, während zu geringe Dehnungen diesen Reiz nicht auslösen können. Diese Situation entspricht den, für die Knochenheilung des diaphysären Knochens hinsichtlich mechanischer Belastung bereits bekannten Erkenntnissen. Bei Dehnungen von mehr als 6 % besitzt der neugebildete Knochen im Osteotomiespalt eine höhere Knochendichte und dickere Knochen trabekel als der gesunde, nicht-operierte Knochen der contra-lateralen Femurkondyle. Es zeigte sich hingegen in Bereichen mit geringeren Gewebedehnungen $< 6\%$ wie in der distalen stabilen Spalthälfte, im Vergleich zu Bereichen mit höheren Gewebedehnungen eine geringere BMD sowie weniger Knochenaufbau und Osteoid (Abb. 68).

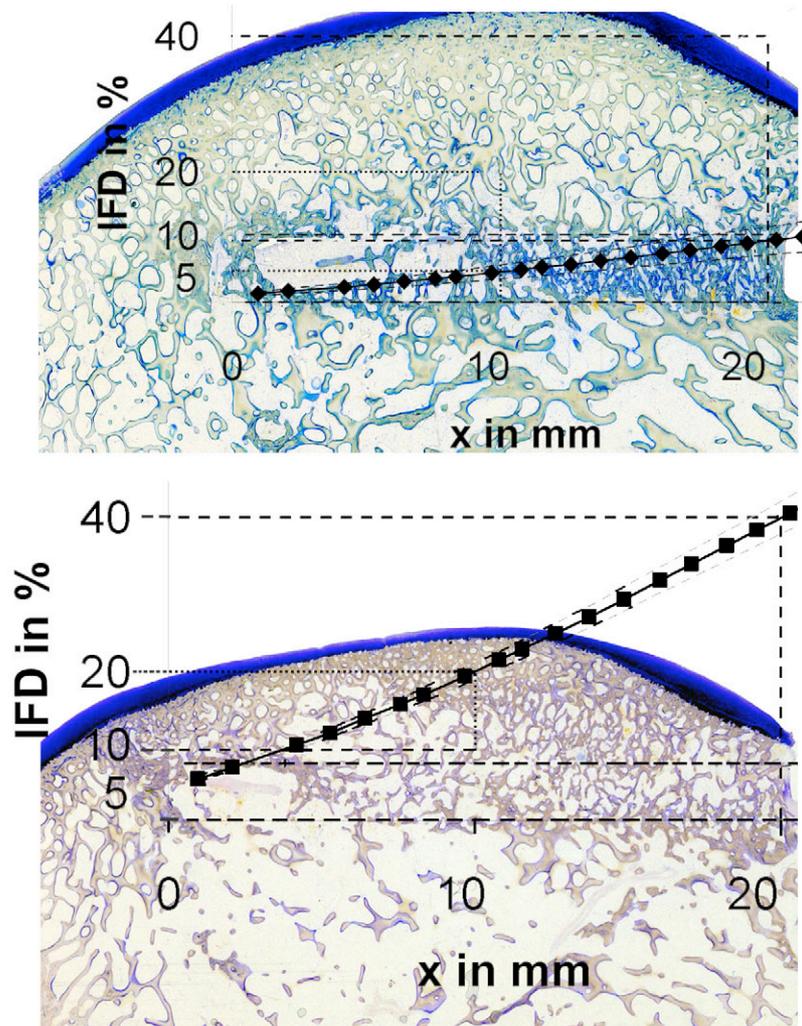


Abb. 68: Darstellung des Dehnungsverlaufs im Osteotomiespalt: oben stabil fixiert, unten flexibel fixiert; im distalen Spaltbereich geringere IFD und weniger Knochenneubildung, im proximalen Spaltbereich deutlicher Knochen- und Knochenanbau.

Vergleicht man diese Bereiche der IFD im metaphysären Knochen mit den Dehnungsbereichen der diaphysären Heilung, ist deutlich erkennbar, dass die metaphysäre Heilung nach ähnlichen Regeln verläuft. Unter stabiler Fixation einer diaphysären Fraktur mithilfe von z.B. der Plattenosteosynthese verlief die Knochenheilung über die Auffüllung des Frakturspalts mit lamellärem Knochen. Dabei heilte der Knochen schnell über desmale Ossifikation unter geringer Ausbildung von Kallusgewebe (Claes et al., 2003; Perren, 1979). Eine Studie von Hente beschäftigte sich mit der Dehnungsverteilung innerhalb einer diaphysären Osteotomie der Schafstibia (Hente et al., 1991). Diese zeigte bei interfragmentären Dehnungsbereichen bis zu 20 % eine gute Verknöcherung und Mineralisierung der Knochenheilung. Bei der diaphysären Knochenheilung unter flexiblen Fixationsbedingungen und höheren IFD von > 20 % kam es zu einer starken Zunahme an Gewebe und zur Ausbildung eines großen Frakturkallus mit einem hohen Knochenanteil (Claes et al., 1997; Goodship und Kenwright, 1985; McKibbin, 1978). Bestehende Faserknorpelbanden zwischen den Fragmenten konnten eine knöcherne Überbrückung und dadurch eine Heilung des Knochens verzögern (Epari et al., 2006). In einer Vielzahl von Studien an der Diaphyse von Schafen konnte bestätigt werden, dass eine große IFB und folglich eine große IFD im Frakturgebiet bereits unabhängig von Art und Bewegungsrichtung der Kräfte in der Lage ist, die Frakturheilung zu be- oder sogar zu verhindern (Claes et al., 2000b; Kenwright und Goodship, 1989; Klein et al., 2003; Schenk et al., 1968).

In einer früheren Studie unseres Institutes wurde die Gewebedifferenzierung im Verlauf der diaphysären Knochenheilung untersucht. Es konnte dabei nachgewiesen werden, dass die Art der Knochenheilung im diaphysären Bereich von der interfragmentären Dehnung und dem hydrostatischen Druck abhängt. Erstmals wurden für diese beiden Einflüsse Wertebereiche definiert (Claes und Heigele, 1999). Die Knochenheilung in diaphysären Bereichen mit bis zu 5 % IFD verläuft dieser Dehnungshypothese nach über den Weg der desmalen Ossifikation. Diese Erkenntnisse lassen sich für die metaphysäre Heilung unter entsprechenden interfragmentären Dehnungsbereichen bestätigen. Für interfragmentäre Dehnungsbereiche von bis zu 15 % findet die diaphysäre Heilung über enchondrale Ossifikation statt (Claes und Heigele, 1999). Diese Erkenntnisse stimmen ebenfalls mit dem dargestellten Verlauf der Knochenheilung in der Metaphyse überein.

Für Bereich mit IFD über 15 % wird in der Diaphyse eine Heilung über die Bildung von Faserknorpel oder Bindegewebe angenommen. In der vorliegenden Studie zur metaphysären Heilung konnte bei IFD über 20 % eine Bildung von Faserknorpel, nicht jedoch von Bindegewebe beobachtet werden. Das kann möglicherweise auf die Tatsache zurückgeführt werden, dass das Heilungsgebiet von trabekulärem Knochen umgeben ist. Dieser bietet mit seiner aktiven großen Knochenoberfläche eine hohe Dichte an Vorläuferzellen sowie eine bessere Blutversorgung.

In der Umgebung des Osteotomiespalts zeigten sich teilweise an verschiedenen Lokalisationen deutliche Unterschiede zwischen den drei verglichenen Tiergruppen bezüglich der Struktur des metaphysären Knochens in den Bereichen oberhalb und unterhalb des Osteotomiespalts. Oberhalb der Osteotomie in der Nähe der Gelenkfläche sowie der Kortikalis waren bei allen Schafen die BMD, die Steifigkeit und der Anteil an trabekulärem Knochengewebe am höchsten. Anatomiebedingt verringerten sich diese Werte mit dem Abstand zur Oberfläche in Richtung des diaphysären Markraums.

Im Bereich zwischen distaler Osteotomie und darüberliegender kortikaler patellofemorale Gleitfläche wies der metaphysäre Knochen der flexibel fixierten Tiergruppe eine signifikant höhere BMD, sowie signifikant mehr Knochengewebe mit einer entsprechend höheren Steifigkeit auf als die beiden anderen Gruppen. Der entsprechende Knochenbereich der stabil fixierten Gruppe hatte sowohl dieselbe BMD und denselben Knochenanteil als auch eine entsprechende Steifigkeit, verglichen mit dem intakten Knochen. Die Werte in diesem Gebiet stimmten mit Ergebnissen aus Untersuchungen am trabekulären Knochen der Tibia gesunder, unbehandelter Schafe überein (Augat, 2003b). Oberhalb des proximalen Spaltbereichs und entlang des gesamten Knochenverlaufs unterhalb des Osteotomiespalts zur Diaphyse hin konnten zwischen den drei Gruppen keinerlei Unterschiede festgestellt werden.

Diese Erkenntnisse stimmen mit den Beobachtungen überein, die Knochen als biologisch reaktives Gewebe erkannten, welches durch Umbau der Knochenmasse seine Struktur der Funktion anpasst. Der trabekuläre Knochen erfuhr durch die Durchbiegung des Osteotomiespalts in diesem Bereich eine vermehrte mechanische

Belastung und reagierte mit gesteigerter Aktivität und Knochenneubildung. Dieses Prinzip gilt überwiegend für die Spongiosa, bei welcher es erstmals nachgewiesen und verifiziert werden konnte. Dabei konnte bestätigt werden, dass eine Änderung der mechanischen Belastung des Knochens eine Umformung seiner inneren Architektur zur Folge hat (Culmann, 1866; Wolff, 1892). Behrens et al. stellten dar, dass spongiöser Knochen auf Belastung mit Remodeling reagiert, was zu einem deutlichen Unterschied der Steifigkeit zwischen belastetem und unbelastetem Knochen führt. Dabei besteht nicht nur ein Zusammenhang zwischen der Knochensteifigkeit und Größe der einwirkenden Belastung, sondern auch bezüglich Dauer und Häufigkeit dieser Belastung. Höhere Kraftereinwirkung auf eine in direktem Kontakt zum spongiösen Knochen stehende Fläche, beeinflusst direkt dessen Steifigkeit (Behrens et al., 1974). Die Struktur des metaphysären Knochens erlaubt es den Trabekeln, sich aufgrund ihrer relativ großen Oberfläche im Verhältnis zum Volumenanteil schnell umzubauen und sich den mechanischen Gegebenheiten dadurch anzupassen (Perren, 1992).

Eine Limitation der vorliegenden Studie ist die relativ geringe Anzahl der herangezogenen Schafe. Auf die statistische Testung verschiedener Ergebnisse wurden daher teilweise verzichtet. Abgesehen von der Anzahl der Tiere stellten sich die Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen jedoch sehr deutlich dar, weshalb von der Operation weiterer Schafe abgesehen wurde.

