

Aus der Chirurgischen Klinik und Poliklinik
für Allgemein-, Unfall- und Wiederherstellungschirurgie
der Ludwig–Maximilians–Universität München
Vorstand: Prof. Dr. Wolfgang Böcker

**Evaluation des histo-pathologischen Outcomes nach Versorgung von
Frakturen kleiner Röhrenknochen mit Bio-ISOS I Implantaten im Tiermodell**

Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwigs–Maximilians–Universität München



Vorgelegt von
Jan Christian Bruder
aus Frankfurt am Main

2022

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Priv. Doz. Dr. Oliver Pieske

Mitberichterstatter: Prof. Dr. Christoph Walz
PD Dr. Attila Aszódi

Mitbetreuung durch den
promovierten Mitarbeiter: Priv. Doz. Dr. Axel Greiner

Dekan: Prof. Dr. med. Thomas Gudermann

Tag der mündlichen Prüfung: 17.11.2022

Meinen Eltern

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	10
1.1	Relevanz des Themas	10
1.2	Etablierte Methoden der Frakturversorgung kleiner Röhrenknochen.....	12
1.2.1	Osteosyntheseverfahren zur Versorgung kleiner Röhrenknochen	12
1.2.2	Nachteile etablierter Verfahren der Frakturversorgung.....	16
1.3	Bio-ISOS I	17
1.3.1	Biomechanische Versuchsreihen.....	18
1.3.2	In vivo Versuche am Tiermodell.....	20
1.4	Hintergrund.....	21
1.4.1	Histologie des Knochens	21
1.4.2	Histo-pathophysiologische Merkmale der Frakturheilung.....	23
1.4.3	Pathologisch verzögerte Frakturheilung.....	28
2	Zielsetzung und Forschungsfragen.....	31
3	Material und Methoden	32
3.1	Studienkollektiv und Versuchsaufbau.....	33
3.2	Makroskopische Vorgehensweise.....	36
3.3	Mikroskopische Vorgehensweise.....	39
4	Ergebnisse	45
4.1	Deskription der Kenndaten zu Versuchstieren und OP.....	45
4.2	Deskription der Score Variablen.....	46
4.2.1	Vereinigung der Frakturenenden („ <i>Union</i> “)	47
4.2.2	Corticalis („ <i>Cortical integrity</i> “)	48
4.2.3	Spongiosa („ <i>Cancellous Bone</i> “)	49
4.2.4	Defektheilung („ <i>Filling of defect</i> “).....	50
4.2.5	Knochenmark („ <i>Bone marrow</i> “)	51
4.2.6	Entzündungsreaktion („ <i>Inflammation</i> “) und implantatassoziierte ossäre Reaktionen (Osteolysen)	52
4.3	Gesamt-Score der Frakturheilung.....	53
4.3.1	Vergleich innerhalb der Gruppen	53
4.3.2	Vergleich zwischen den Gruppen	59
5	Diskussion.....	63
5.1	Zusammenfassung der Ergebnisse	63

5.2	Vergleich mit den makroskopischen und radiologischen Ergebnissen der Bio-ISOS I Studie	64
5.3	Diskussion der Ergebnisse im wissenschaftlichen Kontext	66
6	Zusammenfassung	73
7	Literaturverzeichnis	74
8	Anhang	80
8.1	Ergänzendes Material	80
8.1.1	Material und Methoden	80
8.1.2	Bildmaterial.....	82
8.2	Eidesstattliche Versicherung	107
9	Danksagung	108

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Evaluierte Parameter	35
Tabelle 2: Übersicht der verwendeten Färbemethode [51]	41
Tabelle 3: Scores zur Operationalisierung der Frakturheilung	42
Tabelle 4: Kennziffern zu Versuchstieren und OP	45
Tabelle 5: Deskription der Score Variable "Union"	47
Tabelle 6: Deskription der Score Variable "Cortical integrity"	48
Tabelle 7: Deskription der Score Variable "Cancellous Bone"	49
Tabelle 8: Deskription der Score Variable "Fulling of defect"	50
Tabelle 9: Deskription der Score Variable "bone marrow"	51
Tabelle 10: Vergleich der Schnittstellen der 4 Wochen Gruppe	54
Tabelle 11: Vergleich der Schnittstellen der 8 Wochen Gruppe	55
Tabelle 12: Vergleich der Schnittstellen der 16 Wochen Gruppe	56
Tabelle 13: Vergleich der Schnittstellen der 24 Wochen Gruppe	57
Tabelle 14: Vergleich der Schnittstellen der 48 Wochen Gruppe	58
Tabelle 15: Deskriptive Statistik des Gesamt-Scores stratifiziert nach Wochen Gruppen	59
Tabelle 16: Test auf Normalverteilung	60
Tabelle 17: Test auf Varianzhomogenität	60
Tabelle 18: Welch-ANOVA	60
Tabelle 19: Post-hoc-Test	61
Tabelle 20: Kodierung der Score Variablen	80

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schematische Darstellung einer Plattenosteosynthese bei multifragmentärer Metacarpalfraktur [26]	12
Abbildung 2: Schematische Darstellung einer Zugschraubenosteosynthese [24]	13
Abbildung 3: Schematische Darstellung einer intramedullären Kirschner-Draht Osteosynthese eines Metacarpalknochens [27]	14
Abbildung 4: Schematische Darstellung einer elastisch stabilen intramedullären Nagelung (ESIN) an der Clavicula [33]	15
Abbildung 5: Schema der Bio-ISOS I Osteosynthese [20]	17
Abbildung 6: Osteone im ungefärbten Knochenschliff	22
Abbildung 7: Schematische Darstellung der Substantia compacta eines Röhrenknochens [52]	22
Abbildung 8: Schematische Darstellung der indirekten Frakturheilung [52]	27
Abbildung 9: Versuchstierpopulation	34
Abbildung 10: Präparation des Operationsgebiets [20]	36
Abbildung 11: Osteotomie [20]	37
Abbildung 12: Implantation der Bio-ISOS I Schiene [20]	38
Abbildung 13: Durch Bio-ISOS I Implantat versorgte Fraktur [20]	38
Abbildung 14: Übersicht der Einzelschritte der Präperatherstellung	39
Abbildung 15: Anfertigung der Knochenschnitte	40
Abbildung 16: Gewebekasette mit Präparat	40
Abbildung 17: Schema der Knochenschnitt-Präparate	40
Abbildung 18: Konservierter Knochenschnitt in Paraffin	41
Abbildung 19: Algorithmus zur histo-pathologischen Auswertung der Knochenschnitte.....	43
Abbildung 20: Mittelwertvergleich der Score Variable Union.....	47
Abbildung 21: Mittelwertvergleich der Score Variable Cortical integrity.....	48
Abbildung 22: Mittelwertvergleich der Score Variable Cancellous bone.....	49
Abbildung 23: Mittelwertvergleich der Score Variable Fulling of defect.....	50
Abbildung 24: Mittelwertvergleich der Score Variable Bone marrow.....	51
Abbildung 25: 4 Wochen Gruppe - Vergleich der Schnittstellen.....	54
Abbildung 26: 8 Wochen Gruppe - Vergleich der Schnittstellen.....	55
Abbildung 27: 16 Wochen Gruppe - Vergleich der Schnittstellen.....	56
Abbildung 28: 24 Wochen Gruppe - Vergleich der Schnittstellen.....	57
Abbildung 29: 48 Wochen Gruppe - Vergleich der Schnittstellen.....	58
Abbildung 30: Vergleich des Gesamt-Scoring zwischen aller Versuchsgruppen.....	59
Abbildung 31: Analyseplan zur Auswertung des Gesamt-Scores	81
Abbildung 32: 4 Wochen – Detailansicht proximaler Knochenschnitt (Versuchstiernr.: 049110).....	82
Abbildung 33: 4 Wochen – Übersichtsansicht proximaler Knochenschnitt (Versuchstiernr.: 049110).....	83
Abbildung 34: 4 Wochen – Detailansicht mittlerer Knochenschnitt (Versuchstiernr.: 049344)	84
Abbildung 35: 4 Wochen – Detailansicht distaler Knochenschnitt (Versuchstiernr.: 049066)	85
Abbildung 36: 4 Wochen – Detailansicht distalen Knochenschnitt (Versuchstiernr.: 049110)	86

Abbildung 37: 4 Wochen - Übersichtsansicht mittiger Knochenschnitt (Versuchstiernr.: 049110).....	87
Abbildung 38: 4 Wochen – Übersichtsansicht proximaler Knochenschnitt (Versuchstiernr.: 047373).....	88
Abbildung 39: 4 Wochen – Detailansicht mittiger Knochenschnitt (Versuchstiernr.: 047373)	89
Abbildung 40: 8 Wochen – Übersichtsansicht proximaler Knochenschnitt (Versuchstiernr.: 029350).....	90
Abbildung 41: 8 Wochen - Übersichtsansicht mittiger Knochenschnitt (Versuchstiernr.: 029350).....	91
Abbildung 42: 8 Wochen – Detailansicht mittiger Knochenschnitt (Versuchstiernr.: 029350)	92
Abbildung 43: 8 Wochen – Detailansicht proximaler Knochenschnitt (Versuchstiernr.: 030365).....	93
Abbildung 44: 16 Wochen – Übersichtsansicht mittiger Knochenschnitt (Versuchstiernr.: 130127).....	94
Abbildung 45: 16 Wochen – Detailansicht mittiger Knochenschnitt (Versuchstiernr.: 130127).....	95
Abbildung 46: 16 Wochen - Übersichtsansicht distaler Knochenschnitt (Versuchstiernr.: 134106).....	96
Abbildung 47: 16 Wochen – Übersichtsansicht proximaler Knochenschnitt (Versuchstiernr.: 134130).....	97
Abbildung 48: 24 Wochen – Übersichtsansicht proximaler Knochenschnitt (Versuchstiernr.: 7368).....	98
Abbildung 49: 24 Wochen – Überblicksansicht proximaler Knochenschnitt (Versuchstiernr.: 7369).....	99
Abbildung 50: 24 Wochen – Detailansicht proximaler Knochenschnitt (Versuchstiernr.: 7369).....	100
Abbildung 51: 24 Wochen – Detailansicht mittiger Knochenschnitt (Versuchstiernr.: 7369)	101
Abbildung 52: 48 Wochen – Detailansicht proximaler Knochenschnitt (Versuchstiernr.: 16341).....	102
Abbildung 53: 48 Wochen- Detailansicht mittiger Knochenschnitt (Versuchstiernr.: 16389)	103
Abbildung 54: 48 Wochen - Übersichtsansicht proximaler Knochenschnitt (Versuchstiernr.: 16341).....	104
Abbildung 55: 48 Wochen- Übersichtsansicht mittiger Knochenschnitt (Versuchstiernr.: 16363).....	105
Abbildung 56: 48 Wochen – Detailansicht distaler Knochenschnitt (Versuchstiernr.: 16363).....	106

Abkürzungsverzeichnis

Bio-ISOS	Bioresorbierbare Intramedulläre Spann-Osteo-Synthese
CT	Computertomographie
°C	Grad Celsius
DIN EN ISO	Deutsches Institut für Normung, für Europäische Norm und für International Organization for Standardization
EDTA	Ethylene Diamine Tetraacetic Acid
HE	Hämatoxylin-Eosin
i.m.	intra-musculär
i.v.	intra-venös
K-Draht	Kirschner Draht
kg	Kilogramm
Max	Maximum
mg	Milligramm
Min	Minimum
N	Newton
NaCl	Natrium-Chlorid
OP	Operation
PCL	Poly-ε-Caprolacton
PP	Polypropylen
SD	Standardabweichung
sig.	signifikant
µg	Mikrogramm

1 Einleitung

1.1 Relevanz des Themas

Knochenfrakturen zählten zu den 20 am häufigsten gestellten Hauptdiagnosen in deutschen Kliniken [1], die bei den unter 70-jährigen als Unfallfolge bei 18% aller Männer und sogar 25% aller Frauen auftritt. Bei Patienten über 70 Jahre steigt das Frakturrisiko bei Männern auf ein Drittel aller Geschädigten, während es bei Frauen sogar die Hälfte aller Betroffenen sind.[2]

Frakturen sind für die Patienten nicht nur mit Schmerzen und Immobilisation verbunden, sie können auch schwerwiegende Komplikationen und Folgeschäden wie Blutungen, sensomotorische Defizite oder akuten bis langfristigen Funktionsverlust mit sich bringen und müssen deshalb schnell und effizient versorgt werden. Für die Patienten stehen vor allem Schmerzfreiheit, eine möglichst schnelle Genesung und die vollständige Wiederherstellung der Funktion im Vordergrund. Diese Forderung nach schneller Rehabilitation wird nicht nur durch die individuelle Lebensgestaltung beeinflusst, sondern auch durch den erhöhten Leistungsdruck an Erwerbstätige sowie den Druck der Gesundheitsökonomie [3-8].

Um diesen Anforderungen gerecht zu werden, bedarf es neuer Operationstechniken und -materialien, die eine sichere und effiziente Alternative zu den herkömmlichen Osteosyntheseverfahren (vgl. Kapitel 1.2) bieten. Durch den Einsatz resorbierbarer Materialien zur Versorgung von Frakturen können viele Probleme, die mit dem Einsatz metallischer Implantate verbunden sind (siehe 1.2.2), verhindert werden. Gerade in Hinblick auf die minimal-invasive Versorgung von Frakturen und den Verzicht auf eine erneute Operation zur Metallentfernung werden Methoden dieser Art auch in Zukunft immer mehr an Bedeutung gewinnen.[9] Vor allem resorbierbaren Implantaten auf der Basis von Laktiden und Glycolsäuren wurde in der Vergangenheit in der Forschung große Aufmerksamkeit geschenkt, weil diese Polyester durch einfache Hydrolyse in ihre unschädlichen, nicht toxischen Grundbausteine zerlegt werden können, die dann über die Niere ausgeschieden werden.[10,8,11,12] Weiterhin ermöglichen die bioresorbierbaren Kunststoffe, die eine dem biologischen Knochen näherliegende Steifigkeit besitzen als die herkömmlichen Osteosyntheseverfahren, durch den voranschreitenden Abbauprozess dem Knochen ein sukzessives Erreichen der Eigenstabilität [11-15].

Durch die Optimierung der Gewebeverträglichkeit und der mechanischen Belastbarkeit von bioresorbierbaren Kunststoffen konnte durch Herrn PD Dr. med. Oliver Pieske im Jahr 2007 ein neuartiges bioresorbierbares Implantat zur Stabilisierung von Schafffrakturen kleiner Röhrenknochen erfunden werden. Dieses Implantat ist im Rahmen des „Bio-ISOS“ Projektes Grundlage dieser Arbeit. „Bio-ISOS“ setzt sich wie folgt zusammen:

Bio	Bioresorbierbare
I	Intramedulläre
S	Spann-
O	Osteo-
S	Synthese

Im Rahmen dieses Projektes wurde nicht nur eine neue Methode zur Stabilisierung von Schafffrakturen kleiner Röhrenknochen, sondern ebenfalls ein neuartiges Implantat aus bioresorbierbarem Material entwickelt. Dieses kann eine Fraktur intramedullär stabilisieren und durch einen durch das Implantat verlaufenden Faden, welcher extramedullär auf beiden Seiten jenseits der Fraktur verankert ist, Kompression auf den Frakturspalt ausüben und so zur Heilung und Stabilisierung der Fraktur beitragen [8,16]. In vorausgegangenen experimentellen Arbeiten aus den Feldern der Medizin, Biomechanik, Kunststofftechnik, molekularer Chemie und Industrie wurde das Implantat bereits eingehend untersucht. [17-19,8]. Anschließend an die Erprobung des Implantats im in vivo Kaninchenmodell [20] untersucht diese Arbeit nun das histo-pathologische Ergebnis nach einer Versorgung mit Bio-ISOS Implantat im Kaninchenmodell.

1.2 Etablierte Methoden der Frakturversorgung kleiner Röhrenknochen

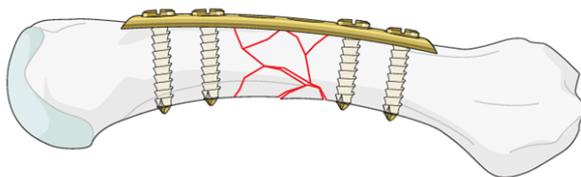
Der Einsatz metallischer Osteosynthesematerialien wie Platten, Schrauben oder Marknägel ist die etablierte Methode zur Versorgung von Frakturen in der Unfallchirurgie. Diese in der Regel sehr stabilen Fixationsverfahren von Knochenfragmenten führen zu guten klinischen Resultaten, bringen allerdings auch zahlreiche potentielle Komplikationen mit sich und machen oftmals Folgeeingriffe notwendig.[9,21,10]

1.2.1 Osteosyntheseverfahren zur Versorgung kleiner Röhrenknochen

Da das Bio-ISOS (**B**ioresorbierbare **I**ntramedulläre **S**pann-**O**steo-**S**ynthese) Implantat in der momentanen Version nur für die Versorgung kleinerer Röhrenknochen gedacht ist, soll an dieser Stelle lediglich auf Osteosyntheseverfahren eingegangen werden, die üblicherweise für die Versorgung von Frakturen an Knochen wie Ossea metacarpales/– tarsales, Phalangen, Claviculae oder Rippen verwendet werden.[22,23,8,17]

Plattenosteosynthese

Bei diesem Verfahren wird die Platte mittels Schrauben auf dem Knochenperiost befestigt, um die Fraktur von beiden Seiten zu fixieren. Dies kann entweder mittels winkelstabiler Schrauben oder Cortikalisschrauben geschehen. Die Plattenform richtet sich nach anatomischer Lokalisation der Versorgungsstelle und Operationstechnik. Diese Art der Osteosynthese wird in der Regel bei mehrfragmentären oder komplexen Frakturen angewandt.[24,25,7]



AO

Abbildung 1: Schematische Darstellung einer Plattenosteosynthese bei multifragmentärer Metacarpalfaktur [26]

Zugschraubenosteosynthese

Das Prinzip der Zugschraubenosteosynthese besteht darin, dass eine zwischen den sich gegenüberliegenden Frakturstücken liegende Schraube Kompression auf die Frakturoberflächen ausübt und somit die Fraktur stabilisiert. Beim Eindrehen der Schraube wird das Frakturstück mit dem Gewindeloch an das Gegenstück gezogen und es entsteht Kompression. Eine Zugschraubenosteosynthese erfolgt in den meisten Fällen bei längerstreckigen Spiralfrakturen mittels zwei bis drei Schrauben. [24,25,7] (Abbildung 2)

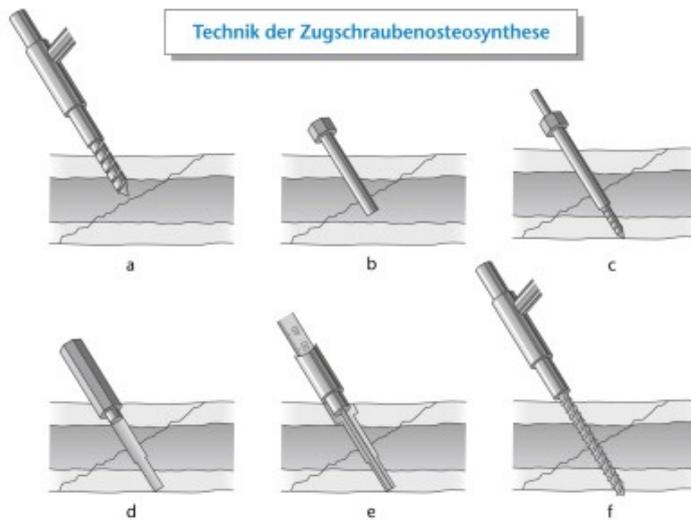


Abbildung 2: Schematische Darstellung einer Zugschraubenosteosynthese [24]

Kirschner Drähte

Drähte in verschiedenen Stärken dienen der Stabilisierung der Fraktur, können jedoch auch als Adaptionsosteosynthese verwendet werden [24]. Sie werden insbesondere als intermedulläre Osteosyntheseverfahren zur Versorgung von einfachen Frakturen von kleinen Röhrenknochen wie zum Beispiel den Phalangen und Metacarpal-/tarsalknochen genutzt. [27] Um eine gewisse Rotationsstabilität zu erreichen, werden idealerweise zwei Kirschner-Drähte eingebracht. Im Bereich der Metacarpalia insbesondere bei Frakturen der Metacarpalia 4 und 5 geschieht dies nach der von Foucher beschriebenen Technik von antegrad über den Markraum. Hierdurch gelingt eine übungsstabile Versorgung der Fraktur.[28,29,23]

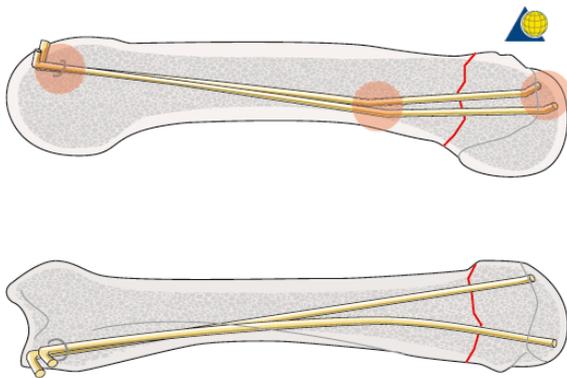


Abbildung 3: Schematische Darstellung einer intramedullären Kirschner-Draht Osteosynthese eines Metacarpalknochens [27]

Elastisch stabile intramedulläre Nagelung (ESIN)

Das Prinzip der Technik einer Frakturversorgung mittels eines elastischen intramedullären Nagels ist eine langstreckige intramedulläre Stabilisierung durch die elastische Vorspannung des Titannagels. So kann aus biomechanischer Sicht im Gegensatz zur Plattenosteosynthese das Problem der wechselnden Zuggurtungsseite bei unterschiedlichen Belastungen der Clavicula umgangen werden [30]. Die Indikation für eine Versorgung mit einer elastischen stabilen intramedullären Nagelung (ESIN) wird hauptsächlich im Rahmen adulter Claviculaschafffrakturen gestellt und hier insbesondere bei jungen, aktiven Patienten [31-33]. Eine Versorgung langer Röhrenknochen wie der Ulna, des Radius oder der Fibula ist aufgrund der nur eingeschränkten Rotationsstabilität im Bereich der Erwachsenen-Frakturversorgung nur selten indiziert. Hierzu zählen unter anderem stark kontaminierte offene Frakturen im Bereich des Unterarmes. Im Bereich der Kinderchirurgie hingegen erfährt die elastisch stabile intramedulläre Nagelung, unter anderem auch aufgrund der Kapazität für ein ausgeprägtes Knochen-Remodelling im Kindesalter, eine breite Akzeptanz. [34]

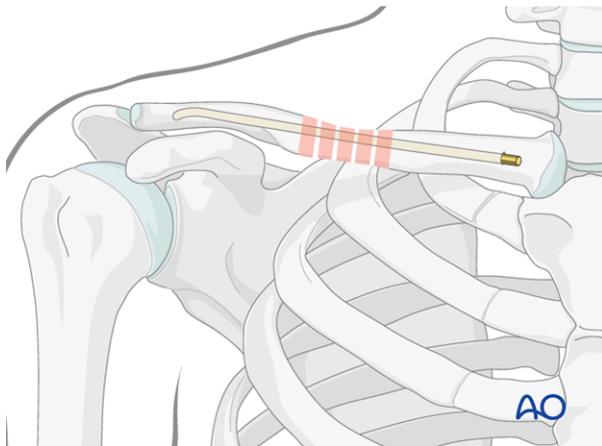


Abbildung 4: Schematische Darstellung einer elastisch stabilen intramedullären Nagelung (ESIN) an der Clavicula [33]

1.2.2 Nachteile etablierter Verfahren der Frakturversorgung

Mit diesen Methoden der Frakturversorgung sind trotz der Entwicklung dünner Titanplatten und -Schrauben eine Reihe von Nachteilen verbunden. Hierzu zählen unter anderem postoperative Bewegungseinschränkungen, die mangelnde Belastbarkeit insbesondere bei Kirschnerdraht-Osteosynthese, die Gefahr inflammatorischer/allergischer Reaktionen des umliegenden Gewebes sowie lokale Weichteilschädigungen wie Sehnenreizungen, Verklebungen und Schädigungen von Nerven und Blutgefäßen [3,5,27,35-37].

Insbesondere nach Versorgung von Klavikulafrakturen trägt eine Plattenosteosynthese gerade bei schlanken Menschen auf und kann zu Fremdkörpergefühl, Wetterfühligkeit oder Beschwerden beim Tragen von Kleidung mit Trägern oder Rucksäcken. Auch im Bereich des Handskeletts stehen die eingebrachten Implantate oft in direktem Kontakt zu wichtigen Strukturen und kann durch Verwachsungen mit z.B. dem Sehnengleitgewebe und den Ansätzen der Mm. lumbricales et interossei bzw. allein durch das Auftragen des Osteosynthesematerials zu erheblichen funktionellen Störungen führen [38,39].

Als sehr invasiv kann die Versorgung von Frakturen mittels Platten-/Draht-/Schraubenosteosynthese aber vor allem deshalb angesehen werden, weil sie oft einen zweiten Eingriff zur Entfernung des Osteosynthesematerials notwendig macht.[40,41] Diese Explantation ist nicht nur deswegen kritisch zu betrachten, weil sie eine weitere Operation mit eingriffsassoziierten Risiken, Narkose und anschließender Rehabilitationszeit notwendig macht und somit zu weiterem ökonomischen Belastungen des Gesundheitssystems führt, sie ist außerdem mit erneuten prä-, intra-, und postoperativen radiologischen Kontrollen verbunden. Dadurch sind die Patienten zum einen einer erhöhten Strahlenbelastung ausgesetzt und zum anderen handelt es sich bei der Bildgebung um einen nicht zu vernachlässigenden Kostenfaktor [40,3,5,42,43]

Ein weiteres Problem im Zusammenhang mit Frakturen ist, dass der Knochen nach Heilung unter starrer metallischer Fixation schwächer wird, was zur Atrophie des Knochens bis zu Osteoporose führen kann.[10,40,44] Dadurch, dass metallische Implantate wesentlich steifer sind als der Knochen kann weiterhin die Bruchheilung durch ungewollten Knochenumbau negativ beeinflusst werden [45,46]. Eine ideale Fixation würde mit dem Fortschreiten des Heilungsprozesses seine Starrheit stetig reduzieren, sodass die mechanische Belastung auf den heilenden Knochen schrittweise gesteigert wird bis das Material schließlich vollständig resorbiert ist.[10]

Um die genannten Nachteile der Platten-/Draht-/Schraubenosteosynthese zu reduzieren, müssen semi-starre Materialien und Fixationsstrategien entwickelt werden. Dies ist im Rahmen des Bio-ISOS I Projektes erfolgt und soll im Folgenden geschildert werden.

1.3 Bio-ISOS I

Im Rahmen des Bio-ISOS I Projektes gelang in Kooperation mit Rheinisch-Westfälischen Technischen Hochschule Aachen (RWTH) die Entwicklung eines intramedullären, resorbierbaren Implantats. (Abbildung 5). Es wurden bereits vergleichende Arbeiten zu Degradation und mechanischer Belastbarkeit im Vergleich zu anderen bioresorbierbaren Kunststoffen von der Arbeitsgruppe Bio-ISOS durchgeführt und veröffentlicht [17,18,8].

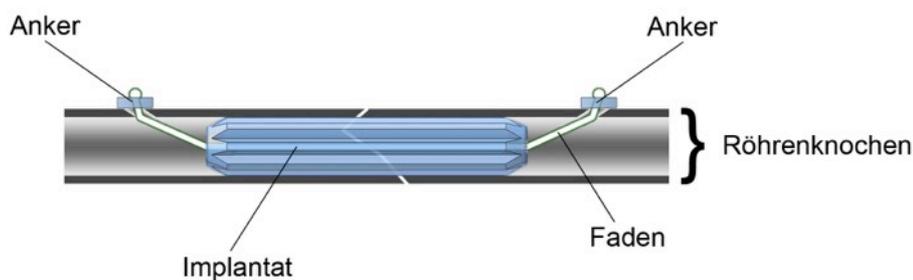


Abbildung 5: Schema der Bio-ISOS I Osteosynthese [20]

Das Implantat besteht aus Resomer LR 704 S (70% L-Lactid, 30% D,L-Lactid) und Poly-ε-Caprolacton (PCL), welche hydrolytisch abgebaut werden. Während die Abbauphase des L-Lactids über 36 Monate beträgt, wird der D,L-Lactid-Anteil bereits in 12-18 Monaten resorbiert. So gelang die Entwicklung eines passenden Implantats mit ausreichend langer Resorptionszeit, welches nicht zu spröde und gleichzeitig stabil genug ist, um dem Knochen ausreichende Stabilität während der Heilung zu geben. Es handelt sich um ein röhrenförmiges Implantat mit einer lamellenartigen Oberfläche, welches sich in der Markhöhle fest verzahnt und dadurch Rotationsstabilität erzeugt. Durch den längs hindurch verlaufende Faden kann eine Zugspannung aufgebaut werden, die eine Kompression der Fraktur ermöglicht. Der Anker überträgt dann die Kraft des Fadens auf den Knochen wodurch die Kompression der Frakturrenden noch weiter erhöht wird. Wie die Schiene besteht auch der Fadenanker aus Resomer LR 704 S und PCL. Eine medizinische Zulassung des Werkstoffes ist bereits erfolgt. [17,18,8,47]

Das entwickelte Implantat wurde anschließend sowohl biomechanisch als auch in vivo im Tiermodell getestet:

1.3.1 Biomechanische Versuchsreihen

Im Folgenden soll ein Überblick über die Ergebnisse der biomechanischen Versuchsreihen gegeben werden, die den Versuchen im Tiermodell voraus gingen. Für genauere Informationen zur methodischen Vorgehensweise und detaillierten Ergebnissen siehe *Pieske 2010* [8] und *Massen 2018* [20].

Biegeversuche

Nach den Vorgaben des DIN EN ISO 7438 (Deutsches Institut für Normung e.V., 2005), wurde das Implantat zunächst im 3-Punkt Biegeversuch im Vergleich zu PCL und Polypropylen (PP) auf seine Belastbarkeit getestet. Die Ergebnisse zeigten, dass das Bio-ISOS Implantat aus Resomer LR704 S die signifikant ($p < 0,001$) höchste Belastbarkeit von 227,38 N aufwies (PCL: 57,20N; PP: 110,39N). [8]

In vitro Degenerationsversuche

Der in vitro Degenerationsversuch zur Prüfung des Abbauverhaltens zeigte, dass die Masse der Implantate sowie der pH der Lösung in den ersten 8 Wochen im Schüttelinkubator bei 37 °C konstant blieben. Die Belastbarkeit lag nach diesem Zeitraum im Mittel noch bei 121,84 N. Damit lag die Belastbarkeit im 3-Punkt-Biegeversuch nach 8 Wochen noch über der Belastbarkeit (89 N) einer winkelstabilen VariAx-Platte vom Stryker®-Handsieb (Stryker GmbH & Co KG, Dr.-Homer-Stryker-Platz 1, 47228 Duisburg). Da man nach 6 bis 8 Wochen von einer ausreichenden Heilung einer Fraktur ausgehen kann,[24] sollte die Osteosynthese mittels Bio-ISOS aus Resomer LR 704 S eine ausreichende Stabilität erbringen. [8,17]

Faden-Ausreißversuche

Weiterhin wurden verschiedene Fäden im Ausreißversuch sowohl im trockenen als auch im feuchten Milieu getestet. Zur Evaluierung der Bio-ISOS Anwendbarkeit wurde eine Auswahl des gängigen chirurgischen Fadenmaterials im speziell entwickelten Testapparat mit einer ZWICK Z010 Universalprüfmaschine bis zum Versagen getestet. Voll resorbierbare Fäden zeigten eine vergleichbar geringere Belastbarkeit und Knotenstabilität im Vergleich zu den teil- und nicht-resorbierbaren Fäden. [8]

Im *trockenen Milieu* waren die nicht resorbierbaren FiberWire®-Fäden mit einer Belastbarkeit von 150-250 N am stabilsten gefolgt von den teilresorbierbaren Orthocord™-Fäden (Belastbarkeit 130-150N). [8]

Die Testung der Fäden im *feuchten Milieu* diente der Simulation quasi physiologischer Verhältnisse. Hierfür wurde ein Testapparat angefertigt, der den Kraftverlauf in einem Zeitintervall von 2 Wochen gemessen hat. An die Fäden wurde eine Vorspannung von 40 N angelegt und der Kraftabfall mittels Biegebalkensensor gemessen. Der Versuch wurde in einem Bad aus isotoner NaCl-Lösung bei 37°C durchgeführt. Die voll-resorbierbaren Fäden versagten bereits vor dem Erreichen der zwei Wochen. Die höchste Reißfestigkeit zeigten, wie im trockenen Milieu, die FibreWire®- (nicht-resorbierbar) und Orthocord™- (teil-resorbierbar) Fäden, beide mit der identischen Belastungsdauer von 310 Stunden. In Folge dieser Ergebnisse aus langer Belastbarkeit und hoher Reißfestigkeit wurde der teilresorbierbare Orthocord™ in den Tierversuchen verwendet. [8]

Fadenanker

Auch die Testung der Fadenanker wurde mittels Zwick Z010 in einem Zugversuch durchgeführt. Hierzu wurden die Anker in eine Aluminiumplatte eingespannt und ein Versagen des Ankers durch Ausriss des Steges im Anker getestet. Das Kraftmaximum des Resomer LR 704 S-Ankers betrug 72,5 N (SD $\pm 4,75$ N), während der PCL-Anker bereits bei einer Belastung von 35,8 N (SD $\pm 10,5$ N) versagte. [8]

Bio-ISOS Osteosynthese

Schließlich wurden die Bio-ISOS Implantate mit gängigen Osteosyntheseverfahren verglichen. 10 cm lange Zylinder aus Knochenersatzmaterialien der 4. Generation (Sawbones®, Sawbones Europe AB, Krossverksgatan 3, 21616 Malmö, Schweden) wurden mittig osteotomiert und die Osteosynthese wahlweise mit Platten des Leibinger Sets von Stryker® (Profyle-Hand 2.3 mm 6-Loch-Standardplatte, Profyle-Hand 2.3 mm 6-Loch-kompressionsplatte, Vari-Ax-Hand 2.3 mm 6-Loch-Verblockungsplatte), intramedullären Kirschner-Drähten (1,6mm) [48] und Bio-ISOS Implantaten durchgeführt. Anschließend wurde ein 4-Punkt-Biegeversuch nach ASTM F382 [49] zur Ermittlung der maximalen Belastung durchgeführt. Das Bio-ISOS Implantat zeigte hierbei die größte Belastbarkeit (62,0 N, SD $\pm 3,58$ N), gefolgt von den Kirschner-Drähten, die jedoch lediglich einer Kraft von 32,9 N (SD $\pm 4,5$ N) standhielten. Von den getesteten Platten des Leibinger Sets von Stryker erreichte die winkelstabile Platte den höchsten einen mittleren F_{max} - Wert von 22,80 N (SD $\pm 0,76$ N). Somit zeigt sich das Bio-ISOS Implantat 1,9-fach stabiler als die Kirschnerdraht-Osteosynthese. [8,17]

1.3.2 In vivo Versuche am Tiermodell

An dieser Stelle sollen die der Arbeit im Rahmen von Bio-ISOS I vorausgegangenen Versuche am Tiermodell kurz geschildert werden. Detailliert wird das methodische Vorgehen in den Tiermodellen im Kapitel 2 *Material und Methoden* dargestellt.

