

**Histologische Biokompatibilitätsprüfungen
eines bioresorbierbaren Dreikomponenten-
Knochenklebstoffes auf β -Tricalcium-
Phosphat-Basis**

**Ergebnisse einer tierexperimentellen Untersuchung
am Kaninchen**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
des Fachbereichs Medizin der Justus-Liebig-Universität
Giessen

vorgelegt von
Agnes Brigitte Skorupa
aus Groß Strehlitz

Giessen 2008

Aus dem Medizinischen Zentrum für Chirurgie, Anästhesiologie und
Urologie

Klinik und Poliklinik für Unfallchirurgie

Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. Dr. med. vet. Reinhard Schnettler des
Universitätsklinikums Giessen - Marburg GmbH

(Standort Giessen)

Gutachter: Priv. - Doz. Dr. med. C. Heiß

Gutachter: Priv. - Doz. Dr. med. dent. M. Balkenhol

Tag der Disputation: 5.2.2009

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung	1
1.1	Fragestellung und Zielsetzung	2
2.	Theoretische Grundlagen	3
2.1	Anforderungen an einen bioresorbierbaren Knochenklebstoff	3
2.2	Geschichte und Entwicklung von Klebstoffen	4
2.3	Physiologie und Morphologie des Knochens	10
2.3.1	Funktion der Knochen	10
2.3.2	Knochenaufbau	10
2.3.3	Baumaterial des Knochens	11
2.3.4	Geflecht- und Lamellenknochen	14
2.3.5	Ossifikation	16
2.3.6	Funktioneller Knochenumbau	19
2.3.7	Knochenstoffwechsel	21
2.3.8	Primäre und sekundäre Frakturheilung	22
2.4	Physiologie und Morphologie des Skelettmuskelgewebes	25
2.4.1	Struktur und Molekularaufbau des kontraktiven Apparates der Skelettmuskulatur	25
2.4.2	Bindegewebshüllen	26
2.4.3	Segmentale Muskelfasernekrosen – Zenkersche Degeneration	26
2.4.4	Regeneration der Skelettmuskelfasern	27
3.	Material und Methoden	30
3.1	Prüfsubstanz Knochenklebstoff	30
3.2	Versuchstiere	31
3.3	Versuchsanordnung	32
3.4	Operationsablauf	33
3.4.1	Narkose	33
3.4.2	Operation	33
3.4.3	Postoperative Überwachung	37
3.5	Euthanasie	37
3.5.1	Perfusion	38

3.6	Histologische Untersuchungen	39
3.6.1	Herstellung der Technovit 7200 Schliffe	39
3.6.2	Herstellung der Paraffinschnitte	44
3.6.3	Herstellung der Technovit 9100 Schliffe	44
3.6.4	Lichtmikroskopische Auswertung	46
3.7	Enzymhistochemische Untersuchungen	49
3.8	Transelectronenmikroskopische Untersuchungen	50
3.9	Statistik	52
4.	Ergebnisse	53
4.1	Klinische Ergebnisse	53
4.2	Lichtmikroskopische Analysen	54
4.2.1	Femurkondyle	55
4.2.2	Rückenmuskulatur	76
4.3	Enzymhistochemische Analysen	90
4.4	Transmissionselectronenmikroskopische Analysen	92
4.5	Histomorphometrische Analysen	98
5.	Diskussion	100
5.1	Tiermodell	101
5.2	Makroskopische Befunde	103
5.3	Lichtmikroskopische Analysen	104
5.4	Enzymhistochemische Analysen	114
5.5	TEM-Analysen	115
5.6	Histomorphometrische Analysen	116
6.	Zusammenfassung	119
7.	Summary	120
8.	Literaturverzeichnis	122
9.	Tabellen- und Abbildungsverzeichnis	130
	Danksagung	134
	Lebenslauf	135

1. Einleitung

Im Laufe der letzten Jahrzehnte hat die Verwendung von Klebstoffen in der Industrie bei der Vereinigung unterschiedlichster Materialien viele der langbewährten Verfahren wie das Schrauben, Nieten, Nageln und Löten abgelöst. In der Medizin dagegen konnte sich die Klebung gegen die herkömmlichen Verfahren wie Osteosynthesen bis zum heutigen Tage nicht etablieren. Dabei könnte ein bioresorbierbarer Knochenklebstoff in operativen Fachgebieten wie z.B. der Traumatologie und der operativen Orthopädie eine attraktive Alternative und Ergänzung zu den bekannten Osteosyntheseverfahren darstellen.

Besonders bei der Fixation kleinerer und weitgehend unbelasteter knöcherner Fragmente sowie bei der Versorgung von Trümmerfrakturen in Verbindung mit einer Osteosynthese dürfte der Einsatz eines Knochenklebstoffes den konventionellen Behandlungsstrategien überlegen sein.

Verglichen mit metallischen Osteosynthesematerialien verursacht der Gebrauch eines Knochenklebstoffes eine deutlich geringere Gewebetraumatisierung und führt nicht zu einer Beeinträchtigung der Blutversorgung. Weiterhin entfallen notwendige Metallentfernungen (Re-Eingriffe) und die damit verbundenen Risiken und Gefahren eines operativen Eingriffs sowie die durch den Zweiteingriff und den damit verbundenen Arbeitsausfall anfallenden Kosten für das Gesundheitswesen [Heiss 2005, Heiss 2006]. Durch die Verteilung des Klebstoffes auf die gesamte Oberfläche wird im Gegensatz zu herkömmlichen Osteosynthesen eine gleichmäßige flächenhafte Kraftverteilung mit besserer Kraftübertragung erreicht. Ein weiterer Vorteil bei der Verwendung eines Knochenklebstoffes ist seine Fähigkeit Materialunebenheiten auszugleichen sowie seine schwingungsdämpfenden Eigenschaften [Giebel 1981].

Trotz der Vorteile die der Einsatz eines bioresorbierbaren Knochenklebstoffes bieten könnte, gibt es bis heute keinen verfügbaren Knochenklebstoff, der im Rahmen der Frakturversorgung eingesetzt wird. Die wesentliche Ursache dafür liegt in den spezifischen Anforderungen, die an einen Knochenklebstoff gestellt werden. Die in der Vergangenheit getesteten Knochenklebstoffe konnten diesen Anforderungen nicht gerecht werden und scheiterten entweder an deren Biokompatibilität, Degradierbarkeit oder mangelnden Verbundfestigkeit [Heiss 2004]. Aus diesem Grunde besteht ein nachhaltiger Forschungsbedarf für die Entwicklung neuartiger resorbierbarer Knochenklebstoffsysteme.

1.1 Fragestellung und Zielsetzung

Ziel dieser experimentellen Arbeit ist die Überprüfung der Biokompatibilität und Degradation eines neuartigen bioresorbierbaren Knochenklebstoffes auf der Basis von β -Tricalcium-Phosphat. Zur Durchführung der Studie wurde ein standardisiertes und reproduzierbares Zylindermodell im spongiösen Bereich der Femurkondyle des Kaninchens (Kleintiermodell) gewählt. Anhand licht-, enzym- und transmissionselektronenmikroskopischer sowie histomorphometrischer Untersuchungen sollen die Unterschiede der Frakturheilung, der Biokompatibilität und der Degradation des neuartigen Knochenklebstoffes im Vergleich zur Kontrollgruppe erarbeitet werden. Zum Zwecke weiterer Untersuchungen erfolgte zudem die Implantation des Knochenklebstoffes in eine muskuläre, rechtsparavertebrale Rückentasche der Kaninchen. Diese soll ebenfalls im Hinblick auf die Biokompatibilität und Degradation im Weichteilgewebe des verwendeten Knochenklebstoffs im Rahmen einer histologischen Analyse im Vergleich zur Kontrollgruppe ausgewertet werden. Die Beurteilung der Ergebnisse der Untersuchungen soll sich dabei an folgenden Fragestellungen orientieren:

- Erfüllen der verwendete Knochenklebstoff und seine Abbauprodukte nach Applikation in Knochen- sowie Weichteilgewebe (Skelettmuskulatur) die Kriterien der Biokompatibilität?
- Findet nach der Klebstoffapplikation im Osteotomiespalt eine physiologische Knochenneubildung im Rahmen der Frakturheilung statt oder wird diese durch den applizierten Klebstoff behindert?
- Kann eine Degradation des applizierten Knochenklebstoffes im spongiösen Lager der Femurkondyle und der paravertebralen Skelettmuskulatur nachgewiesen werden? Welche Rolle spielt dabei die zelluläre Resorption des Knochenklebstoffes und welcher Zelltypus ist hauptsächlich an den resorptiven Vorgängen beteiligt?

Darüber hinaus soll durch die Anwendung am Kleintiermodell die klinische Praktikabilität erprobt werden, sowie eine Klärung und Festlegung des Einsatzgebietes des neuentwickelten Knochenklebstoffes erfolgen. Die experimentellen Untersuchungen sollen dazu beitragen, Grundlagen auf dem Gebiet der Knochenklebung zu schaffen,

um die Verwendung von Knochenklebstoffen als Alternative oder Ergänzung zu den konventionellen Behandlungsstrategien in der Traumatologie und operativen Orthopädie in Zukunft etablieren zu können.

2. Theoretische Grundlagen

2.1 Anforderungen an einen bioresorbierbaren Knochenklebstoff

Die erfolgreiche Herstellung und klinische Anwendung eines Knochenklebstoffes ist an verschiedene Voraussetzungen gebunden (Tab. 1). Der Knochenklebstoff muss als ein in den Körper eingebrachtes Fremdmaterial „biokompatibel“ sein, d.h. er darf weder toxisch, kanzerogen noch mutagen wirken, darf zu keiner Sensibilisierung führen und muss für Zellen adhäsiv sein [Kawahara 1985]. 1988 wurde der Begriff „Biokompatibilität“ von Williams als „die Fähigkeit eines Materials, eine angemessene Gewebereaktion des Empfängers bei spezifischer Applikation zu erzeugen“ definiert [Williams1988].

Biohistokompatibilität	<ul style="list-style-type: none"> - nicht toxisch, nicht karzinogen, nicht teratogen, nicht embryotoxisch - bioresorbierbar (degradierbar) in einem definiertem Zeitraum - geringe Polymerisationshitze während der Aushärtungsphase
Verbundfestigkeit	<ul style="list-style-type: none"> - starke Klebefähigkeit - ausreichende Elastizität - gutes Haftvermögen an feuchten, fettigen und spongiösen Oberflächen
Handhabung	<ul style="list-style-type: none"> - einfache Anwendbarkeit und Applizierbarkeit
Weitere Eigenschaften	<ul style="list-style-type: none"> - schnelle Aushärtung - keine Volumenänderung - Stabilität während der Lagerung - Sterilisierbarkeit - Wirtschaftlichkeit

Tab. 1 Allgemeine Anforderungen an bioresorbierbare Knochenklebstoffe in der Traumatologie und operativen Orthopädie (aus Heiss et al. „Bioresorbable bone adhesives“, Unfallchirurg 2005).

In Anlehnung an diese Definition sollte der Knochenklebstoff während seiner Präsenz physiologische Prozesse wie z.B. die Knochenheilung nicht oder positiv beeinflussen. Weiterhin darf die Applikation des Klebstoffes bzw. seine Polymerisation nicht zu größeren Temperaturentwicklungen führen, um Wärmeschäden im Gewebe (Hitzenekrosen) zu vermeiden [Heiss 2003].

Eine weitere Voraussetzung ist die biologische Abbaubarkeit des Klebstoffes innerhalb eines definierten Zeitraumes, dabei sollten auch seine Abbauprodukte die Kriterien der Biokompatibilität erfüllen [Donkerwolcke 1998]. Der Abbau des Klebstoffes und der damit verbundene Verlust der mechanischen Stabilität sollte umgekehrt proportional zu dem Gewinn an Stabilität durch Aufbau körpereigenen Knochens geschehen, so dass bei vollständigem Klebstoffabbau ein vollständiges Auffüllen des Frakturspaltes durch neu gebildeten Knochen erfolgt ist.

Der Knochenklebstoff muss darüber hinaus möglichst sofort oder einige Minuten nach der Applikation (schnelle Aushärtung) eine ausreichend stabile Klebeverbindung gewährleisten, die unmittelbar folgende funktionelle Beanspruchungen (Zugscher-, Druckstabilität) erlaubt. Dabei sollte die Aushärtungszeit jedoch auch in einer Größenordnung liegen, die eine unkomplizierte Bearbeitung und Anwendung zulässt [Heiss 2004].

Die Konsistenz des Knochenklebstoffes sollte ausreichend zähflüssig sein, um ein ungewolltes Abfließen vom Applikationsort zu verhindern [Claes 1997]. Des Weiteren muss der Klebstoff sterilisierbar sein und auch in feuchter Umgebung und an fettigen Oberflächen wie spongiösem Knochen haften [Heiss 2005]. Weitere Anforderungen sind eine einfache Handhabung sowie ein wirtschaftlich vertretbarer Rahmen im Hinblick auf die Herstellung, Aufbewahrung und Anwendbarkeit des Knochenklebstoffes [Heiss 2003, Stephen 1984].

2.2 Geschichte und Entwicklung von Klebstoffen

Die Vorteile der Klebstoffanwendung beim Zusammenfügen getrennter Gewebe wurden schon früh erkannt und führten seitdem zur Entwicklung unterschiedlichster Klebstoffe in der Medizin.

Die Geschichte der Klebstoffentwicklung hat ihre Ursprünge in Ägypten, wo vor mehr als 4000 Jahren die ersten Versuche einen Knochenklebstoff zu entwickeln unternommen wurden. Jahrhunderte später im Jahre 1772 wurde der „Plaster of

Paris“, der Gipsverband eingeführt, der heutzutage immer noch im Rahmen der konservativen Frakturbehandlung eingesetzt wird [Heiss 2005].

Der erste Knochenklebstoff mit dem Namen „Ossocol“ wurde von HEDRI 1931 vorgestellt. Dabei handelte es sich um einen Knochenleim bestehend aus einem aus Kollagen von Knochen und Bindegewebe gewonnenem Proteingemisch. HEDRI berichtete über anfänglich gute Klebefestigkeit und Frakturheilung, jedoch verhinderte das Auftreten schwerwiegender allergischer Reaktionen den weiteren Gebrauch des Knochenklebstoffes [Donckerwolke 1998].

Erst drei Jahrzehnte später führte die stürmische Entwicklung der Kunststoffchemie zur Entstehung weiterer Klebstoffe, von denen zunächst die Epoxidharze die Aufmerksamkeit auf sich zogen. 1958 führte BLOCH mit Araldit[®], einem Kunststoffklebstoff aus Ethoxylinharzen, Klebungen von Frakturen an den Vorderläufen von Schafen durch. In acht Fällen versagte die Methode entweder infolge von aufgetretenen Infektionen oder weil sich der Frakturbereich als zu fetthaltig bzw. zu feucht erwies [Bloch 1958]. 1956-1959 mischte der Russe GOLOVIN den Klebstoff mit Zusätzen von Knochenmehl sowie Fibrin und konnte daraufhin gute Ergebnisse an 32 Patienten mit frischen und pathologische Frakturen sowie Pseudarthrosen verzeichnen [Golovin 1956, 1959].

In eingehenden Versuchen deckte RIETZ 1964 gravierende Schwächen der Epoxidharze auf, zu denen neben mangelnder Degradation des Klebstoffes und verzögerter Frakturheilung auch eine ungenügende Haftung des Klebstoffes im feuchten Milieu und eine hohe Polymerisationshitze zählten [Rietz 1964].

Ein Polyurethan-Hartschaum namens Ostamer[®] weckte 1959 das Interesse der Öffentlichkeit. Die anfänglich von MANDARINO 1959/60 beobachteten guten Ergebnisse im Hinblick auf die Frakturheilung sowie die Gewebeerträglichkeit und Degradation des Klebstoffes wurden jedoch von späteren Untersuchern nicht oder nur mit Einschränkungen geteilt. Neben lokalen Wundheilungsstörungen [Buchner 1961] und Infektionen [Thompson 1960] mit Dehiszenzen, Hautnekrosen und Fistelungen [Drompp 1960] zeigten spätere Untersuchungen eine geringe bis ausbleibende Kallusbildung [Buchner 1962, Leemann 1961] sowie eine unzureichende Klebstoffdegradation [Gilmer 1961, Hollenberg 1963]. Des Weiteren

wurden Polymerisationstemperaturen von über 70°C beobachtet [Hoyt 1960] sowie ein Verlust der Adhäsion im feuchten Milieu aufgezeigt [Giebel 1981].

1959 wurde die hohe Klebekraft der heutzutage als Sekunden- und Sofortklebstoff bekannten Cyanoacrylate von COOVER entdeckt. Durch Variation der Alkylkettenlänge können verschiedenste Derivate dieses kalthärtenden Einkomponentenklebstoffes hergestellt werden, wobei mit steigender C-Atomzahl der Alkylreste die Klebefestigkeit und Toxizität der Verbindung abnimmt, die Elastizität und die Polymerisationszeit jedoch zunehmen [Contzen 1968, Heiss W. 1968]. Im Unterschied zu anderen Klebstoffen bewirkt eine mäßige Feuchtigkeit am Applikationsort der Cyanoacrylate keine Abnahme der Zugfestigkeit, sondern bewirkt im Vergleich zu Klebungen unter trockenen Bedingungen sogar eine verbesserte Zugfestigkeit [Giebel 1981]. Große Feuchtigkeit jedoch führt auch bei den Cyanoacrylaten zu einer Abnahme der Klebefestigkeit.

Versuche Cyanoacrylate als Knochenklebstoff zu gebrauchen blieben meist erfolglos. Dies lag an der mangelnden Festigkeit der geklebten Knochen die unter Belastung vermehrt Dislokationen aufwiesen [Chalupnik 1968, Giebel 1968]. Weiterhin berichtete STEIN (1969) bei Klebstoffversuchen von frakturierten Kaninchentibiae über Probleme bei der Verarbeitung der Cyanoacrylate, da diese aufgrund ihrer dünnflüssigen Konsistenz aus dem Frakturspalt abfließen und für die Verklebung nicht mehr zur Verfügung standen. Ein anderer Nachteil der Cyanoacrylate besteht darin, dass diese aufgrund einer im Verhältnis zur Knochenneubildung zu langsamen Klebstoffresorption ein mechanisches Hindernis für den Kallus bilden [Stein 1969].

TKATCHENKO und RUTSKI berichteten 1969 über eine durchgängige Biodegradation, gute Heilung und minimale Gewebereaktionen bei Knochenklebungen mit Cyanoacrylaten. 1975/76 jedoch folgten Berichte über einen fehlenden Zusammenschluss und eine Dislokation der verklebten Frakturenden, hohe Infektionsraten, schwere lokale Toxizität sowie gelegentliche Fistelbildung [Rutski 1975, Tkachenko 1976].

Ähnlich verhielt es sich mit dem 1972 von POLYAKOV vorgestellten Verfahren des „Knochenschweißens“, bei dem ein Cyanoacrylat-Knochenmehlgemisch mit Ultraschall zur Sofortpolymerisation gebracht wurde und in ein hartes Knochenkonglome-

rat verwandelt wurde [Polyakov 1972]. Die anfänglich von POLYAKOV vorgestellten guten Ergebnisse wurden durch Berichte anderer Arbeitsgruppen, über Nekrosen infolge starker Wärmeentwicklung, hohe Infektionsraten und Dislokationen der Frakturenden, widerlegt [Brug 1976, Tkatchenko 1976].

Wegen der überwiegend negativen Erfahrungen bei der Verwendung der Cyanoacrylate als Knochenklebstoff rät GIEBEL davon ab, diese für Knochenklebungen zu gebrauchen. BECK empfiehlt, Cyanoacrylate zur Adaption kleinerer Fragmente, die anders nicht mehr fixiert werden können zu verwenden [Beck 1966].

Eine weitere Gruppe der Klebstoffe bilden die Fibrinklebstoffe, die als Gewebeklebstoffe bei der Verklebung durchtrennter Nerven erstmals 1940 eingesetzt wurden [Young 1940]. Der erste erfolgreiche Versuch einer Osteosynthese mit Hilfe eines Fibrinklebstoffes wurde 1976 von PASSL durchgeführt. Dieser fixierte homologe Gelenkknorpeltransplantate ohne subchondrale Knochenplatte von Schafen mit Fibrin und erzielte bei Tieren, die postoperativ keine Ruhigstellung des Gelenkes erfuhren gute Ergebnisse [Passl 1976]. Dies führte PASSL auf die durch den Fibrinklebstoff bedingte vorübergehende feste Fixierung, die eine bindegewebige Einheilung des Transplantats mit darauf folgender Verknöcherung an der Basis ermöglicht zurück. Die Arbeitsgruppen um BÖHLER und BÖSCH konnten 1977 eine beschleunigte Knochenheilung und Einheilung von reimplantierten Knochenzylindern beobachten, was sie auf eine erhöhte Rate der Revaskularisation bei der Verwendung von Fibrinklebstoffen zurückführten [Böhler 1977, Bösch 1977].

Die meisten Fibrinklebesysteme basieren auf einer Mixtur aus den körpereigenen Substanzen Fibrinogen, Thrombin, Calcium und Gerinnungsfaktor XIII und besitzen daher eine hervorragende, mit den vorgenannten Klebstoffen nicht zu vergleichende Verträglichkeit [Donckerwolcke 1998]. Weitere Vorteile gegenüber den vorher genannten Klebstoffen sind die fehlende Hitzeentwicklung beim Polymerisieren, die günstige Auspolymerisierungszeit von 30 sec. sowie die hämostatische Wirkung. Als nachteilig erweist sich das geringe Risiko einer Hepatitisübertragung sowie eine im Vergleich zu den eingangs erwähnten Klebstoffen geringere Adhäsionsfähigkeit [Giebel 1981].

Der Abbau des Fibrinklebstoffes geht ohne größere Gewebereizung innerhalb von wenigen Tagen vonstatten. BRAUN fand an geklebten osteochondralen Frakturen von Kaninchen bereits nach 7 Tagen eine fortgeschrittene Klebstofforganisation mit

dichtem Granulationsgewebe und nur noch wenigen Fibrinresten. Der rasche Abbau des Fibrinklebstoffes erwies sich für den Knochen jedoch als zu schnell, so zeigte die Klebeverbinding eine unzureichende Haftfestigkeit und erforderte eine zusätzliche Ruhigstellung des Gelenkes von 21 Tagen [Braun 1978].

Aufgrund des schnellen Abbaus und der relativ geringen Adhäsionsfähigkeit der Fibrinklebstoffe empfehlen GIEBEL und RIMPLER den Gebrauch von Fibrinklebstoffen für Knochen in speziellen Fällen, wenn keine starken mechanischen Kräfte einwirken [Giebel 1981]. Heutzutage werden Fibrinklebstoffe zur Unterstützung der chirurgischen Naht oder deren Einsparung in mechanisch gering belasteten Bereichen (z.B. bei einer Leber- oder Milzläsion) verwendet. Außerdem finden sie bei der Blutstillung, der Verklebung von Nerven Anastomosen oder der Fixierung von Transplantaten im dermalen und HNO-Bereich Anwendung [Heiss 2003].

Polymethylmethacrylate (PMMA) gehören in die Gruppe der Knochenzemente, welche schon seit 1930 in der Zahnmedizin Verwendung finden. Im Unterschied zu den klassischen Knochenklebstoffen entsteht die Verbindung zur Oberfläche bei den Knochenzementen nicht durch molekulare Anziehung, sondern hauptsächlich durch mechanische Verzahnung [Smith 1973]. 1965 verwendeten CHARNLEY und KETTLEWELL als erste Polymethylmethacrylat für die Verankerung der Hüft-Total-Endoprothese [Charnley 1965]. Als nachteilig erwiesen sich die Polymerisationshitze von 96°C sowie die zytotoxische Wirkung des flüssigen PMMA-Monomers [Hulliger 1962]. Während ALBREKSSON eine minimale benigne Fremdkörperriesenzellreaktion als Gewebereaktion auf PMMA beobachten konnte, wurden von ZOLLINGER, der histopathologische Untersuchungen an dem Methylmethacrylatpräparat Palacos durchführte, weder Abbau noch reaktive Erscheinungen wie Bildung von Granulationsgewebe gefunden [Albreksson 1981, Zollinger 1952].

GIEBEL berichtete über eine durchschnittliche Zugfestigkeit für Methyl-2-Methacrylat von 506 N/cm² unter trockenen Bedingungen, wobei diese in Blut-Ringer-Lösung nur etwa $\frac{1}{10}$ des Wertes im Trockenen erreichte [Giebel 1981]. Es wurde gezeigt, dass PMMA, vorausgesetzt die Applikation geschieht nicht flächig, die Frakturheilung nicht beeinträchtigen [Charnley 1966].

Insgesamt wurden PMMA in zahlreichen Tierversuchen als externe Manschetten, intramedulläre Schienung und als Klebstoff direkt im Frakturspalt untersucht, dabei

beobachteten alle Arbeitsgruppen eine gute Fixationsstärke und adäquate Frakturheilung [Stephen 1984].

Bei der direkten Verklebung von Knochen beobachtete CHARNLEY jedoch spät auftretende Dislokationen und eine fehlende Vereinigung der Fragmentenden, die gegen den Gebrauch der PMMA als Knochenklebstoff sprachen [Charnley 1966]. Ähnliche Ergebnisse wurden von ENIS sowie MÜLLER verzeichnet [Enis 1974, Müller 1963].

Die aktuellsten Studien auf dem Gebiet der Knochenklebstoffentwicklung wurden 2004 von HEISS durchgeführt. Dieser untersuchte sowohl *in vitro* als auch im Klein- und Großtiermodell die Biokompatibilität, Degradation und Verbundfestigkeit von drei verschiedenen Klebstoffvarianten auf der Basis von Alkylen-bis(oligolactoyl)-methacrylaten (ELAMA). Die Varianten unterschieden sich durch ihre Comonomere: MMA (Methylmethacrylat) und HEMALA (Hydroxyethylmethacrylat-oligolactid), eine Klebstoffvariante beinhaltete das Hauptmonomer ELAMA ohne weitere Comonomere.

In den In-vivo-Untersuchungen konnte eine zelluläre Resorption der Klebstoffbestandteile gezeigt werden. Während eine der im Kleintiermodell untersuchten Klebstoffvarianten (ELAMA mit 5% HEMALA) eine unzureichende Degradation mit einer Behinderung der physiologischen Frakturheilung zeigte, konnte bei einer weiteren (ELAMA mit 4% MMA) eine ausgezeichnete Biokompatibilität und eine im Vergleich zur Kontrolle tendentiell stärkere Verbundfestigkeit beobachtet werden. Im Großtiermodell fand sich eine sehr gute Biokompatibilität der applizierten Klebstoffvariante (EMALA ohne Comonomer) im kortikalen, jedoch nicht im spongiösem Bereich sowie eine gute Biegefestigkeit im kortikalen Anteil [Heiss 2006].

Zusammenfassend konnte bisher trotz der Vorteile die der Einsatz eines Knochenklebstoffes gegenüber den herkömmlichen Verfahren wie Osteosynthesen bietet von keinem der Forscher in der Vergangenheit ein Knochenklebstoff gefunden werden, der die spezifischen Anforderungen erfüllt. Es besteht demzufolge weiterhin ein nachhaltiger Forschungsbedarf für die Entwicklung neuartiger Knochenklebstoffe, um die Verwendung dieser als Alternative oder Ergänzung zu den konventionellen Behandlungsstrategien in Zukunft etablieren zu können.

2.3 Physiologie und Morphologie des Knochens

2.3.1 Funktion der Knochen

Das knöchernerne Skelett bildet gemeinsam mit den Gelenken den passiven Bewegungsapparat, der durch den aktiven Bewegungsapparat, die Muskulatur, bewegt wird [Taschenatlas der Anatomie 1999].

Die Hauptaufgabe der Knochen liegt in ihrer Stütz- und Schutzfunktion. Daneben spielen sie, in Anbetracht der Tatsache, dass 99% des gesamten Calciums und 60% des Phosphors des menschlichen Körpers im Skelett gebunden sind, eine große Rolle für den Calcium- und Phosphatstoffwechsel [Junqueira 1996].

2.3.2 Knochenaufbau

Die langen Röhrenknochen verdanken ihren Namen ihrem röhrenförmigen Schaft (Diaphyse), innerhalb dessen sich die Markhöhle, Cavitas medullaris, befindet. Die Enden der Röhrenknochen werden als Epiphysen bezeichnet und sind auf den Gelenkflächen mit hyalinem Knorpel überzogen.

Zwischen Epiphyse und Diaphyse befindet sich meist ein verbreiteter Knochenabschnitt (Metaphyse), der Vorsprünge (Apophysen) für die Befestigung von Muskeln, Sehnen und Bändern enthält.

Zwischen Epi- und Metaphyse liegt die Epiphysenfuge, deren Verknöcherung mit Abschluss des Skelettwachstums vollzogen wird [Benninghoff 2003]. Makroskopisch kann man auf einem Querschnitt durch einen Röhrenknochen die Substantia compacta (=Kortikalis) von der Substantia spongiosa unterscheiden. Dabei zeichnet sich erstere durch eine dicht gepackte Knochensubstanz ohne Einschluss größerer mineralfreier Areale aus, während letztere ein Maschenwerk aus einzelnen, locker gepackten Knochenbälkchen darstellt (Abb. 1).

Die Anordnung und Ausdehnung des Bälkchensystems variiert dabei stark je nach Lokalisation, Beanspruchung und Alter. Die Diaphysen langer Röhrenknochen bestehen zum großen Teil aus Substantia compacta, die Markhöhle besitzt nur wenig oder keine Spongiosa und ist beim Erwachsenen mit gelbem Fettgewebe aufgefüllt (gelbes Knochenmark).

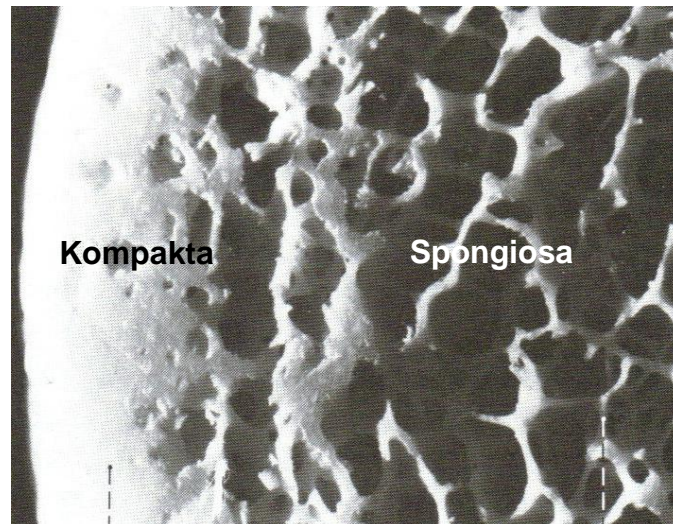


Abb. 1 Makroskopischer Aspekt des Knochens mit Spongiosa und Kompakta (aus Benninghoff, Anatomie Bd.1, 15. Auflage).

Anders verhält es sich bei den Epi- und Metaphysen, hier findet sich überwiegend Substantia spongiosa, deren Zwischenräume zwischen den Spongiosabälkchen mit blutbildendem Knochenmark ausgefüllt sind. Die Kortikalis ist hier nur in Form eines dünnen Überzugs vorhanden [Benninghoff 2003]. Eine ähnliches Verteilungsmuster der Kompakta und Spongiosa findet sich auch bei den planen, kurzen und irregulären Knochen. Ein Übergang von Spongiosa zu Kompakta und umgekehrt ist unter bestimmten Bedingungen (z.B. Wachstumsprozesse bzw. Alterungsprozesse) möglich (siehe 2.3.6) [Benninghoff 2003].

2.3.3 Baumaterial des Knochens

Vitaler Knochen stellt ein komplexes System aus Mineralien und verschiedenen organischen Materialien dar.

Knochenspezifische Zellen

Osteoblasten und Osteozyten

Osteoblasten sind die für die Knochenbildung entscheidenden Zellen. Sie entstehen lokal aus Zellen des Bindegewebes und kommen überall dort vor, wo Knochenbildung stattfindet, also bei Wachstums-, Umbau- und Reparationsvorgängen. Diese Zellen synthetisieren die organischen, nichtmineralisierten Komponenten der Knochenmatrix (Kollagen I, Proteoglykane und Glykoproteine), auch Osteoid genannt,

und sind an seiner Mineralisation beteiligt [Benninghoff 2003]. Im aktiven Zustand besitzen Osteoblasten eine kuboide Form, ein basophiles Zytoplasma und helle Golgi-Zonen. Ein ausgeprägtes endoplasmatisches Retikulum, dient als Syntheseort der organischen Matrixproteine (v.a. Kollagen I), welche nach erfolgter Modifizierung und Verpackung im Golgi-Apparat ohne vorherige Speicherung sezerniert werden [Junqueira 2005].

Bei Produktion von Osteoid werden die Osteoblasten im Knochen eingeschlossen, man spricht dann von Osteozyten (Abb. 2a). Die Mineralisierung des Osteoids geschieht unter der Mitwirkung der Osteoblasten als Einbau von Calcium-Phosphat-Salzen in Form von Apatit. Dieser Vorgang wird vermutlich durch vesikuläre Membranabschnürungen der Osteoblasten („Membranvesikel“), die als Kristallisationskeime dienen, beschleunigt [Benninghoff 2003]. Im Gegensatz zu den oberflächlich, meist in Reihe liegenden Osteoblasten, liegen Osteozyten, durch die synthetisierte Knochengrundsubstanz auseinandergedrängt, einzeln in kleinen Höhlen (Lakunen) (Abb. 2a). Osteozyten haben eine flache bis längsovale Form und besitzen ein deutlich verringertes endoplasmatisches Retikulum, sowie einen kleineren Golgiapparat [Junqueira 2005].

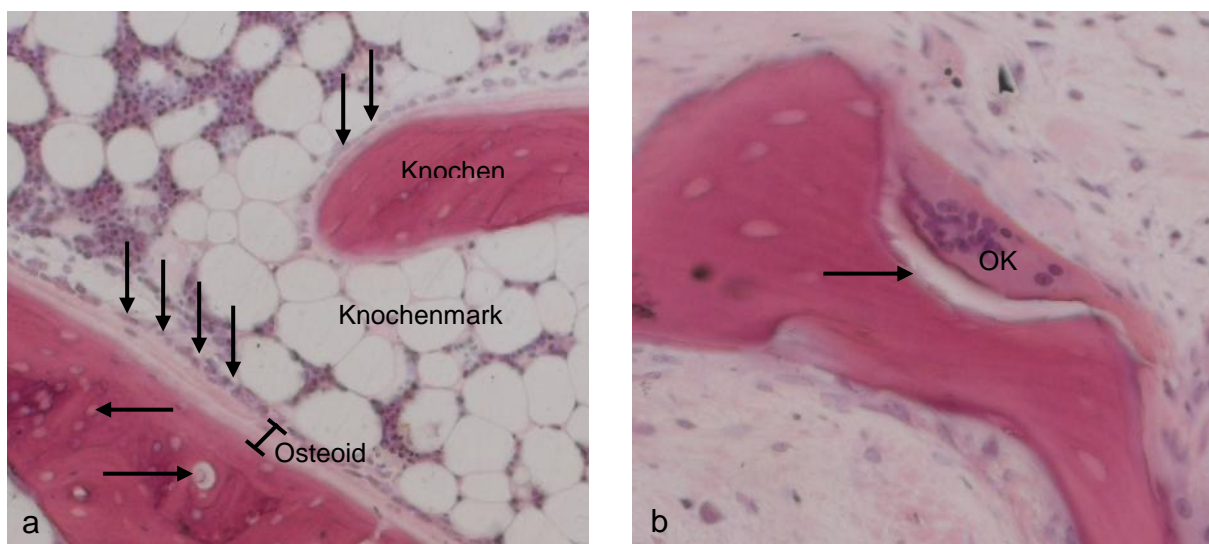


Abb. 2a-b (a) Osteblastensaum (↑↑) synthetisiert die Knochenmatrix (Osteoid). Bei der Verkalkung der Knochenmatrix werden die Osteoblasten eingeschlossen und differenzieren dann zu Osteozyten (→). (b) Mehrkerniger Osteoklast (OK) in einer HOWSHIPschen Lakune (→) (eigenes Bildmaterial).

Durch in feinsten Kanälen (Kanalikuli) liegende Fortsätze bleiben sie untereinander und mit den oberflächlichen Osteoblasten in Verbindung. Dadurch wird der Stoffaustausch zwischen den Zellen ermöglicht [Benninghoff 2003]. Die große Kontaktfläche

der Osteozyten und ihrer Fortsätze zum mineralisierten Gewebe, spielt eine entscheidende Rolle bei der Regulation des Calciumspiegels, da sie die Mobilisation von Calcium einerseits und das Abfangen von Calcium aus dem Serum andererseits in kürzester Zeit ermöglicht [Benninghoff 2003].

Osteoklasten

Osteoklasten sind Abkömmlinge des hämatopoetischen Systems, wobei Monozyten als deren Vorläuferzellen angesehen werden [Benninghoff 2003]. Es handelt sich dabei um mehrkernige Riesenzellen mit einem Durchmesser bis zu 100 µm, deren Aufgabe in der Resorption des mineralisierten Knochens besteht. Resorbierende Osteoklasten besitzen an der dem Knochen zugewandten Seite zahlreiche Einfaltungen der Zellmembran, die als sog. „Resorptionssaum“ erkennbar werden [Benninghoff 2003]. Das Zytoplasma zeichnet sich durch viele Ribosomen, Mitochondrien, Lysosomen und Vakuolen aus. Oft findet man Osteoklasten in im Rahmen der Resorptionstätigkeit entstandenen Einbuchtungen der Knochenoberfläche, den HOWSHIPschen Lakunen (Abb. 2b). Im Bereich des Resorptionssaums wird durch Fusion von Prälysosomen der Osteoklasten mit der gefalteten Zellmembran das Enzym V-ATPase eingebaut. Bei diesem Enzym handelt es sich um eine Protonenpumpe, die durch Ansäuerung der Lakune zur Auflösung der Hydroxylapatitkristalle und Demineralisierung des Knochens führt. Die Auflösung der nun freiliegenden organischen Grundsubstanz wird von in der Resorptionslakune sezernierten lysosomalen Enzymen wie Kollagenasen und Kathepsinen vorgenommen [Junqueira 2005].

Knochenmatrix

Die Knochenmatrix ist etwa zu gleichen Teilen aus organischen und anorganischen Substanzen aufgebaut.

Der organische Anteil der Knochenmatrix besteht zu 95% aus Kollagen I, den Rest machen Proteoglykane und Glykoproteine sowie mehrere spezifische Proteine, z.B. Osteonektin, Osteokalzin und Osteopontin aus. Einige dieser Substanzen haben Brückenfunktionen und verbinden die Mineralien des Knochens mit dem Kollagen (Osteonektin) bzw. den Zellen (Osteopontin). Den Hauptteil der für die Druckfestigkeit verantwortlichen anorganischen Bestandteile bilden Calcium und Phosphat in

Form von Hydroxylapatitkristallen $[\text{Ca}_{10} (\text{PO}_4)_6 (\text{OH})_2]$. Daneben finden sich in wesentlichen Anteilen Magnesium, Kalium, Chlor, Eisen und Karbonat [Benninghoff 2003]. Die Apatitkristalle liegen entlang der Kollagenfibrillen und werden von einem Hydratmantel umgeben, der den Ionenaustausch zwischen den Kristallen und der Umgebung fördert [Junqueira 2005].

2.3.4 Geflecht- und Lamellenknochen

Abhängig von der Anordnung der organischen Fasern lassen sich zwei Arten von Knochengewebe unterscheiden, der Geflecht- und der Lamellenknochen.

Bei jeder Knochenneubildung wird zunächst Geflecht- oder Faserknochen gebildet, der im weiteren Entwicklungsprozess meist durch Lamellenknochen ersetzt wird. Ausnahmen bilden die Schädelnähte, die Alveolen der Zähne sowie Einstrahlungsstellen der meisten Sehnen und Bänder [Junqueira 2005].

Beim *Geflechtknochen* besitzen die Kollagenfaserbündel keine bestimmte Verlaufsrichtung, vielmehr sind sie durch eine geflechtartige Anordnung ohne Bezug zu umliegenden Strukturen wie Gefäßen charakterisiert. Im Unterschied zu Lamellenknochen ist Geflechtknochen stärker vaskularisiert und hat eine deutlich höhere Wachstumsgeschwindigkeit, der Mineralgehalt und somit die Festigkeit dagegen fällt geringer aus [Junqueira 2005].

Beim *Lamellenknochen* folgt die Anordnung der kollagenen Fasern und der dazwischen eingelagerten mineralischen Bestandteile bestimmten funktionell orientierten Gesetzmäßigkeiten [Benninghoff 2003]. Als Lamellen werden von Kollagenfasern und Matrix gebildete Knochenschichten bezeichnet. Innerhalb der Lamelle haben die Fasern einen schraubenförmigen, zueinander parallelen Verlauf, wobei die Verlaufsrichtung in der Regel von Lamelle zu Lamelle wechselt [Junqueira 2005]. An der Grenze zweier Lamellen und gelegentlich in den Lamellen befinden sich die Osteozyten mit ihren radiär ausstrahlenden, in Knochenkanälchen liegenden Fortsätzen.

Es werden unterschiedliche Arten von Lamellen unterschieden (Abb. 3):

- *General- oder Hauptlamellen*

Diese verlaufen parallel zur äußeren (äußere Generallamelle) bzw. inneren (innere Generallamellen) Knochenoberfläche, dabei übersteigt die Zahl der äußeren Generallamellen die der inneren [Junqueira 2005].

- *Speziallamellen*

Speziallamellen sind 3-7 μm dicke, konzentrisch um Gefäßkanäle (Havers-Kanäle) angeordnete Lamellen. Dabei bezeichnet man einen Havers-Kanal zusammen mit den ihn umgebenden Speziallamellen als Osteon oder Havers-System. Osteone sind meist zylindrisch und verlaufen charakteristischerweise entlang der Längsachse der Diaphysen [Junqueira 2005].

- *Schaltlamellen*

Hierunter versteht man im Rahmen von Umbauprozessen übrig gebliebene Lamellen- oder Lamellenbruchstücke, die zwischen den Osteonen liegen [Benninghoff 2003].

Wie bereits oben erwähnt, verlaufen im Lamellenknochen die Gefäße im Zentrum der Osteone in den Haversschen Kanälen. Diese enthalten neben den ernährenden Blutgefäßen auch Nerven und lockeres Bindegewebe. Die parallel zur Knochenoberfläche orientierten Haverskanäle kommunizieren durch senkrecht zu ihnen verlaufende Kanäle, die sog. Volkmannschen Kanäle, mit dem Periost, der Knochenmarkshöhle und anderen Haverskanälen [Junqueira 2005].

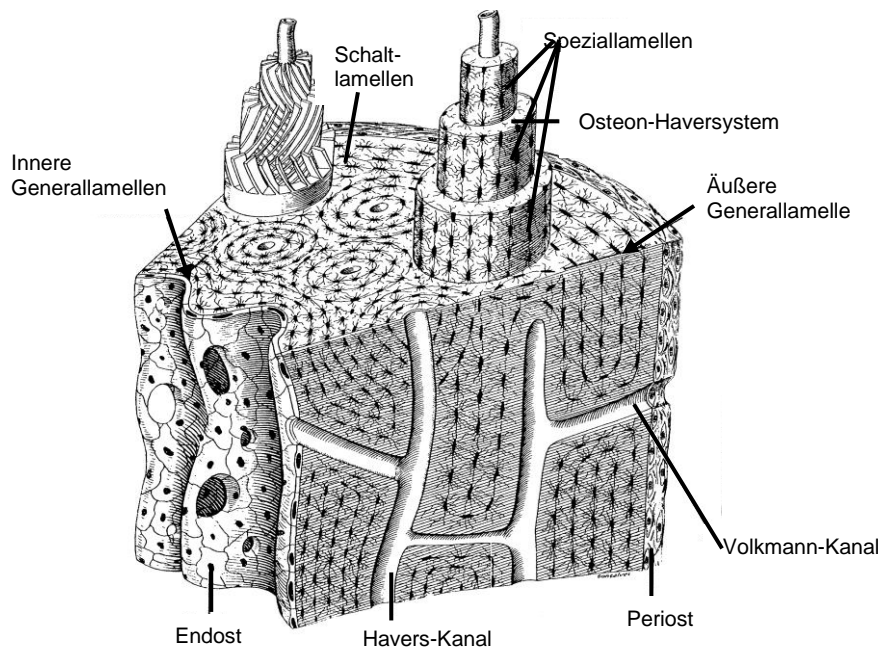


Abb. 3 Schematische Zeichnung eines Ausschnitts der Substantia compacta der Diaphyse eines Röhrenknochens (aus Junqueira, Carneiro, Histologie 2005).

Diese histologische Systematik im Knochenaufbau findet sich hauptsächlich bei der Kompakta, gilt aber im Prinzip auch für die Spongiosa. Beim spongiösen Knochen fehlen allerdings regulär gebaute Osteone und es werden hauptsächlich Lamellenbruchstücke sichtbar.

2.3.5 Ossifikation

Histologisch unterscheidet man, je nach dem aus welchem Gewebe der Knochen entstanden ist eine desmale (= direkte = primäre) und eine chondrale (= indirekte = sekundäre) Ossifikation. Bei beiden Prozessen tritt zunächst Geflechtknochen auf, der jedoch bald durch Lamellenknochen ersetzt wird [Benninghoff 2003].

Desmale Ossifikation

Als desmale Ossifikation bezeichnet man eine Knochenneubildung, die direkt aus dem ortsständigen Bindegewebe erfolgt [Benninghoff 2003]. Zu Beginn finden sich im Bindegewebe am Ort des zukünftigen Knochens mehrere Gruppen von Mesenchymzellen, die sich nach und nach zu Osteoblasten differenzieren, die Osteoid produzieren, das anschließend mineralisiert wird (Abb. 4).

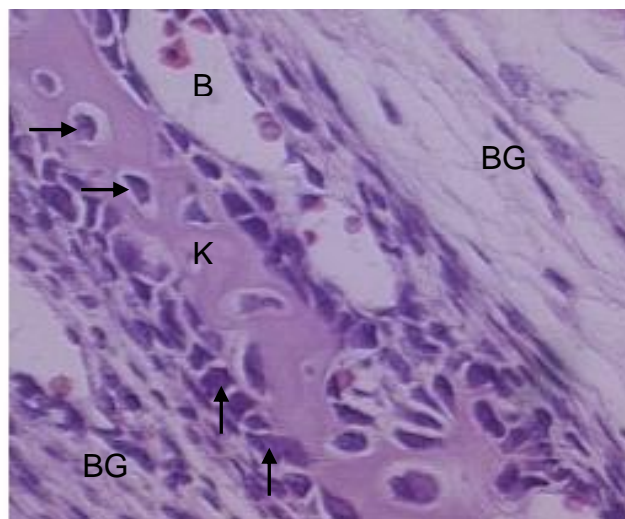


Abb. 4 Desmale Ossifikation. Mesenchymales Bindegewebe (BG), Osteoblasten (↑), Osteozyten (→), Knochengrundsubstanz (K), Blutgefäß (B) (aus: www.anatomie.net/histowebatlas).

Im Rahmen des Verkalkungsvorgangs kommt es zur Einmauerung der Osteoblasten und damit zur Bildung von Bälkchen aus Geflechtknochen. Im weiteren Verlauf

wachsen in die Zwischenräume der Bälkchen Gefäße ein und Mesenchymzellen differenzieren sich zu Knochenmarkszellen. Durch die Differenzierung weiterer Osteoblasten kommt es zu einer Größenzunahme dieser sog. Ossifikationszentren, bis sie schließlich miteinander verschmelzen und das ursprüngliche Bindegewebe ersetzen [Junqueira 2005]. Man findet die desmale Ossifikation im Embryonalstadium in großen Teilen des Schädel- und Gesichtsskeletts sowie der Klavikula [Benninghoff 2003].

Chondrale Ossifikation

Unter chondraler Ossifikation versteht man den Ersatz einer vorgebildeten Knorpelmatrix durch Knochen [Benninghoff 2003]. Man unterscheidet eine peri- und eine enchondrale Ossifikation:

Perichondrale Ossifikation :

Diese vornehmlich in der Schaftmitte langer Knochenanlagen vorkommende Ossifikationsform nimmt ihren Ausgang von dem der Knorpeloberfläche anliegendem, bindegewebigen Perichondrium. Dabei wird nach dem Muster der desmalen Ossifikation von Osteoblasten des Perichondriums zunächst eine dünne Schicht von Faserknochen der äußersten Knorpelschicht aufgelagert. Durch Anbau weiterer Faserknochenbälkchen kommt es zum Dickenwachstum der entstehenden Knochenmanschette [Benninghoff 2003]. Von diesem Zeitpunkt an wird das Perichondrium als Periost bezeichnet, da es nun nicht mehr Knorpel-, sondern Knochengewebe bedeckt. Die Chondrozyten innerhalb der Knochenmanschette werden allmählich aufgelöst und die übrig gebliebene Matrix verkalkt. Im weiteren Verlauf kommt es zum Einwachsen von Blutgefäßen in die verkalkte Knorpelsubstanz, sowie zur Immigration von Mesenchymzellen, die sich zu Osteoblasten differenzieren und an der verkalkten Knorpelmatrix mit der Synthese von Faserknochen beginnen. Durch Resorption von übrig gebliebenen Knorpelresten und einem Teil des zentralen Knochens durch Osteoklasten entsteht die Knochenmarkshöhle [Junqueira 2005].

Enchondrale Ossifikation:

Die enchondrale Ossifikation beginnt im Knorpelinneren und findet sich vor allem im Bereich der Epiphysen [Taschenatlas der Anatomie 1999]. Dabei kommt es im

Verlauf des Ossifikationsvorganges zu charakteristischen Veränderungen und Anordnungen der Chondrozyten (Abb. 5). In der Proliferationszone beginnen die Chondrozyten sich schnell zu teilen und sich in Längsachse der Epiphysen zu Zellsäulen anzuordnen (=Säulenknorpel). Schaftwärts nehmen die Zellen Wasser auf, werden groß und blasig (=Blasenknorpel) und bewirken eine Verkalkung der sie umgebenden Knorpelgrundsubstanz.

Im weiteren Verlauf kommt es zu einem Untergang der großblasigen Zellen und deren Resorption durch Chondroklasten, die auch einen Teil der verkalkten Knorpelgrundsubstanz abbauen (Eröffnungszone). An übrig gebliebene Knorpelmatrix wird von Osteoblasten, die sich aus eingewanderten Stammzellen differenziert haben, Knochenmatrix angelagert (Verknöcherungszone), gleichzeitig kommt es zu einem Einsprossen von Kapillarschlingen in die mineralisierten Knorpelsepten [Junqueira 2005].



Abb. 5 Enchondrale Ossifikation (aus: www.tiho-hannover.de/einricht/anat/lit/mwenth/os/ec_os.htm).

Das Endresultat ist der Aufbau einer primären Spongiosa, die entsprechend den lokalen Erfordernissen weiter umgebaut wird, bevor sie ihre endgültige Struktur erlangt.

Im Verlauf des Wachstums wird immer mehr Knorpel durch Knochen ersetzt, bis schließlich an der Grenze zwischen Epi- und Diaphyse nur noch eine schmale knorpelige Fuge (Wachstums- oder Epiphysenfuge) übrig bleibt [Benninghoff 2003]. Von dieser Fuge ausgehend erfolgt das Längenwachstum der Knochen solange, bis

die Wachstumsfuge gegen Ende des Wachstums durch Knochenmatrix ersetzt und damit verschlossen wird [Junqueira 2005].

2.3.6 Funktioneller Knochenumbau

Die Anordnung der Knochensubstanz in einem Knochen folgt in der Regel dem Prinzip der größten mechanischen Festigkeit beim kleinstmöglichen Materialaufwand (Leichtbauweise nach Pauwels).

Das bedeutet, dass in mechanisch weniger stark beanspruchten Bereichen (z.B. im Zentrum eines Röhrenknochens) Material gespart wird, während Bereiche mit erhöhter mechanischer Beanspruchung (z.B. die Kortikalis) verdichtet erscheinen. Bei Änderung der ursprünglichen mechanischen Anforderungen, ist der Knochen dazu im Stande sich den neuen Erfordernissen durch Umbauvorgänge anzupassen. So wird ein mechanisch nicht beanspruchter Knochen (z.B. überschüssiger Kallus nach erfolgter Frakturheilung) mit der Zeit abgebaut, während ein unter vermehrter Beanspruchung stehender Knochen (z.B. der Brückenkallus bei Frakturheilung) durch Anbauvorgänge verstärkt wird.

Diese auch als „funktionelle Anpassung“ oder „bone modeling“ bezeichneten Vorgänge sind die Voraussetzung für die Heilungsprozesse am Knochen.

Außer den bereits genannten, bei Änderung der Beanspruchung auftretenden Umbauvorgängen, findet im Knochen ein ständiger Knochenumbau statt, der keine sichtbaren Skelettstrukturänderungen verursacht und nur mit dem Mikroskop erfasst werden kann. Dieser sog. „schleichende“ Ersatz des Knochengewebes (auch bone remodeling) findet während des ganzen Lebens statt und verhindert vorzeitige Ermüdungserscheinungen des Knochens. Neben der Erhaltung der Knochenqualität sorgt der ständige Knochenumbau zudem dafür, dass nekrotische Knochenpartien (z.B. nach Frakturen, freie Knochentransplantate) umgebaut und wieder „revitalisiert“ werden [Debrunner 2002].

Den erwähnten Umbauprozessen des Knochens liegen stets die gleichen histologischen Vorgänge zu Grunde: Knochenneubildung durch Osteoblasten und Knochenabbau durch Osteoklasten [Debrunner 2002].

