

**Einfluss der ultraschallgestützten Implantatfixation
auf das Knochenremodelling im experimentellen
Osteotomiemodell am Femurcondylus
des Kaninchens**

Inauguraldissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors der Humanbiologie
des Fachbereichs Medizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von
Paul Bernd Robioneck
aus Setterich/Baesweiler

Gießen 2010

Aus der Klinik und Poliklinik für Unfallchirurgie
Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. Dr. med. vet. Reinhard Schnettler
Des Universitätsklinikums Gießen und Marburg GmbH
Standort Gießen

Gutachter: Univ.-Prof. Dr. med. Dr. med. vet. R. Schnettler
Gutachter: Prof. Dr. P. Augat

Tag der Disputation: 16.12.2010

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung und Fragestellung	1
2	Theoretische Grundlagen	5
2.1	Knochenzellen und Frakturheilung	5
2.2	Grundlagen Ultraschall und Ultraschallschweißen	11
3	Material und Methoden	13
3.1	Osteosynthesematerialien und Instrumente	13
3.2	Versuchsplanung und Versuchsablauf	15
3.2.1	Versuchstiere	15
3.2.2	Versuchsablauf	16
3.2.3	Narkoseverfahren	17
3.2.4	Operationstechnik	17
3.2.5	Nachsorge der Tiere	20
3.2.6	Euthanasie und Perfusion	20
3.3	Mikro-Computertomographie	23
3.4	Histologische Verfahren	24
3.5	Immunhistochemie	25
3.6	Transmissionselektronenmikroskopie	26
3.7	Histomorphometrie	26
3.8	Biomechanik	28
3.8.1	Versuchsaufbau	28
3.8.2	Analyse	30
4	Ergebnisse	33
4.1	Mikro-Computertomographie	33
4.2	Histologie	35
4.2.1	Makroskopische Beurteilung	35
4.2.2	Knochenremodelling im Osteotomiespalt	37
4.2.3	Implantatinterface	46
4.2.4	Resorptionsverhalten am Sonic Pin	57
4.3	Immunhistochemie	63
4.4	Transmissionselektronenmikroskopie	72
4.5	Histomorphometrie	83

4.5.1	Histomorphometrie der Fremdkörperreaktion CD68	83
4.5.2	Histomorphometrie der Gewebeanteile im Osteotomiespalt	85
4.6	Biomechanik.....	90
5	Diskussion	93
5.1	Tiermodell und Studiendesign	93
5.2	Knochenheilung.....	95
5.3	Interface der Implantate und Resorptionsverhalten des Pins	100
5.4	Biomechanik.....	104
5.5	Das USS im Vergleich zu anderen Technologien.....	106
5.6	Ausblick.....	110
6	Zusammenfassung.....	111
7	Summary	113
8	Verzeichnisse	115
8.1	Literaturverzeichnis	115
8.2	Tabellenverzeichnis.....	122
8.3	Abbildungsverzeichnis.....	123
8.4	Abkürzungsverzeichnis	125
9	Erklärung.....	127
10	Danksagung.....	129

1 Einleitung und Fragestellung

Die Unfallchirurgie und Orthopädie beschäftigt sich mit der Wiederherstellung und Erhaltung des verletzten Bewegungsapparates und der Organsysteme. Ein Schwerpunkt dabei ist die Rekonstruktion des Skelettes. Durch die Osteosynthese werden die frakturierten Knochen in eine korrekte anatomische Position gebracht und mittels Implantaten so fixiert, dass eine mechanische Belastbarkeit gegeben ist und die ungestörte Frakturheilung stattfinden kann.

Gegenwärtig genutzte Verfahren wie Platten- und Schraubenosteosynthese, Verriegelungsnagel und Fixateur Extern liefern eine stabile Verbindung. Trotz der stetigen Weiterentwicklung dieser Osteosyntheseverfahren kommt es jedoch in der klinischen Anwendung immer wieder zum Auftreten von Komplikationen und Versagen dieser unterschiedlichen Verfahren [Perren, SM; 2002].

Die operative dauerhafte Fixation strukturgeschwächter Knochen (z.B. bei der Osteoporose) ist mit den zur Verfügung stehenden Osteosynthese-Systemen nur unzureichend durchführbar und mit steigenden Komplikationsraten behaftet. [Kim, WY et al; 2001, Becker, W et al; 2000].

Die Osteoporose ist eine Skeletterkrankung, die zur Fragilitätsfraktur neigt, da die Knochenfestigkeit den physikalischen Anforderungen des Alltags nicht genügt. Neben genetisch vorgegebenen Defekten der skelettrelevanten Signalkaskaden ist darüber hinaus die Kopplung zwischen physikalischen Kräften und Genexpression bei der Osteoporose gestört und zusammengenommen damit auch die Frakturheilung kompromittiert. Beim gesunden Knochenmetabolismus werden Knochenmasse und Knochenfestigkeit den jeweiligen physikalischen Kräften entsprechend modifiziert.