Eine weitere Einschränkung ist die Tatsache, dass der Dehnungsverlauf innerhalb des Frakturspalts im trabekulären Knochen nicht konstant und somit nicht genau bestimmbar ist. Die IFD verhält sich an jeder Lokalisation im Spalt anders, wodurch nur eine in Dehnungsbereiche zusammengefasste Darstellung möglich ist. Hierdurch kann der optimale Wert für die interfragmentäre Dehnung zwar nicht exakt ermittelt, aber dennoch eingegrenzt werden. Dadurch ist es möglich, die Dehnungsbereiche mit den unterschiedlichen Heilungsverläufen zu korrelieren.

Die histologischen und radiologischen Ergebnisse zeigen, dass eine Bindegewebsschicht mit knapp 0,4 mm Dicke an der Berührungsfläche des Knochens mit dem die interfragmentäre Bewegung eingrenzenden Stahlimplantat gebildet wurde. Die Bildung von Bindegewebe an einer mechanisch nicht stabilen Berührungs- oder Grenzfläche ist ein bereits aus der Literatur bekanntes Phänomen

und geschieht frühzeitig in den ersten Wochen nach der Implantation (Soballe et al., 1992). Es wurde bereits durch verschiedene Autoren an unterschiedlichen Tierarten und Lokalisationen beschrieben und gilt als Reaktion des Knochens auf Grenzflächenbewegungen zwischen Knochen und Implantat (Claes et al., 1981; Matter et al., 1974; Perren, 1992; Sarmiento et al., 1980). Bedingt durch auftretende zyklischen Belastungen und Bewegungen im Mikrometerbereich kommt es zu osteoresorptiven Modifikationen zwischen Implantat und Knochen oder zwischen Knochen und Knochen (Ganz et al., 1975). Diese Knochenresorption in der Kontaktzone zwischen Implantat und Knochen bewirkt meist eine Erhöhung der vorliegenden interfragmentären Dehnungen. Die Auswertung der etablierten Methode der Fluoreszenzmarkierung (Milch et al., 1958; Rahn et al., 1980; Suzuki und Mathews, 1966; Tam und Anderson, 1980) ergab, dass im Osteotomiespalt bereits vier Wochen post OP nach Gabe von Calceingrün vor allem in der flexiblen Versuchsgruppe deutlich fluoreszierendes Gewebe eingelagert wurde. Der meiste den Osteotomiespalt stabilisierende Knochen wurde etwa sechs Wochen post OP gebildet und mittels Tetrazyklin dargestellt. Dieser Zeitpunkt wird in einer weiteren Studie an der ovinen Tibia bestätigt, wo die knöcherne Überbrückung ebenfalls nach einer Versuchsdauer von sechs Wochen stattfand (Stürmer, 1987). Daher kann davon ausgegangen werden, dass die bindegewebige Schicht im Bereich des Implantates die IFB während der Knochenheilung beeinflusst hat, was wiederum bei der Berechnung der IFD berücksichtigt wurde. Daher wäre es in weiterführenden Studien von Nutzen, eine Fixation der Implantate zu ermitteln, die keinerlei Bewegungen erlaubt.

Um die Auswirkung der mechanischen Einflüsse außerhalb der beiden bisherigen Fixationsbedingungen detaillierter zu untersuchen, besteht die Möglichkeit die interfragmentären Bedingungen und Dehnungsbereiche zu variieren.

Aufgrund des asynchronen zeitlichen Ablaufs der Frakturheilung und der währenddessen ablaufenden Umbauprozesse, konnte die Heilung mit nur einem Tötungszeitpunkt nicht ausreichend und zeitlich lokalisiert untersucht werden. Dadurch, dass sich ein Teil des neugebildeten Knorpel- oder Knochengewebes möglicherweise zum Ende der Studie nach acht Wochen bereits im Remodelingprozess befand oder schon umgebaut wurde, stellt dieser Zustand nur

eine Momentaufnahme dar. Bei den Tieren der stabil fixierten Gruppe wäre es zudem interessant zu wissen, ob und wann die im distalen Spaltbereich mit geringer IFD vorliegende verzögerte Heilung tatsächlich durch Knochengewebe überbrückt wird. Für weiterführende Studien wäre es von großem Interesse, den Heilungszustand zu unterschiedlichen Zeitpunkten zu untersuchen, wofür jedoch eine Vielzahl an Tieren notwendig ist. Bei der Übertragung der Ergebnisse auf den Menschen muss immer berücksichtigt werden, dass die durchgeführte Osteotomie nicht denselben Bedingungen entspricht, wie eine im klinischen Alltag auftretende metaphysäre Fraktur. Dort wäre die Situation deutlich komplexer und destruktiver für den Knochen und das umgebende Gewebe.

4.3 Chancen des Verfahrens und Ausblick

Studien zur Frakturheilung haben gezeigt, dass der Heilungsverlauf des Knochens maßgeblich von biologischen und biomechanischen Faktoren beeinflusst wird. Bei der Erforschung mechanischer Einflüsse auf den metaphysären Knochen bestehen jedoch noch viele offene Fragen.

Ein geeignetes Tiermodell unterstützt dabei die Untersuchung von Mechanismen und mechanischen Eigenschaften im Verlauf der Frakturheilung des metaphysären Knochens. Diese Erkenntnisse besitzen vor allem für Patienten mit osteoporotisch bedingten Frakturen eine große Bedeutung. Da Osteoporose und deren Folgen eine überwiegend bei Menschen auftretende systemische Erkrankung ist, sind Forschungen nach Therapie- und Präventionsmaßnahmen durch ethische Vorgaben und mangels homogener humaner Studiengruppen stark eingeschränkt. Aus diesem Grund besteht vermehrt Bedarf an einem Modell im Großtier mit strukturellen Bedingungen sowie Knochendimensionen, die mit den Gegebenheiten im Menschen vergleichbar und für Frakturheilungsstudien geeignet sind.

Alle bisherigen metaphysären Modelle waren biomechanisch weder charakterisiert noch standardisiert und wurden überwiegend im metaphysären Knochen von Kleintieren durchgeführt.

Operative Eingriffe an den dabei meist genutzten Tierarten Maus und Ratte sind jedoch mit Schwierigkeiten verbunden. Aufgrund der geringen Größe der Tiere sind die skelettalen Komponenten für chirurgische Intervention nur eingeschränkt zugänglich und verwendbar. Die Metaphyse ist in den Knochen dieser Tierarten zum einen sehr gering ausgeprägt, zum anderen nur schwer abgrenzbar. Es kommt daher zu großen Schwankungsbreiten der Ergebnisse, welche aufgrund dessen nur bedingt aussagekräftig sind.

Es besteht ein sehr großer Bedarf an einem besser geeigneten Großtiermodell zur Untersuchung der metaphysären Frakturheilung. Durch die Entwicklung und Etablierung eines solchen Modells mit kontrollierbaren mechanischen Eigenschaften besteht nun die Möglichkeit ausschließlich und gezielt die biologischen Faktoren zu verändern. Dadurch begrenzt man den Rahmen der möglichen Einflussfaktoren auf die Frakturheilung und kann sich selektiv der Untersuchung einzelner Parameter widmen. Somit bietet dieses Modell hervorragende Voraussetzungen um die Untersuchung der metaphysären Frakturheilung zu erleichtern. Durch eine geringere Anzahl an Variablen wird der Bedarf an Studien sowie unterschiedlichen Modellen und folglich an Tierversuchen deutlich eingeschränkt. Für komplexe klinische metaphysäre Frakturen bedarf es weiterführender Untersuchungen und gegebenenfalls Modifikationen des vorliegenden Modells. Es besteht zudem die Möglichkeit anhand dieses Tiermodells eine Verlaufsuntersuchung in regelmäßigen Abständen durchzuführen. Dadurch kann die Heilung in ihren einzelnen Phasen auf verschiedenen Ebenen und zu beliebigen Zeitpunkten nachvollzogen werden.

Die Versorgung einer metaphysären Fraktur mittels Osteosynthese stellt hohe Anforderungen an Technik und Material. Durch die häufig vorkommende, osteoporosebedingt geringere Knochendichte sowie schlechtere Knochenstruktur hält der Knochen nur geringen Belastungen stand. Osteoporotischer, metaphysärer Knochen hat eine deutlich reduzierte Festigkeit und biomechanisch schlechte Materialeigenschaften. Dies ist vor allem ein Problem bei der Verankerung von Implantaten in diesem Knochengebiet, deren Versagen bisher nur unzureichend verhindert werden kann.

In weiterführenden Studien kann mithilfe des hier entwickelten charakterisierten und standardisierten Großtiermodells untersucht werden, inwiefern beim Vorliegen einer Osteoporose der Verlauf der metaphysären Knochenheilung sowie deren mechanische Randbedingungen verändert sind. Dazu können sowohl osteoporotische Schafe als auch osteoporotische Schweine dienen, auf deren knöchernen Gegebenheiten die in der vorliegenden Studie entwickelte Methode übertragen werden kann.

Neben der Möglichkeit die metaphysäre Frakturheilung auch im Hinblick auf Osteoporose zu verbessern, können mittels des hier entwickelten Modells erstmals neue oder verbesserte pharmakologische Substanzen sowie unterschiedliche Behandlungsmöglichkeiten bei Osteoporose und dadurch hervorgerufenen Frakturen untersucht werden. Diese Erkenntnisse stellen für viele Betroffenen eine große Chance auf ein verbessertes Leben ohne erkrankungsbedingte Einschränkungen und Konsequenzen dar.

5 Zusammenfassung

Die Frakturheilung im diaphysären Knochen wird maßgeblich von ihrer biomechanischen Umgebung beeinflusst. Ein Großteil der klinisch auftretenden Frakturen befindet sich jedoch im spongiösen Knochen der Metaphyse. Trotz ihrer vor allem bei Osteoporosepatienten herausragenden Relevanz wurde der metaphysären Frakturheilung bisher nur wenig Interesse geschenkt und ihr Verlauf kaum erforscht. Zudem fehlen Studien, die die biomechanischen Effekte auf die Knochenheilung in diesem Gebiet berücksichtigen. Aus diesem Grund war es das Ziel dieser Arbeit, erstmals ein definiertes und mechanisch charakterisiertes Modell im Großtier zu entwickeln, an welchem der Einfluss von interfragmentärer Bewegung und Dehnung auf die metaphysäre Knochenheilung untersucht werden konnte.

Dies wurde unter reproduzierbaren Bedingungen mittels einer gut standardisierten im Verlauf der Studie neuentwickelten Methodik durchgeführt. Dazu wurde eine partielle 3 mm breite Osteotomie in der rechten distalen Femurkondyle von zwölf adulten, weiblichen Schwarzkopfschafen erstellt. Dort übt die Patella bei physiologischer Gliedmaßenbelastung eine Kraft auf die Trochlea aus, die zu einer Durchbiegung des Osteotomiespalts führt. Die daraus resultierende interfragmentäre Dehnung im Spalt beträgt abhängig von Lokalisation und Fixationsmethode bis zu 40 %. Sie wurde durch ein Stahlimplantat mit 3 mm (stabile Fixation) bzw. 2 mm Dicke (flexible Fixation) eingegrenzt. Acht Wochen nach der Operation fand am explantierten Knochen die computertomographische, histomorphologische und biomechanische Auswertung statt.