Dabei kann eine charakteristische Abfolge folgender Stadien beobachtet werden (Abb. 6):

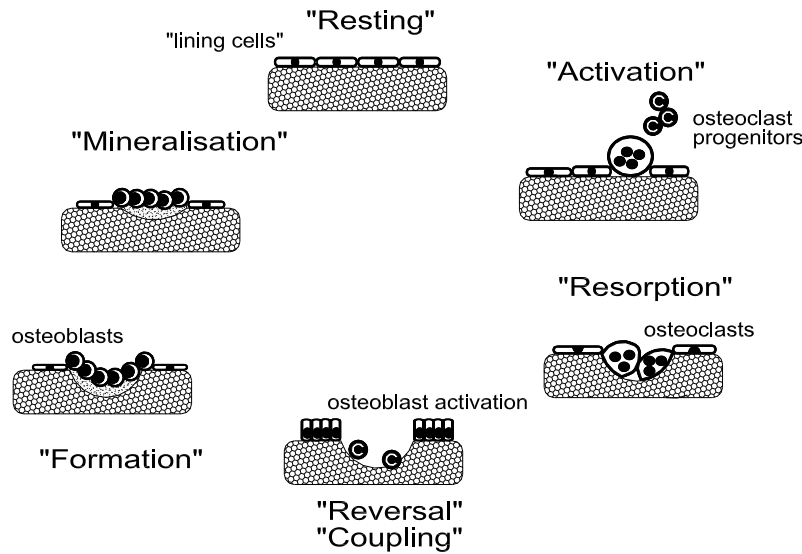


Abb. 6 Stadien des Bone Remodelings im Knochen (aus: Heiss „Biokompatibilität, Degradation und Verbundfestigkeit eines neuartigen bioresorbierbaren Knochenklebers in der Traumatologie und operativen Orthopädie“, 2006).

1. Aktivierung: Induziert wird der Prozeß des Remodelings durch die Differenzierung von Osteoklasten aus hämatopoetischen Stammzellen (Makrophagen und Monozyten) unter lokalem Einfluß, z.B von MCSF (Macrophage Colony Stimulating Factor), und deren Transport über die Blutbahn zum Knochen [Aubin 1998].

2. Resorption: Osteoklasten setzen sich auf der Knochenoberfläche fest und führen durch lysosomale Enzyme, Proteasen und saure Phosphatasen zu einer Auflösung der verkalkten Grundsubstanz unter Ausbildung der charakteristischen HOWSHIP-schen Lakunen. Dieser Prozess dauert ungefähr 2-4 Wochen [Teitelbaum 2000].

3. Reversal (Umkehrung): Osteoklasten verlassen die Howshipschen Lakunen. Wachstumsfaktoren und Prostaglandine sowie während des osteoklastären Resorptionsprozesses freigesetzte Faktoren (Kopplungsfaktoren) führen dann zu einer Stimulation und Differenzierung der Osteoblasten aus osteoblastischen Vorläuferzellen (pluripotente mesenchymale Stammzellen [Teitelbaum 2000]).

Die durch Chemotaxis angelockten Osteoblasten füllen schließlich den Resorptionsdefekt wieder auf [Aubin 2000].

4. Formation: Ablagerung von extrazellulären unmineralisierten Matrixproteinen (Osteoid) durch die Osteoblasten unter der Expression und Sekretion von alkalischer Phosphatase, Osteocalcin, Kollagen-Typ I und Zytokinen. Dieser Vorgang dauert ca. 3 Monate [Aubin 1998].

5. Mineralisation: Die Mineralisierung des Osteoids geschieht unter der Mitwirkung der Osteoblasten als Einbau von Calcium-Phosphat-Salzen in Form von Apatit. Daneben wirken Phosphat, Magnesium, Calcium, Natrium, Karbonat und Eisen bei der Mineralisation mit.

6. Quiescent Phase (Ruhephase): Nach Auffüllung des entstandenen Defektes wandelt sich ein Teil der Osteoblasten in Osteozyten um, die dann miteinander über zytoplasmatische Fortsätze verbunden sind [Kaiser 2002].

Der Prozess, bei dem der Knochenabbau von dem Knochenanbau gefolgt wird, nennt man „Coupling“. Er stellt sicher, dass abgebauter Knochen durch neuen Knochen ersetzt wird und somit ein Gleichgewicht zwischen Resorption und Formation bestehen bleibt [Heiss 2006].

2.3.7 Knochenstoffwechsel

Als Speicherort fast des gesamten Calciums (99%) und eines großen Teils des Phosphors (60%) des menschlichen Körpers, spielt das Skelett eine wichtige Rolle für den Calcium- und Phosphatstoffwechsel [Junqueira 1996].

Die Regulation des Calcium- und Phosphat-Haushaltes erfolgt im Wesentlichen durch die Hormone Calcitonin, Parathormon und Calciferol (Abb. 7). Das in der Nebenschilddrüse gebildete Parathormon erhöht den Calciumspiegel im Blut durch Stimulation von Osteoklasten, sowie durch gesteigerte Rückresorption von Calcium im Darm und in der Niere.

Als Antagonist des Parathormons senkt das in den interstitiellen C-Zellen der Schilddrüse gebildete Calcitonin den Kalziumspiegel durch eine Hemmung der Osteoklasten und der renalen Calciumrückresorption. Neben diesen antagonistischen Wirkungen regulieren Parathormon und Calcitonin als Synergisten den Phos-

phatstoffwechsel. Hier führen sie durch eine Hemmung der renalen Phosphatrückresorption zu einer Senkung des Phosphatspiegels [Kreutzig 2000].

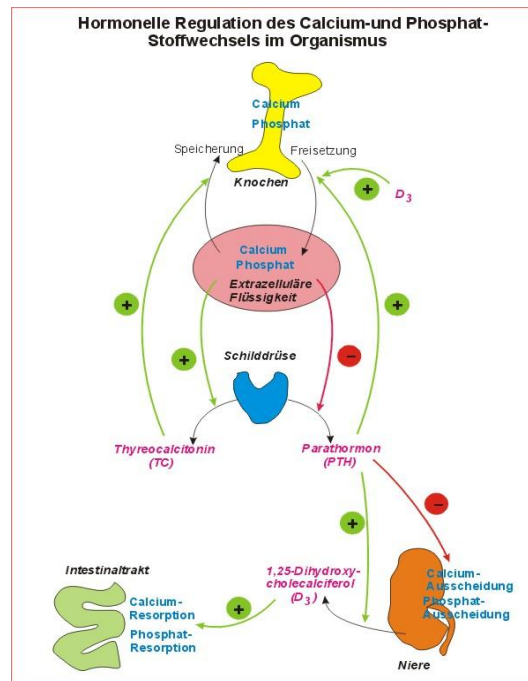


Abb. 7 Hormonelle Regulation des Calcium- und Phosphat-Stoffwechsels (aus: www.biochemie.web.med.uni-muenchen.de/biotutor_2004/calcium.htm).

Calciferol ist ein Hormon, das aus Vorstufen des Vitamin D in Haut, Leber und Niere synthetisiert wird. Es senkt den Calciumspiegel durch Förderung des Calciumeinbaus in den Knochen und fördert die gastrointestinale Resorption von Calcium und Phosphat [Kreutzig 2000].

Außer den genannten, soll zudem auch auf Hormone wie das Wachstumshormon STH, Glukokortikoide, Schilddrüsenhormone und Androgene verwiesen werden, die ebenfalls eine Rolle im Knochenstoffwechsel spielen, an dieser Stelle jedoch nicht näher erläutert werden.

2.3.8 Primäre und sekundäre Frakturheilung

Die Frakturheilung kann abhängig von Art und Ausmaß der Fraktur, sowie von der Beweglichkeit oder Stabilisierung der Frakturrenden auf unterschiedliche Weise erfolgen. Man unterscheidet eine primäre (=direkte) und eine sekundäre (=indirekte) Frakturheilung [Remberger 2002].

Primäre Frakturheilung

Die primäre Frakturheilung beobachtet man nur unter absolut stabilen Verhältnissen (z.B. Kompressionsosteosynthese), sie ist gekennzeichnet durch das völlige Fehlen eines Frakturkallus. Da diese Art von Knochenheilung nur unter stabilen Bedingungen vorkommt, bedeutet ihr Vorkommen umgekehrt den Beweis absoluter Stabilität [Debrunner 2002]. Man unterscheidet zwischen Kontakt- und Spalthheilung (Abb. 8a-b):

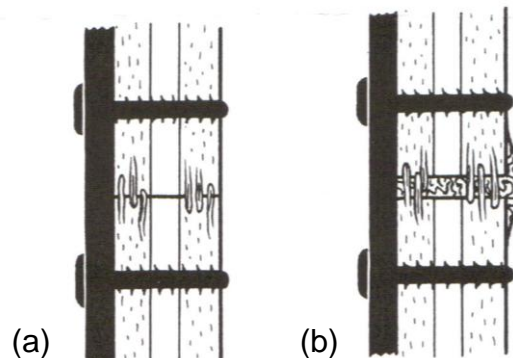


Abb. 8a-b Primäre Frakturheilung unter absolut stabilen Verhältnissen. (a) Kontakttheilung und (b) Spalthheilung (aus: Debrunner „Orthopädie-Orthopädische Chirurgie“, 2002).

Bei der Kontakttheilung besteht ein direkter Kontakt der Fraktarenden ohne Dislokation oder Spaltenbildung, so dass eine unmittelbare Überbrückung der Knochenanteile durch aktivierte Osteone erfolgen kann. Im Zuge der Regeneration bilden aktivierte Osteoklasten trichterförmige Resorptionskanäle, in die Osteoblasten einwandern und neuen Knochen anlagern wodurch es zur Bildung neuer, den Frakturspalt überbrückender Osteone kommt. Bei einer Kontakttheilung muss also zuerst durch Resorption Raum geschaffen werden, damit die Knochenneubildung stattfinden kann.

Spalthheilung findet in solchen Fällen statt, wo zwischen stabil fixierten Fragmenten ein Spalt (max. 0,5-0,8 mm) verbleibt. In diesem entsteht ein fibroblasten- und kapillarreiches Granulationsgewebe mit Osteoblasten, die ohne Ausbildung endostaler oder periostaler Kallusformationen Faserknochen und durch Umbau Lamellenknochen bilden [Remberger 2002]. Bei der Spalthheilung entfällt die Osteoklastenaktivierung, da bereits genügend Raum für die Knochenneubildung vorhanden ist. Defekte mit einem Durchmesser größer 0,8 mm weisen oft nur eine langsam voranschreitende Knochenbildung auf. Intermediär auftretendes Bindegewebe, das an-

schließlich in Geflechtknochen umgewandelt wird kann dabei im Rahmen der Knochenheilung vorkommen [Schenk 1977, Katthagen 1986]. Die beschriebenen Prozesse wurden im Allgemeinen für den kortikalen Knochen beschrieben, gelten jedoch prinzipiell auch für spongiösen Knochen, in dem sie jedoch an der Oberfläche der Trabekel ablaufen.

Sekundäre Frakturheilung

Diese Form der Frakturheilung findet sich bei weniger starren, flexibleren Osteosynthesen, die ein gewisses Maß an Mikrobewegungen im Frakturspalt zulassen. Dabei wird das durch die frische Fraktur (Abb. 9a) bedingte Hämatom durch einwachsendes Granulationsgewebe organisiert, zusammen mit entstehendem Faserknorpel bildet sich im Frakturspalt anschließend ein provisorischer „Knorpelkallus“ (Abb. 9b). Gleichzeitig entsteht an den periostalen und endostalen Fragmentenden, jedoch in einiger Distanz zum Frakturspalt, ein Knochenkallus aus Faserknochen.

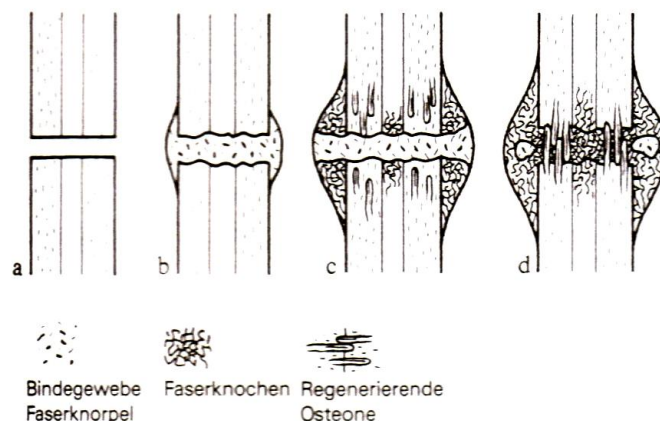


Abb. 9a-d Histologie der natürlichen Knochenbruchheilung. a) Frische Fraktur. b) Bindegewebs- und Knorpelkallus. c) Periostale und endostale Knochenbildung und Havers'scher Umbau der teilweise nekrotischen Fragmentenden. d) Brückenschlag, Ossifikation des Brückenkallus, Havers'scher Durchbau (aus: Debrunner „Orthopädie-Orthopädische Chirurgie“, 2002).

Die knöcherne Überbrückung der Fraktur beginnt mit schrittweisen Abbau des Knorpels durch eingewanderte Chondroklasten sowie dessen allmählichen Mineralisierung. Einsprossende Gefäße und nachfolgende Osteoblasten, die Faserknochen an die Knorpelreste anlagern, führen anschließend zur Bildung eines weitmaschigen Faserknochenkallus (Abb. 9c). Dieser wird schließlich im Rahmen von Knochenumbauprozessen durch kompakten Lamellenknochen ersetzt und die knöcherne Konso-

lidierung des Frakturspaltes damit vollendet (Abb. 9d) [Debrunner 2002]. Die Bildung des Faserknochenkallus und sein Umbau zum lamellären Knochen sind nach 6-8 Wochen abgeschlossen [Remberger 2002].

2.4 Physiologie und Morphologie des Skelettmuskelgewebes

2.4.1 Struktur und Molekularaufbau des kontraktiven Apparates der Skelettmuskulatur

Die Zellen der quergestreiften Muskulatur werden aufgrund ihrer bis zu 10 cm reichenden Länge auch als „Fasern“ bezeichnet (Abb. 10) [Benninghoff 2003]. Jede Muskelfaser stellt ein sog. Synzytium dar, d.h. eine mehrkernige Zelle, die durch Verschmelzung von mehreren Vorläuferzellen (Myoblasten) entstanden ist.

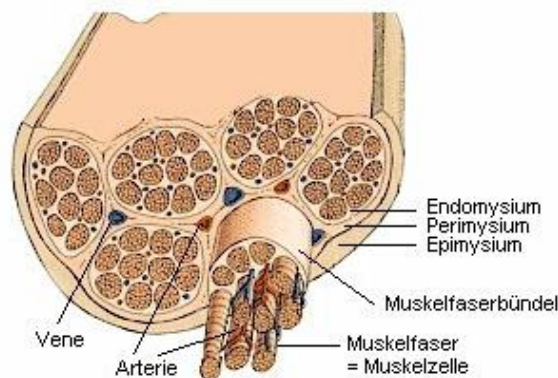


Abb. 10 Aufbau des Skelettmuskels aus Muskelfaserbündeln bzw. Muskelfasern (aus www.medizininfo.de/ruecken/muskulatur/aufbau.shtml).

Demnach besitzt eine einzelne Muskelfaser mehr als einen Zellkern, genauer gesagt kommen auf 1 mm Länge etwa 50-100 Zellkerne. Diese sind meist euchromatisch (blaß), elongiert und liegen direkt unter der Plasmamembran [Benninghoff 2003].

Ein Skelettmuskel besteht aus vielen Muskelfasern, die in Muskelfaserbündeln gelagert dicht aneinander liegen [Benninghoff 2003]. Die einzelne, bis zu 100 µm starke Muskelfaser besteht aus Hunderten von Myofibrillen und dazwischen liegenden Zellorganellen (Abb. 10) [Golenhofen 1997]. Die 0,5-1 µm dicken Myofibrillen sind aus dünnen Aktin- und dicken Myosinfilamenten aufgebaut, deren periodische hintereinandergestaffelte und ineinander greifende Anordnung für das typische Querstreifungsmuster des Skelettmuskels verantwortlich ist [Benninghoff 2003].

2.4.2 Bindegewebshüllen

Faszie und Epimysium

Jeder Muskel ist von einer aus straffem Kollagen bestehenden Bindegewebshülle umgeben, die als Muskelfaszie bezeichnet wird. Sie kann als eine spezielle Differenzierung einer dem Muskel locker aufliegenden kollagenen Bindegewebsschicht, dem Endomysium, bezeichnet werden (Abb. 10) [Benninghoff 2003].

Peri- und Endomysium

Als Perimysium bezeichnet man die vom Epimysium in die Tiefe des Muskels einstrahlenden Bindegewebsblätter, die die Muskelfaserbündel umgreifen. Innerhalb der Muskelfaserbündel werden die einzelnen Muskelfasern von einer dünnen Schicht von retikulären Fasern, dem Endomysium, umgeben (Abb. 10). Zusammen mit der Basallamina der Muskelfasern bildet das Endomysium einen Bindegewebsschlauch, der die Plasmamembran der Muskelfaser umgibt [Benninghoff 2003].

2.4.3 Segmentale Muskelfasernekrosen - Zenkersche Degeneration

Schädigungen der Skelettmuskulatur, z.B. durch mechanische Noxen, können je nach Ausmaß der Verletzung zu einem partiellen oder kompletten Untergang (Nekrose) der Muskelfasern führen. So verursacht eine lokale Schädigung nicht zwangsläufig eine Nekrose der gesamten Muskelfaser, sondern führt vielmehr lediglich zum Untergang der betroffenen Faserabschnitte, während nicht verletzte Faserabschnitte erhalten bleiben und zur Regeneration befähigt sind [Benninghoff 2003]. Diese auch als „segmentale Fasernekrose“ oder „Zenkersche“, „wachsartige“ oder „hyaline“ Degeneration bezeichnete Nekroseart wurde erstmals 1864 von ZENKER in unfixierten Muskelfasern von Patienten mit Typhus beschrieben, sie ist jedoch völlig unspezifisch und bei nahezu allen Muskelerkrankungen zu finden [Schröder 1982].

Als auslösenden Faktor für die zur segmentalen Degeneration der Muskelfasern führenden Vorgänge postulierten KARPATI & CARPENTER (1980) die Verletzung der Plasmamembran und den damit verbundenen Calcium-Influx. Dabei scheinen die überlebenden Muskelfaserabschnitte in der Lage zu sein durch die Synthese von neuen Membranen eine Separierung von den geschädigten Bereichen herbeizuführen und damit die osmotische Homöostase zu erhalten und ihren Untergang zu verhindern [Mastaglia 1982].

Die degenerativ veränderten Abschnitte der Muskelfasern weisen charakteristische histomorphologische Veränderungen auf, so dass sie bei der Betrachtung unter dem Lichtmikroskop eindeutig von gesunden Muskelfaserbezirken unterschieden werden können. Die betroffenen Faserabschnitte wirken „geschwollen“ und mit homogenem, eosinophil erscheinendem Material ausgefüllt, so dass die charakteristische Längs- und Querstreifung nicht mehr erkennbar ist [Bethlem 1970]. Im weiteren Verlauf kommt es zu einem scholligen Zerfall, zur Vakuolenbildung und zur Lyse der myofibrillären Elemente sowie zur Kernpyknose bzw. Kernlyse. Im Spätstadium der Zenkerschen Degeneration erfolgt schließlich die Phagozytose des nekrotischen Materials durch eingewanderte Makrophagen [Van Vleet 1976] (Abb. 11).

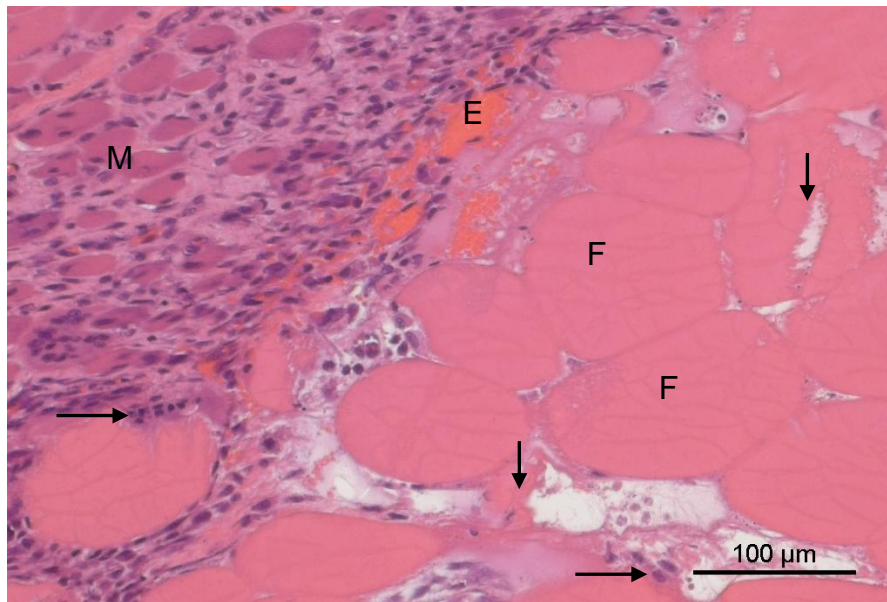


Abb. 11 Zenkersche Degeneration der Muskelfasern. Homogen eosinophil erscheinende Fasern (F) mit scholligem Zerfall (↓) und Vakuolenbildung sowie Phagozytose durch mononukleäre Phagozyten (→). Regenerierende Muskulatur (M), Einblutung (E) (H.E., 20x) (aus eigenem Bildmaterial).

2.4.4 Regeneration der Skelettmuskelfasern

Die Beantwortung der Frage ob und in welchem Ausmaß Regeneration der Muskelfasern möglich ist, ist einerseits davon abhängig, ob noch eine intakte Blutversorgung und Innervation der Muskelfaser besteht und andererseits davon, ob ihre Basalmembran intakt geblieben ist. Segmental nekrotische Fasern mit erhalten gebliebener Basalmembran können durchaus gut und erfolgreich regenerieren, während größere Defekte nicht restituiert, sondern bindegewebig gedeckt werden [Schröder 1982].

Maßgeblich an der Muskelregeneration beteiligt sind die sog. Satellitenzellen. Dabei handelt es sich um ruhende, subsarkolemmal gelegene muskuläre Stammzellen (Myoblasten), die im Bedarfsfall durch Zellteilung die Regeneration einleiten können. Nach mehreren Teilungszyklen lagern sich die postmitotischen Myoblasten aneinander und führen durch anschließende Verschmelzung zur Bildung der sog. Myotuben. Dies sind dünne und noch unreife Muskelfasern, die innerhalb des alten Basalmembranschlauches der zerstörten Muskelfaser liegen, jedoch auch eine eigene Basalmembran besitzen. Durch Fusion ihrer Plasmamembran mit erhalten gebliebenen Resten der Basalmembran der präexistenten Muskelfaser wird schließlich wieder ein kontinuierliches Fasergebilde geschaffen.

Oftmals werden die Verschmelzungsbereiche der neuen, dünneren Fasern mit den unverletzten Faserbereichen in Längsschnitten in Form von Faseraufspaltungen sichtbar [Benninghoff 2003] (Abb. 12a). Ein weiteres zu beobachtendes Phänomen während der Muskelfaserregeneration sind die sog. „Regenerationsknospen“, dabei handelt es sich um vielkernige, basophile Synzytien, die von der unversehrten Faseranteilen aussprossen und unter Bildung langer Zellbänder einander entgegenwachsen [Doerr 1974].

Je nach Regenerationsstadium weisen die Muskelzellen bei der Betrachtung unter dem Lichtmikroskop eine Reihe klassischer Merkmale auf, die ihre Unterscheidung ermöglichen. So besitzen Satellitenzellen einen rundlichen bis spindelförmigen Zellleib, einen hyperchromatischen, oft gelappten Zellkern und keine Myofibrillen [Benninghoff 2003].

Myoblasten sind ebenfalls spindelförmig und liegen zwischen Basallamina und Faseroberfläche der Faser. Sie sind jedoch im Gegensatz zu den Satellitenzellen im aktivierten Zustand zur Myofilamentsynthese befähigt [Mastaglia 1982].

Im Rahmen der Regenerationsprozesse kann es zu einer Anlagerung von proliferierenden Fibroblasten an Zellen des frühen Regenerationsstadiums, wie z.B. die Myoblasten, kommen. Dies kann dazu führen, dass die regenerierenden Zellen eine große Ähnlichkeit mit vielkernigen Riesenzellen aufweisen und nur schwer von diesen unterschieden werden können.

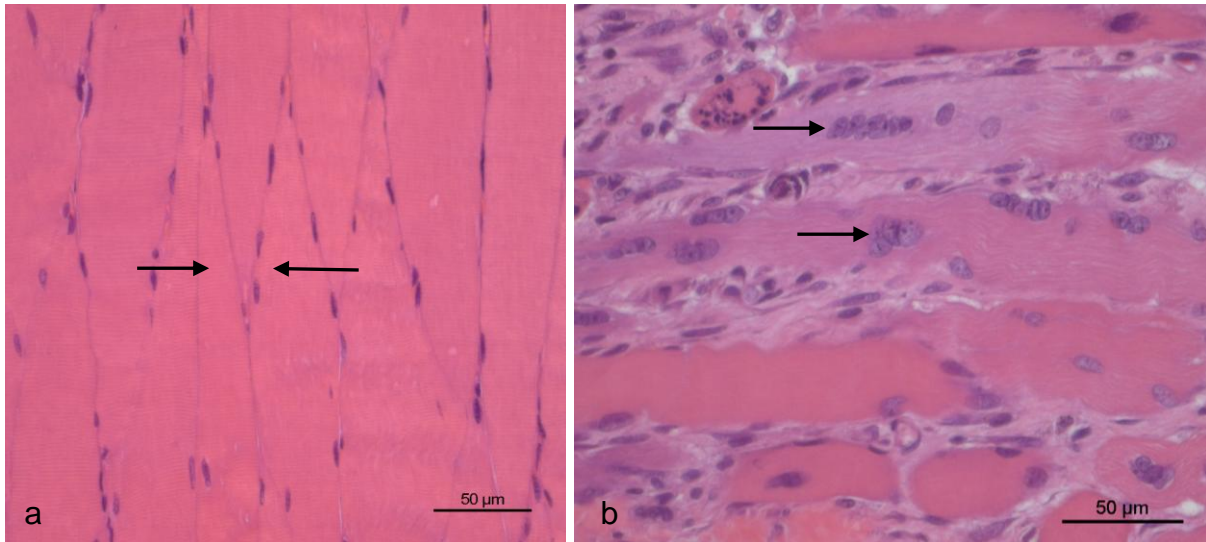


Abb. 12a-b. (a) „Aufgesplittetes“ Erscheinungsbild der Muskelfasern (→) als Zeichen stattgefundener Reparatursprozesse (H.E., 40x). (b) Basophile Myotuben mit zentral liegenden, in Reihen angeordneten Zellkernen (→) und prominentem Nukleolus (H.E., 40x) (aus eigenem Bildmaterial).

Myotuben sind lang gestreckte, vielkernige, dünne Fasern, deren große, zentral liegende Zellkerne einen prominenten Nukleolus besitzen und deren reihenförmige Anordnung auf Längsschnitten erkennbar wird. (Abb. 12b). Durch um den zentralen Zellkern gelegene Myofibrillen ist bei der Betrachtung unter dem Mikroskop bereits ansatzweise die charakteristische Quer- und Längssteifung innerhalb der Myotuben sichtbar [Mastaglia 1982].

Zwei Charakteristika, die unabhängig vom Regenerationsstadium allen sich regenerierenden Muskelzellen gemeinsam sind, sind die ausgeprägte Basophilie des Zytoplasmas auf H.E.-gefärbten Schnitten, welche den hohen Gehalt an Ribonukleinsäure widerspiegelt, sowie die großen, glasigen Kerne, die reichlich Euchromatin enthalten und einen prominentem Nukleolus enthalten (Abb. 12b).

In fortgeschrittenen Stadien der Regeneration nehmen die Kerne wieder eine periphere Position innerhalb der Muskelfaser ein und die Fasern verlieren mit ansteigender Myofibrillenzahl ihre basophile Färbung [Mastaglia 1982]. Zeichen der Muskelregeneration sind bereits nach 7 Tagen in Form von reichlichen Myotuben und sich regenerierenden Muskelfasern sichtbar [Gutierrez 1991].

Nach 6 Wochen entspricht die mittlere Größe der neu gebildeten Muskelfasern der Norm, zentral liegende Kerne sowie Aufsplitterungen und Verzweigungen bleiben als Zeichen der vorausgegangenen Schädigung bestehen [Remmele 1995].

3. Material und Methoden

3.1 Prüfsubstanz: Knochenklebstoff

Bei dieser tierexperimentellen Studie wurde ein Dreikomponentenklebstoff verwendet, der durch homogene Vermischung (20-30 Sekunden) von 2 Feststoffkomponenten A und B (je 30%) und einer viskosen Makromermischung (40%) vor der Anwendung hergestellt wird (Abb. 13b). Dieser pastöse Knochenklebstoff ist innerhalb von 30-50 Sekunden zu verarbeiten und härtet innerhalb einer weiteren Minute aus. Die Feststoffkomponenten A und B bestehen aus phasenreinem Beta-Tricalciumphosphat (86,6%) (Cerasorb[®], Fa. Curasan, Kleinostheim) mit Korngrößen kleiner 50 μm und 9,6% Natriumhydrogencarbonat als Porenbildner. Diese Füllstoffe enthalten Bis(hydroxyethyl)-para-toluidin (3,8%) als Radikalbildungsbeschleuniger (Komponente A) bzw. Dibenzoylperoxid (3,8%) als Radikalinitiator (Komponente B).

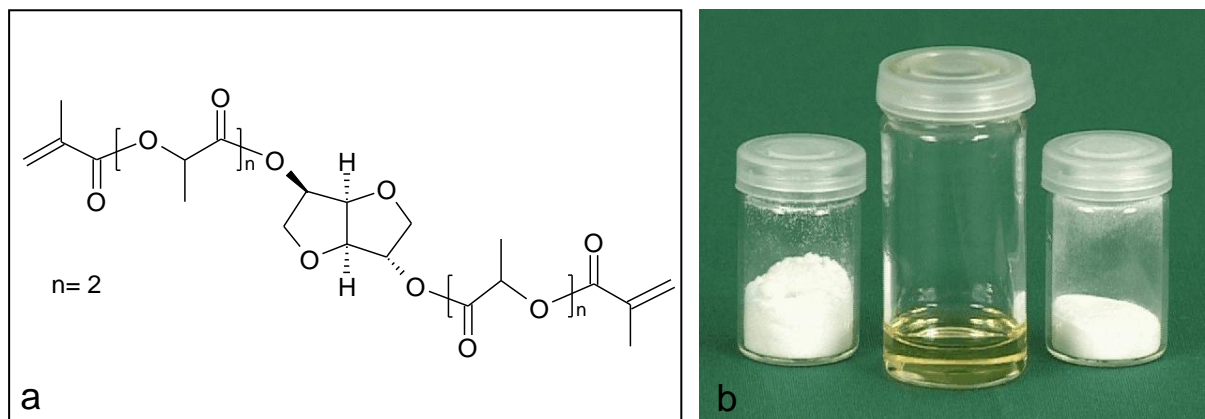


Abb.13a-b (a) Strukturformel der Makromermischung. (b) Dreikomponentenklebstoff mit den beiden Feststoffkomponenten aus β -Tricalciumphosphat und der viskösen Makromermischung (Bilder: Fa. Curasan, Kleinostheim).

Die Makromermischung besteht aus Methacrylat-terminierten Oligolactiden unterschiedlicher Kettenlänge (Abb. 13a). Die Darstellung der methacrylierten Oligolactide erfolgte durch eine Ringöffnungs-Polymerisation von L-Lactid sowie nachfolgende Veresterung der gebildeten terminalen Hydroxylgruppen [Vogt 2002]. Zur Einstellung der Viskosität wurde ein niedrigvisköser Haftvermittler/Verdünner in Form von Hydroxymethylmethacrylat (HEMA) (10%) verwendet.

3.2 Versuchstiere

Um die experimentell gewonnenen Daten mit hinreichender Wahrscheinlichkeit auf die beim Menschen zu erwartenden Verhältnisse übertragen zu können, musste ein Versuchstier gewählt werden, dessen anatomische Voraussetzungen es zuließen, Bedingungen zu simulieren, die den Verhältnissen beim Menschen sehr nahe kommen. Unter diesem Gesichtspunkt wurden für diese Studie insgesamt 53 sechs Monate alte, männliche und weibliche Kaninchen der Rasse New Zealand White als Versuchstiere ausgewählt. Neben ähnlichen anatomischen Verhältnissen sprach die Tatsache, dass Kaninchen mit abgeschlossenem Wachstum in bis zu 90% der Gesamtknochenfläche eine sekundäre Osteonenstruktur zeigen und damit eine gleichartige Knochenfeinstruktur wie der Mensch aufweisen für die Wahl des Kaninchens als Versuchstier [Wissing 1990].

Für das gewählte Tiermodell sprach zudem, dass beim Kaninchen alle Umbauvorgänge am Knochen in Form eines Zeiträfers, aber unter ähnlichen Bedingungen wie in der Humansituation, ablaufen. Hinzu kommt, dass sich Kaninchen in der artgerechten Haltung als wenig anspruchsvoll und widerstandsfähig gegenüber dem operativen Trauma zeigen.

Die im Rahmen dieser Studie verwendeten Kaninchen stammen aus einem amtlich anerkannten Zuchtbetrieb für Kaninchen in Niederwünsch (Thüringen), verantwortliche Person war Dipl. Ing. agr. Ronald Krieg. Es handelte sich um weibliche und männliche Tiere mit einem durchschnittlichen Gewicht von ca. 4207 g \pm 423 g. Die weitere Haltung und Versorgung der Tiere erfolgte in der Tierklinik für Gross- und Kleintiere des Forschungszentrums für Medizintechnik und Biotechnologie e.V. (FZMB) in Bad Langensalza (Thüringen). Die Versuchstiere wurden im Laufstall mit Einstreu gehalten. Die Fütterung erfolgte mit standardüblichem Trockenfutter für Kaninchen, Wasser stand den Tieren ad libitum zur Verfügung. Nach Markierung der Tiere durch eine Nummer am Ohr und am eigenen Käfig, erfolgte anhand einer Randomisierung die Zuteilung zu den entsprechenden Klebstoff- bzw. Kontrollgruppen. Die Bestimmungen des Tierschutzgesetzes (§ 8 Abs. 1 in der Fassung vom 18.08.1986, BGB1.I.S. 1319 mit Änderung des Artikels 3 vom 20.08.1990) wurden, nach Genehmigung des Tierversuchantrages (Nr. 14-01/05) im März 2005 durch die Tierschutzkommission in Weimar (Thüringen), strikt eingehalten.

3.3 Versuchsanordnung

Für die Umsetzung dieser *in vivo*-Studie am Kleintiermodell wurden insgesamt 53 Kaninchen benötigt, 2 für die Pilotstudie und die restlichen 51 für die Hauptstudie.

Im Rahmen einer Pilotstudie wurde zunächst 2 Kaninchen der Knochenklebstoff im Bereich der Femurkondyle implantiert, nach 21 Tagen wurden diese Pilottiere euthanasiert und die Biokompatibilität des Klebstoffes histologisch beurteilt. Auf eine Kontrollgruppe wurde dabei verzichtet. Aufgrund des problemlosen Verlaufs der Pilotstudie und einer aus der histologischen Beurteilung der Präparate ersichtlichen guten Biokompatibilität wurde nach Genehmigung des Tierversuchsantrags durch die örtliche Tierschutzkommission die Hauptstudie gestartet.

Bei dieser wurden drei Gruppen à 6 Kaninchen gebildet, denen Knochenklebstoff appliziert wurde und die nach 10 Tagen, 21 Tagen und 3 Monaten euthanasiert wurden (Tab. 2).

Standzeiten	Tiere/Klebstoffgruppe	Tiere/Kontrollgruppe
Pilottiere ¹	2	0
10 d	<div style="display: flex; justify-content: space-between;"> Gruppe 1 2 </div> 6	Gruppe 5 6
21 d	<div style="display: flex; justify-content: space-between;"> Gruppe 2 2 </div> 6	Gruppe 6 6
3 m	<div style="display: flex; justify-content: space-between;"> Gruppe 3 2 </div> 6	Gruppe 7 6
12 m	<div style="display: flex; justify-content: space-between;"> Gruppe 4 1 </div> 4	Gruppe 8 4
SUMME:	31	22
insges.	53	

Tab 2 Einteilung der Versuchstiere in die Klebstoff- und Kontrollgruppen der verschiedenen Beobachtungszeitpunkte mit Darstellung der Tieranzahl pro Gruppe. ¹Pilottiere: 2 Tiere: Standzeit 21 d.

Eine weitere Gruppe bestehend aus 4 Kaninchen, denen Klebstoff appliziert wurde und die erst nach einem Jahr getötet wurden, bildete die Langzeitgruppe. Für die Zeiträume 10 Tage, 21 Tage und 3 Monate wurden pro Kontrollgruppe jeweils 6 Kaninchen eingesetzt, in der Langzeit-Kontrollgruppe 4 Kaninchen. Des Weiteren kamen zu den Klebstoffgruppen der 10 Tage-, 21 Tage- und 3 Monatszeiträume jeweils

zwei weitere Kaninchen hinzu, bei denen eine Perfusion zur Fixierung des Gewebes durchgeführt wurde (Tab. 2). Die Langzeitgruppe wurde nur durch ein zusätzliches Kaninchen für die Perfusion erweitert. Das fixierte Gewebe diente der späteren Erstellung von Histologien, die transmissionselektronenmikroskopische Untersuchungen möglich machten.

Bei allen Versuchstieren erfolgte neben der Klebstoffapplikation im Bereich der Femurkondyle zudem eine Klebstoffimplantation in eine muskuläre, rechtsparavertebrale Rückentasche, die nachfolgend ebenfalls für die histologische Beurteilung der Biokompatibilität des verabreichten Klebstoffes herangezogen wurde. In der Hauptstudie konnten somit 29 Tiere der Klebstoff- und 22 Tiere der Kontrollgruppe zugeordnet werden (Tab. 2).

3.4 Operationsablauf

3.4.1 Narkose

Für die Narkose erfolgte eine anticholinerge Prämedikation mit 0,1 mg/kg Atropin (Atropinum sulfuricum[®], Eifelfango, Bad Neuenahr-Ahrweiler) und eine Sedierung mit 6 mg/kg Xylazin (Rompun[®], Bayer, Leverkusen). Die Injektionsnarkose wurde durch eine intramuskuläre Gabe von 60 mg/kg Ketamin (Ursotamin[®], Serumwerk Bernburg) in den M. semitendinosus/M. semimembranosus erreicht. Die Operationsdauer betrug 30-35 Minuten, wofür eine Injektionsnarkose ausreichend war. Im Bedarfsfall erfolgte zur Aufrechterhaltung der Narkose eine Nachdosierung von Ketamin (0,2-0,6 ml).

3.4.2 Operation

Zunächst wurde das Fell im Bereich des rechten distalen Femurs, der rechten proximalen Tibia und am Rücken rasiert und desinfiziert (mit jodhaltiger Desinfektionslösung = Betaisodonna-Lösung). Danach wurde die Extremität bzw. der Rückenbereich mit sterilen Tüchern abgedeckt, so dass diese für die Operation zugänglich waren. Es musste auf absolute Sterilität während sämtlicher Eingriffe geachtet werden, um eine Kontamination zu verhindern.

Jedes Kaninchen wurde nach erfolgter Randomisierung in Injektionsnarkose am rechten Ober- und Unterschenkel des Hinterlaufs operiert. Das kontralaterale Femur und die kontralaterale Tibia blieben unberührt. Zusätzlich wurde der Knochenklebstoff noch in eine muskuläre Rückentasche rechtsparavertebral appliziert.

Durch eine ca. 3 cm lange Hautinzision über dem Knie wurde über einen medialen Zugang das Kniegelenk erreicht, es erfolgte zunächst die Durchtrennung der Cutis und Subcutis, anschließend die Eröffnung der Kniegelenkshöhle, die Lateralisation der Patella sowie die Freilegung der proximalen Tibia und der distalen Femurkondyle.

Nach Freipräparation des Kniegelenks und dessen anatomischen Strukturen sowie Blutstillung wurde unter konstanter Kühlung mit physiologischer Kochsalzlösung (NaCl 0,9%) mit einer Diamanthonnfräse (DBCS = Diamond-Bone-Cutting-System[®], Fa. BIOMET, Darmstadt) im Bereich der Spongiosa der proximalen Tibia und des distalen Femurs jeweils ein Defekt mit einem Durchmesser von 6,3 mm gesetzt und dabei ein Knochenzylinder mit einem Durchmesser von 5,7 mm und einer Länge von 10 mm entnommen. Das Setzen des Defektes geschah beim distalen Femur von ventral nach dorsal im entlastungsfreien Knorpelbereich des Patellagleitlagers, bei der proximalen Tibia in mediolateraler Richtung. Auf diese Weise wurde ein standardisierbarer und reproduzierbarer Leerdefekt geschaffen (Abb. 14a-b).

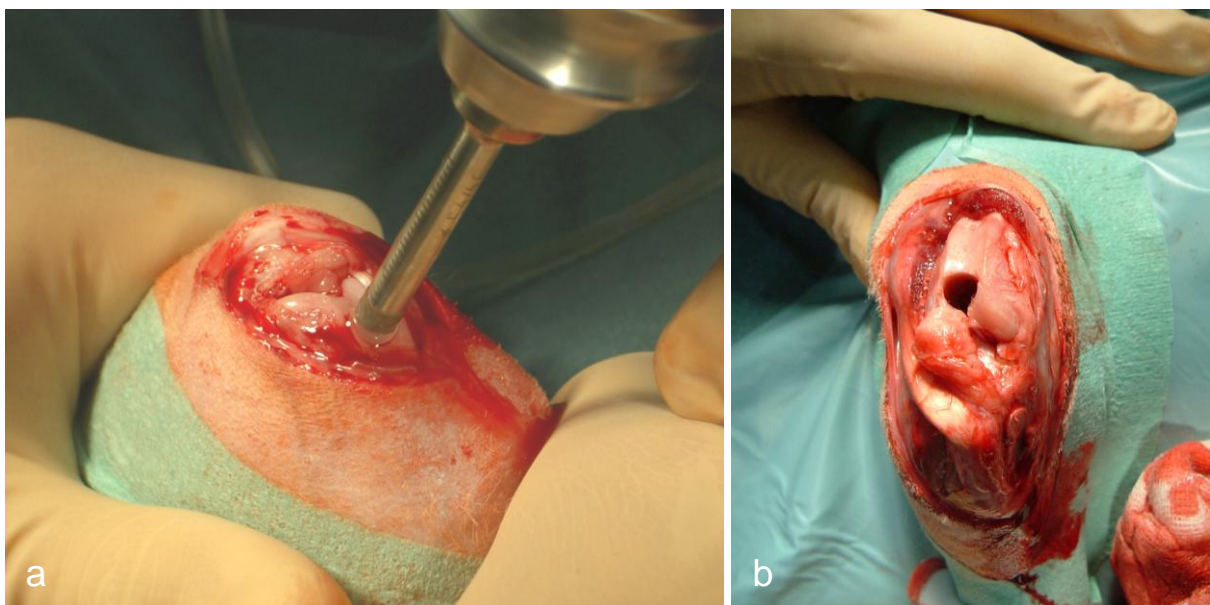


Abb. 14a-b

(a) Extraktion des spongiösen Knochenzylinders mit DBCS aus der Femurkondyle. (b) Spongiöser Bohrlochdefekt (6,3 x 15 mm) nach Knochenzylinderentnahme im Patellagleitlager der Femurkondyle.

Während der aus dem Femur entnommene Zylinder direkt der Klebstoffapplikation zugeführt wurde, wurde der Zylinder des Tibiaplateaus zuvor mit Hilfe einer Bohrvorrichtung zentrisch angebohrt und mit einem 0,8 mm dünnen Titandraht versehen. Diese Modifizierung des Zylinders ermöglichte die spätere Durchführung von biomechanischen Tests, die in einer anderen Dissertationsarbeit durchgeführt und analysiert werden.

Der Knochenklebstoff wurde nach Anrühren aus den drei Komponenten (Anrührzeit ca. 20-30 sec.) mit einem Spatel in Form dünner Streifen entlang der Längsseiten des vorher markierten Zylinders bei 6 und 12 Uhr aufgetragen und wieder in den Bohrlochleerdefekt eingesetzt (Abb. 15a-c). Nach Applikation des Knochenklebstoffes musste innerhalb von 30-50 Sekunden die korrekte anatomische Position des Knochenzylinders im Knochenlager der Femurkondyle erfolgen (Abb. 15c).

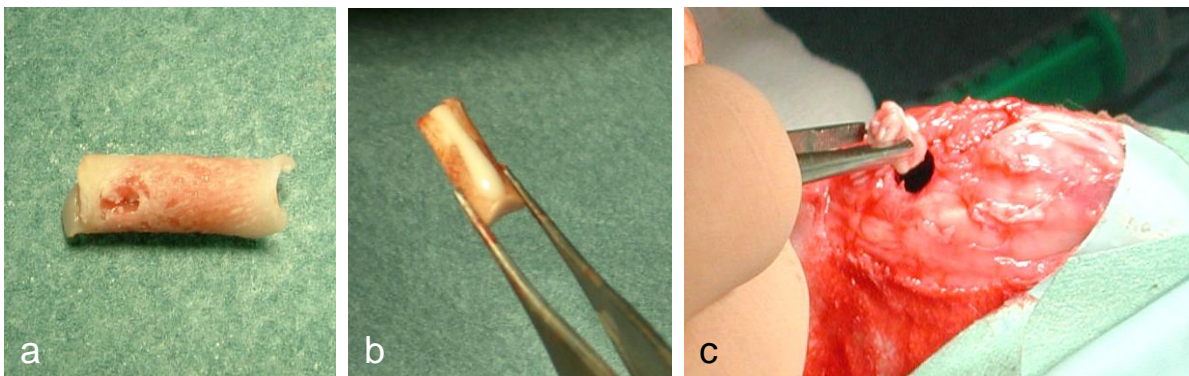


Abb. 15a-c

(a) Knochenzylinder (5,7 x 15 mm) aus der Femurkondyle. (b) Applikation des Klebstoffes in Form dünner Längsstreifen. (c) Anatomische Reposition nach Klebstoffapplikation.

Grundvoraussetzung für dieses Manöver war die exakte Platzierung des Zylinders, die aufgrund einer vor der Zylinderentnahme gesetzten Markierung an der Femurkondyle sowie am Zylinder ermöglicht wurde. Überschüssiges Klebstoffmaterial wurde sofort entfernt. Wurde die korrekte Positionierung erzielt, musste nun bei jedem Tier (aus der Klebstoffgruppe) nach erfolgter Klebstoffapplikation eine Fixationsphase von 60 Sekunden eingehalten werden.

Nach Aushärtung des Klebstoffes wurde das Repositionsergebnis nochmals überprüft (Abb. 16a), die Patella zurückverlagert, die Gelenkkapsel verschlossen, die Cutis durch Vicryl-Nähte verschlossen und ein Pflastersprühverband (Nobecutan[®], Fa. Astra Cemicals, Norderstedt) aufgebracht (Abb. 16b).

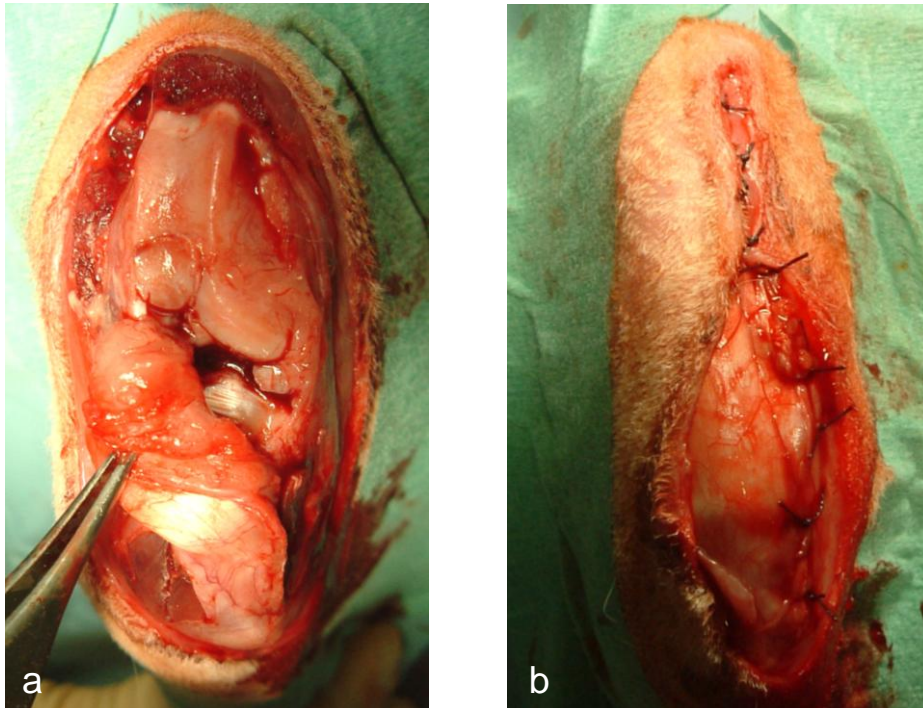


Abb. 16a-b

(a) Knochenzylinder nach Replantation in das Patellagleitlager der Femurkondyle. (b) Wundverschluss durch Nahtmaterial.

Des Weiteren erfolgte am Rücken der Kaninchen die Präparation einer muskulären, rechtsparavertebralen Rückentasche, die mit einer Spatelspitze (ca. 1 ml) Knochenklebstoff gefüllt wurde (Abb. 17a-b).

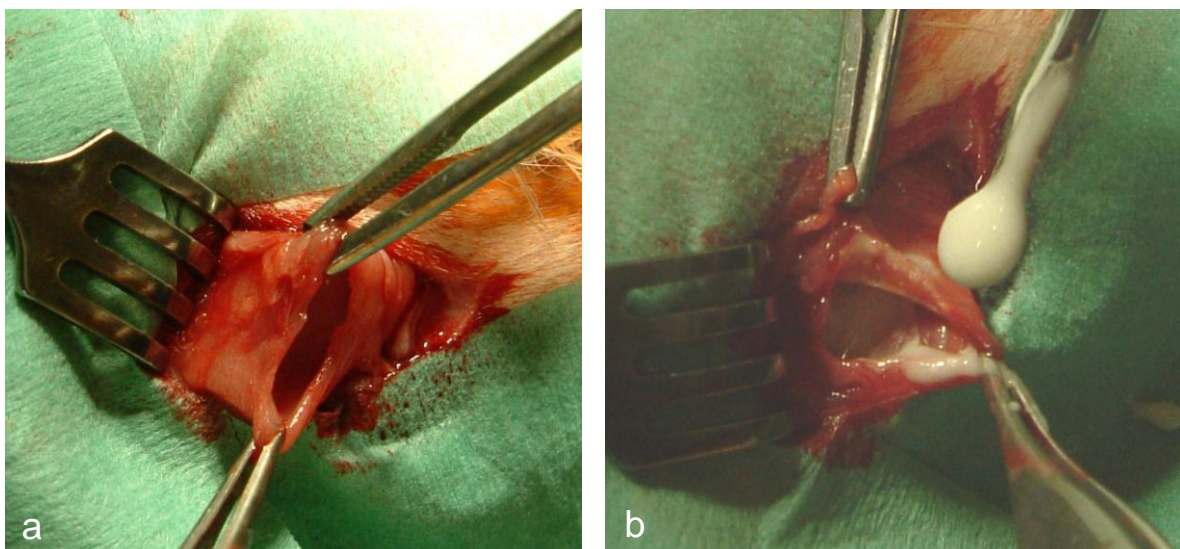


Abb. 17a-b

(a) Präparation einer rechtsparavertebralen, muskulären Rückentasche. (b) Applikation des Knochenklebstoffes in die präparierte Rückentasche.

Nach Aushärtung des Klebstoffes in der Muskeltasche (ca. 60 Sekunden) erfolgte ein schichtweiser Wundverschluss einschließlich Hautnaht durch Vicryl- und Prolene-Nähte. Zusätzlich wurde die Operationswunde mit Nobecutan-Spray[®] verschlossen.

3.4.3 Postoperative Überwachung

Die Kaninchen wurden bis zum Wiedererlangen des vollen Bewusstseins in eine Aufwachbox gebracht, in der mit Hilfe von Infrarotlampen eine warme und ruhige Umgebung geschaffen wurde. Direkt nach dem operativen Eingriff sowie am 1. und 2. postoperativen Tag erhielten die Tiere 4,0 mg/kg Caprofen (Fa. Pfizer, Karlsruhe) gegen Schmerzen sowie 0,5-1,0 ml/Tier Borgal (Fa. Intervet, Unterschleißheim) zur Infektionsprophylaxe subkutan verabreicht. Anschließend erfolgte eine Überführung der Tiere in ihre Ställe, wo sie mit Trockenfutter und Wasser ad libitum ernährt wurden. Eine Vollbelastung der operierten Extremität konnte direkt postoperativ durchgeführt werden. Während des gesamten Beobachtungszeitraums wurden die Tiere von veterinärmedizinischer Seite betreut und überwacht. Neben einer täglichen Beobachtung und Dokumentation des Verhaltens und des körperlichen Zustandes der Tiere wurde der Heilungsverlauf der Operationswunde, die Bewegungsaktivität und der Bewegungsablauf sowie die Futterraufnahme und das Körpergewicht täglich kontrolliert und registriert.

3.5 Euthanasie

Nach 10 Tagen, 21 Tagen, 3 Monaten und 1 Jahr wurden die Tiere schmerzlos, unter Vorliegen der oben beschriebenen Narkose, durch eine intrakardiale Injektion von 2,5 – 3,0 ml T61[®] (Fa. Aventis, Frankfurt) euthanasiert und die Femora, die Tibiae sowie die muskulären Rückentaschen mit dem Knochenklebstoff und angrenzendem Gewebe entnommen.

Direkt nach der Entnahme erfolgte eine gründliche Freipräparation der entnommenen Femora und Tibiae, d. h. Weichteil- und Bänderreste wurden entfernt. Während die Femora und die Rückentaschen zur Fixierung in 4%iger Formalinlösung konserviert der weiteren Bearbeitung zur Herstellung entsprechender Histologien zugeführt

wurden, wurden die Tibiae zum Zwecke biomechanischer Untersuchungen unfixiert und vakuumverschlossen tiefgefroren. Zusätzlich wurden bei jedem Kaninchen der verschiedenen Versuchsdauern prä mortem Blutentnahmen zur Bestimmung des Klebstoffgehaltes, der Leber- und Nierenwerte durchgeführt sowie zur toxikologischen Auswertung post mortem Teile der Leber und die Nieren entnommen.