Bei osteoporotischen Knochenveränderungen treten verstärkt Probleme in der notwendigen Frakturversorgung auf, da bei der überwiegenden Anzahl der heutzutage eingesetzten Osteosynthese-Materialien keine flächenhafte Kraftverteilung besteht. Verschraubungen wiederum sind auf eine gute Knochenfestigkeit angewiesen, schwächen diese jedoch beim Einbringvorgang. Bei der krankhaft veränderten Knochenstruktur ist dies ursächlich für die auftretenden Komplikationen verantwortlich zu machen.

Neben metallischen werden auch zunehmend bioresorbierbare Werkstoffe als Osteosynthesemittel eingesetzt. Pins aus resorbierbaren Polymeren werden hauptsächlich in der Hand- und Fußchirurgie verwendet, um die Osteosynthese zu unterstützen. [Jensen, CH et al; 1996; Kumta, SM et al; 1998; Burns, AE et al; 1998]. Bioresorbierbare Kopolymere bestehend aus Poly-(L,DL)-Laktiden (PLDLA) sind biokompatibel und sicher im klinischen Einsatz. [Ignatius, AA et al; 1996; Prokop, A et al; 2004]. Die Indikationen sind jedoch durch die begrenzten biomechanischen Eigenschaften und durch die geringe Fixation zum Knochen, aufgrund reduzierter Festigkeit, begrenzt. [Daniels, AU et al; 1990; Ambrose, CG et al; 2004].

Eine verbesserte primäre Fixation des Implantates in unterschiedlich veränderten Knochenstrukturen könnte das Indikationsspektrum erweitern.

Ein vielversprechender Ansatz hierzu stellt möglicherweise die sogenannte „Bone Welding“ oder auch „Sonic Fusion“ Technologie dar. Neuartig dabei ist das Ultraschallschweißen (USS) von thermoplastischen resorbierbaren Implantaten, wobei das Polymer mittels Ultraschallenergie während des Einbringens oberflächlich aufgeschmolzen wird. Die flüssige Phase dringt dabei in die das Implantat umgebende interkonnektierende Porenstruktur des spongiösen Knochens ein und erstarrt durch die Wärmeabsorption des Implantates und des Gewebes innerhalb von wenigen Sekunden.

Dabei wird eine große Kontaktfläche zwischen Implantat und dem angrenzenden Knochengewebe erzielt, ohne jedoch den Knochen mechanisch zu schädigen.

Ursprünglich stammt das USS aus der industriellen Kunststofffügetechnik. So revolutionierte es die Uhrentechnologie, da Quarzuhren mit Hilfe dieser Technik erstmals so günstig produziert werden konnten, dass eine Reparatur sich nicht mehr lohnte. Da das USS im Vergleich zum herkömmlichen Kleben keine langen Abbindezeiten benötigt, kommt es auch in der Möbelindustrie seit mehreren Jahren zur Anwendung [Mayer, J et al; 2008].

Bei der möglichen Anwendung dieser Technik in der Frakturversorgung müssen jedoch zuvor einige Fragen beantwortet werden.

So muss die Auswirkung des USS auf die zellulären Komponenten im Osteotomie-(Fraktur-) spalt untersucht, die knöcherne Implantatintegration sowie die Resorption des Sonic Pins und darüberhinaus seine Biokompatibilität mit Hilfe unterschiedlicher Verfahren (Röntgen, Mikrocomputertomographie, Licht- und Transmissions-

elektronenmikroskopie sowie immunhistochemische, histomorphometrische und biomechanische Untersuchungen) analysiert und erarbeitet werden.

Ziel der vorliegenden experimentellen Arbeit ist es, den Einfluss der Sonic Fusion Technologie, in ihrer Anwendung auf einem neu entwickelten, resorbierbaren Poly-(L-DL)-Laktid-Pin auf die zellulären knöchernen Umbauvorgänge in einem standardisierten Osteotomiemodell am Femurcondylus des Kaninchens [Heiss, C; 2006] zu untersuchen.

Dabei sollen nachfolgende Fragen beantwortet werden.

- Kommt es durch diese neuartige USS Methode zu Störungen der knöchernen Heilung?
- Verändert sich das physiologische Remodelling des Knochens?
- Treten unerwartete Reaktionen im Interface des Polylaktidmaterial des Sonic Pins mit dem umliegenden Gewebe auf?
- Haben unterschiedliche Standzeiten (Implantationsdauer) einen Einfluss auf die Resorption des Polylaktidmaterials?
- Ist diese neuartige Methode des USS hinsichtlich Anwendungssicherheit und Effektivität in der Frakturversorgung einer heutzutage angewandten Schraubenosteosynthese gleichwertig?