Es wurden 5 Gruppen á 4 Tieren per Zufallsverfahren der rechte oder linke Femur osteotomiert und anschließend mit dem Bio-ISOS Implantat versorgt.

Die Versuchstiere wurden nach 4,8,16,24 bzw. 48 Wochen euthanisiert. CT-Untersuchungen wurden jeweils nach der Hälfte des Untersuchungszeitraums und am Ende der Gruppenlaufzeit durchgeführt. Anhand der CT-Daten wurden Kortikalisdicke und Gesamtdurchmesser des versorgten Femurschaftes sowie der nicht-osteotomierten Gegenseite (Referenzwert) erhoben. Für die 4 Wochen Gruppe wurden keine CT Untersuchungen durchgeführt.

Makroskopisch zeigte sich in den CT-Untersuchungen kein signifikanter Unterschied in der Kortikalisdicke zwischen operiertem und gesundem Femur. Weiterhin wurden keine Entzündungsprozesse oder sonstige osteodestruktiven Vorgänge festgestellt.[20]

Die histo-pathologische Analyse der Knochen ist der Gegenstand der vorliegenden Arbeit. Hintergrund, methodisches Vorgehen und Ergebnisse werden im Folgenden geschildert.

1.4 Hintergrund

1.4.1 Histologie des Knochens

Das Knochengewebe baut sich aus drei dafür spezifischen Zelltypen auf, den Osteoblasten, den Osteoklasten und den Osteozyten. Diese sind umgeben von Knochengrundsubstanz bestehend aus kollagenen Fasern vom Typ I, Proteoglycanen, Glykoproteinen und anorganischen Bestandteilen. Diese Grundsubstanz, das Osteoid, wird durch die Osteoblasten gebildet. Die Härte des Knochens wird durch die Einlagerung von Hydroxylapatit in das Osteoid bedingt. Hat sich die Grundsubstanz verhärtet, sind die synthetisierenden Osteoblasten von Knochenmatrix eingemauert und verlieren ihre Funktion, sie werden damit zu Osteozyten. Da im Knochen permanente Umbauvorgänge stattfinden, sind Osteoklasten zum Abbau des Knochens notwendig. Durch den Abbau von Knochenmaterial kann beispielsweise der Blutcalciumspiegel erhöht werden. [50-52]

Weiter unterscheidet man zwei verschiedene Knochenformen, den Geflecht- und den Lamellenknochen: Beim Knochenwachstum entsteht zunächst der flexiblere Geflechtknochen, der dann zu Lamellenknochen umgewandelt wird. Bei Erwachsenen ist schließlich bis auf wenige Ausnahmen (knöchernes Labyrinth) nur noch Lamellenknochen in der Skelettstruktur vorhanden.

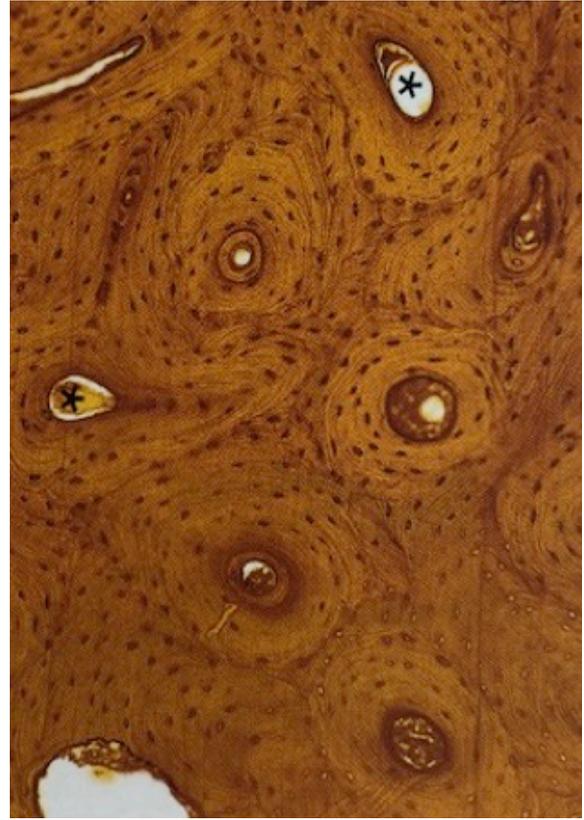
Der Geflechtknochen besteht aus einer *Substantia compacta*, die die stabile Wandung des Knochens bildet und einer bälkchenhaften *Substantia spongiosa*, die im Inneren des Knochens liegt. Mikroskopisch zeichnet sich Geflechtknochen dadurch aus, dass Kollagenfasern und Knochenzellen unregelmäßig verteilt sind.

Bei Lamellenknochen hingegen sind histologisch vor allem zahlreiche Lamellensysteme, in denen die Kollagenfibrillen geschichtet angeordnet sind, auffallend. Die Grundeinheit des Knochens sind zahlreiche Osteone mit zentral gelegenem „Havers Kanal“, durch welchen die den Knochen versorgenden Blutgefäße verlaufen. Zwischen den einzelnen Lamellenschichten des Osteons liegen außerdem die Lakunen. Von ihnen gehen zahlreiche Knochenkanälchen („Canaliculi“), die die Lakunen untereinander und den „Havers Kanal“ miteinander verbinden, aus. Die Lakunen beherbergen die Zellkörper, die „Canaliculi“ die Zellfortsätze der Osteozyten. Zwischen den Osteonen finden sich gestapelte Lamellenreste, sogenannte „Schaltlamellen“. Es handelt sich hierbei um bereits zum größten Teil abgebaute Osteone. Die quer verlaufenden „Volkmann-Kanäle“ verbinden die Gefäßversorgung der „Havers-Kanäle“ untereinander und mit dem Periost. (Abbildung 6/ Abbildung 7)

[50,51]



[51]



[51]

Abbildung 6: Osteone im ungefärbten Knochenschliff

(Femurdiaphyse des Menschen)

1,2: Osteon; *: Harvers Kanal; ->: Canaliculi

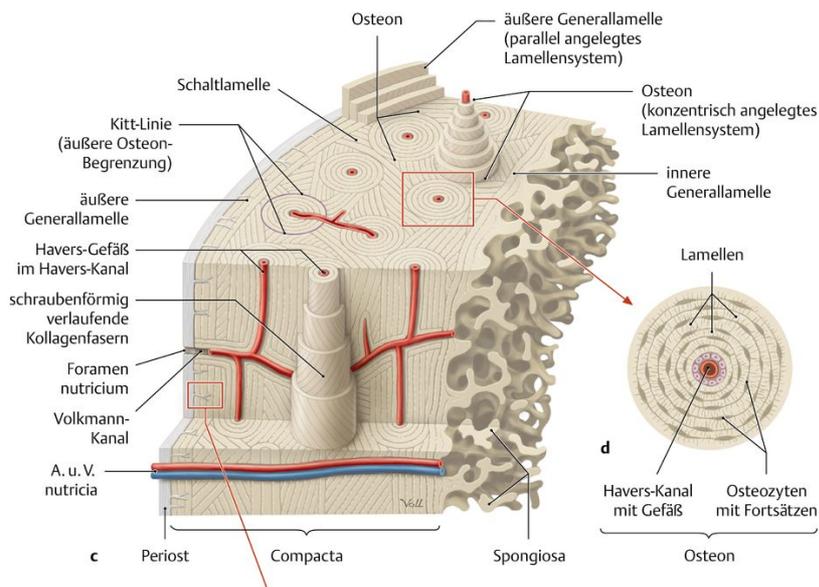


Abbildung 7: Schematische Darstellung der Substantia compacta eines Röhrenknochens [52]

1.4.2 Histo-pathophysiologische Merkmale der Frakturheilung

Knochen zählen zu den stabilen Geweben des Körpers, welche aus differenzierten, langlebigen Zellen bestehen. Dieser Zellpool befindet sich nach Abschluss des Wachstums im G₀-Zustand des Zellzyklus, unterläuft also keiner Zellteilung mehr.

Der Zellzyklus teilt sich in die vier Phasen der

- (1) G₁-Phase: Zellwachstum, RNA- und Proteinsynthese
- (2) S-Phase: DNA-Replikation
- (3) G₂-Phase: Kontrollphase, Fehlpaarungs-Reparaturen
- (4) M-Phase: Zellteilung

nach (4) können einige Zellen in die reversibel inaktive G₀ Phase eintreten. Bedingt wird der Eintritt in die G₀-Phase durch eine niedrige Konzentration an Wachstumsfaktoren, das Erreichen eines bestimmten Differenzierungsgrades oder einer hohen Populationsdichte.
[53]

Bei Verletzung jedoch können diese Zellen reaktiviert werden, wodurch der Heilungsvorgang beispielsweise einer Fraktur durch die Bildung von neuem Gewebe möglich ist. Durch die gute Durchblutung des Knochens und die Möglichkeit einer raschen Aktivierung der benötigten Zellgruppen besitzt der Knochen ein sehr gutes Heilungspotential. Hierdurch nimmt der Knochen eine Sonderstellung ein, da er selbst bei vollständiger Kontinuitätsunterbrechung die Fähigkeit zur organotypischen Regeneration besitzt.
[50,51,54-59]

Bei der Knochenheilung unterscheidet man zwischen primärer/direkter und sekundärer/indirekter Frakturheilung:

Primäre/direkte Frakturheilung

Merkmal der primären Knochenheilung ist, dass die Frakturflächen der beiden Knochenenden eng aufeinander liegen (Abstand $<1\text{mm}$). Idealerweise werden die Knochenfragmente unter Druck aneinander gepresst. Eine primäre, direkte Frakturheilung kann somit nur durch eine stabile Osteosynthese (Kompressionsosteosynthese) oder im Falle einer Fissur und vollständiger Ruhigstellung stattfinden. Durch den direkten Kontakt der Knochenflächen erfolgt nur eine sehr geringe Kallusbildung, da kein Frakturspalt überbrückt werden muss. Die neu gebildeten Osteone können direkt in das vorhandene Knochenmaterial einwachsen. Aus den auseinander frakturierten Havers-Kanälen können durch den engen Kontakt direkt Kapillaren und Osteoklasten in die anliegende Frakturhälfte einsprießen. Die Osteoklasten bilden Resorptionskanäle, die durch Osteoblasten mit Knochengewebe ausgefüllt werden, wodurch die beiden Knochenenden fest miteinander verbunden werden. Die direkte Frakturheilung verläuft im Vergleich zur sekundären, indirekten Frakturheilung ausgesprochen langsam, von einer Remodelingphase von 1-1,5 Jahren ist auszugehen. Insbesondere bei der Indikationsstellung einer Metallentfernung sollte dies berücksichtigt werden. [51,54,50,57,60,61,59]

Sekundäre/indirekte Frakturheilung

Bei einem Frakturspalt >1mm oder dislozierten Frakturen kommt es zur sekundären Frakturheilung. Diese läuft in den folgenden Phasen ab (Abbildung 8):

Frakturphase (Minuten bis Stunden)

Aufgrund einer Gewalteinwirkung kommt es zu einer Durchbrechung der Kontinuität von Periost, Kortikalis und Spongiosa sowie der Durchtrennung der periostalen und medullären Blutgefäße, wodurch sich ein Hämatom bildet. [57,60,61,59]

Inflammatorische Phase (48-72h)

Die Frakturphase geht unmittelbar in die inflammatorische Phase über. Durch das Frakturhämatom werden zunächst das Koagulationssystem aktiviert und vasoaktive Regulatoren freisetzt. Es kommt zur Freisetzung und Anreicherung von Morphogenen und Wachstumsfaktoren sowie zu einer Aktivierung von pluripotenten Zellen. Die Konzentration an Entzündungsmediatoren wie Interleukinen (IL-1, IL-6, IL-11, IL-18, TNF-alpha) ist deshalb die ersten Tage nach dem Frakturereignis signifikant erhöht. Es kommt zu Prozessen der Plättchenaggregation und Angiogenese. Durch das Gefäßtrauma im Rahmen der Fraktur und der somit unterbrochenen Blutversorgung kommt es zur Hypoxie des Gewebes wodurch die Osteozyten am Ende der beiden Frakturhälften unterversorgt werden und degenerieren. Eingewanderte Makrophagen phagozytieren diese nekrotischen Bereiche und schütten gleichzeitig Signalfaktoren für die Stimulation des Knochenwachstums aus (Bone morphogenic Proteins: BMP-2, -5, -7; transforming growth factor beta: TGF-beta; plaetet-derived growth factor: PDGF; insulin-like growth factor: IGF). Diese Wachstumsfaktoren bewirken das Einwandern, die Proliferation und Differenzierung von mesenchymalen Stammzellen. Aus diesen Stammzellen differenzieren sich neben Angioblasten und Chondroblasten auch endotheliale Zellen, Fibro- und Osteoblasten. Diese wandeln das Frakturhämatom zunächst in Granulationsgewebe aus Fibroblasten, Kollagenfasern und einsprossenden Gefäßproliferaten um. [57,60,61,59]

Proliferative Phase, Granulationsphase, Phase des weichen Kallus (72h-6 Wochen)

Nach Abklingen der Entzündungsreaktion ist das Hämatom zunächst mit Fibrin und Kollagenfibrillen durchzogen. Unter dem Einfluss der Wachstumsfaktoren (s.o.) wird dieses durch Granulationsgewebe mit Fibroblasten, neu gebildetem Kollagen sowie Kapillaren ersetzt und bildet als Brücke zwischen den Frakturrenden den sogenannten weichen Kallus. Im Rahmen der „primären Kallusreaktion“ beginnen Osteoklasten mit dem Abbau der toten Fragmentenden, Chondroblasten mit Ersetzen des Bindegewebes durch Knorpel und Osteoblasten mit der subperiostalen Knochenneubildung von den Frakturrenden (peripher) zur Mitte (zentral).[57,60,61,59]

Phase der Kallushärtung (4 – 12 Wochen)

Der bindegewebige Kallus wird nach und nach ähnlich des Vorgangs an der intakten Wachstumsplatte unter Bildung verkalkter Knorpelsubstanz in den Fixationskallus umgewandelt. Bei der enchondralen Knochenbildung differenzieren sich aus den Stammzellen Chondrozyten, die Knorpelgewebe synthetisieren welches die Frakturzone mechanisch stabilisiert. Anschließend beginnen distal der Fraktur Osteoblasten den Knorpel in Geflechtknochen umzuwandeln, bis das Knorpelgewebe schließlich komplett ersetzt ist. Der Geflechtknochen orientiert sich in der Ausrichtung der Trabekel nicht entsprechend seiner mechanischen Belastung, sondern entlang der Kapillaren, weshalb eine Stabilität wie beim Lamellenknochen nicht gewährleistet ist. [57,60,61,59]

Modeling und Remodeling Phase (6 Wochen – 24 Monate)

Der den Frakturspalt überbrückende Geflechtknochen wird in mehreren Wochen bis Monaten durch Osteoklasten abgebaut. Simultan bauen Osteoblasten Lamellenknochen auf, der den endgültigen knöchernen Kallus bildet. In dieser letzten Phase entsteht eine wieder funktional belastbare und stabile Knocheneinheit. Der Remodeling Prozess wird durch die mechanische Belastung des Knochens stimuliert und die Ausrichtung des Lamellenknochens entsprechend der mechanischen Beanspruchung bestimmt. Klinisch und radiologisch kann die Frakturheilung bereits nach sechs Wochen abgeschlossen sein (erreichen der normalen Festigkeit), biologisch gilt die Knochenbruchheilung erst mit dem Abschluss sämtlicher reparativer Prozesse als abgeschlossen, was Jahre dauern kann.

[51,54,56,60,61,57,59]

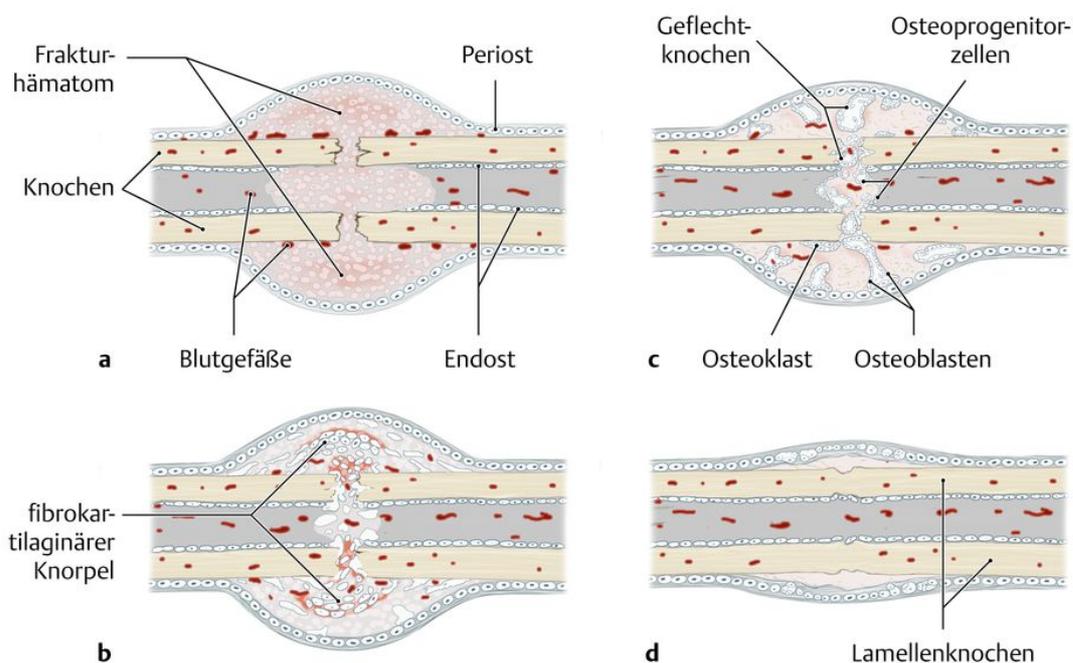


Abbildung 8: Schematische Darstellung der indirekten Frakturheilung [52]

a - Inflammatorische Phase/Frakturhämatom und Organisation des Hämatoms mit lockerem Bindegewebe/Granulationsphase; b - fibrocartilaginärer Knorpel/Fixationskallus; c- Knochenmineralisation/knöcherner Kallus und Umbau in Geflechtknochen; d – Umbau in Lamellenknochen

1.4.3 Pathologisch verzögerte Frakturheilung

Im Rahmen der pathologisch verzögerten Frakturheilung kann man zwischen verzögerter Frakturheilung (delayed union) und Pseudarthrose (non-union) unterscheiden. Diese werden historisch gesehen nach der Heilungszeit definiert. Wenn also in einem normalerweise angemessenen Zeitraum keine Heilung eingetreten ist, wird nach vier Monaten zunächst von einer verzögerten Frakturheilung gesprochen. Trotz des langsamen und verzögerten Frakturheilungsprozesses ist eine Vereinigung der Fraktur auch noch ohne chirurgischen Eingriff weiterhin möglich. Als Pseudarthrose wird häufig eine ausbleibende Frakturheilung nach sechs Monaten definiert, auch wenn diese nicht unumstritten ist. So spricht die US-amerikanischen Gesundheitsbehörde FDA (Food and Drug Administration) erst bei ab neun Monaten nach Trauma ausbleibender Frakturheilung von einer Pseudarthrose. Bei Pseudarthrosen ist im Gegensatz zur verzögerten Frakturheilung keine Knochenheilung ohne chirurgischen Eingriff zu erwarten. [59,61,60,57]

Äthiologie, Risikofaktoren und Klassifikation

Im Rahmen der Entstehung einer Pseudarthrose spielen mechanische, biologische und endokrine Faktoren eine wichtige Rolle.

Bereits Astley Cooper beschrieb 1842 in seiner Abhandlung „Treatise on Dislocations and Fractures of the Joints“, dass es nicht schwer zu verstehen sei, dass die zur Konsolidierung einer Fraktur notwendigen Materialien bei häufigen Bewegungen und Störungen niemals in einen knöchernen Kallus umgewandelt werden könnten [62]. Daher sind die Hauptrisikofaktoren für die Entstehung von verzögerter Frakturheilung beziehungsweise einer Pseudarthrose biomechanische Gründe wie lokale Instabilität an der Bruchstelle durch mangelnde Ruhigstellung sowie Scherbeanspruchung und Stauchung im Frakturbereich. Hierdurch wird der sich aus dem Kallus bildende Geflechtknochen wiederholt zerrissen oder im Falle einer primären Frakturheilung die Ausbildung von Haversschen Systemen über den Frakturspalt verhindert. [57,60,61,59]

Weiterhin können biologische Faktoren wie schlechte Blutversorgung im Bereich der Knochenfragmentenden mit daraus resultierender Devitalisierung der Fragmente, z.B. durch Mikroangiopathien, schwere Knochen- und Weichteildefekte mit begleitendem Substanzverlust, Denervierungen oder Durchblutungsstörungen der angrenzenden Weichteile sowie lokale/systemische Infektionen zur Bildung von Pseudarthrosen führen.

Allgemeine Faktoren, die die Vitalität des Gewebes und somit die Heilung herabsetzen wie zum Beispiel Patientenalter, Dauerbehandlung mit Medikamenten, Röntgenbestrahlung haben weiteren Einfluss auf die Bildung einer Pseudarthrose. [57,60,61,59]

Durch Glukokortikoidüberschuss, Zytostatika, Röntgenstrahlen, Gonadenhormonmangel oder (juvenilen) Diabetes mellitus kann die Frakturheilung aufgrund der daraus resultierenden Osteopenie verlangsamt werden. Darüber hinaus ist die Inzidenz von Pseudarthrosen bei Männern, einem erhöhten Body-Mass-Index, Rauchern, Arthrose und Rheuma erhöht. Systemische Erkrankungen wie Osteoporose, Osteomalazie, ein Mangel an Vitamin D und seinen Metaboliten, Störungen des Phosphathaushalts, Hyperparathyreoidismus, renale Osteopathie führen zu einer gestörten Mineralisation des Frakturkallus, wodurch der knöcherne Durchbau verzögert wird oder ausbleibt. Zu den sich negativ auf die Frakturheilung auswirkenden Medikamenten zählen unter anderem Zytostatika, Antikoagulanzen, Benzodiazepine, Diuretika und NSAIDs. [63]

Als weiteren Risikofaktor auf die Ausbildung einer Pseudarthrose sowie auf die Heilungszeit einer Fraktur konnten Claes et al. die Frakturspaltgröße identifizieren. So zeigten Bruchlücken über 10mm eine signifikant verringerte Heilung als Bruchlücken unter 3mm [64,11]. Dies zeigt die Wichtigkeit einer suffizienten Frakturreduktion und Minimierung von Frakturlücken, um die Voraussetzung für eine ungestörte Frakturheilung zu schaffen. Diese Ergebnisse werden weiterhin durch die Ergebnisse von Gaebler et al. sowie Drosos et al., welche ebenfalls ein erhöhtes Risiko einer verzögerten bzw. ausbleibenden Knochenheilung bei einem Frakturspalt größer 3mm herausarbeiten konnten [65,66].

Diese Einflussfaktoren auf die Entstehung von Pseudarthrosen finden sich im morphologischen Bild der Pseudarthrosen wieder:

- hypertrophe Pseudarthrose: Diese Art der Pseudarthrose entsteht insbesondere bei einer insuffizienten Ruhigstellung der Fraktarenden, weshalb es zu einer voluminösen periostalen Kallusbildung an beiden Fraktarenden kommt. Die verbreiterten, elefantenfußartigen Fraktarenden sind gut vaskularisiert, ohne dass eine knöcherne Verbindung und somit Heilung eintreten. In diesem Fall wird auch von biologisch reaktionsfähigen Pseudarthrosen gesprochen.
- hypotrophe, avitale Pseudarthrose: Aufgrund eines Ausbleibens der Mediatorenkaskade der Knochenheilung verbleiben die Fragmente avital und eine Gewebsreaktion bleibt aus. Somit bleibt die Pseudarthrose ohne Kallusbildung mit atrophischen Fraktarenden. Hierbei handelt es sich um biologisch reaktionsunfähigen Pseudarthrosen.
- Defektpseudarthrose: Eine Defektpseudarthrose entsteht durch einen großen Knochendefekt, sodass eine knöcherne Überbrückung mittels Kallus nicht mehr möglich ist. In diesem Fall ist auch ein weichteiliges Interponat im Frakturspalt möglich, welches die knöcherne Konsolidierung verhindert.

Das therapeutische Vorgehen wird entscheidend von den ursächlichen Faktoren sowie der Morphologie der Pseudarthrose bestimmt. So steht zum Beispiel bei der hypertrophen Pseudarthrose häufig die zuverlässige Stabilisierung durch eine adäquate Osteosynthese sowie gegebenenfalls die Resektion einer Pseudarthrosenmembran im Vordergrund oder im Fall der avitalen Pseudarthrose die Verbesserung der Vitalität mit Vaskularisation, Wiederherstellung eines biologischen Lagers oder Minimieren der negativen systemischen Einflussfaktoren. Defektpseudarthrosen erfordern häufig neben einem Debridement des avitalen Gewebes und eventuell infizierter Gewebsteile eine Überbrückung durch einen fixierten kortikospongiösen Span oder eine Spongiosaplastik in Ergänzung zu der fixierenden Osteosynthese, um eine Ausheilung auch ohne Verkürzung der Gliedmaße erreichen zu können [57,58,60,63,64].

2 Zielsetzung und Forschungsfragen

Die im Rahmen der vorliegenden Arbeit erfolgte histo-pathologische Auswertung der mit resorbierbaren Implantaten versorgten Röhrenknochen soll die lokale Gewebsreaktion um das Implantat untersuchen, um die Bio-ISOS Osteosynthese als Alternative zu metallischen Implantaten für die Versorgung von Frakturen kleiner Röhrenknochen weiterzuentwickeln.

Hierzu erfolgte die Evaluierung folgender Parameter der Knochenheilung:

- Vereinigung der Fraktarenden („*Union*“)
- Corticalis („*Cortical integrity*“)
- Spingiosa („*Cancellous Bone*“)
- Defektheilung („*Filling of defect*“)
- Knochenmark („*Bone marrow*“)
- Entzündungsreaktion („*Inflammation*“),

sowie die Auswertung eines aus den oben beschriebenen Größen errechneten Gesamt-Scores.

Anhand der statistischen Auswertungen und dem Vergleich zwischen den Versuchstiergruppen sollen in der vorliegenden Arbeit die folgenden Fragen beantwortet werden:

- 1) Kann im Rahmen der Nachuntersuchungen eine zunehmende Frakturheilung beobachtet werden?
- 2) Können Entzündungsreaktionen im Sinne von Abstoßungsreaktionen oder Früh-/Spätinfektionen beobachtet werden?
- 3) Zeigen sich Osteolysen um das Implantat im Bereich der Fraktur?
- 4) Gibt es Unterschiede zwischen den verschiedenen Entnahmestellen der Schnitte?
- 5) Besteht ein signifikanter Unterschied zwischen den Stadien der Frakturheilung innerhalb der Wochengruppen?
- 6) Entsprechen die histo-pathologischen Befunde den makroskopischen und radiologischen Ergebnissen aus der Arbeit von Maßen 2018

3 Material und Methoden

Im Folgenden sollen das Studienkollektiv, der Versuchsaufbau und die Durchführung des Tiermodells im Detail geschildert werden. Die Versuche am Tier basieren auf der Forschung von Viljanen et al. und Manninen et al.[10,9].

Alle operativen Eingriffe und Untersuchungen erfolgten unter Einhaltung sämtlicher Tierschutzbestimmungen und unterstanden der vorher erteilten Genehmigung der Regierung von Oberbayern, München. Bei Durchführung der Versuche lag eine gültige Genehmigung nach dem Tierschutzgesetz i.d.F. vom 25.05.1998 (nach §10a) vor (GZ 55.2-1-54-2531.3-65-09).

3.1 Studienkollektiv und Versuchsaufbau

Das Gesamtstudienkollektiv bestand aus 25 Kaninchen der Rasse „New Zealand White Rabbit“ der Firma „Charles Rivers Laboratories International, Inc.“. Prä- und post-operativ wurden die Tiere in den Tierstellen des Instituts für chirurgische Forschung am Universitätsklinikum der LMU München gehalten. In den Tierställen hatten die Kaninchen freien Auslauf in Außen- und Innenräumen sowie einen streng kontrollierten 12-stündigen Zyklus von Licht und Dunkelheit. Alle Tiere hatten jederzeit einen uneingeschränkten Zugang zu frischem Wasser und ausreichend Nahrung.

Vor Beginn der Versuchsreihe wurde durch eine Pilot-Reihe von 5 Tieren die Operationstechnik etabliert, dieses Kollektiv hatte jedoch keinen Beitrag zu den Versuchsergebnissen.

Anschließend wurden für die histologische Nachuntersuchung jeweils 5 Untersuchungskohorten á 4 Kaninchen gebildet, die über einen postoperativen Zeitraum von 4,8,16,24 und 48 Wochen beobachtet wurden. Welches Bein osteotomiert und anschließend operativ mit dem Bio-ISOS Implantat versorgt wurde, wurde per Los-Verfahren entschieden. (Abbildung 9)

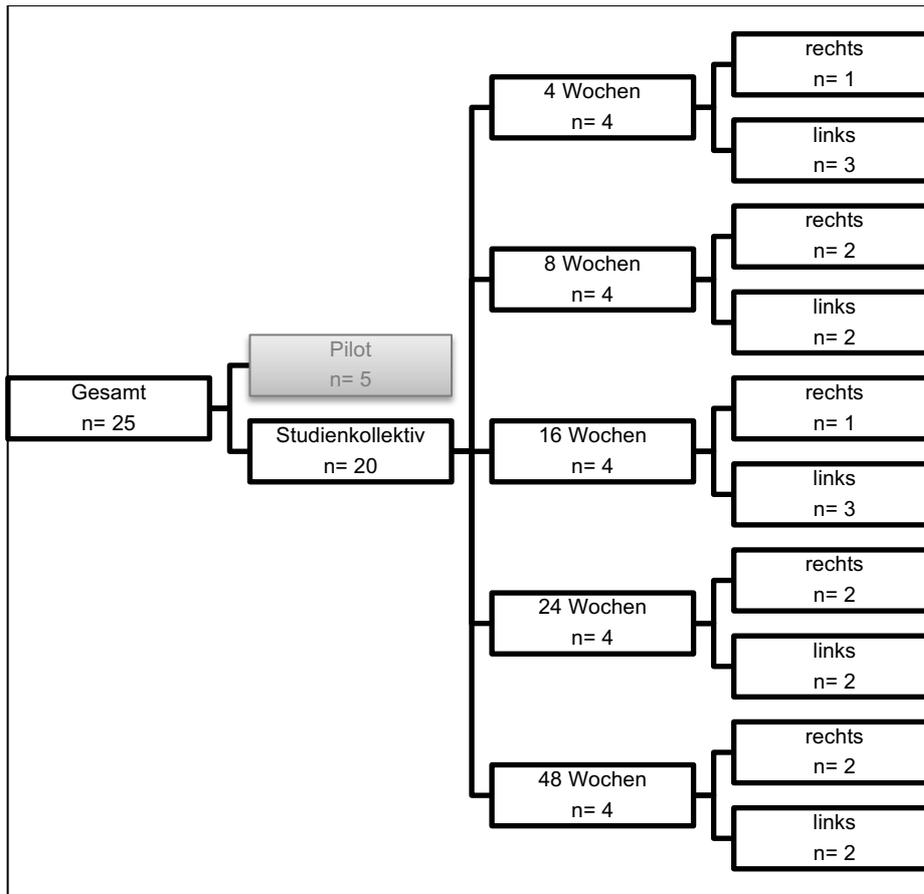


Abbildung 9: Versuchstierpopulation

Die Operation der Versuchstiere erfolgte in Vollnarkose, während der OP erfolgte eine Singleshot i.m. Antibiotika-Gabe. Zur Unterstützung der Atmung wurde den Tieren während der OP und bis zum Wiedererlangen aller Körperfunktionen Sauerstoff über eine Gesichtsmaske verabreicht (4-6l/min). Die Sauerstoffversorgung der Tiere wurde über den gesamten Zeitraum der OP und bis zum vollständigen erwachen mittels Pulsoxymetrie kontrolliert. Die erste Gabe des Analgetikums erfolgte bereits während der OP und wurde alle 8 Stunden für die ersten sieben Tage post-OP fortgesetzt.

Zur Euthanisierung der Tiere wurde zunächst eine Narkose eingeleitet, die Tötung erfolgte dann durch die i.v.-Gabe von 70mg/kg KG Pentobarbital (Narcoren®, Merial GmbH, Halbergmoos, Deutschland).

Prä-, intra- und postoperativ wurden zusätzlich die folgenden Parameter erfasst:

Tabelle 1: Evaluierte Parameter

Zeitpunkt	Parameter
Prä-operativ	Geschlecht Gewicht Alter
OP-Daten	Narkosedauer Operationszeit Länge des Hautschnitts
Post-operativ	Klinische Kontrolluntersuchungen Radiologische Kontrolluntersuchungen Röntgenkontrolle (unmittelbar nach OP, 7.- und 14. Tag post-operativ) CT-Untersuchung (am Ende der Lebenszeit der jeweiligen Versuchsgruppe)

Klinische Kontrolluntersuchung

Postoperativ wurden alle Tiere auf mögliche Komplikationen untersucht. Die Kontrolluntersuchungen erfolgten die ersten zwei Wochen nach OP täglich, danach wurden die Tiere alle zwei Wochen klinisch untersucht. Wurden allerdings im Untersuchungszeitraum zu irgendeinem Zeitpunkt Auffälligkeiten festgestellt, fand wieder eine tägliche Kontrolle des betroffenen Versuchstieres statt. Wundkontrollen wurden bis zur vollständigen Abheilung durchgeführt.

Radiologische Kontrolluntersuchungen

Direkt im Anschluss an die OP wurden die Tiere im noch narkotisierten Zustand einem konventionellen Röntgen in 2 Ebenen (anterio-posterior; lateral) unterzogen. Ein erneutes Kontrollröntgen unter Narkose zur Beurteilung von Stellung und Heilungsfortschritt erfolgte am 7. und 14. post-operativen Tag.

Zusätzlich wurden bei allen Tieren nach Euthanisierung eine CT-Untersuchung zur Evaluation von *Dislokation, Fremdkörperreaktion und Osteolyse sowie Knochenheilung* durchgeführt

Die Auswertung der CT-Bilder erfolgte mit Hilfe der open-source imaging software OsiriX® (Version 6.0.1., Pixmeo SARL, Bernex, Schweiz). Die Femura wurden jeweils an drei Knochenpunkten vermessen. Bei der operierten Seite lagen die Messpunkte (M1, M2, M3) am distalen Ende des Implantats (M1), der Osteotmiestelle (M2) und am proximalen Ende (M3) des Implantats. Die gesunde Referenzseite wurde seitengleich 15mm (M1), 30mm (M2) und 45mm (M3) oberhalb des distalen Endes des Femurs vermessen. An jedem der drei Punkte wurde durch die Messung (1) Femur-Durchmesser, (2) Kortikalis-Dicke, (3) Kallus-Dicke und (4) Implantat-Durchmesser erfasst.[20]

3.2 Makroskopische Vorgehensweise

Für die Frakturversorgung mittels des Bio-ISOS Implantates wurde eine eigene OP-Technik entwickelt.[20,8]

Operationsvorbereitung

Nach erfolgreicher Narkotisierung wurde die OP-Seite der Kaninchen per Zufall ausgewählt. Im Rahmen der OP-Vorbereitung erfolgte die Rasur des ausgewählten Hinterlaufs. Anschließend wurden die Tiere seitlich gelagert und die Extremitäten am OP-Tisch fixiert. Der ausgewählte Hinterlauf wurde desinfiziert und mit sterilen Tüchern und OP-Folie abgedeckt.