In metaphysären Osteotomieregionen mit sehr kleinen interfragmentären Dehnungen < 6 % bildet sich signifikant weniger geheilter Knochen als bei höheren Gewebedehnungen. Die Knochenheilung läuft verzögert und überwiegend über desmale Ossifikation ab. Für Frakturzonen mit höheren Dehnungen im Bereich zwischen 6 und 20 % stellt sich hingegen eine verbesserte Knochenheilung mit mehr neugebildetem Knochen und sowohl desmaler als auch enchondraler Ossifikation dar. Interfragmentäre Dehnungen über 20 % führen zu keiner weiteren Verbesserung der metaphysären Heilung.

In dieser Höhe verursacht IFD stattdessen in einigen Fällen die Entwicklung von fibrösem Gewebe und Faserknorpel im Osteotomiespalt, was zu einer Heilungsverzögerung des Knochens führen kann. Kein Tier beider Fixationsgruppen zeigt metaphysär eine für diaphysäre Knochenbereiche unter interfragmentärer Bewegung typische externe periostale Kallusbildung.

Die Dehnungsbereiche aus welchen eine desmale bzw. enchondrale Ossifikation resultiert, sind in ihrer Größenordnung mit denen der diaphysären Heilung vergleichbar. In der Diaphyse führen interfragmentäre Dehnungen unterhalb von 5 % zu desmaler Ossifikation und Werte zwischen 5 und 15 % zu enchondraler Ossifikation. Interfragmentäre Dehnungen von mehr als 15 % verzögern die Heilung des Knochens oder verhindern diese vollständig.

Die Frakturheilung im spongiösen Knochen folgt somit ähnlichen biomechanischen Gesetzmäßigkeiten, wie sie für den kortikalen Knochen beschrieben sind. Damit kann belegt werden, dass auch im metaphysären Knochen Dehnungen unterschiedlicher Größe unterschiedliche Heilungsmuster induzieren.

Anhand des entwickelten Großtiermodells besteht nun in Zukunft die Möglichkeit, die Heilung des metaphysären Knochens eingehender zu erforschen. Hierdurch können grundlegende Erkenntnisse und klinisch wichtige Fragestellungen sowie die Frakturheilung im osteoporotischen metaphysären Knochen besser verstanden werden. Dieses Großtiermodell bietet zudem zum ersten Mal die Möglichkeit, den Erfolg verschiedener Therapiemaßnahmen sowie pharmazeutischer Wirkstoffe am metaphysären Knochen unter definierten biomechanischen Bedingungen zu untersuchen und auf die Gegebenheiten im Menschen zu übertragen.

6 Summary

It is generally supposed that the pattern of fracture healing in trabecular metaphyseal bone differs from that of diaphyseal fractures. However, even though clinically many fractures occur in metaphyseal bone, to date only few experimental studies have been performed and there is not much knowledge about the bone healing in this region. Particularly, the influence of biomechanical factors has not yet been investigated under standardized conditions. Our aim was to correlate the interfragmentary strain with the bone healing outcome in a controlled metaphyseal fracture model in sheep.

Twelve mature sheep received a partial 3 mm osteotomy in the distal femoral condyle close to the trochlea. The determination of the interfragmentary strain by in vivo x-ray analyses and a finite element model revealed that the deflection of the osteotomy gap by the patello-femoral force during walking provoked increasing strains of up to 40 %. This interfragmentary movement in the gap was limited by a steel implant of 3 mm thickness (stable group; n = 6) and 2 mm thickness (flexible group; n = 6) fixed in the proximal region of the osteotomy. Bone healing was evaluated after 8 weeks by the assessment of the bone mineral density, biomechanical indentation testing and by quantitative undecalcified bone histomorphometry in regions of interest that displayed differing magnitudes of interfragmentary strain.

In areas with strains below 5 % significantly less bone formation occurred compared to areas with higher strains (6 – 20 %). For strains larger than 20 % fibrocartilage layers were observed. Low interfragmentary strain (< 5 %) led to intramembranous bone formation, whereas higher strains additionally provoked endochondral ossification or fibrocartilage formation. It is therefore proposed that metaphyseal bone healing follows similar biomechanical principles as diaphyseal healing.

7 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Desmale Osteogenese im Stirnbein eines Menschen, Paragon-Färbung. 200-fache Vergrößerung; (Quelle: UFB).....	6
Abb. 2: Chondrale Osteogenese mit Bildung von Knorpelgewebe und Umbau zu Knochen im Femur eines Schafes, Paragon-Färbung. 100-fache Vergrößerung; (Quelle: UFB).....	6
Abb. 3: Längsschnitt durch einen Röhrenknochen (Femur); schematischer Aufbau des Knochens in die drei Bereiche: Diaphyse, Metaphyse und Epiphyse mit ihren jeweiligen kortikalen und spongiösen Strukturen.....	7
Abb. 4: Geflechtknochen, Femur Schaf. 100-fache Vergrößerung; (Quelle: UFB).....	9
Abb. 5: Lamellenknochen mit Osteonen aus konzentrisch angeordneten Lamellen und Haversschen Kanälen in deren Mitte, Femur Ratte. 200-fache Vergrößerung; (Quelle: UFB).....	9
Abb. 6: Die Knochenneubildung bei einer diaphysären Fraktur beginnt frakturfern mit desmaler Knochenneubildung (D) und geht in Richtung zur Frakturspaltmitte hin in eine enchondrale Knochenneubildung (E) über. Wenn der Kallus peripher knöchern überbrückt ist, kann die eigentliche Fraktur heilen (Claes, 2006).....	15
Abb. 7: Diaphysäre Fraktur einer Rattentibia im histologischen Schnittbild mit Kallusbildung oberhalb und unterhalb des mittig liegenden Frakturspalts, Paragon-Färbung; (Quelle: UFB).	15
Abb. 8: Schema der zu erwartenden Gewebedifferenzierung in Abhängigkeit von den im Frakturgebiet wirkenden Kräften (Abszisse: Hydrostatischer Druck in MPa; Ordinate: Dehnung in %) (Claes und Heigele, 1999).	20
Abb. 9: Metaphysäres Frakturmodell in der Femurkondyle des Schafes: die Kräfte des proximal an der Patella wirkenden M. quadriceps F_Q sowie der distal an der Patella ansetzenden Patellarsehne F_{PT} bewirken unter Belastung der Gliedmaße eine resultierende Retropatellarkraft F_R ; diese Kraft F_R führt zur Durchbiegung des Knochenreststückes und bewirkt innerhalb des Osteotomiespalts interfragmentäre Dehnungen.	31
Abb. 10: Markierung des Hautschnittes.....	34
Abb. 11: Darstellung der freiliegenden rechten Femurkondyle nach Zugang.....	34
Abb. 12: Setzen des ersten Spickdrahtes parallel zur Femurkondyle als Orientierung für die weiteren Schritte bei der Anbringung der Sägelehre.....	34
Abb. 13: Aufsicht auf die fixierte Sägelehre.....	34
Abb. 14: Sägen des Osteotomiespalts durch die rechte Femurkondyle mittels oszillierender Säge und Sägelehre.....	36

Abb. 15: Seitliche Ansicht des Osteotomiespalts ohne Implantat.....	36
Abb. 16: Implantate mit einer Dicke von 2 mm (vorn) und 3 mm (hinten).	36
Abb. 17: Osteotomiespalt mit eingesetztem 2 mm - Implantat im proximalen Spaltbereich.....	36
Abb. 18: Der Schrittzähler wurde zur Messung der Aktivität am Metatarsus des Schafes befestigt.	38
Abb. 19: Schaf über EMED-Plattform laufend (Plattform zum Schutz in weißes Tuch gepackt, das die Messung nicht beeinflusst).	39
Abb. 20: EMED-Gangmessplattform (610 x 320 mm ²); die schwarze Fläche ist die Sensorfläche (240 x 380 mm ²).	39
Abb. 21: Sägeschnitt (blaue Linie) durch die Femurotrochlea zur weiteren Verarbeitung des Präparates.....	40
Abb. 22: Schematische Darstellung der Schnittebenen der pQCT-Messung; links: Faxitronaufnahme Femurkondyle Im.; rechts: Aufsicht von cranial auf Femurkondyle; Querschnitt 1 und 2 befinden sich in der distalen, 3 und 4 in der proximalen Spalthälfte; gemessen wurde von distal nach proximal (Pfeil).	42
Abb. 23: pCT-Röhre mit zentral positioniertem Präparat auf der Justier-Acrylglasschiene.....	42
Abb. 24: Darstellung der drei für die Auswertung herangezogen ROIs an einem Querschnitt der Femurkondyle.	42
Abb. 25: Schnittschema zur Teilung der Femurkondyle in zwei gleiche Hälften; zur biomechanischen Testung aus der lateralen (links), zur histologischen Auswertung aus der medialen Hälfte (rechts).....	43
Abb. 26: Schematische Darstellung des Versuchsaufbaus für die biomechanische Eindrücktstung.....	44
Abb. 27: Fotografische Darstellung des Versuchsaufbaus der Eindrücktstung....	44
Abb. 28: Kraft-Weg-Kurve zur Ermittlung der Steifigkeit des Materials aus der Steigung der Kurve; Abszisse: Länge (L) in mm; Ordinate: Kraft (F) in N.	45
Abb. 29 (oben): Schema der Druckpunkte innerhalb des Osteotomiespalts (Defektbereich D); drei Messpunkte liegen in der distalen, drei in der proximalen Spalthälfte.....	46
Abb. 30 (rechts): 3 mm Knochenscheibe liegt plan auf der Druckplatte – die markierten Druckmesspunkte wurden zur Bestimmung ihrer Steifigkeit nacheinander mit einem Stempel (ø 1,5 mm) gedrückt.....	46