3.5.1 Perfusion

Die Perfusion der Versuchstiere ermöglichte eine sofortige Fixierung des Knochengewebes, die eine Voraussetzung für die Herstellung qualitativ hochwertiger Histologien u. a. für transmissionselektronenmikroskopische Untersuchungen darstellt.

Die Perfusionen der Kaninchen erfolgten in Narkose (siehe Kap. 3.4.1), dabei wurde dasselbe Narkoseprotokoll wie für die übrigen Tiere verwendet. Nach einer Laparotomie des Abdomens und Verlagerung des Darms auf die Seite wurde das Retroperitoneum eröffnet und die Aorta abdominalis sowie die Vena cava inferior dargestellt.

Zur Fixierung wurde die Aorta abdominalis vorsichtig mobilisiert, so dass proximal und distal eine Ligatur angelegt werden konnte, die proximale der beiden Ligaturen wurde zugezogen. Auf gleiche Weise wurde mit der Vena cava inferior verfahren (Abb. 18).

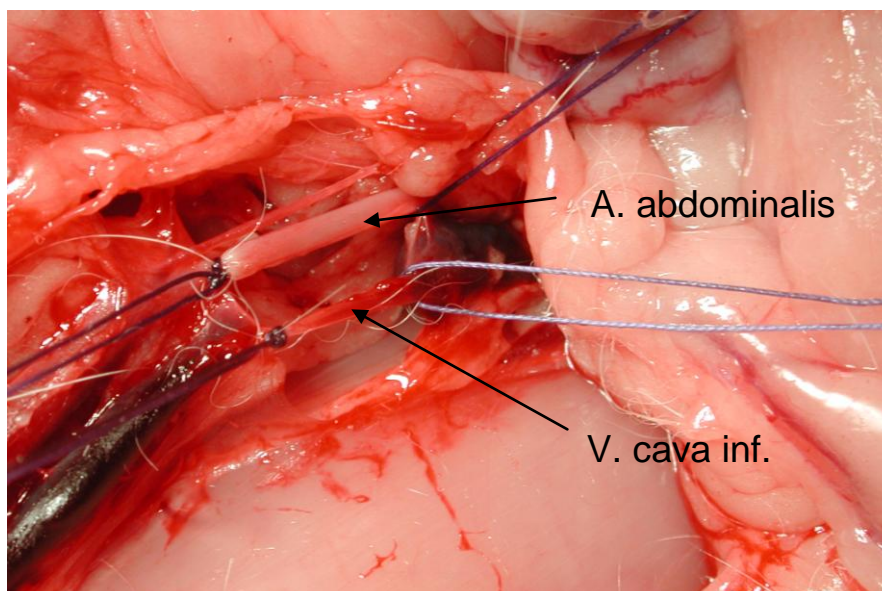


Abb. 18 Darstellung der Aorta abdominalis und Vena cava inferior mit den angelegten proximalen und distalen Ligaturen für die Perfusion.

Als nächstes folgte die Eröffnung der Aorta zwischen den beiden Ligaturen und das Einführen eines dünnen Katheters bis in die A. iliaca externa der hinteren, operierten Extremität, um diese zu perfundieren. Nach Einbringen des Katheters in Strömungsrichtung wurde seine intraarterielle Lage durch das Zuziehen der distalen Ligatur (über dem Katheter) gesichert. Ein weiterer Katheter wurde in die Vena cava inferior eingebracht und nach dem Vorschieben wurde auch dieser durch das Zuziehen der distalen Ligatur in seiner Lage gesichert.

Im nächsten Schritt erfolgte die Spülung der betreffenden Extremität über den intraarteriell liegenden Katheter mit 500 ml NaCl-Lösung, wobei die aus dem venös liegenden Katheter austretende Flüssigkeit in einer Nierenschale aufgefangen wurde. Anschließend folgte die Perfusion der operierten Extremität mit 4%iger PFA-Lösung (Fixierlösung), wobei die Tiere vor der Applikation des Fixierungsmediums schmerzlos durch eine intrakardiale Injektion von 2,5 – 3,0 ml T61[®] getötet wurden. Nach dem Eintritt der Gewebefixierung wurde die Extremität abgesetzt und freipräpariert sowie die Rückentasche entnommen, in 4%iger Formalinlösung eingelegt und der weiteren Bearbeitung zur Herstellung histologischer Schnitte zugeführt. Eine Entnahme der Leber und Nieren erfolgte hierbei nicht.

3.6 Histologische Untersuchungen

3.6.1 Herstellung der Technovit 7200 Schliffe

Die Herstellung der Technovit 7200 Schliffe erfolgte mit einer Trenn-Dünnschlifftechnik, welche zur Herstellung von bis 10 µm dünnen Schliffen von nicht schneidbaren Geweben, wie z.B. Knochen, von DONATH und BREUNER (1981) für die histologische Diagnostik entwickelt wurde. Die Probenaufbereitung sowie die Herstellung und Auswertung der Dünnschliffe erfolgte im Laboratorium für experimentelle Unfallchirurgie der Klinik und Poliklinik für Unfallchirurgie des Universitätsklinikums Giessen-Marburg (Standort Giessen).

Die in 4%iger Formalinlösung vorfixierten Femurkondylen wurden nach dem Transport ins Labor zunächst mit einer Eingangsnummer versehen und nach einer Spülung in 0,1M Natrium-Phosphat-Puffer mit dem Trennschleifsystem Typ 300 auf die

entsprechende Größe zugesägt. Dabei wurden aus den nichtperfundierten Femora drei und aus den perfundierten Femora vier Scheiben angefertigt (Abb. 19-20).

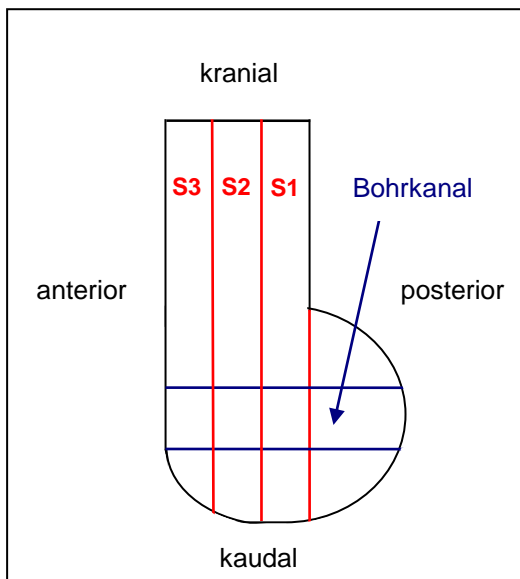


Abb. 19 Darstellung der Schnittebenen (Femurkondyle, Ansicht von der Seite).

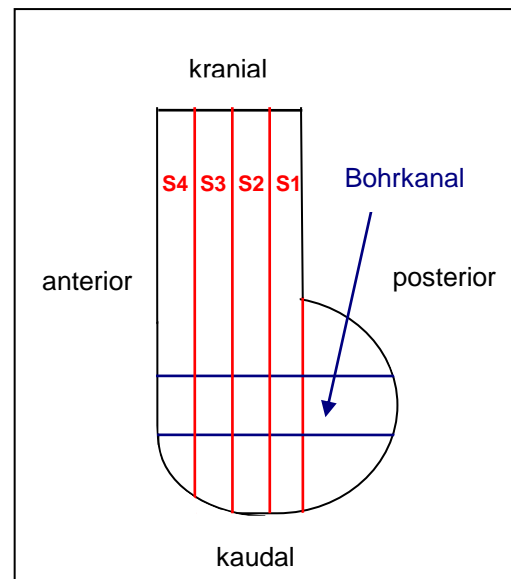


Abb. 20 Darstellung der Schnitt Ebenen (Femurkondyle (perfundiert), Ansicht von der Seite).

Für die Technovit 7200 Einbettungen wurden hierbei jeweils die anteriore (ventrale) und posteriore (dorsale) Scheibe (S3 und S1 bzw. S4 und S1) der Femurkondylen verwendet. Die übrigen Scheiben dienten der Herstellung von Paraffinschnitten und Technovit 9100 Schliffen. Die angefertigten Knochenscheiben sollten eine Dicke von 3 mm besitzen, da nur so eine gute Fixation erreicht werden konnte (Abb. 21).

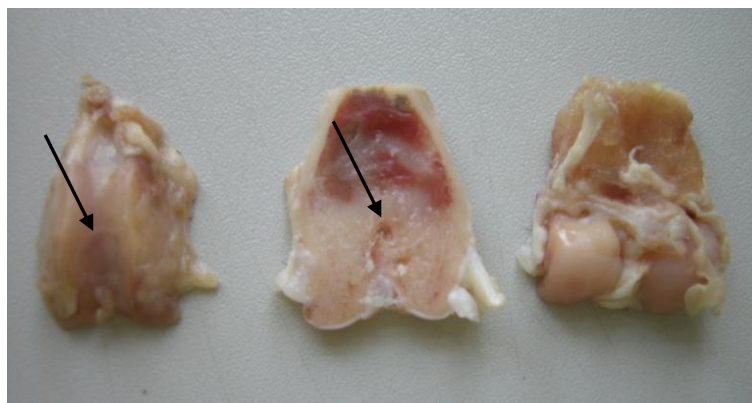


Abb. 21 Darstellung der angefertigten Knochenscheiben, von links nach rechts: ventrale Scheibe, mittlere Scheibe und dorsale Scheibe. Implantierter Zylinder (→), bei der dorsalen Scheibe aufgrund von Weichteilgewebe nicht sichtbar.

Die Proben wurden zusammen mit der Eingangsnummer in eine weiße Plastikkapsel hineingelegt und konnten dann entwässert werden. Größere Knochenstücke wurden in Verbandmull eingewickelt und der Entwässerung zugeführt. Die Entwässerung erfolgte zunächst mit einer aufsteigenden Alkoholreihe (70%, 80%, 96%, 100%, 100%, 100%), wobei die Entwässerungszeiten in den einzelnen Stufen in direkter Abhängigkeit zur Knochenscheibendicke standen und zwischen 24-48 Stunden bei den 3 mm dicken Scheiben betragen. Knochenscheiben von mehr als 3 mm Dicke benötigten bis zu 72 Stunden. Nach dieser manuellen Entwässerung erfolgte zur Optimierung der Ergebnisse die Bearbeitung der Scheiben im Entwässerungs- und Infiltrationsgerät der Fa. Exakt (Norderstedt). Hierbei handelte es sich um ein Gerät bestehend aus sechs lichtundurchlässigen Aluminiumbehältern, in denen in sechs Stufen unter Agitation eine optimale Entwässerung und Infiltration der Proben mit dem lichthärtenden Kunststoff Technovit 7200[®] (Kulzer, Freidrichsdorf) erreicht wurde. Dabei verweilten die Proben für einen Tag in der ersten Infiltrationsstufe bestehend aus einem Gemisch aus 30% Technovit-70% Alkohol und wurden danach nochmals für jeweils 1 Tag in die zweite und dritte Infiltrationsstufe (50% Technovit-50% Alkohol bzw. 30% Technovit-70% Alkohol) überführt. Die nachfolgenden drei Infiltrationsstufen erfolgten in reinem Technovit (100%) unter Zugabe eines Beschleunigers. Die Einwirkzeiten der Knochenproben in den einzelnen Behältern betragen jeweils 5 Tage.

Als nächstes erfolgte die Einbettung und Polymerisation der kunststoffinfiltrierten Knochenscheiben. Dazu wurden diese in vorgefertigte Einbettmulden gelegt und dort mit Technovit 7230[®] (Fa. Kulzer, Freidrichsdorf), einem speziellem Fixierklebstoff, am Boden der Mulde fixiert. Im Anschluss erfolgten das Auffüllen der Mulden mit dem Einbett-Kunststoff sowie die Polymerisation unter dem Kulzer-Exakt Lichtpolymerisationsgerät. Nach einer Polymerisationsdauer von etwa 8-14 Stunden (je nach Probendicke), erfolgte die Endpolymerisierung im Wärmeschrank bei ca. 40-50°C. Nach einer Abkühlphase über Nacht konnten die in Kunststoff eingebetteten Knochenscheiben, die nun die Form eines Blockes besaßen, aus den Mulden gedrückt werden. Dieser Kunststoffblock musste nun so angeschliffen werden, dass die histologisch zu untersuchende Fläche an die Oberfläche gebracht wurde. Dazu wurde der Block zunächst mit der nicht zu untersuchenden Seite nach Aufbringen von Technovit 4000[®] (Fa. Kulzer, Friedrichsdorf) in einer Vakuumklebevorrichtung auf ei-

nen Plexiglas-Objektträger geklebt. Der so vorbereitete Präparationsblock konnte dann dem Mikroschleifsystem zugeführt werden.

Mit dem Exakt-Mikroschleifsystem wurde der Block solange planparallel abgeschliffen, bis alle gewünschten Knochenabschnitte an der Oberfläche sichtbar waren. Eine Überprüfung der Planparallelität wurde durch eine Mehrpunktdickenmessung erreicht. Anschließend erfolgte eine Polierung der Fläche mit Sandpapier der Körnung K 1200-4000, um eine möglichst glatte Oberfläche zu erhalten. Vor der weiteren Bearbeitung des Kunststoffblocks mit aufgeklebtem Objektträger im Exakt-Mikroschleifsystem musste dessen absolute Dicke im Protokoll festgehalten werden. Um den Kunststoffblock dem Exakt-Trennschleifsystem zuführen zu können, musste dieser zunächst mit einem zweiten, planparallelen, silicoupbeschichteten Objektträger verklebt werden, so dass eine Art „Sandwich“ entstand.

Vor der Klebung wurde die Objektträgerdicke im Protokoll festgehalten und die Klebeflächen mit organischem Lösungsmittel gereinigt. Nach dem Aufbringen eines lichthärtenden Photopräzisionsklebstoffes auf der zu untersuchenden Seite des Kunststoffblockes, wurde unter Sichtkontrolle in der Exakt-Präzisionsklebepresse der Objektträger gegen die zu untersuchende Seite des Kunststoffblockes gepresst. Nach einer Photo-Polymerisationszeit von 8-10 min. unter Blaulicht konnte das fertige „Sandwich“ entnommen werden. Vor der Herstellung des Trennschliffes wurde aus der Differenz der „Sandwich“-dicke weniger den Werten der absoluten Dicke des Kunststoffblockes und des silicoupbeschichteten Objektträgers die Klebstoffdicke bestimmt. Zur Herstellung eines Trennschnittes wurde der Block in die vorgesehene Halterung eingebracht und nach Einstellung der gewünschten Schnittdicke des Präparates (ca. 200 μm) wurde der Schnitt mit dem silicoupbeschichteten Objektträger von dem übrigen Block getrennt.

Die Herstellung des endgültigen Dünnschliffpräparates erfolgte anschließend mit dem Mikroschleifsystem. Dazu wurde zunächst die exakte Schnittdicke errechnet (Gesamtdicke des zu schleifenden Präparates abzüglich der Objektträger- und Klebstoffstärke). Anschließend wurde der Objektträger in die vorgesehene Vakuumhalterung des Mikroschleifsystems eingebracht und an der Mikrometerschraube der Nullpunkt eingestellt. Im nächsten Schritt wurde an der Mikrometerschraube die ge-

wünschte abzuschleifende Dicke eingestellt und der Schleifvorgang gestartet. Um auf eine Enddicke von 20-30 µm der Schnitte zu gelangen, entsprach der auf der Mikrometerschraube einzustellende Betrag demnach der Differenz der exakten Schnittdicke des Trennschnittes minus der gewünschten Enddicke des Schnittes. Im letzten Schritt erfolgte das Polieren des Schliffes mit sehr feinem Schleifpapier (Körnung K 1200-4000, Fa. Diaplus, Walter Messner GmbH, Oststeinbrück). Insgesamt wurden aus jedem Knochenblock jeweils zwei Dünnschliffe angefertigt, von denen anschließend einer mit Toluidinblau und einer mit H.E. gefärbt wurde.

Toluidinblau-Färbung:

Nach einer 10-minütigen Behandlung des Dünnschliffes mit 10%iger H₂O₂-Lösung wurde dieser nach gutem Abspülen mit Leitungswasser mit 1 Tropfen Toluidinblaulösung gefärbt und nach einer 15-minütigen Einwirkzeit erneut mit Leitungswasser gut abgespült. Zum Schluss erfolgte nach dem Trocknen des Schliffes die Eindeckung mit Technovit 7200 ohne den Polymerisationsbeschleuniger BPO (Dibenzoylperoxid).

Färbeergebnis: Mineralisierte Hartgewebematrix: ungefärbt bis blassblau; Zellen und Weichgewebe: blau; Knorpelmatrix: metachromatisch bis rotviolett; verkalkte Knorpelmatrix: dunkelblau.

H.E.-Färbung:

Auch hier wurde der Dünnschliff 10 min. mit 10%iger H₂O₂-Lösung vorbehandelt und gut abgespült. Anschließend erfolgte für 5-10 min. die Färbung mit Hämatoxylin- oder Hämalaunlösung. Im nächsten Schritt wurde der Schliff für 10 min. in Leitungswasser gebläut, bevor dann die Färbung mit Eosin (Einwirkzeit: 1 min.) folgte. Nach erneutem Abspülen in Leitungswasser und Trocknen des Schliffes erfolgte wie bei der Toluidinfärbung die Eindeckung.

Färbeergebnis: In dieser Färbung werden saure Moleküle im Schnitt durch das Hämatoxylin dargestellt, so dass die Kerne, aber auch saure Schleimsubstanzen, Bakterien, Knorpel oder Kalk blau erscheinen. Basische Strukturen wie das Zytoplasma der Zellen (Knochengewebe, Muskelzellen), Kollagen und proteinhaltige Lösungen werden durch das Eosin nuanciert rot angefärbt.

3.6.2 Herstellung der Paraffinschnitte

Für die Herstellung der Paraffinschnitte wurden die aus den vorfixierten Knochenproben angefertigten mittleren Scheiben der nichtperfundierten Femora (S2) sowie die dritte Scheibe der perfundierten Femora (S3) verwendet. Im ersten Schritt erfolgte die Entkalkung der Proben in EDTA-Lösung für 6 Wochen, mit zweiwöchigem Wechsel der Lösung. Anschließend wurden die Proben gut unter Leitungswasser gespült und zur Entwässerung der aufsteigenden Alkoholreihe (70%, 80%, 96%, 100%, 100%) zugeführt, wobei die Entwässerungszeiten in den einzelnen Stufen zwischen 1 und 2 Stunden betragen.

Nach einer weiteren Verweilzeit der Scheiben in Xylol (2 x 30 min.) erfolgte die Überführung in paraffingefüllte Einbettkassetten (Fa. Shannon, Frankfurt a.M.). Bei -20°C im Gefrierschrank wurde das Paraffin dann zum Erstarren gebracht. Im Anschluss erfolgte die Herstellung der 4-5 µm dicken Paraffinschnitte mit einem Rotationsmikrotom (Leica RM 2155, Fa. Leica, Bensheim). Das Einbringen der Schnitte in ein Wasserbad diente der Streckung der Paraffinschnitte, wodurch das Aufbringen auf einen Objektträger erleichtert wurde. Nach einer Lagerung dieser bei 40°C im Wärmeschrank erfolgte die H.E.-Färbung.

Dabei wurden die fertigen Paraffinschnitte als erstes in Xylol (für 2 x 5 min.) entparaffiniert, bevor sie im nächsten Schritt der absteigenden Alkoholreihe (100%, 96%, 70%) zugeführt wurden. Diesen zwei Schritten folgte nach gründlichem Abspülen, ähnlich wie bei den Dünnschliffen, eine 5-10-minütige Färbung mit Hämatoxylin- oder Hämalaunlösung, das Bläuen der Schnitte in Leitungswasser (10 min.) sowie die Färbung mit Eosin (Einwirkzeit: 1 min.). Nach erneutem Abspülen in Leitungswasser durchliefen die Schnitte zunächst noch eine aufsteigende Alkoholreihe (70%, 96%, 100%) und wurden erneut in Xylol gebracht, bevor sie mit DePeX (einem Xylol-Dibutylphthalat-Einbettmedium) eingedeckt wurden.

3.6.3 Herstellung der Technovit 9100-Schliffe

Für die Herstellung der Technovit 9100-Schliffe wurden die vorfixierten Rückenmuskulaturproben verwendet. Nachdem die Proben im ersten Schnitt nach gründlicher Spülung mit 0,1 M Na-Ph-Puffer in einer aufsteigenden Alkoholreihe (jeweils 1 x 1

Stunde in 70%, 80%, 96%, 98%, 99,6% vergällt, 99,6% vergällt, 100%) entwässert wurden und im Anschluss daran 2 x 1 Stunde in Xylol verblieben, folgte die Präinfiltration der Präparate. Diese beinhaltete folgende drei Schritte: Die Einbettung in

1. ein Technovit 9100/Xylol-Gemisch im Verhältnis 1:1 für 1 h
2. stabilisiertem Technovit 9100 mit Härter für 2 h
3. entstabilisiertem Technovit 9100 mit Härter für 2 Tage bei 4°C im Kühlschrank

Die sich anschließende Infiltration der Präparate erfolgte mit entstabilisiertem Technovit 9100[®] NEU (Fa. Kulzer, Friedrichsdorf), PMMA und Härter ebenfalls bei 4°C im Kühlschrank für 2 Tage. Die infiltrierten Präparate wurden im nächsten Schritt in die dafür vorgesehenen Einbettmatrizen gebracht und mit einem Technovit 9100-Polymerisationsgemisch unter luftdichtem Verschluss durch einen Parafilm bedeckt. Die Aushärtung des Polymerisationsgemisches fand bei 4°C im Gefrierschrank für 2 Tage statt. Aus den auspolymerisierten Blöcken wurden nach langsamer Abkühlung mit einem Rotationsmikrotom (Leica RM 2155, Fa. Leica, Nussloch) 4 µm dicke Schnitte angefertigt. Dabei wurde der Block vor dem Schneiden mit 30%igen Alkohol angefeuchtet. Das folgende Einbringen der Schnitte in eine 50%ige Alkohollösung führte zu deren Streckung, so dass das Aufbringen auf einen Objektträger ermöglicht wurde. Mit einer Polyethylenfolie bedeckt wurden die Schnitte anschließend über Nacht bei 50°C in einer Presse getrocknet.

Die fertigen Technovit 9100-Schnitte wurden mit H.E. und Toluidinblau gefärbt.

H.E.-Färbung:

Vor der eigentlichen Färbung der Schnitte erfolgte das Herauslösen des Einbettmediums mit Methylmethacrylat (MEA I-, und MEA II-Lösung für je 20 min.) mit nachfolgendem Einbringen in Aceton (Aceton I-, Aceton II-Lösung, Aceton und Aqua dest. 1:1 für je 5 min.) sowie anschließendem Spülen in Aqua dest. Im nächsten Schritt wurden analog zu den Paraffinschnitten die H.E.-Färbung sowie die Eindeckelung durchgeführt.

Toluidinblau-Färbung:

Bei der Toluidinblaufärbung entfiel die Vorbehandlung mit MEA und Aceton, so dass die fertigen Schnitte hier direkt mit 1 Tropfen Toluidinblaulösung gefärbt werden konnten. Nach einer 15-minütigen Einwirkzeit und sorgfältigem Abspülen unter Lei-

tungswasser erfolgte nach dem Trocknen des Schliffes die Eindeckelung mit Technovit 7200® ohne den Polymerisationsbeschleuniger BPO (Dibenzoylperoxid).

3.6.4 Lichtmikroskopische Auswertung

Qualitative Auswertung

Die qualitative Auswertung der histologischen Präparate erfolgte mit dem Mikroskop Axioskop 2 plus (Fa. Zeiss, Jena). Die Präparate wurden zunächst anhand von Gesamtübersichten und im Folgenden in den Vergrößerungen 2,5x, 10x, 20x, 40x und 100x ausgewertet. Für die Dokumentation wurden am Photomikroskop Axioplan 2 (Fa. Zeiss, Jena) Übersichtsaufnahmen und Detailaufnahmen (Vergrößerungen: 1,25x, 2,5x, 5x, 10x, 20x, 40x, 100x) mit einer digitalen Kamera (Leica DC 500, Benzheim), die mit einem Computer verbunden war, angefertigt. Die Präparate wurden im Gesamten, aber speziell im Bereich des Implantationsgebietes hinsichtlich folgender Punkte untersucht:

Femur

- Knochenneubildung im Osteotomiespalt, spaltnahen oder spaltfernen Zylinder- bzw. Lagerknochen
- Verteilung, Lage und Menge des Knochenklebstoffes
- Zellulärer Abbau des Knochenklebstoffes
- Beurteilung des Spaltinhaltes
- Lage des Zylinders im Bohrkanal
- Beurteilung der Grenzfläche (Interface) von Knochenklebstoff und Knochen
- Knochenabbau im Bereich des Zylinders und Lagerknochens
- Vorhandensein allgemeiner Entzündungszeichen

Rückenmuskulatur

- Menge, Aussehen und Verteilung des implantierten Knochenklebstoffes
- Zellulärer Abbau des Knochenklebstoffes
- Kontaktfläche (Interface) zwischen Muskel und Knochenklebstoff
- Anzeichen von Muskelfaserregeneration
- Anzeichen von Muskelfaserdegeneration
- Vorhandensein allgemeiner Entzündungszeichen

Quantitative Auswertung

Die histomorphometrische Auswertung der unentkalkten Knochenschliffe diente der quantitativen Erfassung der Knochenneubildungsrate innerhalb des Osteotomie-spaltes. Die Auswertungen wurden mit Hilfe des computerunterstützten Bildanalyse-systems Image ProPlus® (Fa. OptoSys, Darmstadt) erhoben.

Dieses Bildverarbeitungsprogramm verfügt über eine große Anzahl von Mess- und Analysefunktionen, die es u.a. ermöglichen knöcherne Anteile innerhalb des Kno-chenschliffes durch unterschiedliche Anfärbung, Kontrastierung und Helligkeit von nichtknöchernen Strukturen zu diskriminieren und ihre Fläche innerhalb eines vorge-gebenen Bereiches in Form von histomorphometrischen Parametern festzuhalten.

Der Vorteil dieses Systems besteht darin, dass der Bildanalysevorgang voll automati-siert abläuft und untersucherunabhängig ist, was einen erheblichen Zeitgewinn bei gleichzeitig sehr guter Reproduzierbarkeit der Ergebnisse bedeutet. Lediglich die Einstellung des Kontrastes, der Bildschärfe, der Helligkeit und der Anfärbung unter-liegt dem Untersucher, wobei hier durch ein und denselben Untersucher eine Fehler-minimierung erreicht werden kann. Für die histomorphometrischen Auswertungen wurden H.E.-gefärbte Übersichtsaufnahmen der Dünnschliffpräparate mit einem ste-reoskopischen Mikroskops STEMI SV 11® (Fa. Carl Zeiss, Jena) und einer daran an-geschlossenen Videocamera Kappa Typ Dx30 (Fa. OptoSys, Darmstadt) eingelesen und in die Computereinheit des Bildverarbeitungsprogramms Image ProPlus® (Fa. OptoSys, Darmstadt) übertragen und gespeichert. Im Computer selbst erfolgte dann die Digitalisierung der Bilddaten in ein binäres Rot-Weiß-Bild (Abb. 22a-b).

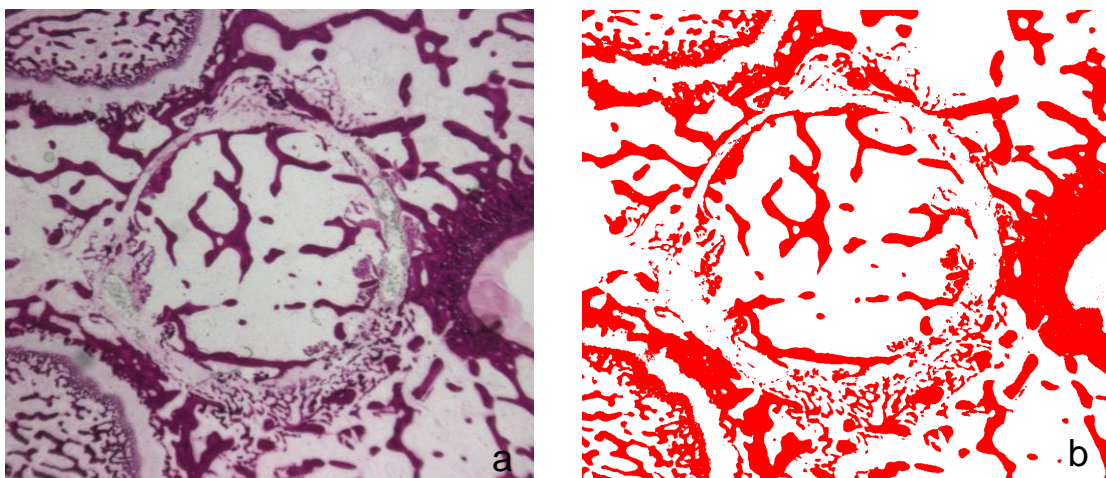


Abb. 22a-b

(a) Eingescannte Übersichtsaufnahme eines Dünnschliffpräparates in H.E.-Färbung. (b) Zustand nach Überführung des Bildes in ein binäres Rot-Weiss-Bild.

Bei der eigentlichen Auswertung wurde zunächst mit Hilfe des Bildbearbeitungsprogramms durch das Aufbringen einer kreisförmigen Figur (Figur 1) auf die Bohrkanalgrenzen des Lagerknochens ein erster Messbereich festgelegt (Abb. 23a).

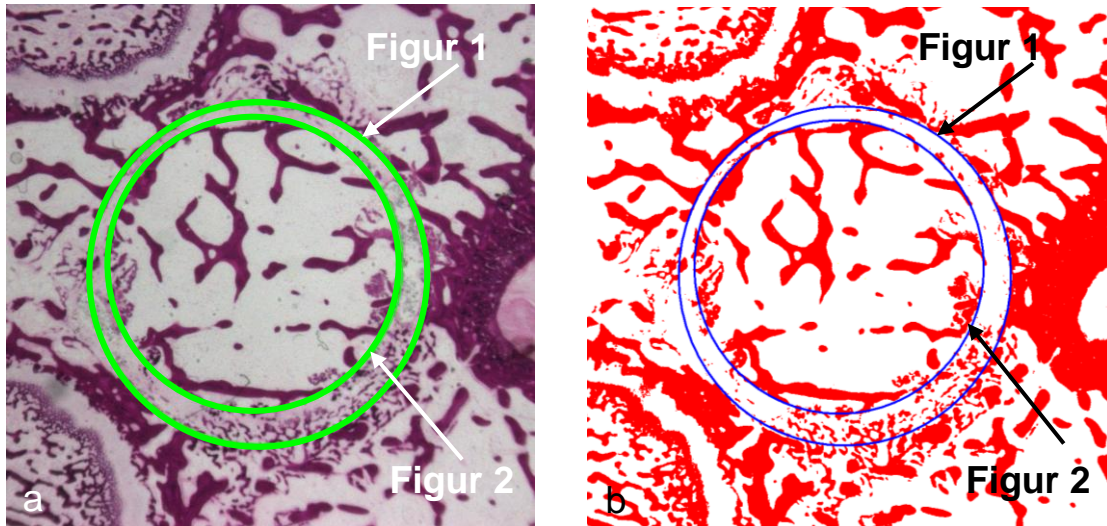


Abb. 23a-b

(a) Festlegung der Messbereiche mit Hilfe der Figuren 1 und 2. (b) Übertragung der festgelegten Figuren auf das Falschfarbbild.

In gleicher Art und Weise wurde ein Kreis um das Implantat gelegt (Figur 2) und damit ein zweiter Messbereich bestimmt (Abb. 23a). Die festgelegten Kreise wurden abgespeichert und anschließend zur Messung der Flächen in einem zweiten Schritt auf die Rot-Weiß-Kopien der Bilder übertragen (Abb. 23b). Die ermittelten Daten wurden anschließend in eine Excel-Tabelle (Microsoft Excel, Microsoft Office 2003) übertragen und mittels der Subtraktion beider Messbereiche die Gesamtfläche des Spaltes bzw. die AOI (=Area of Interest) bestimmt.

Daneben war es mit Hilfe des Image ProPlus[®] Programms möglich, die Fläche des Knochengewebes in den beiden Messbereichen zu bestimmen. Durch eine Subtraktion der Werte ergab sich dann die Fläche des Knochengewebes im Osteotomiespalt, im Weiteren als BS (=Bone Surface) abgekürzt. Die Bestimmung des prozentualen Anteils des Knochengewebes an der Spaltfläche, im folgenden TBS (Trabecular Bone Surface) genannt, erfolgte entsprechend nachfolgender Formel:

$$\text{TBS} = \text{BS} / \text{AOI} * 100 [\%]$$

Zur histomorphometrischen Analyse konnten nicht alle Knochenschliffe herangezogen werden. Bei den 3-Monatstieren konnte keine histomorphometrische Analyse durchgeführt werden, da sich zu diesem Beobachtungszeitpunkt sowohl bei den Klebstoff- als auch Kontrollgruppen aufgrund einer nahezu kompletten knöchernen Durchbauung der Osteotomiespalt nicht mehr eindeutig abgrenzen ließ und somit der Auswertungsbereich nicht exakt festzulegen war. Weiterhin wurden die Präparate der Tier-Nr. 13 und 14 aufgrund starker Entzündungszeichen aus der Messung genommen. Zudem reduzierte sich die Stichprobenzahl der 10-Tages-Klebstoffgruppe um das Präparat der Tier-Nr. 18, welches aufgrund einer Fraktur der lateralen Femurkondyle des Tieres nicht angefertigt werden konnte. Zwei kraniale Dünnschliffe der 21 Tage-Klebstoff- bzw. Kontrollgruppe (Tier-Nr. 43 und 49) sowie zwei kraniale Knochenschliffe der 10-Tages-Kontrollgruppe (Tier-Nr. 37 und 46) erwiesen sich aufgrund einer unzureichenden Schliffqualität als nicht auswertbar. Aufgrund der Unvollständigkeit der kranialen Schliffe wurden diese nicht mit in die Auswertungen einbezogen und die histomorphometrische Analyse an den kaudalen Knochendünnschliffen der Präparate durchgeführt. Mit Ausnahme der o.g. Tiere konnten somit insgesamt 25 kaudale Dünnschliffpräparate der Femurkondyle jedes Tieres für die histomorphometrischen Auswertungen herangezogen werden (Tab. 3).

	Beobachtungstag	Anzahl der Tiere (n)	Anzahl der Schliffe (n)
Klebstoffgruppe	10	7	7
	21	6	6
Kontrollgruppe	10	6	6
	21	6	6

Tab. 3 Anzahl der Femurkondylenpräparate für die histomorphometrischen Analysen.

3.7 Enzymhistochemische Untersuchungen

Bei dieser Methode wurde die Aktivität der tartratresistenten sauren Phosphatase (TRAP) von ein- oder mehrkernigen Makrophagen und Osteoklasten mit Hilfe eines geeigneten Substratgemisches nachgewiesen. Die Zugabe eines Markers, der durch die Reaktionsprodukte farblich umgesetzt wurde, führte dann zur Anfärbung entsprechender Zellen. Als Substratlösung wurde dabei in N-N-Dimethylformamid (DMF) ge-

lösstes Naphthol-AS-TR-Phosphat verwendet, die Zugabe von Echtrotsalz, das an die Reaktionsprodukte bindet, führte zu einer leuchtend roten Anfärbung TRAP-enhaltener Zellen (TRAP-positive Zellen). Das in der Substratlösung enthaltene Na-Tartrat diente der Hemmung von anderen, nicht tartratresistenten sauren Phosphatasen und verhinderte somit ihre Interaktion mit dem Substrat. Für den Nachweis wurden ungefärbte Paraffinschnitte der Femora der Klebstoffgruppen verwendet. Dabei entsprach die Vorgehensweise folgendem Standardprotokoll:

Zum Entparaffinieren wurden die Objektträger mit den Paraffinschnitten für 10 min. in Xylol und anschließend für jeweils 2 x 5 min. in Aceton sowie 2 x 5 min. in Aqua dest. gebracht. Der Entparaffinierung folgte eine 10-minütige Spülung in 0,1M Acetatpuffer und schließlich das Aufbringen der im Folgenden angemischten Substratlösung:

- 35 mg Naphthol-AS-TR-Phosphat
- 125 µl N-N-Dimethylformamid (DMF)
- 57,5 mg Na-Tartrat (Di-Natriumtartrat-Dihydrid)
- 35g Echtholzsalz (Fast Red TR Salt)
- 25 ml 0,1 m Na-Acetatpuffer Ph 5,2

Die mit der Substratlösung benetzten Schnitte wurden bei 37°C für 30 min. in die feuchte Kammer gebracht und anschließend gut in Aqua dest. gespült. Im letzten Schritt erfolgte das Eindeckeln mit Kaisers Glyceringelatine. Ein Teil der Paraffinschnitte wurde zudem vor dem Eindeckeln mit Toluidinblau gegengefärbt. Die gegengefärbten Schnitte erleichterten aufgrund der zusätzlichen Darstellung der umgebenden Strukturen die Orientierung innerhalb des Präparates und wurden daher für fotografische Aufnahmen angefertigt.

3.8 Transelektronenmikroskopische Untersuchungen

Für die Herstellung der transelektronenmikroskopischen Schnitte wurden die aus den vorfixierten Knochenproben angefertigten zweiten Scheiben der perfundierten Femora (S2) verwendet. Im ersten Schritt wurden die Scheiben für ca. 2-3 Stunden in eine 1%ige OsO₄-Lösung gebracht, die Ablagerung des metallischen Osmiums an osmo-

philen Strukturen führte später zu einer besseren Kontrastierung der Schnitte. Als nächstes folgte nach mindestens sechsfacher Spülung der Proben mit 0,1 M Natrium-Phosphat-Puffer die Dehydratation der Proben in einer aufsteigenden Alkoholreihe bis 100%, wobei die Entwässerungszeiten bei 15 min. beginnend bis hin zu 40 min. sowie einer ganzen Nacht in der letzten Stufe betragen. Anschließend wurden die Scheiben nach der Entfettung in Xylol (3 x 30 min.) in das Epoxidharz Epon (Glycidether 100, 2-Dodecenylnsuccinic acid anhydride, Methylnadidic anhydrid, 2,4,6-Tris<dimethylaminomethyl>phenol; Fa. Serva, Heidelberg) eingebettet. Dazu wurden die Proben bei Raumtemperatur nacheinander in folgende Infiltrationsgemische gebracht:

1. Xylol/Epon-Gemisch im Verhältnis 2:1 für 2 h im Exsikkator
2. Xylol/Epon-Gemisch im Verhältnis 1:1 über Nacht im Exsikkator
3. Xylol/Epon-Gemisch im Verhältnis 1:2 über Nacht im Exsikkator
4. reines Epon über Nacht im Exsikkator
5. reines Epon für 4 h in Exsikkator

Zum Ausbetten wurden die Scheiben in kleine Teflonformen gebracht und nach 15 min. bei 48°C, 15 min. im Exsikkator und 3 h bei 48°C zum Auspolymerisieren für 20 Stunden in den Wärmeschrank (60°C) gelegt. Anschließend wurden aus den Blöcken mit dem Ultramikrotom Reichert-Ultracut (Fa. Leica, Wetzlar) 0,5-1 µm dünne Semidünnschnitte angefertigt, die mit Toluidinblau gefärbt wurden. Von den zu untersuchenden Osteotomiezonen konnten ebenfalls mit dem Ultramikrotom, jedoch diesmal mit einem Diamantmesser, Ultradünnschnitte mit einer Dicke von 60-80 nm hergestellt werden. Die Nachkontrastierung erfolgte mit Uranylacetat + Bleicitrat mittels des Ultrastainer (Leica, Wetzlar) im Labor für experimentelle Unfallchirurgie in Gießen. Die nachfolgenden transelektronenmikroskopischen Untersuchungen der Ultradünnschnitte wurden an einem TEM-Gerät EM 109[®] (Fa. Zeiss, Oberkochen) bei 80 kV Beschleunigungsspannung bei unterschiedlicher Vergrößerung durchgeführt.

Die fotografische Dokumentation erfolgte auf Mittelformnegativfilmen mit nachfolgender Erstellung von Papierabzügen. Das Auflösungsvermögen von 0,2-0,3 µm erlaubte es, mit einer Vergrößerung bis zum 1.000.000 fachen bis in den Bereich der

Makromoleküle vorzudringen. Die transelektronenmikroskopischen Bilder (TEM-Bilder) wurden schließlich mit dem Flachbrettscanner (Scan Jet 4c Hewlett Packard) digitalisiert.

3.9 Statistik

Die bei den histomorphometrischen Analysen erhobenen Daten wurden mit dem Statistikprogramm SPSS für Windows 11.5[®] (Fa. SPSS GmbH Software, München) statistisch ausgewertet. Dabei stand die vergleichende Darstellung des Parameters TBS (= total bone surface = Indikator für den Anteil des Knochengewebes im Osteotomiespalt) der Klebstoff- und Kontrollgruppen der beiden Versuchsdauern im Vordergrund. Da keine Normalverteilung für die Zielgröße TBS vorausgesetzt werden konnte, wurde zur Datenauswertung der Mann-Whitney-Rangtest für unabhängige Stichproben getrennt für die 10 Tage- und 21 Tage-Gruppen angewandt.

Als Lageparameter wurde in diesem Fall der Median mit den Spannweiten herangezogen, der aufgrund seiner Robustheit gegen Extremwerte ein genaueres Maß der zentralen Tendenz bietet als der arithmetische Mittelwert. Der Median teilt die Stichproben in anteilmäßig zwei gleich große Teile, d.h. ungefähr 50% der gemessenen Werte sind kleiner bzw. größer als der Median [Bödeker 1999]. Die errechneten Wahrscheinlichkeiten für den Fehler 1. Ordnung (=p-Wert) werden im Ergebnisteil jeweils angegeben.

Der p-Wert gibt an wie groß die „Irrtumswahrscheinlichkeit“ ist. Diese gibt an wie groß die Wahrscheinlichkeit eines Irrtums ist, wenn behauptet wird, dass ein beobachteter Effekt besteht (Alternativhypothese), obwohl in Wirklichkeit kein Effekt vorhanden ist (Nullhypothese). Wenn diese Wahrscheinlichkeit klein ist, so spricht dieses Ergebnis gegen die Nullhypothese und es ist Evidenz für die Richtigkeit der Alternativhypothese vorhanden [Bender 2001].

Vor der Datenerhebung wurde eine maximale Irrtumswahrscheinlichkeit festgelegt (Signifikanzniveau $\alpha=0,05$), die den Fehler 1. Art (=p-Wert), nämlich die Nullhypothese abzulehnen, obwohl sie richtig ist, begrenzt. Ist der p-Wert kleiner als das gewählte Irrtums-(Signifikanz)Niveau α , dann gilt das Ergebnis als statistisch signifikant.

4. Ergebnisse

4.1 Klinische Ergebnisse

Der postoperative Heilungsverlauf der Tiere gestaltete sich im Wesentlichen ohne Komplikationen und die entnommenen Präparate zeigten keine makroskopischen Auffälligkeiten (Abb. 24a). Lediglich ein Tier aus der 12-Monats-Klebstoffgruppe sowie ein weiteres Tier aus der 12-Monats-Kontrollgruppe mussten aufgrund einer zunehmenden Verschlechterung des Allgemeinzustandes vor dem Ende der Studie aus dem Versuch genommen werden. Das zuletzt genannte wurde bei der Auswertung der 3-Monats-Kontrollgruppe miteinbezogen. Weiterhin konnten bei einigen Kaninchen zum Tötungszeitpunkt auffällige Befunde an der operierten Extremität (Abb. 24b) bzw. Rückenpartie erhoben werden, die in Tab. 4 zusammengefasst wurden.

Tier-Nr.	Gruppe	Makroskopische Auffälligkeiten		Weitere Auffälligkeiten
		Knie	Rücken	
2	21 Tg. Klebstoff	Extraartikulär Pus und Hämatom, Wundheilungsstörung	Pus	-
11	10 Tg. Klebstoff	Extraartikulär Pus	Pus	Gewichtsabnahme 697 g, reduzierter Allgemeinzustand
13	21 Tg. Klebstoff	Extra- und intraartikulär Pus, Gelenkerguss, Hämatom	-	Gewichtsabnahme 1284 g, reduzierter Allgemeinzustand
18	10 Tg. Klebstoff	Extraartikulär Pus und Hämatom, Wundheilungsstörung	-	Gewichtsabnahme 508 g
19	10 Tg. Klebstoff	Extraartikulär Pus und Hämatom, Wundheilungsstörung, Gelenkerguss	-	Gewichtsabnahme 674 g
36	10 Tg. Kontrolle	Intraartikulär Pus, Wundheilungsstörung,	Pus	Gewichtsabnahme 751 g
37	10 Tg. Kontrolle	-	Pus	-
40	10 Tg. Kontrolle	Wundheilungsstörung	-	-
45	10 Tg. Klebstoff	Extraartikulär Pus, Wundheilungsstörung,	-	-
46	10 Tg. Kontrolle	Wundheilungsstörung	-	-
48	10 Tg. Kontrolle	Extraartikulär Hämatom	Pus	-
51	10 Tg. Kontrolle	Extraartikulär Pus, Nahtdehiszenz	-	Gewichtsabnahme 920 g

Tab. 4 Makroskopisch auffällige Befunde bei der Euthanasie der Versuchstiere und Probenentnahme.

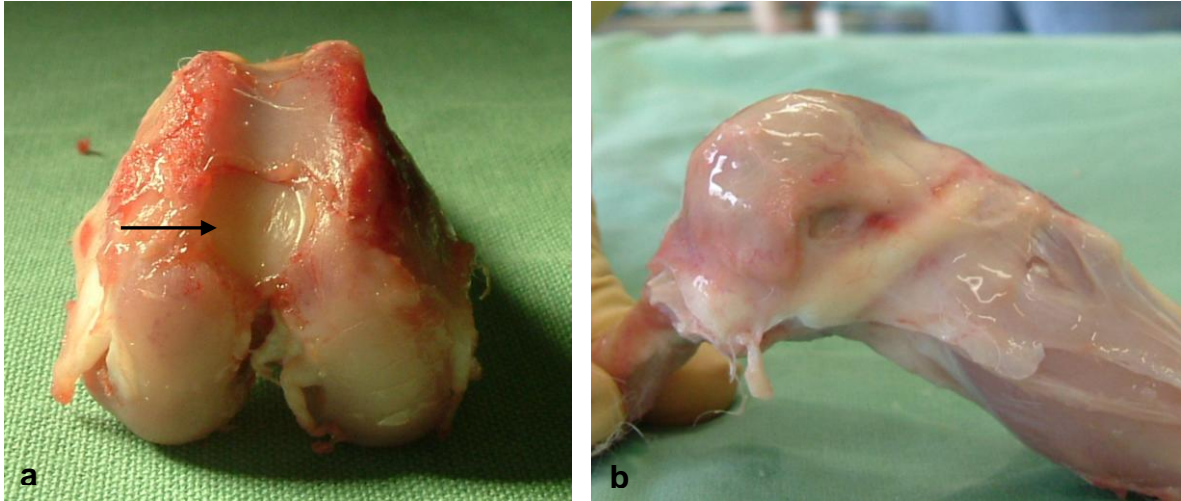


Abb. 24a-b (a) Unauffällige Femurkondyle mit eingewachsenem Knochenzylinder (→). (b) Kniegelenkserguß bei Kaninchen Nr. 19.

Dabei handelte es sich im Wesentlichen um oberflächliche Wundheilungsstörungen, Hämatombildung oder diskrete Pusansammlungen im Bereich des Operationsgebietes sowie Abnahmen des Körpergewichtes.

Die beobachteten Befunde zeigten sich dabei sowohl bei Tieren der Klebstoff- wie auch der Kontrollgruppe und überwiegend nach 10 Tagen Beobachtungsdauer.

Nach Entfernung der Weichteil- und Bänderreste im Bereich des eingesetzten Knochenzylinders konnte dabei jedoch bei keinem dieser Tiere eine pathologische Veränderung im Sinne einer Lockerung des eingesetzten Zylinders oder Knochenarrosion beobachtet werden.

4.2 Lichtmikroskopische Analysen

Die Ergebnisse der lichtmikroskopischen Untersuchungen werden nachfolgend für die Klebstoff- bzw. Kontrollgruppen der jeweiligen Standzeiten (10 Tage, 21 Tage, 3 Monate und 12 Monate) getrennt für Femur und Rückentasche beschrieben und durch Detailaufnahmen einzelner Dünnschliffpräparate fotografisch belegt.

4.2.1 Femurkondyle

10 Tage - Gruppen (Klebstoff/Kontrolle)

In den Übersichten der Präparate der Klebstoffgruppe, waren die in den Bohrdefekt replantierten Knochenzylinder zu erkennen. Dabei konnte nicht bei allen Präparaten eine zentrale Lage des Zylinders im Bohrloch beobachtet werden, so dass z.T. ungleichmäßige Abstände zwischen den Zylindern und dem Lagerknochen des Femurs zu verzeichnen waren. Weiterhin war auf allen Präparaten, die noch nicht geschlossene Epiphysenfuge angeschnitten, die oftmals durch den Zylinder bzw. in seiner Nähe verlief (Abb. 25a).

Innerhalb des Osteotomiespalt war der applizierte Klebstoff an seiner glasigen, gräulich schimmernden, mit kristallartigen Partikeln versetzten Struktur erkennbar (Abb. 25b). Dabei lag dieser größtenteils regelrecht in Form größerer Areale im Bereich des Spaltes. Auf einigen Schliffen konnte jedoch auch eine Verschiebung des Knochenklebstoffes zu den Seiten hin beobachtet werden, die oftmals mit einer Durchmischung des Klebstoffes bzw. einzelner Klebstoffpartikel mit dem Granulationsgewebe verbunden war (Abb. 25a-b). Bei einem Tier war zudem Klebstoff in den durch die Osteotomie eröffneten intratrabekulären Zwischenräumen des Zylinders zu finden.

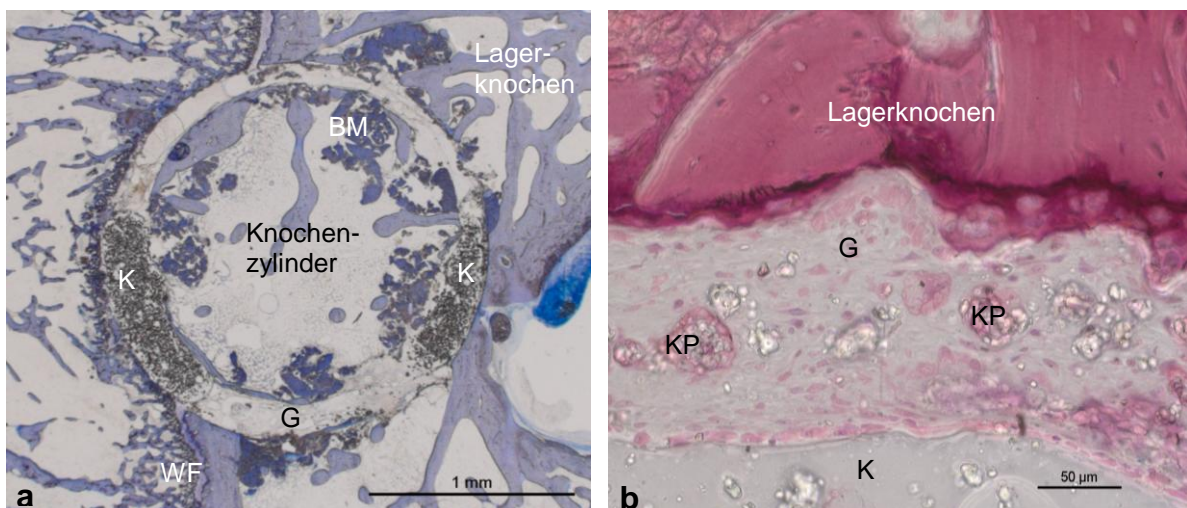


Abb. 25a-b Lichtmikroskopie - Klebstoffgruppe nach 10 Tagen. (a) Übersicht - Knochenzylinder mit Klebstoff (K) und Granulationsgewebe (G) im Osteotomiespalt. Bohrmehl (BM) in intratrabekulären Zwischenräumen des Implantats und Lagerknochens sowie die noch offene, proximal des Zylinders verlaufende Wachstumsfuge (Toluidinblau, 1,25x). (b) Detailaufnahme mit innerhalb des Granulationsgewebes (G) liegendem Klebstoffareal (K), einzelne Klebstoffpartikel (KP), Lagerknochen (L) (H.E., 40x).

Der Grenzbereich (Interface) zwischen Klebstoff und Knochen stellte sich unauffällig dar (Abb. 26). Zelluläre Infiltrationen des Klebstoffes oder ein Abbau durch vielkernige Riesenzellen konnten nicht beobachtet werden.

Der Osteotomiespalt selbst war mit zell- und gefäßreichem Granulationsgewebe, Fibrin, Bohrmehl, Knochensplittern und -fragmenten aufgefüllt, wobei die drei letztgenannten auch in den durch den Bohrvorgang eröffneten Trabekelzwischenräumen des Zylinder- bzw. Lagerknochens zu sehen waren. Vereinzelt fanden sich im Spalt auch aus den eröffneten intratrabekulären Zwischenräumen reingeflossene Fett- und Knochenmarkszellen, in Bereichen, wo die Epiphysenfuge durch den Spalt führte, wurden entsprechend auch Knorpelzellen sichtbar. Makrophagen oder andere Zellen des Phagozytensystems konnten zu diesem Zeitpunkt nur vereinzelt im Osteotomiespalt nachgewiesen werden. Gelegentlich waren geringe Geflechtknochenneubildungen im spaltnahen Lagerknochen und Zylinder zu sehen.