Abbildung 10: Präparation des Operationsgebiets [20]

Osteotomie

Der Zugang und die Osteotomie-Technik waren bei allen Tieren identisch. Das Operationsgebiet wurde über einen Zugang am mittleren Oberschenkeldrittel kaudal des tastbaren Trochanter major und der Patella von 2,5 cm eröffnet. Anschließend erfolgte eine Präparation von subkutanem Gewebe, Muskelfaszien, M. quadriceps femoris und schließlich des Femurs zur besseren Darstellung für die anschließende Durchführung der Osteotomie. Gefäße als mögliche Blutungsquellen wurden dargestellt und legiert. Die Osteotomie wurde in einem Winkel von 30° von ventral nach dorsal mittels oszillierender Knochensäge durchgeführt. (Abbildung 11)

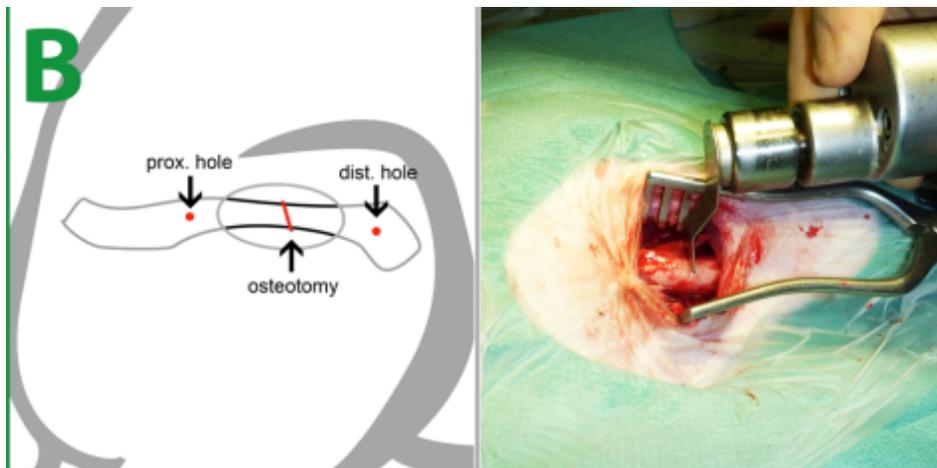


Abbildung 11: Osteotomie [20]

Implantation Bio-ISOS I

Das Implantat hat einen Durchmesser von 30x5mm. Dementsprechend wurde der Markraum der Kaninchenfemura ausgemessen und falls notwendig auf die Größe des Implantats ausgefräst. Eine Bohrung erfolgte 2 cm von beiden Osteotomie-Enden im Winkel von 45°. Diese Löcher dienten als Eintrittspunkte der Fadenanker, durch welchen das Implantat befestigt wurde und welche nach Reposition der Fraktur zusammen mit den Fixierungsknöpfen als Zuggurtung dienten. (Abbildung 12 und 9)

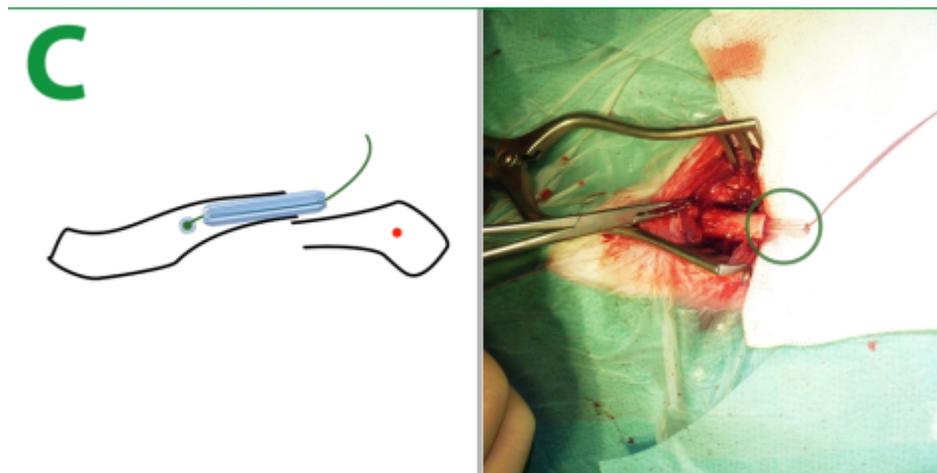


Abbildung 12: Implantation der Bio-ISOS I Schiene [20]

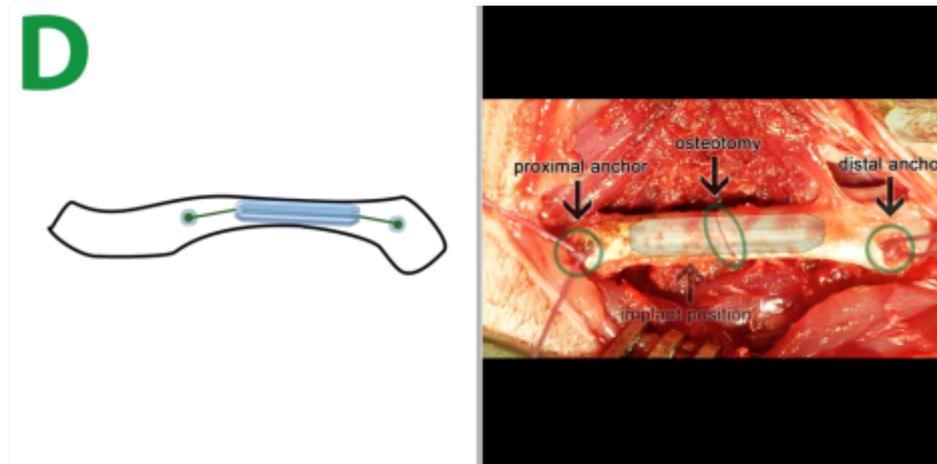


Abbildung 13: Durch Bio-ISOS I Implantat versorgte Fraktur [20]

3.3 Mikroskopische Vorgehensweise

Probenherstellung und –aufbereitung erfolgte im Laboratorium des pathologischen Instituts des Universitätsklinikums der LMU München.

Die folgende Abbildung soll eine Übersicht der einzelnen Arbeitsschritte der Präperatherstellung geben:

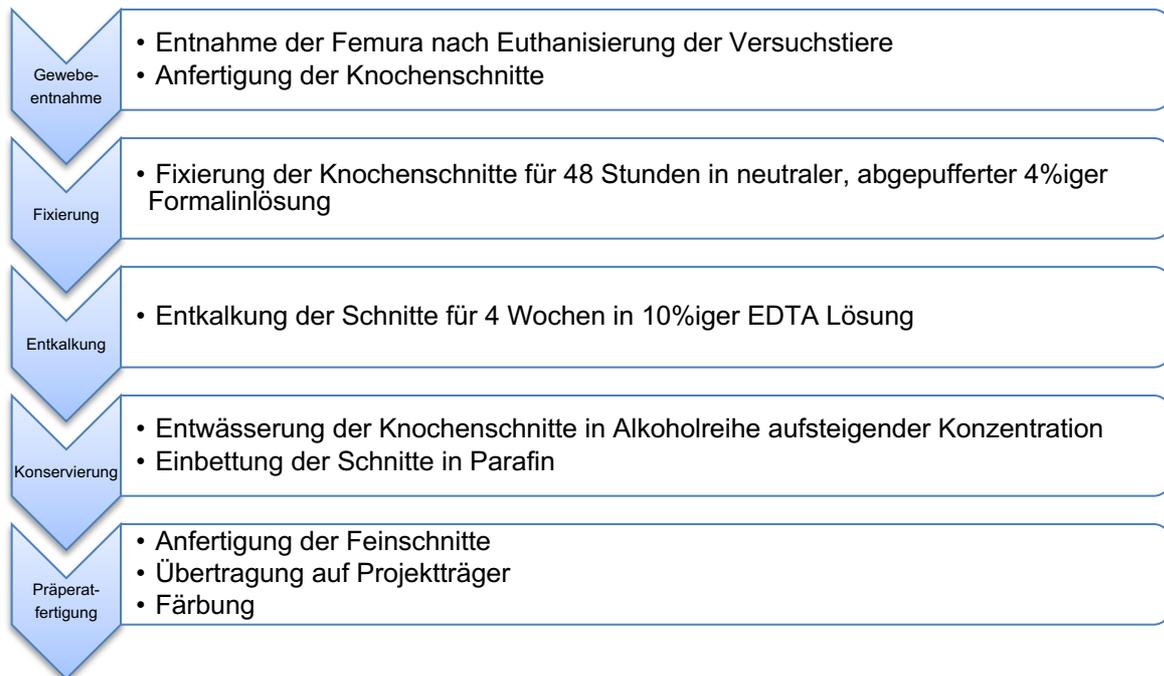


Abbildung 14: Übersicht der Einzelschritte der Präperatherstellung

Gewebeentnahme und Anfertigung der Schnitte

Pro Versuchstier wurden je drei Schnittproben von der osteotomierten und der Kontrollseite angefertigt.

Die Kaninchenfemura wurden hierzu direkt postoperativ bei -30°C gefroren und anschließend mit der unten abgebildeten Knochensäge (Cut Grinder; Kugel Medical, Regensburg) axial in max. 3 mm große Stücke zugeschnitten. Die entstandenen Knochenschnitte wurden dann in beschrifteten Gewebekassetten konserviert. (Abbildung 15, Abbildung 16, Abbildung 17)



Abbildung 15: Anfertigung der Knochenschnitte



Abbildung 16: Gewebekassette mit Präparat

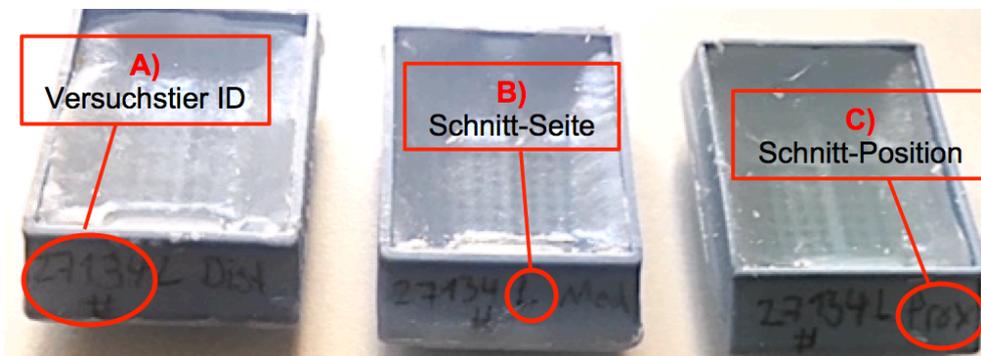


Abbildung 17: Schema der Knochenschnitt-Präparate

Fixierung und Entkalkung

Alle Femur-Schnitte wurden für 2 Tage in neutraler, abgepufferter 4 %iger Formalinlösung fixiert. Danach erfolgte die Entkalkung des Knochens durch 10 %ige EDTA-Lösung für 4 Wochen.

Konservierung

Um die Schnitte bis zur Aufbereitung zu konservieren, erfolgte zunächst die Entwässerung in aufsteigender Alkoholreihe (jeweils eine Stunde mit 70%, 80%, 90% und vier mal eine Stunde in 100% Alkohol) mit anschließender Einbettung in heißem Paraffin. (Abbildung 18)

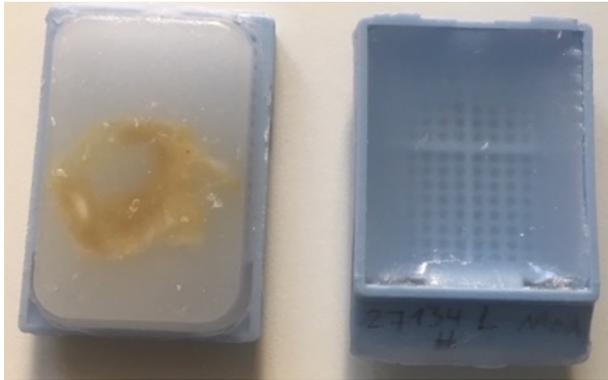


Abbildung 18: Konservierter Knochenschnitt in Paraffin

Präparatfertigung

Die in Paraffin gebetteten Knochen wurden mittels Mikrotom (HistoCoreMULTICUT, Leica, Deutschland) axial 5 µm dick geschnitten und auf Objektträger übertragen.

Die Hämatoxylin-Eosin (HE) Färbung wurde gewählt, da sie die Beurteilung sowohl von Gewebe als auch von Zellpopulationen erlaubt. [67,51] Die folgende Tabelle soll eine Übersicht über die Färbungseigenschaften geben:

Tabelle 2: Übersicht der verwendeten Färbemethode [51]

	H.E. Hämatoxylin-Eosin
Bestandteile	<i>Hämatoxylin</i> <i>Eosin</i>
Funktion	Übersichtsfärbung
Färbe- verhalten	<i>Hämatoxylin</i> : sauer/basophile Strukturen blau <i>Eosin</i> : basisch/acidophile Strukturen rot
Blau	Zellkern, rER, Ribosomen, Kalk
Rot	Zelluläre und extrazelluläre Proteine (Zytoplasma, Kollagenfasern)

Histo-pathologische Untersuchungsverfahren

Histo-pathologisch sollte der Heilungsfortschritt, eventuell auftretende Störungen der Knochenheilung, Osteolysen sowie Entzündungsreaktionen beurteilt werden. Quantifiziert wurden diese Parameter mithilfe der folgenden histo-pathologischen Scoring-Systeme zur Beurteilung der Frakturheilung:

Tabelle 3: Scores zur Operationalisierung der Frakturheilung

	Score nach M.H Huo et al.	Score nach A Oryan et al.
Originalarbeit	Huo MH, Troiano NW, Pelker RR, Gundberg CM, Friedlaender GE (1991) The influence of ibuprofen on fracture repair: biomechanical, biochemical, histologic, and histomorphometric parameters in rats. J Orthop Res 9 (3):383-390. [67]	Oryan A, Monazzah S, Bigham-Sadegh A (2015) Bone injury and fracture healing biology. Biomed Environ Sci 28 (1):57-71. doi:10.3967/bes2015.006 [56]
Score-Dimensionen	Quantität und Qualität des Gewebes im Frakturspalt	Status der Kallus-Formation
Score-values	Siehe Anhang (Tabelle 20)	

Die lichtmikroskopische Auswertung des Schnittpräparate erfolgte verblindet durch zwei unabhängige Untersucher. Aus den zwei ermittelten Scores wurde für jedes Versuchstier ein Mittelwert aus beiden Ergebnissen berechnet. Außerdem wurde die Standardabweichung (SD) zwischen den Ergebnissen der beiden Untersucher erhoben. Vor der Auswertung wurde festgelegt, dass Abweichungen von bis zu $SD \pm 1,5$ akzeptiert werden. Alle darüber liegenden Abweichungen sollten durch einen dritten Untersucher begutachtet werden. Diese Kontrollmaßnahme, war jedoch nicht notwendig, da die maximale Abweichung der beiden Untersucher bei $SD \pm 1,00$ lag.

Die Lichtmikroskopische Untersuchung wurden mittels Leica M165 FC Fluoreszenzmikroskop (Leica Microsystems, Wetzlar, Deutschland) durchgeführt. Der in Abbildung 19 gezeigte Algorithmus beschreibt das standardisierte Vorgehen, nach dem das Scoring durchgeführt wurde:

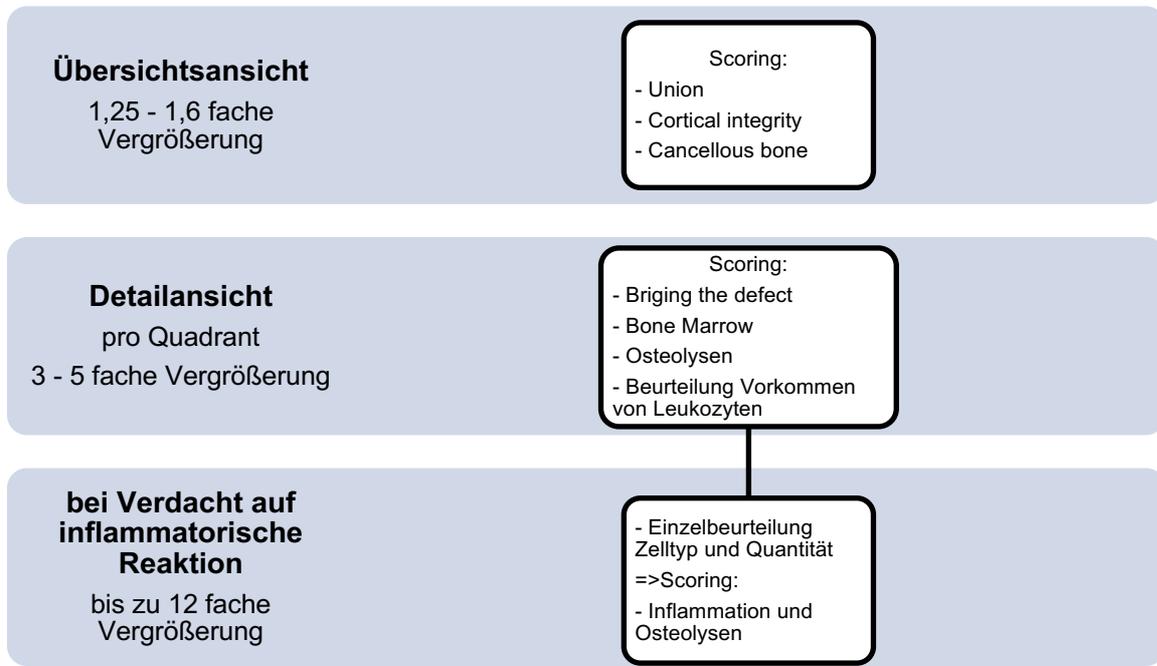


Abbildung 19: Algorithmus zur histo-pathologischen Auswertung der Knochenschnitte

Statistische Analyse

Die statistischen Auswertungen wurden mittels SPSS Statistics Version 25 (IBM Germany, Ehningen, Deutschland) durchgeführt. Für die Deskription des Datenkollektives wurde die Verteilung von Geschlecht und Gewicht der Tiere ausgewertet. Weiter wurden für OP-Dauer und die Narkosezeiten Mittelwert, Median, Standardabweichung, sowie Minimum (Min) und Maximum (Max) berechnet.

In der statistischen Auswertung der histologischen Scores wurde zunächst jeder der Parameter separat deskriptiv analysiert. Hierbei wurden Mittelwert, Median, Standardabweichung, Minimum und Maximum als Größen der zentralen Tendenz berechnet.

Anschließend wurde das mittlere Scoring der distalen, mittigen und proximalen Schnittstellen beschrieben und verglichen.

Für die Auswertung des Gesamt-Scores wurde ein Mittelwertvergleich zwischen den Versuchsgruppen mittels Welch- ANOVA und anschließendem post-hoc Test durchgeführt. Abbildung 31 zeigt den detaillierten Analyseplan.

4 Ergebnisse

Insgesamt wurde 20 Versuchstiere untersucht, von denen alle weiblichen Geschlechts waren. Wie Abbildung 9 verdeutlicht, richtete sich die Überlebensdauer nach der Versuchsgruppe.

4.1 Deskription der Kenndaten zu Versuchstieren und OP

Tabelle 4 zeigt die deskriptiven Kenndaten zu Versuchstieren und OP, stratifiziert nach der Lebensdauer der Versuchsgruppe und des gesamten Kollektivs:

Tabelle 4: Kennziffern zu Versuchstieren und OP

4 Wochen					
	Mittelwert	Median	Min	Max	SD
Gewicht [kg]	3,78	3,8	3,4	4,1	0,33
Narkosedauer [min]	65	65	60	70	3,54
OP-Dauer [min]	36,25	35,5	29	45	5,72
8 Wochen					
	Mittelwert	Median	Min	Max	SD
Gewicht [kg]	4	4	3,5	4,5	0,38
Narkosedauer [min]	55,5	57,5	45	62	6,58
OP-Dauer [min]	22,75	20,5	18	32	5,45
16 Wochen					
	Mittelwert	Median	Min	Max	SD
Gewicht [kg]	3,55	3,55	3,2	3,9	0,25
Narkosedauer [min]	59	58,5	53	66	4,64
OP-Dauer [min]	29,5	29,5	28	33	2,69
24 Wochen					
	Mittelwert	Median	Min	Max	SD
Gewicht [kg]	4,23	4,2	4	4,5	0,19
Narkosedauer [min]	59,5	56,5	50	75	10,40
OP-Dauer [min]	24	25	20	26	2,45
48 Wochen					
	Mittelwert	Median	Min	Max	SD
Gewicht [kg]	4,33	4,35	4,2	4,6	0,16
Narkosedauer [min]	53	53	46	60	5,15
OP-Dauer [min]	30,25	30	25	36	4,82
Gesamt					
	Mittelwert	Median	Min	Max	SD
Gewicht [kg]	3,98	4,1	3,2	4,6	0,40
Narkosedauer [min]	58,40	59,5	45	75	7,68
OP-Dauer [min]	28,55	27	18	45	6,58

Das durchschnittliche Gewicht der Versuchstiere lag bei 3,98 kg, mit einer SD von $\pm 0,40$ kg unterschieden sich die Gruppen kaum. Die Narkosedauer betrug im Mittel 58,40 Minuten (SD ± 8 Minuten), innerhalb dieses Zeitraums nahm die Operation durchschnittlich 28,55 Minuten ein (SD ± 7 Minuten).

4.2 Deskription der Score Variablen

Im Folgenden soll zunächst eine deskriptive Analyse der einzelnen Score Variablen stratifiziert nach Versuchsgruppe erfolgen.

Im Fließtext finden sich Verweise auf den Bildband im Anhang der exemplarisch die histopathologischen Ergebnisse des Scores veranschaulichen soll.

4.2.1 Vereinigung der Frakturenden („Union“)

Die erste Dimension der Frakturheilung stellt im angewandten Scoring-System die Vereinigung der Frakturenden dar. Wie die Standardabweichungen in Tabelle 5 zeigen, waren innerhalb der Versuchstiergruppen keine Ausreißer zu beobachten. Die schlechtesten Ergebnisse waren nach 4 Wochen zu sehen, in der die Knochenlücke zumeist nur mit fibrösem Gewebe überbrückt war. In den 8, 16 und 24 Wochen Gruppen sind die Knochenenden der Proben hingegen bereits mindestens osteochondral vereinigt. In der 48 Wochen Gruppe ist der Frakturspalt bei allen Tieren durch Knochen ersetzt.

Tabelle 5: Deskription der Score Variable "Union"

	Mittelwert	Median	SD	Min	Max
4 Wochen	2,38	2,00	0,48	2,00	3,00
8 Wochen	2,92	3,00	0,28	2,00	3,00
16 Wochen	3,21	3,00	0,50	2,00	4,00
24 Wochen	3,33	3,00	0,47	3,00	4,00
48 Wochen	4,00	4,00	0	4,00	4,00

Insgesamt ist mit steigender Überlebenszeit ein linearer Anstieg im mittleren Scoring der Variable „Union“ zu sehen wie auch Abbildung 20 zeigt.

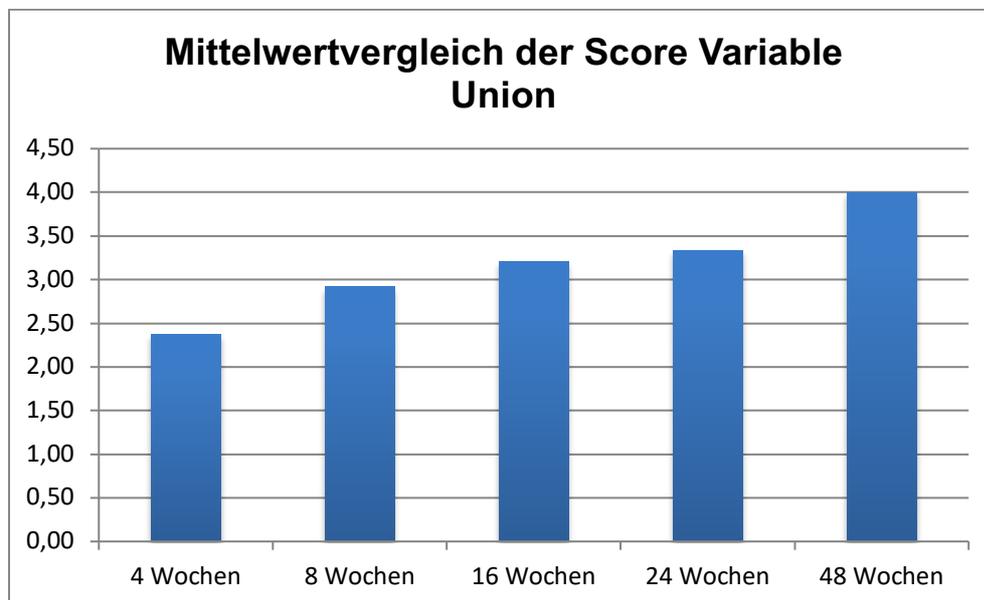


Abbildung 20: Mittelwertvergleich der Score Variable Union

4.2.2 Corticalis („Cortical integrity“)

Bereits in der 4 Wochen Gruppe konnte bei allen Versuchstieren zumindest eine frühe Reorganisation der Corticalis observiert werden. (4 Wochen: Mittelwert 2,67; Min 2,00). In der 8, 16 und 24 Wochen Gruppe war bereits der Großteil des corticalen Mantels wieder intakt. Dabei konnte die 16 Wochen Gruppe im Mittel etwas bessere Ergebnisse erzielen als die 24 Wochen Gruppe, die Abweichung liegt allerdings innerhalb der Standardabweichung. (16 Wochen: Mittelwert 3,63; SD $\pm 0,48$; 24 Wochen: Mittelwert 3,33; SD $\pm 0,47$). Die Versuchstiere der letzten Gruppe erreichten die besten Ergebnisse, da hier bei einem Großteil der Cortex bereits vollständig rekonstruiert war. (Tabelle 6)

Tabelle 6: Deskription der Score Variable "Cortical integrity"

	Mittelwert	Median	SD	Min	Max
4 Wochen	2,67	3,00	0,47	2,00	3,00
8 Wochen	3,00	3,00	0	3,00	3,00
16 Wochen	3,63	4,00	0,48	3,00	4,00
24 Wochen	3,33	3,00	0,47	3,00	4,00
48 Wochen	3,83	4,00	0,37	4,00	4,00

Wie in Abbildung 21 dargestellt steigt auch die Variable „Cortical Integrity“ mit der Beobachtungszeit an. Wie oben bereits beschrieben gibt es eine geringe Differenz zwischen der 16 und der 24 Wochen Gruppe.

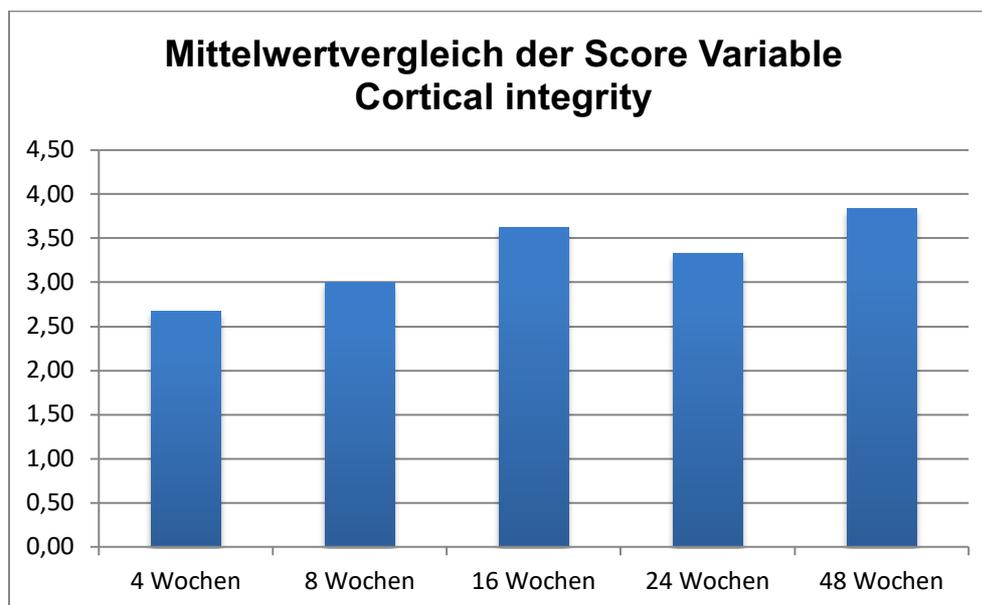


Abbildung 21: Mittelwertvergleich der Score Variable Cortical integrity

4.2.3 Spongiosa („Cancellous Bone“)

Bezüglich der Spongiosa score keines der Versuchstiere mit dem niedrigsten Wert, da bei jedem Schnitt aktive ossäre Zellaktivitäten zu beobachten waren. In der 4 und 8 Wochen Gruppe konnten aktive ossäre Umbauprozesse beobachtet werden und neues Knochenmaterial war bereits vorhanden (4 Wochen: Mittelwert 3,17; 8 Wochen: Mittelwert 3,13). Die beiden Gruppen unterschieden sich nicht untereinander.

Ab der 16 Wochen Gruppe konnte weiterer Progress im Aufbau der Spongiosa beobachtet werden. Bei den Tieren der 16, 24 und 48 Wochen Gruppen reorganisierte sich die spongiöse Struktur des Knochens bereits. Wie Abbildung 22 zeigt, stiegen in Abhängigkeit von der Überlebensdauer die erreichten Score-Werte.

Tabelle 7: Deskription der Score Variable "Cancellous Bone"

	Mittelwert	Median	SD	Min	Max
4 Wochen	3,17	3,00	0,55	2,00	4,00
8 Wochen	3,13	3,00	0,33	3,00	4,00
16 Wochen	3,96	4,00	0,45	3,00	5,00
24 Wochen	4,04	4,00	0,20	4,00	5,00
48 Wochen	4,25	4,00	0,43	4,00	5,00

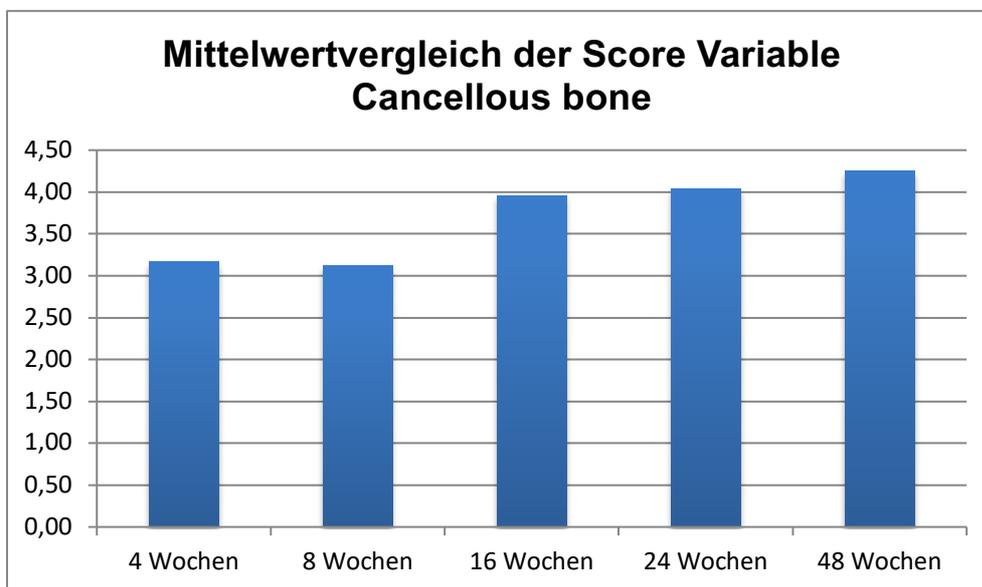


Abbildung 22: Mittelwertvergleich der Score Variable Cancellous bone

4.2.4 Defektheilung („Filling of defect“)

Bereits 4 Wochen post-OP war der Defekt mindestens durch Knorpelgewebe überbrückt, im Mittel konnte sogar schon eine gleichmäßige Mischung von Knorpel- und Knochengewebe beobachtet werden (4 Wochen: Min 4,00; Mittelwert: 7,42). Nach 8 Wochen war mindestens unreifer Knochen mit nur geringen Anteilen an Knorpelgewebe im Frakturspalt zu erkennen. In der 16 Wochen Gruppe konnten bereits maximale Score Ergebnisse erzielt werden, da bei diesen Tieren nur reifer Knochen vorlag. (Tabelle 8)

Tabelle 8: Deskription der Score Variable "Filling of defect"

	Mittelwert	Median	SD	Min	Max
4 Wochen	7,42	8,00	0,91	4,00	8,00
8 Wochen	8,13	8,00	0,53	7,00	9,00
16 Wochen	8,79	9,00	0,50	8,00	10,00
24 Wochen	8,83	9,00	0,62	8,00	10,00
48 Wochen	9,67	10,00	0,47	9,00	10,00

Auch die Vergleichsgraphik der Mittelwerte zeigt, dass ein linearer Heilungsfortschritt des Defektes verzeichnet werden konnte. (Abbildung 23)

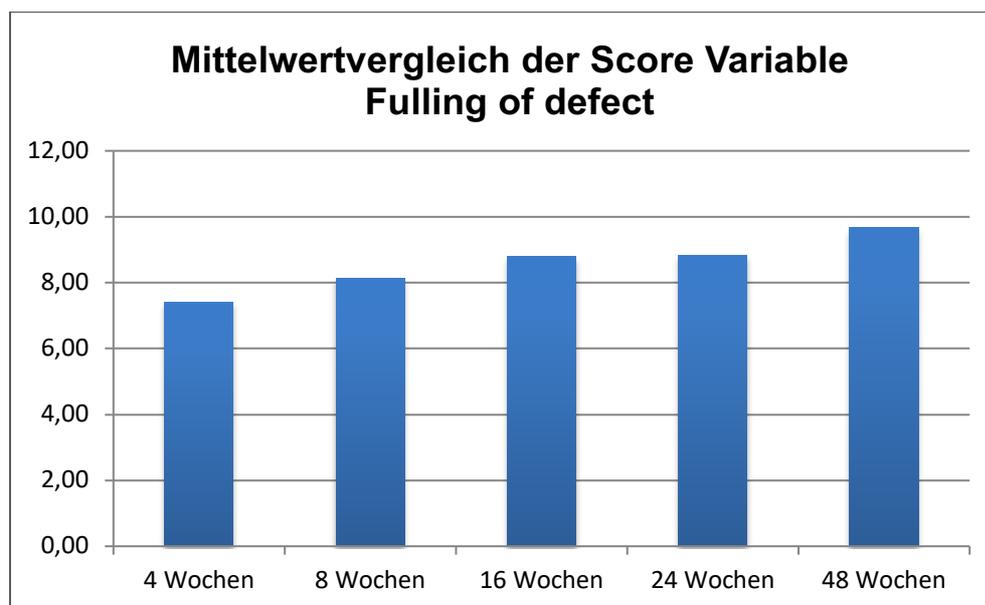


Abbildung 23: Mittelwertvergleich der Score Variable Filling of defect

4.2.5 Knochenmark („Bone marrow“)

Wie Tabelle 9 zeigt, konnte nach 4 und 8 Wochen der Heilung mikroskopisch in jedem der Schnitte zumindest fibröses Gewebe erkannt werden (4 Wochen: Min 2,00; 8 Wochen: Min 2,00). In der 16 Wochen Gruppe war bei einem Großteil der Tiere bereits der Umbau zu rotem Knochenmark abgeschlossen (16 Wochen: Mittelwert 4,13) und in der 24 Wochen Gruppe war bei einigen Knochenschnitten bereits die Progression zu adultem Knochenmark festzustellen (24 Wochen: Mittelwert 4,63, Max 5,00). Dieser Prozess war in der 48 Wochen Gruppe bereits bei allen Versuchstieren abgeschlossen (48 Wochen: Mittelwert 5,00; SD ± 0).