2 Theoretische Grundlagen

2.1 Knochenzellen und Frakturheilung

Knochenzellen

Das knöchernen Skelett hat neben seiner Stützfunktion und der Schutzfunktion für das zentrale Nervensystem und die inneren Organe wichtige Aufgaben in der Blutzellenproduktion und in der Speicherung und Bereitstellung von Kalzium- und Phosphationen. So sind 99% des gesamten Kalziums und 60% des Phosphors des menschlichen Körpers im Skelett gebunden [Junqueira, LC et al; 1996].

Der Knochen ist ein aus organischer und anorganischer Knochenmatrix sowie zellulären Elementen bestehendes differenziertes Stützgewebe. Der organische Anteil besteht hauptsächlich aus Kollagen mit einem anorganischen Kristallinmaterial aus verschiedenen Kalksalzen und Wasser [Junqueira, LC et al; 2005].

Knochen wird von Zellen produziert, enthält Zellen und wird durch Zellen resorbiert. Osteoblasten sind knochenbauende Zellen und entwickeln sich aus Osteoprogenitorzellen, den mesenchymalen Stammzellen (MSC), die im endostalen oder periostalen Bindegewebe liegen. Die Osteoblastogenese wird von einer großen Anzahl von Transkriptionsfaktoren, wie zum Beispiel Runx2 [Stein, GS et al; 2004] oder Osterix [Nakashima, K et al; 2002] gesteuert, wobei Hormone und Wachstumsfaktoren regelnd eingreifen. Neben Östrogenen, Glucokorticoiden und Vitamin D ist das Parathormon (PTH) das wichtigste Hormon in diesem Kontext. Das bone morphogenetic protein-2 (BMP-2) ist entscheidend für die Osteoblastenaktivität und Rekrutierung [Khosla, S et al; 2008].

Osteoklasten sind die knochenabbauenden Zellen und differenzieren sich aus hämatopoetischen Stammzellen (HSC). Sie entstehen durch Fusionen von einkernigen Vorläuferzellen und gehören zur Zellreihe der Monozyten/Makrophagen. Hier sind es vor allem zwei Gruppen von Faktoren, welche die Osteoklastengnese regulieren:

Zum einen Interleukine (IL-1,3,6 und 11), Leukemia Inhibitory Faktor (LIF), Tumor-Nekrosefaktor (TNF), Granulocytemacrophage-colony-stimulating-factor (GM-CSF) und Macrophage-colony-stimulating-factor (M-CSF).

Zum anderen RANKL – ein membrangebundener Ligand, der u. a. von Osteoblasten exprimiert wird – stimuliert nach Bindung an den Rezeptor RANK die Differenzierung

des zuvor durch M-CSF expandierten Osteoklasten-Präkursorpols. Osteopontin (OPN; ein Glycoprotein, das von Osteoblasten sekretiert wird) ist der lösliche „decoy-receptor“ und fungiert als Inhibitor der Osteoklastogenese, indem er „überschüssige“ RANKL-Moleküle abfängt [Boyle, WJ et al; 2003].

Die Differenzierung und Kommunikation der Osteoklasten und Osteoblasten wird durch zirkulierende Hormone, lokale Cytokine und Wachstumsfaktoren gesteuert. Die molekulare Regulation der Osteoklastenaktivität ist bis jetzt noch nicht vollständig geklärt [Mizoguchi, T et al; 2009].

In der Knochenmatrix sind die Knochenzellen, die Osteozyten, verteilt, die mittels Zytoplasmafortsätzen, welche in kleinen Kanälen verlaufen, Verbindungen zu den Nachbarzellen und Blutgefäßen unterhalten [You, LD et al; 2004]. Beim Ablauf von Stoffwechselprozessen und der Versorgung mit Nährstoffen nimmt das Kanälchensystem eine zentrale Stellung ein [Junqueira, LC et al; 2005]. Durch zytoplasmatische Prozesse können sich Osteozyten ausdehnen und retrahieren [Bonewald, LF et al; 2007].

Im Wesentlichen wird zwischen spongiösem und kortikalem Knochen (Kompakta) unterschieden. Die Kompakta wird dabei als ein Verbundsystem mit mehrfachen Ineinanderschachtelungen angesehen. Die Spongiosa andererseits stellt ein schwammartiges Geflecht dar, welches die Aufgabe der Kraftverteilung bei minimaler Eigenmasse (Leichtbau) hat. Aufgrund seiner Lamellenstruktur hat der Knochen die Fähigkeit, mehrdimensional Verformungswiderstand zu leisten. Das Knochengewebe selbst enthält zwei Komponenten, die einer Verformung Widerstand leisten können. Dies sind die zugfesten Kollagenfasern und die druckfesten anorganischen Einlagerungen [Junqueira, LC et al; 2005].