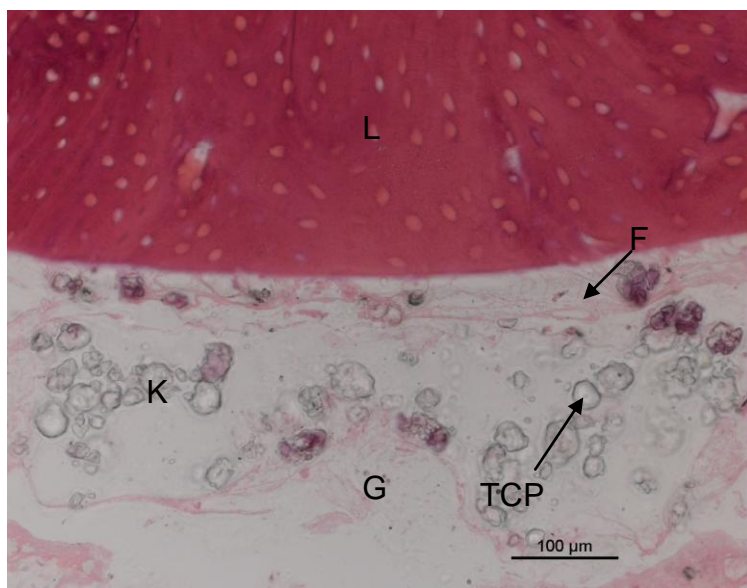


Abb. 26 Lichtmikroskopie - Klebstoffgruppe nach 10 Tagen. Detailaufnahme der Interfaceregion Klebstoff(K)/Lagerknochen(L). Bindegewebiges Granulationsgewebe (G) und Fibrinnetzwerke (F) zwischen Lagerknochen und Klebstoff, Tricalciumphosphat (TCP)-Partikel (H.E., 20x).

Eine deutliche Osteogenese im Spalt fand sich bei einem Tier (Abb. 27a). Dabei kamen sowohl an Klebstoffreste angrenzend als auch klebstofffern neugebildete Knochen trabekel mit perlschnurartigen Osteoblastensäumen zur Darstellung (Abb. 27b). Eine unterschiedlich breite Spaltweite als Grund für die verstärkte Osteogenese konnte hierbei ausgeschlossen werden, da der Knochenzylinder bei diesem Tier exakt im Zentrum des Bohrlochs positioniert worden war.

Eine Knochenresorption konnte nicht nachgewiesen werden. Sowohl das Implantat als auch der Lagerknochen besaßen glatte Osteotomie­ränder und waren vollständig erhalten. Das Knochenmark im Implantat sowie im angrenzenden Lagerknochen erschien vollkommen unauffällig. Bei drei Tieren sah man im Vergleich zu den anderen Tieren der Kleb­er­gruppe ein etwas zellreicheres Granulationsgewebe im Spalt, in dem sich vereinzelt Ansammlungen neutrophiler Granulozyten und Lymphozyten fanden.

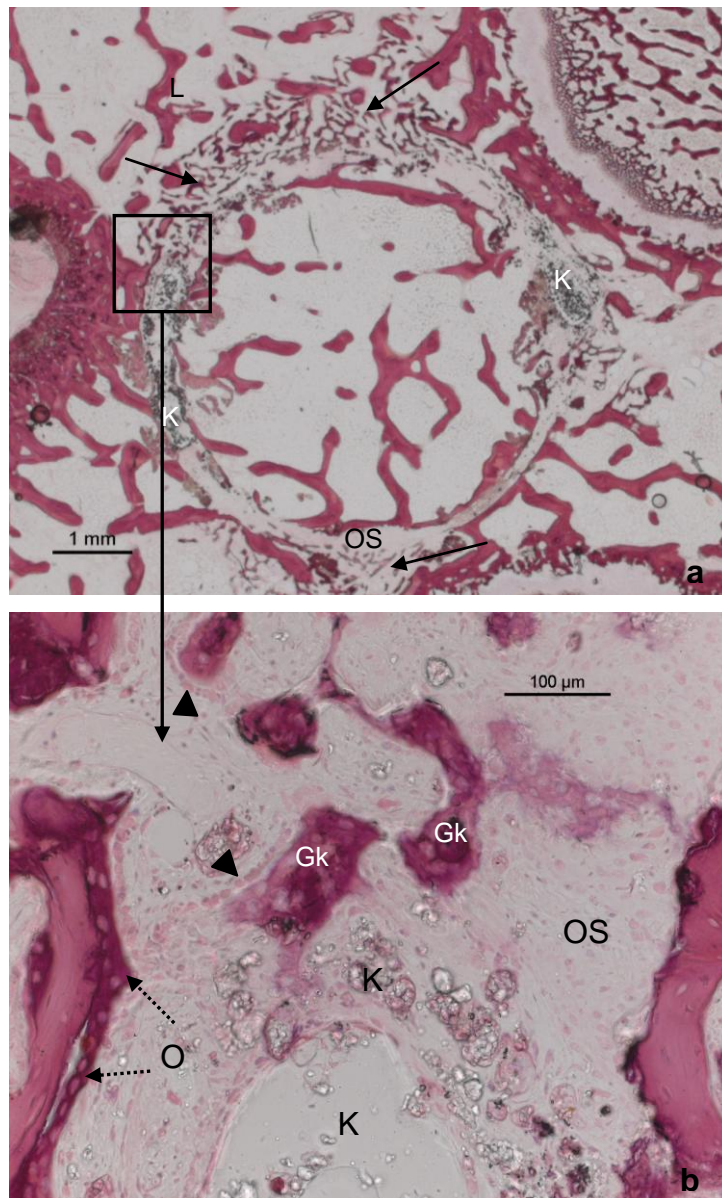


Abb. 27a-b Lichtmikroskopie - Klebstoffgruppe nach 10 Tagen. (a) Übersicht - Osteogenese (→) im Osteotomiespalt (OS) und angrenzendem Lagerknochen (L) (H.E., 1,25x). (b) Detailaufnahme aus Abb. 27a - Geflechtknochen­trabekel (Gk) mit perlschnurartig angeordneten Osteoblasten (▶), Osteoidbildung (O) in direkter Nachbarschaft zum Klebstoff (K) (H.E., 10x).

Bei den Kontrolltieren zeigten sich im Vergleich zur Klebstoffgruppe keine entscheidenden Abweichungen. Vereinzelt konnten neu gebildete Geflechtknochen-trabekel im Osteotomiespalt und angrenzendem Lagerknochen nachgewiesen werden. Dabei zeigte sich das Auftreten der neuen Knochen-trabekel völlig unabhängig von der stellenweise differierenden Spaltbreite. Eine mit dem oben erwähnten Tier der Klebstoffgruppe vergleichbare Knochen-neubildung fand sich bei keinem der Kontrolltiere (Abb. 28a-d).

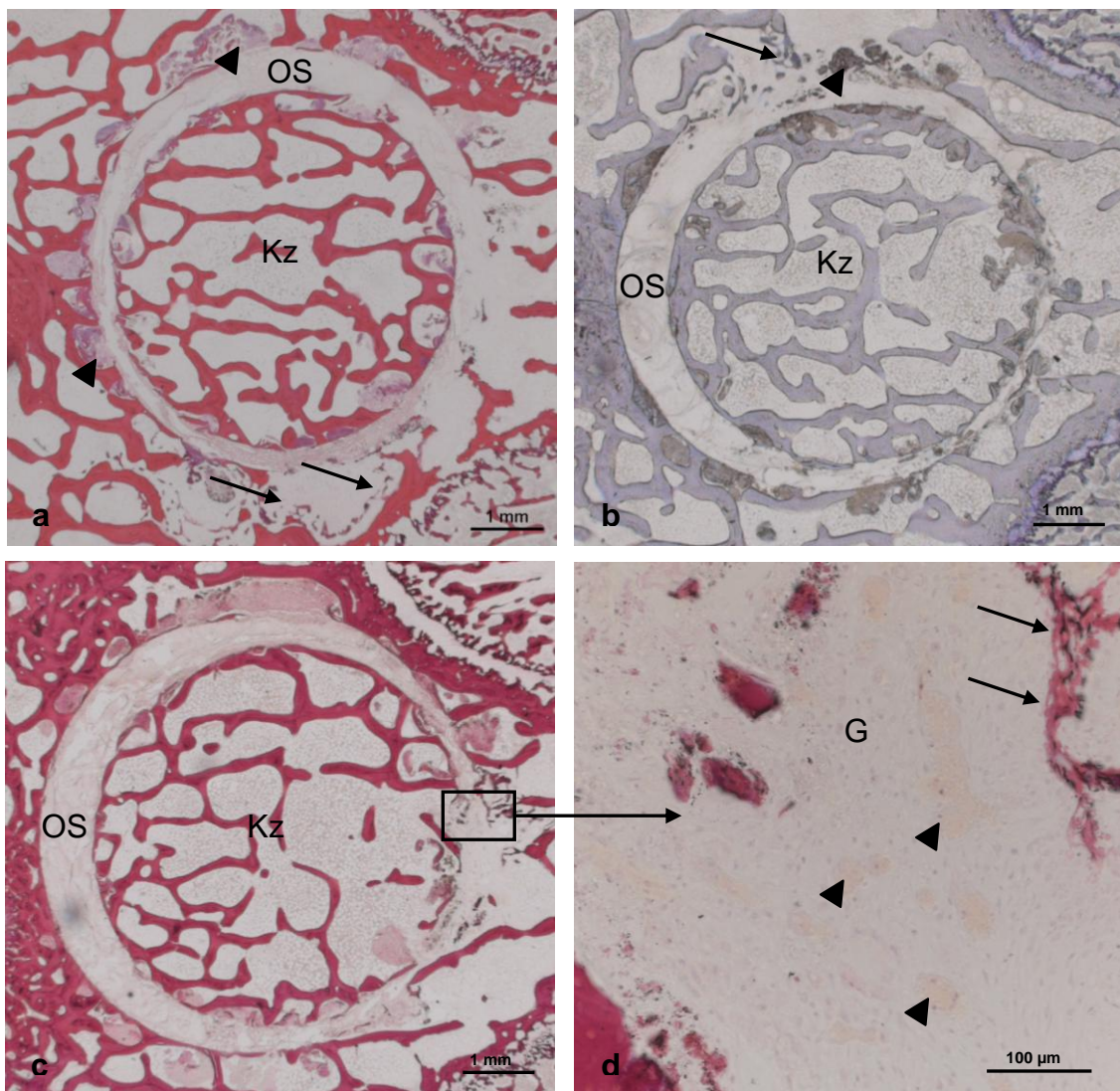


Abb. 28a-d Lichtmikroskopie - Kontrollgruppe nach 10 Tagen. (a)+(b) Übersicht mit Osteotomiespalt (OS) und dem nicht exakt zentrisch positionierten Knochenzylinder (Kz). Geringe Geflechtknochen-bildungen im Lagerknochen (→), Bohrmehl (▶) (H.E., Toluidinblau, 1,25x). (c) Übersicht Knochen-zylinder (Kz) im Osteotomiespalt (OS) (H.E., 1,25x). (d) Detailaufnahme aus Abb. 28c - Osteogenese im Osteotomiespalt (→), Granulationsgewebe (G), Gefäße (▶) (H.E., 20x).

Das Implantat erschien bei allen Tieren vollständig, zeigte jedoch wie auch schon die Klebstoffgruppe nicht immer eine zentrische Lage. Der Inhalt des Spaltes war, abgesehen von dem fehlenden Klebstoff, größtenteils vergleichbar mit dem der Klebstoffgruppe und enthielt neben bindegewebigem, gefäßreichem Granulationsgewebe (Abb. 28d) vereinzelt Knochensplitter und -fragmente, Bohrmehlreste sowie Fibrin als Hinweise auf das vorausgegangene Trauma durch den Bohrvorgang. Eingewanderte mono- oder polynukleäre Phagozyten, welche die Knochensplitter oder das Bohrmehl phagozytierten, konnten auch hier nur vereinzelt beobachtet werden. Anzeichen einer Entzündungsreaktion wurden nicht gesehen.

Zusammenfassend zeigten sich im Hinblick auf die resorptiven Vorgänge und den zellulären Status keine Unterschiede zwischen der Kontroll- und Klebstoffgruppe. Bei beiden Gruppen schienen sich die Resorptionsvorgänge aufgrund der geringen Anzahl an beobachteten Zellen des Phagozytensystems erst in der Anlaufphase zu befinden. Bezüglich der Osteogenese stach bei der Klebstoffgruppe ein Tier heraus, welches eine gesteigerte Geflechtkochenneubildung aufwies, während man bei den übrigen Tieren der Klebstoffgruppe eine der Kontrolle vergleichbare, geringe Osteogenese sah. Weiterhin konnten bei der Klebstoffgruppe im Gegensatz zur Kontrolle bei drei Tieren vereinzelt Ansammlungen neutrophiler Granulozyten und Lymphozyten im Osteotomiespalt beobachtet werden.

21 Tage - Gruppen (Klebstoff/Kontrolle)

Hinsichtlich der Zylinderlage, Klebstoffmenge und -verteilung zeigten die untersuchten Präparate der Klebstoffgruppe vergleichbare Ergebnisse wie die Klebstoffgruppe nach 10 Tagen. Die Epihysenfuge war nach wie vor noch nicht geschlossen und verlief bei den meisten Tieren entweder durch den Zylinder oder in seiner Umgebung. Im Unterschied zur 10-Tagesgruppe, lag der Klebstoff nun nicht mehr völlig reaktionslos im Granulationsgewebe, sondern wurde stellenweise von mehrkernigen Riesenzellen flankiert (Abb. 29b). Weiterhin fanden sich im Vergleich zur 10-Tages-Klebstoffgruppe etwas häufiger mono- und polynukleäre Phagozyten wie z.B. polynukleäre Riesenzellen an Bohrmehlresten und Knochensplittern. Die Kontaktfläche zwischen Knochen und Klebstoff stellte sich weiterhin unauffällig dar (Abb.

29a-b). Stellenweise kam es zu einer Vermischung einzelner Klebstoffpartikel mit dem zwischen Knochenklebstoff und Geflechtknochen liegendem Granulationsgewebe (Abb. 30c). An den frisch gebildeten Geflechtknochen trabekeln waren Osteoblastensäume nachweisbar (Abb. 30b-c).

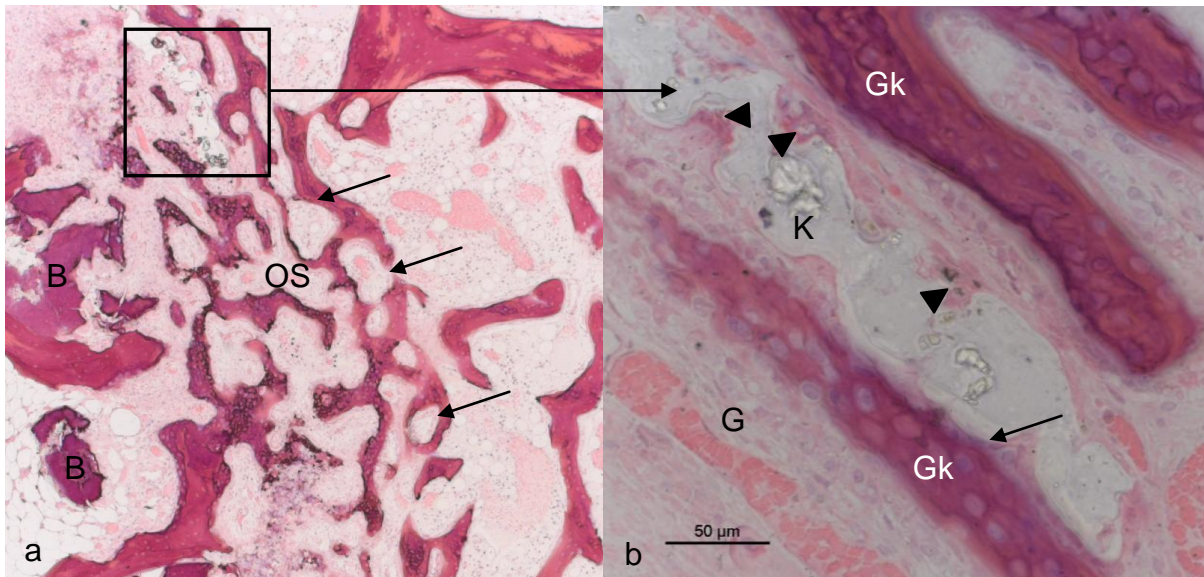


Abb. 29a-b Lichtmikroskopie - Klebstoffgruppe nach 21 Tagen. a) Geflechtknochenbildung (→) im Osteotomiespalt (OS), Bohrmehlreste (B) (H.E., 5x). b) Detailaufnahme eines Klebstoffareals (K) mit mehrkernigen Riesenzellen (▶) zwischen neugebildeten Geflechtknochen trabekeln (Gk) im Granulationsgewebe (G), unauffällige Interfaceregion Knochen/Klebstoff (→) (H.E., 40x).

Die Präparate von drei Tieren zeigten deutliche Geflechtknochenneubildungen im Osteotomiespalt, die sich sowohl klebstofffern als auch direkt an diesen angrenzend fanden (Abb. 30a). Eine komplette Durchbauung des Spaltes sah man jedoch nicht. Wie schon in der 10-Tagesgruppe konnte kein Zusammenhang zwischen der stellenweise differierenden Spaltbreite und dem Auftreten des Geflechtknochens verzeichnet werden.

Ein Umbau des gut mineralisierten Geflechtknochens in Lamellenknochen wurde nicht beobachtet.

Bei zwei weiteren Tieren war die Knochenneubildung geringer ausgeprägt, die restlichen Knochendünnschliffe zeigten nur wenige Anzeichen von einer aktiven Osteogenese. Bereiche im Spalt, die nicht mit Knochenbälkchen durchbaut waren, waren ähnlich der 10-Tagesgruppe mit binde- und gefäßreichem Granulationsgewebe, Knochensplittern, Bohrmehlresten und Fibrin aufgefüllt.

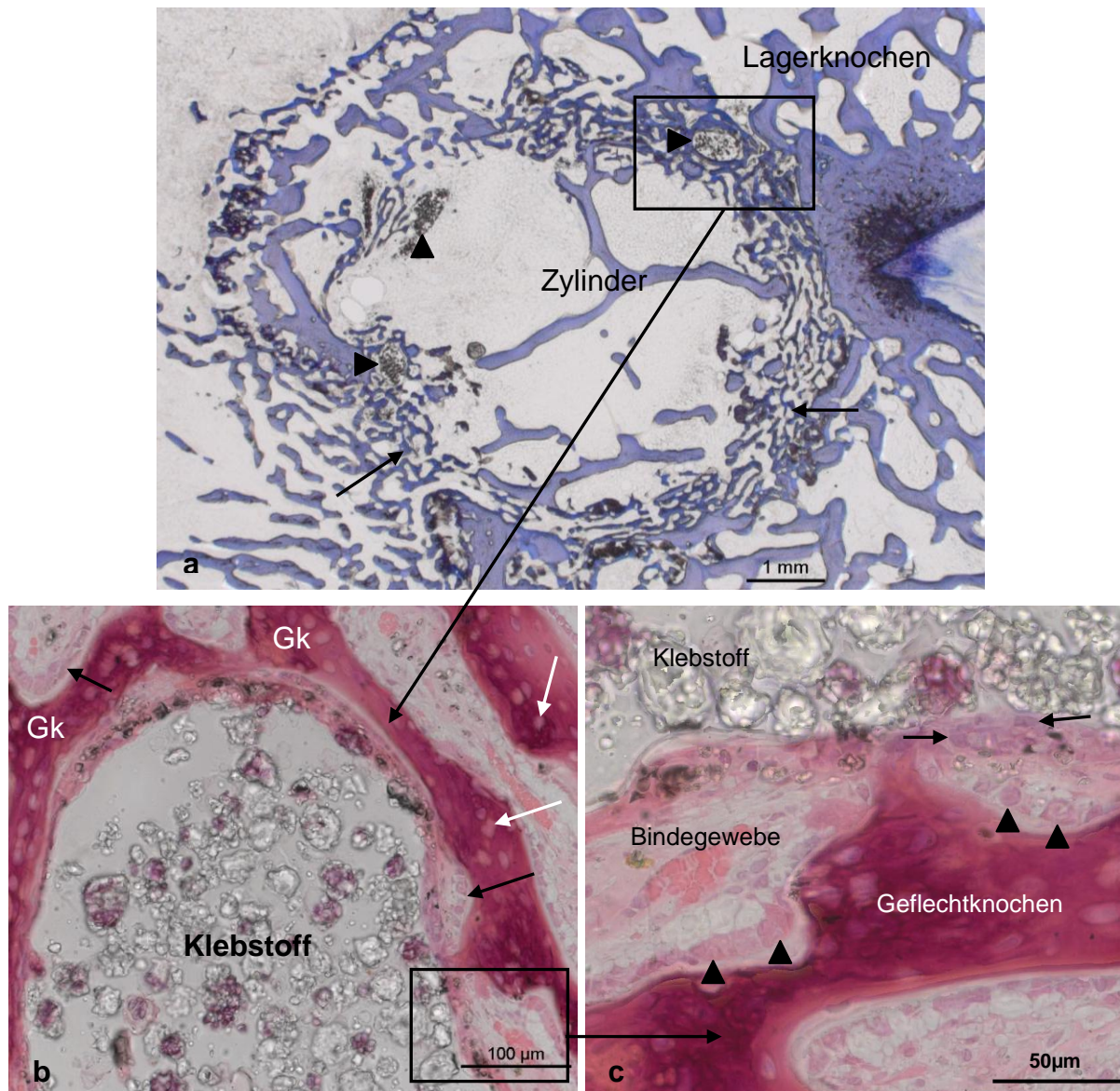


Abb. 30a-c Lichtmikroskopie - Klebstoffgruppe nach 21 Tagen. (a) Übersicht mit intensivem Geflecht-knochenbridging (→) zwischen Lagerknochen und Zylinder sowohl klebstofffern als auch in klebstoff-nahen Bereichen des Osteotomiespaltes, Klebstoff (▶) (Toluidinblau, 1,25x). (b) Detailaufnahme aus Abb. 30a - Klebstoffareal zwischen neu gebildeten Geflechtknochentrabekeln (Gk) mit eingemauerten Osteozyten (weiß→) sowie in Reihe liegenden Osteoblasten (schwarz→) (H.E., 20x). (c) Detailauf-nahme aus Abb. 30b - Klebstoff/Bindegewebe-Interface mit einzelnen Klebstoffpartikeln, welche sich mit dem Granulationsgewebe vermischt haben, Mesenchymzellen (→), Osteoblastensaum (▶) (H.E., 40x).

Bei zwei Tieren war eine starke, sich nach peripher ausbreitende Entzündungsreaktion zu sehen (Abb. 31a). Dabei wurde bei beiden Präparaten vor allem der Lagerknochen abgebaut, wohingegen der Zylinder so gut wie gar nicht betroffen war. In diesen Bereichen zeigte die Knochenoberfläche lakunenartige Vertiefungen

(HOWSHIP Lakunen) in denen vielkernige Osteoklasten nachgewiesen werden konnten (Abb. 31b-c).

Hinweise auf einen Zusammenhang zwischen der entzündlichen Reaktion und dem implantierten Klebstoff, wie z.B. eine Begrenzung der Entzündung auf die Umgebung des Klebstoffs, konnten nicht nachgewiesen werden.

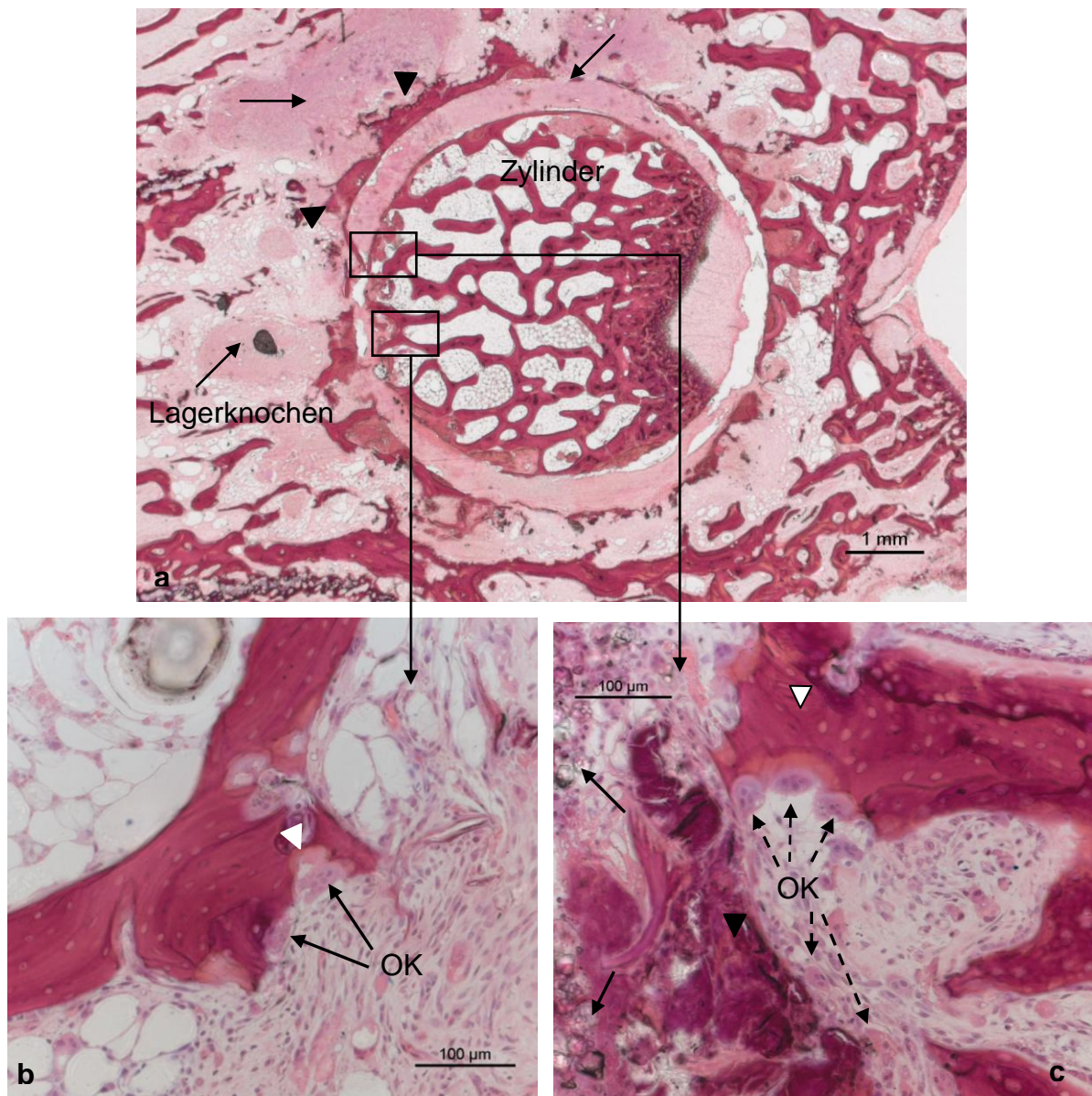


Abb. 31a-c Lichtmikroskopie - Klebstoffgruppe nach 21 Tagen. (a) Übersichtsaufnahmen mit ausgeprägter Entzündungsreaktion im Osteotomiespalt und Lagerknochen (→) sowie Bereiche mit ausgeprägter Knochenresorption (▶) (H.E., 1,25x). (b) Detailaufnahmen im Entzündungsbereich mit zahlreichen in Resorptionslakunen (weiss▶) sitzenden Osteoklasten (OK), welche den Knochen abbauen (H.E., 20x). (c) Detailaufnahme von Osteoklasten (OK) am nekrotischen Knochenmaterial (▶) und vitalem Knochen (weiss▶). Am Bildrand vereinzelte Klebstoffpartikel angeschnitten (→) (H.E., 20x).

Weiterhin wurde bei zwei Tieren der Zylinder in der kaudalen Schnittebene teilweise bzw. bei einem Tier fast vollständig durch vielkernige Osteoklasten abgebaut und mit bindegewebigem Granulationsgewebe aufgefüllt. Dabei befanden sich in direkter Nachbarschaft zu den Resorptionszonen oftmals Bezirke mit den bereits erwähnten Geflechtknochenneubildungen, die z.T. auch auf die Zylinder übergriffen. Bei den übrigen Tieren waren die Zylinder vollständig erhalten und besaßen meist glatte Osteotomieeränder. Im Knochenmark des an den Zylinder grenzenden Knochengewebes wurden vereinzelt Bereiche mit Fettgewebsnekrosen sichtbar, in deren Umgebung mehrkernige Riesenzellen zu sehen waren (Abb. 32a-b).

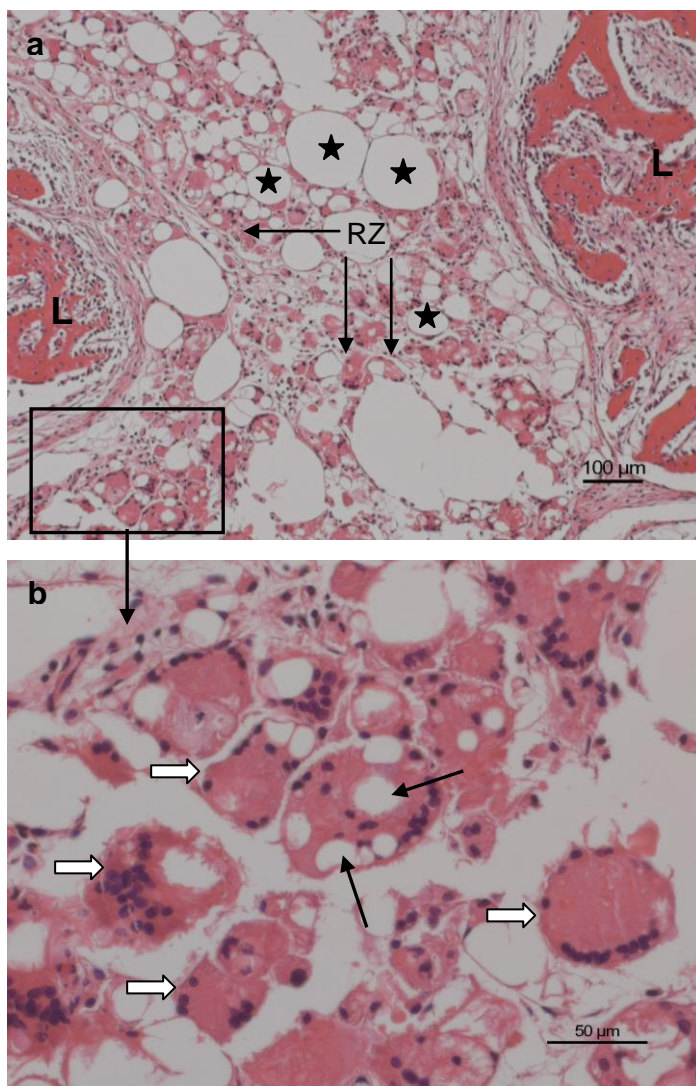


Abb. 32a-b Lichtmikroskopie - Klebstoffgruppe nach 21 Tagen (a) Knochenmarksbereich im defektangrenzenden Lagerknochen (L) mit zahlreichen mehrkernigen Riesenzellen (RZ), die Fettzellen (★) phagozytieren (→) (H.E., 10x). (b) Detailaufnahme aus Abb. 32a – Mehrkernige Riesenzellen (⇨) mit multiplen intrazellulären Vakuoleneinschlüssen (→) im Zytoplasma (H.E., 40x).

In der Kontrollgruppe war in allen Präparaten ebenfalls noch eine offene Wachstumsfuge zu sehen. Mit Ausnahme eines Tieres zeigte sich eine deutliche Osteogenese

innerhalb des Spaltes, bis hin zur seiner fast kompletten Durchbauung. Eine Umwandlung des Geflechtknochens in Lamellenknochen war nicht zu sehen (Abb. 33). Die noch nicht durchbauten Bereiche waren wie bei der Klebstoffgruppe mit gefäßreichem Granulationsgewebe, Fibrin- und Bohrmehlresten sowie einzelnen Knochensplittern durchsetzt. Die Zylinderlage war auch bei dieser Gruppe nicht immer zentrisch, wobei die Spaltweite keinen Einfluss auf die Menge und den Ort der Knochenneubildung zu haben schien.

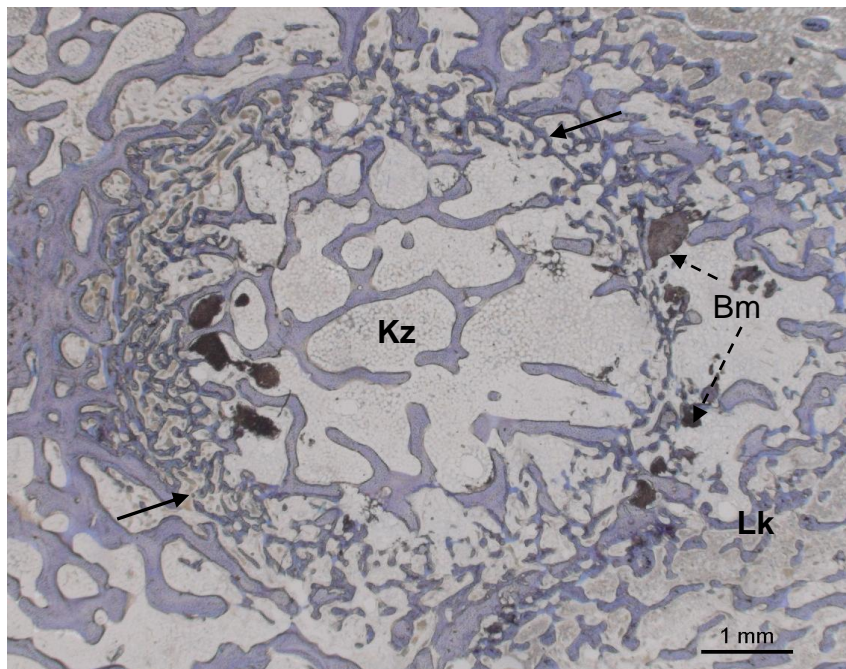


Abb. 33 Lichtmikroskopie - Kontrollgruppe nach 21 Tagen. Deutliche Geflechtknochenbildung im Osteotomiespalt (→) mit Bridging zwischen Lagerknochen (Lk) und Knochenzylinder (Kz). Einzelne Bohrmehlreste (Bm) (Toluidinblau, 1,25x).

Die Implantate waren größtenteils noch gut erhalten, der spaltnahe Rand zeigte nur stellenweise lakunenartige Vertiefungen mit darin sitzenden mehrkernigen Osteoklasten (Abb. 34b). Lediglich bei einem Tier schien der Zylinder bis auf einzelne Knochenreste resorbiert worden zu sein. Wie schon bei der Klebstoffgruppe konnte nahe der resorbierten Bezirke im Lagerknochen, Zylinder und Osteotomiespalt meist eine aktive Osteogenese beobachtet werden, welche an einer Auffüllung der Resorptionszonen mit Knochen beteiligt war (Abb. 34a). Im Unterschied zur Klebstoffgruppe, in der nur wenige mehrkernige Riesenzellen an Bohrmehl und Knochensplittern zu finden waren, traten diese hier häufiger auf (Abb. 34b).

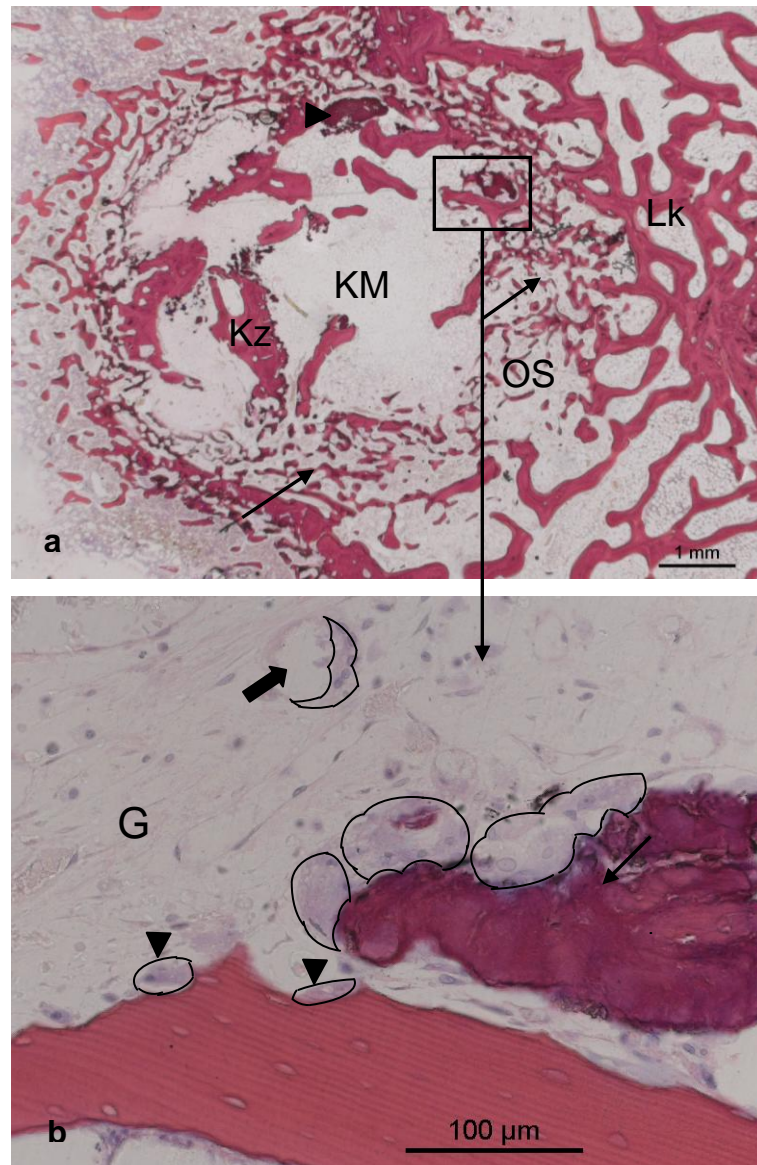


Abb. 34a-b Lichtmikroskopie - Kontrollgruppe nach 21 Tagen. (a) Übersichtsaufnahme mit teilweise resorbiertem Zylinder (Kz) und Knochenmark (KM). Ausgeprägte Osteogenese (→) im Osteotomiespalt (OS) auf den Zylinder und Lagerknochen (Lk) übergreifend, Bohrmehlreste (▶) (H.E., 1,25x). (b) Detailaufnahme des spaltnahen Osteotomierandes mit Resorptionslakunen und Osteoklasten (▶), mehrkernige Zellen (umrandet) am Bohrmehl (→) und im Granulationsgewebe (G) an einem Gefäß (➡) (H.E., 20x).

Hinweise auf ausgedehnte Entzündungsreaktionen waren nicht sichtbar. Es fiel auf, dass auch in dieser Gruppe vereinzelt Knochenmarksbereiche innerhalb des Zylinders und des angrenzenden Lagerknochens Fettgewebnekrosen aufwiesen, die von mehrkernigen Zellen beseitigt wurden.

Zusammenfassend konnten bei beiden Gruppen nach 21 Tagen im Vergleich zu den 10-Tagesgruppen bereits vorangeschrittene Resorptionsvorgänge im Osteotomiespalt verzeichnet werden.

Dabei schienen die Abbauvorgänge von Bohrmehl und Knochensplittern in der Kontrolle tendenziell weiter fortgeschritten als in der Klebstoffgruppe, welches sich u.a. an der im Vergleich zur Klebstoffgruppe höheren Anzahl an Phagozyten bemerkbar machte. Die Klebstoffresorption durch polynukleäre Phagozyten war zu diesem Zeitpunkt deutlich erkennbar. Hinsichtlich der Vollständigkeit der Implantate fanden sich in beiden Gruppen Zylinder, die teilweise als reduziert und resorbiert eingestuft werden konnten. Dabei konnte oftmals in der Nähe dieser Resorptionszonen eine aktive Osteogenese im Lagerknochen, Osteotomiespalt oder Zylinder nachgewiesen werden. Bezüglich der Osteogenese zeigten beide Gruppen nach 21 Tagen eine gesteigerte Geflechtknochenneubildung im Osteotomiespalt. Dabei lagen die osteogenetischen Vorgänge der Kontrolle deutlich vor der Knochenneubildung der Klebstoffgruppe. Zuletzt zeigte sich bei der Klebstoffgruppe im Unterschied zur Kontrolle bei zwei Tieren eine ausgedehnte Entzündungsreaktion.

3 Monate - Gruppen (Klebstoff/Kontrolle)

Anders als bei den vorherigen Gruppen, war die Wachstumsfuge bei den 3-Monatstieren nun bei beiden Gruppen geschlossen. Zu diesem Beobachtungszeitpunkt fiel es bei den Präparaten zunehmend schwerer, das Implantat zu identifizieren.

Innerhalb der Klebstoffgruppe waren lediglich bei einem Tier der Osteotomiespalt und der Knochenzylinder gut abgrenzbar. Bei diesem Präparat fand sich noch sehr viel Klebstoff verteilt über fast den gesamten Spalt, neu gebildeter Geflechtknochen war nicht zu sehen. Das Implantat erschien im kaudalen Bereich leicht angegriffen und wurde durch Granulationsgewebe ersetzt (Abb. 35a).

Bei den übrigen Knochenschliffen schien der Zylinder größtenteils in den Lagerknochen eingehüllt zu sein. Die Osteogenese war bei diesen Tieren vermutlich abgeschlossen, da der Osteotomiespalt komplett mit Lamellenknochen durchbaut schien, so dass der Spalt nur sehr schwer bis gar nicht vom umgebenden Lagerknochen differenziert werden konnte (Abb. 35b). Geflechtknochen war nicht zu sehen, zu diesem Zeitpunkt war demnach bereits ein Stadium erreicht, in dem der als Reparaturknochen geltende Geflechtknochen vollständig durch den endgültigen Lamellenknochen ersetzt worden war.

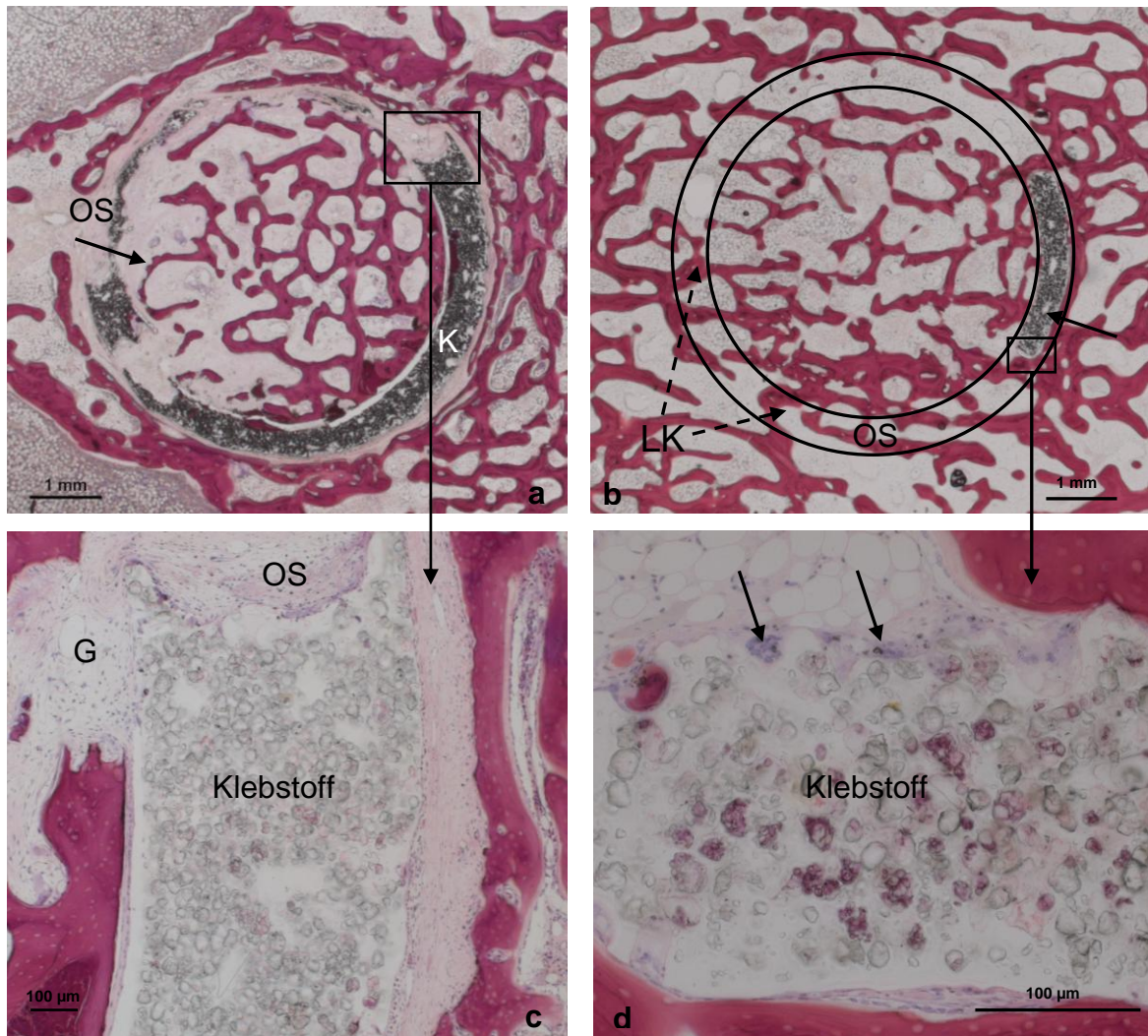


Abb. 35a-d Lichtmikroskopie - Klebstoffgruppe nach 3 Monaten. (a) Übersichtsaufnahme eines stellenweise resorbierten Knochenzylinders (→), Osteotomiespalt (OS) mit viel Klebstoff (K) und fehlender Osteogenese (H.E., 1,25x). (b) Knöcherne Durchbauung des Osteotomiespales (OS) mit Lamellenknochen (LK) (Kreise: Begrenzung des ehemaligen Osteotomiespales = OS). Klebstoffreste im Osteotomiespalt (→) (H.E., 1,25x). (c) Detailaufnahme - Klebstoffareal im Osteotomiespalt (OS), Granulationsgewebe (G) (H.E., 10x). (d) Detailaufnahme - Klebstoff/Knochen-Interface, mehrkernige Riesenzellen (→) (H.E., 20x).

Hinweise auf einen ehemals vorhandenen Defekt bzw. Osteotomiespalt brachten u.a. einzelne Inseln mit noch verbliebenem Granulationsgewebe zwischen dem lamellären Knochen. Dabei wurde der an die bindegewebigen Bereiche angrenzende Knochen stellenweise durch mehrkernige Osteoklasten abgebaut (Abb. 36).

In den trabekulären Zwischenräumen des Lamellenknochens waren bei einigen Tieren mengenmäßig zum Teil noch den vorherigen Gruppen vergleichbare Ansammlungen des applizierten Klebstoffes vorhanden. Bei anderen Tieren dagegen fand man nur noch kleine inselförmige Klebstoffareale. Dabei lagen die Klebstoffreste

größtenteils in einem Bereich, in dem man den Spalt vermuten würde, lediglich bei einem Tier schienen die Klebstoffreste verstreut in den trabekulären Zwischenräumen des gesamten Implantationsgebietes zu liegen.

Innerhalb der lamellären Trabekelzwischenräume fand sich der Klebstoff zum einen von Granulationsgewebe umgeben (Abb. 35c, Abb. 36, Abb. 37a), zum anderen lag dieser auch bereits inmitten von Knochenmark (Abb. 37b). Insgesamt fand an allen Klebstoffarealen eine rege Resorption durch vielkernige Zellen statt (Abb. 35d, Abb. 36, Abb. 37a-b).

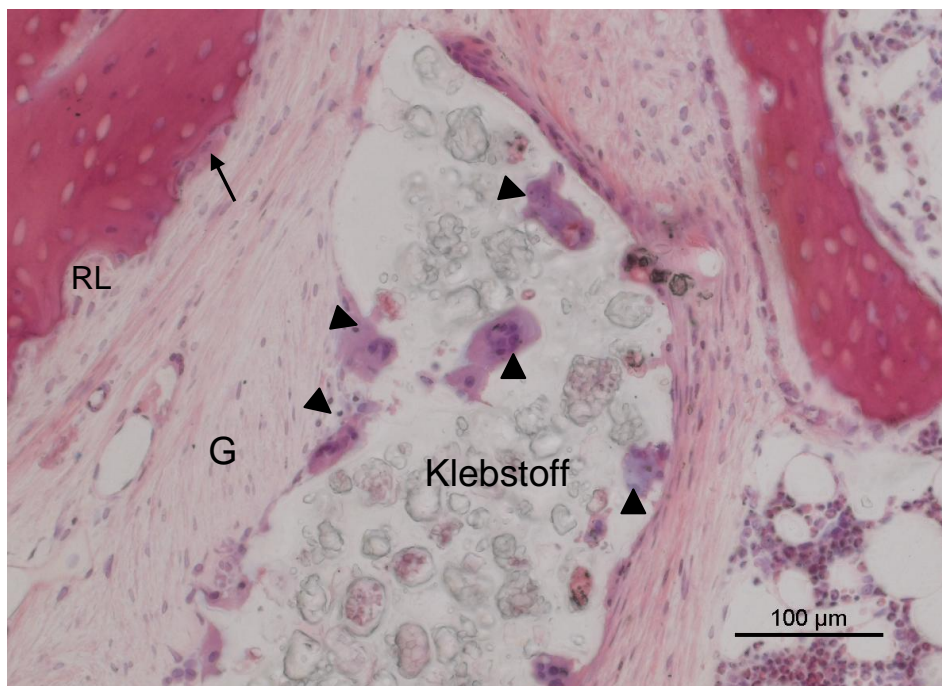


Abb. 36 Lichtmikroskopie - Klebstoffgruppe nach 3 Monaten. Detailaufnahme eines Klebstoffareals mit zahlreichen polynukleären Zellen (▶). Resorptionslakunen (RL) mit Osteoklasten (→) am an das bindegewebige Granulationsgewebe (G) angrenzenden Knochen (H.E., 20x).

Bohrmehlreste und ihr Abbau durch polynukleäre Riesenzellen waren lediglich bei einem Tier sichtbar, auf den übrigen Schlifften fand sich kein Bohrmehl mehr. Soweit eine Beurteilung des Grenzbereiches zwischen Klebstoff und Knochen möglich war, stellte sich dieser unauffällig dar. Anzeichen einer Entzündungsreaktion traten bei keinem der Kaninchen auf.

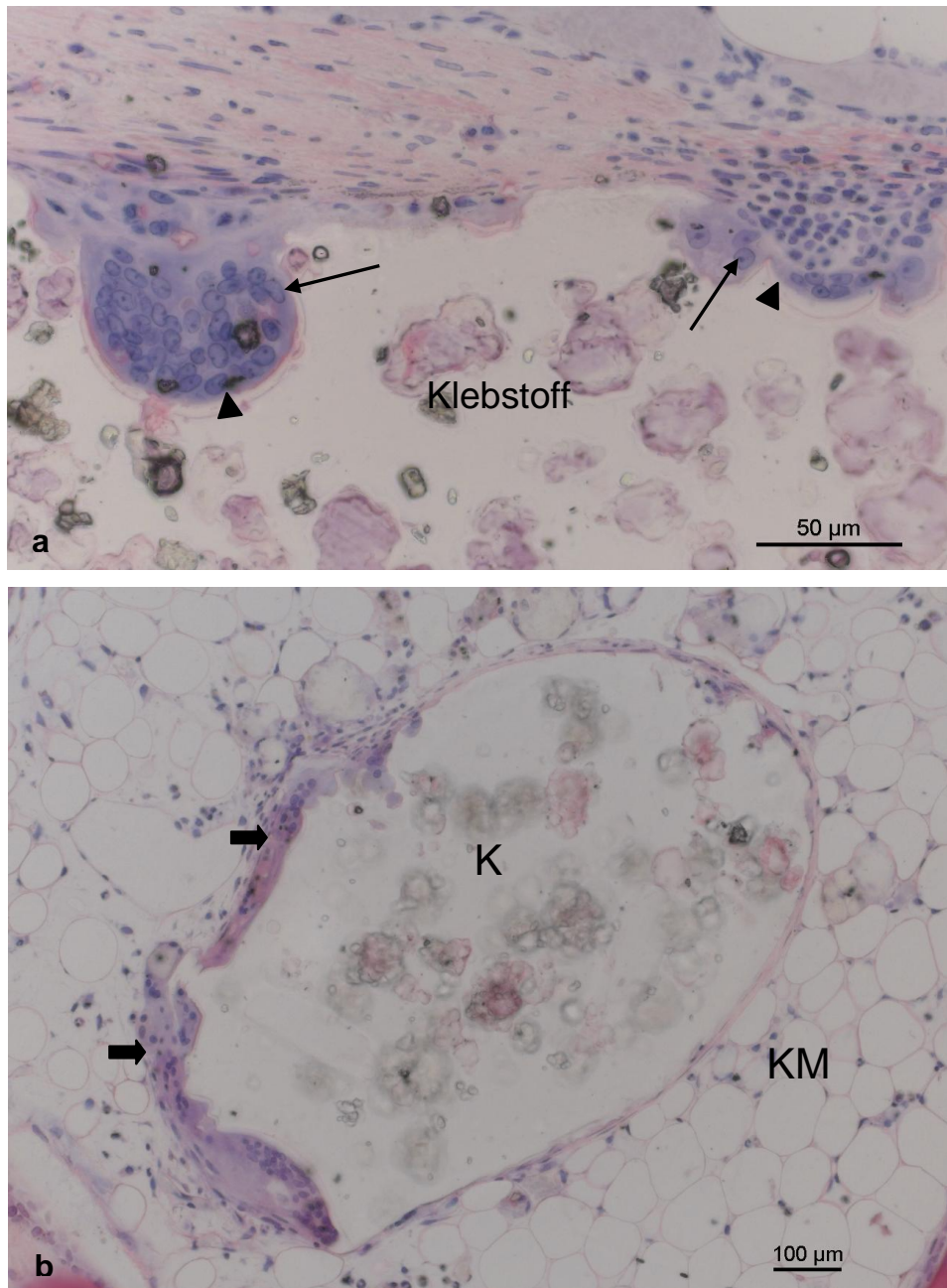


Abb. 37a-b Lichtmikroskopie - Klebstoffgruppe nach 3 Monaten. (a) Detailaufnahme mehrerer an einem Klebstoffrest sitzender Riesenzellen (▶) mit zahlreichen Zellkernen (→) (H.E., 40x). (b) Deutliche Phagozytose eines Klebstoffareals (K) durch vielkernige Riesenzellen (➡), Knochenmark (KM) um den Klebstoffrest (H.E., 20x).