Tabelle 9: Deskription der Score Variable "bone marrow"

	Mittelwert	Median	SD	Min	Max
4 Wochen	2,33	2,00	0,47	2,00	3,00
8 Wochen	2,42	2,00	0,49	2,00	3,00
16 Wochen	4,13	5,00	1,09	2,00	5,00
24 Wochen	4,63	5,00	0,56	3,00	5,00
48 Wochen	5,00	5,00	0	5,00	5,00

Auch für die Variable „Bone marrow“ zeigt die Graphik der Mittelwerte einen stetigen Heilungsfortschritt. (Abbildung 24)

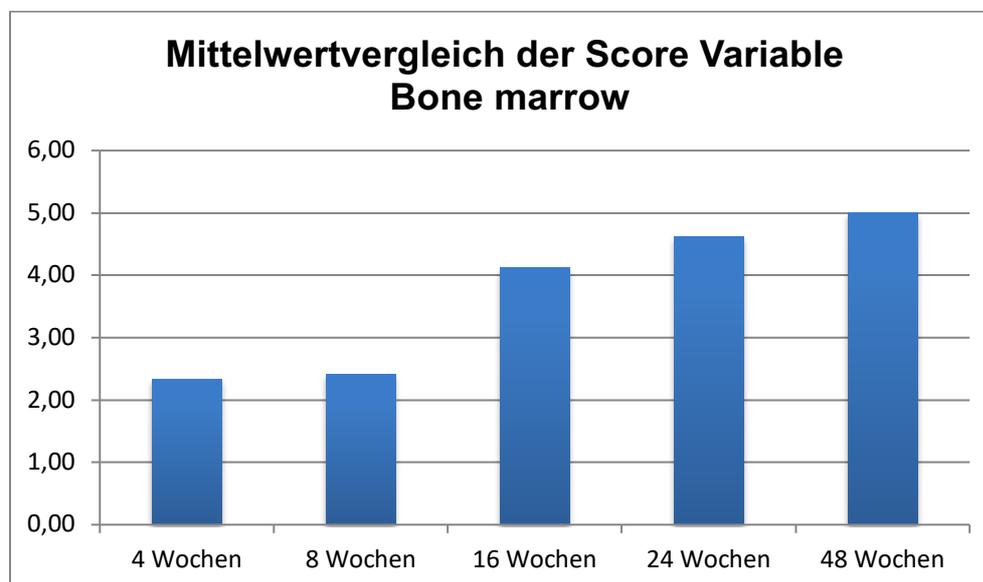


Abbildung 24: Mittelwertvergleich der Score Variable Bone marrow

4.2.6 Entzündungsreaktion („Inflammation“) und implantatassoziierte ossäre Reaktionen (Osteolysen)

Das Scoring definiert eine positive inflammatorische Reaktion als die Identifikation von mindestens 20% Leukozyten in einem Gesichtsfeld (Tabelle 20). Keines der Präparate wies eine solche Kolonialisierung von Leukozyten auf. Weiterhin wurden die Schnitte auf Osteolysen um das Implantat untersucht. Bei keinem der Schnitte konnten Osteolysen um die Implantate detektiert werden. In allen Wochengruppen gibt es eine Bildung von Gewebe bis direkt an das Implantat heran. In den Wochengruppen 16 und 48 zeigt sich im Rahmen des fortgeschrittenen Heilungsprozesses eine Bildung von Geflechtknochen bis direkt an das Implantat.

4.3 Gesamt-Score der Frakturheilung

4.3.1 Vergleich innerhalb der Gruppen

Im Folgenden sollen die Mittelwerte der drei Schnittstellen (proximal, mittig, distal) stratifiziert nach Wochen Gruppe untersucht werden.

Insgesamt zeigen die folgenden Detailauswertungen, dass vor allem die proximalen Schnittstellen tendenziell bessere Scoring Ergebnisse liefern als die mittigen und distalen Knochenabschnitte.

4.3.1.14 Wochen

Wie Tabelle 10 und Abbildung 25 zeigen unterschied sich das Scoring der Schnittstellen voneinander, wobei der Mittelwert vom proximal nach distal abnahm. Dabei ist zu beachten, dass das Mittel der distalen Schnittstellen die größte Standardabweichung (SD $\pm 1,71$) und damit auch die stärkste Abweichung vom Median aufwies, welcher robuster gegenüber Ausreißern ist (Mittelwert 15,88 vs. Median 16,60). Allerdings war der Trend des sinkenden Scores auch zu beobachten, wenn für die distale Schnittstelle der Median als Vergleichsparameter herangezogen wurde.

Tabelle 10: Vergleich der Schnittstellen der 4 Wochen Gruppe

4 Wochen	Mittelwert	Median	SD	Min	Max
Proximal	19,63	19,75	0,41	19,00	20,00
Mittig	18,38	18,25	0,41	18,00	19,00
Distal	15,88	16,60	1,71	13,00	17,50

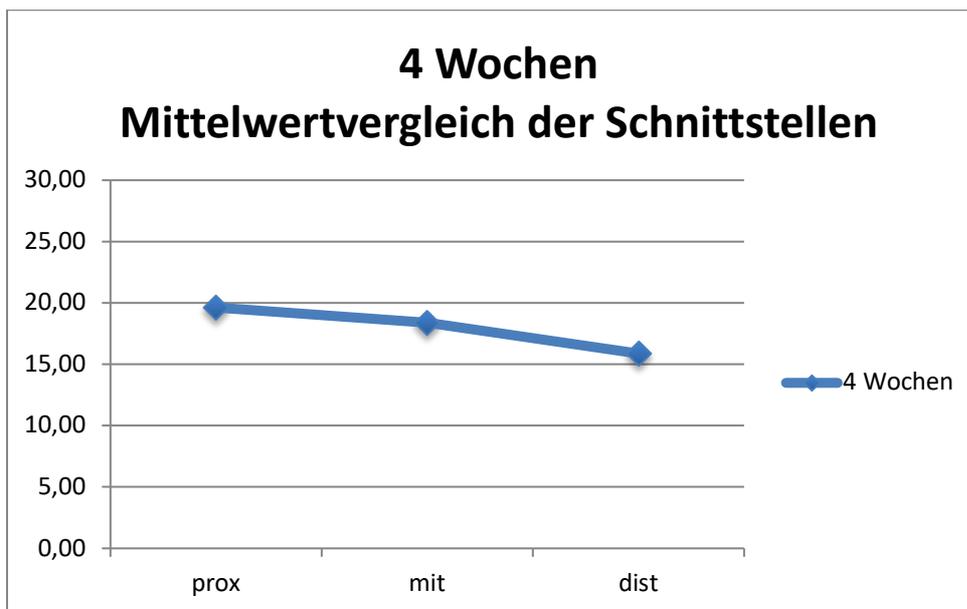


Abbildung 25: 4 Wochen Gruppe - Vergleich der Schnittstellen

4.3.1.28 Wochen

Innerhalb der 8 Wochen Gruppe unterschied sich vor allem das Scoring der proximalen Schnittstelle von distalem und mittigen Knochenabschnitt. Im Gegensatz dazu waren die Ergebnisse für den mittigen und distalen Schnitt nahezu identisch (Tabelle 10, Abbildung 26)

Tabelle 11: Vergleich der Schnittstellen der 8 Wochen Gruppe

8 Wochen	Mittelwert	Median	SD	Min	Max
Proximal	21,00	21,25	0,61	20,00	21,50
Mittig	19,00	19,00	0,50	18,50	19,50
Distal	19,13	19,00	0,22	19,00	19,50

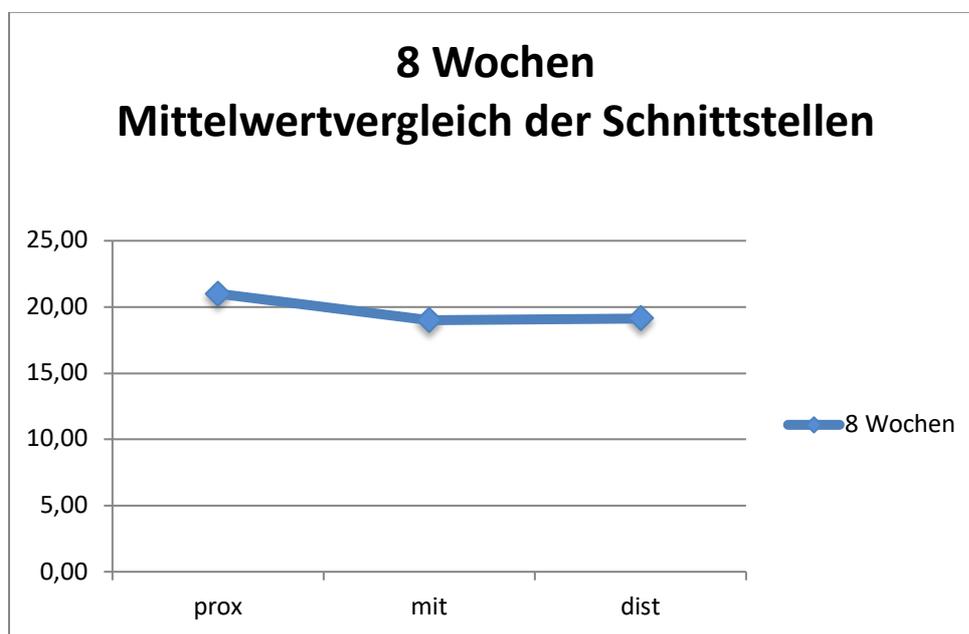


Abbildung 26: 8 Wochen Gruppe - Vergleich der Schnittstellen

4.3.1.2 16 Wochen

In der 16 Wochen Gruppe beobachteten wir einen stetigen Abfall der mittleren Score Ergebnisse von proximal nach distal. Dabei erreichten die proximal entnommenen Proben im Mittel einen Score von 25,63, während die distal nur mit nur einen durchschnittlichen Wert von 21,88 aufwiesen. (Tabelle 12, Abbildung 27)

Tabelle 12: Vergleich der Schnittstellen der 16 Wochen Gruppe

16 Wochen	Mittelwert	Median	SD	Min	Max
Proximal	25,63	25,25	1,14	24,50	27,50
Mittig	23,63	23,75	1,52	21,50	25,50
Distal	21,88	22,00	0,89	20,50	23,00

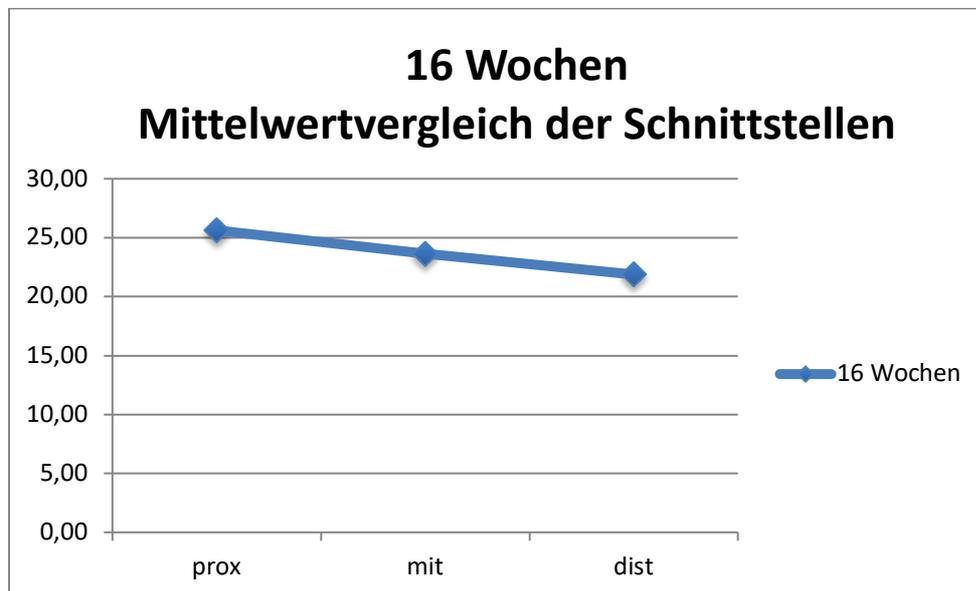


Abbildung 27: 16 Wochen Gruppe - Vergleich der Schnittstellen

4.3.1.3 24 Wochen

Die Ergebnisse der 24 Wochen Gruppe entsprachen in ihrer Tendenz denen der 4 und 8 Wochen Gruppen, da auch hier ein Unterschied vor allem zwischen proximalen Knochenabschnitt zu den anderen festzustellen war.

Tabelle 13: Vergleich der Schnittstellen der 24 Wochen Gruppe

24 Wochen	Mittelwert	Median	SD	Min	Max
Proximal	26,50	26,50	0,35	26,00	27,00
Mittig	23,13	23,25	0,74	22,00	24,00
Distal	22,80	22,75	0,89	22,0	24,00

Wie auch Abbildung 28 zeigt, war zwischen mittigem und distalen Abschnitt nur ein geringfügiger Unterschied festzustellen. Die Mittelwerte dieser beiden Schnittstellen unterschieden sich lediglich um einen Wert von 0,33. (Tabelle 13)

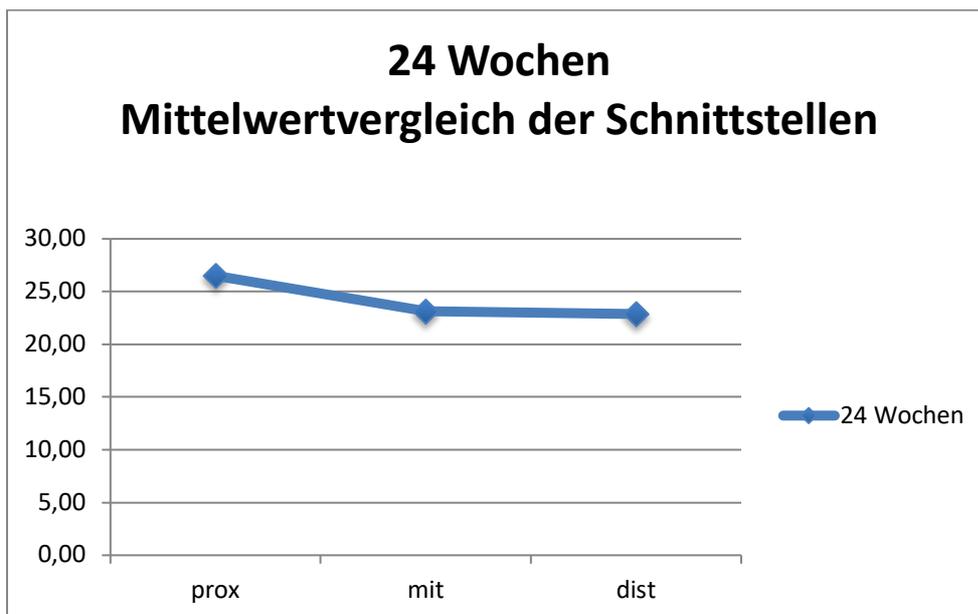


Abbildung 28: 24 Wochen Gruppe - Vergleich der Schnittstellen

4.3.1.4 48 Wochen

Tabelle 14 bestätigt, dass auch das Scoring der 48 Wochen Gruppe analog zu den vorher dargestellten Ergebnissen war.

Während der proximale Abschnitt mit einem Mittelwert von 27,63 am besten scorete, lagen die Werte der anderen Knochenabschnitte darunter. Allerdings waren die Unterschiede in dieser Gruppe nur noch sehr gering und sind in Abbildung 29 nur wegen einem sehr kleinen Maßstab gut darstellbar. (Tabelle 14)

Tabelle 14: Vergleich der Schnittstellen der 48 Wochen Gruppe

48 Wochen	Mittelwert	Median	SD	Min	Max
Proximal	27,63	27,50	0,22	27,50	28,00
Mittig	26,25	26,25	0,25	26,00	26,00
Distal	26,38	26,25	0,41	26,00	27,00

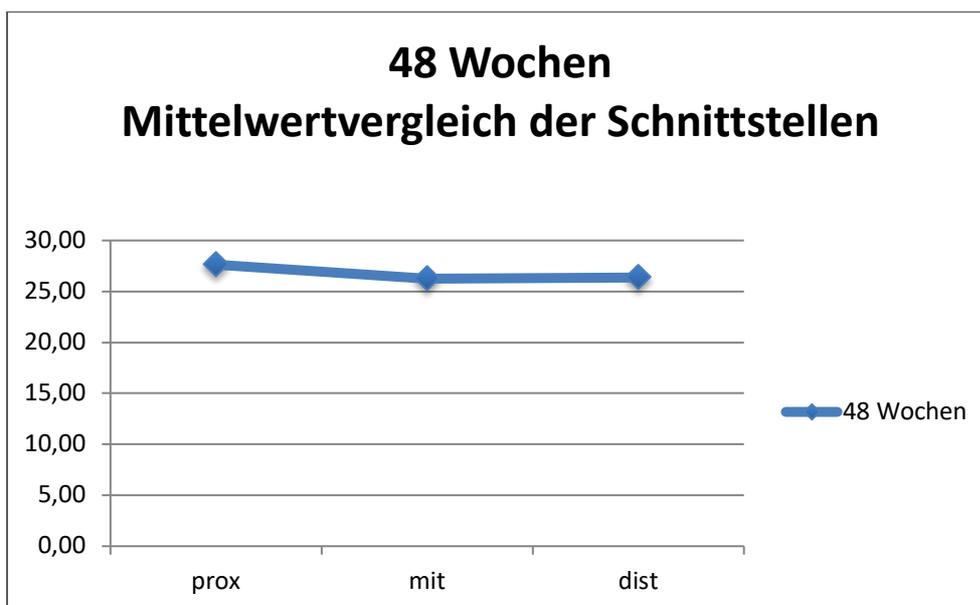


Abbildung 29: 48 Wochen Gruppe - Vergleich der Schnittstellen

4.3.2 Vergleich zwischen den Gruppen

Wie Tabelle 15 zeigt, wurden 5 Versuchsgruppen à 4 Tieren analysiert (Gesamt n= 20). Aus den Einzel- Score Ergebnissen jedes Versuchstieres wurde pro Wochen Gruppe ein mittlerer Scorewert errechnet. Die Standardabweichungen sowie Minimum und Maximum zeigen die Variation des Scorings innerhalb der Versuchstiergruppen. Die maximale Standardabweichung von $\pm 0,95$ wurde in der 16 Wochen Gruppe beobachtet, die geringste in der 48 Wochen Gruppe ($SD \pm 0,22$).

Tabelle 15: Deskriptive Statistik des Gesamt-Scores stratifiziert nach Wochen Gruppen

	N	Mittelwert	SD	Std.-Fehler	95% CI		Min	Max
					Untergrenze	Obergrenze		
4 Wochen	4	17,95	0,67	0,34	16,89	19,03	17,00	18,50
8 Wochen	4	19,71	0,16	0,08	19,45	19,96	19,50	19,83
16 Wochen	4	23,71	0,95	0,47	22,02	25,21	22,67	24,67
24 Wochen	4	24,17	0,71	0,35	23,04	25,29	23,33	24,83
48 Wochen	4	26,75	0,22	0,11	26,41	27,09	26,50	27,00
Gesamt	20	22,45	0,74	0,74	20,91	24,01	17,00	27,00

Abbildung 30 illustriert zusätzlich den Anstieg der Score-Werte in Abhängigkeit von der post-OP Überlebenszeit der Versuchstiere.

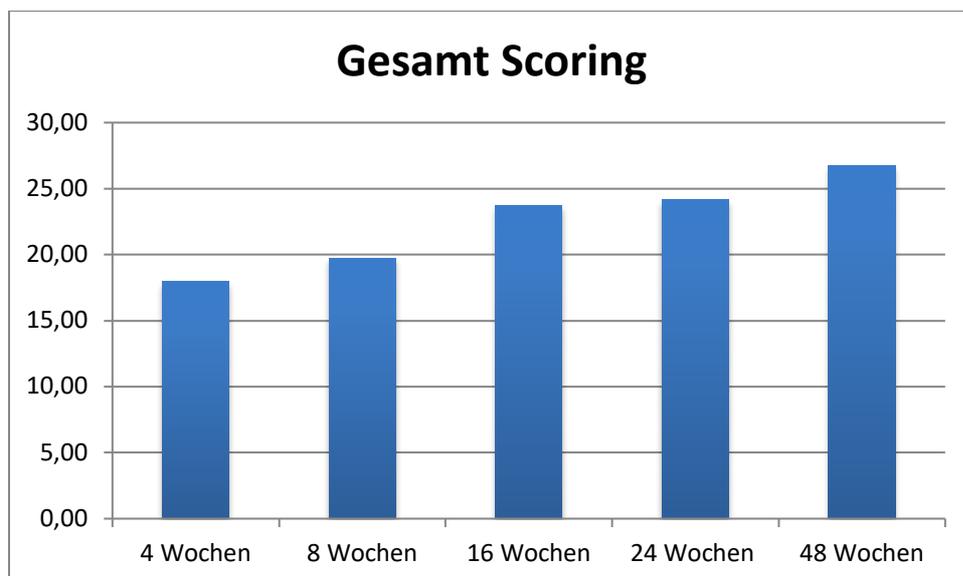


Abbildung 30: Vergleich des Gesamt-Scoring zwischen aller Versuchsgruppen

Die statistische Analyse der Mittelwerte hatte zum Ziel signifikante Unterschiede im Heilungsfortschritt zwischen den Wochengruppen zu detektieren.

Da es sich um eine sehr kleine Stichprobenzahl handelt wurde der Shapiro-Wilk-Test auf Normalverteilung durchgeführt. Wie Tabelle 15 zeigt handelt es sich um eine normalverteilte Stichprobe, aus diesem Grund wurde eine ANOVA als parametrischer Mittelwertvergleich als geeignetes Testverfahren ausgewählt. Voraussetzung der einfaktoriellen ANOVA ist Varianzhomogenität, die durch die Levene-Statistik nicht bestätigt werden konnte (vgl. Tabelle 17; $p=0,004$).

Tabelle 16: Test auf Normalverteilung

Shapiro-Wilk- Test			
	Statistik	df	Signifikanz
4 Wochen	0,871	4	0,304
8 Wochen	0,863	4	0,272
16 Wochen	0,916	4	0,512
24 Wochen	0,912	4	0,492
48 Wochen	0,993	4	0,972

Tabelle 17: Test auf Varianzhomogenität

	Levene-Statistik	df 1	df 2	p-Wert
Basierend auf den Mittelwerten	6,01	4	15	0,004
Basierend auf dem Median	4,37	4	15	0,015
Basierend auf dem Median mit angepassten df	4,27	4	6,64	0,047
Basierend auf dem getrimmten Mittel	5,66	4	15	0,006

Dementsprechend fiel die Wahl auf das Testverfahren einer Welch-ANOVA, die robust gegenüber der Verletzung der Varianzhomogenität ist. Das Ergebnis ($p=0,000$) zeigt, dass ein signifikanter Unterschied zwischen den Mittelwerten der getesteten Gruppen besteht. (Tabelle 18)

Tabelle 18: Welch-ANOVA

	Statistik	df 1	df 2	p-Wert
Welch-Test	575,11	4	6,94	0,000

Um anschließend zu identifizieren, welche der Gruppen sich signifikant (sig.) voneinander unterscheiden, wurde ein post-hoc-Test durchgeführt:

Tabelle 19: Post-hoc-Test

Wochen Gruppe (I)	Wochen Gruppe (J)	Mittlere Differenz (I-J)	Std.-Fehler	p-Wert	95% CI	
					Untergrenze	Obergrenze
4 Wochen						
	8 Wochen	-1,75	0,35	0,06	-3,61	0,11
	16 Wochen	-5,75	0,58	0,001	-8,17	-3,32
	24 Wochen	-6,21	0,49	0,000	-8,16	-4,25
	48 Wochen	-8,79	0,35	0,000	-10,59	-6,99
8 Wochen						
	4 Wochen	1,75	0,35	0,06	-0,11	3,61
	16 Wochen	-4,00	0,48	0,015	-6,68	-1,32
	24 Wochen	-4,46	0,36	0,004	-6,42	-2,49
	48 Wochen	-7,04	0,13	0,000	-7,60	-6,49
16 Wochen						
	4 Wochen	5,75	0,58	0,001	3,32	8,17
	8 Wochen	4,00	0,48	0,015	1,32	6,68
	24 Wochen	-0,46	0,59	0,989	-2,90	1,98
	48 Wochen	-3,04	0,49	0,032	-5,67	-0,41
24 Wochen						
	4 Wochen	6,21	0,49	0,000	4,25	8,16
	8 Wochen	4,46	0,36	0,004	2,49	6,42
	16 Wochen	0,46	0,59	0,989	-1,98	2,90
	48 Wochen	-2,58	0,37	0,019	-4,49	-0,67
48 Wochen						
	4 Wochen	8,79	0,35	0,000	6,98	10,60
	8 Wochen	7,04	0,13	0,000	6,49	7,60
	16 Wochen	3,04	0,49	0,032	0,41	5,67
	24 Wochen	2,58	0,37	0,019	0,67	4,49

Die Ergebnisse des post-hoc-Tests in Tabelle 19 zeigen:

- 4 Wochen Gruppe:
 - kein sig. Unterschied zur 8 Wochen Gruppe (p= 0,06)
 - sig. Unterschied zu 16 Wochen Gruppe (**p= 0,001**)
 - sig. Unterschied zu 24 Wochen Gruppe (**p= 0,000**)
 - sig. Unterschied zu 48 Wochen Gruppe (**p= 0,000**)

- 8 Wochen Gruppe
 - sig. Unterschied zu 16 Wochen Gruppe (**p= 0,015**)
 - sig. Unterschied zu 24 Wochen Gruppe (**p= 0,004**)
 - sig. Unterschied zu 48 Wochen Gruppe (**p= 0,000**)

- 16 Wochen Gruppe
 - kein sig Unterschied zu 24 Wochen Gruppe ($p= 0,989$)
 - sig. Unterschied zu 28 Wochen Gruppe (**$p= 0,032$**)

- 24 Wochen Gruppe
 - sig. Unterschied zu 48 Wochen Gruppe (**$p= 0,019$**)

- 48 Wochen Gruppe
 - wie die oben angeführten Ergebnisse zeigen, unterscheidet sich die 48 Wochen Gruppe von allen anderen signifikant

5 Diskussion

5.1 Zusammenfassung der Ergebnisse

Die deskriptive Auswertung der einzelnen Score Parameter ergab für die „Union“, dass nach 4 Wochen eine Defektüberbrückung mit fibrösen Gewebe zu beobachten war, nach 8 Wochen waren die Fraktarenden ostochondral überbrückt und in der 48 Wochen Gruppe war der Defektspace bereits vollständig durch Knochen ersetzt.

Die Struktur des *Kortex* war nach 4 Wochen in der frühen Reorganisationsphase, nach 8 Wochen war bereits der Großteil des Knochenmantels aller ausgewerteten Schnitte intakt. In der 48 Wochen Gruppe konnte die vollständige Rekonstruktion des *Kortex* beobachtet werden.

Auch die *Spongiosa* befand sich bereits nach 4 Wochen im aktiven ossären Umbau mit bereits vorhandenem Knochenmaterial. Ab 16 Wochen reorganisierte sich die Bälkchenstruktur der Knochen.

Im Hinblick auf die *Defektüberbrückung* war in der 4 Wochen Gruppe mindestens Knorpelmaterial und ab 8 Wochen unreifer Knochen vorhanden. Ab der 16. Woche nach der OP war bereits die Defektüberbrückung durch reifen Knochen abgeschlossen.

Das *Knochenmark* war nach 4 Wochen fibrös ersetzt, ab der 16 Wochen war bei den meisten Tieren bereits der Umbau zu rotem Knochenmark abgeschlossen. In der 48 Wochengruppe war bei allen Versuchstieren der vollständige Umbau zu adultem Knochenmark abgeschlossen.

In der histologischen Auswertung gab es keinen Hinweis auf eine floride Entzündungsreaktion. In keinem histologischen Schnitt zeigten sich Fremdkörperreaktionen oder ossäre Reaktionen wie Osteolysen um das Bio-ISOS Implantat.

Bei der Beurteilung des Gesamtscores wurden zunächst die Versuchstiere innerhalb einer Gruppe verglichen. In der 4 und der 8 Wochen Gruppe nahm dabei der mittlere Score-Wert von proximal nach distal ab. In der 16, 24 und 48 Wochen Gruppe scorte im Mittel nur noch der proximale Knochenabschnitt höher als der mittige und distale Teil, während mittiger und distaler Abschnitt nur Abweichungen innerhalb der jeweiligen SD zeigten.

Im Vergleich zwischen den Versuchsgruppen war lediglich zwischen der 4 und 8 sowie der 16 und 24 Wochen Gruppe kein signifikanter Heilungsfortschritt erkennbar. Bei allen anderen scorte die jeweils darauffolgende Wochen Gruppe mit einem signifikant besseren Ergebnis als die darunter liegende.

5.2 Vergleich mit den makroskopischen und radiologischen Ergebnissen der Bio-ISOS I Studie

In der klinischen Nachuntersuchung fanden sich bei der Bio-ISOS I Studie von Maßen 2018 [20] keinerlei Hinweise auf eine klinische Infektion, lediglich ein Versuchstier zeigte eine blande Weichteilinduration a.e. aufgrund des resorbierbaren Nahtmaterials. Weiterhin gab es in der CT-Bildgebung nach Auswertung nach der Klassifikation von Hoffmann keinerlei Hinweis auf implantatassoziierte, ossäre Reaktionen [68]. Diese Ergebnisse histologisch durch die vorliegende Arbeit weiter gestützt. In keinem der Schnitte gab es den Hinweis auf eine Entzündungsreaktion oder ossäre Reaktionen um das Implantat, wie zum Beispiel Osteolysen.

Die makroskopische CT-gestützte Auswertung der Bio-ISOS I Studie von Maßen 2018 [20] ergab weiterhin, dass der Osteotomiespalt bei 95,8% der Tiere zum jeweiligen Untersuchungszeitpunkt vollständig überbrückt war. Lediglich bei einem Versuchstier in der 8-Wochen-Gruppe musste zum Zeitpunkt der Untersuchung von einer verzögerten Heilung ausgegangen werden, da eine weitere Nachuntersuchung nicht möglich war. Wie in 5.1 und 4.2 beschrieben, entspricht dieses insgesamt sehr gute Ergebnis den histo-pathologischen Ergebnissen des Score Parameters „Union“ und „Defektüberbrückung“. In den Schnitten der 8 Wochen Gruppe zeigte sich kein Hinweis auf eine Pseudarthrose bei jedoch mindestens einer osteochondralen Überbrückung des Frakturspaltes. Insgesamt kann also nach histologischer Auswertung zumindest von einer regelrechten Überbrückung des Frakturspaltes auch nach 8 Wochen ausgegangen werden. Gegebenenfalls ist in der CT-Bildgebung eine vorwiegend chondrale Überbrückung nicht adäquat abgebildet, da auch in der CT-Bildgebung eine Kallusbildung bei dem betroffenen Tier zu erkennen war.

Im Rahmen der Studie von Maßen 2018 [20] konnte weiterhin eine ausgeprägte Kallusreaktion nachgewiesen werden. Somit können auch nach Versorgung mit Bio-ISOS Implantaten noch geringe Dislokationskräfte auf die Fraktur einwirken, da das 5mm Standard-Implantat gegebenenfalls keinen 100%igen press-fit erreichte und somit Mikrobewegungen möglich waren. Diese sind jedoch im Rahmen der indirekten Frakturheilung als regelrecht zu werten. Verglichen mit den vorliegenden Ergebnissen, in denen die proximalen Abschnitte insgesamt bessere Scoring-Ergebnisse lieferten als die distalen, kann hier ggf. die Erklärung darin gesucht werden, dass eine Ruhigstellung postoperativ bzw. eine belastungsfreie Beübung [69], nicht möglich war. Hierdurch könnte durch die schmerzadaptierte Vollbelastung ein höherer Hebel im Bereich der Fraktur gewirkt haben, was zu einer vermehrten Kallusbildung insgesamt und geringen Fehlstellungen sowie geringfügig niedrigeren Scoringwerten im distalen Bereich geführt hat.

In einer Linie mit den Ergebnissen von Maßen 2018, die beschreiben, dass „*bei 95,8% der Versuchstiere durch die operative Versorgung mittels Bio-ISOS eine vollständige knöcherne Heilung erreicht werden*“ [20] konnte, ist die histo-pathologischen Beobachtung, dass die Versuchstiergruppen mit höherer post-operativer Überlebenszeit signifikant besser scoren und somit einen regelrechten Heilungsverlauf nach einer Fraktur beobachtet werden konnte.

5.3 Diskussion der Ergebnisse im wissenschaftlichen Kontext

Die folgende Einordnung der Ergebnisse in den wissenschaftlichen Kontext soll dazu dienen, die Funktionsweise des Bio-ISOS Implantats im Vergleich mit anderen Studien zu diskutieren.