Abb. 31: Schema der Druckpunkte aller Druckbereiche (oben) und deren Lage in der Femurkondyle (rechts):	47
Abb. 32: Schematische Darstellung des Punktezählverfahrens mit Angabe der sechs unterschiedlichen Bereiche; NetZRaster liegt exemplarisch in einem Ausschnitt eines histologischen Schnittes (nicht maßstabsgetreu).	50
Abb. 33: Schematische Darstellung eines Bereichs innerhalb des Osteotomiespalt unter fluoreszierendem Licht; die grünen Banden repräsentieren das in der vierten Woche post OP injizierte Calceingrün, die roten Banden das in der sechsten Woche injizierte Tetrazyklin.	51
Abb. 34: Röntgenbilder von Schafen der stabil (a) und flexibel (b / c) fixierten Operationsgruppe –	53
Abb. 35: Aktivitätsmessung prae OP und post OP (stabil / flexibel jeweils n = 4).	54
Abb. 36: Bodenreaktionskraftmessung der rechten operierten Hintergliedmaße bezogen auf die prae OP-Werte (stabil / flexibel jeweils n = 4).	55
Abb. 37: Prae und post OP-Messungen bezogen auf das Körpergewicht des jeweiligen Tieres; Mittelwerte aller gemessenen Tiere aus beiden Operationsgruppen (n = 8).	56
Abb. 38: Präparation eines Femurs der stabil fixierten Versuchsgruppe (S 88); Ansicht von medial.....	57
Abb. 39: Knochenscheibe aus dem Osteotomiebereich eines flexibel fixierten Schafes (S 876); der leere Bereich entspricht der Lage des Implantates, links davon verläuft der Osteotomiespalt mit neugebildetem Gewebe.	57
Abb. 40: Faxitron-Kontaktröntgenbild (l.m.) post mortem, Femur eines stabil fixierten Tieres (S 88) nach Entfernung des Implantates.	58
Abb. 41: Faxitron-Kontaktröntgenbild (l.m.) post mortem, Femur eines flexibel fixierten Tieres (S 77) mit einem 2 mm-Implantat.	58
Abb. 42: Faxitron-Kontaktröntgenbild (l.m.) einer Knochenscheibe aus dem Osteotomiebereich eines Schafes der stabil fixierten Gruppe (S 86).	58
Abb. 43: Faxitron-Kontaktröntgenbild (l.m.) einer Knochenscheibe aus dem Osteotomiebereich eines Schafes der flexibel fixierten Gruppe (S 14).	58
Abb. 44: Knochenmineraldichte in mg/ccm im Osteotomiespalt (ROI _{Spalt}); vier Scan Ebenen von distal nach proximal (stabil n = 6, flexibel n = 5, contra-lateral n = 8); * = p ≤ 0,05.	60
Abb. 45: Knochenmineraldichte in mg/ccm im Osteotomiespalt (ROI _{Spalt}); je zwei Scan Ebenen in einen Bereich zusammengefasst (stabil n = 6, flexibel n = 5, contra-lateral n = 8); * = p ≤ 0,05.	61

- Abb. 46: Knochenmineraldichte in mg/ccm oberhalb des Osteotomiespalts (ROI_{oben}); vier Scan Ebenen von distal nach proximal (stabil n = 6, flexibel n = 5, contra-lateral n = 8); * = $p \leq 0,05$ 62
- Abb. 47: Knochenmineraldichte in mg/ccm unterhalb des Osteotomiespalts (ROI_{unten}); vier Scan Ebenen von distal nach proximal (stabil n = 6, flexibel n = 5, contra-lateral n = 8); * = $p \leq 0,05$ 62
- Abb. 48: Steifigkeitswerte der Druckpunkte innerhalb des Osteotomiespalts in der distalen und proximalen Spalthälfte (stabil n = 6, flexibel n = 5, contra-lateral n = 11). 64
- Abb. 49: Steifigkeitswerte von Druckpunkten inner-, ober- und unterhalb des Osteotomiespalts; rechts im Diagramm ist die Knochenscheibe mit der jeweils entsprechenden Lokalisation der Steifigkeitsmessung in dunkelrot in Bezug zum hellroten Osteotomiespalt dargestellt (stabil n = 6, flexibel n = 5, contra-lateral n = 11); * = $p \leq 0,05$ 65
- Abb. 50: Dreidimensionale Darstellung der μ CT-Schnitte einer Knochenscheibe aus dem Osteotomiebereich mit Sicht auf den Osteotomiespalt. In der distalen Spalthälfte befindet sich kaum neugebildetes mineralisiertes Gewebe. Der Implantatbereich stellt sich als Hohlraum dar. Stabile Gruppe (S 44). 66
- Abb. 51: Dreidimensionale Darstellung der μ CT-Schnitte einer Knochenscheibe aus dem Osteotomiebereich mit Sicht auf den Osteotomiespalt. In der distalen Spalthälfte befindet sich deutlich sichtbar neugebildetes mineralisiertes Gewebe. Der Implantatbereich stellt sich als Hohlraum dar. Flexible Gruppe (S 11). 67
- Abb. 52: Übersichtsaufnahme eines histologischen Schnittes von zwei Tieren der stabil (S 1 / S 2) und der flexibel (F 1 / F 2) fixierten Operationsgruppe; darunter jeweils die Vergrößerung eines typischen Ausschnitts des Knochen- sowie neubaus aus dem distalen (s 1 / f 1) bzw. dem proximalen (s 2 / f 2) Spaltbereich dieses Tieres mit den für die Ergebnisse relevanten Strukturen und Geweben. 69
- Abb. 53: Stabil fixierte Gruppe – distale Hälfte: Osteoid und Osteoblastensäume entlang der Knochen trabekel am Osteotomiespaltrand. 100-fache Vergrößerung. ... 70
- Abb. 54: Stabil fixierte Gruppe – proximale Hälfte: Knochen trabekel mit Osteoidsäumen und Osteoblasten sowie vereinzelt Knorpelzellen (Pfeil). 200-fache Vergrößerung. 70
- Abb. 55: Flexibel fixierte Gruppe – distale Hälfte: Osteoklasten (Pfeil) und Osteoblasten beim Umbau des neugebildeten Knochengewebes. 200-fache Vergrößerung. 70
- Abb. 56: Flexibel fixierte Gruppe – proximale Hälfte: Faserknorpel (lila / violett) im Umbau zu mineralisiertem Knochengewebe (blau). 200-fache Vergrößerung. 70
- Abb. 57: Flexibel fixierte Gruppe: Verdickung der Knochen trabekel (Pfeil) im Bereich um das distale Spaltende (*). 200-fache Vergrößerung. 70

- Abb. 58: Stabil fixierte Gruppe: bindegewebige Schicht (Pfeil) im Bereich um das Implantat (*). 50-fache Vergrößerung. 70
- Abb. 59: Prozentuale Gewebezusammensetzung aller ermittelten Gewebepunkte im distalen Spaltbereich (stabil n = 6, flexibel n = 5, contra-lateral n = 7); * = $p < 0,05$. .. 72
- Abb. 60: Prozentuale Gewebezusammensetzung aller ermittelten Gewebepunkte im distalen Spaltbereich (stabil n = 6, flexibel n = 5, contra-lateral n = 7); * = $p \leq 0,05$. 72
- Abb. 61: Prozentuale Gewebezusammensetzung aller ermittelten Gewebepunkte oberhalb des distalen Spaltbereichs (stabil n = 6, flexibel n = 5, contra-lateral n = 7); * = $p \leq 0,05$ 73
- Abb. 62: Prozentuale Gewebezusammensetzung aller ermittelten Gewebepunkte oberhalb des proximalen Spaltbereichs (stabil n = 6, flexibel n = 5, contra-lateral n = 7); * = $p \leq 0,05$ 74
- Abb. 63: Prozentuale Gewebezusammensetzung aller ermittelten Gewebepunkte unterhalb des distalen Spaltbereichs (stabil n = 6, flexibel n = 5, contra-lateral n = 7); * = $p \leq 0,05$ 75
- Abb. 64: Prozentuale Gewebezusammensetzung aller ermittelten Gewebepunkte unterhalb des proximalen Spaltbereichs (stabil n = 6, flexibel n = 5, contra-lateral n = 7); * = $p \leq 0,05$ 75
- Abb. 65: Histologische Schnitte der Fluoreszenzfärbung: angeordnet in Lage und Tier entsprechend den Bildern der histologischen Auswertung (Abb. 52 und Abb. 52); oben stabile und unten flexible Tiere, jeweils links distaler und rechts proximaler Spaltbereich; grün = Calceingrün, rot = Tetrazyklin (Färbung ursprünglich gelb, aber aufgrund verbesserter Darstellbarkeit in Falschfarbe rot geändert). 77
- Abb. 66: Schema der relevanten, auf den Osteotomiespalt einwirkenden Kräfte; über den Drehpunkt (schwarzer Punkt) wird die aufgrund der Gliedmaßenbelastung auftretende Kraft F_H über weitere Kräfte (grüne Pfeile) mittels Patellarsehnen- (F_{PT}) und Quadrizepskraft (F_Q) als resultierende Kraft (F_R) auf den Osteotomiespalt übertragen und dieser entsprechend durchgebogen (Claes et al., 2009). 92
- Abb. 67: FE-Modell der interfragmentären Bewegung (IFB) und resultierenden interfragmentären Dehnung (IFD) (y-Achse) über den Verlauf des Osteotomiespalts (3 mm) (x-Achse) unter stabil und flexibel fixierten Bedingungen; der Bereich auf der x-Achse zwischen 0 und 10 mm entspricht der distalen, der Bereich zwischen 10 und 20 mm der proximalen Osteotomiespalthälfte; die gestrichelten Linien geben die möglichen Abweichungen der IFD aufgrund eventueller Unterschiede ($\pm 0,1$ mm) in der Dicke der Bindegewebsschicht um das Implantat an. (Claes et al., 2009)..... 94
- Abb. 68: Darstellung des Dehnungsverlaufs im Osteotomiespalt: oben stabil fixiert, unten flexibel fixiert; im distalen Spaltbereich geringere IFD und weniger Knochenneubildung, im proximalen Spaltbereich deutlicher Knochen- und Knochenanbau..... 100

8 Literaturverzeichnis

Aalto, K.

Structural changes in intact tubular bone after application of axial loads by external fixation.

Annales chirurgiae et gynaecologiae (1986) 75, 44-47.

Ackerman, G., and Jupiter, J.B.

Non-union of fractures of the distal end of the humerus.

J Bone Joint Surg Am (1988) 70, 75-83.

Aerssens, J., Boonen, S., Lowert, G., Dequeker, J.

Interspecies difference in bone composition, density and quality; Potential implications for in vivo bone research.

Endocrinology 139 (1998) 139, 663-670.

Aro, H.T., and Chao, E.Y.

Bone-healing patterns affected by loading, fracture fragment stability, fracture type, and fracture site compression.

Clin Orthop Relat Res (1993), 8-17.

Aronson, J., and Shen, X.

Experimental healing of distraction osteogenesis comparing metaphyseal with diaphyseal sites.

Clin Orthop Relat Res (1994), 25-30.

Aspenberg, P., Wermelin, K., Tengwall, P., and Fahlgren, A.

Additive effects of PTH and bisphosphonates on the bone healing response to metaphyseal implants in rats.

Acta Orthop (2008) 79, 111-115.

Atkinson, P.J.

Variation in trabecular structure of vertebrae with age.

Calcif Tissue Res (1967) 1, 24-32.