Ähnlich wie bei der Klebstoffgruppe dieser Versuchsdauer, war es bei den Präparaten der Kontrolle aufgrund der Einheilung schwierig bis unmöglich die Zylinder im Lagerknochen noch abzugrenzen. Diese waren ebenfalls vollständig in den angrenzenden Knochen integriert und der Geflechtknochen bereits durch Lamellenknochen ersetzt worden, so dass der Defekt bzw. ein Osteotomiespalt kaum noch sichtbar war

(Abb. 38). Bei zwei Tieren fanden sich in den Zwischenräumen des lamellären Trabekelwerkes einzelne Reste von Granulationsgewebe. Das an das Granulationsgewebe angrenzende Knochengewebe wies auch hier lakunäre Vertiefungen mit darin sitzenden Osteoklasten auf.

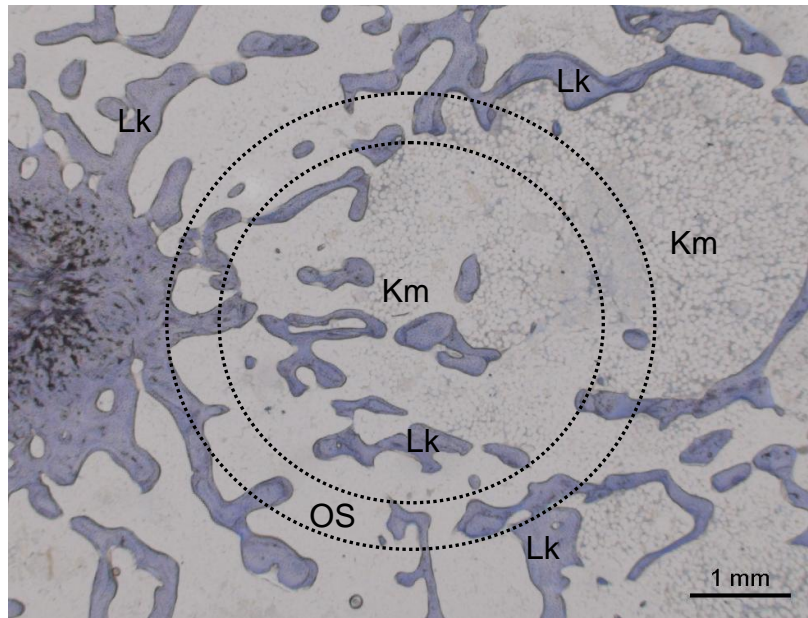


Abb. 38 Lichtmikroskopie - Kontrollgruppe nach 3 Monaten. Übersichtsaufnahme mit vitalem Lamellenknochen (Lk) und Knochenmark (Km) ohne abgrenzbaren Osteotomiespalt. Gestrichelte Linien: geschätzte Lage des ehemals vorhandenen Osteotomiespalt (OS) (Toluidinblau, 1,25x).

Zwei Tiere bildeten jedoch eine Ausnahme. Bei einem war ein stark volumenreduzierter, entrundeter Zylinder sichtbar. Es wurden sowohl resorptive Prozesse in Form von Implantatabbau durch mehrkernige Riesenzellen und Auffüllung mit Granulationsgewebe als auch Wiederaufbau in Form von neu gebildetem Geflechtknochen trabekeln innerhalb des Implantats sichtbar. Eine Durchbauung des Spaltes oder Einheilung des Zylinders hat nicht stattgefunden (Abb. 39a-b).

Bei dem anderen Tier handelte es sich um ein Tier der 12-Monats-Kontrollgruppe, das jedoch aufgrund eines schlechten Allgemeinzustandes nach 3 Monaten vorzeitig getötet werden musste und daher an dieser Stelle in die Auswertungen miteinbezogen wurde. Bei diesem Tier war der Zylinder zwar noch gut erhalten, jedoch war der Osteotomiespalt vollständig mit bindegewebigem Granulationsgewebe ausgefüllt und zeigte keine Zeichen einer Geflechtknochenbildung. Daneben fand sich im Unter-

schied zu den restlichen 3-Monatstieren noch reichlich Bohrmehl mit mehrkernigen Riesenzellen im spaltnahen Lagerknochen.

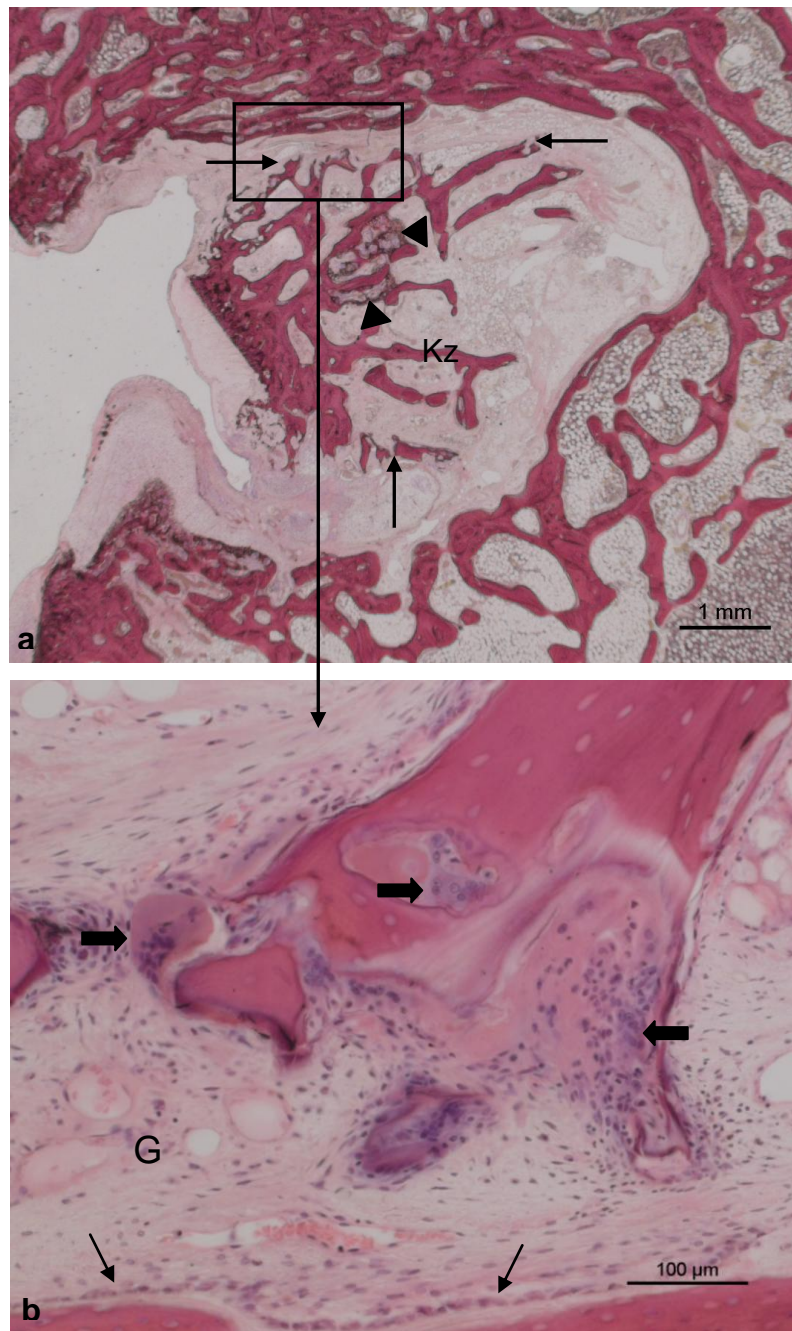


Abb. 39a-b Lichtmikroskopie - Kontrollgruppe nach 3 Monaten. (a) Übersichtsaufnahme mit stark volumenreduzierten Knochenzylinder (Kz), Implantatabbau (→) sowie Geflechtknochenbildung (▶), kein Bridging des Osteotomiespaltes (H.E., 1,25x). (b) Detailaufnahme aus Abb. 39a - Resorption des Knochengewebes durch Osteoklasten (■), bindegewebiges Granulationsgewebe (G), Osteogenese mit Osteoblastenaktivität (→) (H.E., 20x).

Außerdem konnte bei diesem Tier als einzigem Tier der 3-Monatstiere noch eine offene Wachstumsfuge beobachtet werden. Bei keinem der Präparate waren Anzeichen einer Entzündungsreaktion sichtbar.

Nach insgesamt drei Monaten zeigte die Klebstoff- bzw. Kontrollgruppe mit Ausnahme von einem bzw. zwei Tieren eine abgeschlossene Osteogenese in den Osteotomiezonen. Der Osteotomiespalt war vollständig durchbaut und überbrückt und der Geflechtknochen (Reparaturknochen) bereits durch Lamellenknochen ersetzt worden, so dass eine Differenzierung des Zylinders innerhalb des Lagerknochens sich als schwierig bis hin zu unmöglich erwies. Der sich nach 21 Tagen abzeichnende Vorsprung der Kontrolle im Hinblick auf die Osteogenese zeichnete sich bei diesem Beobachtungszeitraum nicht mehr ab. Die resorptiven Vorgänge waren nach drei Monaten bei beiden Gruppen bereits weit fortgeschritten, lediglich einzelne Inseln aus Granulationsgewebe und dem daran angrenzenden Knochengewebe zeigten phagozytierende Zellen wie vielkernige Riesenzellen oder Osteoklasten. Bohrmehl und Knochensplitter oder -fragmente waren bis auf bei einem Tier der Klebstoff- bzw. zwei Tieren der Kontrollgruppe nicht mehr zu sehen. Im Hinblick auf den Klebstoff zeigten sich z.T. verhältnismäßig große Mengen innerhalb der trabekulären Zwischenräume des Lamellenknochens. Klebstoffreste grenzten direkt an gebildeten Lamellenknochen, das Knochen/Klebstoff-Interface stellte sich dabei als völlig unauffällig ohne jegliche Hinweise auf eine bindegewebige Abkapselung dar. Eine Resorption des Klebstoffes durch zahlreiche mehrkernige Riesenzellen konnte nachgewiesen werden.

12 Monate - Gruppen (Klebstoff/Kontrolle)

Nach 12 Monaten konnte bei den meisten Präparaten der Klebstoffgruppe eine komplette Durchbauung des Osteotomiespalt mit Lamellenknochen beobachtet werden, so dass hier ähnlich der 3-Monats-Klebstoffgruppe keine Differenzierung des Zylinders innerhalb des Lagerknochens möglich war (Abb. 40a). Lediglich in den kaudalen Knochenschliffen zweier Tiere war der Osteotomiespalt aufgrund einzelner Bindegewebs- und Klebstoffreste erkennbar (Abb. 40b). Beiden Tieren war auf den betreffenden Schliffen ein zu nah am Gelenkspalt verlaufender Bohrkanal mit resul-

tierendem Einbruch in das Gelenk gemeinsam. Auch nach 12 Monaten konnten bei allen Tieren intratrabekulär noch Klebstoffreste gefunden werden, wobei sich, wie schon in der Vergleichsgruppe nach 3 Monaten, hinsichtlich der Menge ein uneinheitliches Bild mit sehr geringen Klebstoffrestmengen aber auch größeren Klebstoffarealen bot.

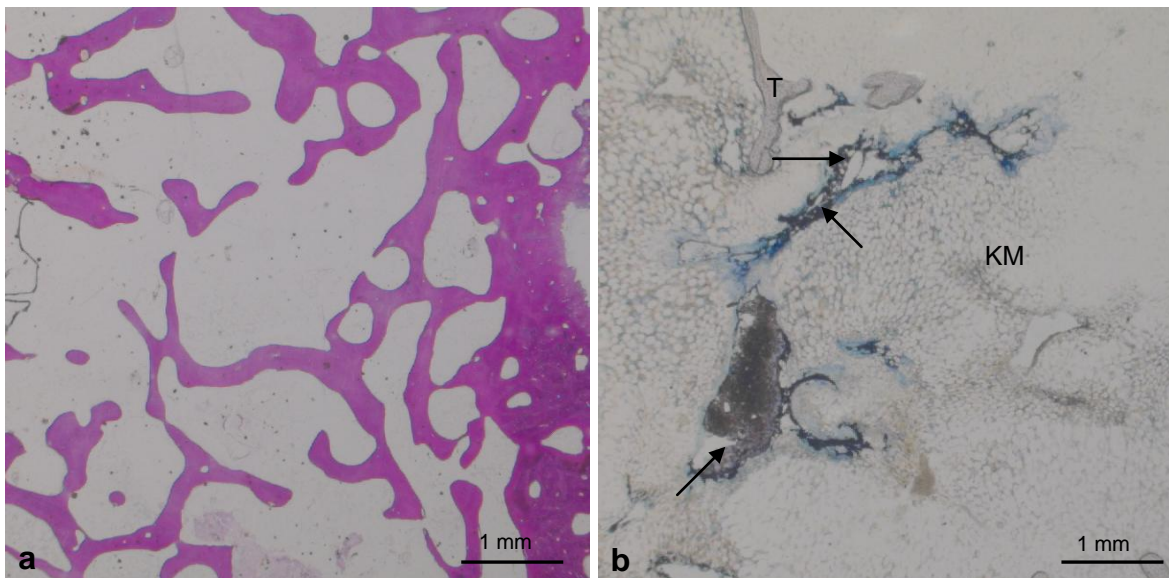


Abb. 40a-b Lichtmikroskopie - Klebstoffgruppe nach 12 Monaten. (a) Übersichtsaufnahme mit unauffälligem Knochengewebe ohne Klebstoffreste oder Hinweise auf die ehemalige Zylinderlage (H.E., 1,25x). (b) Übersichtsaufnahme mit Klebstoffresten innerhalb einer inhomogenen Substanz (→) im Knochenmark (KM) als Hinweis auf die Lage des Osteotoimiespaltes, Knochen trabekel (T) (Toluidinblau, 1,25x).

In den Toluidinblau-gefärbten Präparaten fiel auf, dass einzelne Klebstoffreste in einer farblich und strukturell inhomogenen, bisher nicht beobachteten Substanz eingebettet schienen (Abb. 40b, 41a-c). Dabei zeigte diese neben hellviolett gefärbten, grobnodulär strukturierten Bereichen tiefviolette bis dunkelblaue, feinkörnig veränderte Zonen. Die Substanzformationen eingrenzend, jedoch auch frei im Knochenmark liegend, fanden sich tief dunkelblaue bis schwarze, sternförmig ausgezogene Präzipitate, in denen ebenfalls gelegentlich kleine Klebstoffpartikel gefunden werden konnten (Abb. 41b-c). In den H.E.-gefärbten Präparaten konnten ähnliche Beobachtungen gemacht werden. Dabei imponierte die Substanz hier als hellrosa bis violett gefärbte, teils schollig zerfallende, teils nodulär strukturierte Masse, die ebenfalls stellenweise von sternförmig konfigurierten, diesmal kräftig rosa gefärbten Präzipitaten umgeben wurde.

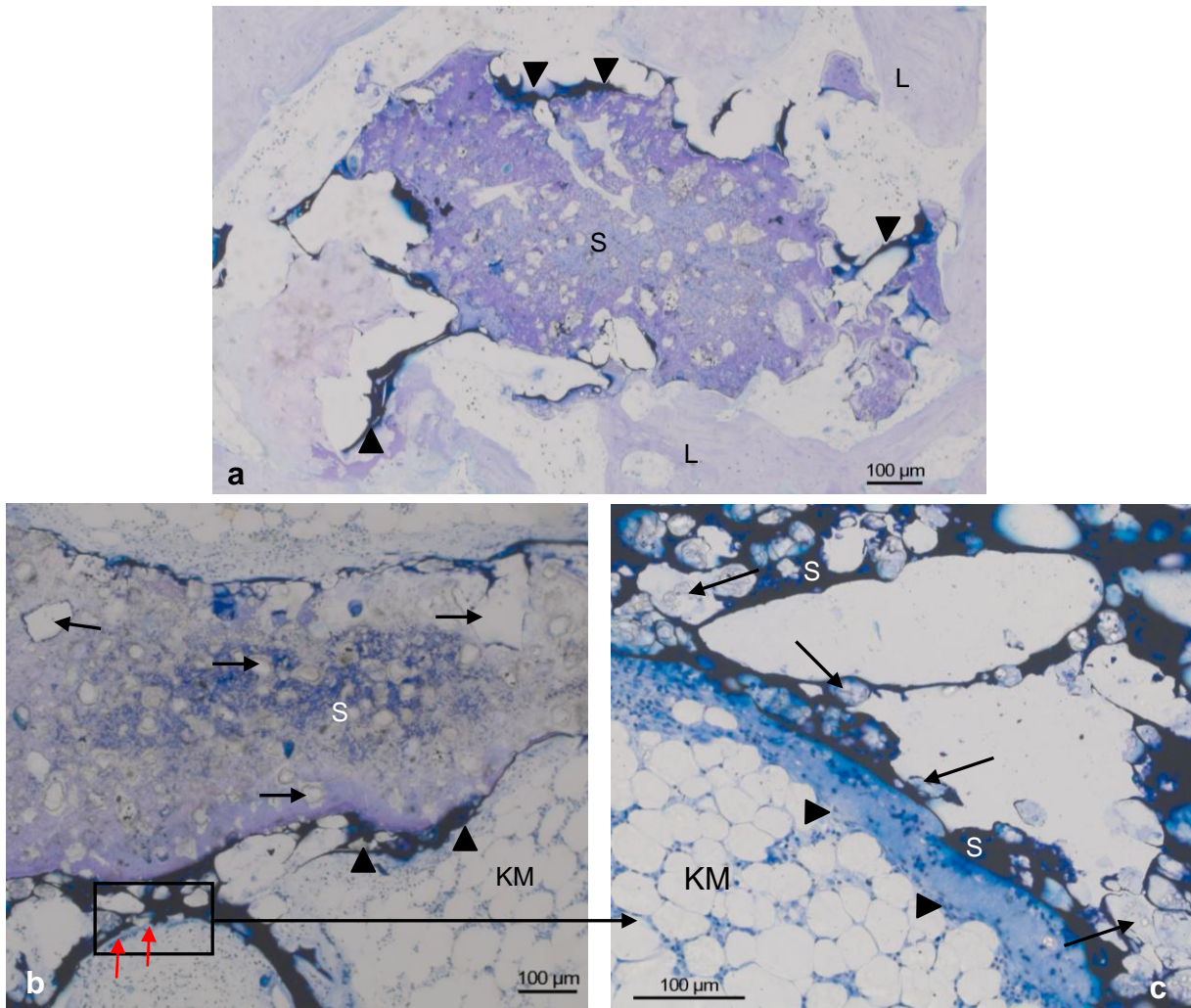


Abb. 41a-c Lichtmikroskopie - Klebstoffgruppe nach 12 Monaten. (a) Restklebstoff innerhalb einer inhomogenen Substanz (S) mit randständigen dunklen Präzipitaten (▶), Lamellenknochen (L) (Toluidinblau, 10x). (b) Mehrkernige Riesenzellen (rot→) an Klebstoffresten (→) und inhomogener Substanz (S), Knochenmark (KM) (Toluidinblau, 10x). (c) Detailaufnahme aus Abb. 41b - Zahlreiche polynukleäre Riesenzellen (▶) an Klebstoffresten (→) und schwarzviolett gefärbter Substanz (S), Knochenmark (KM) (Toluidinblau, 40x).

Bei allen Knochenschliffen fanden sich unmittelbar an den in die oben beschriebene Substanz inkorporierten Klebstoffpartikeln sowie an den dunkel gefärbten Präzipitaten zahlreiche polynukleäre Riesenzellen (Abb. 41b-c, Abb. 42a). Ferner konnten bei den phagozytierenden Riesenzellen intrazelluläre, phagozytierte Klebstoffreste gezeigt werden (Abb. 42b). Darüber hinaus konnten Phagozyten lediglich im Rahmen des normalen Knochenumbaus beobachtet werden. Der an die Klebstoffbezirke reichende Lamellenknochen sowie der übrige Lagerknochen und das Knochenmark stellten sich unauffällig dar. Es konnten keine Anzeichen einer akuten oder chronischen Entzündungsreaktion dokumentiert werden.

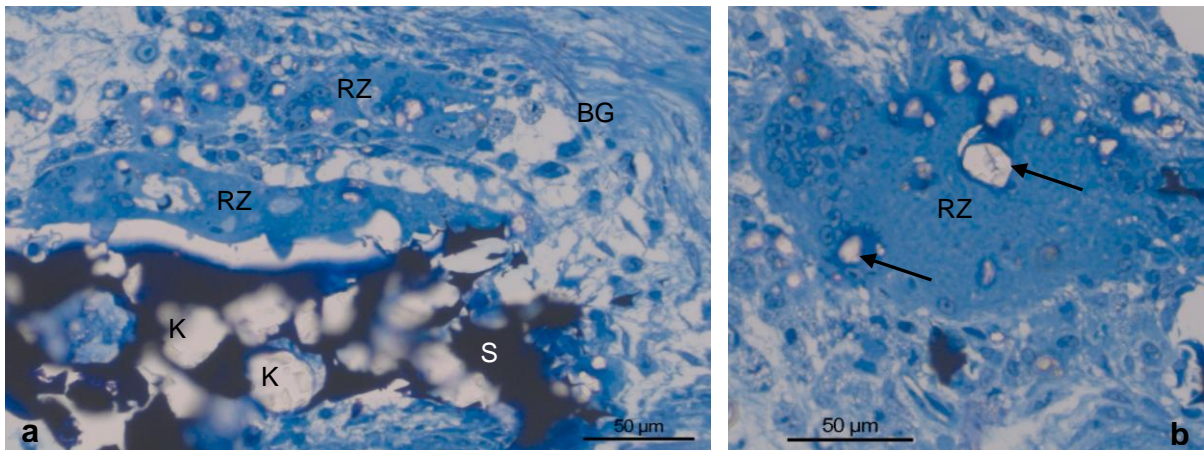


Abb. 42a-b Lichtmikroskopie - Klebstoffgruppe nach 12 Monaten. (a) Detailaufnahme einer polynukleären Riesenzelle (RZ), welche die schwarzblaue Substanz (S) mit darin liegenden Klebstoffresten (K) phagozytiert, Bindegewebe (BG) (Toluidinblau, 40x). (b) Mehrkernige Riesenzelle (RZ) mit intrazellulären Klebstoffresten (→) (Toluidinblau, 40x).

Die Präparate der Kontrollgruppe zeigten alle unauffälliges Knochengewebe (Lamellenknochen) ohne jeden Hinweis auf einen ehemals vorhandenen Defekt (Abb. 43a-b). Es fanden sich keine Anzeichen für eine Entzündungsreaktion oder osteolytische Prozesse des Knochengewebes. Der zelluläre Status im ehemaligen Osteotomiebereich entsprach dem des Knochengewebes im peripheren Lagerknochen. Zelluläre Resorption durch polynukleäre Phagozyten (Osteoklasten) konnte zu diesem Beobachtungszeitpunkt lediglich im Rahmen des physiologischen Knochenremodelings nachgewiesen werden.

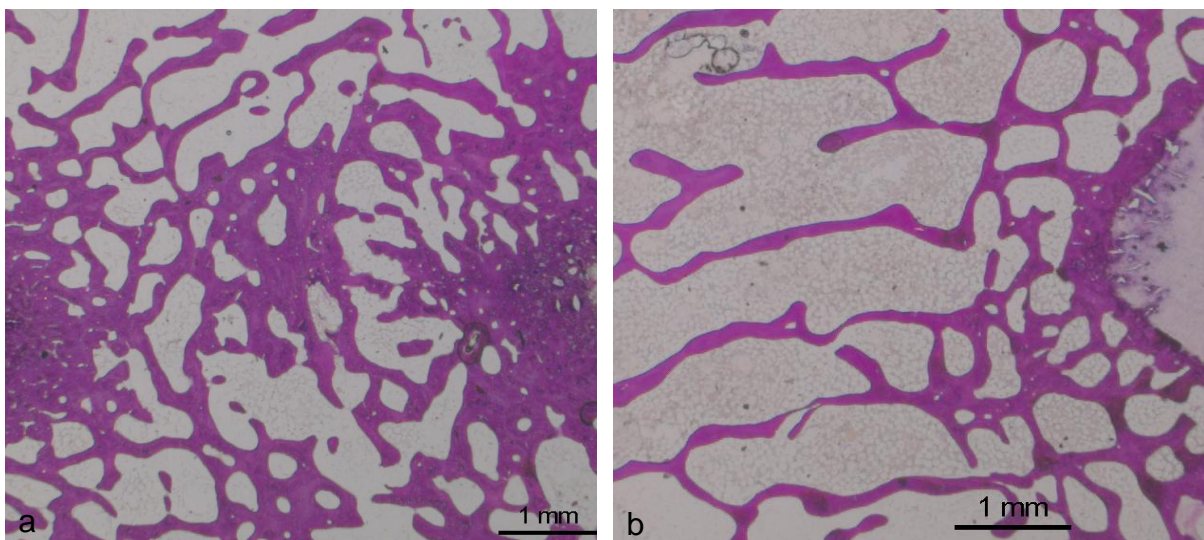


Abb. 43a-b Lichtmikroskopie - Kontrollgruppe nach 12 Monaten. (a)-(b) Übersichtsaufnahmen mit komplett durch Lamellenknochen aufgefülltem Osteotomiespalt (H.E., 1,25x).

Zusammenfassend war sowohl bei der Kontroll- als auch bei der Klebstoffgruppe nach 12 Monaten aufgrund der kompletten knöchernen Integration des Zylinders in den Lagerknochen der Osteotomiespalt, wie schon in den Vergleichsgruppen nach 3 Monaten, nicht abgrenzbar. Eine Ausnahme bildeten die dorsalen Knochenschliffe zweier Tiere der Klebstoffgruppe, auf denen der Osteotomiespalt aufgrund einzelner Bindegewebsreste noch erkennbar war.

In der Klebstoffgruppe konnte nach 12 Monaten noch Restklebstoff nachgewiesen werden, dabei variierte dessen Menge, ähnlich wie bei der Vergleichsgruppe nach 3 Monaten, schnittebenenabhängig von gering bis mäßig. Im Unterschied zur 3-Monatsgruppe, bei der die Klebstoffreste im Knochenmark und/oder verbliebenem Bindegewebe lagen, schienen die Klebstoffpartikel nun von einer farblich und strukturell inhomogenen Substanz umgeben zu sein. Zudem konnten zahlreiche kräftig gefärbte Präzipitate nahe den verbliebenen Klebstoffbezirken bzw. frei im Knochenmark der intratrabekulären Räume des Lamellenknochens beobachtet werden. Die verbliebenen Klebstoffareale bzw. die inhomogene Substanz ließen eine ausgeprägte zelluläre Resorption durch mehrkernige Riesenzellen erkennen, darüber hinaus konnten keine Anzeichen einer gesteigerten zellulären Resorption im angrenzenden Knochengewebe festgestellt werden.

4.2.2 Rückenmuskulatur

10 Tage - Gruppen (Klebstoff/Kontrolle)

In den Übersichtsaufnahmen der Präparate der Klebstoffgruppe waren die mit Klebstoff präparierten „Taschen“ innerhalb der quergestreiften Rückenmuskulatur gut sichtbar. Dabei befanden sich im Inneren der abgebildeten Taschen neben dem implantierten Klebstoff auch Ansammlungen von Muskelzellen, welche sich bezüglich ihres Erscheinungsbildes deutlich von dem an die Muskeltasche angrenzenden Muskelgewebe unterschieden (Abb. 44). Es handelte sich um kalibervergrößerte, homogen eosinophil erscheinende Fasern, die die für die Skelettmuskulatur charakteristische Querstreifung verloren hatten. Die Kerne dieser Fasern erschienen etwas kleiner und intensiver angefärbt, stellenweise fehlten sie völlig. Neben Fragmentierung waren eine Vakuolenbildung und ein hyalin-scholliger Zerfall dieser Fasern sichtbar.

In den interstitiellen Räumen zwischen den veränderten Muskelfasern zeigten sich mononukleäre Zellen (u.a. Makrophagen, Plasmazellen), welche die Muskelfasern infiltrierten.

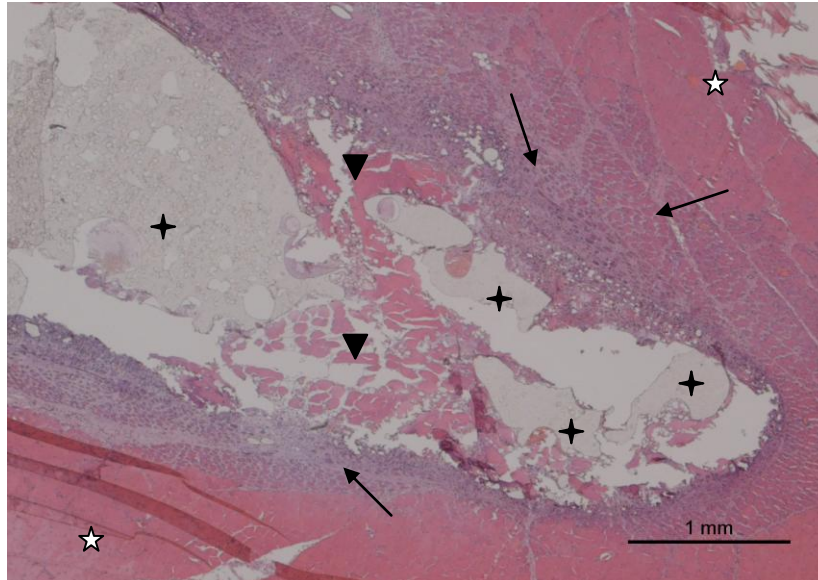


Abb. 44 Lichtmikroskopie - Klebstoffgruppe nach 10 Tagen. Übersichtsaufnahme der mit Klebstoff (✚) gefüllten Tasche innerhalb der quergestreiften Rückenmuskulatur (☆). Veränderte Muskelfasern innerhalb der Muskeltasche (▶) sowie Regenerationsprozesse der defektnahen Skelettmuskulatur (→) (H.E., 2,5x).

Ein Abbau der schollig zerfallenden Muskelfasern durch mehrkernige Zellen wurde bei zwei Tieren vereinzelt nachgewiesen. Zusätzlich zu den größeren Klebstoffarealen innerhalb der Muskeltasche befanden sich verstreut, kleinere Klebstoffpartikel im bindegewebigen und zellreichen Granulationsgewebe, das die Muskeltasche vom umgebenden Muskelgewebe abgrenzte und vermischt sich stellenweise mit diesem (Abb. 45a-b). Vereinzelt fanden sich in einigen Präparaten mehrkernige Riesenzellen, die an größeren Klebstoffansammlungen saßen und diese abzubauen schienen (Abb. 45b). Innerhalb des bindegewebigen Granulationsgewebes, d.h. in unmittelbarer Nähe zum Klebstoff, wurden vermehrt kleinere, oft lang gestreckte Fasern mit basophilem Zytoplasma sichtbar. Diese wiesen prominente, zentrale Kerne mit deutlichem Nukleolus auf, die im Längsschnitt der Fasern oft in Reihen angeordnet waren. Zur Peripherie hin, nahmen diese Fasern an Größe zu, die Zellkerne wanderten an den sarkolemmnahen Rand und die Basophilie nahm ab. Daneben zeichneten sich in diesem Faserverbund einzelne Muskelfasern ab, die durch andere Fasern „aufgesplittet“ erschienen, bzw. selbst andere Fasern „aufsplitteten“.

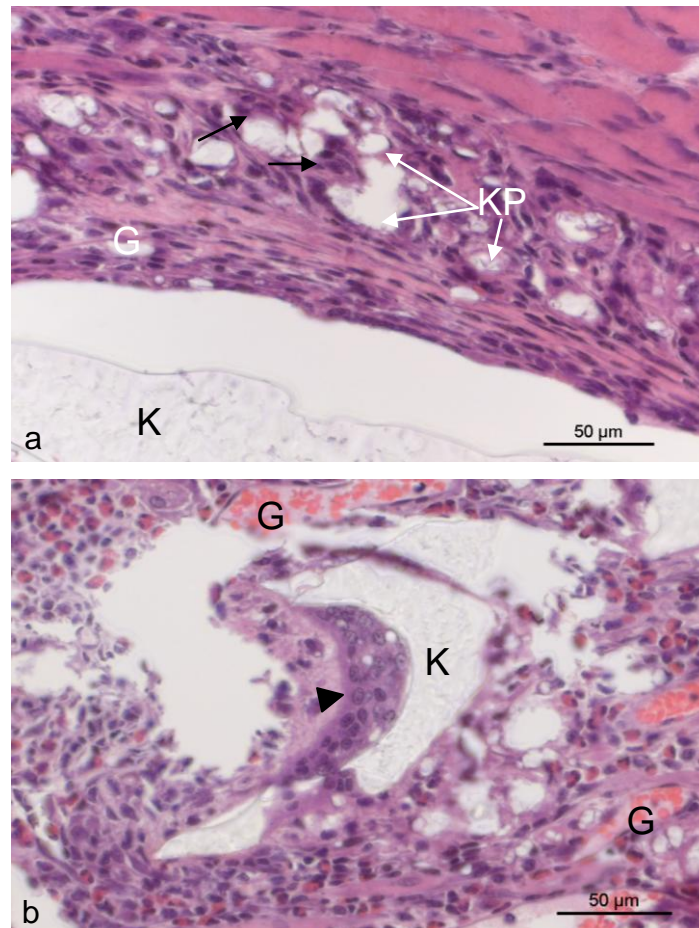


Abb. 45a-b Lichtmikroskopie - Klebstoffgruppe nach 10 Tagen. (a) Zellreiches Granulationsgewebe (G) mit einzelnen Klebstoffpartikeln (KP) und schwer abgrenzbaren Riesenzellen (→), größeres Klebstoffareal (K) (H.E., 40x). (b) Mehrkernige Riesenzelle (▶) an einem Klebstoffareal (K), Blutgefäße (G) (H.E., 40x).

Weiterhin fanden sich in der umgebenden Muskulatur und im Bindegewebe stellenweise regenerierende Muskelfasern, die longitudinal getroffen kernreiche, kolbenförmig aufgetriebene Faserenden besaßen (Abb. 46). Vereinzelt wurden zwischen den basophil erscheinenden Muskelfasern, sowie in der umgebenden, defektnahen Muskulatur Fasern sichtbar, die den homogen eosinophil gefärbten Fasern in der Muskeltasche ähnelten. Dabei zeigten auch diese scholligen Zerfall, Vakuolen und zelluläre Infiltration. Deutliche Infiltrationen der Muskulatur mit granulozytären sowie lymphozytären Entzündungszellen sowie Einschmelzung des Muskelgewebes traten bei einem Tier auf. Zudem sah man auf allen Präparaten Ansammlungen von Fettgewebe, sowohl im Binde- als auch im Muskelgewebe sowie vereinzelt Einblutungen, bevorzugt in das zellreiche Bindegewebe oder inmitten der Muskeltasche zwischen den Klebstoffresten und den untergehenden Muskelfasern.

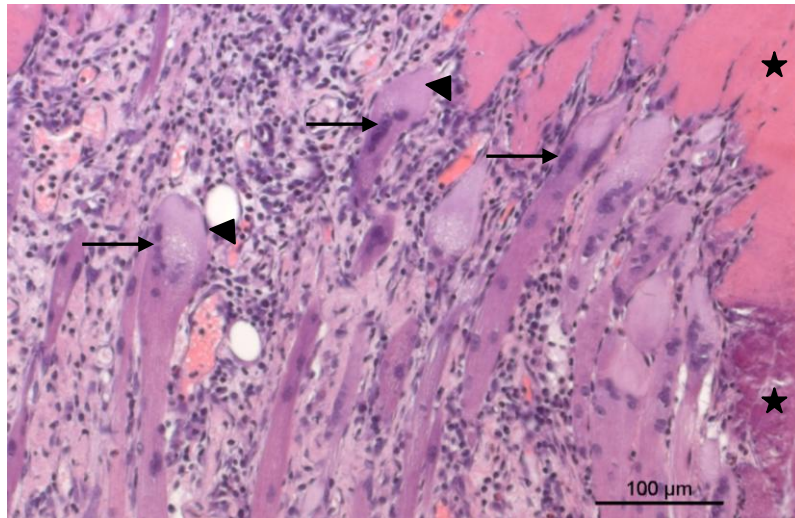


Abb. 46 Lichtmikroskopie - Klebstoffgruppe nach 10 Tagen. Detailaufnahme regenerierender Muskelfasern mit zentral gelegenen und in Reihen angeordneten Zellkernen (→), basophilem Zytoplasma sowie kolbenförmig aufgetriebenen Faserenden (▶), degenerativ veränderte Muskelfasern (★) mit scholligem Zerfall (H.E., 20x).

Bei den Kontrolltieren zeigte sich ein ähnliches Bild wie bei der Klebstoffgruppe. Bei fast allen Präparaten war auch hier der präparierte Defekt innerhalb der quergestreiften Muskulatur sichtbar. Abgesehen von dem fehlenden Klebstoff innerhalb der Taschen, waren diese mit Ansammlungen veränderter Muskelzellen im Inneren und einer Begrenzung durch ein sehr dichtes, zellreiches Granulationsgewebe nach außen ähnlich strukturiert wie die Taschen der Klebstoffgruppe. Lediglich bei einem Tier war keine Muskeltasche im eigentlichen Sinne, sondern vielmehr eine stellenweise durch Bindegewebsansammlungen durchzogene Muskulatur sichtbar. Die Muskelfasern inmitten der Muskeltasche zeigten analog zur Klebstoffgruppe Strukturänderungen wie Fragmentierung, homogen eosinophiles Aussehen, Vakuolen bis hin zum scholligen Zerfall, Kernverlust sowie zelluläre Infiltration auf. Ein Abbau dieser Fasern durch eingewanderte mehrkernige Riesenzellen konnte vereinzelt bei zwei Tieren beobachtet werden (Abb. 47). Bei einem weiteren Tier fanden sich in den bindegewebigen Bereichen vereinzelt schollig zerfallende, homogen eosinophile Fasern, die von Riesenzellen phagozytiert wurden. Auffällig waren zudem im Bindegewebe sowie zwischen einzelnen Muskelfasern dieses Tieres auftretende Granulozytenansammlungen, welche stellenweise zur Infiltration und Degeneration einzelner Muskelfasern führten. Darüber hinaus konnten Riesenzellen aufgrund der schon beschriebenen Ähnlichkeit zu Myoblasten sowie aufgrund der Zelldichte des Granulationsgewebes nicht sicher abgegrenzt werden.

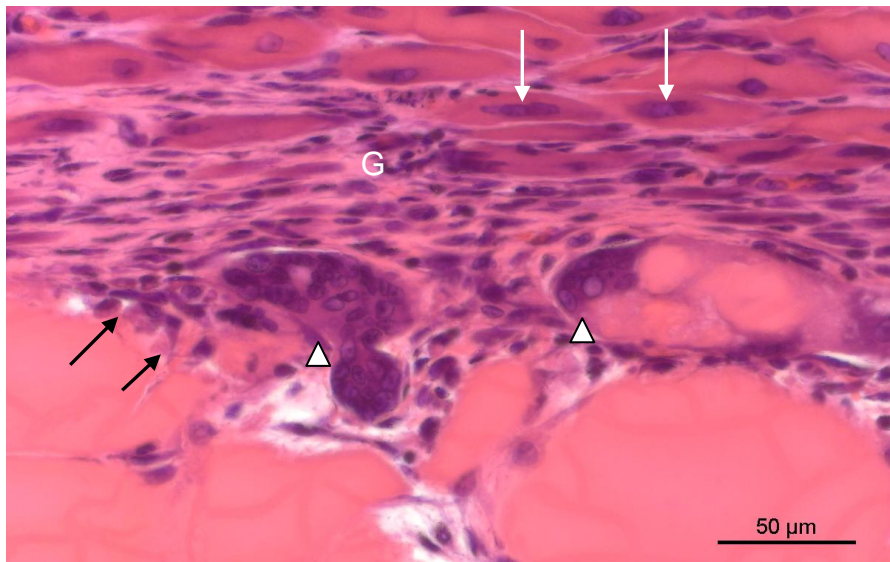


Abb. 47 Lichtmikroskopie - Kontrollgruppe nach 10 Tagen. Detailaufnahme von untergehenden Muskelfasern (Kernverlust, zelluläre Infiltration (→), Fragmentierung) und deren Phagozytose durch mehrkernige Riesenzellen (▶weiss), regenerierende Fasern (→weiss) mit kettenförmig angeordneten, zentralen Zellkernen im zellreichen Granulationsgewebe (G) (H.E., 40x).

Im bindegewebigen Granulationsgewebe fanden sich auch bei der Kontrolle kalibergeminderte, basophile Fasern mit prominenten, zentralen Kernen, die im Längsschnitt getroffen oft lang gestreckt erschienen und eine reihenförmige Anordnung der Kerne zeigten (Abb. 48). Zur Peripherie hin verhielten sich diese Fasern im Hinblick auf Kalibergröße, Basophilie und Kernlage wie die entsprechenden Fasern der Klebstoffgruppe.

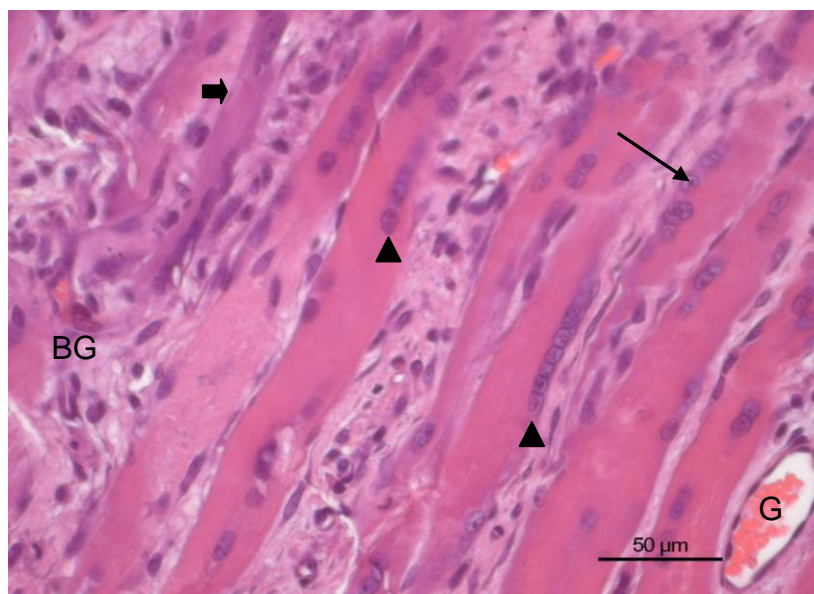


Abb. 48 Lichtmikroskopie - Kontrollgruppe nach 10 Tagen. Muskelfasern mit prominenten, in Reihen angeordneten Zellkernen (▶) mit deutlichem Nukleolus (→), Fasern mit basophilem Zytoplasma (■), Gefäß mit Erythrozyten (G), Bindegewebe (BG) (H.E., 40x).

Kolbenartig verbreiterte, kernreiche Faserauftreibungen sowie „aufgesplittet“ aussehende Fasern traten nur vereinzelt in der umgebenden Muskulatur auf. Weiterhin kamen zwischen den basophilen Fasern des Granulationsgewebes sowie in der umgebenden Muskulatur vereinzelt strukturveränderte Muskelfasern vor.

Nach 10 Tagen konnte sowohl bei der Kontrolle als auch bei der Klebstoffgruppe der gesetzte Defekt nachgewiesen werden. Dabei zeigten sich bei beiden Gruppen, von dem applizierten Klebstoff der Klebstoffgruppe abgesehen, keine Unterschiede hinsichtlich des Erscheinungsbildes der Rückentasche.

Diese stellte sich als ein durch zellreiches, dichtes Granulationsgewebe abgegrenzter Bezirk innerhalb der Rückenmuskulatur dar. Die Muskelfasern innerhalb der Tasche zeigten bei beiden Gruppen Zeichen einer fortgeschrittenen Degeneration. Eine Phagozytose dieser Fasern durch mehrkernige Riesenzellen fand sich in den Kontrollpräparaten vereinzelt bei zwei, in der Klebstoffgruppe bei einem Tier. Weitere Riesenzellen konnten in der Klebstoffgruppe am Klebstoff nachgewiesen werden. Weiterhin konnten in beiden Gruppen ausgeprägte Regenerationsprozesse der Muskulatur in Form basophiler, langgestreckter Fasern mit in Reihen angeordneten, aufgetriebenen Zellkernen innerhalb des Granulationsgewebes beobachtet werden. Gravierende Entzündungsprozesse mit einer Einschmelzung der Muskulatur konnten bei einem Tier der Klebstoffgruppe gefunden werden. Bei der Kontrolle konnten bei einem Tier stellenweise Infiltrationen der Muskulatur und des Bindegewebes mit Granulozyten gezeigt werden.

21 Tage - Gruppen (Klebstoff/Kontrolle)

Nach 21 Tagen war die mit Klebstoff gefüllte Tasche innerhalb der Muskulatur bei der Klebstoffgruppe auf allen Präparaten nachweisbar. Dabei zeigte sich die Verteilung und Menge des vorhandenen Klebstoffes unverändert zur 10-Tages-Klebstoffgruppe. Anders verhielt es sich mit der Menge der degenerativ veränderten Muskelfasern innerhalb der Tasche. Lediglich ein Tier zeigte vergleichbare Ansammlungen der veränderten Muskelfasern, während bei den übrigen Präparaten nur noch einzelne, übrig gebliebene Faserreste auf die frühere Existenz von degenerativ veränderten Muskelfasern hinwiesen. Dabei wurde neben mononukleärer Infiltration der

Fasern bzw. ihrer Reste bei drei Tieren vereinzelt auch deren Abbau durch mehrkernige Riesenzellen beobachtet (Abb. 49).

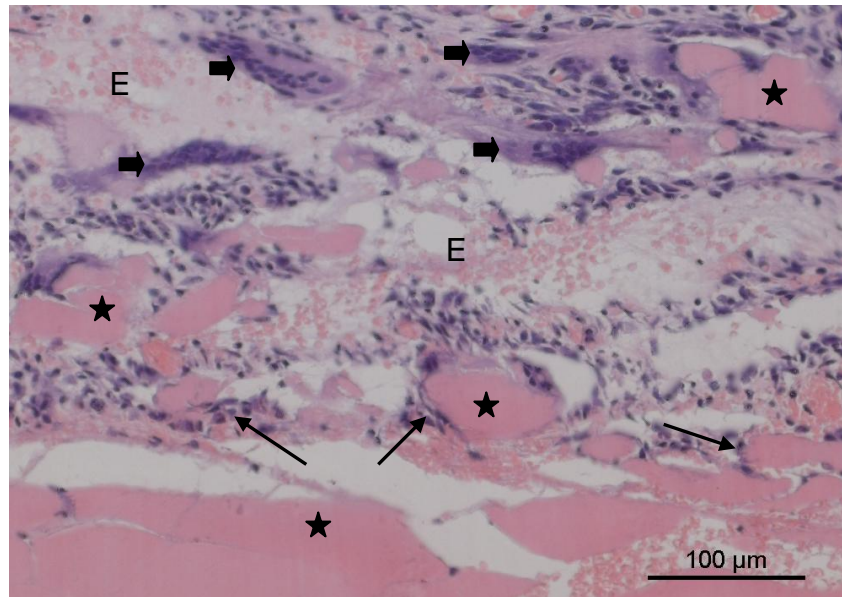


Abb. 49 Lichtmikroskopie - Klebstoffgruppe nach 21 Tagen. Detailaufnahme homogen eosinophil veränderter Muskelfasern bzw. Faserreste (★) mit zellulärer Infiltration (→) und Abbau durch polynukleäre Riesenzellen (▸), ins Gewebe ausgetretene Erythrozyten (E) (H.E., 20x).

Neben den bereits erwähnten Riesenzellen an veränderten Muskelfasern, waren bei sechs Tieren eindeutig mehrkernige Riesenzellen sichtbar, die an größeren Klebstoffbezirken bzw. Partikeln saßen (Abb. 50).

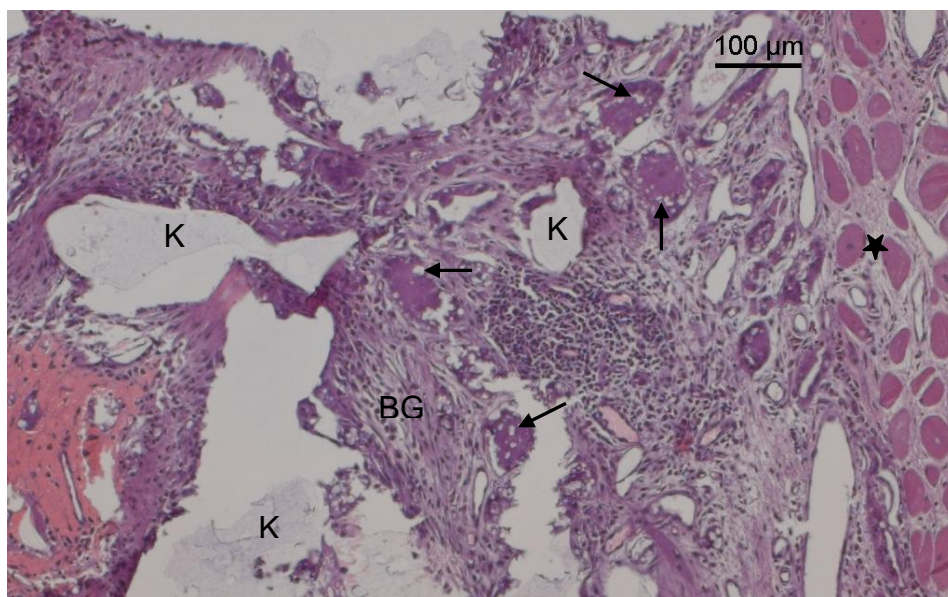


Abb. 50 Lichtmikroskopie - Klebstoffgruppe nach 21 Tagen. Detailaufnahme von zellreichem Bindegewebe (BG) mit Klebstoffarealen (K) sowie zahlreichen mehrkernigen Riesenzellen mit intrazellulären Einschlüssen (→), Muskelfasern im Regenerationsstadium (★) (H.E., 10x).

Basophil erscheinende Fasern im Granulationsgewebe, kolbenförmige, kernreiche Auftreibungen und andere Hinweise auf Regenerationsprozesse waren bei dieser Gruppe ähnlich vertreten wie schon bei der Vergleichsgruppe nach 10 Tagen. Sehr selten wurden an einzelnen Fasern der defektnahen Muskulatur degenerative Zeichen wie Vakuolenbildung, schollig degenerativer Zerfall oder zelluläre Infiltration gefunden. Ausgeprägte entzündliche Infiltrate zeichneten sich nicht ab. Ansammlungen von Fettgewebe, sowohl im Binde- als auch im Muskelgewebe, sowie vereinzelt Einblutungen, bevorzugt in das zellreiche Bindegewebe gehörten wie schon bei den 10-Tagesgruppen zum histologischen Bild.

Im Unterschied zur Klebstoffgruppe war bei der Kontrolle lediglich bei einem Tier eine Muskeltasche zu sehen, auf den übrigen Schnitten wurde das Bild überwiegend von kompaktem Muskelgewebe, das stellenweise von Bindegewebe durchflochten wurde, beherrscht. Teilweise waren auch größere bindegewebige Bereiche inmitten der Muskulatur angeschnitten. Homogen eosinophil erscheinende Muskelfasern wie sie bei den 10-Tagesgruppen innerhalb der Muskeltasche zu sehen waren, fanden sich als einzelne Restfasern nur bei einem Präparat. An diesen Faserresten waren zahlreiche Riesenzellen erkennbar (Abb. 51).

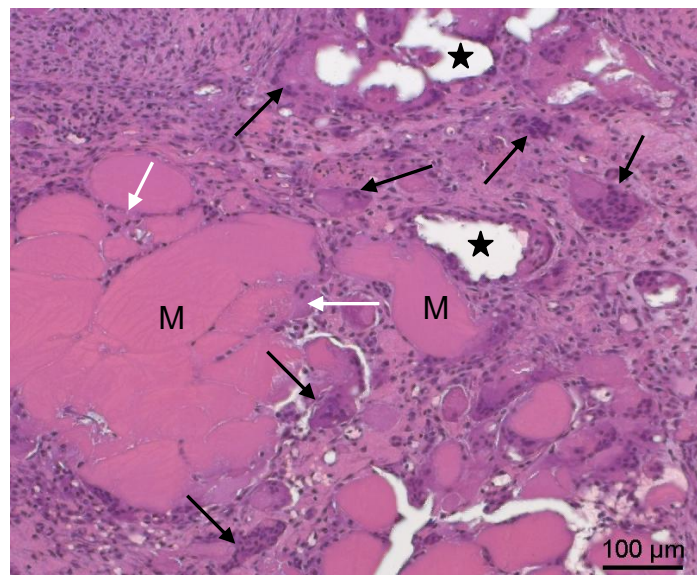


Abb. 51 Lichtmikroskopie - Kontrollgruppe nach 21 Tagen. Übersicht eines zellreichen Bindegewebsbereiches mit homogen eosinophil erscheinenden Muskelfasern (M) und zahlreichen mehrkernigen Riesenzellen (→), zelluläre Infiltrationen der Fasern (→weiss). Schollig zerfallene Muskelfasern, die im Rahmen der Präparatherstellung herausgelöst wurden (★) (H.E., 10x).

Darüber hinaus konnten keine weiteren Riesenzellen eindeutig abgegrenzt werden. Vereinzelt konnten degenerativ veränderte Muskelfasern beobachtet werden (Abb. 52).