Funktionsweise des Bio-ISOS Implantats

Peterburs et al. haben den Einfluss von Reduktionsmanövern auf die Frakturheilung bei Ratten sowohl biomechanisch als auch histologisch untersucht. Hierfür wurden 144 männliche Ratten in 12 randomisierten Versuchsgruppen (1, 2, 3 und 4 Wochen Gruppe) unterteilt. Nach Osteotomie der Femura, wurden alle Tiere mit einem Fixateur externe versorgt. Anschließend wurde ein Roboter-assistiertes-Reduktionsverfahren durchgeführt, das die zwei Knochenenden schrittweise annäherte. Während bei einer Gruppe das Verfahren nur einmalig durchgeführt wurde, durchlief die zweite Gruppe die Prozedur 10mal, bei der Kontrollgruppe fand keine Intervention statt. Die Ergebnisse zeigten, dass eine Woche nach dem Reduktions-Manöver die Gruppe mit einer einmaligen Intervention das höchste kortikale Knochenvolumen aufwies. Auch die Bio-ISOS Prothese arbeitet mit einem System, das darauf basiert Zugspannung auf die Frakturenden auszuüben. Insbesondere die guten Ergebnisse der Scoreparameter Frakturvereinigung, Kortikalisdicke und Defektfüllung führen wir auf den effizienten und konstanten Aufbau einer Frakturkompression durch das Bio-ISOS Implantat zurück. Ein Vorteil des Bio-ISOS Systems im Vergleich zu der von Peterburs et al vorgestellten Roboter-assistierten Methode ist, dass unser Verfahren weniger invasiv, weniger zeitaufwändig und kostengünstiger ist. [70]

Der Einfluss der Kompression, die durch das Bio-ISOS Implantat auf die Fraktur ausgeübt wird, wurde ebenfalls von den Ergebnissen einer Forschungsarbeit von Aro und Chao zu verschiedenen Einflussfaktoren der Knochenheilung beschrieben. In dem dort beschriebenen Tiermodell wurden die an der Tibia osteotomierten Hasen mit einem externen Fixateur versorgt und in drei Untersuchungsgruppen unterteilt. Gruppe 1 verblieb mit einem Frakturspalt unter 1 mm, nach zwei Wochen wurde der Fixateur dynamisiert, um die axiale Kompression der Frakturenden während Bewegung zu erlauben. In der zweiten Gruppe wurde die Osteotomielücke durch den Fixateur geschlossen, ohne konstante Kompression auf den Knochen auszuüben. Die dritte Gruppe hatte einen Frakturspalt von 2 mm, die Dynamisierung des Fixateurs begann nach 4 Wochen. In den Resultaten zeigte sich, dass durch eine Dynamisierung der Frakturenden und somit eine Kombination aus primärer und sekundärer Frakturheilung ein positiver Einfluss auf die Heilung und die Qualität des

Knochens erreicht werden konnte. [71] Auch das Bio-ISOS Implantat vereint durch die straffe Zuggurtung zu Beginn einerseits und die im Verlauf nachlassende Spannung des teilresorbierbaren Fadens mit einer dadurch erreichten Dynamisierung auf die Frakturenden Anteile aus primärer und sekundärer Frakturheilung. Die intramedulläre Funktionsweise des Bio-ISOS Implantats erzielt sowohl in der bildgestützten als auch in der mikroskopischen Beurteilung der Knochenheilung sehr gute Ergebnisse. Im histologischen Scoring konnte gezeigt werden, dass der Frakturspalt bereits nach 4 Wochen komplett überbrückt war und nach 8 Wochen mit unreifem Knochenmaterial gefüllt war, das im Gegensatz zum weichen Knorpelgewebe eine höhere Stabilität aufweist.

Vergleich mit anderen Osteosyntheseverfahren

Bio-resorbierbare Implantate

Ebenfalls im Tiermodell testeten Viljanen et al. (1998) an Kaninchen die Versorgung distaler Femurfrakturen mit resorbierbaren Poly-L-Lactiden im Vergleich zu intramedullären Metallimplantaten. In der Gruppe mit den resorbierbaren Implantaten gab es keinen signifikanten Unterschied in der kortikalen Knochendichte zwischen der osteotomierten und der gesunden Kontrollseite der Tiere. Bei der Gruppe, die durch Metallimplantate versorgt wurde, wiesen die operierten Femura eine signifikant geringere Dichte im Vergleich zur kontralateralen Seite auf. Die Autoren schließen darauf, dass durch den Einsatz von resorbierbaren Implantaten das Osteoporoserisiko durch stress-shielding reduziert wird. Der Heilungsfortschritt der Frakturen wurde in dieser Studie lediglich durch CT-Aufnahmen überprüft, weswegen nur ein näherungsweise Vergleich einzelner Score Variablen möglich ist. Entsprechend der Ergebnisse von Viljanen et al. beobachteten auch wir in der histopathologischen Auswertung gute Ergebnisse für die Neubildung von Kortex und Spongiosa. So konnten bereits nach 8 Wochen ein zum Großteil intakter Knochenmantel beobachtet werden. Der wiederaufgebaute Knochen der Spongiosa hatte sich nach 16 Wochen schon teilweise wieder in seiner charakteristischen Bälkchenstruktur reorganisiert. Beide Ergebnisse sprechen ebenfalls auf mikroskopischer Ebene dafür, dass durch die Behandlung der Versuchstiere mit dem resorbierbaren Implantat eine geringe Knochendichte vermieden werden kann. [72]

In einer weiteren Studie zum Vergleich zwischen der Frakturversorgung mit bioresorbierbaren Materialien vs. Metallimplantaten analysierte die Forschergruppe um Viljanen et al (2001) sowohl das radiologische als auch das histo-pathologische Outcome. Untersucht wurden 22 Hasen, die nach Osteotomie des distalen Femurs mit einem resorbierbaren Implantat versorgt wurden, und 38 Tiere mit Osteosynthese durch ein Metallimplantat. Für die histologischen Untersuchungen betragen die follow-up Zeiten 16, 24 und 48 Wochen. Histomorphologisch beschreiben sie, dass ab 16 Wochen post-OP keine Zeichen der „non-Union“ mehr sichtbar gewesen seien. Leider wird nicht genauer darauf eingegangen, wie genau die zelluläre Struktur des Knochens zu diesem Zeitpunkt aussieht. Das in der vorliegenden Forschungsarbeit verwendete Scoring System zeigt, dass bereits in der 8 Wochen Gruppe der Defekt osteochondral verbunden ist. Weiter beschreiben Viljan et al., dass nach 18 Wochen bereits eine Defektfüllung mit Lamellenknochen stattgefunden hat, was unseren Ergebnissen entspricht.[9]

Im Rahmen der Frakturversorgung mit bioresorbierbaren Materialien kam es immer wieder zu Berichten von periimplantären Osteolysen, Entzündungs- und Fremdkörperreaktionen insbesondere auf Implantate aus PGA, PGA/PLA und PDS- Zusammensetzungen. Diese implantatassoziierten Osteolysen und Fremdkörperreaktionen scheinen insbesondere mit der Abbaugeschwindigkeit des Implantats verknüpft zu sein, welche für PGA, PGA/PLA und PDS-Implantate deutlich kürzer ist als für die PLLA/PDLLA-Implantate. [73,68,74-76,20,8]

Tuomo et al. testeten resorbierbare intramedulläre Implantate aus poly(L/DL)lactide 70 : 30/bioactive glass [SR-P(L/DL)LA/bioactive glass]. Diese wurden nach Osteotomie des distalen Femurs als Osteosynthese an insgesamt 64 Ratten in einem Nachbeobachtungszeitraum von maximal 52 Wochen untersucht. Bei keinem der Tiere kam es zu Osteolysen oder Fremdkörperreaktionen um das Implantat und lediglich ein Versuchstier zeigte eine milde lokale Weichteilinfektion, was für eine insgesamt gute Biokompatibilität des bioresorbierbaren Implantats spricht. Die Ergebnisse der Studie, welche einem unserem Implantat ähnliche PLLA/PDLLA-Zusammensetzung verwendet, stützen die guten Ergebnisse der vorliegenden Arbeit, in der keine Osteolyse, Fremdkörperreaktion oder Entzündung beobachtet werden konnten. Allerdings wurden in der Studie bei 20 Versuchstieren Dislokationen der Fraktur und insgesamt 19 non-unions beschrieben. Diese Ergebnisse wurden auf eine nicht ideale initiale operative Versorgung zurückgeführt. In der vorliegenden Arbeit konnten keine non-unions beobachtet werden, was auch durch die Arbeit von Maßen 2018 gestützt wird, in welcher nur eine fragliche delayed-union nach 8 Wochen (aufgrund der Euthanasierung des Versuchstiers mit der fraglichen delayed-union nach 8 Wochen kann keine Aussage bezüglich der weiteren Heilung/nicht-Heilung getroffen werden) und insgesamt keine klinisch relevanten Dislokationen der Osteosynthese beschrieben werden. Dies könnte auch auf die suffizientere Stabilisierung der Osteosynthese mittels Zuggurtung zurückgeführt werden. [77,20]

Zwei weitere Studien von Pihlakamaki et al untersuchten die Weichteilreaktionen nach Implantation von PGA, PDS und PLLA an Kaninchenfemora ähnlich der vorliegenden Arbeit. Sowohl in den Nachuntersuchungen nach 3, 6, 12, 24, 52 Wochen sowie in der Langzeit-Nachuntersuchung nach 36 und 51 Monaten konnten keine Osteolysen, Entzündungsreaktionen oder Fremdkörperreaktionen beobachtet werden. [78,79] Diese Ergebnisse unterstützen die guten Ergebnisse der vorliegenden Arbeit bezüglich der Biokompatibilität von PLLA/PDLLA Implantaten. Diese wird ebenfalls von Prokop et al. bestätigt, welcher 36 Schafe in zwei Gruppen mit PLLA/PDLLA-Pins (Verhältnis 70:30) versus PLLA/PDLLA/beta-TCP-Pins zur Versorgung des distalen Femur vergleicht. Der Nachbeobachtungszeitraum betrug maximal 36 Monate. In der Gruppe PLLA/PDLLA kam es

zu keiner Entzündungsreaktion oder Osteolyse, in der PLLA/PDLLA/beta-TCP-Pin-Gruppe konnten zwei milden Entzündungsreaktionen mit isolierten Riesenzellen bzw. einem Granulom ohne klinische Anomalität beobachtet werden. Diese können bei Schafen auch im Rahmen von Verletzungen auftreten und können somit nicht in klaren Zusammenhang zum genutzten Implantat gestellt werden. [76]

Nicht-resorbierbare Implantate

McSweeney et al. untersuchten in einer Studie die Knochenheilung von Kaninchen Femura nach Versorgung mit einem speziellen intramedullären Stabilisierungssystem (IlluminOss Bone Stabilization System). Bei diesem Implantat handelte es sich um einen Ballon, welcher im Knochen mit einem Monomer gefüllt wurde, welcher anschließend aushärtet. Die Tiere wurden nach 1, 4, 12, 26 und 52 Wochen euthanisiert. Für die Evaluation der Defektheilung wurden Knochenschnitte mikroskopisch untersucht. Sie beobachteten unter anderem, dass nach 26 Wochen die Defektlücke zum Großteil durch Lamellenknochen ausgefüllt war. Die Versuchstiere, die in unserer Studie mit dem Bio-ISOS Implantat versorgt wurden, erreichten bereits größtenteils nach 16 Wochen den vollen Score für Defektfüllung, da bei diesen Tieren ausschließlich reifer Knochen den Defektspace ausfüllte. [80]

Eine aktuelle Studie von Müller et al. beschreibt die Frakturversorgung durch ein neuartiges Osteosynthesematerial mit „memory-Funktion“ (Nitel-titanium shape memory alloy). Diese Methode hat zum Ziel das Implantat non-invasiv an den sich durch den Heilungsfortschritt verändernden Knochen anzupassen und so eine angepasste Belastung zuzulassen, die wiederum den Progress in der Knochenheilung verstärken soll. Ähnlich wie das Bio-ISOS Implantat hat diese neue Entwicklung von Osteosyntheseverfahren das Ziel, dass ein Implantat sich an den heilenden Knochen anpasst, um eine schnellere Mobilisation zu ermöglichen und so nicht nur einen besseren Heilungsfortschritt zu erreichen, sondern auch Komorbiditäten zu verhindern. In der beschriebenen Forschungsarbeit wurden die Tiere nach 8 Wochen euthanisiert. Man konnte in der makroskopischen Evaluation, μ CT und post mortem Biegeversuchen keinen signifikanten Unterschied zwischen Interventions- und Kontrollgruppe (Osteosynthese ohne „memory-Funktion“) feststellen. In beiden Gruppen wurde eine erfolgreiche Knochenheilung berichtet. [81]

In der mikroskopischen Auswertung des Bio-ISOS Implantats haben wir im Gesamt Scoring einen stetig progredienten Heilungsfortschritt für alle im Score verwendeten Dimensionen der Knochenheilung festgestellt. Allerdings können wir in der mikroskopischen Beurteilung der Knochen nicht von einer vollständigen Heilung nach 8 Wochen ausgehen. Wie unsere Ergebnisse zeigen, erreichen die darauffolgenden Wochen Gruppen mit gesteigerter Überlebenszeit signifikant bessere Ergebnisse in der Gesamtbeurteilung der Frakturheilung. Dieser Unterschied in den Ergebnissen zu der Studie von Müller et al. ist vermutlich vor allem darauf zurück zu führen, dass die Knochenheilung nach Versorgung mit dem Form-anpassenden Material lediglich makroskopisch evaluiert wurde.

Schlussfolgerung

Insgesamt zeigt der Vergleich der Ergebnisse mit aktuellen Arbeiten zum Thema der Frakturversorgung mit resorbierbaren Materialien, dass unsere Resultate denen des aktuellen wissenschaftlichen Konsensus entsprechen. Tendenziell konnten durch das Bio-ISOS Implantat versorgten Frakturen sogar bessere Scoringergebnisse, als die herangezogenen Vergleichsstudien erreichen. Allerdings beschränkt sich die Einordnung in den aktuellen wissenschaftlichen Stand lediglich auf einzelne Score Parameter, da die Studien, die mit vergleichbarem Versuchsaufbau arbeiten, in der Regel nur einzelne Parameter (Bone union, Cortex, Spongiosa, Defektfüllung) mikroskopisch untersuchten.

Stärken und Schwächen der Studie

In diesem Zusammenhang muss neben den Schwierigkeiten mit der Vergleichbarkeit der Resultate das Fehlen einer Vergleichsgruppe als Schwäche der hier präsentierten Studie eingestanden werden. Das Bio-ISOS Implantat sollte in dieser ersten Phase zunächst darauf getestet werden, welche Heilungsfortschritte erreicht werden können. Im nächsten Schritt sollte ein direkter Vergleich in vivo mit herkömmlichem Osteosynthesematerial durchgeführt werden. Eine weitere Limitation der Studie liegt im vergleichsweise kurzen Nachbeobachtungszeitraum der Tiere, womit keine abschließende Aussage über langfristige ossäre Reaktionen gemacht werden kann.

In der aktuellen Phase der Erprobung des Implantats sehen wir es als klare Stärke unsere Studie, dass wir die Frakturheilung sowohl makroskopisch als auch mikroskopisch untersucht haben. Weiterhin wurde ein mehrdimensionaler, validierter Score zur Beurteilung der Frakturheilung verwendet, wodurch sowohl an Einzelparametern als auch am Gesamt Scoring der Heilungsprogress beschrieben werden konnte. Darüber hinaus ist ein Vorteil im methodischen Vorgehen des Bio-ISOS Projektes der Einsatz von Kaninchenfemura, da diese eine gute Vergleichbarkeit mit kleinen Röhrenknochen des Menschen aufweisen [8], für deren Versorgung das Bio-ISOS Implantat etabliert werden soll.

6 Zusammenfassung

Zusammengefasst konnte die vorliegende Studie zur mikroskopischen Beurteilung der Frakturheilung nach Versorgung mit dem Bio-ISOS Implantat zeigen, dass im Tiermodell bereits nach 4 Wochen 60% des Gesamt-Scorings erreicht wurden. Die Resultate zeigen eine schnelle und effiziente Knochenheilung auch unter sofortiger Vollbelastung des Kaninchenfemurs, bei der im untersuchten Kollektiv keine Komplikationen (wie Osteolysen, Entzündungen oder eine Dislokation der Frakturrenden) beobachten konnten. Dadurch kann eine schnelle Mobilisierung erreicht werden, was sich wiederum positiv auf die Knochenheilung auswirkt und das Komplikationsrisiko mindert. Dieser Effekt wirkt sich zum einen positiv auf gesundheitsökonomische Faktoren wie Bettenzahlen und Liegedauer in Kliniken aus. Zum andern trägt eine kurze und möglich komplikationsarme Behandlung zum individuellen Patientenwohl bei.

Nachdem nun die Wirkungsweise des Implantats dargestellt werden konnte, soll in der nächsten Phase der direkte Vergleich des Bio-ISOS Implantats mit etablierten metallischen Osteosynthesematerialien und resorbierbaren Implantationsverfahren erfolgen. Wie in der Diskussion dargestellt, zeigte die Einordnung in den aktuellen wissenschaftlichen Kontext, dass das Bio-ISOS Implantat im Vergleich zu anderen Studien tendenziell etwas besser abschneidet. Diese Tendenz gilt es in weiterführenden Studien zu quantifizieren und validieren. Prinzipiell ist das Resomer 704S® von der Firma Boehringer Ingelheim Pharma GmbH & Co. KG ein in der Humanmedizin zugelassener Wirkstoff, weshalb auch die Verwendung des Implantats als Osteosynthese menschlicher Frakturen kleiner Röhrenknochen in Betracht gezogen werden sollte.

7 Literaturverzeichnis

1. Die 20 häufigsten Hauptdiagnosen 2016. Statistisches Bundesamt.
<https://www.destatis.de/DE/ZahlenFakten/GesellschaftStaat/Gesundheit/VorsorgeRehabilitationseinrichtungen/Tabellen/DiagnosenVorsorgeReha.html>.
2. Robert-Koch-Institut (2013) Beiträge zur Gesundheitsberichterstattung des Bundes. Das Unfallgeschehen bei Erwachsenen in Deutschland. Ergebnisse des Unfallmoduls der Befragung. »Gesundheit in Deutschland aktuell 2010«. Robert-Koch-Institut.
http://www.rki.de/DE/Content/Gesundheitsmonitoring/Gesundheitsberichterstattung/GBEDownloadsB/unfallbericht_geda.pdf%3F_blob%3DpublicationFile.
3. Bostman O (1994) Economic considerations on avoiding implant removals after fracture fixation by using absorbable devices. *Scand J Soc Med* 22 (1):41-45.
doi:10.1177/140349489402200107
4. Downing ND, Griffin DR, Davis TR (1997) A comparison of the relative costs of cast treatment and intramedullary nailing for tibial diaphyseal fractures in the UK. *Injury* 28 (5-6):373-375. doi:10.1016/s0020-1383(97)00028-4
5. Bostman OM (1996) Metallic or absorbable fracture fixation devices. A cost minimization analysis. *Clin Orthop Relat Res* (329):233-239
6. Larsen K, Hansen TB, Thomsen PB, Christiansen T, Soballe K (2009) Cost-effectiveness of accelerated perioperative care and rehabilitation after total hip and knee arthroplasty. *J Bone Joint Surg Am* 91 (4):761-772. doi:10.2106/JBJS.G.01472
7. Nagda SH, Altobelli GG, Bowdry KA, Brewster CE, Lombardo SJ (2010) Cost analysis of outpatient anterior cruciate ligament reconstruction: autograft versus allograft. *Clin Orthop Relat Res* 468 (5):1418-1422. doi:10.1007/s11999-009-1178-y
8. Pieske O (2010) BIO-ISOS. Ein neuartiges Implantat für Röhrenkochenfrakturen. LMU Klinikum.
9. Viljanen J, Pihlajamäki H, Kinnunen J, Bondestam S, Rokkanen P (2001) Comparison of absorbable poly-L-lactide and metallic intramedullary rods in the fixation of femoral shaft osteotomies: an experimental study in rabbits. *J Orthop Sci* 6 (2):160-166.
doi:10.1007/s0077610060160
10. Manninen MJ, Pohjonen T (1993) Intramedullary nailing of the cortical bone osteotomies in rabbits with self-reinforced poly-L-lactide rods manufactured by the fibrillation method. *Biomaterials* 14 (4):305-312
11. Claes L, Ignatius A (2002) [Development of new, biodegradable implants]. *Chirurg* 73 (10):990-996. doi:10.1007/s00104-002-0543-0
12. Claes LE (1992) Mechanical characterization of biodegradable implants. *Clin Mater* 10 (1-2):41-46. doi:10.1016/0267-6605(92)90083-6
13. Hofmann GO (1992) Biodegradable implants in orthopaedic surgery--a review on the state-of-the-art. *Clin Mater* 10 (1-2):75-80. doi:10.1016/0267-6605(92)90088-b

14. Hofmann GO (1995) Biodegradable implants in traumatology: a review on the state-of-the-art. Arch Orthop Trauma Surg 114 (3):123-132. doi:10.1007/BF00443385
15. Prokop A, Jubel A, Helling HJ, Udomkaewkanjana C, Brochhagen HG, Rehm KE (2002) [New biodegradable polylactide implants (Polypin-C) in therapy for radial head fractures]. Chirurg 73 (10):997-1004. doi:10.1007/s00104-002-0545-y
16. Pieske OP, W.; Michaeli, W.; Klee, D. (2007) Implantat für kleine Röhrenknochen sowie Verfahren zur Behandlung von Röhrenknochenfrakturen (Innovationswettbewerb zur Förderung der Medizintechnik). Bundesministerium für Bildung und Forschung
17. Bauer M (2012) Vergleich der Biomechanik herkömmlicher chirurgischer Methoden zur Versorgung von Rippenfrakturen mit dem neuen bioresorbierbaren Implantat Bio-ISOS. LMU Klinikum.
18. Hartz N (2010) Entwicklung und Erprobung eines intramedullären, bioresorbierbaren Implantats zur Versorgung von Schaftfrakturen an kleinen Röhrenknochen. Fachhochschule Koblenz.
19. Michaelis I (2010) Qualifikation des biodegradierbaren Polymers Poly-ε-Caprolacton als Implantatmaterial. RWTH Aachen.
20. Massen F (2018) Bio-ISOS. Experimentelle Auswertung einer neuartigen bioresorbierbaren, intramedullären Spannosteosynthese zur Therapie von Schaftfrakturen kleiner Röhrenknochen am in vivo Kaninchenmodell. LMU München.
21. Marcazzan S, Weinstein RL, Del Fabbro M (2018) Efficacy of platelets in bone healing: A systematic review on animal studies. Platelets 29 (4):326-337. doi:10.1080/09537104.2017.1327652
22. Polzer H, Polzer S, Mutschler W, Prall WC (2012) Acute fractures to the proximal fifth metatarsal bone: development of classification and treatment recommendations based on the current evidence. Injury 43 (10):1626-1632. doi:10.1016/j.injury.2012.03.010
23. Windolf J, Rueger JM, Werber KD, Eisenschenk A, Siebert H, Schadel-Hopfner M (2009) [Treatment of metacarpal fractures. Recommendations of the Hand Surgery Group of the German Trauma Society]. Unfallchirurg 112 (6):577-588; quiz 589. doi:10.1007/s00113-009-1630-1
24. Breusch S. CM, Mau H., Sabo D. (2013) Klinikleitfaden Orthopädie und Unfallchirurgie.
25. Fricker RK, M.; Nuñez, F.; Axelrod, T. Metacarpales - Reduction & Fixation. AO Foundation.
<https://www2.aofoundation.org/wps/portal/surgery?bone=Hand&segment=Metacarpals&showPage=redfix>. Accessed 06.10.2019 2019
26. Fricker RK, M.; Nunez, F.; Axelrod, T. (2008) Flexible intramedullary nail. Diaphyseal simple, transverse. AO Surgery Reference.
<https://surgeryreference.aofoundation.org/orthopedic-trauma/adult-trauma/clavicle/diaphyseal-simple-transverse/flexible-intramedullary-nail>. Accessed 02.05.2021
27. Fricker RK, M.; Nuñez, F.; Axelrod, T. Intramedullary K-wire fixation.
https://www2.aofoundation.org/wps/portal/!ut/p/a1/04_Sj9CPykssy0xPLMnMz0vMAfGjzOKN_A0M

[3D2DDbz9 UMMDRyDXQ3dw9wMDAwCTYEKivEocDQnTr8BDuBoQEh_QW5oKABaevup/dl5/d5/L2dJQSEvUUt3QS80SmIFL1o2XzJPMDBHSVMwS09PVDEwQVNFMUdWRjAwMFE1/?showPage=redfix&bone=Hand&segment=Metacarpals&classification=77-Head, Subcapital&treatment=&method=Intramedullary K-wire fixation&implanttype=&approach=&redfix_url=1467357514650](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1467357514650/). Accessed 06.10.2019

28. Foucher G (1995) "Bouquet" osteosynthesis in metacarpal neck fractures: a series of 66 patients. *J Hand Surg Am* 20 (3 Pt 2):S86-90. doi:10.1016/s0363-5023(95)80176-6

29. Foucher G, Chemorin C, Sibilly A (1976) [A new technic of osteosynthesis in fractures of the distal 3d of the 5th metacarpus]. *Nouv Presse Med* 5 (17):1139-1140

30. Jubel A, Andermahr J, Weisshaar G, Schiffer G, Prokop A, Rehm KE (2005) [Intramedullary nailing (ESIN) in clavicular pseudoarthroses. Results of a prospective clinical trial]. *Unfallchirurg* 108 (7):544-550. doi:10.1007/s00113-005-0937-9

31. Kettler M, Schieker M, Braunstein V, König M, Mutschler W (2007) Flexible intramedullary nailing for stabilization of displaced midshaft clavicle fractures: technique and results in 87 patients. *Acta Orthop* 78 (3):424-429. doi:10.1080/17453670710014022

32. Andermahr J, Faymonville C, Rehm KE, Jubel A (2008) [Percutaneous plate osteosynthesis for clavicular fractures. Initial description]. *Unfallchirurg* 111 (1):43-45. doi:10.1007/s00113-007-1304-9

33. Andermahr JM, M.; Nem, D. (2015) Flexible intramedullary nail. Diaphyseal simple, transverse. <https://surgeryreference.aofoundation.org/orthopedic-trauma/adult-trauma/clavicle/diaphyseal-simple-transverse/flexible-intramedullary-nail>. Accessed 02.05.2021

34. Heim DL, S.; Mosheiff, R.; Weil, Y. (2013) Intramedullary nailing. Multifragmentary radial fracture with non-multifragmentary ulnar fracture.

<https://surgeryreference.aofoundation.org/orthopedic-trauma/adult-trauma/forearm-shaft/multifragmentary-radial-fracture-with-non-multifragmentary-ulnar-fracture/intramedullary-nailing-principles>. Accessed 02.05.2021

35. Rüedi TM, WM. (2000) Implants and materials in fracture fixation. In: Perren SM, R.; Ortrun, P. (ed) *AO Principles of fracture management*. Thieme, p 33-42

36. Thomas P, Thomsen M (2010) [Implant allergies]. *Hautarzt* 61 (3):255-262; quiz 263-254. doi:10.1007/s00105-009-1907-x

37. Deutman R, Mulder TJ, Brian R, Nater JP (1977) Metal sensitivity before and after total hip arthroplasty. *J Bone Joint Surg Am* 59 (7):862-865

38. Muller-Farber J (2003) [Removal of metal in traumatology]. *Unfallchirurg* 106 (8):653-668. doi:10.1007/s00113-003-0637-2

39. Petravic BB, B. (1998) Metallentfernung nach Osteosynthesen am Handskelett. *OP J*

40. Heidemann W, Jeschkeit S, Ruffieux K, Fischer JH, Wagner M, Kruger G, Wintermantel E, Gerlach KL (2001) Degradation of poly(D,L)lactide implants with or without addition of calciumphosphates in vivo. *Biomaterials* 22 (17):2371-2381

41. Prevel CD, Eppley BL, Ge J, Winkler MM, Katona TR, D'Alessio K, Sarver D (1996) A comparative biomechanical analysis of resorbable rigid fixation versus titanium rigid fixation of metacarpal fractures. *Ann Plast Surg* 37 (4):377-385
42. Böhm KN, M. (2009) Krankheitskosten., vol Heft 48. Statistisches Bundesamt, Gesundheitsberichterstattung des Bundes
43. DESTATIS (2009) Gesundheit - Fallpauschalenbezogene Krankenhausstatistik (DRG-Statistik). Operationen und Prozeduren der vollstationären Patientinnen und Patienten in Krankenhäusern. Statistisches Bundesamt Wiesbaden
44. Nishizuka T, Kurahashi T, Hara T, Hirata H, Kasuga T (2014) Novel intramedullary-fixation technique for long bone fragility fractures using bioresorbable materials. *PLoS One* 9 (8):e104603. doi:10.1371/journal.pone.0104603
45. Deluca PA, Lindsey RW, Ruwe PA (1988) Refracture of bones of the forearm after the removal of compression plates. *J Bone Joint Surg Am* 70 (9):1372-1376
46. Wolff J (2010) The classic: on the inner architecture of bones and its importance for bone growth. 1870. *Clin Orthop Relat Res* 468 (4):1056-1065. doi:10.1007/s11999-010-1239-2
47. GmbH&Co.KG B-I-P (2009) Resomer® LR 704 S Ingelheim am Rhein, Germany Patent
48. Manner M, Roesler B (2000) [Orthograde Kirschner wire osteosynthesis. Experiences with intramedullary fixation of the distal metacarpal V fracture]. *Chirurg* 71 (3):326-330
49. ASTM-International (2004) Standard Specification and Test Method for Metallic Bone Plates. ASTM-International, West Conshohocken, PA, United States
50. Ulfing N (2011) Kurzlehrbuch Histologie. 3 edn. Thieme
51. Welsch U (2009) Lehrbuch Histologie. 2 edn. Elsevier
52. Schüncke MS, E.; Schumacher, U.; Voll, M.; Wesker, K. (2007) Prometheus. Allgemeine Anatomie und Bewegungssystem. Thieme
53. Rassow JH, K.; Netzker, R.; Deutzmann, R. (2008) Biochemie. Duale Reihe, 2 edn. Thieme
54. Kirchner TM-H, H.K.; Roessner, A. Kurzlehrbuch Pathologie. 12 edn
55. Bohndorf KI, H.; Fischer, W. (2006) Radiologische Diagnostik der Knochen und Gelenke. 2 edn. Thieme
56. Oryan A, Monazzah S, Bigham-Sadegh A (2015) Bone injury and fracture healing biology. *Biomed Environ Sci* 28 (1):57-71. doi:10.3967/bes2015.006
57. Seebach CM, I. (2011) Pathophysiologie des Knochens. In: Scharf HR, A.; Pohlemann, T.; Marzi, I.; Kohn, D.; Günther, K. (ed) Orthopädie und Unfallchirurgie: Facharztwissen nach der neuen Weiterbildungsordnung, vol 2. Elsevier, p 39-47

58. Hak DJ, Fitzpatrick D, Bishop JA, Marsh JL, Tilp S, Schnettler R, Simpson H, Alt V (2014) Delayed union and nonunions: epidemiology, clinical issues, and financial aspects. *Injury* 45 Suppl 2:S3-7. doi:10.1016/j.injury.2014.04.002
59. Werner M (2016) Knochenfrakturen. In: Amann KK, R.; Klöppel, G. (ed) *Pathologie - Urogenitale und Endokrine Organe. Gelenke und Skelett*, vol 3. Springer, p 1102-1104
60. Ip D (2008) Normal and abnormal bone healing. In: Ip D (ed) *Orthopedic Traumatology - A Resident's Guide*. Springer, p 49-85
61. Marsell R, Einhorn TA (2011) The biology of fracture healing. *Injury* 42 (6):551-555. doi:10.1016/j.injury.2011.03.031
62. Cooper W (1856) *Theoretical and Practical Treatise on Diseases of the Eyes*. *Br Foreign Med Chir Rev* 17 (33):126-138
63. Zura R, Xiong Z, Einhorn T, Watson JT, Ostrum RF, Prayson MJ, Della Rocca GJ, Mehta S, McKinley T, Wang Z, Steen RG (2016) Epidemiology of Fracture Nonunion in 18 Human Bones. *JAMA Surg* 151 (11):e162775. doi:10.1001/jamasurg.2016.2775
64. Claes L, Augat P, Suger G, Wilke HJ (1997) Influence of size and stability of the osteotomy gap on the success of fracture healing. *J Orthop Res* 15 (4):577-584. doi:10.1002/jor.1100150414
65. Gaebler C, Berger U, Schandelmaier P, Greitbauer M, Schauwecker HH, Applegate B, Zych G, Vecsei V (2001) Rates and odds ratios for complications in closed and open tibial fractures treated with unreamed, small diameter tibial nails: a multicenter analysis of 467 cases. *J Orthop Trauma* 15 (6):415-423. doi:10.1097/00005131-200108000-00006
66. Drosos GI, Bishay M, Karnezis IA, Alegakis AK (2006) Factors affecting fracture healing after intramedullary nailing of the tibial diaphysis for closed and grade I open fractures. *J Bone Joint Surg Br* 88 (2):227-231. doi:10.1302/0301-620X.88B2.16456
67. Huo MH, Troiano NW, Pelker RR, Gundberg CM, Friedlaender GE (1991) The influence of ibuprofen on fracture repair: biomechanical, biochemical, histologic, and histomorphometric parameters in rats. *J Orthop Res* 9 (3):383-390. doi:10.1002/jor.1100090310
68. Hoffmann R, Weller A, Helling HJ, Krettek C, Rehm KE (1997) [Local foreign body reactions to biodegradable implants. A classification]. *Unfallchirurg* 100 (8):658-666. doi:10.1007/s001130050172
69. Fricker RK, M.; Nunez, F.; Axelrod, T. (2008) Lag screw with protection plate. *AO Surgery Reference*. <https://surgeryreference.aofoundation.org/orthopedic-trauma/adult-trauma/metacarpals/shaft-oblique/lag-screw-with-protection-plate-introduction>. Accessed 02.05.2021
70. Peterburs B, Mittelstaedt A, Haas P, Petri M, Westphal R, Dullin C, Sehmisch S, Neunaber C (2018) Biomechanical and histological analyses of the fracture healing process after direct or prolonged reduction. *Eur J Med Res* 23 (1):39. doi:10.1186/s40001-018-0337-6

71. Aro HT, Chao EY (1993) Bone-healing patterns affected by loading, fracture fragment stability, fracture type, and fracture site compression. *Clin Orthop Relat Res* (293):8-17
72. Viljanen J, Kinnunen J, Bondestam S, Rokkanen P (1998) Intramedullary fixation of distal femoral diaphyseal osteotomies with absorbable self-reinforced poly-L-lactide and metallic intramedullary rods assessed by plain radiographs, quantitative computed tomography, and magnetic resonance imaging: an experimental study in rabbits. *J Biomed Mater Res* 39 (2):222-228
73. Helling HJ, Prokop A, Schmid HU, Nagel M, Lilienthal J, Rehm KE (2006) Biodegradable implants versus standard metal fixation for displaced radial head fractures. A prospective, randomized, multicenter study. *J Shoulder Elbow Surg* 15 (4):479-485.
doi:10.1016/j.jse.2005.10.010
74. Weiler A, Helling HJ, Kirch U, Zirbes TK, Rehm KE (1996) Foreign-body reaction and the course of osteolysis after polyglycolide implants for fracture fixation: experimental study in sheep. *J Bone Joint Surg Br* 78 (3):369-376
75. Weiler A, Hoffmann RF, Stahelin AC, Helling HJ, Sudkamp NP (2000) Biodegradable implants in sports medicine: the biological base. *Arthroscopy* 16 (3):305-321.
doi:10.1016/s0749-8063(00)90055-0
76. Prokop A, Jubel A, Helling HJ, Eibach T, Peters C, Baldus SE, Rehm KE (2004) Soft tissue reactions of different biodegradable polylactide implants. *Biomaterials* 25 (2):259-267.
doi:10.1016/s0142-9612(03)00496-4
77. Tuomo P, Matti L, Hannu P, Pentti R, Henna N, Pertti T (2004) Fixation of distal femoral osteotomies with self-reinforced poly(L/DL)lactide 70:30/bioactive glass composite rods. An experimental study on rats. *J Mater Sci Mater Med* 15 (3):275-281.
doi:10.1023/b:jmsm.0000015488.11602.4e
78. Pihlajamaki H, Bostman O, Tynnen O, Laitinen O (2006) Long-term tissue response to bioabsorbable poly-L-lactide and metallic screws: an experimental study. *Bone* 39 (4):932-937. doi:10.1016/j.bone.2006.04.009
79. Pihlajamaki HK, Salminen ST, Tynnen O, Bostman OM, Laitinen O (2010) Tissue restoration after implantation of polyglycolide, polydioxanone, polylevolactide, and metallic pins in cortical bone: an experimental study in rabbits. *Calcif Tissue Int* 87 (1):90-98.
doi:10.1007/s00223-010-9374-z
80. McSweeney AL, Zani BG, Baird R, Stanley JRL, Hayward A, Markham PM, Kopia GA, Edelman ER, Rabiner R (2017) Biocompatibility, bone healing, and safety evaluation in rabbits with an IlluminOss bone stabilization system. *J Orthop Res* 35 (10):2181-2190.
doi:10.1002/jor.23532
81. Muller CW, Pfeifer R, Meier K, Decker S, Reifenrath J, Gosling T, Wesling V, Krettek C, Hurschler C, Kramer M (2015) A Novel Shape Memory Plate Osteosynthesis for Noninvasive Modulation of Fixation Stiffness in a Rabbit Tibia Osteotomy Model. *Biomed Res Int* 2015:652940. doi:10.1155/2015/652940