Auer, J.A., Goodship, A., Arnoczky, S., Pearce, S., Price, J., Claes, L., von Rechenberg, B., Hofmann-Antenbrinck, M., Schneider, E., Muller-Terpitz, R., *et al.*

Refining animal models in fracture research: seeking consensus in optimising both animal welfare and scientific validity for appropriate biomedical use.

BMC Musculoskelet Disord (2007) 8, 72.

Augat, P., Burger, J., Schorlemmer, S., Henke, T., Peraus, M., Claes, L.

Shear movement at the fracture site delays healing in a diaphyseal fracture model.

J Orthop Res (2003a) 21, 1011-1017.

Augat, P., Fuerst, T., and Genant, H.K.

Quantitative bone mineral assessment at the forearm: a review.

Osteoporos Int (1998a) 8, 299-310.

Augat, P., Gohl, C., Ignatius, A., Iwabu, S., and Claes, L.
A Large Animal Model of Osteoporosis: The Ovariectomized and Corticoid Treated Sheep.

Paper presented at: 10th Conference of the European Orthopaedic Research Society (2000)(Wiesbaden).

Augat, P., Margevicius, K., Simon, J., Wolf, S., Suger, G., and Claes, L.
Local tissue properties in bone healing: influence of size and stability of the osteotomy gap.

J Orthop Res (1998b) 16, 475-481.

Augat, P., Merk, J., Genant, H.K., and Claes, L.

Quantitative assessment of experimental fracture repair by peripheral computed tomography.

Calcif Tissue Int (1997) 60, 194-199.

Augat, P., Merk, J., Ignatius, A., Margevicius, K., Bauer, G., Rosenbaum, D., and Claes, L.

Early, full weightbearing with flexible fixation delays fracture healing.

Clin Orthop (1996) 328, 194-202.

Augat, P., Schorlemmer, S., Gohl, C., Iwabu, S., Ignatius, A., Claes, L.

Glucocorticoid-treated sheep as a model for osteopenic trabecular bone in biomaterials research.

J Biomed Mater Res (2003b) 66A, 457-462.

Augat, P., Simon, U., Liedert, A., and Claes, L.

Mechanics and mechano-biology of fracture healing in normal and osteoporotic bone.

Osteoporos Int (2005) 16 Suppl 2, S36-43.

Barrios, C., Brostrom, L.A., Stark, A., and Walheim, G.

Healing complications after internal fixation of trochanteric hip fractures: the prognostic value of osteoporosis.

J Orthop Trauma (1993) 7, 438-442.

Bassett, C.

Biology of fracture repair, nonunion and pseudarthrosis.

In Complications of fracture management, H. Gossling, Pillsbury, S., ed. (Philadelphia, J.B. Lippincott), (1984) p. 1-8.

Behrens, J.C., Walker, P.S., and Shoji, H.

Variations in strength and structure of cancellous bone at the knee.

J Biomech (1974) 7, 201-207.

Bergmann, G., Graichen, F., and Rohlmann, A.

Hip joint forces in sheep.

J Biomech (1999) 32, 769-777.

Bergmann, G., Siraky, J., Rohlmann, A., and Koelbel, R.

A comparison of hip joint forces in sheep, dog and man.

J Biomech (1984) 17, 907-921.

Brand, R., Rubin, C., Eds.
Fracture Healing.

In: Albright JA, Brand RA (Hrsg) The scientific basis of orthopaedics (1987).

Braun, W., and Ruter, A.

Fracture healing. Morphologic and physiologic aspects.

Unfallchirurg (1996) 99, 59-67.

Brighton, C.T.

The biology of fracture repair.

Instr Course Lect (1984) 33, 60-82.

Browning, R.C., McGowan, C.P., and Kram, R.

Obesity does not increase external mechanical work per kilogram body mass during walking.

J Biomech (2009) 42, 2273-2278.

Carter, D.R., Beaupre, G.S., Giori, N.J., and Helms, J.A.

Mechanobiology of skeletal regeneration.

Clin Orthop (1998) 355, S41-55.

Carter, D.R., Blenman, P.R., and Beaupré, G.S.

Correlations between Mechanical Stress History and Tissue Differentiation in Initial Fracture Healing.

Journal of Orthopaedic Research (1988) 6, 736-748.

Charnley, J., and Baker, S.L.

Compression arthrodesis of the knee; a clinical and histological study.

J Bone Joint Surg Br (1952) 34-B, 187-199.

Chavassieux, P.

Bone effects of fluoride in animal models in vivo. A review and a recent study.

J Bone Miner Res (1990) 5 Suppl 1, S95-99.

Chen, W.J., Jingushi, S., Aoyama, I., Anzai, J., Tamura, M., and Iwamoto, Y.

Effects of FGF-2 on metaphyseal fracture repair in rabbit tibiae.

J Bone Miner Metab (2004) 22, 303-309.

Claes, L.

Biologie und Biomechanik der Osteosynthese und Frakturheilung.

Orthopädie und Unfallchirurgie (2006) 1, 329-346.

Claes, L., and Augat, P.

Biomechanik der Frakturheilung.

Paper presented at: Osteologie (1995).

Claes, L., Augat, P., Schorlemmer, S., Konrads, C., Ignatius, A., and Ehrnthaller, C.

Temporary distraction and compression of a diaphyseal osteotomy accelerates bone healing.

J Orthop Res (2008) 26, 772-777.

- Claes, L., Augat, P., Suger, G., and Wilke, H.J.
Influence of size and stability of the osteotomy gap on the success of fracture healing.
J Orthop Res (1997) *15*, 577-584.
- Claes, L., Eckert-Hubner, K., and Augat, P.
The effect of mechanical stability on local vascularization and tissue differentiation in callus healing.
J Orthop Res (2002a) *20*, 1099-1105.
- Claes, L., Eckert-Hubner, K., and Augat, P.
The fracture gap size influences the local vascularization and tissue differentiation in callus healing.
Langenbecks Arch Surg (2003) *388*, 316-322.
- Claes, L., Grass, R., Schmickal, T., Kisse, B., Eggers, C., Gerngross, H., Mutschler, W., Arand, M., Wintermeyer, T., and Wentzensen, A.
Monitoring and healing analysis of 100 tibial shaft fractures.
Langenbecks Arch Surg (2002b) *387*, 146-152.
- Claes, L., Kinzl, L., and Neugebauer, R.
[Experimental studies on the influence of plate material on stress-relief and atrophy of the bone osteosynthesis plates (author's transl)].
Biomed Tech (Berl) (1981) *26*, 66-71.
- Claes, L., Laule, J., Wenger, K., Suger, G., Liener, U., and Kinzl, L.
The influence of stiffness of the fixator on maturation of callus after segmental transport.
J Bone Joint Surg Br (2000a) *82*, 142-148.
- Claes, L., Maurer-Klein, N., Henke, T., Gerngross, H., Melnyk, M., and Augat, P.
Moderate soft tissue trauma delays new bone formation only in the early phase of fracture healing.
J Orthop Res (2006) *24*, 1178-1185.
- Claes, L., Reusch, M., Gockelmann, M., Ohnmacht, M., Wehner, T., Amling, M., Beil, F.T., and Ignatius, A.
Metaphyseal fracture healing follows similar biomechanical rules as diaphyseal healing.
J Orthop Res (2010).
- Claes, L., Veesser, A., Gockelmann, M., Simon, U., and Ignatius, A.
A novel model to study metaphyseal bone healing under defined biomechanical conditions.
Arch Orthop Trauma Surg (2009) *129*, 923-928.
- Claes, L., Wentzensen, A., Mutschler, W., Arand, M., and Gerngroß, H.
Monitoring of fracture healing at patients with unilateral external fixators.
Paper presented at: 3rd Conference of the International Society for Fracture Repair (1992)(Bruxelles).

Claes, L., Wolf, S., and Augat, P.
Mechanische Einflüsse auf die Callusheilung [Mechanical modification of callus healing].
Chirurg (2000b) 71, 989-994.

Claes, L.E.
Die Bedeutung des Frakturspalts für die Knochenheilung.
Op-Journal (1992) No 1, Jg 8, 11-15.

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

Claes, L.E., Heigele, C.A., Neidlinger-Wilke, C., Kaspar, D., Seidl, W., Margevicius, K.J., and Augat, P.
Effects of mechanical factors on the fracture healing process.
Clin Orthop (1998) 355 Suppl, S132-147.

Claes, L.E., Wilke, H.J., Augat, P., Rubenacker, S., and Margevicius, K.J.
Effect of dynamization on gap healing of diaphyseal fractures under external fixation.
Clin Biomech (Bristol, Avon) (1995a) 10, 227-234.

Claes, L.E., Wilke, H.J., and Kiefer, H.
Osteonal structure better predicts tensile strength of healing bone than volume fraction.
J Biomech (1995b) 28, 1377-1390.

Cornell, C.N.
Internal fracture fixation in patients with osteoporosis.
J Am Acad Ortho Surg (2003) 11, 109-119.

Cornell, C.N., Lane, J.M., and Poynton, A.R.
Orthopedic management of vertebral and long bone fractures in patients with osteoporosis.
Clin Geriatr Med (2003) 19, 433-455.

Cruess, R.L., and Dumont, J.
Fracture healing.
Can J Surg (1975) 18, 403-413.

Culmann, C.
Die graphische Statistik.
Meyer & Zeller, Zürich (1866).

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

Denny, H.R.

A Guide to Canine Orthopaedic Surgery,
Vol. (1980), (Oxford, England, Blackwell Scientific).

Digby, J.M., Holloway, G.M., and Webb, J.K.

A study of function after tibial cast bracing.
Injury (1983) *14*, 432-439.

Draenert, K., and Draenert, Y.

The architecture of metaphyseal bone healing.
Scan Electron Microsc (1979), 521-528.

Duda, G.N., Bartmeyer, B., Sporrer, S., Taylor, W.R., Raschke, M., and Haas, N.P.

Does partial weight bearing unload a healing bone in external ring fixation?
Langenbecks Arch Surg (2003) *388*, 298-304.

Duda, G.N., Eckert-Hübner, K., Sokiranski, R., Kreutner, A., Miller, R., and Claes, L.

Analysis of inter-fragmentary movement as a function of musculoskeletal loading conditions in sheep.

J Biomech (1998) *31*, 201-210.

Dumont, C., Kauer, F., Bohr, S., Schmidtmann, U., Knopp, W., Engelhardt, T., Stürmer, E.K., and Stürmer, K.M.

Long-term effects of saw osteotomy versus random fracturing on bone healing and remodeling in a sheep tibia model.
J Orthop Res (2009) *27*, 680-686.

Ebraheim, N.A., Skie, M.C., Heck, B.E., and Jackson, W.T.

Metaphyseal nonunion: a diagnostic dilemma.
J Trauma (1995) *38*, 261-268.

Egermann, M., Goldhahn, J., Holz, R., Schneider, E., and Lill, C.A.