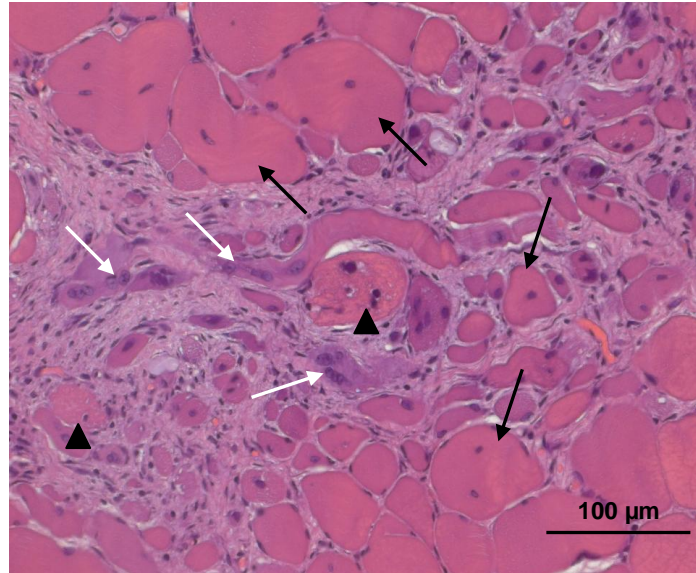


Abb. 52 Lichtmikroskopie - Kontrollgruppe nach 21 Tagen. Detailaufnahme eines Bindegewebsareals mit Muskelfasern unterschiedlicher Regenerationsstadien: basophile, langgestreckte Fasern im frühen Regenerationsstadium (→weiss), Zellen späterer Stadien mit zentral lokalisierten Zellkernen (→). Einzelne degenerativ veränderte Muskelfasern (►) (H.E., 20x).

Innerhalb der bindegewebigen Bereiche waren erneut die schon bei den vorherigen Gruppen beschriebenen Zeichen regenerativer Prozesse der Skelettmuskulatur zu sehen. Anzeichen eines entzündlichen Prozesses konnten nicht beobachtet werden.

Zusammengefaßt war nach 21 Tagen bei der Klebstoffgruppe in allen Präparaten der muskuläre Defekt in Form einer Tasche zu sehen. In der Kontrolle dagegen fand sich eine Tasche nur bei einem Tier, bei den übrigen Präparaten konnte lediglich eine stellenweise durch Bindegewebe durchsetzte Skelettmuskulatur beobachtet werden. Beide Gruppen zeigten im Unterschied zu den 10-Tagegruppen nur Reste der degenerativ veränderten Fasern innerhalb der Muskeltasche bzw. der bindegewebigen Bereiche, an denen eine Phagozytose durch mehrkernige Riesenzellen nachgewiesen werden konnte. Hinsichtlich der Menge und Verteilung des Klebstoffes sowie seiner Phagozytose durch polynukleäre Zellen ergaben sich keine Unterschiede zur Klebstoffgruppe nach 10 Tagen Beobachtungsdauer. Im Übrigen zeigte das histologische Bild beider Gruppen die schon bei den 10-

Tagegruppen nachgewiesenen regenerativen und seltener degenerativen Prozesse einzelner Muskelfasern.

3 Monate - Gruppen (Klebstoff/Kontrolle)

Mit Ausnahme von zwei Präparaten war bei der Klebstoffgruppe eine Muskeltasche mit Klebstoffinhalt auf allen Präparaten sichtbar. Dabei fiel die bindegewebige Abgrenzung der Klebstoffreste bei dieser Gruppe deutlich schmäler aus, vielmehr schien das bindegewebige Granulationsgewebe nun vermehrt in den Klebstoffbereich vorgedrungen zu sein und verlieh diesem ein zerklüftetes, inselförmiges Aussehen (Abb. 53). Eine einheitliche, nicht zerklüftete Klebstoffansammlung fand sich nur noch bei einem Tier. Vereinzelt fanden sich bei drei Tieren angrenzend an Klebstoffreste schollig-vakuolär zerfallende Muskelfaserreste, die vermehrt Kapillareinsprossungen zeigten und von Riesenzellen sowie mononukleären Zellen umgeben bzw. infiltriert wurden.

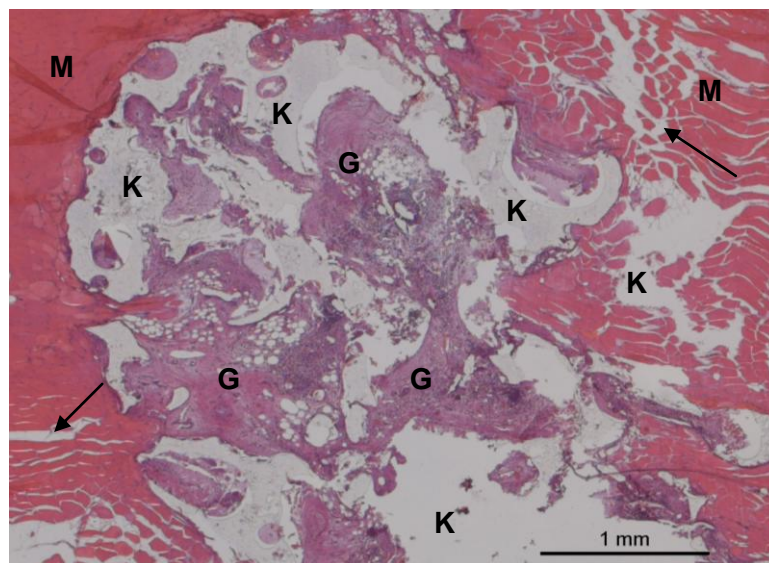


Abb. 53 Lichtmikroskopie - Klebstoffgruppe nach 3 Monaten. Übersichtsaufnahme der muskulären Rückentasche mit deutlich zerklüftetem Klebstoffbereich (K) durch einsprossendes Granulationsgewebe (G), Skelettmuskulatur (M), Artefakte (→) (H.E., 2,5x)

Darüber hinaus waren innerhalb des Granulationsgewebes und direkt am Klebstoff zahlreiche mehrkernige Riesenzellen sichtbar (Abb. 54a-c). Bei zwei Tieren war kein Klebstoff angechnitten, lediglich unauffällige Muskulatur und einzelne Fettgewebsansammlungen kamen zum Vorschein.

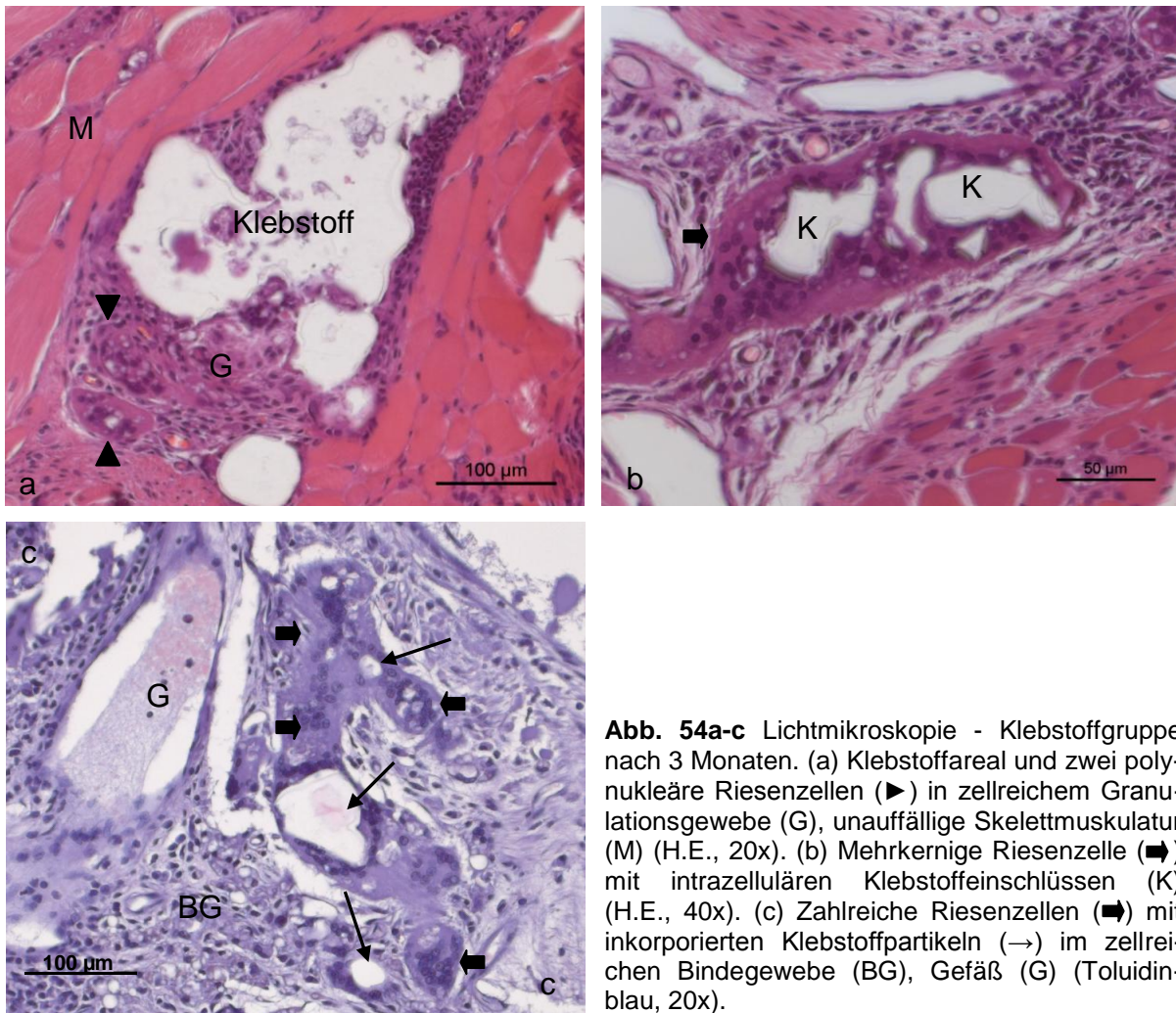


Abb. 54a-c Lichtmikroskopie - Klebstoffgruppe nach 3 Monaten. (a) Klebstoffareal und zwei polynukleäre Riesenzellen (▴) in zellreichem Granulationsgewebe (G), unauffällige Skelettmuskulatur (M) (H.E., 20x). (b) Mehrkernige Riesenzelle (▣) mit intrazellulären Klebstoffeinschlüssen (K) (H.E., 40x). (c) Zahlreiche Riesenzellen (▣) mit inkorporierten Klebstoffpartikeln (→) im zellreichen Bindegewebe (BG), Gefäß (G) (Toluidinblau, 20x).

Basophil erscheinende Fasern wurden seltener beobachtet, vielmehr fanden sich vermehrt im bindegewebigen Bereich um die Klebstoffreste Muskelfasern, die Kaliber und Farbe betreffend den peripheren Muskelfasern ähnelten, jedoch oftmals zentrale, aufgetriebene Kerne mit deutlichem Nukleolus besaßen. Kernreiche Auftreibungen sowie ein „aufgesplittetes“ Erscheinungsbild einzelner Muskelfasern kamen sehr selten vor. Anzeichen einer Entzündung oder ausgeprägte Einblutungen in das Muskel- oder Bindegewebe traten nicht auf.

Im Unterschied zur Klebstoffgruppe zeigten die Präparate der Kontrolle unauffällige Skelettmuskulatur sowie Anschnitte von Fettgewebe. Hinweise auf einen vorausgegangenen Defekt z.B. bindegewebiges Narbengewebe konnte nicht beobachtet werden (Abb. 55).

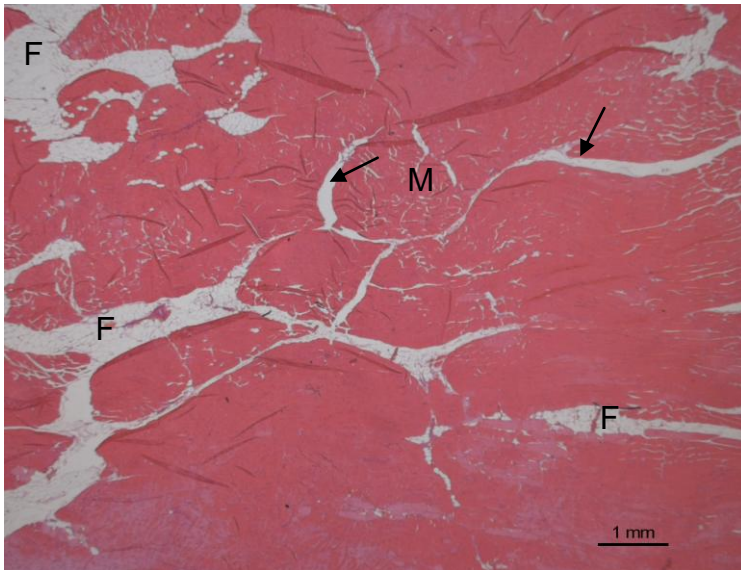


Abb. 55 Lichtmikroskopie - Kontrollgruppe nach 3 Monaten. Übersichtsaufnahme mit unauffälliger Skelettmuskulatur (M) ohne Hinweise auf einen vorausgegangenen Defekt, Fettgewebe (F), Artefakte (→) (H.E., 1,25x).

Nach 3 Monaten fand sich bei der Klebstoffgruppe insgesamt eine fortgeschrittene Resorption des Klebstoffes durch mehrkernige Riesenzellen, die zusammen mit dem in den Klebstoffbereich vorgedrungenem Granulationsgewebe zu einer Aufspaltung der Klebstoffbezirke in kleinere, inselförmige Areale geführt hatte. Weiterhin konnte bei zwei Tieren kein Klebstoff mehr festgestellt werden. Regenerationsprozesse der Skelettmuskulatur waren nach wie vor vorhanden, jedoch in einem fortgeschrittenerem Stadium. In der Kontrollgruppe dagegen schienen die Regenerations- und Resorptionsprozesse abgeschlossen, alle Präparate zeigten unauffällige Skelettmuskulatur ohne Zeichen eines vorausgegangenen operativen Eingriffs.

12 Monate - Gruppen (Klebstoff/Kontrolle)

Bei der histologischen Auswertung der Klebstoffgruppe nach 12 Monaten zeigten die Präparate aller vier Tiere noch Klebstoff. Dieser befand sich, lediglich durch einen schmalen, bindegewebigen Saum abgegrenzt, innerhalb einer vom histologischen Bild her völlig unauffälligen Skelettmuskulatur. Entsprechend den scheinbar abgeschlossenen Anpassungs- und Regenerationsvorgängen waren Zeichen der Degeneration oder regenerative Prozesse des Muskelgewebes nach 12 Monaten kaum zu sehen.

Der Klebstoff bzw. die Klebstoffpartikel waren in den Übersichtsaufnahmen nicht auf Anhieb zu identifizieren, vielmehr imponierte inmitten der Muskulatur ein farblich und

strukturell uneinheitlich erscheinender Bereich, in dem erst bei höheren Vergrößerungen Klebstoffpartikel identifiziert werden konnten (Abb. 56a-c).

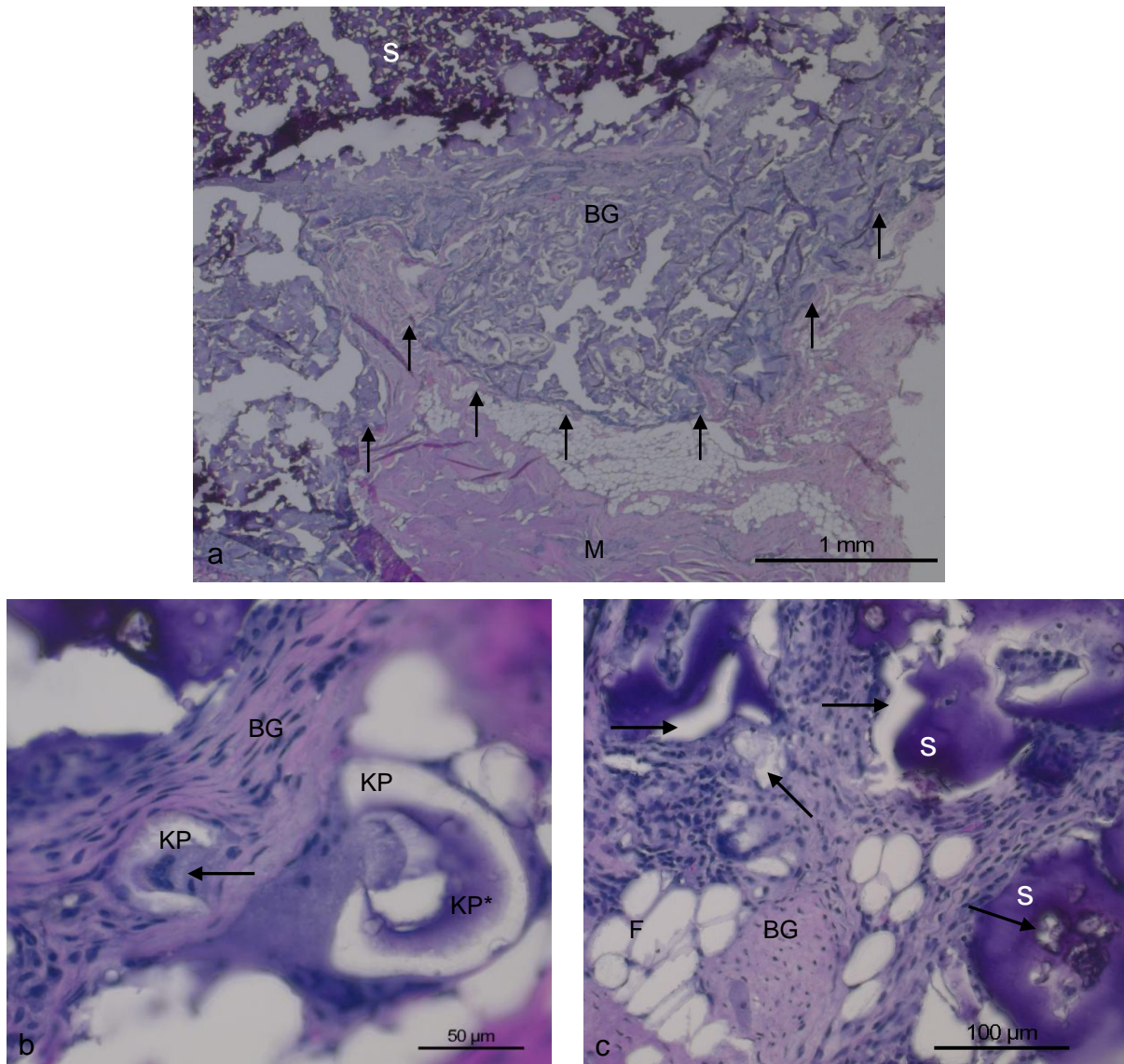


Abb. 56a-c Lichtmikroskopie - Klebstoffgruppe nach 12 Monaten. (a) In der Übersicht wird innerhalb der Muskulatur (M) ein inhomogen strukturierter Bereich (↑↑) sichtbar, welcher peripher durch Bindegewebe (BG) aufgelockert erscheint und zentralwärts als bröckelige, schwarzviolette Masse (S) imponiert (H.E., 2,5x). (b) Detailaufnahme aus Abb. 56a - Klebstoffpartikel (KP) mit Phagozytose durch eine polynukleäre Zelle (→), basophile Färbung eines Klebstoffpartikels (KP^{*}), Bindegewebe (BG) (H.E., 40x). (c) Detailaufnahme aus Abb. 56a - Einzelne Klebstoffpartikel (→), dunkelviolette Substanz (S), Bindegewebe (BG), Fettzellen (F) (H.E., 20x).

In den H.E.-gefärbten Schliffrichten reichte das farbliche Spektrum des auffälligen Bereiches von hellviolett in der Peripherie bis zu schwarzviolett im Zentrum. Dabei zeigten die peripheren Zonen neben glatt begrenzten, homogen strukturierten und blaßviolettgefärbten Substanzansammlungen noch reichlich zellreiches Granulationsgewe-

be, welches diesen Bereichen ein aufgelockertes Erscheinungsbild verlieh. Zentralwärts zeigten sich zunehmend unregelmäßige Begrenzungen, eine dunklere Färbung und eine nun deutlich bröckelig zerfallende Strukturierung der Substanz, Bindegewebe war hier nicht mehr nachweisbar. Der restliche Klebstoff war größtenteils in Form einzelner Partikel innerhalb dieser Bereiche zu sehen, wobei in den peripheren, Bindegewebe enthaltenen Zonen auch mehrkernige Riesenzellen in Klebstoffnähe beobachtet werden konnten (Abb. 56b). Oftmals zeigten einzelne Klebstoffpartikel eine randständige basophile Färbung (Abb. 56b). In den Toluidinblau-gefärbten Präparaten zeigte sich ein ähnliches Bild. Dabei verliehen die durchsichtig schimmernden Klebstoffpartikel innerhalb der hier größtenteils dunkelblau bis dunkelviolett gefärbten Substanz dieser in den Übersichtsaufnahmen ein schwammartig aufgelockertes Aussehen. Bei höheren Vergrößerungen der neuartigen Substanz konnte meist eine homogene Struktur beobachtet werden. Gelegentlich konnten jedoch auch inhomogene, weißlich körnige Bereiche registriert werden.

Die Präparate der Kontrollgruppe zeigten, wie schon die Präparate der Kontrolle nach 3 Monaten, alle unauffällige quergestreifte Skelettmuskulatur ohne jeden Hinweis auf einen vorausgegangenen Defekt.

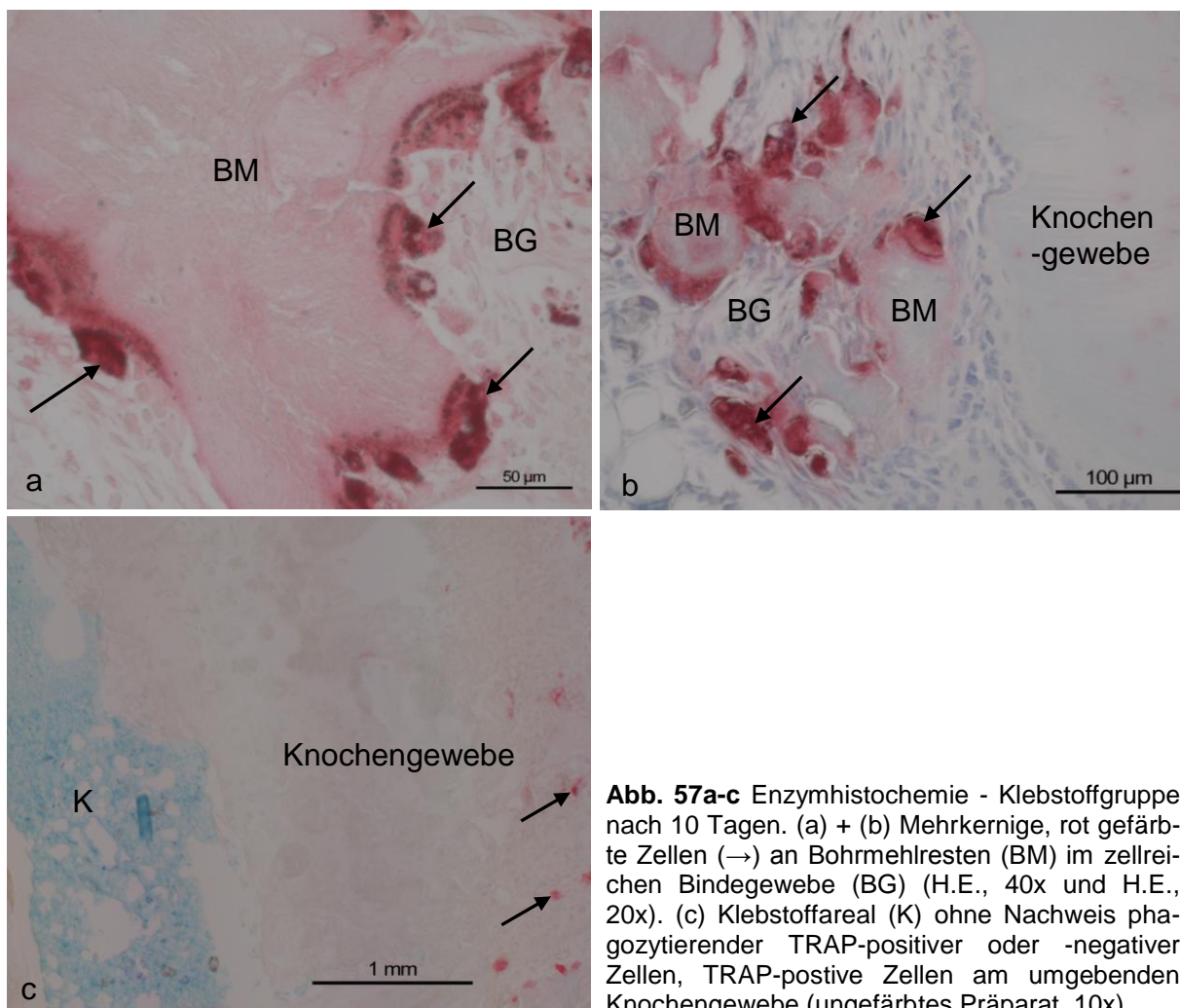
Insgesamt konnte bei der Klebstoffgruppe nach 12 Monaten noch Restklebstoff festgestellt werden. Im Gegensatz zur Klebstoffgruppe nach 3 Monaten war dieser nicht mehr in Form kleinerer, inselförmiger Areale organisiert, sondern bestand im Wesentlichen aus einzelnen Partikeln. Diese befanden sich innerhalb einer farblich und strukturell stellenweise sehr inhomogenen, in dieser Form bei den Vorgruppen nicht gesehenen Substanz, die durch einen schmalen Bindegewebsaum von der umgebenden, histologisch völlig unauffälligen Skelettmuskulatur getrennt wurde. Mehrkernige Riesenzellen in Klebstoffnähe deuteten auch nach 12 Monaten auf anhaltende Resorptionsprozesse der verbliebenen Klebstoffpartikel sowie der neu entstandenen Substanzformationen hin.

Das histologische Bild der Kontrolle deckte sich mit dem Befund nach 3 Monaten und zeigte abgeschlossene Resorptions- und Regenerationsprozesse bei einer unauffälligen Skelettmuskulatur. Entzündungsreaktionen konnten nach 12 Monaten bei beiden Gruppen nicht beobachtet werden.

4.3 Enzymhistochemische Analysen

Die Enzymhistochemie diente der Darstellung von Zellen, welche ein spezifisches Enzym namens tartratresistente saure Phosphatase (TRAP) besaßen. Dabei bewirkte die katalytische Funktion der TRAP eine Umsetzung des verwendeten Substratgemisches und die Entstehung spezifischer Reaktionsprodukte, welche wiederum durch die Kopplung an ein zugesetztes, rotes Pigment farblich markiert wurden, so dass entsprechende Zellen durch eine rote Anfärbung erkannt werden konnten.

Bei der 10-Tages-Klebstoffgruppe konnten mehrere rotgefärbte, vielkernige Zellen an Bohrmehlresten und Knochensplittern nachgewiesen werden (Abb. 57a-b). Am Klebstoffareal wurde nach diesem Beobachtungszeitpunkt kein zellulärer Abbau durch TRAP-positive- oder -negative Zellen beobachtet (Abb. 57c). Es konnten jedoch am umgebenden Knochen TRAP-positive, meist einkernige Zellen gefunden werden.



Bei der 21-Tagesgruppe waren wie schon bei der 10-Tagesgruppe zahlreiche rotgefärbte, meist mehrkernige Zellen an Bohrmehl und Knochensplittern sowie vereinzelt am peripheren Lagerknochen sichtbar (Abb. 58b). Darüber hinaus konnten nun vereinzelt an den Klebstoffresten ein- bis mehrkernige, TRAP-positive Zellen beobachtet werden (Abb. 58a). Eine Phagozytose des Klebstoffs durch vielkernige, TRAP-negative Zellen konnte zu diesem Beobachtungszeitpunkt nicht dokumentiert werden.

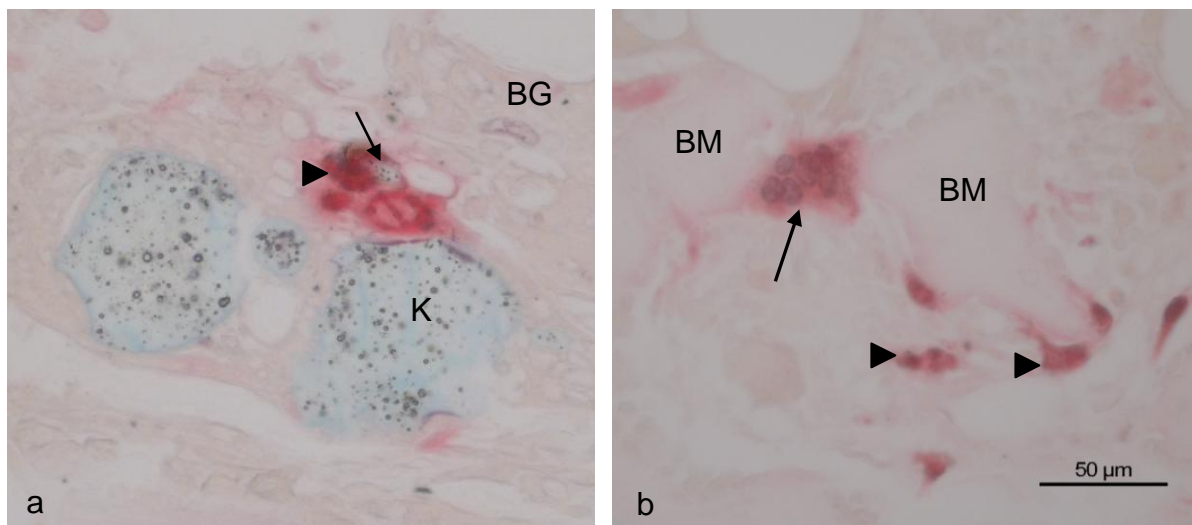


Abb. 58a-b Enzymhistochemie - Klebstoffgruppe nach 21 Tagen. (a) Mehrkernige, rot gefärbte Zelle (▶) mit phagozytiertem Klebstoffpartikel (→), Bindegewebe (BG) (ungefärbtes Präparat, 40x). (b) Polynukleäre Zelle (→) an Bohrmehlresten (BM), einkernige, rot gefärbte Zellen (▶), Bindegewebe (BG) (ungefärbtes Präparat, 40x).

In der 3-Monatsgruppe fiel eine deutliche zelluläre Resorption des Klebstoffes durch mehrkernige, nicht rot gefärbte (TRAP-negative) Riesenzellen auf (Abb. 59a-b). Darüberhinaus konnten vereinzelt einkernige TRAP-positive Zellen an den Klebstoffresten beobachtet werden. An den umgebenden Knochentrabekeln zeigten sich dagegen viele mehrkernige, rot gefärbte Riesenzellen (Abb. 59a).

Die Präparate der 12-Monatsgruppe zeigten ähnlich den Ergebnissen der 3-Monatsgruppe eine Phagozytose des Knochenklebstoffs durch TRAP-negative, d.h. nicht rotgefärbte, mehrkernige Riesenzellen (Abb. 60a-b). Vereinzelt fanden sich auch meist einkernige TRAP-positive Zellen am Klebstoff (Abb. 60b). TRAP-positive, mono- oder polynukleäre Zellen am umgebenden Knochengewebe fanden sich hier seltener als in der Gruppe nach 3 Monaten Beobachtungsdauer (Abb. 60a).

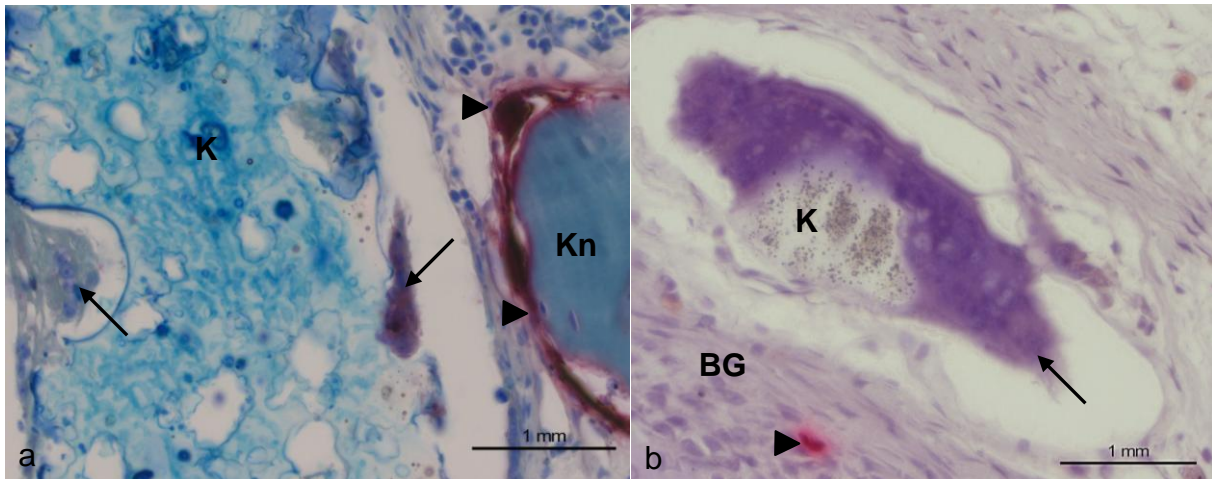


Abb. 59a-b Enzymhistochemie - Klebstoffgruppe nach 3 Monaten. (a) Phagozytose des Klebstoffes (K) durch mehrkernige, TRAP-negative Zellen (→), rot angefärbte Zellen (▶) am Knochen (Kn) (Toluidinblau, 20x). (b) TRAP-negative Riesenzelle(→) mit phagozytiertem Klebstoffrest (K), TRAP-positive, einkernige Zelle (▶) im Bindegewebe (BG) (H.E., 40x).

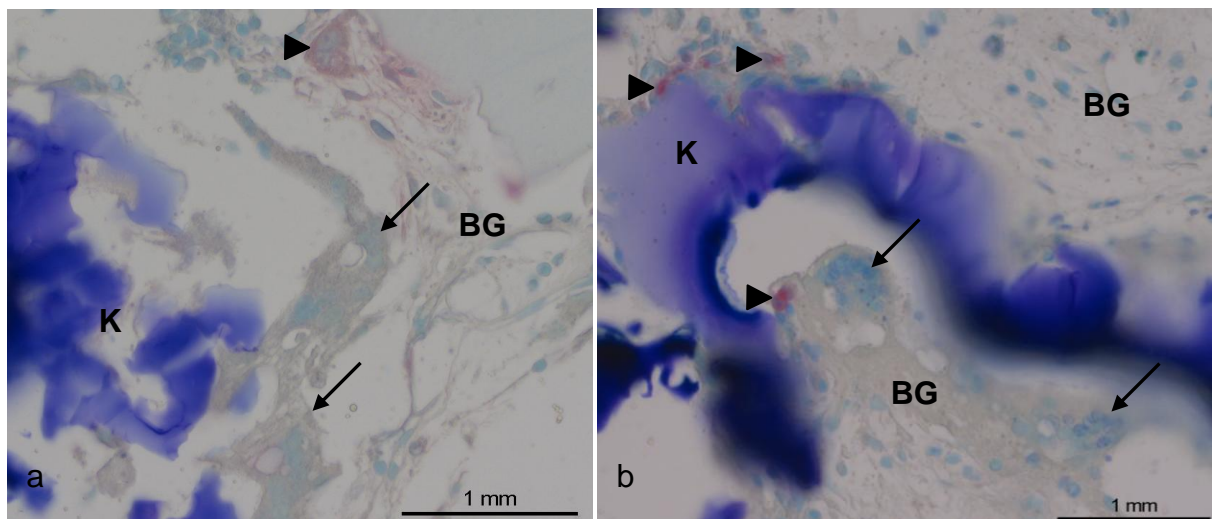


Abb. 60a-b Enzymhistochemie - Klebstoffgruppe nach 12 Monaten. (a) Phagozytose der Klebstoffreste (K) durch TRAP-negative Riesenzellen (→), mehrkernige TRAP-positive Zelle (▶) im Bindegewebe (BG) (Toluidinblau, 40x). (b) Polynukleäre Riesenzellen ohne TRAP-Aktivität (→), rot angefärbte, einkernige Zellen (▶) am Klebstoff (K), Bindegewebe (BG) (Toluidinblau, 40x).

4.4 Transmissionselektronenmikroskopische Analysen

Die Transmissionselektronenmikroskopie (TEM) diente als ergänzende feingewebliche Untersuchung. In Abbildung 61 kann die Phagozytose von Bohrmehl/Knochen splittern und von TCP-Partikeln des Klebstoffes durch eine mehrkernige Riesenzelle nach 10 Tagen Beobachtungsdauer gezeigt werden. Dabei fanden sich im Zytoplasma der Riesenzellen neben phagozytierten Klebstoffpartikeln Vakuolen mit einer

elektronendichten, homogenen Substanz (Abb. 61). Ferner waren in Detailvergrößerungen Ribosomen und zahlreiche Mitochondrien im Zytoplasma als Zeichen von zellulärer Aktivität sichtbar.

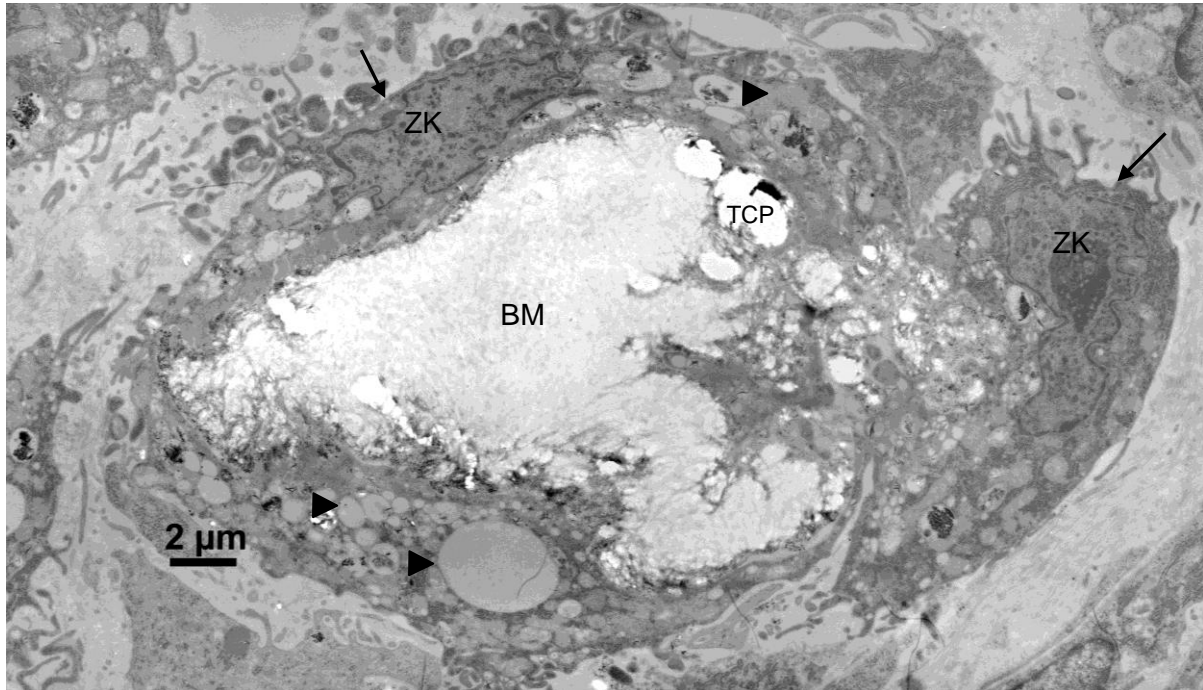


Abb. 61 Elektronenmikroskopie - Klebstoffgruppe nach 10 Tagen. Phagozytose von TCP-Partikeln und Bohrmehl (BM) durch eine mehrkernige Zelle (→), Zellkern (ZK), intrazelluläre Sekreteinschlüsse (▶), Bohrmehl (BM) (Vergr. x3390).

Der Klebstoff stellte sich auf den transmissionselektronenmikroskopischen Präparaten als homogene Masse mit darin identifizierbaren TCP-Partikeln dar (Abb. 62). Nach 21 Tagen konnte eine rege zelluläre Phagozytose des Klebstoffs durch mehrkernige Riesenzellen dokumentiert werden.

Abb. 62 zeigt die Phagozytose des Klebstoffes und der darin enthaltenen TCP-Partikel durch eine mehrkernige Riesenzelle. Diese zeigte sich bei der Betrachtung unter dem Elektronenmikroskop auf ihrer apikalen, dem Klebstoff zugewandten Seite glatt begrenzt, während die basale, dem Klebstoff abgewandte Seite einen ausgeprägten Mikrovilisaum erkennen ließ (Abb. 62).

Mit ihren zahlreichen Pseudopodien umfasst sie zum einen Teile des zu phagozytierenden Klebstoffs und zum anderen Ansammlungen einer elektronendichten, homogenen Substanz, welche sich in Form von Vesikeln auch innerhalb der Klebstoffareale wiederfindet.

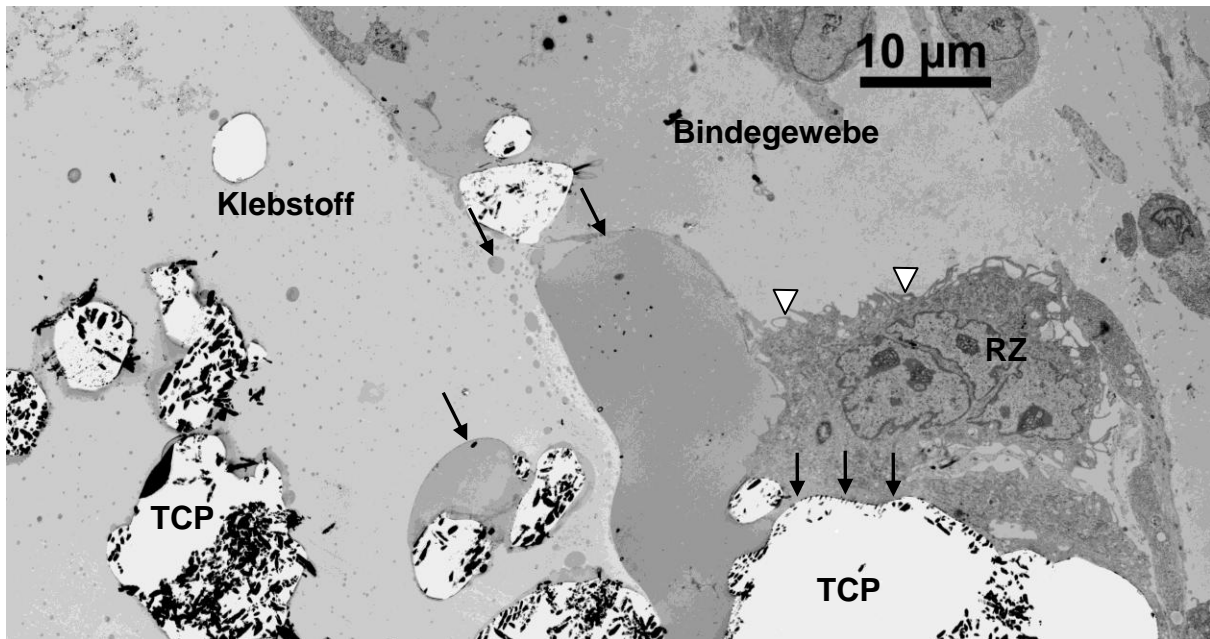


Abb. 62 Elektronenmikroskopie - Klebstoffgruppe nach 21 Tagen. Homogener Klebstoffbereich mit darin enthaltenen TCP-Partikeln. Mehrkernige Riesenzelle (RZ) mit Mikrovillisaum auf der basalen Seite (Δ), Phagozytose von TCP-Partikeln ($\Downarrow\Downarrow$), elektronendichte Substanz an der Riesenzelle (\rightarrow) und in Form von Vakuolen im Klebstoffbereich (\rightarrow) (Vergr. $\times 1028$).

In Abb. 63 ist eine mehrkernige Riesenzelle mit phagozytierten TCP-Partikeln abgebildet. In der Mitte der Riesenzelle sind zwei elektronendichte Zellkerne angeschnitten, deren Heterochromatin kumuliert am Rand der inneren Kernmembran liegt.

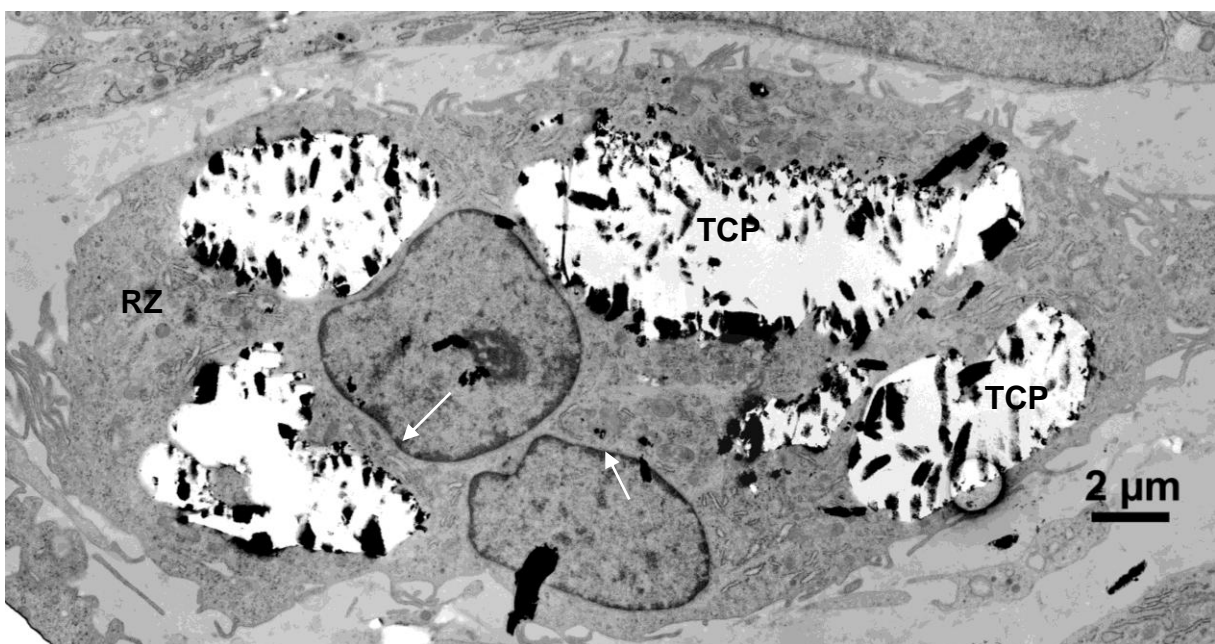


Abb. 63 Elektronenmikroskopie - Klebstoffgruppe nach 21 Tagen. Mehrkernige Riesenzelle (RZ) mit phagozytierten TCP-Partikeln, kumulierte heterochromatische Kernanteile am Rand der inneren Kernmembran (\rightarrow) (Vergr. $\times 3390$).

Abb. 64 zeigt in der mehrkernigen Riesenzelle Einschlüsse, welche in ihrer Elektronendichte dem Klebstoff gleichen und damit Hinweis für die Endozytose des Klebstoffes sind.

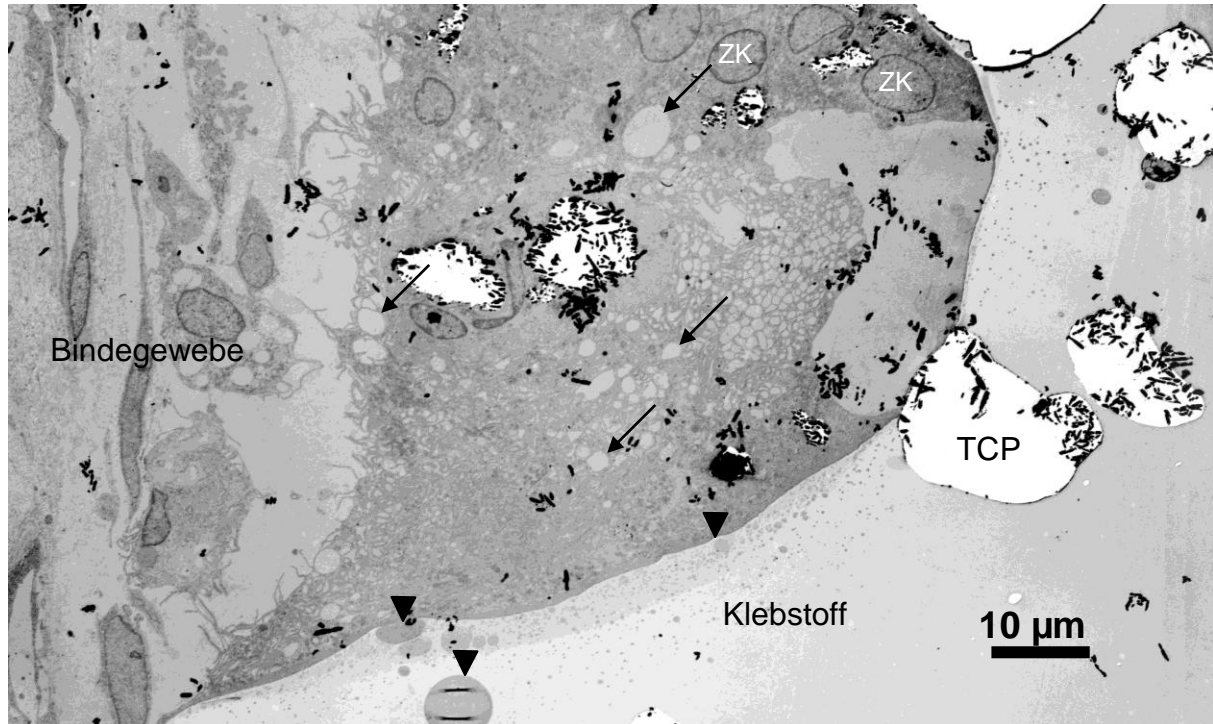


Abb. 64 Elektronenmikroskopie - Klebstoffgruppe nach 21 Tagen. Mehrkernige Riesenzelle mit zum Knochenklebstoff strukturgleichen Einschlüssen (→), Zellkerne (ZK), Abgabe kleiner Vesikel mit elektronendichterer Substanz in den Klebstoffbereich (▶) (Vergr. x628).

Neben der Endozytose des Klebstoffes lässt sich die Freisetzung einer homogenen, elektronendichten Substanz in Form kleiner Vesikel in den Klebstoffbereich nachweisen (Abb. 64, Abb. 65a).

In höheren Vergrößerungen lässt sich eine dünne Schicht mit noch stärkerer Elektronendichte in der Interfaceregion zwischen dem Plasmalemm der Riesenzellen bzw. der von den Riesenzellen gebildeten elektronendichten Substanz und dem Knochenklebstoff beobachten (Abb. 65a-b).

Hierbei scheint es sich ebenfalls um eine vom endoplasmatischen Retikulum der Riesenzellen gebildete Schutzsubstanz zu handeln, welche in Form von kleinen Exozytosevesikeln auf das Plasmalemm gebracht wurde (Abb. 66).

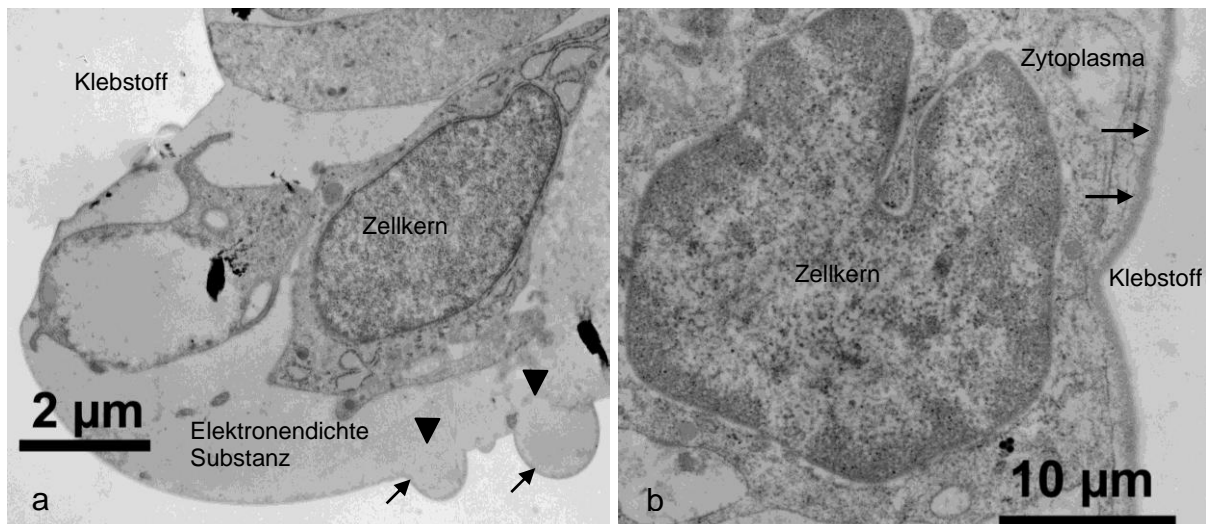


Abb. 65a-b Elektronenmikroskopie - Klebstoffgruppe nach 3 Monaten. (a) Apozytose einer homogenen Substanz in den Klebstoffbereich (▶), elektronendichter Saum (→) an Klebstoff/Substanz-Interface (Vergr. x4940). (b) Elektronendichte Schicht (→) an Klebstoff/Plasmalemm-Interface (Vergr. x12770).

Die bereits lichtmikroskopisch bei der 12-Monats-Klebstoffgruppe aufgefallenen Areale mit einer neu formierten, bis dato nicht gesehenen Substanz stellten sich bei transmissionselektronenmikroskopischer Betrachtung unterschiedlich dar. Verglichen mit gesundem Knochengewebe waren diese immer elektronendichter (Abb. 67a).

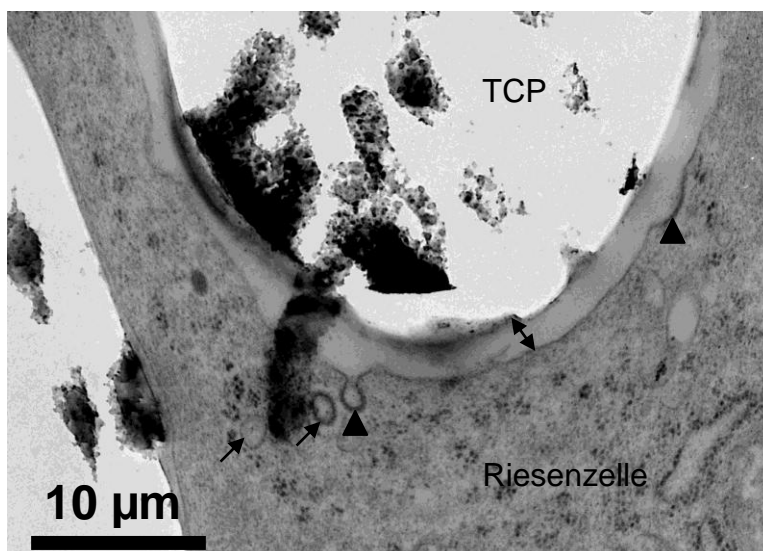


Abb. 66 Elektronenmikroskopie - Klebstoffgruppe nach 21 Tagen. Durch kleine Invaginationen der Zellmembran (Plasmalemm) (▶), wird der elektronendichte Inhalt der Vesikel (→) auf das Plasmalemm gebracht und es kommt zur Ausbildung einer elektronendichten Schicht (↔) zwischen Knochenklebstoff und Plasmalemm der Riesenzelle (Vergr. x12770).