Die strukturelle Integrität des gesunden Knochens wird aus zellbiologischer Sicht in Anpassung an die wechselnden mechanischen Einwirkungen auf das Skelettsystem durch stetige Auf- und Abbauvorgänge aufrechterhalten und durch zellvermittelnde Aktivitäten gewährleistet. Vielfältige Beobachtungen zur Reaktion des Knochens bei unterschiedlichen Be- und Entlastungen werden beschrieben [Perren, SM; 2002]. Dabei bauen Osteoklasten den Knochen ab, während Osteoblasten neue Knochenmatrix synthetisieren. Dieses eng gekoppelte und fein abgestimmte Gleichgewicht von Auf- und Abbau – das Bone Remodelling – vollzieht sich innerhalb transienter funktionell gekoppelter Einheiten, den „Basic multicellular Units“ (BMU) [Jilka, RL; 2003].

Im Vergleich zur Lebensdauer einer BMU, die mit ca. 3 Monaten angesetzt wird [Hernandez, SJ et al; 1999], ist die der einzelnen Zellen, Osteoklasten und Osteoblasten, relativ kurz. Folglich werden apoptotische Zellen beider Populationen stetig durch Vorläuferzellen aus dem Knochenmark ersetzt.

Frakturheilung

Bei einem Verlust der knöchernen Kontinuität und Integrität durch eine Fraktur erfolgt im Idealfall in der darauf folgenden Heilungs- und Konsolidierungsphase die Wiederherstellung der vollen Belastbarkeit des frakturierten Knochens.

Verschiedene Zellen und Gewebetypen sind am physiologischen Ablauf der Frakturheilung beteiligt.

Die Frakturheilung wird in eine direkte und in eine indirekte Frakturheilung eingeteilt. Bei der direkten Frakturheilung, der desmalen Ossifikation, erfolgt die Knochenneubildung des sogenannten Osteoids direkt aus dem mesenchymalen Gewebe. Bei der indirekten Frakturheilung (chondrale Ossifikation) wird die Knochenneubildung auf dem Umweg über die Bildung einer Knorpelmatrix, welche erst im Folgenden schrittweise abgebaut und durch Knochengewebe ersetzt wird, erreicht [Junqueira, LC et al; 2005].

Unter idealen Umständen kann das ursprüngliche Gewebe und dessen Funktion nahezu vollständig wieder hergestellt werden [McKibbin, B; 1978].

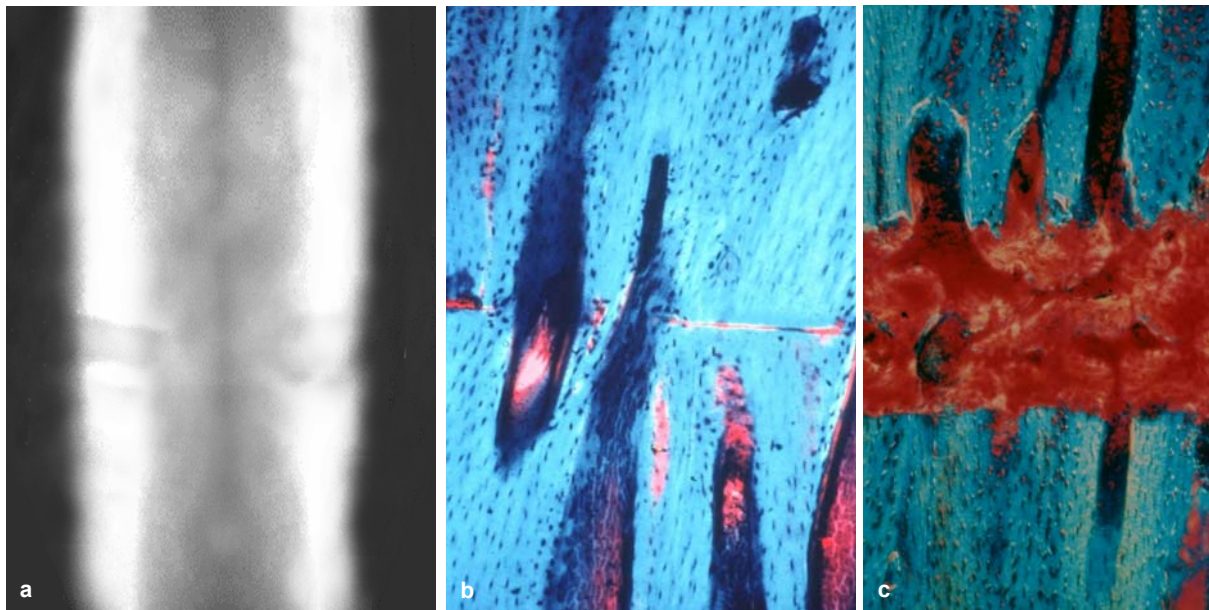
Die primäre Frakturheilung ist nur unter absolut stabilen Verhältnissen möglich. Sie ist gekennzeichnet durch das völlige Fehlen eines Frakturkallus. Man unterscheidet zwischen Kontakt- und Spaltheilung (Abb. 1).