8 Anhang

8.1 Ergänzendes Material

8.1.1 Material und Methoden

8.1.1.1 Kodierung der Score Variablen

Tabelle 20: Kodierung der Score Variablen

	Score values	Score Labels
<u>Score nach Huo et al</u>	1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	Fulling of defect: Fibrouse tissue Predominantly fibrous tissue with small amount of cartilaginous tissue Equal mixture of fibrous and cartilaginous tissue Predominantly cartilage with small amount of fibrous tissue Cartilage Predominantly cartilage with small amount of immature bone Equal mixture of cartilage and immature bone Predominantly immature bone with small amount of cartilage Union of fracture by immature bone Union of fracture fragments by mature bone
<u>Score nach Oray et al</u>	1 2 3 4 5 1 2 3 4 1 2 3 4 5 1 2 3 4 5 1 2 3 4 5 1 2	Union: No sign of union Fibrous Union Osteochondral Union Bone Union Complete reorganization Cortical integrity: Absence of cortex Early detection Reorganization in majority Complete organization Cancellous bone: No osseous cellular activity Early apposition of new bone Active apposition of new bone Reorganizing cancellous bone Complete reorganization of cancellous bone Bone marrow: Not available Detection on fibrinous material Defect occupying more than half Fully occupying the red bone marrow Adult type fatty marrow Inflammation: More than 20 percent leucocytes in a high power field of vision More such foci

8.1.1.2 Analyseplan zur Auswertung des Gesamt-Scores

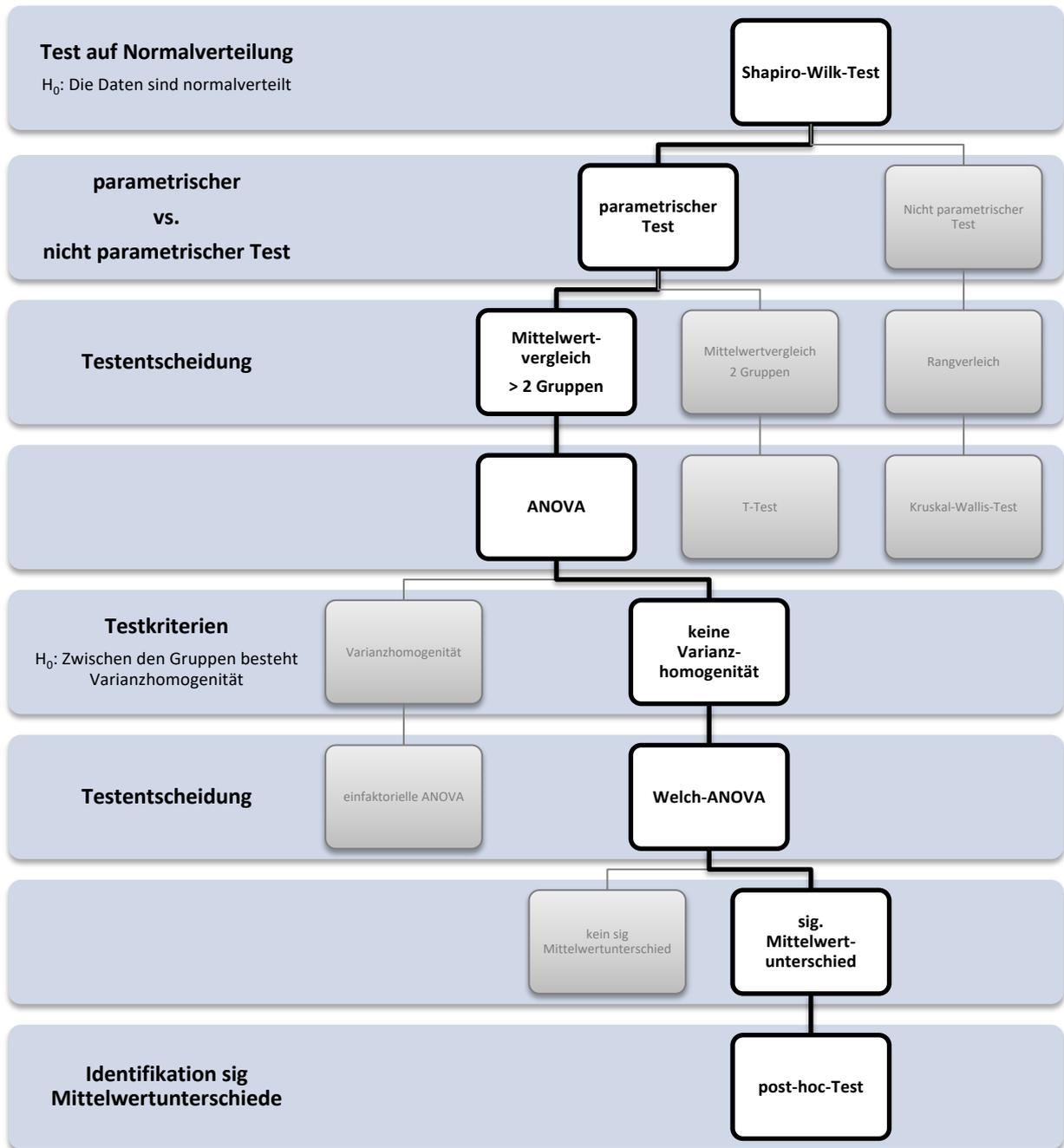


Abbildung 31: Analyseplan zur Auswertung des Gesamt-Scores

8.1.2 Bildmaterial

8.1.2.1 Versuchstiergruppe 4 Wochen

Zusammenfassung Scoring der 4 Wochen Gruppe:

Vereinigung der Frakturenden („*Union*“): 2,38

Corticalis („*Cortical integrity*“): 2,67

Spongiosa („*Cancellous bone*“): 3,17

Defektheilung („*Filling of defect*“): 7.42

Knochenmark („*Bone marrow*“): 2,33

Entzündung („*Inflammation*“): 0

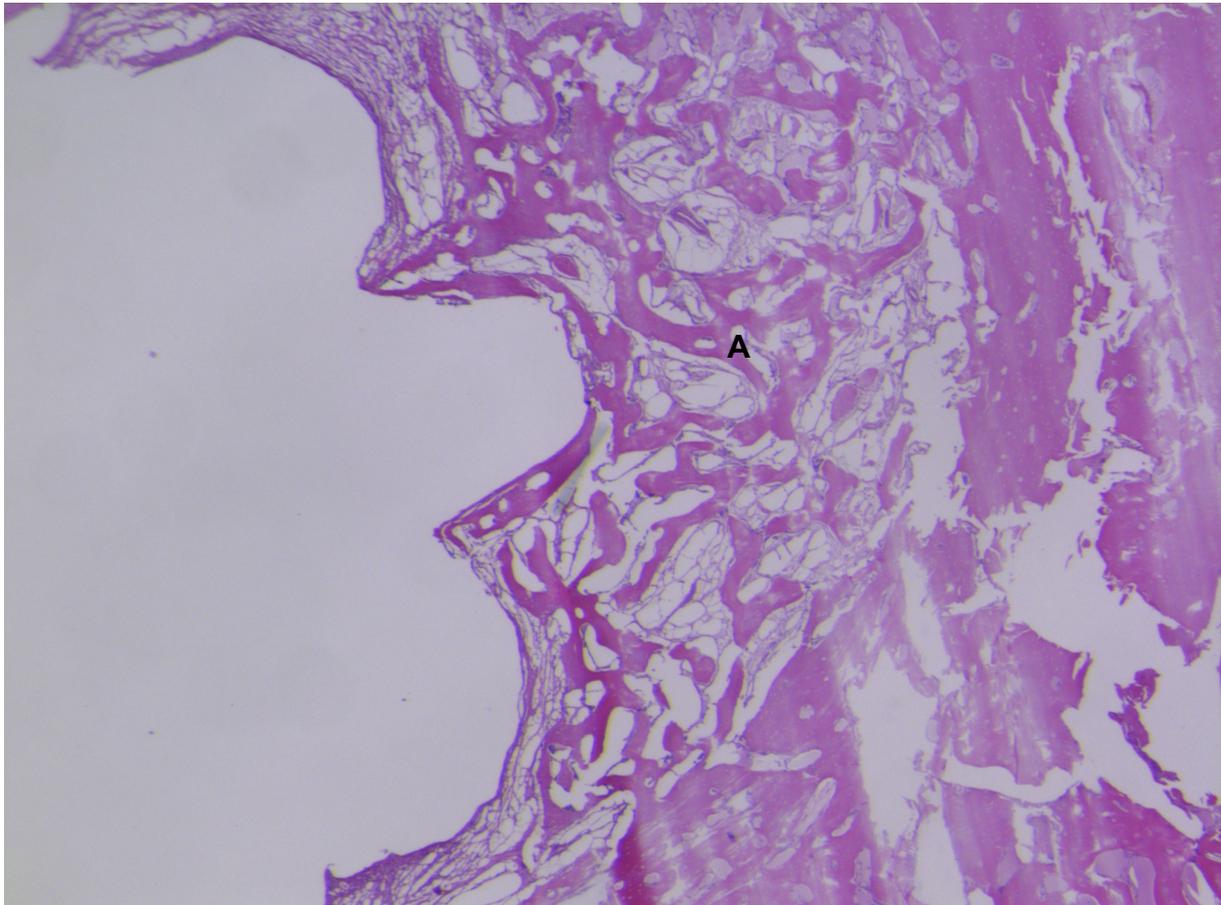


Abbildung 32: 4 Wochen – Detailansicht proximaler Knochenschnitt (Versuchstiernr.: 049110)

A Geflechtknochen am Implantat (Score Item: Spongiosa)

Keine Entzündungen (Score Item: Entzündungen), keine Osteolysen

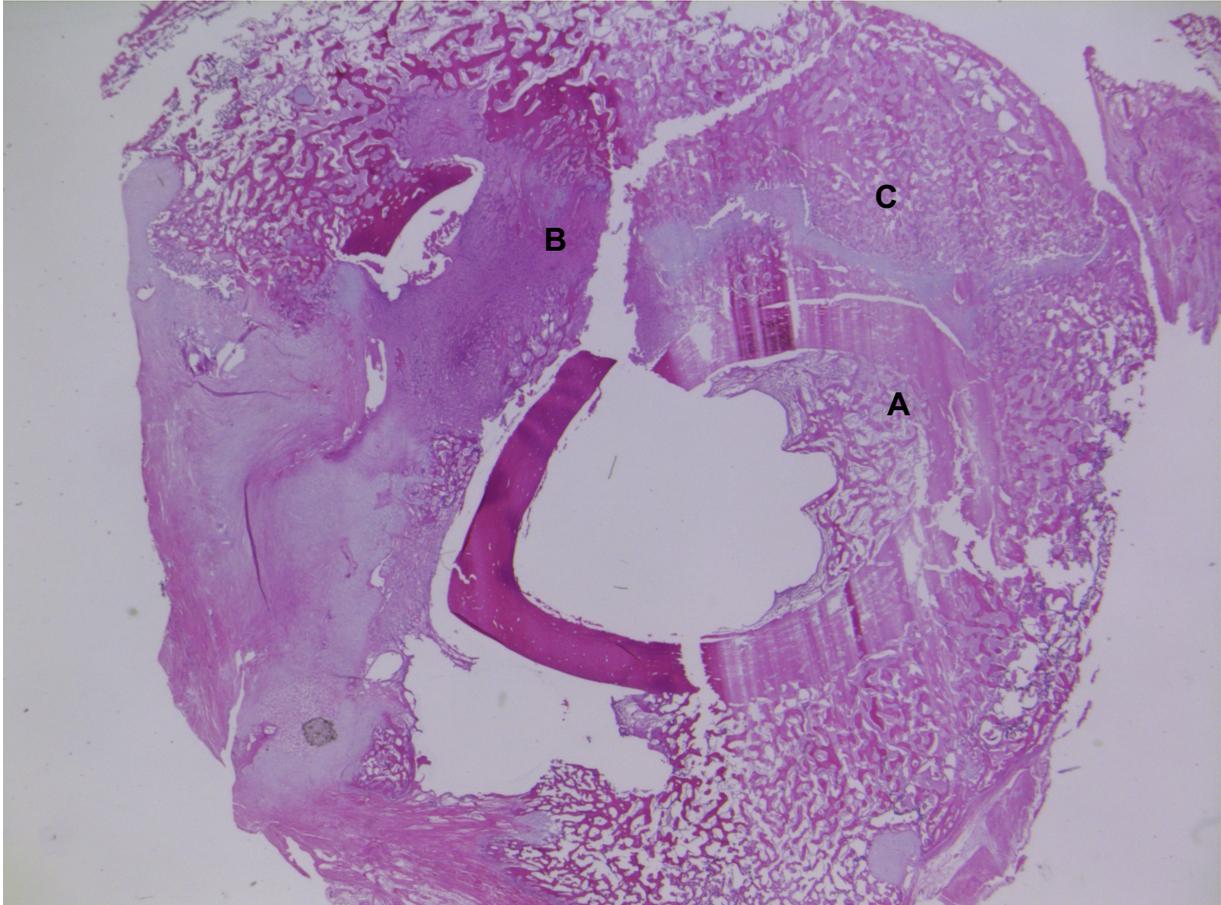


Abbildung 33: 4 Wochen – Übersichtsansicht proximaler Knochenschnitt (Versuchstiernr.: 049110)

A Geflechtknochen (Score Item: *Spongiosa*)

B Fibröse Defektüberbrückung (Score Item: *Vereinigung der Fraktarenden*)

C frühe Kallusbildung

Keine Entzündungen (Score Item: *Inflammation*), keine Osteolysen

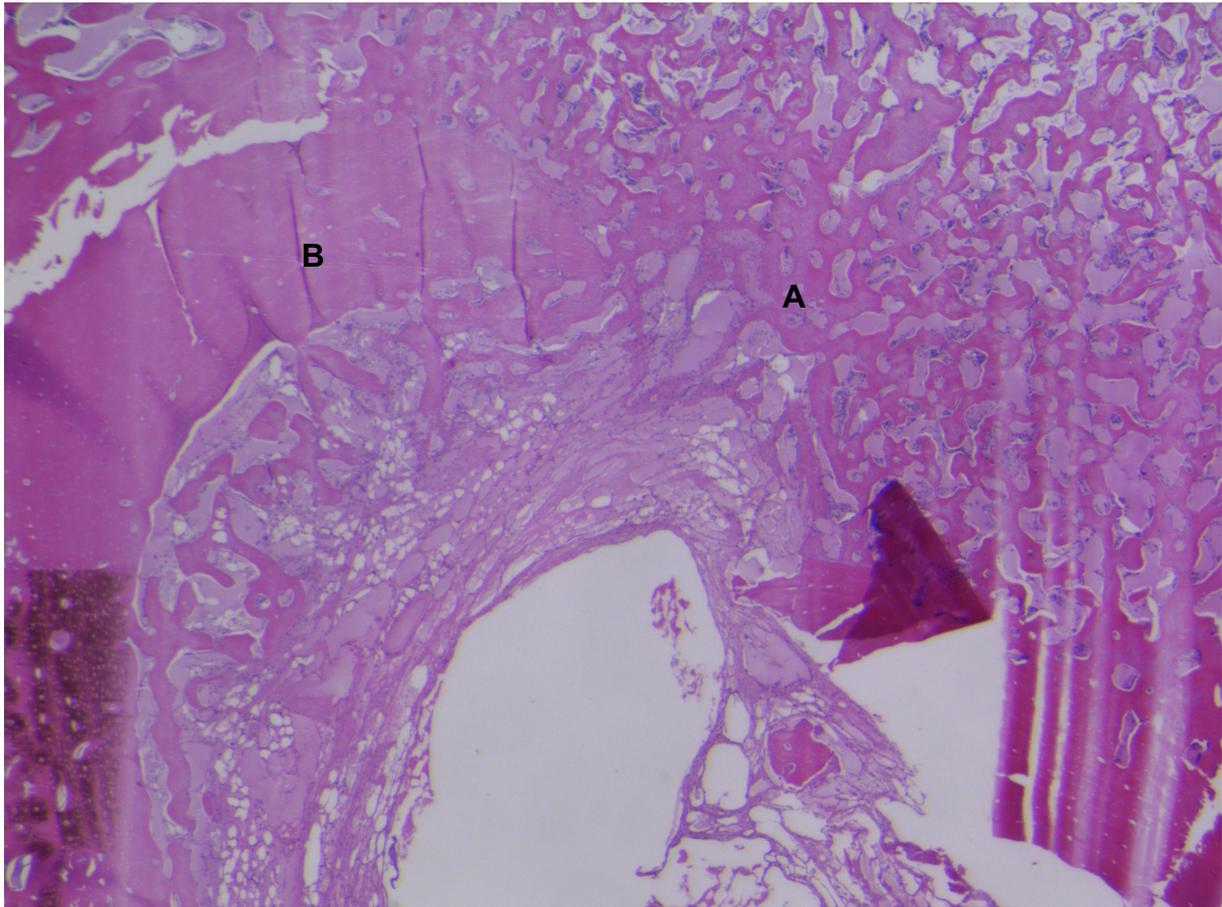


Abbildung 34: 4 Wochen – Detailansicht mittlerer Knochenschnitt (Versuchstiernr.: 049344)

A Geflechtknochen (*Score Item: Vereinigung der Frakturenden*)

B Reorganisation der Corticalis (*Score item: Cortical integrity*)

Keine Entzündungsreaktionen (*Score Item: Inflammation*), keine Osteolyse

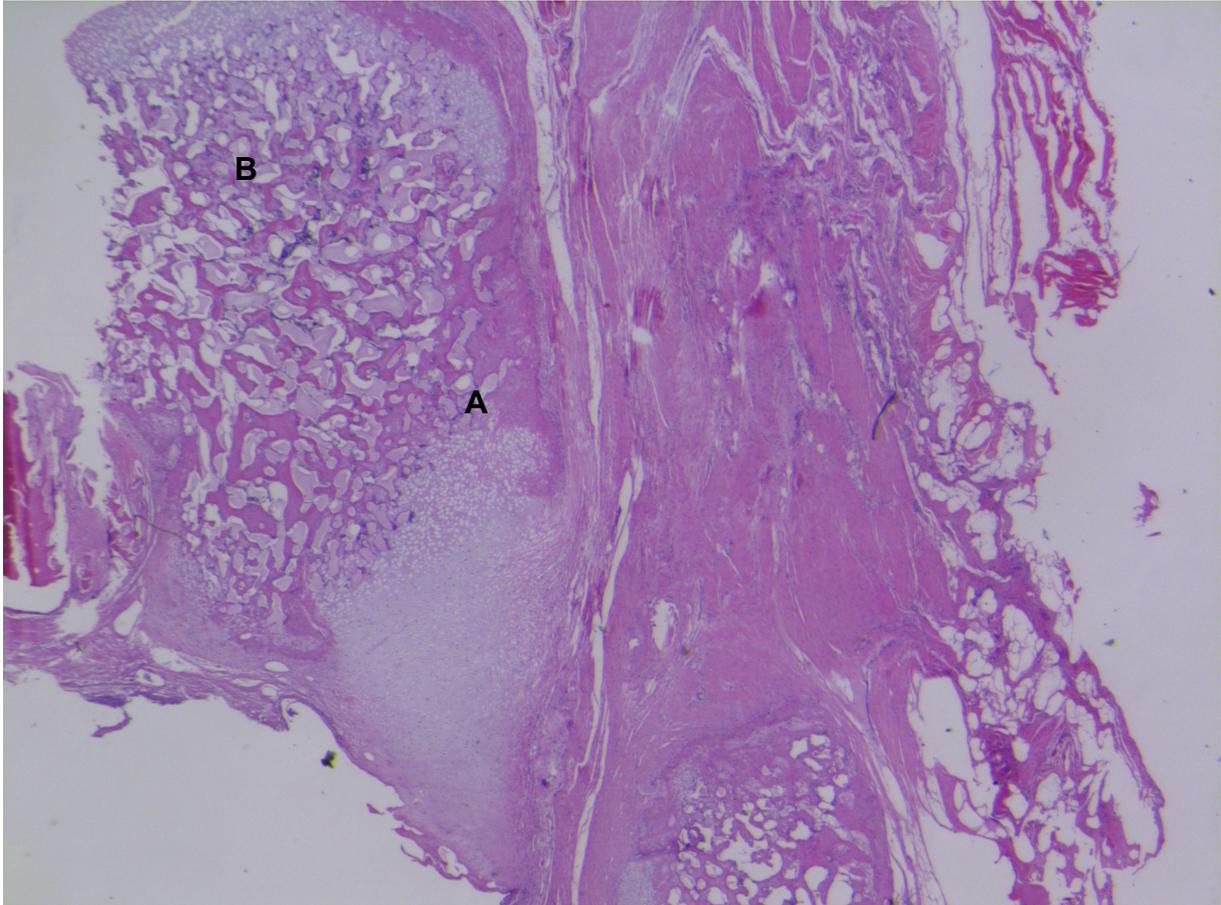


Abbildung 35: 4 Wochen – Detailansicht distaler Knochenschnitt (Versuchstiernr.: 049066)

A fibröses Gewebe und Knorpelbildung (*Score Item: Filling of defect*)

B Geflechtknochen (*Score item: Vereinigung der Frakturrenden*)

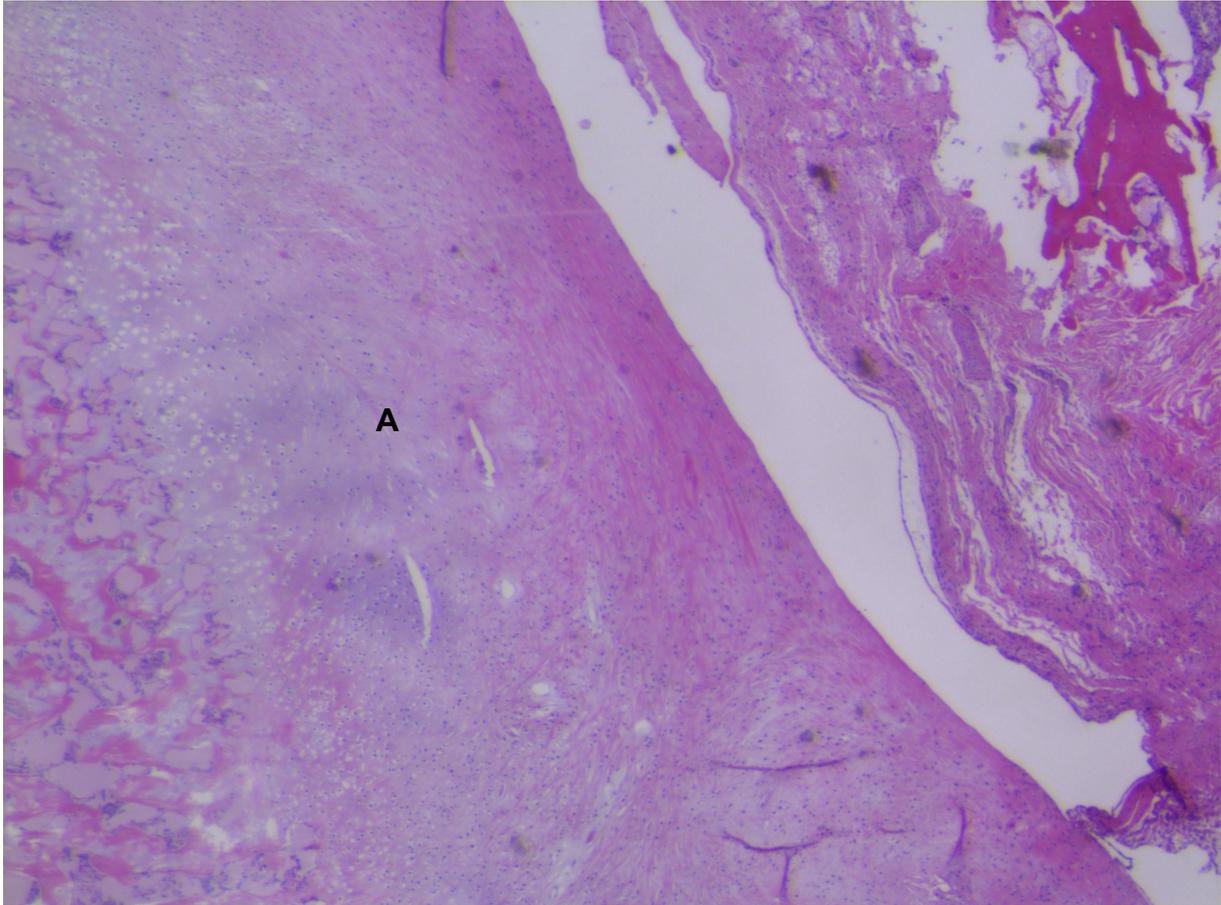


Abbildung 36: 4 Wochen – Detailansicht distalen Knochenschnitt (Versuchstiernr.: 049110)

A fibröses Gewebe und Knorpelbildung (Score Item: *Filling of defect*)

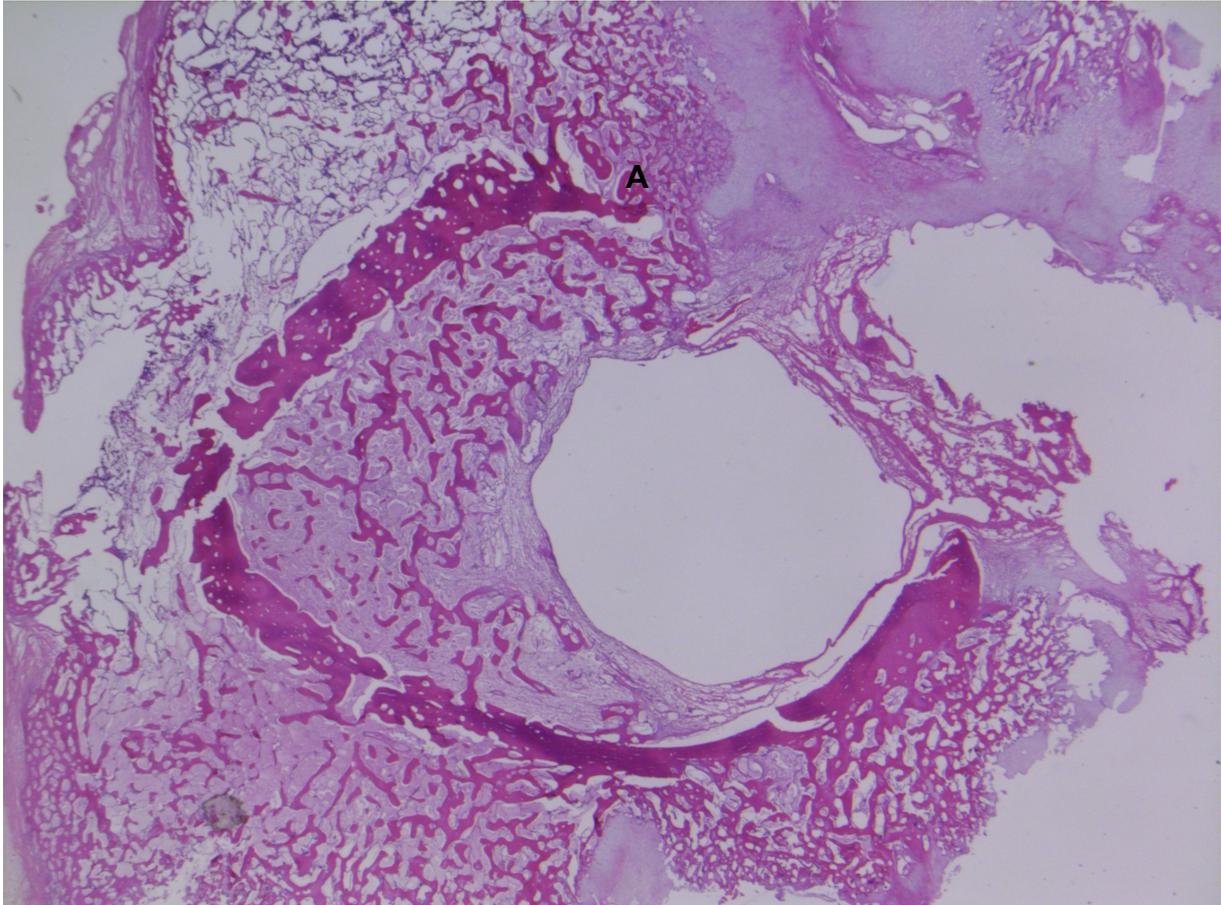


Abbildung 37: 4 Wochen - Übersichtsansicht mittiger Knochenschnitt (Versuchstiernr.: 049110)

A Reorganisation der Corticalis (Score Item: Cortical Integrity)

Keine Entzündungsreaktion (Score Item: Inflammation); keine Osteolysen

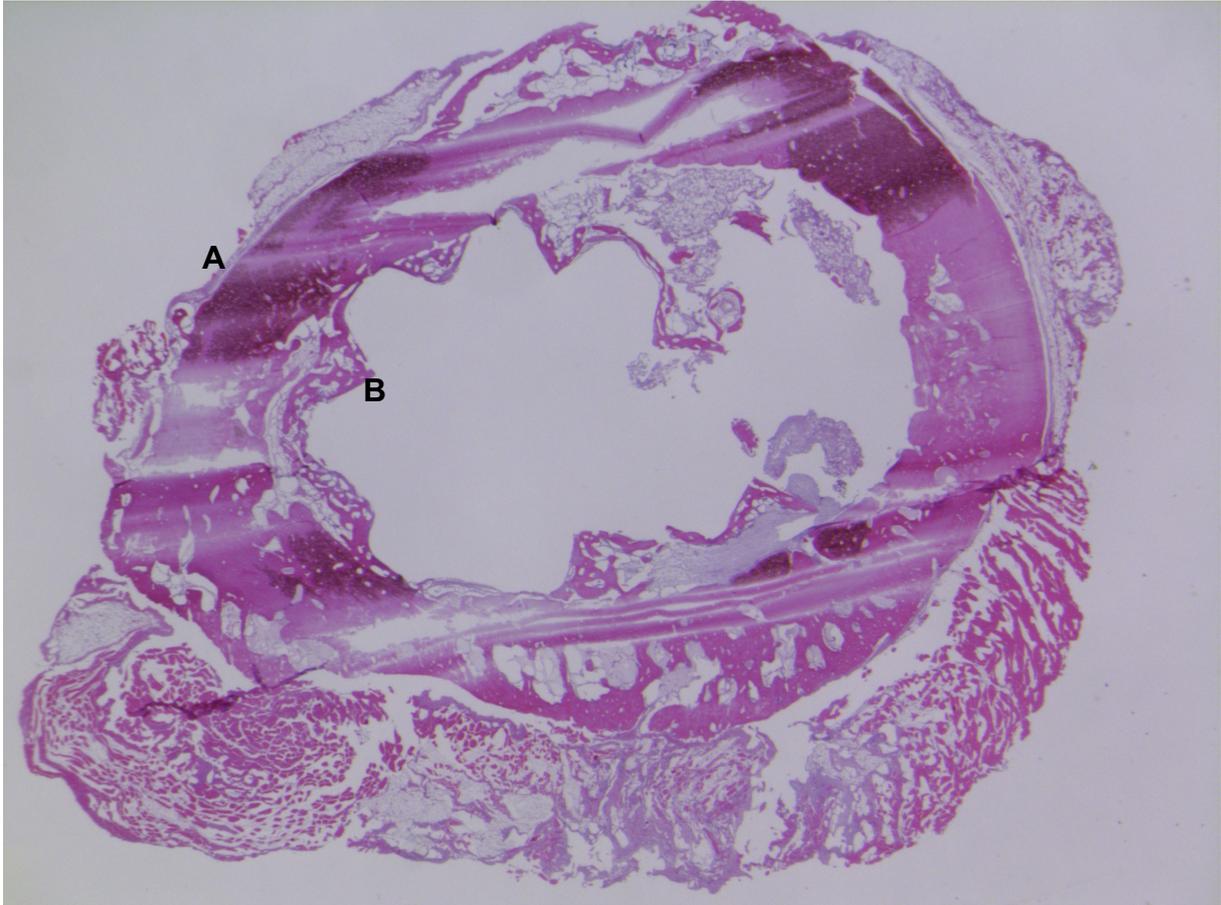


Abbildung 38: 4 Wochen – Übersichtsansicht proximaler Knochenschnitt (Versuchstiernr.: 047373)

A Reorganisation der Corticalis (Score Item: cortical integrity)

B Geflechtknochen (Score item: Vereinigung der Knochenenden)