Dabei konnte man neben tiefschwarzen, eher homogenen Substanzformationen (Abb. 67a) auch Substanzformationen mit inhomogener Strukturierung sehen (Abb. 67b). Eine zelluläre Resorption dieser Areale durch eine mehrkernige Zelle kann in

Abb. 67a und Abb. 67c beobachtet werden. An der Grenze zwischen dem phagozytierten Substanzpräzipitat und dem Plasmalemm der Riesenzelle fand sich ein elektronendichter Saum (Abb. 67c). Ferner liessen sich Riesenzellen mit zahlreichen zum Knochenklebstoff strukturgleichen Vakuolen erkennen (Abb. 67d).

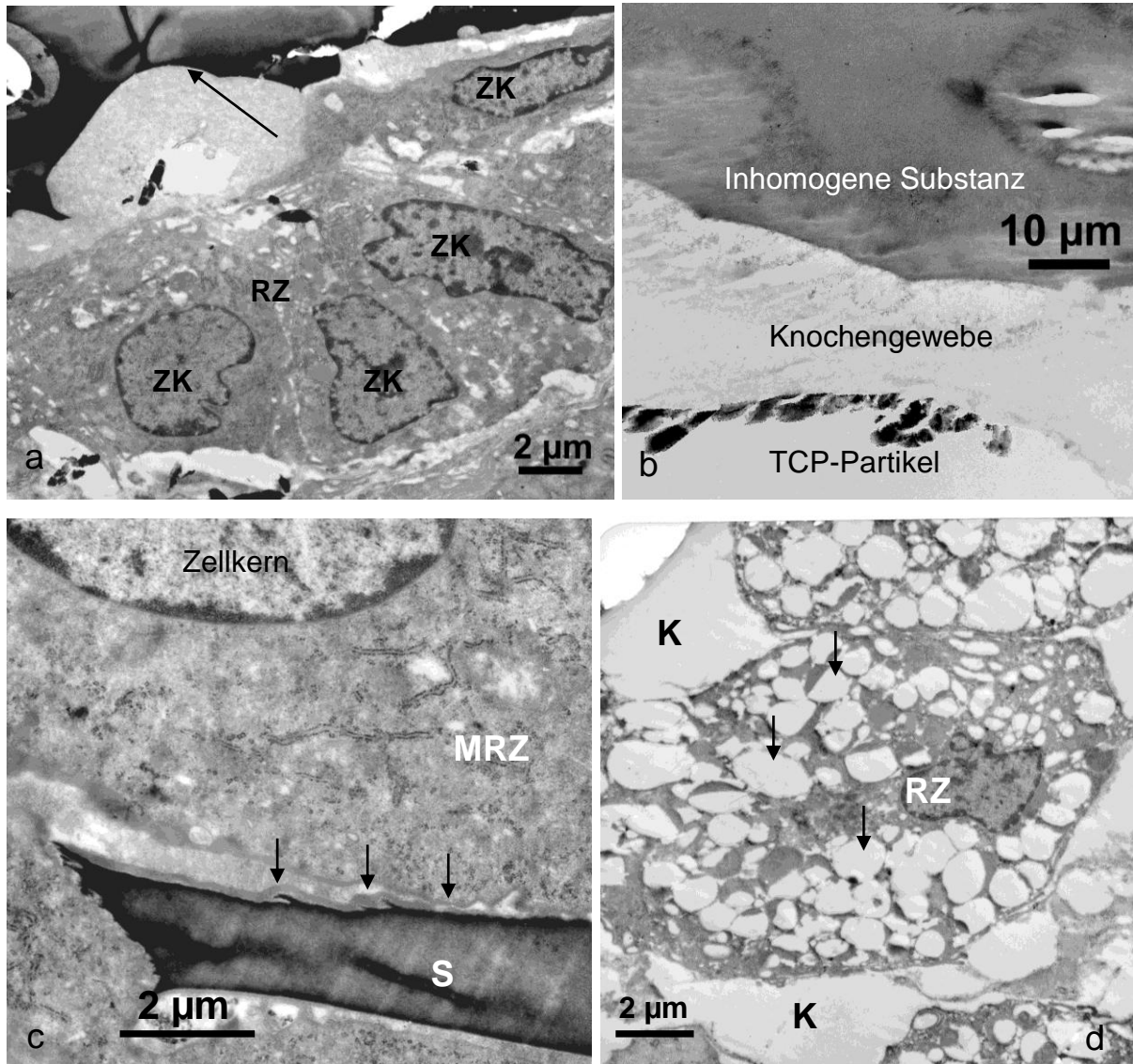


Abb. 67a-d Elektronenmikroskopie - Klebstoffgruppe nach 12 Monaten. (a) Phagozytierende, mehrkernige Riesenzelle (RZ) an schwarzem Substanzpräzipitat (\rightarrow), Zellkerne (ZK) (Vergr. x3390). (b) Von unten nach oben: TCP-Partikel, Knochengewebe und elektronendichte, inhomogene Substanz (Vergr. x6900). (c) Phagozytiertes Substanzpräzipitat (S) im Zytoplasma einer mehrkernigen Riesenzelle (MRZ), elektronendichter Saum (\rightarrow) um phagozytiertes Material (Vergr. x6900). (d) Riesenzelle mit zahlreichen zum Klebstoff (K) strukturgleichen, intrazellulären Einschlüssen (\rightarrow) (Vergr. x4940).

4.5 Histomorphometrische Analysen

Eine Übersicht über die histomorphometrisch erhobenen Daten sowie die mittels der Microsoft-Excell-Tabellenkalkulationsprogramms errechneten Parameter AOI (Area of Interest), BS (Bone Surface) und TBS (Trabecular Bone Surface) bietet die unten abgebildete Tabelle (Tab. 5).

Klebstoff	Tage	fl_kr_1	kn_fl_1	fl_kr_2	kn_fl_2	AOI	BS	TBS
mit	10	24,252	2,337	16,679	2,205	7,573	0,132	0,017
mit	10	24,784	2,876	17,8	2,833	6,984	0,043	0,006
mit	10	23,162	4,272	16,626	4,218	6,536	0,054	0,008
mit	10	24,829	4,466	17,661	4,418	7,168	0,048	0,007
mit	10	22,739	4,261	17,234	3,646	5,505	0,615	0,112
mit	10	28,193	4,77	18,759	4,753	9,434	0,017	0,002
mit	10	29,267	4,877	19,316	4,871	9,951	0,006	0,001
mit	21	23,891	6,753	16,683	6,626	7,208	0,127	0,018
mit	21	23,268	6,954	17,56	6,586	5,708	0,368	0,064
mit	21	24,019	6,664	18,095	5,078	5,924	1,586	0,268
mit	21	22,668	4,961	17,236	4,54	5,432	0,421	0,078
mit	21	27,175	8,0	18,836	7,817	8,339	0,183	0,022
mit	21	30,643	9,633	22,623	8,947	8,02	0,686	0,086
ohne	10	23,95	7,739	18,402	7,64	5,548	0,099	0,018
ohne	10	24,151	9,045	18,27	8,979	5,881	0,066	0,011
ohne	10	24,693	5,204	18,618	5,093	6,075	0,111	0,018
ohne	10	25,96	3,969	19,293	3,921	6,667	0,048	0,007
ohne	10	26,167	7,02	19,371	6,933	6,796	0,087	0,013
ohne	10	29,504	5,579	24,337	5,517	5,167	0,062	0,012
ohne	21	27,896	4,738	18,088	4,368	9,808	0,37	0,038
ohne	21	26,472	10,124	18,276	7,76	8,196	2,364	0,288
ohne	21	30,387	7,861	22,653	7,703	7,734	0,158	0,020
ohne	21	28,058	9,324	19,389	6,755	8,669	2,569	0,296
ohne	21	24,398	8,622	16,367	5,933	8,031	2,689	0,335
ohne	21	26,594	8,272	18,983	5,624	7,611	2,648	0,348

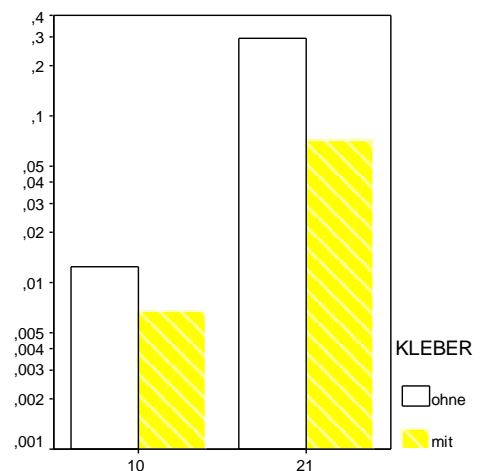
Tab. 5 Messergebnisse der Flächenberechnungen für Figur 1 (fl_kr_1) und Figur 2 (fl_kr_2), der gemessenen Knochendichten (in mm^2) innerhalb dieser Figuren (kn_fl_1 und kn_fl_2) sowie Darstellung der errechneten Größen AOI, BS und TBS (in%) für die Klebstoffgruppen (mit) und Kontrollgruppen (ohne) der Versuchsdauern 10 Tage und 21 Tage.

In Tabelle 6 und Tabelle 7 sind die Mediane und Spannweiten für die errechneten TBS-Werte der einzelnen 10 Tage- und 21 Tage-Gruppen auf logarithmischer Skala dargestellt. TBS entspricht dem prozentualen Anteil des Knochengewebes im Osteotomiespalt. Die Mediane geben eine zentrale Tendenz der gemessenen TBS-Werte einer Beobachtungsdauer an, wobei die Spannweiten die Grenzen zwischen minimal

und maximal gemessenem Median anzeigen. Dabei zeigte sich, dass sowohl nach 10 als auch nach 21 Tagen Beobachtungsdauer in den Klebstoffgruppen die Mediane der TBS-Werte und damit die Knochenneubildungsrate im Osteotomiespalt niedriger als bei den Kontrollgruppen waren (Mann-Whitney-Rangtest) (je $p=0,18$). Beim Vergleich der Klebstoff- und Kontrollgruppe nach 10 Tagen zeigte sich mit einem Median der TBS-Werte von 1,2% bei der Kontrollgruppe zu 0,7% bei der Klebstoffgruppe ein Unterschied, der jedoch nicht als signifikant gemessen werden konnte ($p=0,18$).

	Kontrollgruppe	Klebstoffgruppe
10 d	Median: 1,2% SW: (0,7% - 1,8%) n=6	0,7% (0,1% - 11,2%) n=7
21 d	Median: 29,2% SW: (2% - 34,8%) n=6	7,1% (1,8% - 26,8%) n=6

Tab. 6 Mediane und Spannweiten (SW) der TBS-Werte [in%] als Indikator für die Knochenneubildungsrate der Kontroll- und Klebstoffgruppen der Versuchsdauern 10 Tage und 21 Tage.



Tab. 7 Mediane der TBS-Werte (Trabecular Bone Surface) (y-Achse) als Parameter der Knochenneubildung im Osteotomiespalt. Darstellung in Anteilen auf logarithmischer Skala getrennt nach Versuchsdauer in Tagen (x-Achse) und Behandlung (mit/ohne Klebstoff).

Es fiel auf, dass bei der Spannweite in der Klebstoffgruppe mit 11,2% als maximal gemessenem Median ein deutlich höherer Wert vorlag als bei der Kontrollgruppe (1,8%) (Tab. 6). Dies bedeutet, dass bei einem Tier der Klebstoffgruppe verglichen mit den übrigen Tieren der Klebstoff- und Kontrollgruppe nach 10 Tagen mit 11,2% eine deutlich höhere Knochenneubildungsrate im Osteotomiespalt gemessen wurde. Nach 21 Tagen zeigte sich bei der Kontrollgruppe mit 29,2% ein 4,1fach höherer Median der TBS-Werte als bei der Klebstoffgruppe (7,1%), d.h. es lag ein 4,1fach höherer prozentualer Anteil an Knochengewebe im Osteotomiespalt vor. Dieser Unterschied war jedoch nicht signifikant ($p=0,18$) und lag somit noch im Zufallsbereich. Die Spannweiten der Kontroll- und Klebstoffgruppen differierten nach 21 Tagen mit 2% - 34,8% bei der Kontrolle zu 1,8% - 26,8% bei der Klebstoffgruppe (Tab. 6). Insgesamt kann bei der Kontrollgruppe zu beiden Beobachtungszeitpunkten verglichen

mit der zugehörigen Klebstoffgruppe ein höherer prozentualer Anteil an Knochengewebe im Osteotomiespalt beobachtet werden, die Unterschiede ließen sich jedoch statistisch nicht sichern (Mann-Whitney-Rangtest, $p=0,18$) (Tab. 7).

5. Diskussion

In vielen operativen Fächern werden heutzutage Biomaterialien eingesetzt. Vor allem in der operativen Orthopädie und Traumatologie steht der Einsatz verschiedenster Biomaterialien im Mittelpunkt, dabei reicht das Spektrum von chirurgischem Nahtmaterial, Schrauben und Platten bis zu Endoprothesen und dem künstlichen Ersatz ganzer Gelenke. Der Begriff Biomaterial wurde 1988 von Williams als „jegliche Substanz oder Kombination von Substanzen (ausgenommen Medikamente), die synthetischen oder natürlichen Ursprungs sind und für jeden möglichen Zeitraum als Ganzes oder Teil eines Behandlungssystemes irgendein Gewebe, Organ oder eine Körperfunktion behandelt oder ersetzt“ definiert [Williams 1988].

Demnach fallen Knochenklebstoffe als Materialien, die in Kontakt mit menschlichen Zellen, Geweben und Körperflüssigkeiten treten ebenfalls in die Kategorie Biomaterialien. An Biomaterialien im Allgemeinen und Knochenklebstoffe im Speziellen werden im Hinblick auf ein langfristig gutes Ergebnis verschiedenste Anforderungen gestellt, welche bereits in der Einleitung ausführlich besprochen wurden (siehe Kap. 2.1). Eine der wichtigsten Voraussetzungen bei der Anwendung eines körperfremden Knochenklebstoffes ist dabei neben einer adäquaten zellulären Resorption und Degradation die Biokompatibilität. Dieser Begriff wurde 1988 von Williams als „Fähigkeit des Materials, eine angemessene Gewebereaktion des Empfängers bei spezifischer Applikation zu erzeugen“ definiert [Williams 1988]. Nach Kawahara ist ein Material dann biokompatibel, wenn es weder toxisch, noch mutagen wirkt, es zu keiner Sensibilisierung kommt und für Zellen adhäsiv ist [Kawahara 1985].

Eine Einteilung der biokompatiblen Materialien anhand ihrer Interaktion mit Knochengewebe wurde 1978 von OSBORN vorgenommen. Dieser klassifizierte Biomaterialien als biotolerante, bioinerte und bioaktive Substanzen [Osborn 1978].

Biotolerante Substanzen werden vom eigentlichen Knochen durch eine Bindegewebsschicht getrennt, weshalb lediglich eine sog. Distanzosteogenese möglich wird. Im Falle eines Knochenklebstoffes würde eine fibröse Umscheidung bei

zusätzlich fehlender Resorption und Degradation eine Behinderung der Osteogenese und im schlimmsten Falle die Ausbildung einer Pseudarthrose bedeuten.

Bioinerte Materialien üben praktisch keinen Effekt - also weder im positiven noch im negativen Sinn - auf das Gewebe aus. Ferner kommt es zu keinerlei chemischen Reaktionen mit der biologischen Umgebung. Sie werden im Organismus nicht abgebaut und bewirken unter bestimmten Voraussetzungen eine Kontaktosteogenese mit dem umgebenden Knochen. Für einen Knochenklebstoff wäre auf lange Sicht der fehlende Abbau im Hinblick auf eine aktive Osteogenese hinderlich, weshalb diese Eigenschaft trotz des neutralen Verhaltens im biologischen Milieu bei einem Knochenklebstoff ebenfalls nicht als ideal anzusehen wäre.

Die dritte Klasse wird von den *bioaktiven Materialien* gebildet. Diese haben aufgrund einer dem Knochen chemisch ähnelnden Struktur die Eigenschaft, dass der Knochen mit ihnen eine direkte chemische Verbindung eingehen kann (Verbundosteogenese). Zu dieser Gruppe gehören z.B. Kalzium-Phosphat-Keramiken wie das β -Tricalciumphosphat, welches zu den im Körper vollständig resorbierbaren Materialien gehört und einen wesentlichen Hauptbestandteil des untersuchten Knochenklebstoffes darstellt. Darüber hinaus sollen diese Materialien in der Lage sein Gewebeneubildung zu induzieren [Osborn 1985], wobei diese Eigenschaft im Falle eines Knochenklebstoffes zwar wünschenswert jedoch nicht nötig wäre. Zwischen den einzelnen Gruppen gibt es durchaus auch Überschneidungen, weshalb diese strikte Einteilung mehr als eine theoretische zu betrachten ist.

Ziel dieser experimentellen Arbeit war es durch licht-, transmissionselektronenmikroskopische, enzymhistochemische und histomorphometrische Verfahren die Biokompatibilität des neuentwickelten Dreikomponenten-Knochenklebstoffes auf β -Tricalciumphosphat-Basis zu überprüfen. In nachfolgender Diskussion soll eine kritische Analyse der erzielten Ergebnisse erfolgen.

5.1 Tiermodell

Ein allgemein anerkanntes Tiermodell, das die Übertragbarkeit der experimentell gewonnenen Daten auf die beim Menschen zu erwartenden Verhältnisse zulässt und als Goldstandard Verwendung findet gibt es bisher nicht. Um die Biokompatibilität des neuentwickelten Knochenklebstoffes zu überprüfen, wurde ein Bohrlochdefekt-

modell an der Kaninchenfemurkondyle gewählt. Dieses Modell erlaubte durch das verwendete DBCS-System eine standardisierte und präzise Knochenzylinderentnahme ohne Hitzenekrosen und Mikrotraumatisierungen und sicherte damit eine hohe Reproduzierbarkeit. Für dieses Modell sprach zudem, dass die Femurkondyle als solche genügend Knochensubstanz für einen chirurgisch-tierexperimentellen Eingriff bot und der operative Zugangsweg lediglich mit einer geringen Gewebetraumatisierung verbunden war. Ferner wurde das gewählte Versuchsmodell bereits in der Vergangenheit in zahlreichen experimentellen Untersuchungen erfolgreich erprobt [Günther 1998, Kuijer 1998] und ermöglichte dadurch bereits in der Versuchsplanung eine entsprechende Berücksichtigung von Einfluss- und Störfaktoren. Von Nachteil könnte bei diesem Modell das erhöhte Risiko einer Nachblutung bei einer versehentlichen Eröffnung der Knochenmarkshöhle durch eine zu weit proximal erfolgte Zylinderentnahme sein. Ferner könnten eine nicht exakt zentrisch erfolgte Replantation des Zylinders sowie die infolge der Zylinderentnahme unterbrochene Blutzufuhr zu einer Beeinflussung der Untersuchungsergebnisse führen.

Im Hinblick auf die Auswahl einer geeigneten Versuchstierspezies für experimentelle Untersuchungen am Knochen existieren unterschiedliche Ansichten. Für das Kaninchen als Versuchstier sprach, dass ausgewachsene New-Zealand-White Kaninchen weitgehend eine dem menschlichen Knochen vergleichbare sekundäre Osteonstruktur [Wissing 1990] aufweisen. Zwar wird diese Knochenstruktur auch bei anderen Tierspezies wie z.B. dem Hund gefunden, dieser weist jedoch im Gegensatz zum Kaninchen große Rasseunterschiede und inhomogene Reaktionen mit individuellen Schwankungen auf den experimentellen Reiz auf [Wissing 1990, Hörner 1997]. Ein weiterer Vorteil des Kaninchens sind die im Vergleich zum Menschen im Zeitraffer ablaufenden physiologischen Frakturheilungsvorgänge, die besonders im Hinblick auf die Versuchsdauer als positiv zu bewerten sind, jedoch bei der Übertragbarkeit der Ergebnisse auf die Humansituation berücksichtigt werden müssen [Wissing 1990]. Gerade bei Versuchen mit hohen Fallzahlen ist der Einsatz des Kaninchens durch die günstigen Beschaffungs-, Futter- und Haltungskosten von Vorteil. Hinzu kommt, dass in der einschlägigen Literatur keine Allergien, erhöhte Infektanfälligkeiten oder Abstoßungsreaktionen bei verschiedenen Biomaterialien für das Kaninchen

als Versuchstierspezies dokumentiert worden sind [Wissing 1990, Kuijer 1998, Heiss 2003].

5.2 Makroskopische Befunde

Die makroskopische Beurteilung der operierten Femurkondylen der Kaninchen zeigte bei den Klebstoff- und Kontrollgruppen nach 10 Tagen auffällige Befunde. Bei beiden Gruppen konnten während der Präparationsphase und Probenentnahme in unterschiedlichem Ausmaß Wundheilungsstörungen, extraartikuläre Pusansammlungen, Gelenkergüsse sowie Hämatome im Operationsbereich beobachtet werden. Auffällig war, dass die klinischen Befunde zu einem Grossteil bei der lichtmikroskopischen Auswertung der Knochenschliffe nicht nachgewiesen werden konnten. Somit kann davon ausgegangen werden, dass es sich bei den dokumentierten Befunden um oberflächliche Wundkomplikationen handelte. Eine tiefe Wundinfektion mit Beteiligung des Kniegelenkes zeigte sich nach 10 Tagen bei keinem der Versuchstiere. Eine eitrig-sekretorische Entzündung im Gelenkspalt eines Kontrolltieres blieb ohne histopathologischen Nachweis. Bei einem Tier der 21-Tagesgruppe konnte trotz lichtmikroskopisch nachgewiesenem ausgeprägtem Entzündungsprozess makroskopisch keine Auffälligkeit beobachtet werden. In diesem Falle scheint die intraartikuläre Entzündungsreaktion noch nicht auf das umgebende Gewebe übergegangen zu sein.

Insgesamt konnten bei der makroskopischen Beurteilung der entnommenen Femurkondylen, speziell bei den Klebstoffgruppen keine pathologischen Auffälligkeiten registriert werden. Der implantierte Zylinder war zu den Beobachtungszeitpunkten 10 Tage, 21 Tage und 3 Monate deutlich sichtbar und hatte einen festen Sitz innerhalb des Bohrkanals. Es fanden sich keine makroskopischen Hinweise auf eine akute Entzündungsreaktion oder osteolytische Prozesse an den Femurkondylen. Nach 12 Monaten konnten die Zylinder nicht mehr in der Femurkondylen (Lagerknochen) abgegrenzt werden, welche sich auch hier makroskopisch unauffällig darstellten.

Im Bereich des Operationsgebietes am Rücken des Kaninchens konnten hinsichtlich der Wundheilung ähnliche Beobachtungen gemacht werden. Auch hier konnte bei einigen Tieren der Klebstoff- und Kontrollgruppe eine eitrig-sekretorische Wundsekretion zum Euthanasiezeitpunkt nach 10 und 21 Tagen beobachtet werden. Nur bei einem Tier zeigten die Pusansammlungen jedoch auch ein histologisches Korrelat in Form einer

abszessähnlichen Gewebeseinschmelzung. Die restlichen Befunde sind demnach ebenfalls als oberflächliche Wundkomplikationen zu interpretieren.

Die Wundheilung wird multifaktoriell beeinflusst, wobei zwischen lokalen und allgemeinen Einflussfaktoren unterschieden wird. Zu den lokalen Faktoren zählt man z.B. die Blutversorgung des Gewebes nach der Eröffnung, eine Denervation, die Blutstillung und Hämatombildung, eine lokale Infektion, die Operationstechnik und das Nahtmaterial [Hunt 2000, Robson 1988, Waldorf 1995]. Allgemeine Faktoren, die in Zusammenhang mit dem Ablauf der Wundheilung stehen sind u.a. der Ernährungszustand [Hunt 2000], der physische Status der Versuchstiere oder die intraoperative Körpertemperatur [Waldorf 1995, Kurz 1996]. In den von uns durchgeführten experimentellen Untersuchungen wurde versucht die erwähnten Einflussfaktoren z.B. in Form einer postoperativen Antibiotikumphylaxe, dem Operieren unter aseptischen Bedingungen und der Verwendung klinisch erfolgreich erprobter Operations- und Nahttechniken zu berücksichtigen. Leider konnte das Auftreten von lokalen Wundheilungsstörungen trotz unserer Bemühungen nicht vollkommen verhindert werden. Bei einigen Tieren der Klebstoff- und Kontrollgruppen nach 10 Tagen sowie bei einem Klebstofftier nach 21 Tagen wurden deutliche Gewichtsabnahmen und z.T. erhebliche Reduzierungen des Allgemeinzustandes dokumentiert. Da auch Kontrolltiere betroffen waren, erscheint ein ursächlicher Einfluss des Klebstoffes unwahrscheinlich. Möglicherweise boten die betroffenen Versuchstiere von vornherein keine optimalen gesundheitlichen Ausgangsbedingungen. Evtl. könnte hierbei eine erhöhte Infektanfälligkeit z.B. aufgrund einer Überzüchtung der Tiere oder suboptimaler Haltungsbedingungen (z.B. Bewegungsmangel) für die beobachteten Wundheilungsstörungen in Frage kommen. Ferner könnten die prä-, peri- und postoperativen Maßnahmen bei einigen Tieren Stresssituationen verursacht haben, welche eine ursächliche Rolle bei den beobachteten Zustandsverschlechterungen gespielt haben könnten.

5.3 Lichtmikroskopische Analysen

Nach **10 Tagen** konnte mittels der lichtmikroskopischen Untersuchungen sowohl bei der Klebstoff- als auch bei der Kontrollgruppe der Osteotomiespalt identifiziert werden. Dieser war zu diesem Zeitpunkt bei beiden Gruppen mit einem fibroblasten-

und kapillarreichem Granulationsgewebe sowie Knochensplintern und Bohrmehlresten im Sinne eines Frakturhämatoms ausgefüllt.

In der Klebstoffgruppe kam der Klebstoff größtenteils regelrecht im Bereich des Osteotomiespalt als homogene Masse zum Vorschein. Ein Abfließen des Klebstoffes in benachbarte intratrabekuläre Zwischenräume, wie von GIEBEL und RIMPLER (1981) bei Klebeversuchen mit Cyanoacrylaten beobachtet, konnte nicht aufgezeigt werden. Die gelegentlich vorkommenden Klebstoffausziehungen zu den Seiten erschienen am ehesten durch den Vorgang der Zylinderreplantation bedingt. Diese zeigte sich ebenfalls ursächlich für die stellenweise differierende Klebstoffmenge im Osteotomiespalt. Daneben müssen jedoch auch unter Berücksichtigung der Tatsache, dass die Operationen von zwei Teams parallel durchgeführt wurden, die individuellen Abweichungen zwischen den Operateuren hinsichtlich der Klebstoffdosierung als Ursache für die unterschiedlichen Klebstoffmengen bedacht werden. Insgesamt konnte die Konsistenz des zu untersuchenden Knochenklebstoffes jedoch als überaus gut bewertet werden.

Im Hinblick auf eine aktive Osteogenese zeigten beide Gruppen allenfalls geringe Geflechtknochenneubildungen. Bei einem Tier der Klebstoffgruppe jedoch konnte eine ausgeprägte Geflechtknochenbildung im Osteotomiespalt sowohl in direkter Klebstoffnähe als auch klebstofffern beobachtet werden. Eine unterschiedlich breite Spaltweite als mögliche Erklärung für die verstärkte Osteogenese konnte in dem Fall durch einen exakt zentral im Bohrkanal positionierten Zylinder nicht angeführt werden, so dass hier tatsächlich bereits eine beginnende Überbrückung des Osteotomiespalt zu sehen war. Der Klebstoff selbst lag dabei vollkommen reaktionslos in direkter Nähe zu den neugebildeten Knochen trabekeln und hatte keinen störenden Einfluss auf die stattfindende Osteogenese.

Eine Resorption des Klebstoffes durch ein- oder mehrkernige Zellen des phagozytären Systems konnte lichtmikroskopisch zu diesem Zeitpunkt noch nicht beobachtet werden. Insgesamt konnten sowohl bei der Klebstoff- als auch bei der Kontrollgruppe nur ausgesprochen wenige Zellen des Phagozytensystems im Osteotomiespalt gefunden werden, so dass nach 10 Tagen von einer erst beginnenden resorptiven Phase gesprochen werden muss.

Die nach 10 Tagen und im Verlauf auch nach 21 Tagen sichtbare noch nicht verknöcherte distale Epiphysenfuge des Femurs erschien in Anbetracht des Ausgangsalters

der Versuchstiere von 6 Monaten eher ungewöhnlich. KAWEBLUM konnte histologisch einen Wachstumsfugenschluss im distalen Femur bei New Zealand White Kaninchen nach 19-24 Wochen nachweisen [Kaweblum 1994]. Als Ursache für die prolongierte Verknöcherungszeit der Epiphysenfuge könnten genetische und/oder hormonelle Einflussfaktoren, wie z.B. ein zu niedriger Schilddrüsen- oder ein zu hoher Geschlechtshormonspiegel in Frage kommen. Daneben gibt es jedoch auch eine Reihe allgemeiner Faktoren wie z.B. den Organstoffwechsel, UV-Licht, Ernährung oder den Vitamin D, C und A Haushalt, die eine Rolle bei der Steuerung des Epiphysenschlusses spielen [Putz 1996]. Da die Epiphysenfuge sowohl bei der Klebstoff- als auch bei der Kontrollgruppe der betroffenen Standzeiten noch nicht verschlossen war und somit gleiche Voraussetzungen für beide Gruppen bestanden, zeigte sich diese Tatsache als nicht relevant hinsichtlich der histologisch beobachteten Unterschiede zwischen den beiden Gruppen.

In der Klebstoffgruppe konnten im Gegensatz zur Kontrollgruppe bei drei Tieren vereinzelt Ansammlungen von neutrophilen Granulozyten und Lymphozyten innerhalb des Osteotomiespalt nachgewiesen werden. Oftmals handelt es sich bei solchen Infiltraten um resorptiv-entzündliche Vorgänge im Rahmen der Wundheilung, mit dem Ziel die durch die Frakturierung angefallenen Gewebstrümmer zu beseitigen. Ein Zusammenhang des Auftretens dieser Infiltrate mit dem implantierten Knochenklebstoff konnte nicht sicher ausgeschlossen werden, jedoch erschien er aufgrund der räumlichen Entfernung der entzündlichen Infiltrate zum implantierten Klebstoff sehr unwahrscheinlich. Zudem konnten keine Osteolysen sowie eine unauffällige Knochen-Klebstoffgrenze beobachtet werden.

Nach **21 Tagen** konnten bei beiden Gruppen ausgeprägte Geflechtknochenneubildungen im Osteotomiespalt nachgewiesen werden. Dabei konnte im Hinblick auf die Osteogeneserate ein deutlicher Vorsprung der Kontrolle gegenüber der Adhäsivgruppe dokumentiert werden. Ursächlich für die verzögerte Knochenheilung in der Klebstoffgruppe zeigte sich die temporäre Barrierefunktion des implantierten Klebstoffes bzw. die Tatsache, dass anders als bei der Kontrolle in der Klebstoffgruppe zunächst ein zeitkostender Klebstoffabbau erfolgen musste, um freie Areale für die Osteogenese zu schaffen. Demzufolge erschien die vorübergehende Verzögerung der Knochenheilung bei der Klebstoffgruppe nicht ungewöhnlich.

Dabei ist das Verhältnis der Abbaugeschwindigkeit des Klebstoffes und des damit verbundenen Verlustes der mechanischen Stabilität zu dem Gewinn an Stabilität durch Aufbau körpereigenen Knochens von größter Wichtigkeit im Hinblick auf eine stabile Verbindung. Idealerweise sollte ein umgekehrt proportionales Verhältnis zwischen Klebstoffdegradation und Knochenneubildung bestehen, bei dem der Klebstoffabbau und die Osteogenese im Osteotomiespalt in auf einander abgestimmter Geschwindigkeit verlaufen.

Insgesamt zeigte sich nach 21 Tagen, dass der Klebstoff zwar verglichen mit der Kontrollgruppe zu einer verzögerten Osteogenese geführt hat, es jedoch trotz seiner Anwesenheit und v.a. direkt an ihn angrenzend zu deutlichen Knochenneubildungen kam. Bei den beschriebenen osteogenetischen Prozessen im Osteotomiespalt handelt es sich, besonders vor dem Hintergrund eines 0,3 mm messenden Osteotomiepaltes, hauptsächlich um eine primäre Knochenheilung im Sinne einer Spaltheilung. Es ist jedoch nicht auszuschließen, dass gelegentlich, besonders bei nicht zentral positionierten Zylindern, aufgrund der resultierenden unterschiedlich weiten Osteotomiezonen auch intermediäres Bindegewebe sekundär zu Geflechtknochen umgewandelt wurde.

Der Vorsprung der Kontrolle zeichnete sich auch in Bezug auf die resorptiven Vorgänge und den zellulären Status ab. In der Kontrollgruppe konnte eine höhere Anzahl mono- und polynukleärer Phagozyten wie z.B. mehrkerniger Riesenzellen an Bohrmehlresten und Knochensplittern objektiviert werden, was für etwas weiter fortgeschrittenere Resorptionsvorgänge als in der Klebstoffgruppe sprach. An dem implantierten Knochenklebstoff zeigten sich nach 21 Tagen erste Resorptionsversuche durch ein- oder mehrkernige Zellen des Phagozytensystems.

Neben vollständig erhaltenen Zylindern konnten nach 21 Tagen bei beiden Gruppen teilweise volumenreduzierte Knochenzylinder beobachtet werden. Als Ursache hierfür kommt die im Rahmen der Implantatentnahme bzw. der Bohrung unterbrochene Gefäßversorgung der Zylinder in Frage. Während bei den vollständig erhaltenen Zylindern durch ein Wiedereinsprossen von Gefäßen in alte Gefäßkanäle die Blut- und Nährstoffversorgung des Knochenzylinders wieder hergestellt wurde, scheint dies bei den teilweise resorbierten Zylindern nur unvollständig erfolgt zu sein. Der ausbleibende vaskuläre Wiederanschluss der betroffenen Knochenbereiche innerhalb des Zylinders hat die osteoklastische Resorption dieser zur Folge. Im Rahmen des Bone-

Remodeling erfolgte im weiteren Verlauf ein Ersatz des resorbierten Knochengewebes [Debrunner 2002]. Dies wurde besonders durch die osseointegrativen Vorgänge nahe den resorbierten Zylinderbereichen in Form von auf die Zylinderreste übergreifender Osteogenese deutlich.

Während in der Kontrollgruppe keine Anzeichen einer Entzündungsreaktion beobachtet werden konnten, zeigten die histologischen Präparate zweier Tiere der Klebstoffgruppe ausgeprägte Entzündungszeichen mit osteolytischen Knochenarealen, hauptsächlich im Bereich des spaltnahen Lagerknochens. Der Osteotomiespalt war mit einer inhomogenen Mischung aus Resten des Frakturhämatoms, nekrotischem Knochenmaterial und Entzündungsinfiltraten ausgefüllt, innerhalb welcher Knochenklebstoffpartikel identifizierbar waren. Im Rahmen der Entzündungsreaktion fand sich eine gesteigerte phagozytäre Resorption der Zelltrümmer. Inwiefern dem implantierten Knochenklebstoff eine verantwortliche Rolle hinsichtlich der Genese zukommt ist nicht klar. Ein Zusammenhang kann zwar nicht ausgeschlossen werden, jedoch scheint eine entzündliche Reaktion im Rahmen eines postoperativen Infektes als Genese der beobachteten Infiltrate wahrscheinlicher.

Nach einer Beobachtungsdauer von **3 Monaten** zeigten beide Gruppen eine nahezu abgeschlossene physiologische Frakturheilung, eine Identifizierung des Osteotomiespaltes war aufgrund seiner kompletten Durchbauung nahezu unmöglich. Dabei war zu diesem Zeitpunkt bereits eine Umwandlung des Geflechtknochens in den endgültigen Lamellenknochen erfolgt.

In der Klebstoffgruppe waren nach 3 Monaten noch Klebstoffreste in den intratrabekulären Zwischenräumen vorhanden. Hinsichtlich der verbleibenden Klebstoffmenge konnte kein wesentlicher Unterschied zur Klebstoffmenge nach 21 Tagen vernommen werden, allerdings konnte im Gegensatz zu dieser nach 3 Monaten eine erhebliche zelluläre Resorption des Klebstoffes durch mehrkernige Riesenzellen beobachtet werden.

Die Beurteilung der Klebstoffmenge sollte aufgrund der schon anfangs diskutierten Problematik hinsichtlich individuell bedingter Unterschiede bei der Klebstoffdosierung sowie ungleichmäßiger Klebstoffverschiebung im Rahmen der Zylinderreplantation und dementsprechend schnittebenenabhängig differierenden Klebstoffmengen nicht als entscheidendes Kriterium bei der Bewertung des Klebstoffabbaus herangezogen

werden. Viel bedeutender erscheint hier der fortgeschrittene zelluläre Klebstoffabbau durch ein- und mehrkernige Zellen des Phagozytensystems sowie die Tatsache, dass der Klebstoff keine Barriere für die physiologische Knochenheilung darstellte. Die Klebstoffgruppe konnte vielmehr den sich nach 21 Tagen abzeichnenden Vorsprung der Kontrollgruppe hinsichtlich der osteogenetischen Prozesse wieder aufholen, so dass nach 3 Monaten kein Unterschied mehr zwischen den beiden Gruppen zu sehen war. Wird eine zu große Klebstoffmenge appliziert, so dauern die Resorptionsvorgänge am Klebstoff länger, dadurch wiederum behält der Knochenklebstoff seine die Osteogenese temporär behindernde Eigenschaft länger bei und es kommt zu einer verspäteten Überbrückung des Spaltes wie es bei einem Tier der Klebstoffgruppe der Fall war.

Nach 3 Monaten waren durch resorptive Prozesse bis auf einzelne Inseln mit Granulationsgewebe alle Hinweise auf einen stattgefundenen Defekt beseitigt worden. Lediglich ein Tier der Kontrollgruppe zeigte einen verzögerten Verlauf mit verbliebenen Bohrmehlresten und einem nicht durchbauten Osteotomiespalt. Eine Erklärung hierfür bietet der reduzierte Allgemeinzustand des Tieres, der auch zu einer vorzeitigen Euthanasie des eigentlich zur 12-Monatsgruppe gehörigen Tieres geführt hatte.

Insgesamt konnten bei beiden Gruppen histologisch keine Anzeichen einer Entzündungsreaktion beobachtet werden, das Knochen-Klebstoff-Interface stellte sich sofern vorhanden unauffällig dar. Zusammenfassend konnte daher nach 3 Monaten eine gute Verträglichkeit des Knochenklebstoffes bei einer fortgeschrittenen zellulären Resorption dokumentiert werden.

Nach **12 Monaten** konnte in beiden Gruppen eine abgeschlossene Knochenheilung beobachtet werden. Sowohl die Präparate der Klebstoff- als auch der Kontrollgruppe zeigten unauffälliges Knochengewebe als Ergebnis einer erfolgreich stattgefundenen Zylinderintegration. In der Klebstoffgruppe waren auch nach 12 Monaten Klebstoffreste im Knochenmark zwischen den Knochentrabekeln erkennbar. Anders als bei den bisherigen Präparaten der vorausgegangenen Beobachtungszeiträume erschien der Klebstoff nun nicht mehr in Form einer homogenen, gräulich-glasigen und mit kristallartigen Partikeln versetzten Masse. Vielmehr fanden sich nun einzelne Klebstoffpartikel in einer farblich und strukturell inhomogenen Substanz eingebettet. Daneben konnten teils frei im Knochenmark und teils die inhomogene Substanz wie ein

Bilderrahmen umgebende, kräftig gefärbte, ausgezogene Substanzpräzipitate beobachtet werden. Diese Beobachtungen deuten darauf hin, dass es nach 12 Monaten zu einer Phasentrennung des Knochenklebstoffes gekommen sein könnte. Ursächlich hierfür könnte ein physiko-chemischer Lösungsprozess gewesen sein, der zu einer Trennung der verbliebenen β -Tricalciumphosphat-Partikel der Feststoffkomponenten und der Makromermischung geführt hat. Denkbar wäre jedoch auch, dass es im Rahmen einer hydrolytischen Auflösung des Knochenklebstoffes unter Umständen zur Bildung völlig neuartiger Hydrolyseprodukte gekommen war, die zu dem histologisch dokumentierten Bild geführt haben.

Tricalciumphosphat ist ein synthetisches Analogon zum Hydroxylapatit des Knochens, das durch chemische Lösung und durch zellulären Abbau vollständig resorbierbar ist [Rueger 1998, den Hollander 1991, Eggli 1988, Theiss 2005]. Die zelluläre Resorption von β -Tricalciumphosphat erfolgt durch Makrophagen, vor allem jedoch durch osteoklastenähnliche, TRAP-positive Riesenzellen [Yamada 2007, Theiss 2005, Kondo 2005, Matsusuhita 2004, Chazono 2004]. Neben der guten Resorption wurde von zahlreichen Untersuchern eine Inkorporation von β -Tricalciumphosphatpartikeln in neu gebildeten Knochen im Rahmen des Knochenremodelings beobachtet [Theiss 2005, Yamada 2007]. In Anbetracht dieser Tatsachen erscheint es nahe liegend, dass falls von einer Phasentrennung des Klebstoffes ausgegangen werden kann, die freiwerdenden Tricalciumphosphatpartikel im Rahmen des Knochenremodelings einem Recyclingprozess unterzogen worden sein könnten. Die übrig gebliebenen Bestandteile des Klebstoffes bzw. deren Abbauprodukte könnten dabei das Knochenremodeling derart beeinflusst haben, dass es zur Bildung von qualitativ minderwertigerem Knochen gekommen ist, welcher schließlich histologisch als farblich und strukturell inhomogene Substanz erschien. Ähnliches könnte im Falle eines hydrolytischen Abbauprozesses des Klebstoffes ohne vorherige Phasentrennung durch die entstandenen Abbauprodukte passiert sein. Diese Überlegungen sind jedoch rein spekulativ, denn keine der von uns durchgeführten Untersuchungen konnte eindeutig eine Identifizierung der inhomogenen Substanz erbringen. Zweifelsfrei konnte jedoch sowohl an den strukturell inhomogenen Bereichen als auch an den kräftig gefärbten Substanzpräzipitaten eine rege zelluläre Resorption durch zahlrei-

che Monozyten und Makrophagen, besonders jedoch mehrkernige Riesenzellen, nachgewiesen werden.

Zum Thema Degradation von Tricalciumphosphatkeramiken beschrieben KONDO bei Implantationsversuchen von β -Tricalciumphosphat in Femurkondylen von Ratten eine zelluläre Resorption des implantierten Materials durch mehrkernige, TRAP-positive Zellen, die sie am ehesten für Osteoklasten hielten. Ähnliche Resultate konnten CHAZONO sowie YAMADA bei Versuchen an Kanichenknochen verzeichnen [Yamada 2007, Kondo 2005, Chazono 2004]. Diese Beobachtungen konnten durch die durchgeführten transmissionselektronenmikroskopischen und enzymhistochemischen Untersuchungen nicht bestätigt werden. Die Auswertungen belegten im Gegenteil, dass es sich bei den mehrkernigen, den Klebstoff (und die TCP-Partikel) phagozytierenden Zellen nicht um TRAP-positive Osteoklasten, sondern um TRAP-negative Fremdkörperriesenzellen handelte.

Zusammengefasst lässt sich somit festhalten, dass es in der Klebstoffgruppe nach 12 Monaten vereinzelt zur Bildung strukturell inhomogener Bereiche gekommen ist. Die Tatsache, dass innerhalb dieser Areale einzelne Tricalciumphosphatpartikel identifizierbar waren, veranlasst dabei zu der Annahme, dass ein Zusammenhang zwischen dem implantierten Knochenklebstoff bzw. seinem Abbau und der Formation der inhomogenen Bezirke bestehen könnte. Welche Mechanismen im Einzelnen zur Bildung der beobachteten Substanzformationen geführt haben, kann dabei in unserem Versuchsansatz nicht eruiert werden. Jedoch konnte histologisch, elektronenmikroskopisch und anhand enzymhistochemischer Untersuchungen ein ausgeprägter zellulärer Abbaumechanismus dieser Bereiche besonders durch polynukleäre Fremdkörperriesenzellen im Sinne einer benignen Fremdkörperreaktion nachgewiesen werden. Eine vollständige Resorption der verbliebenen Substanzformationen erscheint daher im weiteren Verlauf sehr wahrscheinlich. Entzündungsreaktionen, Osteolysen oder andere Anzeichen einer Bioinkompatibilität konnten zu diesem Zeitpunkt bei keinem der untersuchten Präparate nachgewiesen werden.

Im Hinblick auf Osborns' Einteilung der Biomaterialien in bioaktive, -inerte und -tolerante Substanzen, kann der neu entwickelte Knochenklebstoff anhand der histologischen Auswertungen der ersten Gruppe zugeordnet werden. Hierfür spricht zunächst die direkt an den implantierten Knochenklebstoff angrenzende, nicht bindegewebig

abgegrenzte Knochenneubildung im Sinne einer Verbundosteogenese sowie die scheinbare Intergration einzelner Tricalciumphosphatpartikel in die physiologischen Knochenumbauaktivitäten des Lagerknochens. Darüber hinaus kann aufgrund der nachgewiesenen zellulären Resorption sowie der Vermutung eines physikochemischen Abbaus des Klebstoffes definitionsgemäß eine bioinerte Eigenschaft ausgeschlossen werden, da bioinerte Materialien keinen Abbau in der biologischen Umgebung erfahren.

Die zur Biokompatibilitätsprüfung des neuen Dreikomponentenklebstoffes ergänzend durchgeführten **lichtmikroskopischen Auswertungen** der rechtsparavertebral lokalisierten und mit Klebstoff befüllten **muskulären Tasche** ergaben insgesamt gute Ergebnisse.

Ähnlich wie bei den Untersuchungen an der Femurkondyle, konnte nach 12 Monaten Beobachtungsdauer noch Restklebstoff inmitten der quergestreiften Muskulatur gefunden werden. Die verbliebenen Klebstoffpartikel lagen dabei auch hier nach 12 Monaten inmitten einer bis dahin nicht beobachteten, strukturell und farblich uneinheitlichen Substanz. Damit erhärtet sich der bereits bei den histologischen Auswertungen der Femurpräparate geäußerte Verdacht, dass ein hydrolytischer Abbauprozess des Klebstoffes stattgefunden haben könnte, welcher z.B. durch die resultierenden Hydrolyseprodukte oder andere physiko-chemische Reaktionen für die lichtmikroskopisch erkennbaren Veränderungen verantwortlich gewesen sein könnte. Die zelluläre Resorption des Klebstoffes durch mono- und polynukleäre Zellen des Phagozytensystems konnte bereits nach 10 Tagen beobachtet werden, wobei sie ihr Maximum 3 Monate post operationem erreichte und auch noch bei den 12-Monatspräparaten an den Restklebstoffpartikeln beobachtet wurde. Eine weitere Resorption des Restklebstoffes erscheint demnach in weiteren Verlauf sehr wahrscheinlich.

Die muskuläre Tasche mit dem Klebstoffinhalt wurde inmitten der quergestreiften Rückenmuskulatur durch einen zellreichen Bindegewebssaum sowie Granulationsgewebe abgegrenzt, von diesem ausgehend konnten zahlreiche Regenerationsprozesse der Skelettmuskulatur in unmittelbarer Nähe zum implantierten Klebstoff dokumentiert werden. Im Gegensatz zur Kontrollgruppe, bei der der gesetzte Defekt bereits nach 3 Monaten infolge der regenerativen und reparativen Prozesse nicht mehr

zu sehen war, konnten bei der Klebstoffgruppe zu diesem Zeitpunkt noch einzelne Fasern in fortgeschritteneren Regenerationsstadien beobachtet werden. Diese leichte zeitliche Verzögerung dürfte sicherlich damit zusammenhängen, dass in der Klebstoffgruppe parallel zu den Regenerationsbemühungen der Muskulatur eine aktive Klebstoffresorption stattgefunden hat.

Die Muskelfasern innerhalb der untersuchten Tasche zeigten sowohl bei der Klebstoffgruppe als auch bei der Kontrolle nach 10 Tagen degenerative Veränderungen im Sinne einer Zenkerschen Degeneration. Im weiteren Verlauf kam es zur Nekrose der Fasern und der Phagozytose des nekrotischen Materials durch eingewanderte Makrophagen und mehrkernige Riesenzellen. Die hyaline Degeneration dieser Fasern ist höchstwahrscheinlich auf eine durch den gesetzten Defekt verursachte lokale Schädigung der Zellstruktur zurückzuführen und zwar in solchem Maß, dass eine Regeneration nicht mehr möglich war. Ferner könnte eine im Rahmen der Muskelaschenpräparation stattgefundene Unterbindung der Blutversorgung die Ursache für den zellulären Untergang der Fasern gewesen sein. Da dieses Phänomen bei beiden Gruppen zu beobachten war, ist ein Einfluss des implantierten Knochenklebstoffes zweifellos ausgeschlossen. Bei den vereinzelt in der defektnahen Muskulatur gefundenen, degenerativ veränderten Muskelfasern dürfte eine ähnliche Genese zu deren Untergang geführt haben.

Insgesamt konnten mit Ausnahme eines Präparates der Klebstoffgruppe nach 10 Tagen keine Anzeichen einer Entzündungsreaktion beobachtet werden. Beim besagten Tier der Klebstoffgruppe kam es zur Ausbildung eines abszessähnlichen Befundes mit einer entzündlichen Gewebeschmelzung. Histologisch konnte kein Bakteriennachweis erfolgen, so dass eine bakterielle Genese zweifelhaft erscheint. Es ist nicht auszuschließen, dass der implantierte Klebstoff für diese Gewebereaktion verantwortlich war. Die Tatsache, dass dieser Befund lediglich bei einem Tier und dann sofort in einer derart ausgedehnten Ausprägung auftrat, macht jedoch eine andere Ursache, wie z.B. eine allgemeine Abwehrschwäche des Tieres, wahrscheinlicher. Vereinzelt gefundene Infiltrate neutrophiler Granulozyten bei einem weiteren Tier, schießen am ehesten mit einer physiologischen Reaktion des Organismus auf den operativen Eingriff im Sinne eines Aufräumprozesses vereinbar zu sein.

5.4 Enzymhistochemische Analysen

Durch die enzymhistochemischen Methoden wurde die Aktivität der tartratresistenten sauren Phosphatase (TRAP) mit Hilfe eines geeigneten Substratgemisches und der Koppelung der Reaktionsprodukte an ein rotes Pigment nachgewiesen.

Elektrophoretisch lassen sich 5 Isoenzyme der sauren Phosphatasen unterscheiden, welche sich z.B. durch ihre Gewebeaffinität, ihr Molekulargewicht oder die Aminosäuresequenz unterscheiden [Bull 2002]. Von besonderem Interesse war dabei für unsere Untersuchungen ein Isoenzym, welches sich im Gegensatz zu den übrigen Isoenzymen in seiner katalytischen Funktion durch Tartrat nicht hemmen lässt und daher als tartratresistente saure Phosphatase (TRAP) bezeichnet wird. Dieses Isoenzym existiert in zwei Isoformen genannt 5a und 5b. TRAP 5b wird ausschließlich von aktiv resorbierenden Osteoklasten sezerniert und gilt daher als zytochemischer Marker der osteoklastischen Aktivität. [Kirstein 2006, Minkin 1982, Lau 1987]. Darüber hinaus findet sich dieses Enzym in den mononukleären Vorläuferzellen der Osteoklasten [Baron 1986]. TRAP 5a findet sich z.B. in Leukozyten von Patienten mit Haarzellleukämie [Ishibashi 2001] oder in Makrophagen und dendritischen Zellen [Hayman 2001, Halleen 2006, Janckila 2005].

Die von uns durchgeführten histochemischen Untersuchungen zeigten bei den 10-Tages- und 21-Tagesgruppen zahlreiche rot angefärbte, mehrkernige Zellen (TRAP-positive Zellen) an Bohrmehlresten und Knochensplittern. Hierbei handelte es sich eindeutig um aktiv resorbierende Osteoklasten. Am Klebstoff konnten erstmals nach 21 Tagen vereinzelt, meist einkernige rot gefärbte Zellen beobachtet werden. In diesem Fall dürfte es sich um ein- oder auch mehrkernige Makrophagen gehandelt haben, die als Vorläuferzellen der Osteoklasten ebenfalls zur TRAP-Synthese befähigt sind und den Klebstoff phagozytierten. Eine ausgeprägte zelluläre Phagozytose des Klebstoffes durch mehrkernige Riesenzellen konnte nach drei und zwölf Monaten beobachtet werden. Dabei fiel auf, dass keine rote Anfärbung der den Klebstoff phagozytierenden Riesenzellen stattgefunden hatte.

Hier halfen die Untersuchungen von ZHENG das Beobachtete richtig zu interpretieren [Zheng 1991]. Dieser hatte mittels zytochemischen Untersuchungen herausgefunden, dass Osteoklasten grundsätzlich eine höhere TRAP-Aktivität besitzen als mehrkernige Fremdkörperriesenzellen. Darüberhinaus zeigte er, dass

Fremdkörperriesenzellen durch 100 mM Na-Tartrat komplett gehemmt wurden, während Osteoklasten lediglich einen 20%igen Aktivitätsverlust zeigten. Ähnliches wurde 1987 von Hermanns bei dem Versuch Osteoklasten und Fremdkörperriesenzellen enzymhistochemisch zu unterscheiden festgestellt [Hermanns 1987]. Diese Beobachtungen lassen den Schluß zu, dass es sich bei den mehrkernigen Riesenzellen am Klebstoff um Fremdkörperriesenzellen handeln musste, welche durch das der Substratlösung zugesetzte Na-Tartrat in ihrer katalytischen Funktion gehemmt wurden und sich demnach nicht rot gefärbt hatten.