Bei der Kontaktheilung besteht ein direkter Kontakt der Fraktarenden ohne Dislokation oder Spaltenbildung (Abb 1a), so dass eine unmittelbare Überbrückung der Knochenanteile durch aktivierte Osteone erfolgen kann.

Dabei schieben sich Osteoklasten aus eröffneten Havers-Kanälen in die gegenüberliegende Bruchfläche. Im Zuge der Regeneration entstehen trichterförmige Resorptionskanäle, in die Osteoblasten einwandern und neuen Knochen anlagern, wodurch es zur Bildung neuer, den Frakturspalt überbrückender Osteone kommt (Abb. 1b).

Spaltheilung findet in solchen Fällen statt, wo zwischen stabil fixierten Fragmenten ein Spalt (max. 0,5-0,8 mm) verbleibt (Abb. 1c). In diesem entsteht ein fibroblasten-

Abb. 1 Primäre Frakturheilung unter absolut stabilen Verhältnissen [Augat, P; 1995]



(a) Röntgenbild einer Kontaktheilung
(b) Histologie einer Kontaktheilung, Osteone überbrücken den Frakturspalt
(c) Histologie einer Spaltheilung

und kapillarreiches Granulationsgewebe mit Osteoblasten (Abb. 1c), die ohne vorherige endostale oder periostale Kallusformation neuen Faserknochen und durch Umbau Lamellenknochen bilden [Junqueira, LC et al; 1996]. Bei der Spaltheilung entfällt die Osteoklastenaktivierung, da bereits genügend Raum für die Osteoblasten vorhanden ist.

Defekte größer als 0,8 mm weisen oft nur eine langsam voranschreitende Knochenbildung auf. Intermediär auftretendes Bindegewebe, das anschließend in Geflechtknochen umgewandelt wird, kann dabei im Rahmen der Knochenheilung vorkommen. [Schenk, RK et al; 1977; Katthagen; BD; 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.

Bei breiterem Frakturspalt erfolgt die Knochenheilung indirekt. Diese Form der Frakturheilung findet sich bei weniger starren, flexibleren Osteosynthesen, die ein gewisses Maß an Mikrobewegungen im Frakturspalt zulassen. Es handelt sich dabei um einen komplexen Vorgang, der über die Ausbildung eines die Fraktur überbrückenden Kallus aus Knorpel-, Knochenzellen und Bindegewebe, die normale Knochenstruktur wiederherstellt (Abb. 2a). Dabei ist jedoch das ungestörte und komplexe Zusammenspiel zwischen knochenbildenden (Osteoblasten) und

knochenabbauenden (Osteoklasten) Zellen, sowie der Einfluss unterschiedlicher Wachstumsfaktoren, Zytokine und Hormone zur Bildung dieses frakturüberbrückenden Kallus unabdingbar [Einhorn, TA; 1998].