A sheep model for fracture treatment in osteoporosis: benefits of the model versus animal welfare.

Lab Anim (2008) *42*, 453-464.

Egger, E.L., Gottsauner-Wolf, F., Palmer, J., Aro, H.T., and Chao, E.Y.

Effects of axial dynamization on bone healing.
J Trauma (1993) *34*, 185-192.

Einhorn.

The Science of fracture healing.

Journal of Orthopaedic Trauma (2005) *19*, S4-S6.

Einhorn, T.A.

The biology of fracture healing.

3rd Conference of the International Society for Fracture Repair, (Brussels, Belgium) (1992), 1-15.

Einhorn, T.A.

The cell and molecular biology of fracture healing.

Clin Orthop Relat Res (1998), S7-21.

Eitel, F., Seiler, H., and Schweiberer, L.

[Morphological examination of animal-experiment results: comparison with regeneration of the human bone-structure. II. Research results (author's transl)].

Unfallheilkunde (1981) 84, 255-264.

Epari, D.R., Schell, H., Bail, H.J., and Duda, G.N.

Instability prolongs the chondral phase during bone healing in sheep.

Bone (2006) 38, 864-870.

Fan, W., Crawford, R., and Xiao, Y.

Structural and cellular differences between metaphyseal and diaphyseal periosteum in different aged rats.

Bone (2008) 42, 81-89.

Feldkamp, L.A., Goldstein, S.A., Parfitt, A.M., Jesion, G., and Kleerekoper, M.

The direct examination of three-dimensional bone architecture in vitro by computed tomography.

J Bone Miner Res (1989) 4, 3-11.

Fischgrund, J., Paley, D., and Suter, C.

Variables affecting time to bone healing during limb lengthening.

Clin Orthop Relat Res (1994), 31-37.

Fitzgerald, E.R.

Dynamic mechanical measurements during the life to death transition in animal tissues.

Biorheology (1975) 12, 397-408.

Fitzgerald, E.R.

Postmortem transition in the dynamic mechanical properties of bone.

Med Phys (1977) 4, 49-53.

Frost, H.M.

The biology of fracture healing. An overview for clinicians. Part I.

Clin Orthop (1989a) 248, 283-293.

Frost, H.M.

The biology of fracture healing. An overview for clinicians. Part II.

Clin Orthop (1989b) 248, 283-293.

Frost, H.M.

A 2003 Update of Bone Physiology and Wolff's Law for Clinicians.

Angle Orthodontist (2004) 74, 3-15.

Ganz, R., Perren, S.M., and Ruter, A.

[Mechanical induction of bone resorption].

Fortschr Kiefer Gesichtschir (1975) 19, 45-48.

Genant, Engelke, Fürst, Glüer, Grampp, Harris, and u.a.
Noninvasive Assessment of Bone Mineral and Structure: State of the art.
Journal of Bone and Mineral Research (1996) *11*, 707-7223.

Geneser, F.
Histologie.
Book, Deutscher Ärzte Verlag (1990), 216 ff.

Gerhart, T.N., Kirker-Head, C.A., Kriz, M.J., Holtrop, M.E., Hennig, G.E., Hipp, J., Schelling, S.H., and Wang, E.
Healing segmental femoral defects in sheep using recombinant human bone morphogenetic protein.
Clin Orthop Relat Res (1993), 317-326.

Goldstein, S.A.
The mechanical properties of trabecular bone: dependence on anatomic location and function.
J Biomech (1987) *20*, 1055-1061.

Goodship, A.E., Cunningham, J.L., and Kenwright, J.
Strain rate and timing of stimulation in mechanical modulation of fracture healing.
Clin Orthop Relat Res (1998), S105-115.

Goodship, A.E., and Kenwright, J.
The influence of induced micromovement upon the healing of experimental tibial fractures.
J Bone Joint Surg [Br] (1985) *67B*, 650-655.

Götte, S., and Dittmar, K.
Epidemiology and costs of osteoporosis.
Der Orthopäde (2001) *Volume 30, Number 7 / Juli 2001*, 402-404.

Hees, H., and Sinowatz, F., eds.
Histologie,
3. Auflage edn (2000) (Deutscher Ärzte-Verlag).

Hente, R., Cheal, E.J., Hagerty, T., and Perren, S.M.
Differentiation of repair tissue under controlled strain gradients.
Orthop Trans (1991) *15*, 520-521.

Hillier, M.L., and Bell, L.S.
Differentiating human bone from animal bone: a review of histological methods.
J Forensic Sci (2007) *52*, 249-263.

Hori, R.Y., and Lewis, J.L.
Mechanical properties of the fibrous tissue found at the bone-cement interface following total joint replacement.
J Biomed Mater Res (1982) *16*, 911-927.

Jakob, F., Seefried, L., Ebert, R., Eulert, J., Wolf, E., Schieker, M., Böcker, W., Mutschler, W., Amling, M., Pogoda, P., *et al.*

Frakturheilung bei Osteoporose.

Osteologie (2007) 16, 71-84.

Jarry, L., and Uhthoff, H.K.

Differences in healing of metaphyseal and diaphyseal fractures.

Can J Surg (1971) 14, 127-135.

Junqueira, L.C., and Carneiro, J.

Histologie: Zytologie, Histologie und mikroskopische Anatomie des Menschen unter Berücksichtigung der Histophysiologie.

Springer-Verlag Berlin Heidelberg New York (1996) 4. Auflage, 196-197.

Kanis, J., McCloskey, E., Johansson, H., Oden, A., Melton, L.J., and Khaltsev, N.

A reference standard for the description of osteoporosis.

Bone (2008) 42, 467-475.

Kanis, J.A., Johnell, O., De Laet, C., Johansson, H., Oden, A., Delmas, P., Eisman, J., Fujiwara, S., Garnero, P., Kroger, H., *et al.*

A meta-analysis of previous fracture and subsequent fracture risk.

Bone (2004) 35, 375-382.

Kaspar, D., Seidl, W., Neidlinger-Wilke, C., Beck, A., Claes, L., and Ignatius, A.

Proliferation of human-derived osteoblast-like cells depends on the cycle number and frequency of uniaxial strain.

J Biomech (2002) 35, 873-880.

Kaspar, K., Schell, H., Seebeck, P., Thompson, M., Schutz, M., and Haas, N., Duda, G.

Angle stable locking reduces interfragmentary movements and promotes healing after unreamed nailing. Study of a displaced osteotomy model in sheep tibiae.

J Bone Joint Surg Am (2005) 87, 2028-2037.

Katz, J.L., and Meunier, A.

The elastic anisotropy of bone.

J Biomech (1987) 20, 1063-1070.

Keaveny, T.M., Morgan, E.F., Niebur, G.L., and Yeh, O.C.

Biomechanics of trabecular bone.

Annu Rev Biomed Eng (2001) 3, 307-333.

Kenwright, J., and Goodship, A.E.

Controlled mechanical stimulation in the treatment of tibial fractures.

Clin Orthop Relat Res (1989), 36-47.

Kenwright, J., Richardson, J.B., Cunningham, J.L., White, S.H., Goodship, A.E., Adams, M.A., Magnussen, P.A., and Newman, J.H.

Axial movement and tibial fractures. A controlled randomised trial of treatment.

J Bone Joint Surg Br (1991) 73, 654-659.

- Kim, J., and Breur, G.J.
Temporospatial and kinetic characteristics of sheep walking on a pressure sensing walkway.
Can J Vet Res (2008) 72, 50-55.
- Kimmel, D.B., and Jee, W.S.
A quantitative histologic study of bone turnover in young adult beagles.
Anat Rec (1982) 203, 31-45.
- King, G.J., and Schatzker, J.
Nonunion of a complex tibial plateau fracture.
J Orthop Trauma (1991) 5, 209-212.
- Klein, P., Opitz, M., Schell, H., Taylor, W.R., Heller, M.O., Kassi, J.P., Kandziora, F., and Duda, G.N.
Comparison of unreamed nailing and external fixation of tibial diastases--mechanical conditions during healing and biological outcome.
J Orthop Res (2004) 22, 1072-1078.
- Klein, P., Schell, H., Streitparth, F., Heller, M., Kassi, J.P., Kandziora, F., Bragulla, H., Haas, N.P., and Duda, G.N.
The initial phase of fracture healing is specifically sensitive to mechanical conditions.
J Orthop Res (2003) 21, 662-669.
- Kolios, L., Sehmisch, S., Daub, F., Rack, T., Tezval, M., Stuermer, K.M., and Stuermer, E.K.
Equol but not genistein improves early metaphyseal fracture healing in osteoporotic rats.
Planta Med (2009) 75, 459-465.
- Kon, E., Delcogliano, M., Filardo, G., Fini, M., Giavaresi, G., Francioli, S., Martin, I., Pressato, D., Arcangeli, E., Quarto, R., *et al.*
Orderly osteochondral regeneration in a sheep model using a novel nano-composite multilayered biomaterial.
J Orthop Res (2010) 28, 116-124.
- Krischak, G.D., Augat, P., Wachter, N.J., Kinzl, L., and Claes, L.E.
Predictive value of bone mineral density and Singh index for the in vitro mechanical properties of cancellous bone in the femoral head.
Clin Biomech (Bristol, Avon) (1999) 14, 346-351.
- Krischak, G.D., Janousek, A., Wolf, S., Augat, P., Kinzl, L., and Claes, L.E.
Effects of one-plane and two-plane external fixation on sheep osteotomy healing and complications.
Clin Biomech (Bristol, Avon) (2002) 17, 470-476.
- Li, X., An, Y.H., Wu, Y.D., Song, Y.C., Chao, Y.J., and Chien, C.H.
Microindentation test for assessing the mechanical properties of cartilaginous tissues.
J Biomed Mater Res B Appl Biomater (2007) 80, 25-31.

Liebich, H.-G.

Funktionelle Histologie: Farbatlas und Kurzlehrbuch de mikroskopischen Anatomie der Haussäugetiere.

Schattauer Verlagsgesellschaft;
Stuttgart, New York (1993).

Liebschner, M.A.

Biomechanical considerations of animal models used in tissue engineering of bone.
Biomaterials (2004) 25, 1697-1714.

Lienau, J., Schell, H., Duda, G.N., Seebeck, P., Muchow, S., and Bail, H.J.

Initial vascularization and tissue differentiation are influenced by fixation stability.
J Orthop Res (2005) 23, 639-645.

Lill, C.A., Gerlach, U.V., Eckhardt, C., Goldhahn, J., and Schneider, E.

Bone changes due to glucocorticoid application in an ovariectomized animal model for fracture treatment in osteoporosis.

Osteoporos Int (2002) 13, 407-414.

Lill, J., Hessel, U., Schlegel, C., Eckhardt, J., Goldhahn, E., Schneider.

Biomechanical evaluation of healing in a non-critical defect in a large animal model of osteoporosis.

Journal of Orthopaedic Research (2003) 21, 836-842.