5.5 Transmissionselektronenmikroskopische Analysen

Durch die TEM-Analysen konnte eine zelluläre Resorption des Klebstoffes durch mehrkernige Riesenzellen bereits nach 10 Tagen beobachtet werden. Mehrkernige Riesenzellen bestehen aus mehreren fusionierten Epitheloidzellen, bei denen es sich um durch bestimmte Reize aktivierte Makrophagen handelt. Ihren Namen haben die Epitheloidzellen aufgrund Ihrer Ähnlichkeit zu epithelialen Zellen [Junqueira 1996]. In höheren Vergrößerungen lies sich eine dünne Schicht mit elektronendichter Substanz in der Interfaceregion zwischen dem Plasmalemm der Riesenzellen und dem Klebstoff nachweisen. Diese wurde in Form von kleinen Exozytosevesikeln auf das Plasmalemm gebracht. Hierbei scheint es sich um eine vom endoplasmatischen Retikulum der Riesenzellen gebildete Schutzsubstanz zu handeln, welche der von Epithelzellen gebildeten Schutzschicht, der Glykokalix, gleicht. Die Glykokalix wird im Wesentlichen von den Oligosaccharidseitenketten der Glykolipide und Glykoproteine der Zellmembran gebildet und wird stets von den Zellen selbst gebildet und regeneriert [Kamen 1989]. Eine Aufgabe der Glykokalix besteht darin, für die Wiedererkennung gleichartiger Zellen mit Antigen-(Fremdkörper)Wirkung untereinander zu sorgen und somit einen Zusammenschluß dieser zu ermöglichen. Der polare Aufbau der Riesenzellen mit einer dem Klebstoff zugewandten, glatten Seite und zahlreichen Mikrovilli an der dem Klebstoff abgewandten Seite zeigte ebenfalls Ähnlichkeit mit der sich bei Epithelzellen findenden Polarität im Aufbau. Ferner war die Polarität hinweisgebend, dass es sich um Fremdkörperriesenzellen und nicht um mehrkernige Osteoklasten handeln musste. Osteoklasten hätten auf der dem Klebstoff zugewandten Seite einen sog. Resorptionssaum mit zahlreichen Membranfältelungen aufwei-

sen müssen [Benninghoff 2003]. Bei der von den zellulären Ausläufern der Fremdkörperriesenzellen begrenzten, mäßig elektronendichten Substanz schien es sich um ein Produkt der Riesenzellen zu handeln, welches mittels Apozytose in den Klebstoffbereich abgegeben wurde. Als Apozytose wird das Freisetzen von zytoplasmatischen Komponenten in Form von Abschnürungen kleiner Membranvesikel bezeichnet. Diese ist wie die Exozytose ein Abgabemechanismus für im Zytosol synthetisierte Substanzen. Dabei dürfte es sich höchstwahrscheinlich um ein aktives Enzymgemisch handeln, welches zur Unterstützung der Klebstoffphagozytose von den Fremdkörperriesenzellen sezerniert und in Form kleiner Vesikel in den Extrazellularraum abgegeben wurde. Hier kann ein weiteres epitheliales Charakteristikum der Riesenzellen aufgezeigt werden, nämlich die Fähigkeit zur Sekretion sowie der Abgabe des sezernierten Agens in Form von Apozytose. Hierzu gehört auch die Sekretion der Schutzsubstanz mittels Exozytose als weiterer Abgabemechanismus von zellulären Komponenten.

Neben der Sekretion zählt auch die Resorption zu den epithelialen Funktionen [Benninghoff 2003]. Auch im Hinblick auf diese Funktion fanden sich in unseren Auswertungen Hinweise auf Ähnlichkeiten der aus mehreren Epitheloidzellen fusionierten Fremdkörperriesenzellen mit Epithelzellen. In den mehrkernigen Riesenzellen fanden sich zahlreiche zum Knochenklebstoff strukturgleiche Einschlüsse und damit Hinweise für die Resorption des Klebstoffes mittels Endozytose. Endozytose ist als Aufnahme von Stoffen aus dem Extrazellulärraum definiert, die durch Einstülpung und anschließender Abschnürung von Membranvesikeln der Plasmamembran erfolgt [Benninghoff 2003].

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass der Organismus durch die von den Fremdkörperriesenzellen gebildete Schutzsubstanz den Klebstoff vom übrigen Gewebe abzugrenzen versucht. Somit kann man diese Reaktion auf den Knochenklebstoff als eine „benigne Fremdkörperreaktion“ verstehen. Ferner kann neben der Abgrenzung eine aktive Phagozytose des Klebstoffes durch die Riesenzellen beobachtet werden.

5.6 Histomorphometrische Analysen

Die in dieser Arbeit verwendete histomorphometrische Methodik zur Untersuchung der Knochenneubildungsrate im Osteotomiespalt stellt ein anerkanntes und in zahl-

reichen Studien erfolgreich angewandtes Verfahren dar. Dennoch beinhaltet diese Art der quantitativen Auswertung einige Fehlermöglichkeiten, welche zu einer signifikanten Beeinflussung der Ergebnisse führen könnten.

So erweist sich z.B. die Festlegung des Messbereiches und die Anfärbung der sich darin befindenden Knochenstrukturen als untersucherabhängig und kann im Zweifelsfall zu statistisch signifikanten Unterschieden der Ergebnisse führen. Um diese Fehlerquellen so gering wie möglich zu gestalten, wurden die Auswertungen von ein und derselben Person durchgeführt, ferner wurde stets unter lichtmikroskopischer Kontrolle am Originalpräparat gearbeitet, so dass mögliche Artefakte problemlos im Voraus erkannt und beseitigt werden konnten. Ein weiteres Problem, im Besonderen für die statistische Auswertung der histomorphometrisch erhobenen Daten, lag in der geringen Fallzahl der auswertbaren Präparate. Aufgrund einer nahezu abgeschlossenen Durchbauung des Osteotomiespaltes nach bereits 3 Monaten konnte bei den Präparaten dieser Gruppe wie auch den Präparaten der 12-Monatsgruppe kein Osteotomiespalt mehr abgegrenzt werden und somit kein Messbereich festgelegt werden. Diese Knochendünnschliffe konnten daher nicht histomorphometrisch beurteilt werden. Desweiteren reduzierte sich die Stichprobenzahl der 21-Tagegruppe um zwei weitere Tiere, bei welchen aufgrund einer ausgedehnten Entzündung die histomorphometrische Auswertung keinen Sinn gemacht hätte. Zudem erwiesen sich einzelne kraniale Dünnschliffe der Präparate aufgrund einer unzureichenden Qualität als nicht brauchbar, so dass die Auswertungen insgesamt nur an den kaudalen Schliffen durchgeführt werden konnten. Eine geringe Präparatanzahl birgt die Gefahr falsch negativer Ergebnisse, d.h. ein vorhandener Unterschied wird gegebenenfalls nicht erkannt. Es ist möglich, dass ein bei geringeren Fallzahlen gemessener nicht signifikanter Unterschied bei größeren Fallzahlen signifikant werden kann. Ein bei einer kleineren Präparatanzahl gemessener signifikanter Unterschied dagegen bestätigt sich meist auch bei einer größeren Anzahl von Präparaten [Stapff 2004]. Die von uns gewonnenen histomorphometrischen Ergebnisse bestätigten im Prinzip die qualitativ-deskriptiven histologischen Resultate. Insgesamt zeigte sich sowohl bei der 10-Tages- als auch bei der 21-Tages-Klebstoffgruppe ein trendweise niedrigerer Median der TBS als Parameter für die Knochenneubildungsrate als bei den entsprechenden Kontrollgruppen. Dies deckte sich weitestgehend mit dem in diesen Beobachtungszeiträumen auch schon histo-

logisch gesehenen Vorsprung der Kontrollgruppe im Hinblick auf die osteogenetischen Vorgänge im Osteotomiespalt. Da die ermittelten Unterschiede jedoch nicht als signifikant gemessen wurden dürfen die Ergebnisse allenfalls als richtungswisende Tendenzen interpretiert werden. Es ist jedoch nicht auszuschließen, dass die als nicht signifikant gemessenen Unterschiede bei einer größeren Fallzahl signifikant gewesen wären. Die im Rahmen dieser Studie durchgeführten experimentellen Untersuchungen sollten Grundlagen auf dem Gebiet der Knochenklebung schaffen, um die Verwendung von Knochenklebstoffen als Alternative oder Ergänzung zu den konventionellen Behandlungsstrategien in der Traumatologie und operativen Orthopädie in Zukunft etablieren zu können. Vor allem bei kleinen Frakturen dürften diese Untersuchungen zur Optimierung der Refixation von Fragmenten ohne osteosynthetische Versorgung durch einen Klebstoff beitragen. Ebenso stellt sich die Frage nach einer Anwendung in der Mund-Kiefer-Gesichtschirurgie, der Hals-Nasen-Ohrenheilkunde sowie der Oral- und Dentalchirurgie. Anhand der Analysen konnte sowohl bei den Kurzzeit- als auch bei den Langzeitbeobachtungen (bis zu 12 Monate) eine kanzerogene oder mutagene Wirkung des untersuchten Knochenklebstoffes auf den Organismus ausgeschlossen werden. Lichtmikroskopisch zeigte sich überwiegend eine ausgesprochen gute Biokompatibilität des Klebstoffes ohne Hinweise auf eine zytotoxische Wirkung. Bei den bei zwei Tieren der Klebstoffgruppe nach 21 Tagen beobachteten Entzündungsreaktionen bleibt letztlich unklar, ob der implantierte Knochenklebstoff oder andere Einflussfaktoren für diese Reaktionen verantwortlich waren. Zum sicheren Ausschluß eines kausalen Zusammenhangs mit der Klebstoffapplikation sollten weitere Untersuchungen folgen. Neben der Biokompatibilität war die Degradierbarkeit des Knochenklebstoffes von grundlegendem Interesse. Hier konnte eine zelluläre Resorption des Klebstoffes bereits nach 10 Tagen gezeigt werden. Die physiologische Knochenbruchheilung wurde durch den implantierten Klebstoff nicht behindert, schon nach 10 Tagen wurden in der Klebstoffgruppe erste Geflechtknöchertrabekel im Osteotomiespalt sichtbar, nach 3 Monaten war der Osteotomiespalt größtenteils mit Lamellenknochen durchbaut. Da die erfolgreiche Herstellung und klinische Anwendung eines Knochenklebstoffes neben einer guten Biokompatibilität und Degradation eine ausreichende Verbundfestigkeit des Knochenklebstoffes erfordert, sollten weiterführende biomechanische Testungen der Klebefähigkeit des untersuchten Klebstoffes folgen.

In den letzten Jahrzehnten gab es viele Bemühungen Knochenklebstoffe hinsichtlich ihrer Herstellung und Eigenschaften im menschlichen Organismus weiter anzupassen. Die in der Vergangenheit getesteten Klebstoffe konnten den Anforderungen nicht gerecht werden und scheiterten an deren Biokompatibilität oder Verbundfestigkeit. Dies hat dazu geführt, dass die Forschungsaktivitäten auf dem Gebiet der Adhäsive in den letzten Jahren deutlich zugenommen haben. Einen Aufschwung erfährt die Adhäsiventwicklung gegenwärtig durch Fortschritte in der Biotechnologie, der Gentechnik und dem Tissue Engineering. In nächster Zukunft ist jedoch nicht mit einem Ersatz der Osteosynthesen durch Klebstoffe zu rechnen, allerdings scheint der parallele Einsatz von Klebstoffen neben den konventionellen Techniken eine realisierbare Zukunftsvision zu sein.

6. Zusammenfassung

Der Einsatz von Knochenklebstoffen in der Versorgung von Frakturen könnte gegenüber den konventionellen Osteosynthesetechniken eine Menge Vorteile bieten. Dennoch konnten sich Klebstoffe in der Traumatologie und operativen Orthopädie bis zum heutigen Tage nicht durchsetzen. Die in der Vergangenheit getesteten Knochenklebstoffe scheiterten oftmals an einer inadäquaten Verbundfestigkeit oder einer unzureichenden Biokompatibilität und Degradation.

Das Ziel dieser Arbeit war, die Biokompatibilität und Biodegradation eines neuen Dreikomponentenknochenklebstoffes auf Tricalcium-Phosphat-Basis in New Zealand Kaninchen zu untersuchen. Dafür wurden mit einer Diamanthohlfräse (DBCS = Diamond bone cutting system) Knochenzylinder aus der Kaninchenfemurkondyle von 53 Versuchstieren entnommen und mit Knochenklebstoff benetzt replantiert. Die Zylinder der Kontrolle wurden ohne Klebstoff wiedereingesetzt. Zusätzlich erfolgte eine Implantation des Klebstoffes in eine muskuläre Rückentasche der Kaninchen. Die Versuchstiere wurden in acht Gruppen unterteilt und nach 10 und 21 Tagen, 3 und 12 Monaten euthanasiert. Die Analyse der Knochenheilung und Klebstoffdegradation erfolgte anhand lichtmikroskopischer, histomorphometrischer, transmissionselektronenmikroskopischer und enzymhistochemischer Methoden. Nach 21 Tagen, 3 und 12 Monaten war lichtmikroskopisch deutlich die Phagozytose des Knochenklebstoffes durch Fremdkörperriesenzellen sichtbar. Durch die Transmissionselektro

nenmikroskopie konnte zudem eine zelluläre Resorption des Klebstoffes durch Makrophagen und mehrkernige Fremdkörperriesenzellen nach 10 Tagen beobachtet werden. Nach 10 Tagen zeigten sich sowohl bei der Kontroll- als auch Klebstoffgruppe beginnende Geflechtknochenbildungen im Osteotomiespalt. Nach 21 Tagen fand sich bei beiden Gruppen eine gesteigerte Osteogenese im Osteotomiespalt, dabei lagen die osteogenetischen Vorgänge der Kontrolle deutlich vor denen der Klebstoffgruppe. Eine nahezu vollständige Durchbauung des Osteotomiespalt mit Lamellenknochen zeigte sich bei beiden Gruppen nach 3 Monaten, ein Vorsprung der Kontrolle hinsichtlich der Knochenheilung konnte nun nicht mehr beobachtet werden. Nach 12 Monaten zeigten beide Gruppen eine vollständige Durchbauung des Osteotomiespalt. Ferner konnten in den Langzeitgruppen strukturell inhomogene Areale innerhalb des normalen Knochengewebes beobachtet werden. Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass hydrolytische Abbauprozesse des Klebstoffes für die Bildung dieser Bereiche verantwortlich waren. Bei zwei Kaninchen der 21-Tages-Klebstoffgruppe fand sich eine Entzündungsreaktion mit lokaler Osteolyse im Osteotomiespalt. Die Kontrollgruppen aller Beobachtungszeitpunkte wiesen keine Entzündungszeichen auf.

Die histologischen Auswertungen der Muskeltasche zeigten eine rege zelluläre Phagozytose des Klebstoffes während aller Beobachtungszeiträume. Nach 12 Monaten konnte auch in der Muskeltasche die Bildung von inhomogenen Arealen als Hinweis auf die Hydrolyse der Klebstoffreste beobachtet werden. Insgesamt konnte eine gute Biokompatibilität und frühzeitige Resorption des untersuchten Klebstoffes ohne eine Barriere für die physiologische Knochenheilung beobachtet werden. Zum Ausschluss eines kausalen Zusammenhangs zwischen der Klebstoffapplikation und den beobachteten Entzündungsreaktionen sollten weiterführende Untersuchungen folgen.

7. Summary

Bone adhesives may offer a number of advantages over the conventional osteosynthesis techniques in the treatment of fractures. Nevertheless to date no bone adhesive could be established successfully for all day clinical use in the trauma and orthopaedic surgery. Researches in the past to design an adequate bone bonding

have mostly not proved useful because of inadequate bonding strength or poor biocompatibility and degradation.

The aim of this experimental study was to investigate the biocompatibility and biodegradation of a new bone adhesive containing tricalciumphosphate in New Zealand rabbits. Using the DBCS (diamond bone cutting system) cylinders of the distal femur of 53 rabbits were extracted and reimplanted with bone adhesive. In the control group the reimplant of the cylinders was performed without bone adhesive. Additionally, bone adhesive has been implanted into a paravertebral, muscular bag. The animals were divided into eight groups and euthanized after 10 and 21 days, 3 and 12 months. The analysis of bone healing and degradation pattern of the adhesive were studied using histological, histomorphometrical, transmission electron microscopical and enzyme histochemical methods.

After 21 days, 3 and 12 months a clear phagocytosis of bone glue by multinuclear foreign body cells was visible in the light microscopy. By electronmicroscopic investigations a cellular resorption of the bone adhesive by multinuclear foreign body cells and macrophages could be seen furthermore after 10 days.

After 10 days incipient formations of original woven bone were observed in the osteotomy gap of the control and adhesive group. After 21 days an increased osteogenesis in the osteotomy gap of both groups was found, the osteogenetic activity in the control group lied clearly ahead of that in the adhesive group. An almost complete bone reconstruction of the osteotomy gap with lamellar bone was visible after 3 months in both groups, an advantage of the control group concerning the bone healing could not be found anymore. After 12 months both groups showed a complete bone reconstruction of the osteotomy gap. Furthermore structural inhomogeneous areas within the normal bone tissue could be seen in the long-term group.

The outcomes suggest that hydrolytic degradation processes were responsible for the formation of these areas. Two rabbits of the 21 days-adhesive group showed an inflammatory reaction with osteolysis in the osteotomy zone. The control groups did not revealed any signs of inflammation at all observation time.

The histological analyses of the muscular bag showed an active cellular phagocytosis of the adhesive during all observation periods. After 12 months a formation of inhomogenous areas as advice for a hydrolysis of the adhesive residues

could be found in the histological results of the muscular bag also. Overall a good biocompatibility and early resorption of the investigated bone adhesive without a barrier of the physiological fracture healing could be seen. To exclude a causal relation between the application of the bone adhesive and the inflammatory reactions further studies should follow.

8. Literaturverzeichnis

1. Albrektsson T, Linder L. A method for short and long term in vivo study of the bone implant interface. *Clin Orthop* 1981;159:269-273.
2. Aubin JE. Bone stem cells. *J Cell Biochem Suppl* 1998;30:73-82.
3. Aubin JE, Bonnelye E. Osteoprotegerin and its ligand: A new paradigm for regulation of osteoclastogenesis and bone resorption. *Medscape Womens Health* 2000;5(2):5.
4. Baron R, Neff L, Tran Van P, Nefussi JR, Vignery A. Kinetic and cytochemical identification of osteoclast precursors and their differentiation into multinucleated osteoclasts. *Am J Pathol* 1986;122(2):363-78.
5. Beck H. Kunststoffklebung mit Cyanoacrylaten an Sehnen und Knochengewebe. *Langenbecks Arch Chir* 1966;316:563-568.
6. Bender R, Lange St. Was ist ein P-Wert. *Dtsch med Wochenschr* 2001; 126:39-40.
7. Benninghoff, Drenckhahn. *Anatomie: Bd.1. Makroskopische Anatomie, Histologie, Embryologie, Zellbiologie.* Urban & Fischer Verlag 2003;145-185.
8. Bethlem J MD. *Muscle Pathology. Introduction and atlas.* North-Holland Publishing Company 1970;15-24.
9. Bloch B. Bonding of fractures by plastic adhesives; preliminary report. *J Bone Joint Surg Br* 1958;40-B(4):804-812.
10. Bödeker RH. *Einführung in die medizinische Statistik.* Verlag der Ferber'schen Universitätsbuchhandlung 1999;24.
11. Böhler N, Bösch P, Sandbach G, Schlag G, Eschenberger J, Schmid L. The influence of homologous fibrinogen on osteotomy healing in rabbits. *Unfallheilkunde* 1977;80(12):501-508.
12. Bösch P, Braun F, Eschenberger J, Kovac W, Spangler HP. The action of high-concentrated fibrin on bone healing. *Arch Orthop Unfallchir* 1977;89(3):259-273.

13. Braun A, Schumacher G, Heine WD. Fibrinklebung zur Replantation osteocartilagärer Fragmente am Kniegelenk des Kaninchens. Unfallheilkunde 1978;294-297.
14. Brug E, Braunsteiner E, v. Gemmern C. Die Ultraschallverschweißung von Knochen. Chirurg 1976;47:555-558.
15. Buchner H. Erfahrungen mit Polyurethanschaum (Ostamer) bei der Behandlung von Knochenbrüchen. Klin Med 1961;16:284-288.
16. Buchner H, Fleischl P. Late results in the treatment of bone fractures with polyurethane foam. Arch Orthop Unfallchir 1962;54:48-57.
17. Bull H, Murray PG, Thomas D, Fraser AM, Nelson PN. Acid phosphatases. Mol Pathol 2002;55:65-72.
18. Chalupnik J, Hejda N, Dobias J. Zur Frage der biologischen Toleranz synthetischer Klebstoffe. Klebstoffe in der Chirurgie. Wien Med Akad 1968:39-46.
19. Charnley J, Kettlewell J. The elimination of slip between prosthesis and femur. J Bone Joint Surg Br 1965;47:56-60.
20. Charnley J. The healing of human fractures in contact with self-curing acrylic cement. Clin Orthop 1966;47:157-163.
21. Chazono M, Tanaka T, Komaki H, Fujii K. Bone formation and bioresorption after implantation of injectable beta-tricalcium phosphate granules-hyaluronate complex in rabbit bone defects. J Biomed Mater Res A 2004;70(4):542-549.
22. Claes L, Hoellen L, Ignatius A. Biodegradable bone cements. Orthop 1997;5(26):459-462.
23. Contzen H. Der derzeitige Stand der Gewebevereinerung durch klebende Autopolymerisate. Melsunger Med Mitt 1968;42:7-12.
24. Coover HW, Joyner FB, Shearer NH, Wicker TH. Chemistry and performance of cyanoacrylate adhesives. Soc Plastics Engrs J 1959;15:413-417.
25. Debrunner AM. Orthopädie – Orthopädische Chirurgie. Patientenorientierte Diagnostik & Therapie des Bewegungsapparates. Hans Huber Verlag 2002.
26. Den Hollander W, Patka P, Klein CP, Heidendal GA. Macroporous calcium phosphate ceramics for bone substitution: a tracer study on biodegradation with ⁴⁵Ca tracer. Biomaterials 1991;12(6):569-573.
27. Doerr W. Organpathologie. Band 3 – Bewegungsapparat, Nervensystem, Haut, Sinnesorgane. Thieme Verlag 1974;159-163

28. Donath K, Breuner G. A method for the study of undecalcified bones and teeth with attached soft tissues. The Sage-Schliff (sawing and grinding) technique. *J Oral Pathol* 1982;11(4):318-326.
29. Donath K. Die Trenn-Dünnschliff-Technik zur Herstellung histologischer Präparate von nicht schneidbaren Geweben und Materialien. Exakt/Kulzer Druckschrift, Norderstedt 1987.
30. Donkerwolcke M, Burny F, Muster D. Tissues and bone adhesives – historical aspects. *Biomaterials* 1998;19(16):1461-1466.
31. Drompp BW. Chemical osteosynthesis of fractures and non-unions of the shafts of long bones of the lower extremity. *Am J Surg* 1960;99:733-744.
32. Eggli PS, Muller W, Schenk RK. Porous hydroxyapatite and tricalcium phosphate cylinders with two different pore size ranges implanted in the cancellous bone of rabbits. A comparative histomorphometric and histologic study of bony ingrowth and implant substitution. *Clin Orthop Relat Res* 1988;232:127-138.
33. Enis JE, McCollough NC, Cooper JS. Effects of methylmethacrylate in osteosynthesis. *Clin Orthop* 1974;105:283-294.
34. Giebel G. Adhesives in surgery - Ergebnisse bei Klebung mit verschiedenen Klebstoffen an verschiedenen Geweben. *Wien Med Akad* 1968;65-66.
35. Giebel G, Rimpler M. Skeletal system gluing: adhesives, 50 years of surgical aids. Part 1. *Biomed Tech* 1981;26(3):35-40.
36. Gilmer WS, Tooms RE, Salvatore JE. An experimental study of the influence of implanted polyurethane sponges upon subsequent bone formation. *Surg Gyn Obstetr* 1961;143-148.
37. Golenhofen K. *Physiologie heute*. Urban & Fischer Verlag 1997;101-109.
38. Golovin GV. Frakturfixierung mit Kunststoffen (Russisch). *Vestn Khir Grekov* 1956;77:125-133.
39. Golovin GV. Klinische Anwendung von "Osteoplast" zur Frakturfixierung (Russisch). *Vestn Khir Grekov* 1959;83:45.
40. Gutierrez JM, Nunez J, Diaz C, Cintra AC, Homsí-Brandeburgo MI, Giglio JR. Skeletal muscle degeneration and regeneration after injection of bothropstoxin-II, a phospholipase A2 isolated from the venom of the snake *Bothrops jararacussu*. *Exp Mol Pathol* 1991;55(3):217-229.
41. Günther KP, Scharf HP, Pesch HJ, Puhl W. Integration properties of bone substitute materials. Experimental studies on animals. *Orthopäde* 1998;27(2):105-117.

42. Halleen JM, Tiitinen SL, Ylipahkala H, Fagerlund KM, Vaananen HK. Tartrate-resistant acid phosphatase 5b (TRACP 5b) as a marker of bone resorption. *Clin Lab* 2006;52(9-10):499-509.
43. Hayman AR, Macary P, Lehner PJ, Cox TM. Tartrate-resistant acid phosphatase (Acp 5): identification in diverse human tissues and dendritic cells. *J Histochem Cytochem* 2001;49(6):675-684.
44. Heiss C, Schnettler R. Bioresorbable adhesives in trauma and orthopaedic surgery. *Biomaterialien* 2003;(4):298-304.
45. Heiss C, Schnettler R, Dingeldein E, Donath K, Bonfield W. Histologische Analysen von HA-Knochenzementen- Ergebnisse einer tierexperimentellen Untersuchung am Micropig. *Z Orthop Ihre Grenzgeb* 2003;141.
46. Heiss C, Hahn N, Pokinskyj P, Wenisch S, Stahl JP, Meyer Ch, Schnettler R. Properties and degradation of a new bioresorbable bone glue. *Biomed Tech* 2004;49(6):163-169.
47. Heiss C, Hahn N, Wenisch S, Alt V, Pokinskyj P, Horas U, Killian O, Schnettler R. The tissue response to an alkylene bis(dilactoyl)-methacrylate bone adhesive. *Biomaterials* 2005;26(12):1389-1396.
48. Heiss C., Schnettler R.: Bioresorbable bone adhesives. Historical perspective and state of the art. *Unfallchirurg* 2005;108(5):348-355.
49. Heiss C, Kraus R, Schluckebier D, Stiller A-C, Wenisch S, Schnettler R. Bone adhesives in trauma and orthopedic surgery. *Europ J Trauma* 2006;32(2):141-148.
50. Heiss C. Biokompatibilität, Degradation und Verbundfestigkeit eines neuartigen bioresorbierbaren Knochenklebers in der Traumatologie und operativen Orthopädie. Habilitationsschrift Giessen 2006.
51. Heiss C. Biokompatibilität, Degradation und Verbundfestigkeit von bioresorbierbaren Ethylenglykol-oligolactid-dimethacrylat Knochenklebstoffen in der Traumatologie und operativen Orthopädie. Shaker Verlag 2007, Edition Medizin, 222 Seiten.
52. Heiss C, Skorupa A, Kraus R, Sommer U, Hübner WD, Schnabelrauch M, Schnettler R. Bioresorbierbare Knochenklebstoffe in der Traumatologie und operativen Orthopädie - Experimentelle Untersuchungen eines neuen Knochenklebstoffes mit Beta-Tricalciumphosphat (β -TCP) Komponente im Kaninchenmodell. In: 6. Thüringer Biomaterial-Kolloquium, INNOVENT e.V., Jena (Hrsg.) 2007.
53. Heiss W, Guthy E, Faul P. Vergleichende Untersuchung zur Reißfestigkeit geklebter und genähter Wunden. *Adhesives in Surgery*. Wien Med Akad 1968;275-278.

54. Hermanns W. Identification of osteoclasts and their differentiation from mononuclear phagocytes by enzyme histochemistry. *Histochemistry* 1987;86(3):225-227.
55. Hollenberg C, Maccoomb RK, Trott JR, Zingg W. An investigation of polyurethane foam in experimental animals. *Canad J Surg* 1963;(6):371-382.
56. Hoyt W. Diskussionsbeitrag. *J Bone Joint Surg* 1960;42-A(5):878.
57. Hörner K, Löffler K, Holtzmann M. Vergleich der histologischen Struktur der Kompakta der langen Röhrenknochen bei Maus, Hamster, Ratte, Meerschweinchen, Kaninchen, Katze und Hund während der Altersentwicklung. *Anat Histol Embryol* 1997;26:289-295.
58. Hulliger L. Studies on the effect of artificial resins (palacos and ostamer) in tissue cultures. *Arch Orthop Unfallchir* 1962;54:581-588.
59. Hunt TK, Hopf H, Hussain Z. Physiology of wound healing. *Adv Skin Wound Care* 2000;13(2Suppl):6-11.
60. Ishibashi M. Acid phosphatase. *Rinsho Byori* 2001;(116):100-109.
61. Janckila AJ, Parthasarathy RN, Parthasarathy LK, Seelan RS, Hsueh YC, Rissanen J, Alatalo SL, Halleen JM, Yam LT. Properties and expression of human tartrate-resistant acid phosphatase isoform 5a by monocyte-derived cells. *J Leukoc Biol* 2005;77(2):209-218.
62. Junqueira LC, Carneiro J. Übersetzt, überarbeitet und ergänzt von Schiebeler TH. *Knochen und Knochenverbindungen in Histologie: Zytologie, Histologie und mikroskopische Anatomie des Menschen unter Berücksichtigung der Histophysiologie*. Springer Verlag 1996;190-217.
63. Junqueira LC, Carneiro J. *Histologie*. Springer Verlag 2005;92-105.
64. Kaiser E, Delling G. Osteozyten - ein Organ im Aufwind morphologischer und zellbiologischer Forschung. *Osteologie* 2002;11(4):219-236.
65. Kamen P. Attachment of human oral fibroblasts to a granular polymeric implant for hard tissue replacement. *Journal of oral Implantology*. 1989;1(15): 583-591.
66. Katthagen BD. Knochenregeneration mit Knochenersatzmaterialien. *Unfallheilk* 1986:178.
67. Kawahara H. Biological requirements for biomaterials. I. Cytotoxicity of biomaterials, in vitro. II. Cell adhesion to biomaterials, in vitro. *Implantologist* 1985;3(2):41-49.
68. Kawebum M, Aguilar MC, Blancas E, Kawebum J, Lehman WB, Grant AD, Strongwater AM. Histological and radiographic determination of the age of

- physeal closure of the distal femur, proximal tibia, and proximal fibula of the New Zealand white rabbit. *J Orthop Res* 1994;12(5):747-749.
69. Kirstein B, Chambers TJ, Fuller K. Secretion of tartrate-resistant acid phosphatase by osteoclasts correlates with resorptive behavior. *J Cell Biochem* 2006;98(5):1085-1094.
 70. Kondo N, Ogose A, Tokunaga K, Ito T, Arai K, Kudo N, Inoue H, Irie H, Endo N. Bone formation and resorption of highly purified beta-tricalcium phosphate in the rat femoral condyle. *Biomaterials* 2005;26(28):5600-5608.
 71. Kreutzig T. *Kurzlehrbuch Biochemie*. Urban & Fischer Verlag 2000;310-311.
 72. Kuijjer R, Bouwmeester SJ, Drees MM, Surtel DA, Terwindt-Rouwenhorst EA, Van Der Linden AJ, Van Blitterswijk CA, Bulstra SK. The polymer Polyactive as a bone-filling substance: an experimental study in rabbits. *J Mater Sci Mater Med* 1998;9(8):449-455.
 73. Kurz A, Sessler DI, Lenhardt R. Perioperative normothermia to reduce the incidence of surgical-wound infection and shorten hospitalization. Study of wound infection and temperature group. *N Engl J Med* 1996;334(19):1209-1215.
 74. Lau KHW, Onishi T, Wergedal JE et al.. Characterisation and assay of tartrate-resistant acid phosphatase activity in serum: potential use to assess bone resorption. *Clin Chem* 1987;33:458-462.
 75. Leemann RA, Hedinger C, Jenny M. Experimental animal and histological results in fracture gluing with the polyurethane polymer „ostamer“. *Sci Prog* 1961;91:908-914.
 76. Mandarino MP, Salvatore JE. Polyurethane polymer, its use in fractured and diseased bones. *Am J Surg* 1959;97(4):442-446.
 77. Mandarino MP, Salvatore JE, Jones TL. Chemical osteosynthesis, a new method of treatment of fractures and diseased bones with a polyurethane polymer. *J Bone Joint Surg* 1960;42-A(5):901.
 78. Mastaglia F, Sir Walton J. *Skeletal Muscle Pathology*. Churchill Livingstone Verlag 1982;88-133.
 79. Matsushita N, Terai H, Okada T, Nozaki K, Inoue H, Miyamoto S, Takaoka K. A new bone-inducing biodegradable porous beta-tricalcium phosphate. *J Biomed Mater Res A* 2004;70(3):450-458.
 80. Minkin C. Bone acid phosphatase: tartrate-resistant acid phosphatase as a marker of osteoclast function. *Calcif Tissue Int* 1982;34(3):285-290.

81. Müller ME. Ostamer und Palacos in der Knochenchirurgie. Langenbecks Arch klin Chir 1963;304:934.
82. Osborn JF, Weiss TH. Hydroxylapatitkeramik – ein knochenähnlicher Biowerkstoff. Schweiz Mschr Zahnheilk 1978;88:1166-1172.
83. Osborn JF. Implantatwerkstoff Hydroxylapatitkeramik – Grundlagen und klinische Forschung. Quintessenz Verlag Berlin, London, Chicago, Rio de Janeiro, Tokio 1985.
84. Passl R, Plenk H Jr, Sauer G, Spängler HP, Radaszkiewicz T, Holle J. Homologous articular cartilage transplantation in animal experiments. Preliminary studies on sheep. Arch Orthop Unfallchir 1976;86(2):243-256.
85. Polyakov VA. Resultate und Ausblicke der Anwendung des Ultraschallverfahrens in der Traumatologie. Unfallmedizinische Tagung der Landesverbände der gewerblichen Berufsgenossenschaften 1972;16:85-91.
86. Putz R. Entwicklung und Wachstum der Epiphysenfuge. Zeitschrift für Orthopädie 1996;134:391-395.
87. Remberger K. Knochen. http://www.uni-saarland.de/pathologie/Knochen_Pathologie/T.../Knochen_Path_3VII.ht Stand: 30.09.02.
88. Remmele W, Peiffer J, Schröder JM. Pathologie. Band 6 – Neuropathologie, Muskulatur, Sinnesorgane. Springer Verlag 1995;439-443.
89. Rietz KA. Polymer osteosynthesis. Experimental studies with an epoxy resin (araldite aw 120). Acta Chir Scand 1964;128:387-401.
90. Robson MC. Disturbances of wound healing. Ann Emerg Med 1988;17:1274-1278.
91. Rutsikii VV, Kholopov OV, Smirnov AS. Certain theoretical and practical problems of adhesive ultrasonic osteosynthesis. Orthop Travmatol Protez 1975;10:18-24.
92. Rueger JM. Bone substitution materials. Current status and prospects. Orthopäde 1998;27(2):72-79.
93. Schenk RK, Willenegger HR. Histology of primary bone healing: modifications and limits of recovery of gaps in relation to extent of the defect. Unfallheilkunde 1977;80(5):155-160.
94. Schröder JM. Pathologie der Muskulatur. Springer Verlag 1982;131-166.
95. Smith DC. Lutes, glues, cements and adhesives in medicine and dentistry. Biomed Eng 1973;8(3):108-115.

96. Stapff M. Fallgrube Statistik Teil 2. 2004. DZKF 7/8:44-51.
97. Stein J. Tierexperimentelle Untersuchungen von Osteosynthesen mit Acrylat-Klebstoffen. Dissertation Hamburg 1969.
98. Stephen C, Weber MD, Michael W, Chapman MD. Adhesives in orthopaedic surgery - a review of the literature and in vitro bonding strengths of bone-bonding agents. Clin Orthop Rel Res 1984;191:249-261.
99. Taschenatlas der Anatomie. Bd 1: Bewegungsapparat. Hrsg.: W. Platzer. Thieme Verlag 1999;14-21.
100. Teitelbaum SL. Bone resorption by osteoclasts. Science 2000;289(5484):1504-1508.
101. Theiss F, Apelt D, Brand B, Kutter A, Zlinszky K, Böhner M, Matter S, Frei C, Auer JA, von Rechenberg B. Biocompatibility and resorption of a brushite calcium phosphate cement. Biomaterials 2005;26(21):4383-4394.
102. Thompson FR, Sezgin MZ. An ostamer study in rabbits leading to its use or misuse in humans. J Bone Joint Surg 1960;42-A,5:877.
103. Tkachenko SS, Rutski VV. Osteosynthesis with polymethylmethacrylate and cyanoacrylate adhesives (A review of domestic and foreign literature). Vestn Khir Im 1969;103(10):135-140. Russian.
104. Tkatchenko SS, Polyakova AM, Rutski VV, Mager KA, Semiantsev VN. Features of reparative regeneration following experimental osteosynthesis with cyanacrylates. Eksp Khir Anesteziol 1976;6:61-63. Russian.
105. Van Vleet JF, Ferrans VJ. Ultrastructural changes in skeletal muscle of selenium-vitamin E.-deficient chicks. Am J Vet Res 1976;37(9):1081-1089.
106. Vogt S, Larcher Y, Beer B, Wilke I, Schnabelrauch M. Fabrication of highly porous scaffold materials based on functionalized oligolactides and preliminary results on their use in bone tissue engineering. Eur Cell Mater 2002;4:30-38.
107. Waldorf H, Fewkes J. Wound healing. Adv Dermatol 1995;10:77-79.
108. Wissing H, Stürmer KM, Breidenstein G. Die Wertigkeit verschiedener Versuchstiere für experimentelle Untersuchungen am Knochen. Unfallheilkunde 1990;212:479-488.
109. Williams DF. Consensus and definitions in biomaterials. Implant Materials in Biofunction, C. De Putter, G.L. de Lange, K. De Groot and A.J.C. Lee. Advances in Biomaterials, Elsevier Science Publishers B.V. 1988;8:11-16.
110. www.anatomie.net/histowebatlas, Stand 1.01.2008.

111. www.biochemie.web.med.uni-muenchen.de/biotutor_2004/calcium.htm, Stand 26.07.2007.
112. www.medizininfo.de/ruecken/muskulatur/aufbau.shtml, Stand 26.06.2007.
113. www.tiho-hannover.de/einricht/anat/lit/mwenth/os/ec_os.htm, Stand 12.2.2008.
114. Yamada M, Shiota M, Yamashita Y, Kasugai S. Histological and histomorphometrical comparative study of the degradation and osteoconductive characteristics of alpha- and beta-tricalcium phosphate in block grafts. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 2007;82(1):139-48.
115. Young JZ, Medawar PB. Fibrin suture of peripheral nerves. *Lancet* 1940;2:126-128.
116. Zheng MH, Papadimitriou JM, Nicholson GC. A quantitative cytochemical investigation of osteoclasts and multinucleate giant cells. *Histochem J* 1991;4:180-188.
117. Zollinger HU. Experimentelle Erzeugung maligner Nierenkapseltumoren bei der Ratte durch Druckreiz (Plastic-Kapseln). *Schweiz Z Allg Path* 1952;15:666.

9. Tabellen- und Abbildungsverzeichnis

Tabellen:

- Tab. 1** Allgemeine Anforderungen an bioresorbierbare Knochenklebstoffe in der Traumatologie und operativen Orthopädie. Seite 3
- Tab. 2** Einteilung der Versuchstiere in die Klebstoff- und Kontrollgruppen der verschiedenen Beobachtungszeitpunkte mit Darstellung der Tieranzahl pro Gruppe. Seite 32
- Tab. 3** Anzahl der Femurkondylenpräparate für die histomorphometrischen Analysen. Seite 50
- Tab. 4** Makroskopisch auffällige Befunde bei der Euthanasie der Versuchstiere und Probenentnahme. Seite 53
- Tab. 5** Messergebnisse der Flächenberechnungen für Figur 1 (fl_kr_1) und Figur 2 (fl_kr_2), der gemessenen Knochendichten (in mm^2) innerhalb dieser Figuren (kn_fl_1 und kn_fl_2) sowie Darstellung der errechneten Größen AOI, BS und TBS (in%) für die Klebstoffgruppen (mit) und Kontrollgruppen (ohne) der Versuchsdauern 10 Tage und 21 Tage. Seite 98
- Tab. 6** Mediane und Spannweiten TBS-Werte [in%] als Indikator für die Knochenneubildungsrate für die Kontroll- und Klebstoffgruppen der Versuchsdauern 10 Tage und 21 Tage. Seite 99
- Tab. 7** Mediane der TBS (y-Achse) als Parameter der Knochenneubildung im Osteotomiespalt. Darstellung in Anteilen auf logarithmischer Skala getrennt nach Versuchsdauer in Tagen (x-Achse) und Behandlung (mit/ohne Klebstoff). Seite 99

Abbildungen:

- Abb. 1** Makroskopischer Aspekt des Knochens mit Spongiosa und Kompakta. Seite 11

Abb. 2a-b (a) Osteoblastensaum ($\uparrow\uparrow$) synthetisiert die Knochenmatrix (Osteoid). Bei der Verkalkung der Knochenmatrix werden die Osteoblasten eingeschlossen und differenzieren dann zu Osteozyten (\rightarrow). (b) Mehrkerniger Osteoklast (OK) in einer HOWSHIPschen Lakune (\rightarrow).	Seite 12
Abb. 3 Schematische Zeichnung eines Ausschnitts der Substantia compacta der Diaphyse eines Röhrenknochens.	Seite 15
Abb. 4 Desmale Ossifikation.	Seite 16
Abb. 5 Enchondrale Ossifikation.	Seite 18
Abb. 6 Stadien des „Bone Remodellings“ im Knochen.	Seite 20
Abb. 7 Hormonelle Regulation des Calcium- und Phosphat-Stoffwechsels.	Seite 22
Abb. 8a-b Primäre Frakturheilung unter absolut stabilen Verhältnissen, Kontaktheilung. und Spaltheilung	Seite 23
Abb. 9a-d Histologie der natürlichen Knochenbruchheilung.	Seite 24
Abb. 10 Aufbau des Skelttmuskels aus Muskelfaserbündeln bzw. Muskelfasern.	Seite 25
Abb. 11 Zenkersche Degeneration der Muskelfasern.	Seite 27
Abb. 12a-b. (a) „Aufgesplittetes“ Erscheinungsbild der Muskelfasern (\rightarrow) als Zeichen stattgefundener Reparationsprozesse.	Seite 29
Abb. 13a-b (a) Strukturformel der Makromermischung. (b) Dreikomponentenklebstoff mit den beiden Feststoffkomponenten aus β -Tricalciumphosphat und der viskösen Makromermischung.	Seite 30
Abb. 14a-b (a) Extraktion des spongiösen Knochenzylinders mit DBCS aus der Femurkondyle. (b) Spongiöser Bohrlochdefekt (6,3 x 15 mm) nach Knochenzylinderentnahme im Patellagleitlager der Femurkondyle.	Seite 34
Abb. 15a-c (a) Knochenzylinder (5,7 x 15 mm) aus der Femurkondyle. (b) Applikation des Klebstoffes in Form dünner Längsstreifen. (c) Anatomische Reposition nach Klebstoffapplikation.	Seite 35
Abb. 16a-b (a) Knochenzylinder nach Replantation in das Patellagleitlager der Femurkondyle. (b) Wundverschluss des Operationsgebietes durch Nahtmaterial.	Seite 36
Abb. 17a-b (a) Präparation einer rechtsparavertebralen, muskulären Rückentasche. (b) Applikation des Knochenklebstoffes in die präparierte Rückentasche.	Seite 36
Abb. 18 Darstellung der Aorta abdominalis und Vena cava inferior mit den angelegten proximalen und distalen Ligaturen für die Perfusion.	Seite 38
Abb. 19 Darstellung der Schnittebenen (Femurkondyle, Ansicht von der Seite).	Seite 40
Abb. 20 Darstellung der Schnittebenen (Femurkondyle (perfundiert), Ansicht von der Seite)	Seite 40
Abb. 21 Darstellung der angefertigten Knochenscheiben, von links nach rechts: ventrale Scheibe, mittlere Scheibe und dorsale Scheibe.	Seite 40
Abb. 22a-b (a) Eingescannte Übersichtsaufnahme eines Dünnschliffpräparates in H.E.-Färbung. (b) Zustand nach Überführung des Bildes in ein binäres Rot-Weiss-Bild.	Seite 47
Abb. 23a-b (a) Festlegung der Messbereiche mit Hilfe der Figuren 1 und 2. (b) Übertragung der festgelegten Figuren auf das Falschfarbbild.	Seite 48

Abb. 24a-b (a) Unauffällige Femurkondyle mit eingewachsenem Knochenzylinder. (b) Kniegelenks-erguß bei Kaninchen Nr 19.	Seite 54
Abb. 25a-b Lichtmikroskopie – Klebstoffgruppe nach 10 Tagen.	Seite 55
Abb. 26 Lichtmikroskopie – Klebstoffgruppe nach 10 Tagen.	Seite 56
Abb. 27a-b Lichtmikroskopie - Klebstoffgruppe nach 10 Tagen.	Seite 57
Abb. 28a-d Lichtmikroskopie - Kontrollgruppe nach 10 Tagen.	Seite 58
Abb. 29a-b Lichtmikroskopie – Klebstoffgruppe nach 21 Tagen.	Seite 60
Abb. 30a-c Lichtmikroskopie - Klebstoffgruppe nach 21 Tagen.	Seite 61
Abb. 31a-c Lichtmikroskopie - Klebstoffgruppe nach 21 Tagen.	Seite 62
Abb. 32a-b Lichtmikroskopie – Klebstoffgruppe nach 21 Tagen.	Seite 63
Abb. 33 Lichtmikroskopie - Kontrollgruppe nach 21 Tagen.	Seite 64
Abb. 34a-b Lichtmikroskopie - Kontrollgruppe nach 21 Tagen.	Seite 65
Abb. 35a-d Lichtmikroskopie - Klebstoffgruppe nach 3 Monaten.	Seite 67
Abb. 36 Lichtmikroskopie – Klebstoffgruppe nach 3 Monaten.	Seite 68
Abb. 37a-b Lichtmikroskopie - Klebstoffgruppe nach 3 Monaten.	Seite 69
Abb. 38 Lichtmikroskopie - Kontrollgruppe nach 3 Monaten.	Seite 70
Abb. 39a-b Lichtmikroskopie - Kontrollgruppe nach 3 Monaten.	Seite 71
Abb. 40a-b Lichtmikroskopie - Klebstoffgruppe nach 12 Monaten.	Seite 73
Abb. 41a-c Lichtmikroskopie - Klebstoffgruppe nach 12 Monaten.	Seite 74
Abb. 42a-b Lichtmikroskopie - Kontrollgruppe nach 12 Monaten	Seite 75
Abb. 43a-b Lichtmikroskopie – Kontrollgruppe nach 12 Monaten.	Seite 75
Abb. 44 Lichtmikroskopie - Klebstoffgruppe nach 10 Tagen.	Seite 77
Abb. 45a-b Lichtmikroskopie - Klebstoffgruppe nach 10 Tagen.	Seite 78
Abb. 46 Lichtmikroskopie - Klebstoffgruppe nach 10 Tagen.	Seite 79
Abb. 47 Lichtmikroskopie - Kontrollgruppe nach 10 Tagen.	Seite 80
Abb. 48 Lichtmikroskopie - Kontrollgruppe nach 10 Tagen.	Seite 80
Abb. 49 Lichtmikroskopie - Klebstoffgruppe nach 21 Tagen.	Seite 82
Abb. 50 Lichtmikroskopie - Klebstoffgruppe nach 21 Tagen.	Seite 82
Abb. 51 Lichtmikroskopie - Kontrollgruppe nach 21 Tagen.	Seite 83
Abb. 52 Lichtmikroskopie - Kontrollgruppe nach 21 Tagen.	Seite 84

Abb. 53 Lichtmikroskopie – Klebstoffgruppe nach 3 Moanten.	Seite 85
Abb. 54a-c Lichtmikroskopie - Klebstoffgruppe nach 3 Monaten.	Seite 86
Abb. 55 Lichtmikroskopie - Kontrollgruppe nach 3 Monaten.	Seite 87
Abb. 56a-c Lichtmikroskopie - Klebstoffgruppe nach 12 Monaten.	Seite 88
Abb. 57a-c Enzymhistochemie- Klebstoffgruppe nach 10 Tagen.	Seite 90
Abb. 58a-b Enzymhistochemie - Klebstoffgruppe nach 21 Tagen.	Seite 91
Abb. 59a-b Enzymhistochemie - Klebstoffgruppe nach 3 Monaten.	Seite 92
Abb. 60a-b Enzymhistochemie - Klebstoffgruppe nach 12 Monaten.	Seite 92
Abb. 61 Elektronenmikroskopie - Klebstoffgruppe nach 10 Tagen.	Seite 93
Abb. 62 Elektronenmikroskopie - Klebstoffgruppe nach 21 Tagen.	Seite 94
Abb. 63 Elektronenmikroskopie - Klebstoffgruppe nach 21 Tagen.	Seite 94
Abb. 64 Elektronenmikroskopie - Klebstoffgruppe nach 21 Tagen.	Seite 95
Abb. 65a-b Elektronenmikroskopie - Klebstoffgruppe nach 3 Monaten.	Seite 96
Abb. 66 Elektronenmikroskopie - Klebstoffgruppe nach 21 Tagen.	Seite 96
Abb. 67a-d Elektronenmikroskopie - Klebstoffgruppe nach 12 Monaten.	Seite 97

„Ich erkläre: Ich habe die vorgelegte Dissertation selbständig, ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der Satzung „Satzung der Justus-Liebig-Universität Giessen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten.“

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei all jenen ganz herzlich bedanken, die mich bei der Erstellung dieser Arbeit unterstützt haben.

Ich danke Herrn Univ.-Prof. Dr. Dr. R. Schnettler, Direktor der Klinik und Poliklinik für Unfallchirurgie, für die Überlassung des Dissertationsthemas sowie die Bereitstellung aller zur Durchführung dieser Arbeit benötigten Mittel.

Ein besonderer Dank gebührt meinem Betreuer und Doktorvater Herrn PD Dr. C. Heiß für die Übernahme der Betreuung und seine großzügige Unterstützung bei der Planung und Anfertigung dieser Arbeit.

Ich danke ebenfalls Herrn Dr. R. Kraus für seine Unterstützung bei der Durchführung der Operationen und der Mitbetreuung des Projekts.

Meinen herzlichsten Dank möchte ich weiterhin an alle Mitarbeiter des Laboratoriums für experimentelle Unfallchirurgie der Justus-Liebig-Universität in Giessen aussprechen, die mir bei Problemen und Rückfragen jeglicher Art stets hilfreich zur Seite gestanden haben und mich bei vielen Aufgaben tatkräftig unterstützten. Insbesondere danke ich Frau Dr. U. Sommer für ihre engagierte Hilfe bei den lichtmikroskopischen Auswertungen und weit darüber hinaus, Frau A. Hild für Ihre freundliche Unterstützung bei den transmissionselektronenmikroskopischen und histomorphometrischen Analysen sowie Frau I. Oberst und Herrn R. Braun für ihre unermüdliche Hilfsbereitschaft bei der Herstellung der Präparate.

Gedankt sei auch Herrn W. Pabst, Mitarbeiter des Instituts für Medizinische Informatik der Justus Liebig Universität in Giessen, für seine Beratung und Hilfe in Fragen der statistischen Datenauswertung.

Schließlich danke ich meiner Familie, meinem Freund A. Förster und allen Freunden für ihre unterstützenden und motivierenden Worte. Insbesondere möchte ich mich bei meinen Eltern bedanken, die mich immer gefördert und unterstützt haben und ohne deren Hilfe diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre. Ihnen widme ich diese Arbeit von ganzem Herzen.

Lebenslauf

Persönliche Daten:

Name: Agnes Brigitte Skorupa
Geburtsdatum, - ort: 07.09.1980 in Groß Strehlitz (Polen)
Konfession: römisch-katholisch
Familienstand: ledig
Eltern: Frau Gabriele Skorupa, Herr Andreas Skorupa

Schulbildung:

09/1987-03/1990 Grundschule in Groß Strehlitz
04/1990-09/1994 Grund- und Förderstufenschule in Waldsolms
09/1994-06/2001 Christian-Wirth-Gymnasium in Usingen mit dem
Erwerb der allgemeinen Hochschulreife

Hochschulbildung:

10/2001-10/2007 Studium der Humanmedizin an der Justus-Liebig-
Universität Giessen
10/2003 Ärztliche Vorprüfung
11/2007 2. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung - Staatsexamen

Famulaturen:

03/2004-04/2004 Famulatur im Klinikum Wetzlar, Bereich: Anästhe-
siologie und Intensivmedizin
09/2004-10/2004 Famulatur im internistischen Praxiszentrum am
Krankenhaus Balserische Stiftung in Giessen, Be-
reiche: Kardiologie, Rheumatologie, Gastroentero-
logie, Diabetologie, Sportmedizin
08/2005-09/2005 Famulatur im Rahmen eines Fortbildungsstipen-
diums im internistischen Praxiszentrum am Kran-
kenhaus Balserische Stiftung in Giessen
03/2006-04/2006 Famulatur in der Klinik und Poliklinik für Unfallchi-
rurgie der Justus Liebig Universität in Giessen

Praktisches Jahr:

08/06-12/06 Innere Medizin, Klinikum Wetzlar (Prof. Dr. W. Kra-
mer)
12/06-04/07 Allgemein Chirurgie und Unfallchirurgie, Klinikum
Wetzlar (PD Dr. Ch. Kuntz, Dr. J. Bindewald, Prof.
Dr. H. Knaepler)
04/07-07/07 Urologie, Klinikum Wetzlar (PD Dr. G. Kleinhans)