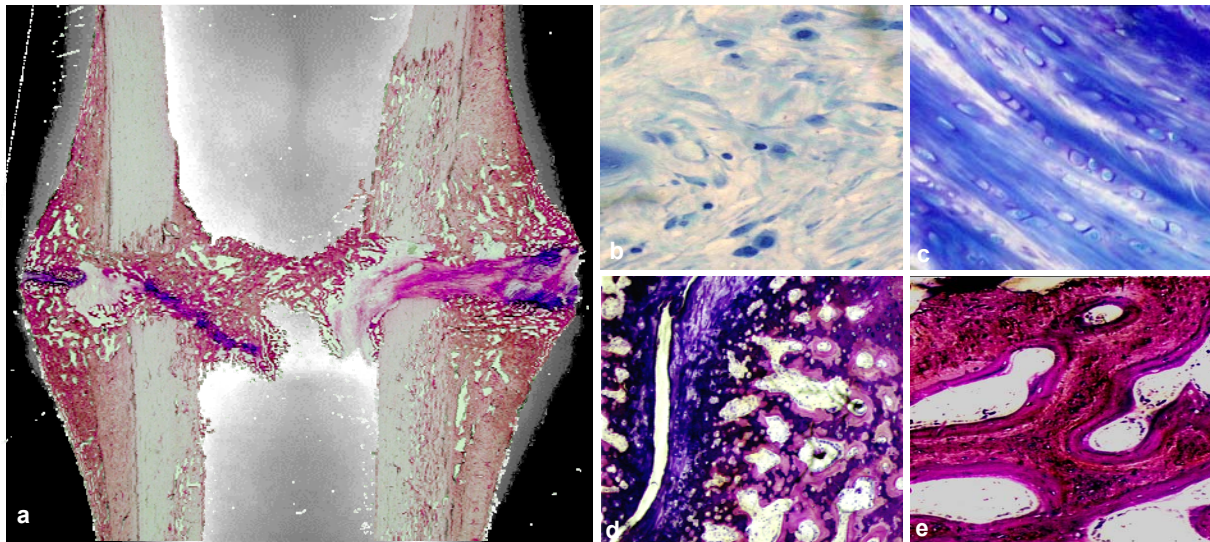
Die indirekte Frakturheilung läuft in 5 unterschiedlichen Phasen ab [Einhorn, TA; 1998]. In der Frakturphase kommt es zur Schädigung von Kortikalis, Knochenmark, Endost, Periost und angrenzenden Weichteilen. Es entsteht ein Hämatom im Frakturspalt, in welches in der anschließenden Entzündungsphase lokal Granulozyten, Mastzellen und Monozyten einwandern (Abb. 2b). Darüber hinaus migrieren pluripotente Stammzellen mesenchymaler Herkunft als Vorläufer der Osteoblasten in den Frakturspalt. Die Zelldifferenzierung und Angiogenese wird durch die Freisetzung von Wachstumsfaktoren und Zytokinen reguliert [Einhorn, TA; 1998].

Nach Abklingen der Entzündungsphase wird in der nachfolgenden Phase der Angiogenese und Chondrogenese über einen Zeitraum von 4 bis 6 Wochen Granulationsgewebe unter dem Einfluss von Wachstumsfaktoren aufgebaut (Abb. 2c). Fibroblasten, Kollagen Typ 1, Kapillaren und bereits erste Mineraldepots bilden die Hauptkomponenten dieses Granulationsgewebes und ersetzen das Frakturhämatom schrittweise. Mesenchym- und Osteoprogenitorzellen differenzieren zu Chondroblasten und Osteoblasten und bilden den sogenannten weichen Kallus, der sich von peripher nach zentral in der Frakturzone ausbildet [Lee, FY et al; 1998]. Daran schließt sich ein fließender Übergang zur Phase der chondralen und der desmalen Ossifikation an (Abb. 2d). Zur Förderung der Osteoblastenproliferation sezernieren Makrophagen Proteine, wie zum Beispiel Osteocalcin und Bone Morphogenetic Proteins. Osteoblasten und Osteoklasten bilden die BMU, die im Weiteren den zerstörten Knochen abbauen und verantwortlich für die Entstehung der als Geflechtknochen bezeichneten neuen Knochenstruktur sind.

Im zentralen Frakturbereich findet zunächst keine Knochenneubildung statt, da initial Osteoklasten und auch Makrophagen den nekrotischen Knochen abbauen. Zu einem späteren Zeitpunkt finden sich in diesem Bereich Chondroblasten und auch Osteoblasten und es kommt zur Überbrückung. Die Fraktarenden werden durch einen weichen Kallus verbunden, welcher folgend durch eine zunehmende Mineralisation aushärtet und in einem Zeitraum von ca. 2 bis 4 Monaten, abhängig von der Frakturlokalisation, in Geflechtknochen umgewandelt wird.

In der Phase des Umbaus, dem sogenannten „Modelling“ und „Remodelling“ erfolgt die allmähliche Umwandlung in lamellären Knochen (Abb. 2e), welche innerhalb eines weiteren Zeitraums von 6 bis 24 Monaten in der Wiederherstellung der ursprünglichen Knochenstruktur mit Periost, Endost und Markraum endet [Debrunner, AM; 2002].

Abb. 2 Histologische Phasen der Frakturheilung bei breiterem Frakturspalt [Augat, P; 1995]



- (a) Übersicht Ossifikation des Brückenkallus
- (b) Entzündung: elastisches Bindegewebe
- (c) Angiogenese und Knorpelbildung: Faserknorpel
- (d) Kalzifizierung: Enchondrale Knochenbildung
- (e) Verknöcherung, Remodelling: Knochen

Zwischen den knochenabbauenden und -aufbauenden Zellen besteht auf zellulärer Ebene eine ständige Interaktion. Osteoblasten synthetisieren Proteine, Osteoprotegerin (OPG) und den Rezeptor Aktivator of Nuclear Factor- κ B Ligand (RANKL), die auf die Differenzierung von Osteoklasten wirken [Lacey, DL et al; 1998; Kong, YY et al; 1990]

OPG agiert hierbei als löslicher Rezeptor – Antagonist für RANKL, welcher wiederum die Differenzierung von aktivierten Osteoklasten aus Vorläuferzellen fördert [Hsu, H et al; 1999].