Linde, F., Hvid, I., and Madsen, F.

The effect of specimen geometry on the mechanical behaviour of trabecular bone specimens.

J Biomech (1992) 25, 359-368.

Lippuner, K., Vogel, R., Tepic, S., Rahn, B.A., Cordey, J., and Perren, S.M.

Effect of animal species and age on plate-induced vascular damage in cortical bone.
Arch Orthop Trauma Surg (1992) 111, 78-84.

Markel, M.D., and Chao, E.Y.

Noninvasive monitoring techniques for quantitative description of callus mineral content and mechanical properties.

Clin Orthop Relat Res (1993), 37-45.

Martini, L., Fini, M., Giavaresi, G., and Giardino, R.

Sheep model in orthopedic research: a literatur review.

Comp Med (2001) 51, 292-299.

Matter, P., Brennwald, J., and Perren, S.M.

[Biological reaction of bones to osteosynthesis plates].

Helv Chir Acta (1974) 0, 1-44.

McKibbin, B.

The biology of fracture healing in long bones.

J Bone Joint Surg Br (1978) 60-B, 150-162.

Melton, L.J., 3rd, and Heaney, R.P.
Too much medicine? Or too little?
Bone (2003) 32, 327-331.

Milch, R.A., Rall, D.P., and Tobie, J.E.
Fluorescence of tetracycline antibiotics in bone.
J Bone Joint Surg Am (1958) 40-A, 897-910.

Minne, H.W., and Pfeifer, M.
[Evidence-based therapy of osteoporosis].
Dtsch Med Wochenschr (2003) 128, 931-934.

Morgan, E.F., Mason, Z.D., Bishop, G., Davis, A.D., Wigner, N.A., Gerstenfeld, L.C.,
and Einhorn, T.A.
Combined effects of recombinant human BMP-7 (rhBMP-7) and parathyroid hormone
(1-34) in metaphyseal bone healing.
Bone (2008) 43, 1031-1038.

Mosekilde, L.
Age-related changes in bone mass, structure, and strength--effects of loading.
Z Rheumatol (2000) 59 Suppl 1, 1-9.

Müller, Schenk, and Willenegger.
Experimentelle Untersuchungen über die Entstehung reaktiver Pseudarthrosen am
Hunderadius.
Helv Chir Acta (1968) 35, 301.

Nafei, A., Danielsen, C.C., Linde, F., and Hvid, I.
Properties of growing trabecular ovine bone. Part I: mechanical and physical
properties.
J Bone Joint Surg Br (2000) 82, 910-920.

National Institutes of Health.
Consensus Development Conference Statement: Diagnosis, Prophylaxis and
Treatment of Osteoporosis.
The American Journal of Medicine; Conference Report (2000) March 27-29.

Neidlinger-Wilke, C., Wilke, H.J., and Claes, L.
Cyclic stretching of human osteoblasts affects proliferation and metabolism: a new
experimental method and its application.
J Orthop Res (1994) 12, 70-78.

Newmann, Turner, and Wark.
The potential of sheep for study of Osteopenia: Current Status and Comparison with
other animal Models.
Bone (1995) 16, 277-284.

Nickel, R., Schummer, A., and Seiferle, E.
Lehrbuch der Anatomie der Haustiere; Band 2, 6. Auflage,
Vol. (1992), (Parey, Berlin und Hamburg).

- Nunamaker, D.M.
Experimental Models of Fracture Repair.
Clinical Orthopaedics and Related Research (1998) 355S, 56-65.
- Nuss, K.M., Auer, J.A., Boos, A., and von Rechenberg, B.
An animal model in sheep for biocompatibility testing of biomaterials in cancellous bones.
BMC Musculoskelet Disord (2006) 7, 67.
- Parfitt, A.M., Drezner, M.K., Glorieux, F.H., Kanis, J.A., Malluche, H., Meunier, P.J., Ott, S.M., and Recker, R.R.
Bone histomorphometry: standardization of nomenclature, symbols, and units. Report of the ASBMR Histomorphometry Nomenclature Committee.
J Bone Miner Res (1987) 2, 595-610.
- Pauwels, F.
Atlas zur Biomechanik der gesunden und kranken Hüfte.
Springer-Verlag, Berlin (1973).
- Pearce, A.I., Richards, R.G., Milz, S., Schneider, E., and Pearce, S.G.
Animal models for implant biomaterial research in bone: a review.
Eur Cell Mater (2007) 13, 1-10.
- Perren, L.S., and Cordey, J.
The Concept of Interfragmentary Strain.
In: Uthoff, H K: Current Concepts of Internal Fixation of Fractures (1980) *Springer-Verlag, Berlin*.
- Perren, S.M.
Physical and Biological Aspects of Fracture Healing with Special Reference to Internal Fixation.
Clin Orthop (1979) 138, 175-196.
- Perren, S.M.
Biomechanische Grundlagen der Frakturbehandlung.
Orthopäde (1992) 21, 3-10.
- Rahn, B.A., Gallinaro, P., Baltensperger, A., and Perren, S.M.
Primary bone healing. An experimental study in the rabbit.
J Bone Joint Surg Am (1971) 53, 783-786.
- Rahn, B.V., Bacellar, F.C., Trapp, L., and Perren, S.M.
[A method for morphometry of bone formation using fluorochromes (author's transl)].
Aktuelle Traumatol (1980) 10, 109-115.
- Ravaglioli, A., Krajewski, A., Celotti, G.C., Piancastelli, A., Bacchini, B., Montanari, L., Zama, G., and Piombi, L.
Mineral evolution of bone.
Biomaterials (1996) 17, 617-622.

- Remedios, A.
Bone and bone healing.
Vet Clin North Am Small Anim Pract (1999) 29, 1029-1044, v.
- Rhineland, F.W.
The normal microcirculation of diaphyseal cortex and its response to fracture.
J Bone Joint Surg Am (1968) 50, 784-800.
- Rhineland, F.W.
Tibial blood supply in relation to fracture healing.
Clin Orthop Relat Res (1974), 34-81.
- Riggs, B.L.
Overview of Osteoporosis.
West J Med (1991) 154, 63-77.
- Ringe, J.D.
Osteoporose,
Vol. (1995), (Stuttgart, Thieme).
- Ringe, J.D.
Osteoporose Differentialdiagnose und Differentialtherapie,
Vol. (1997), (Stuttgart, Thieme).
- Romeis, J.C.
Caregiver strain: toward an enlarged perspective.
J Aging Health (1989) 1, 188-208.
- Rubin, C.T., and Lanyon, L.E.
Kappa Delta Award paper. Osteoregulatory nature of mechanical stimuli: function as a determinant for adaptive remodeling in bone.
J Orthop Res (1987) 5, 300-310.
- Sarmiento, A., Mullis, D.L., Latta, L.L., Tarr, R.R., and Alvarez, R.
A quantitative comparative analysis of fracture healing under the influence of compression plating vs. closed weight-bearing treatment.
Clin Orthop Relat Res (1980), 232-239.
- Sarmiento, A., Schaeffer, J.F., Beckerman, L., Latta, L.L., and Enis, J.E.
Fracture healing in rat femora as affected by functional weight-bearing.
J Bone Joint Surg Am (1977) 59, 369-375.
- Schatzker, J.
Intraarticular malunions and nonunions.
Orthop Clin North Am (1990) 21, 743-757.
- Schatzker, J., Waddell, J., and Stoll, J.E.
The effects of motion on the healing of cancellous bone.
Clin Orthop Relat Res (1989), 282-287.

- Schell, H., Epari, D.R., Kassi, J.P., Bragulla, H., Bail, H.J., and Duda, G.N.
The course of bone healing is influenced by the initial shear fixation stability.
J Orthop Res (2005) *23*, 1022-1028.
- Schell, H., Thompson, M.S., Bail, H.J., Hoffmann, J.E., Schill, A., Duda, G.N., and Lienau, J.
Mechanical induction of critically delayed bone healing in sheep: radiological and biomechanical results.
J Biomech (2008) *41*, 3066-3072.
- Schenk, R.K.
Die Histologie der primären Knochenheilung im Lichte neuer Konzeptionen über den Knochenumbau.
Unfallheilkunde (1978) *81*, 219-227.
- Schenk, R.K., Muller, J., and Willenegger, H.
[Experimental histological contribution to the development and treatment of pseudarthrosis].
Hefte Unfallheilkd (1968) *94*, 15-24.
- Schenk, R.K., and Willenegger, H.R.
Histology of primary bone healing: modifications and limits of recovery of gaps in relation to extent of the defect (author's transl).
Unfallheilkunde (1977) *80*, 155-160.
- Schorlemmer, S., Gohl, C., Iwabu, S., Ignatius, A., Claes, L., and Augat, P.
Glucocorticoid treatment of ovariectomized sheep affects mineral density, structure, and mechanical properties of cancellous bone.
J Bone Miner Res (2003) *18*, 2010-2015.
- Schorlemmer, S., Ignatius, A., Claes, L., and Augat, P.
Inhibition of cortical and cancellous bone formation in glucocorticoid-treated OVX sheep.
Bone (2005) *37*, 491-496.
- Seebeck, P., Thompson, M.S., Parwani, A., Taylor, W.R., Schell, H., and Duda, G.N.
Gait evaluation: a tool to monitor bone healing?
Clin Biomech (Bristol, Avon) (2005) *20*, 883-891.
- Sevitt, S.
Secondary repair of fractures. Events preparatory to union.,
Vol. (1981), (Churchill Livingstone.).
- Shelfbine, S.J., Augat, P., Claes, L., and Simon, U.
Trabecular bone fracture healing simulation with finite element analysis and fuzzy logic.
J Biomech (2005) *38*, 2440-2450.

Sheldon, R.S., and Wilson, J.
Orthopaedic Basic Science,
Vol. (1994), (Ohio, American Academy of Orthopaedic Surgeons).

Silver, and Einhorn.
Osteoporosis and aging.
Clinical Orthopaedics and related research (1995) 316 pp10-20.

Simmons, D.J.
Fracture healing perspectives.
Clin Orthop Relat Res (1985), 100-113.

Smith, D.P., Enderson, B.L., and Maull, K.I.
Trauma in the elderly: determinants of outcome.
South Med J (1990) 83, 171-177.

Soballe, K., Hansen, E.S., H, B.R., Jorgensen, P.H., and Bunger, C.
Tissue ingrowth into titanium and hydroxyapatite-coated implants during stable and unstable mechanical conditions.
J Orthop Res (1992) 10, 285-299.

Stepnick, L.
The frequency of bone disease.,
Vol. (2004), (Washington, D.C.).

Sterck, J.G., Klein-Nulend, J., Lips, P., and Burger, E.H.
Response of normal and osteoporotic human bone cells to mechanical stress in vitro.
Am J Physiol (1998) 274, E1113-1120.