Keine Entzündungsreaktion (Score Item: Inflammation); keine Osteolysen

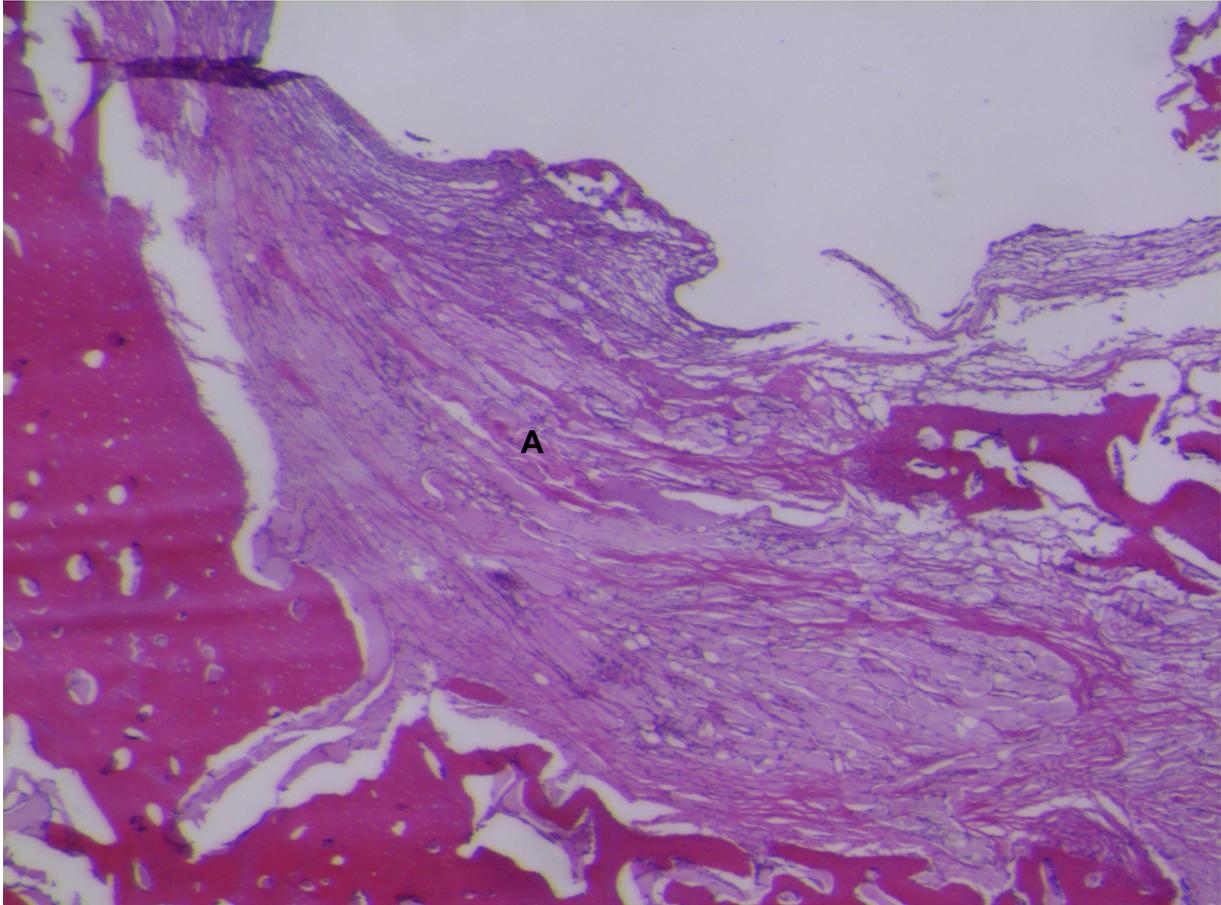


Abbildung 39: 4 Wochen – Detailansicht mittiger Knochenschnitt (Versuchstiernr.: 047373)

A fibröses Knochenmark (*Score Item: Bone marrow*)

8.1.2.2 Versuchstiergruppe 8 Wochen

Zusammenfassung Scoring der 8 Wochen Gruppe:

Vereinigung der Frakturenden („*Union*“): 2,92

Corticalis („*Cortical integrity*“): 2,00

Spongiosa („*Cancellous bone*“): 3,13

Defektheilung („*Filling of defect*“): 8,13

Knochenmark („*Bone marrow*“): 2,42[^]

Entzündung („*Inflammation*“): 0

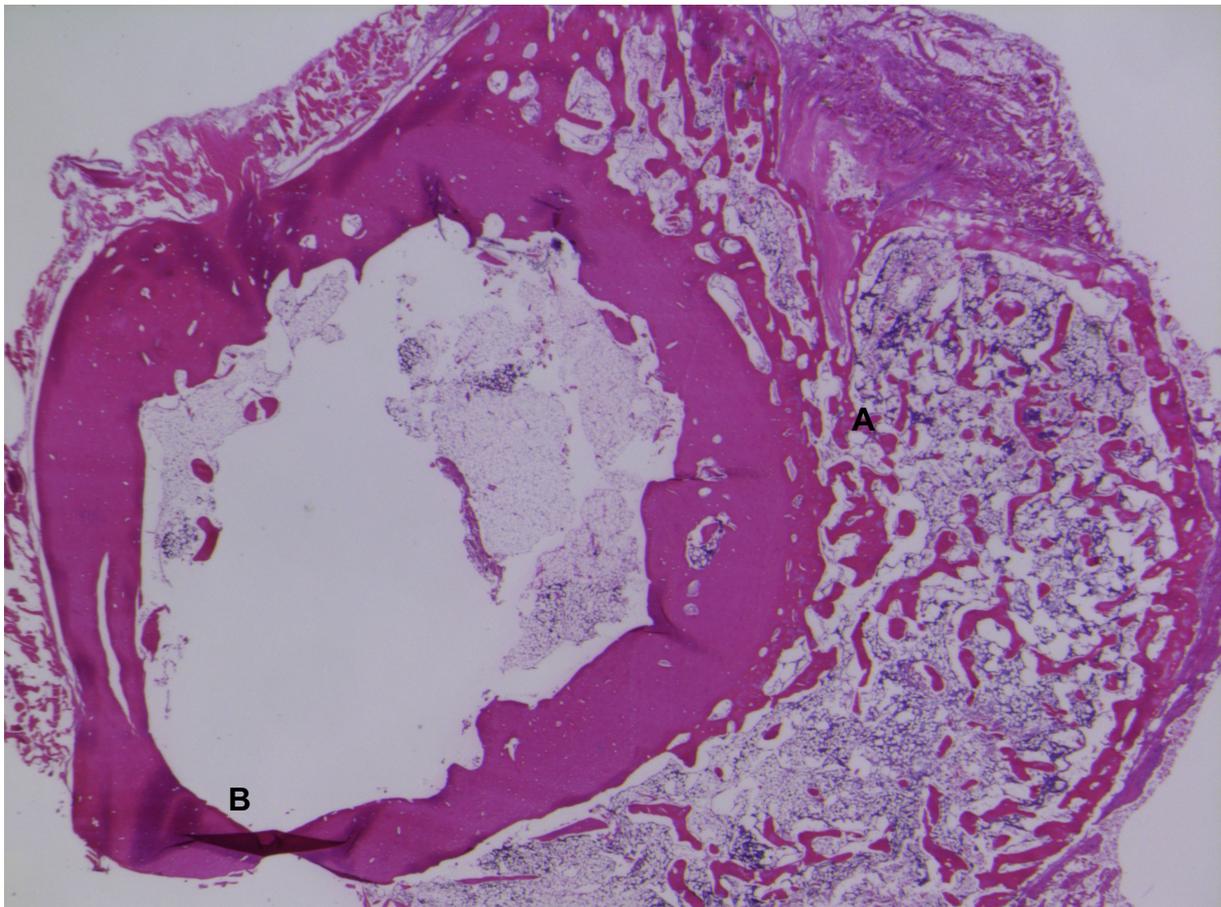


Abbildung 40: 8 Wochen – Übersichtsansicht proximaler Knochenschnitt (Versuchstiernr.: 029350)

A knöcherne Vereinigung der Frakturenden (Score item: *Bone union*)

B Reorganisation der Corticalis (Score item: *Cortical integrity*)

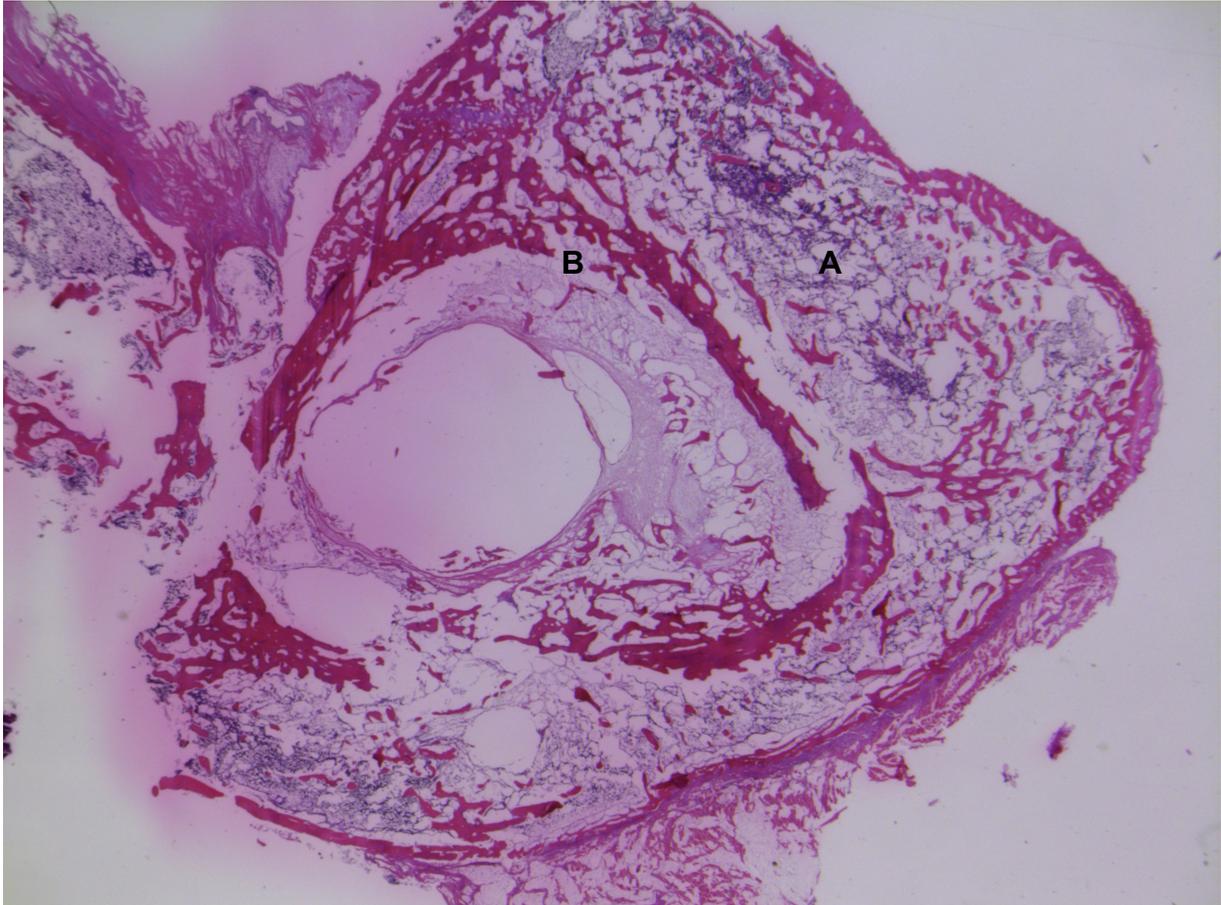


Abbildung 41: 8 Wochen - Übersichtsansicht mittiger Knochenschnitt (Versuchstiernr.: 029350)

A Kallusbildung mit Geflechtknochen

B knöcherne Vereinigung der Frakturrenden und Reorganisation der Corticalis (*Score items: Bone union und Cortical integrity*)

Keine Entzündungen (*Score Item: Inflammation*), keine Osteolysen

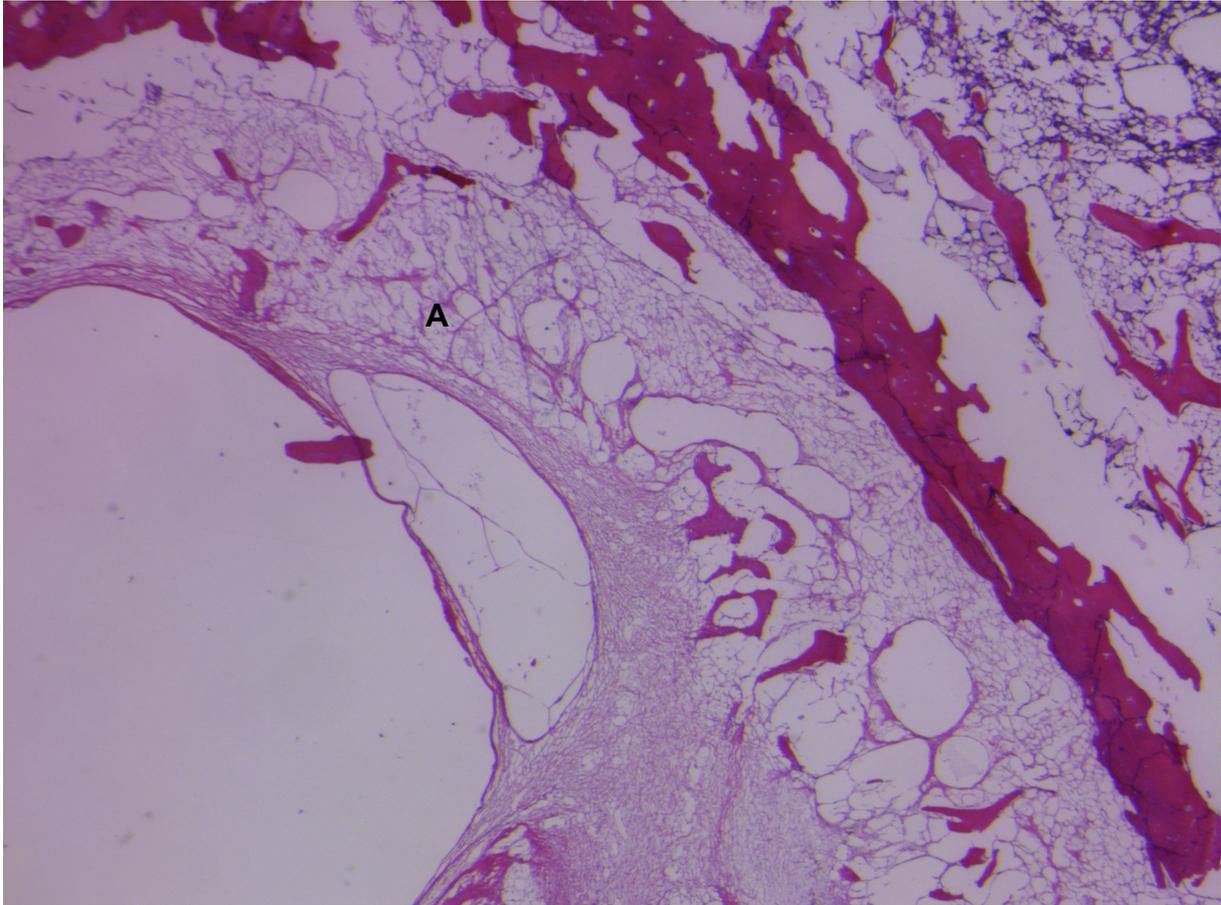


Abbildung 42: 8 Wochen – Detailansicht mittiger Knochenschnitt (Versuchstiernr.: 029350)

A fibröses Gewebe (Score item: Bone marrow)

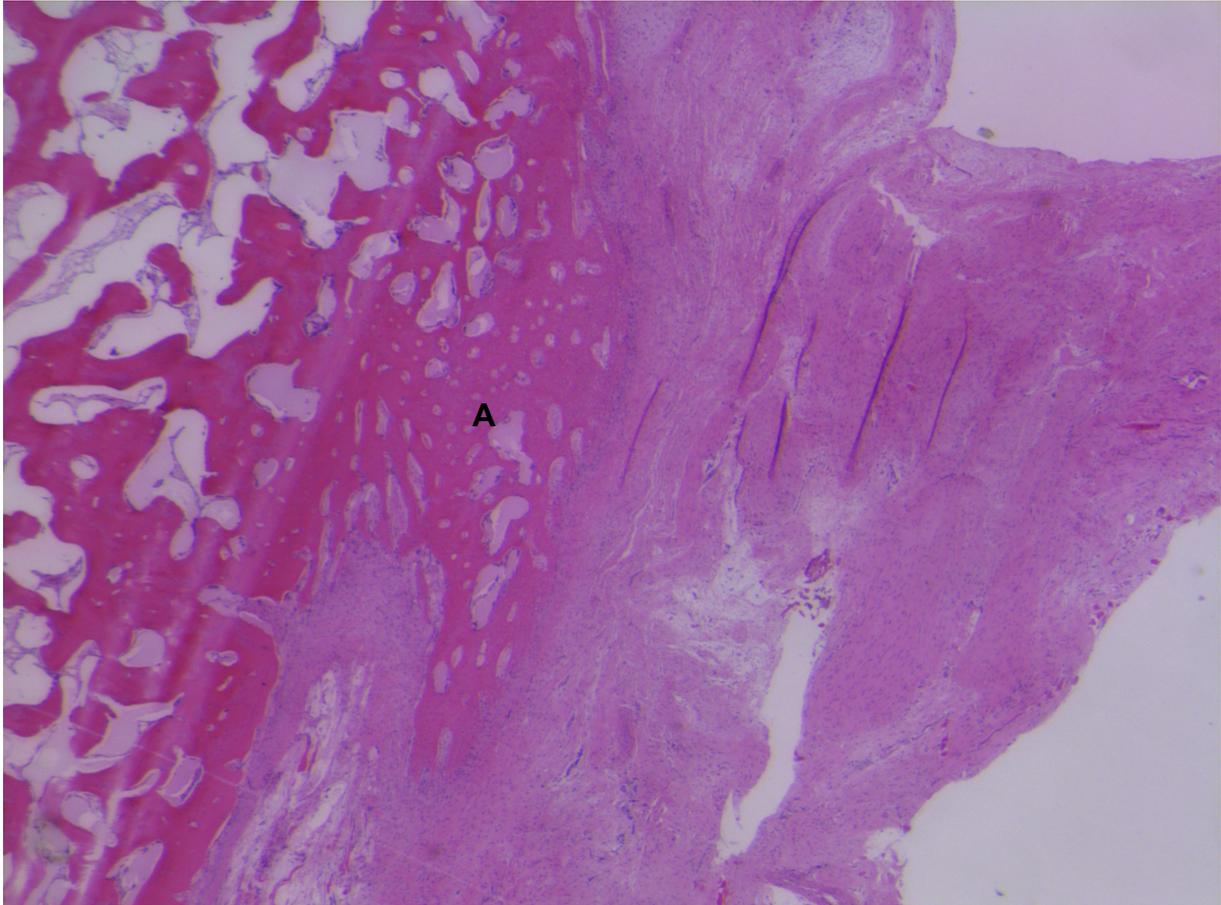


Abbildung 43: 8 Wochen – Detailansicht proximaler Knochenschnitt (Versuchstiernr.: 030365)

A Reorganisation der Spongiosa, aktive Apposition von Geflechtknochen (*Score item: Cancellous bone*)

8.1.2.3 Versuchstiergruppe 16 Wochen

Zusammenfassung Scoring der 16 Wochen Gruppe:

Vereinigung der Fraktarenden („*Union*“): 3,12

Corticalis („*Cortical integrity*“): 3,63

Spongiosa („*Cancellous bone*“): 3,96

Defektheilung („*Filling of defect*“): 8,79

Knochenmark („*Bone marrow*“): 4,13

Entzündung („*Inflammation*“): 0

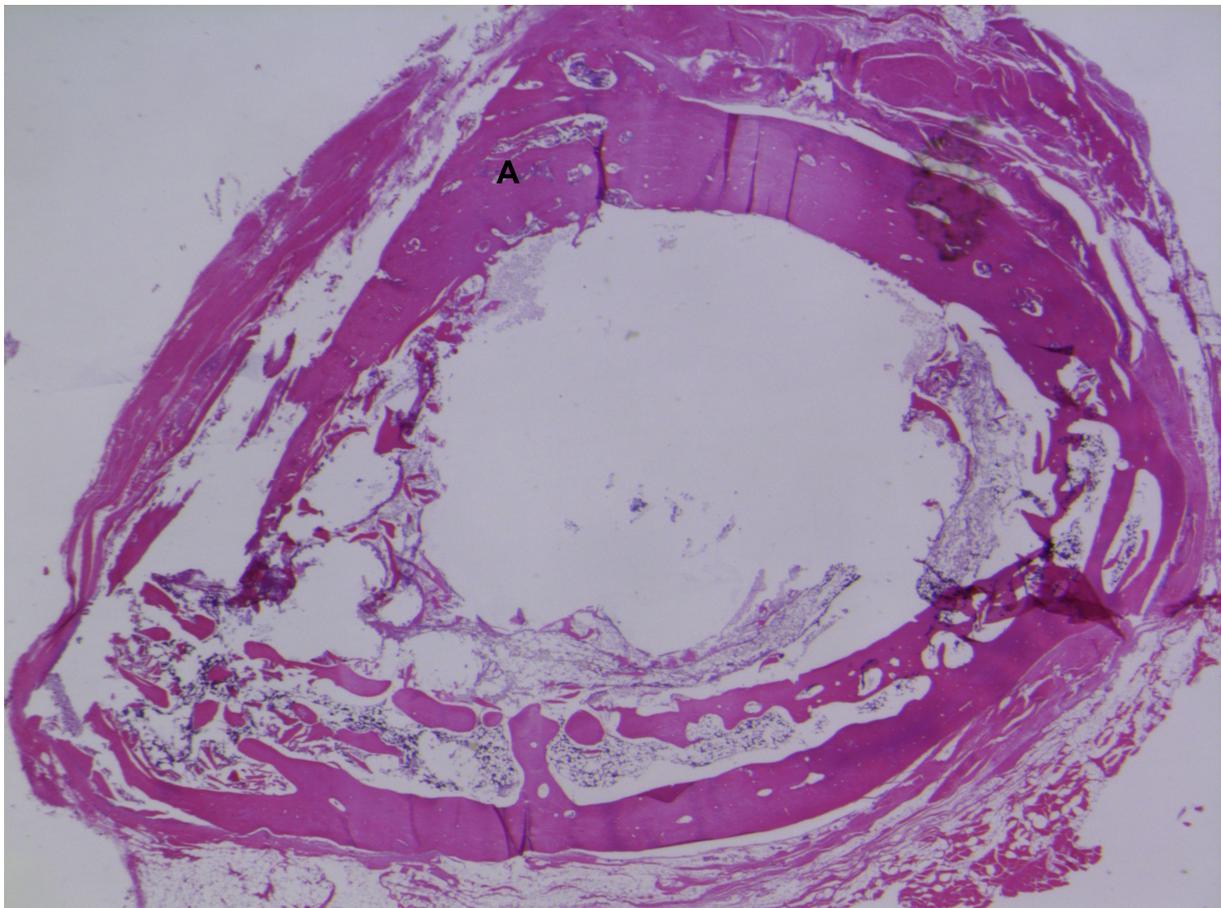


Abbildung 44: 16 Wochen – Übersichtsansicht mittiger Knochenschnitt (Versuchstiernr.: 130127)

A Reorganisation der Corticalis und knöcherner Vereinigung der Fraktarenden (Score item: *Cortical integrity*, *Bone union*)

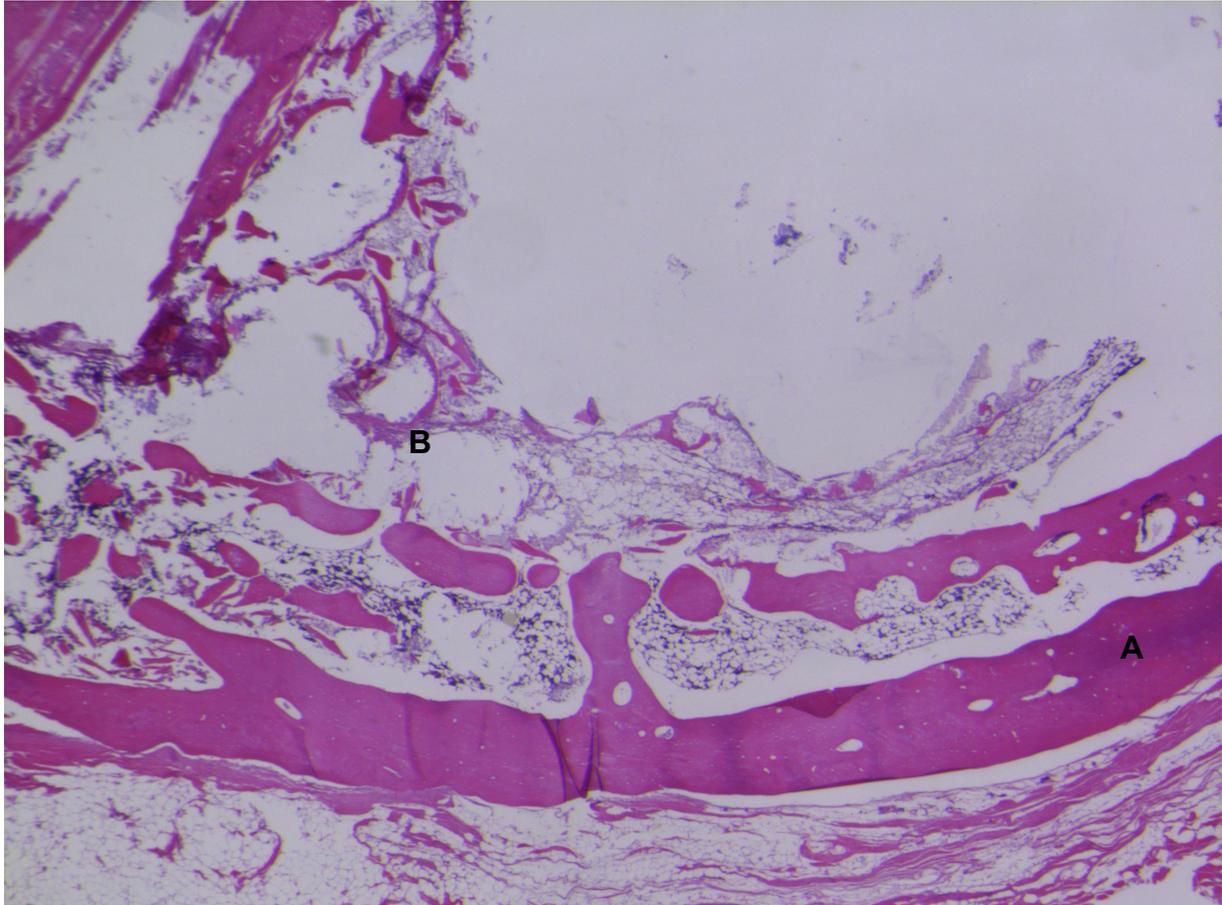


Abbildung 45: 16 Wochen – Detailansicht mittiger Knochenschnitt (Versuchstiernr.: 130127)

A Reorganisation von Spongiosa und Corticalis (*Score item: Cancellous bone, Cortical integrity*)

B Rotes und gelbes Knochenmark (*Score Item: Bone marrow*)

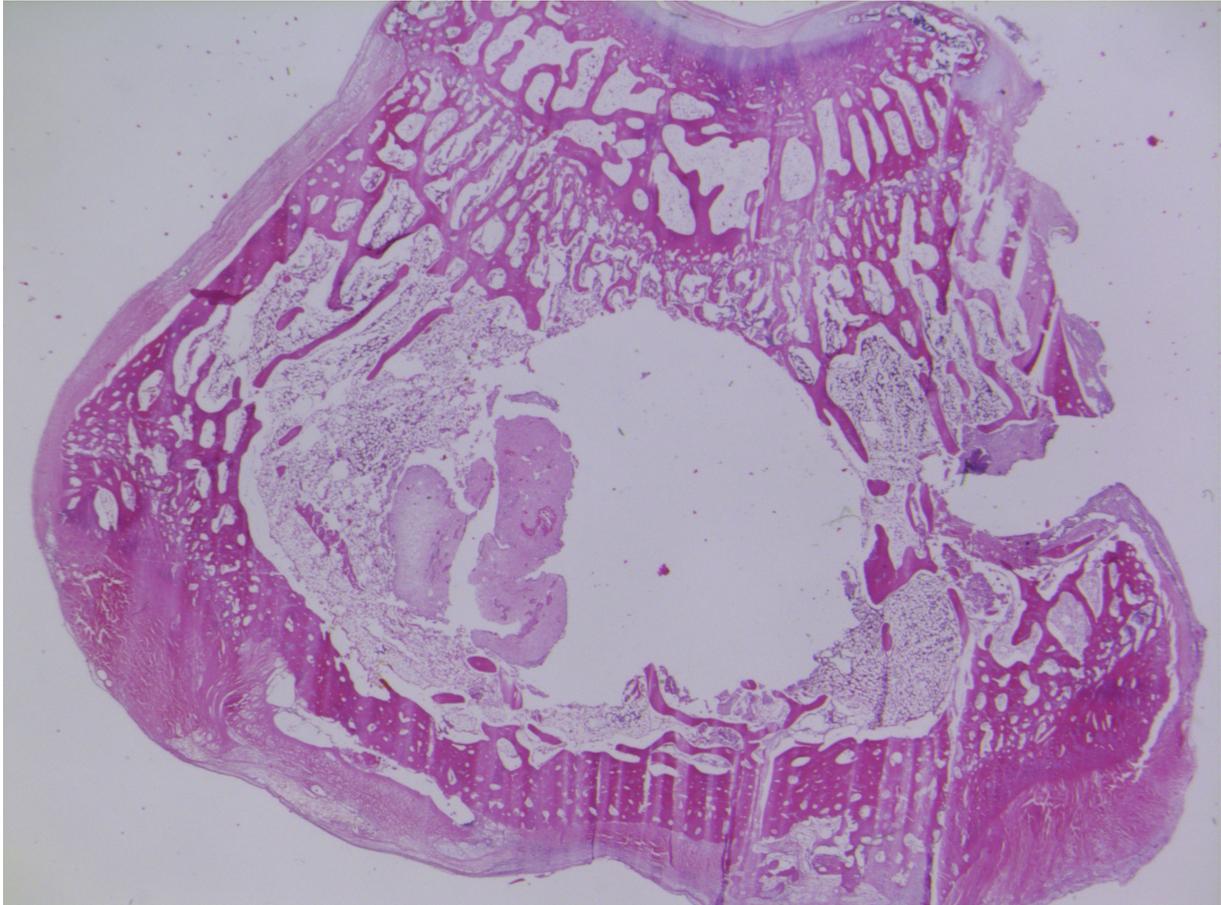


Abbildung 46: 16 Wochen - Übersichtsansicht distaler Knochenschnitt (Versuchstiernr.: 134106)

Keine Entzündungsreaktionen (Score item: *Inflammation*), keine Osteolysen

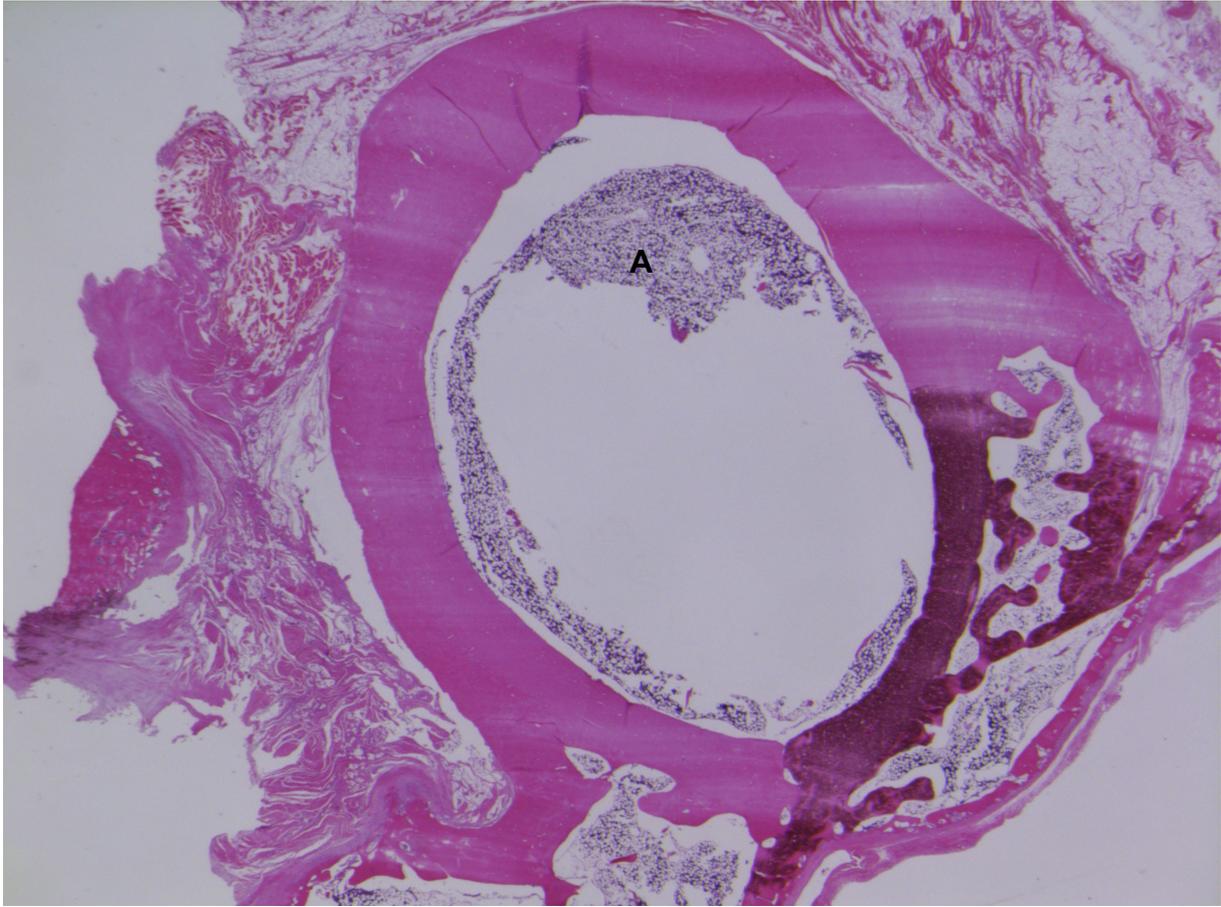


Abbildung 47: 16 Wochen – Übersichtsansicht proximaler Knochenschnitt (Versuchstiernr.: 134130)

A rotes Knochenmark (*Score item: Bone marrow*)

8.1.2.3 Versuchstiergruppe 24 Wochen

Zusammenfassung Scoring der 24 Wochen Gruppe:

Vereinigung der Frakturenden („*Union*“): 3,33

Corticalis („*Cortical integrity*“): 3,33

Spongiosa („*Cancellous bone*“): 4,04

Defektheilung („*Filling of defect*“): 8,83

Knochenmark („*Bone marrow*“): 4,63

Entzündung („*Inflammation*“): 0

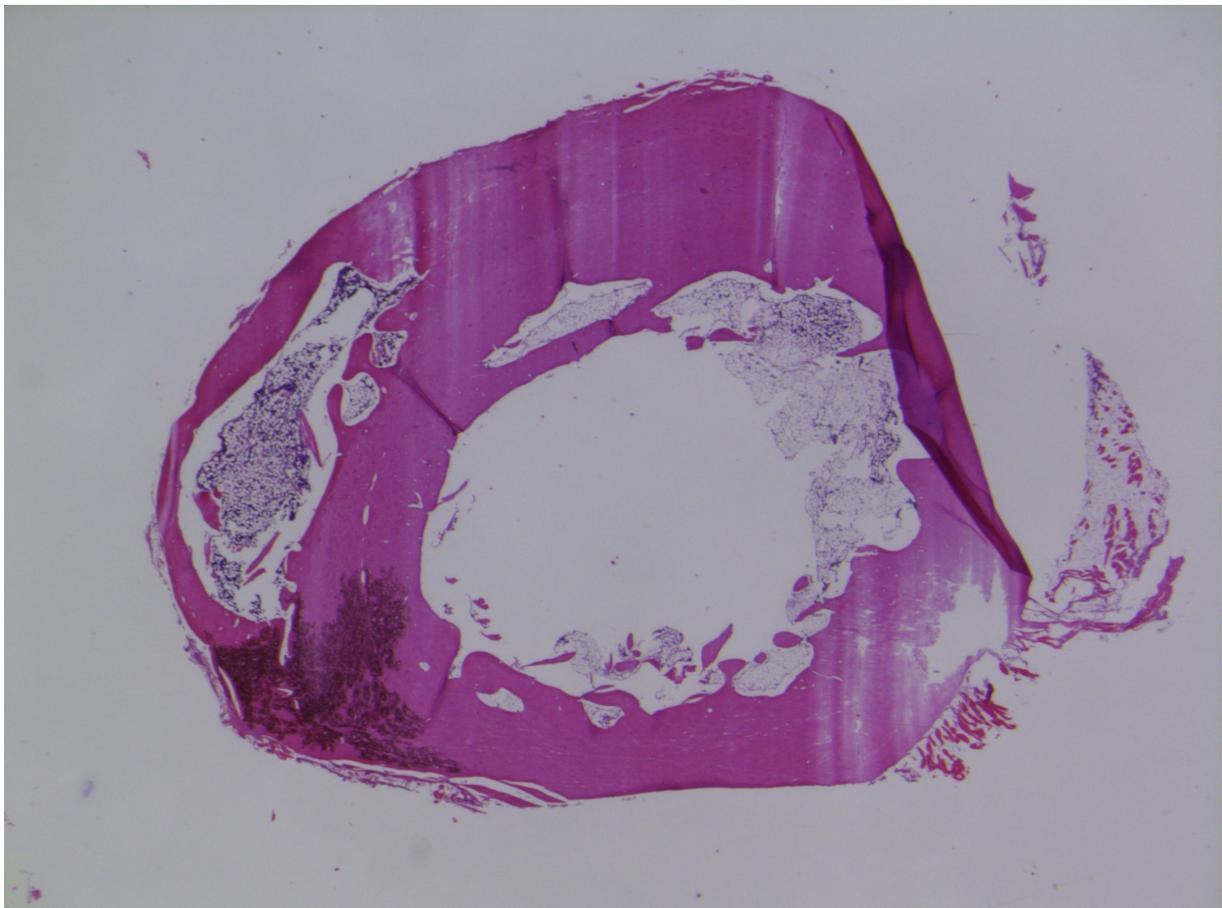


Abbildung 48: 24 Wochen – Übersichtsansicht proximaler Knochenschnitt (Versuchstiernr.: 7368)

Keine Entzündungsreaktionen (Score item: *Inflammation*), keine Osteolysen

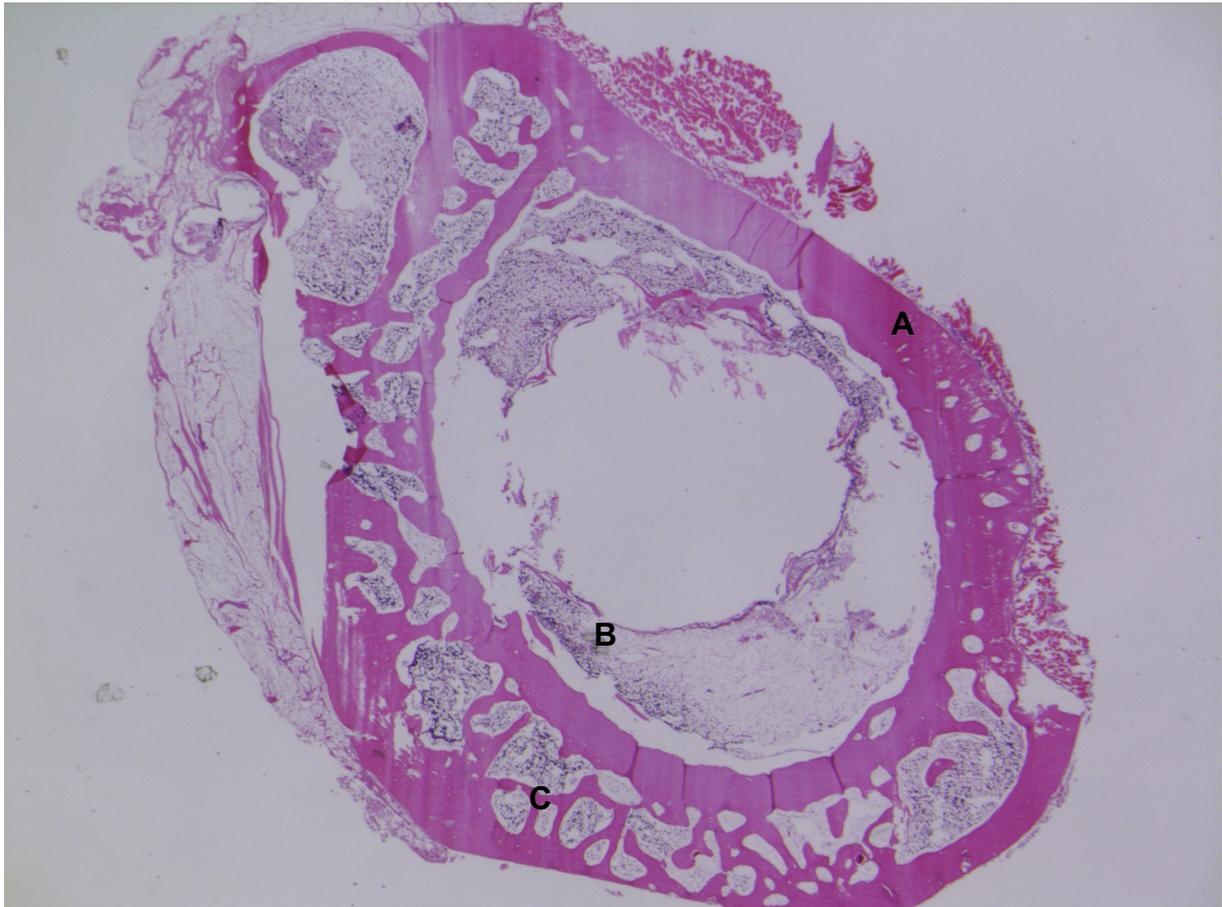


Abbildung 49: 24 Wochen – Überblicksansicht proximaler Knochenschnitt (Versuchstiernr.: 7369)

A Reorganisation von Spongiosa und Corticalis (*Score item: Cancellous bone, Cortical integrity*)

B Rotes und gelbes Knochenmark (*Score Item: Bone marrow*)

Keine Entzündungsreaktionen (*Score item: Inflammation*), keine Osteolysen

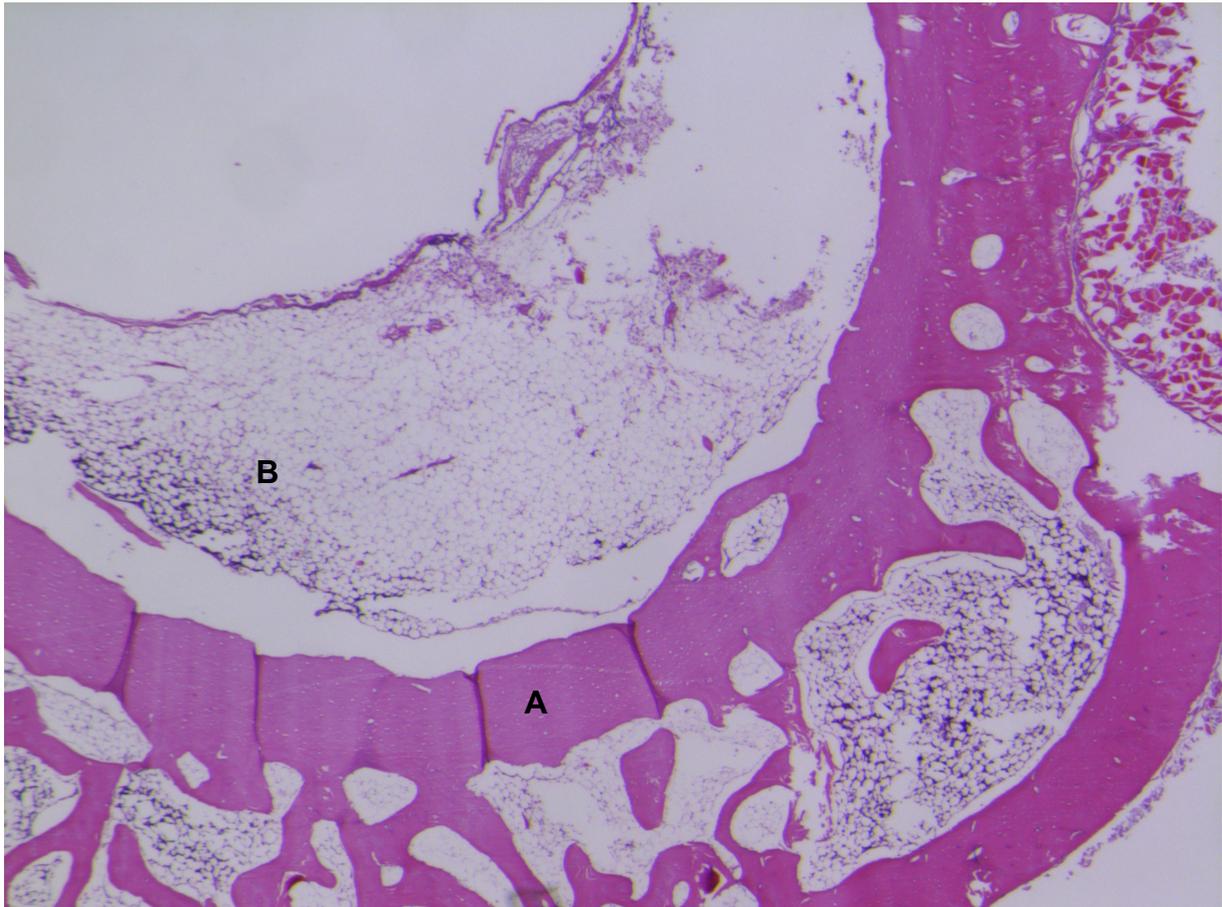


Abbildung 50: 24 Wochen – Detailansicht proximaler Knochenschnitt (Versuchstiernr.: 7369)

A Reorganisation von Spongiosa und Corticalis (*Score item: Cancellous bone, Cortical integrity*)

B Rotes und gelbes Knochenmark (*Score Item: Bone marrow*)

Keine Entzündungsreaktionen (*Score item: Inflammation*), keine Osteolysen

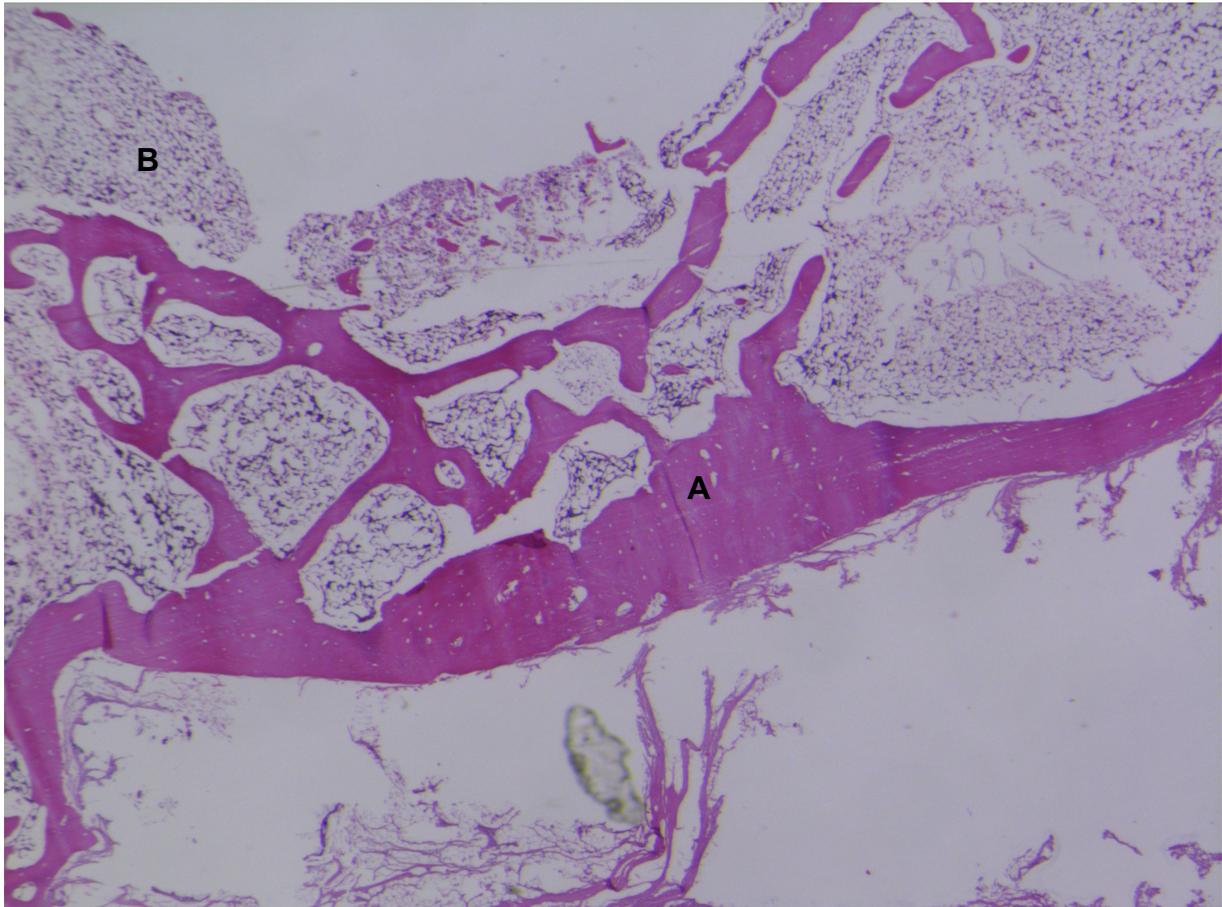


Abbildung 51: 24 Wochen – Detailansicht mittiger Knochenschnitt (Versuchstiernr.: 7369)

A Reorganisation von Spongiosa und Corticalis (Score item: *Cancellous bone, Cortical integrity*)

B Rotes und gelbes Knochenmark (Score Item: *Bone marrow*)

Keine Entzündungsreaktionen (Score item: *Inflammation*), keine Osteolysen

8.1.2.3 Versuchstiergruppe 48 Wochen

Zusammenfassung Scoring der 48 Wochen Gruppe:

Vereinigung der Frakturenden („*Union*“): 4,00

Corticalis („*Cortical integrity*“): 3,83

Spongiosa („*Cancellous bone*“): 4,25

Defektheilung („*Filling of defect*“): 9,67

Knochenmark („*Bone marrow*“): 5,00

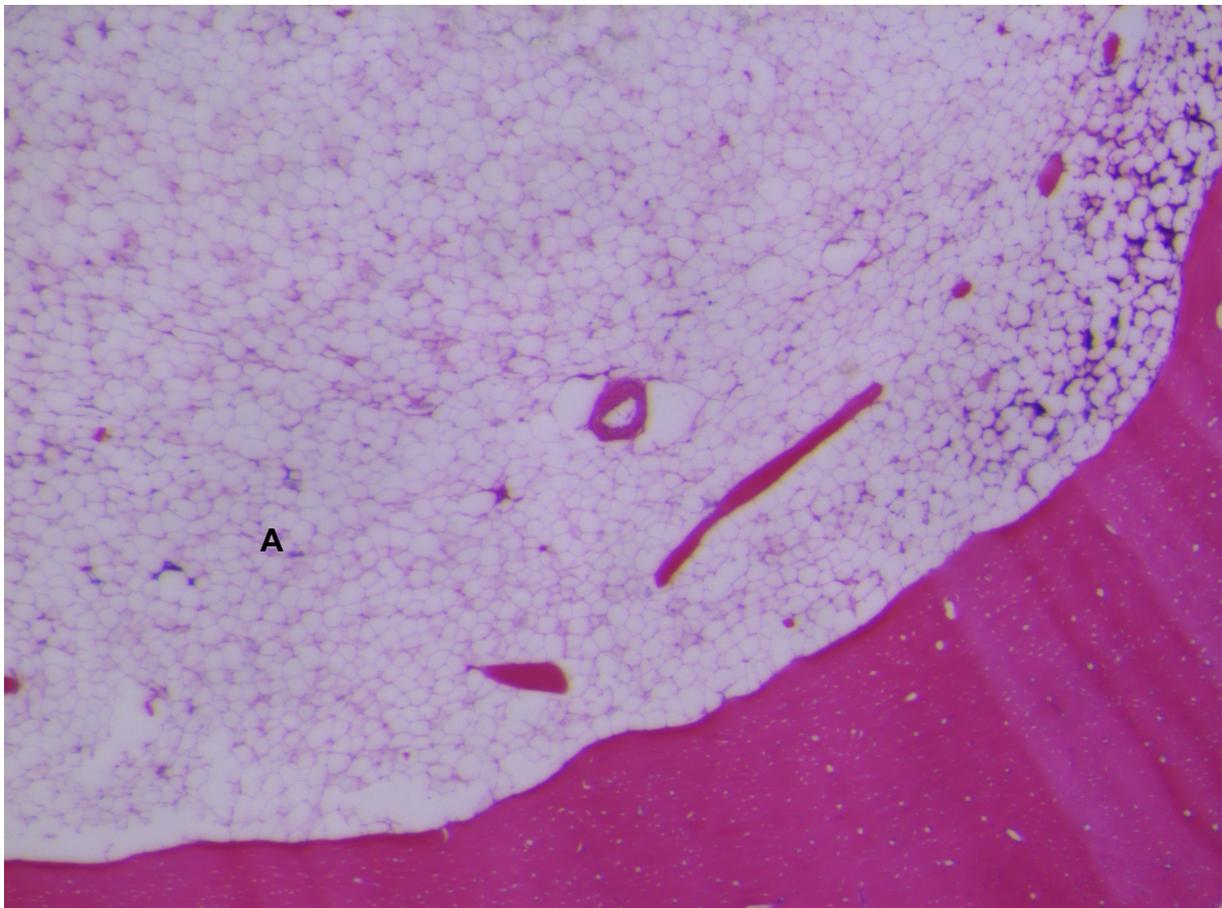


Abbildung 52: 48 Wochen – Detailansicht proximaler Knochenschnitt (Versuchstiernr.: 16341)

A gelbes Knochenmark (Score item: *Bone marrow*)

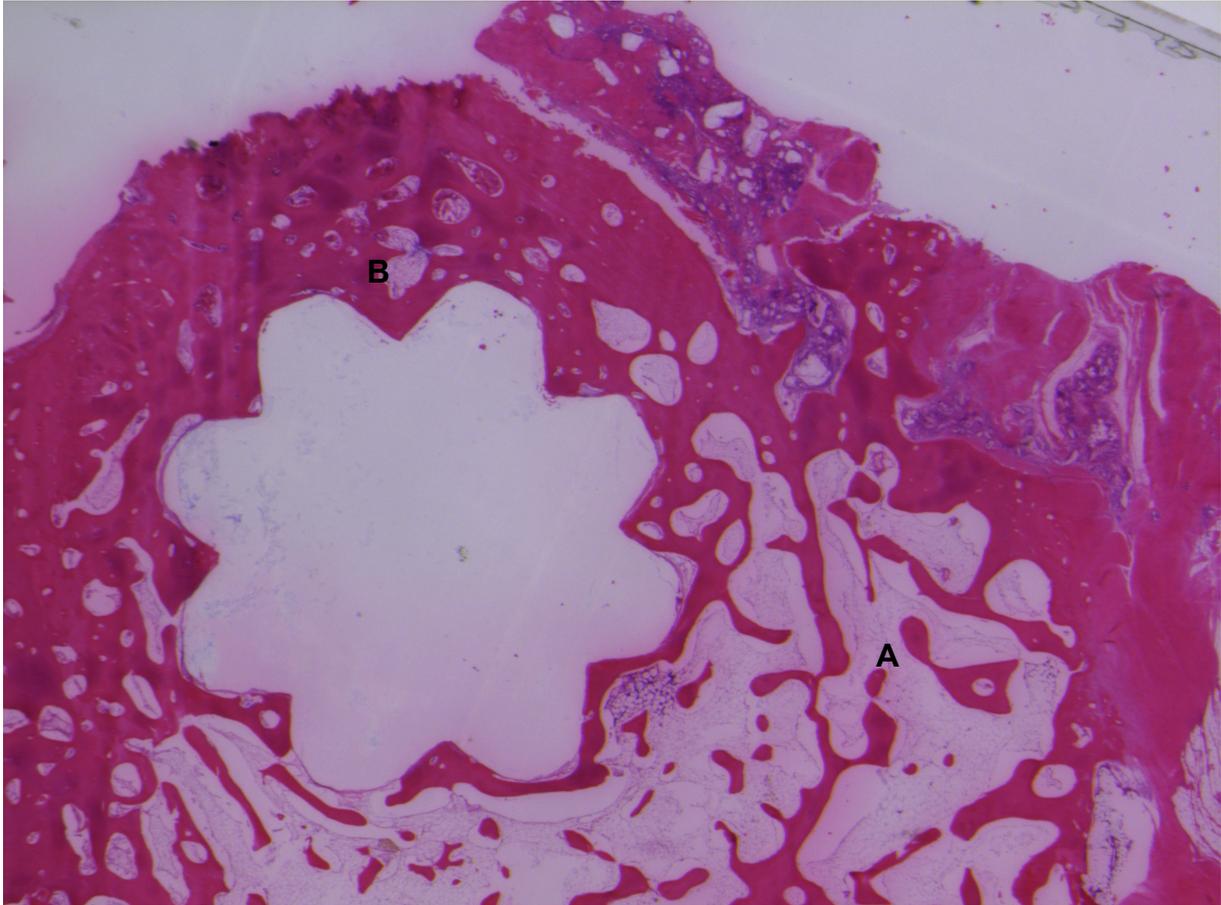


Abbildung 53: 48 Wochen- Detailansicht mittiger Knochenschnitt (Versuchstiernr.: 16389)

A fast vollständige Reorganisation der Spongiosa (Score item: *cancellous Bone*)

B Überbrückung der Fraktur mit reifem Knochen (Score item: *Filling of defect*)

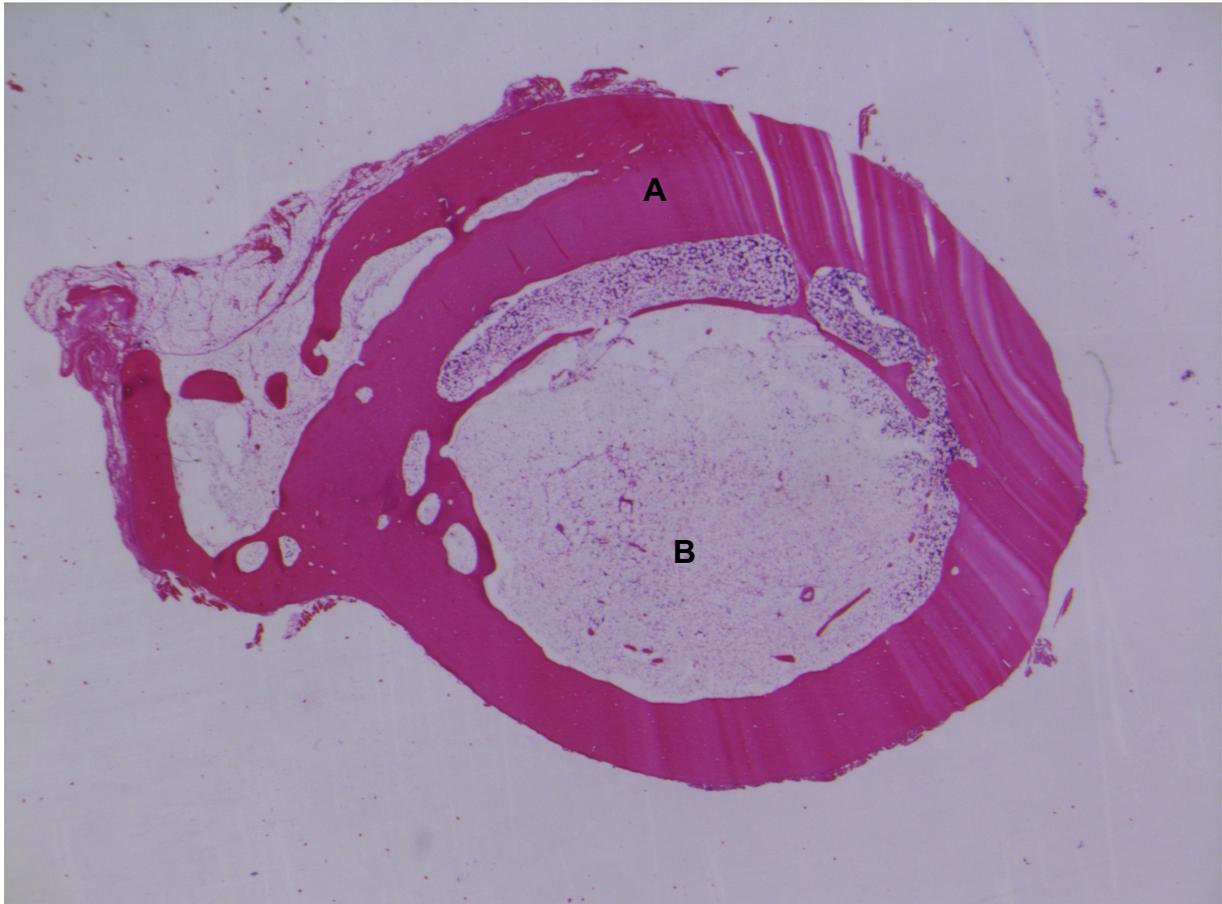


Abbildung 54: 48 Wochen - Übersichtsansicht proximaler Knochenschnitt (Versuchstiernr.: 16341)

A vollständige Reorganisation der Corticalis (Score item: Cortical integrity)

B gelbes Knochenmark (Score item: bone marrow)

Keine Osteolysen

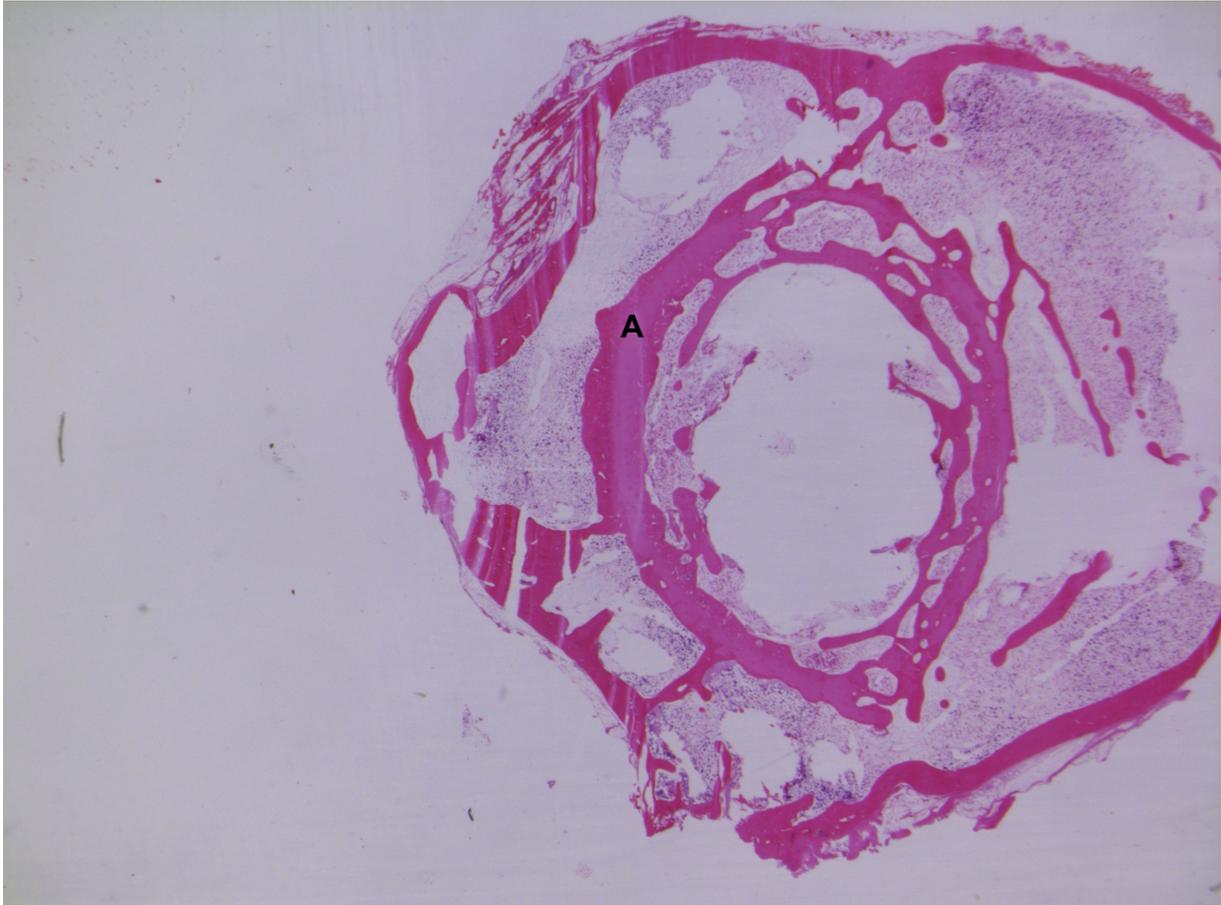


Abbildung 55: 48 Wochen- Übersichtsansicht mittiger Knochenschnitt (Versuchstiernr.: 16363)

A vollständige Reorganisation der Corticalis (Score item: *Cortical integrity*)

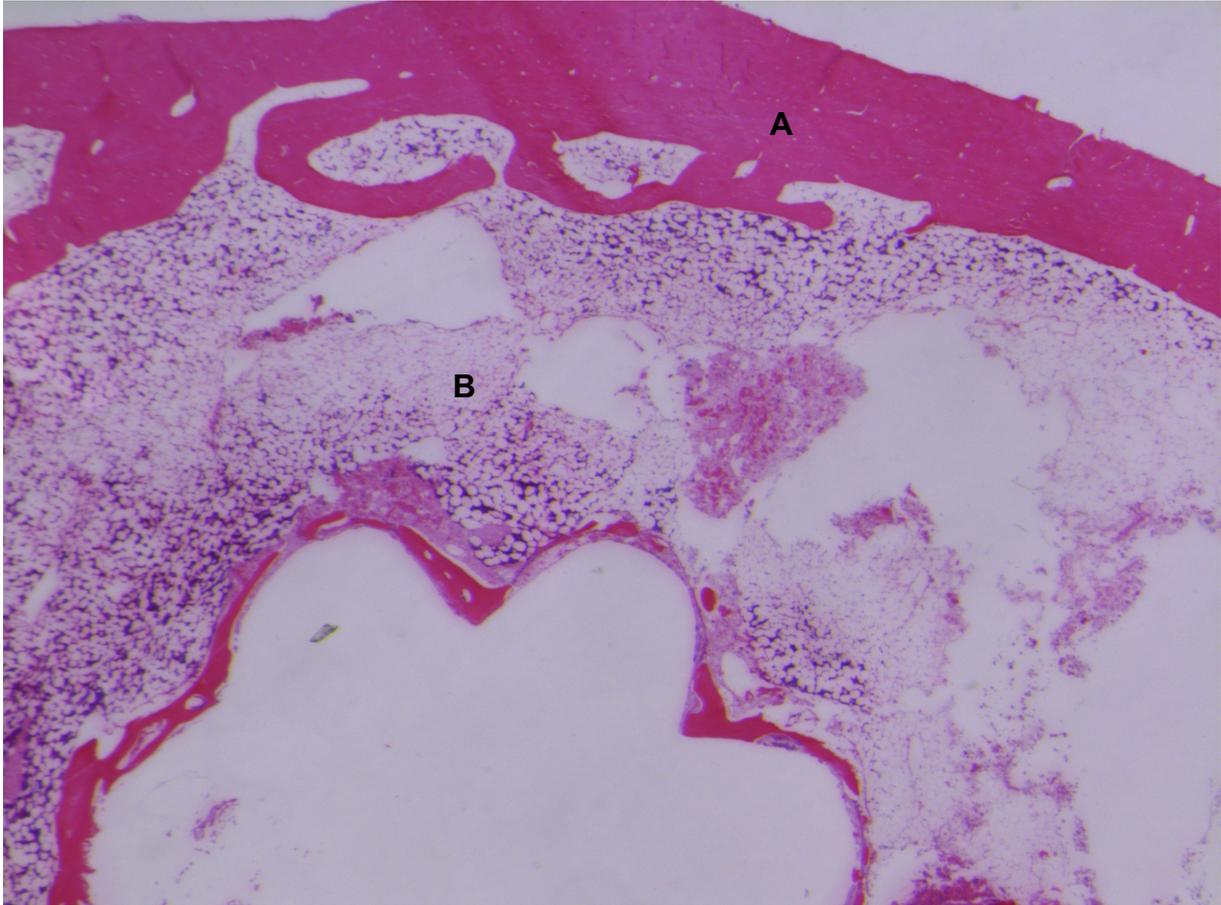


Abbildung 56: 48 Wochen – Detailansicht distaler Knochenschnitt (Versuchstiernr.: 16363)

A vollständige Reorganisation der Corticalis (Score item: Cortical integrity)

B gelbes und rotes Knochenmark (Score item: bone marrow)

Keine Osteolysen

8.2 Eidesstattliche Versicherung

Eidesstattliche Versicherung

Ich erkläre hiermit an Eides statt,
dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Thema:

Evaluation des histo-pathologischen Outcomes nach Versorgung von Frakturen kleiner Röhrenknochen mit Bio-ISOS I Implantaten im Tiermodell

selbständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe.

Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

München, den 17.11.2022

Ort, Datum

Jan Bruder

Unterschrift Doktorandin/Doktorand

9 Danksagung

Zuerst möchte ich mich bei meinem Doktorvater Herrn PD Dr. Oliver Pieske für die Überlassung des Themas dieser Arbeit, die Aufnahme in die Arbeitsgruppe Bio-ISOS, die Einführung in das wissenschaftliche Arbeiten, sowie die fortwährende wissenschaftliche, klinische und persönliche Unterstützung bedanken.

Mein besonderer Dank gilt meinem Betreuer Herrn PD Dr. Axel Greiner, welcher mich im Prozess dieser Doktorarbeit zu jedem Zeitpunkt uneingeschränkt unterstützt hat. Außerdem möchte ich mich bei meinem Kollegen Dr. Felix Massen, auf dessen Ergebnissen die vorliegende Arbeit aufbaut, für die gute Zusammenarbeit in der Arbeitsgruppe bedanken.

Im Rahmen der Anfertigung und Auswertung der Schnittpräparate möchte ich mich bei Prof. Dr. Thomas Knösel des Pathologischen Instituts der LMU München und Herrn Dr. Maximilian Saller der Arbeitsgruppe Experimed der Klinik für Allgemein-, Unfall- und Wiederherstellungschirurgie des LMU Klinikums für die gute Zusammenarbeit und die Bereitstellung der notwendigen Ressourcen danken.

Ich danke meiner Freundin Jenny Schlichtiger, MSc. für die Motivation und Ratschläge während des Entstehungsprozesses der Arbeit.

Besonders möchte ich meinen Eltern, denen ich alles verdanke, für ihre immerwährende Unterstützung danken.