Die Balance zwischen OPG und RANKL und die damit verbundene Wirkung auf Osteoklasten reguliert das Ausmaß an Knochenresorption und ist hierdurch ein zentraler Pfeiler in der Frakturheilung [Hofbauer, LC et al; 1999].

2.2 Grundlagen Ultraschall und Ultraschallschweißen

Ultraschallwellen sind unschädliche periodische Schwingungen von Materieteilchen, die sich als elastische Wellen räumlich ausbreiten, ähnlich den Tönen. Der Frequenzbereich ist für das humane Ohr unhörbar und liegt zwischen 20kHz und 1000MHz. Ultraschallwellen werden in einer Sonde mittels piezoelektrischen (= elektrisch durch Druck) Kristallen erzeugt. Die hochfrequente elektrische Wechsellspannung regt die Kristalle zu Schwingungen an, welche Druckschwankungen in Form von Ultraschallwellen verursachen [Grewell, DA et al; 2003].

Ultraschallwellen finden Anwendung in Technik und Medizin. Einige Beispiele dafür sind Ultraschallmikroskop, Abtastung von Material (z.B. Sonarabtastung des Meeresboden), Zerstörung von Materie durch Resonanz (z.B. Tumorbekämpfung, Nierensteinzertrümmerung), Sonografie (Ultraschalluntersuchungen basierend auf dem Impulsechoverfahren zur Darstellung verschiedener Gewebsarten in Abhängigkeit vom Flüssigkeitsgehalt), Zerstäuben, Vernebeln, Emulgieren und Mischen von Flüssigkeiten (z.B. Nebelmaschinen oder Luftbefeuchter).

Seit einigen Jahren wird das USS industriell eingesetzt. Grundsätzlich beruht es auf hochfrequenten mechanischen Schwingungen, die durch eine Sonotrode an einem thermoplastischen Werkstück angelegt werden. Diese Mikrobewegungen werden durch den Thermoplasten bis hin zur Kontaktfläche der Struktur, in die das Werkstück eingeschweißt wird, übertragen. Durch eine zusätzliche von außen über die Sonotrode aufgebrachte Kraft wird eine permanente Druckspannung induziert, die eine vollständige Übertragung der Sonotrodenschwingungen auf das Werkstück ermöglicht.

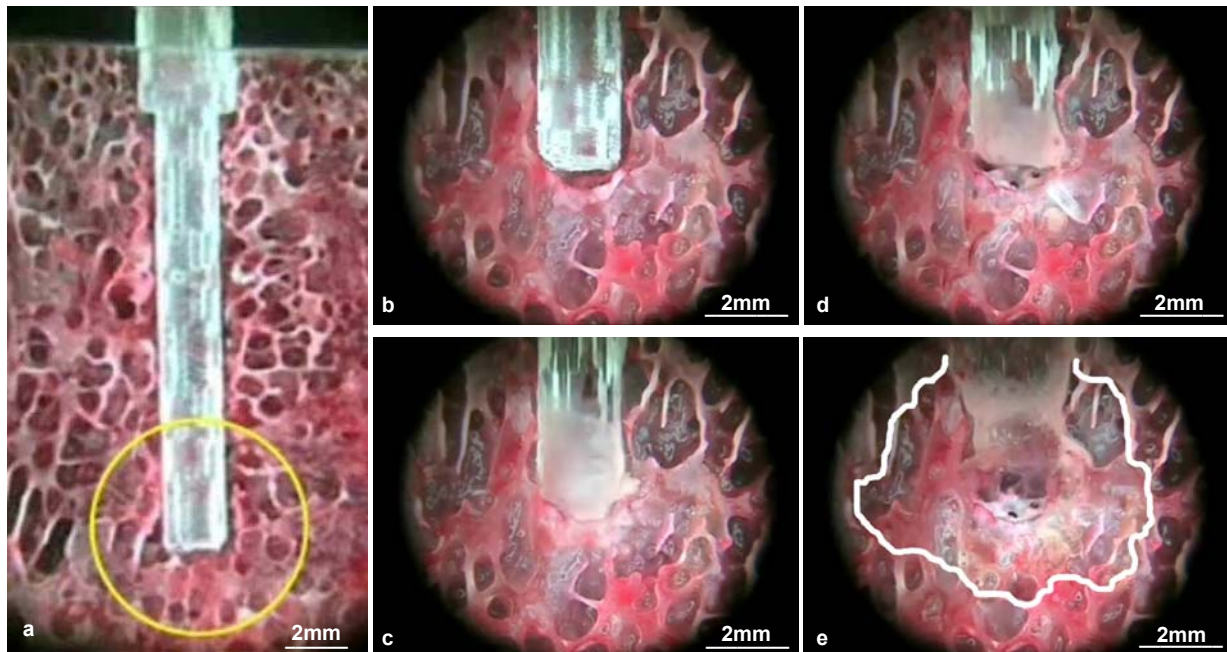
Der eigentliche Schmelzvorgang wird durch zwei Vorgänge bewirkt. Einerseits durch einen lokalen Temperaturanstieg, initiiert durch die relative Gleitbewegung zwischen der Werkstückoberfläche und der Struktur, und andererseits durch freiwerdende Wärme, hervorgerufen durch die innere Reibung im Polymer.