Stoffel, K., Klaue, K., and Perren, S.M.
Functional load of plates in fracture fixation in vivo and its correlate in bone healing.
Injury (2000) 31 Suppl 2, S-B37-50.

Stürmer, E.K., Sehmisch, S., Rack, T., Wenda, E., Seidlova-Wuttke, D., Tezval, M., Wuttke, W., Frosch, K.H., and Stürmer, K.M.
Estrogen and raloxifene improve metaphyseal fracture healing in the early phase of osteoporosis. A new fracture-healing model at the tibia in rat.
Langenbecks Arch Surg (2010) 395, 163-172.

Stürmer, E.K., Sehmisch, S., Tezval, M., Tezval, H., Rack, T., Boekhoff, J., Wuttke, W., Herrmann, T.R., Seidlova-Wuttke, D., and Stürmer, K.M.
Effect of testosterone, raloxifene and estrogen replacement on the microstructure and biomechanics of metaphyseal osteoporotic bones in orchietomized male rats.
World J Urol (2009) 27, 547-555.

Stürmer, E.K., Seidlova-Wuttke, D., Sehmisch, S., Rack, T., Wille, J., Frosch, K.H., Wuttke, W., and Sturmer, K.M.
Standardized bending and breaking test for the normal and osteoporotic metaphyseal tibias of the rat: effect of estradiol, testosterone, and raloxifene.
J Bone Miner Res (2006) 21, 89-96.

Stürmer, K.M.
Histomorphologie der Frakturheilung im Vergleich der Fixationsverfahren am Tibiaschaft,
Vol. (1987), (Berlin, Heidelberg, New York, Springer-Verlag).

Stürmer, K.M.
[Elastic plate osteosynthesis, biomechanics, indications and technique in comparison with rigid osteosynthesis].
Unfallchirurg (1996) 99, 816-829.

Stürmer, K.M., and Schuchardt, W.
[New aspects of closed intramedullary nailing and marrow cavity reaming in animal experiments. I. The tibia of the sheep, as a model for intramedullary nailing].
Unfallheilkunde (1980a) 83, 341-345.

Stürmer, K.M., and Schuchardt, W.
[New aspects of closed intramedullary nailing and marrow cavity reaming in animal experiments. III. Bone-healing, revascularisation and remodelling (author's transl)].
Unfallheilkunde (1980b) 83, 433-435.

Suzuki, H.K., and Mathews, A.
Two-color fluorescent labeling of mineralizing tissues with tetracycline and 2,4-bis[N,N'-di-(carbomethyl)aminomethyl] fluorescein.
Stain Technol (1966) 41, 57-60.

Syed, A.A., Agarwal, M., Giannoudis, P.V., Matthews, S.J., and Smith, R.M.
Distal femoral fractures: long-term outcome following stabilisation with the LISS.
Injury (2004) 35, 599-607.

Takada, M., Engelke, K., Hagiwara, S., Grampp, S., and Genant, H.K.
Accuracy and precision study in vitro for peripheral quantitative computed tomography.
Osteoporos Int (1996) 6, 207-212.

Tam, C.S., and Anderson, W.
Tetracycline labeling of bone in vivo.
Calcif Tissue Int (1980) 30, 121-125.

Tapper, J.E., Fukushima, S., Azuma, H., Thornton, G.M., Ronsky, J.L., Shrive, N.G., and Frank, C.B.
Dynamic in vivo kinematics of the intact ovine stifle joint.
J Orthop Res (2006) 24, 782-792.

Theiss, F., Apelt, D., Brand, B., Kutter, A., Zlinszky, K., Böhner, M., Matter, S., Frei, C., Auer, J.A., and von Rechenberg, B.
Biocompatibility and resorption of a brushite calcium phosphate cement.
Biomaterials (2005) 26, 4383-4394.

Thull, R.
Physicochemical principles of tissue material interactions.
Biomol Eng (2002) 19, 43-50.

Tsiridis, Morgan, Bancroft, Song, Kain, Gerstenfeld, Einhorn, Bouxsein, and Tornetta. Effects of OP-1 and PTH in a New Experimental Model for the Study of Metaphyseal Bone Healing.

Journal of Orthopaedic Research (2007), 1193-1203.

Turner, A.S.

Animal models of osteoporosis--necessity and limitations.

Eur Cell Mater (2001) 1, 66-81.

U.S.CensusBureau.

Population Division, Washington, USA;.

<http://www.census.gov> (2008) *Data updated 2008*.

Uhthoff, Goto, and Cerckel.

Influence of Stable Fixation on Trabecular Bone Healing: A Morphologic Assessment in Dogs.

Journal of Orthopaedic Research (1987) 5, 14-22.

Uhthoff, H.K., and Jaworski, Z.F.

Bone loss in response to long-term immobilisation.

J Bone Joint Surg Br (1978) 60-B, 420-429.

Uhthoff, H.K., and Rahn, B.A.

Healing patterns of metaphyseal fractures.

Clin Orthop Relat Res (1981) 160, 295-303.

Utvag, S.E., Grundnes, O., Rindal, D.B., and Reikeras, O.

Influence of extensive muscle injury on fracture healing in rat tibia.

J Orthop Trauma (2003) 17, 430-435.

Uusitalo, H., Rantakokko, J., Ahonen, M., Jamsa, T., Vuorio, E., and Aro, H.T.

A metaphyseal defect model of the femur for studies of murine bone healing.

Bone (2001) 28, 423-429.

van den Berg, F.

Angewandte Physiologie - Das Bindegewebe des Bewegungsapparates.

Thieme Verlag (1999).

Webb, J.C.J., and Tricker, J.

Bone biology- A review of fracture healing.

Current Orthopaedics (2000) 14, 457-463.

Wehner, T., Claes, L., Niemeyer, F., Nolte, D., and Simon, U.

Influence of the fixation stability on the healing time--a numerical study of a patient-specific fracture healing process.

Clin Biomech (Bristol, Avon) (2010) 25, 606-612.

Weibel, E.R.

Principles and methods for the morphometric study of the lung and other organs.

Lab Invest (1963) 12, 131-155.

Wilke, H.J., Krischak, S., and Claes, L.E.

Formalin fixation strongly influences biomechanical properties of the spine.

J Biomech (1996) 29, 1629-1631.

Willenegger, H., Perren, S.M., and Schenk, R.

Primäre und sekundäre Knochenheilung.

Chirurg (1971) 42, 241-252.

Wissing, H.

Untersuchungen zur Knochenregeneration nach Unterbrechung der medullären oder periostalen Strombahn bei verschiedenen Versuchstierspezies.

Hefte zur Unfallheilkunde - Springer Verlag Berlin Heidelberg (1986) 181, 225-229.

Wissing, H., Stürmer, K., and Breidenstein, G.

Die Wertigkeit verschiedener Versuchstierspezies für experimentelle Untersuchungen am Knochen.

Hefte Unfallheilkunde 212: 479-488 (1990).

Wolf, S., Janousek, A., Pfeil, J., Veith, W., Haas, F., Duda, G., and Claes, L.

The effects of external mechanical stimulation on the healing of diaphyseal osteotomies fixed by flexible external fixation.

Clin Biomech (Bristol, Avon) (1998) 13, 359-364.

Wolff, J.

Gesetz der Transformation der Knochen.

Berlin, Springer Verlag (1892).

Yamagishi, M., and Yoshimura, Y.

The biomechanics of fracture healing.

J Bone Joint Surg [Am] (1955) 37-A, 1035-1068.

Yang, E.C., Weiner, L., Strauss, E., Sedlin, E., Kelley, M., and Raphael, J.

Metaphyseal dissociation fractures of the proximal tibia. An analysis of treatment and complications.

Am J Orthop (1995) 24, 695-704.

Young, R.W.

Cell proliferation and specialization during endochondral osteogenesis in young rats.

J Cell Biol (1962) 14, 357-370.

9 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich ganz herzlich bei Frau Prof. Dr. Anita Ignatius und Herrn Prof. Dr. Lutz Claes für die Möglichkeit der Promotion am Institut für Unfallchirurgische Forschung und Biomechanik bedanken. Vielen lieben Dank für die stets große Unterstützung und das Verständnis in allen arbeitsbezogenen und privaten Anliegen.

Mein herzlichster Dank gilt auch Herrn Prof. Dr. Eckhard Wolf für die Übernahme meiner Arbeit an der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität in München.

Herbert Schmitt kann ich nicht genug danken für alles, was wir zusammen erlebt haben – ohne ihn wäre die Arbeit nicht in dieser Form möglich gewesen. Besonders bedanken möchte ich mich auch bei Sandra Reitmaier für all das, wofür Worte nicht ausreichen.

Ronny Bintl, Uschi Maile, Marion Tomo, Melanie Göckelmann, Christine Bausewein, Andrea Grau, Stefan Recknagel und Frank Heuer danke ich für ihre Unterstützung bei der Versuchsdurchführung und Auswertung sowie für alles, was ich mit ihrer Hilfe gelernt habe. Andreas Seitz und Claudia Nemitz möchte ich danken für die schönen und lustigen Stunden im Büro und die Aufmunterungen zur richtigen Zeit. Anna Rapp danke ich für die hilfreichen Korrekturen dieser Arbeit. Patrizia Horny und Michael Ohnmacht danke ich für die Hilfe bei der biomechanischen Testung und Auswertung.

Allen Mitarbeitern des Instituts möchte ich sehr danken für die schöne, besondere und prägende Zeit in ihrer Mitte, für die Beantwortung vieler Fragen, die Freundschaften und das immer kollegiale Arbeitsklima.

Den Tierärzten des Tierforschungszentrums Oberberghof in Ulm möchte ich für die angenehme Zusammenarbeit und die guten Ratschläge danken.

Bei Wilhelm Gebel, Ricco Richter und Vanessa Traub bedanke ich mich für die liebevolle Betreuung und Pflege der Schafe und ihre stete Hilfe in allen Situationen.

Ganz besonders bedanken möchte ich mich bei meinen „Schäfle“, von denen mir jedes mit seiner ganz eigenen Art nicht nur für diese Arbeit sehr viel gegeben hat.

Jürgen Günther, Klaus Metzeler und David Willer danke ich für die unvergessliche Zeit die wir zusammen verbringen durften, für die endlose Geduld und all ihre Liebe, die langen Gespräche und ihre Unterstützung in jeder nur denkbaren Form – vom Kochen bis zum Korrektur lesen. Anne-Kathrin Siegloch, Anne-Kathrin Fink und David Hänle sowie all meinen Freunden möchte ich von Herzen danken für die schönen und die manchmal schwierigen gemeinsamen Stunden, auch wenn wir nicht immer das tun konnten was wir uns vorgenommen hatten.

Meiner Familie danke ich sehr dafür, dass sie mich immer bedingungslos unterstützt hat und mir ermöglichte, meinen Weg zu gehen. Danke für eure Geduld und euer großes Verständnis in allen Lebensphasen.