Dieses aus der Holzindustrie bekannte Verfahren [Mayer, J et al; 2008] wurde auf die Anwendung in der Medizin transferiert. Ein resorbierbarer thermoplastischer Pin (Werkstück) wird mit Ultraschall verflüssigt und dadurch in die Knochenstruktur eingeschweißt (Abb. 3).

Die Verflüssigung und Erstarrung des Polylaktids dauert dabei weniger als zwei Sekunden. Durch die hohe Viskosität fließt das Laktid teilweise in bis zu 10mm

entfernten Knochenarealen [Zander, N; 2007]. Die dabei entstehenden großen Kontaktflächen zur mikroporösen Oberfläche des Knochens, beziehungsweise der Spongiosa, ermöglichen eine gleichmäßig verteilte biomechanische Kraftübertragung.

Abb. 3 Einschweißen des Sonic Pins in Rinderknochen [Zander, N; 2007]



- (a) Situs Sonic Pin vor der Aktivierung des USS.
(b) (c) (d) Aktivierung des USS führt zum Aufschmelzen und zur Penetration des Polylaktids in das Gewebe.
(e) Situs Sonic Pin nach Aktivierung des USS. Markiert ist der Bereich des erstarrten Polylaktids.

Das Polylaktidmaterial zeigt eine zu anderen resorbierbaren Materialien vergleichsweise langsamere Degradationskinetik mit entsprechend langsamer Festigkeitsabnahme und ist somit zur Fixation auch von heilenden Frakturen geeignet [Claes, L.E. et al, 1996].

3 Material und Methoden

3.1 Osteosynthesematerialien und Instrumente

Als metallische Implantate wurden eine kannulierte Titanschraube 2mm x 14mm aus dem Asnissystem (Fa. Stryker Trauma GmbH, Schönkirchen) und ein K-Draht 0,8mm x 100mm, (Fa. AAP, Berlin) verwendet (Tab. 1 und Abb. 4a). Zur Implantation wurden die jeweiligen implantatspezifischen Instrumente (Tab. 1) eingesetzt.

Implantat	Spezifische Instrumente
Asnis Micro Schraube (Material Ti6Al4V)	Kannulierter Schraubendreher 2,0mm Solider Schraubendreher 2,0mm Kannulierter Bohrer 1,7mm, Single use, Sterile Bohrerführungshülse 0,8/1,7mm K-Wire 0,8mm x 100mm Single use, Sterile Asnis Micro, Schraubenmesslehre 0,8/1,2mm Asnis Micro Elastosil Handgriff, kannuliert, AO Anschluss
SonicPin (Material Poly-L-DLLaktid Resomer LR 706 S)	Bohrer (10mm) für SonicPin 18mm Spiralbohrer 10mm mit Anschlag Abschneidevorrichtung (Stanzaufnahme) Seitenschneider Hammer Ultraschallkonsole (Katalognummer 71-90000) verwendet mit Handstück (Katalognummer 71-90010)
K-Draht (Material StSt)	K-Draht Aufsatz für Chirurgiemaschine

Tab. 1 Übersicht der verwendeten implantatspezifischen Instrumente

Das resorbierbare Implantat war ein Sonic Pin (Fa. Stryker Trauma GmbH, Schönkirchen) mit einer Länge von 18mm. Der Kopfdurchmesser beträgt 3,5mm und der Schaftdurchmesser 2,2mm. Die Spitze des Pins ist doppelfinnenartig zur Begünstigung einer schnellen Oberflächenverflüssigung während des USS (Abb. 4e). Der Kopf hat ein Innengewinde M2 zur sicheren Anbindung der Sonotrode des Ultraschallgerätes (Abb. 4f).

Das Material des Sonic Pins ist ein Co-Polymer aus 70% L-Laktid und 30% DL-Laktid (Poly-(L-DL)-Laktid, Resomer LR 706 S, Fa. Boehringer, Ingelheim).

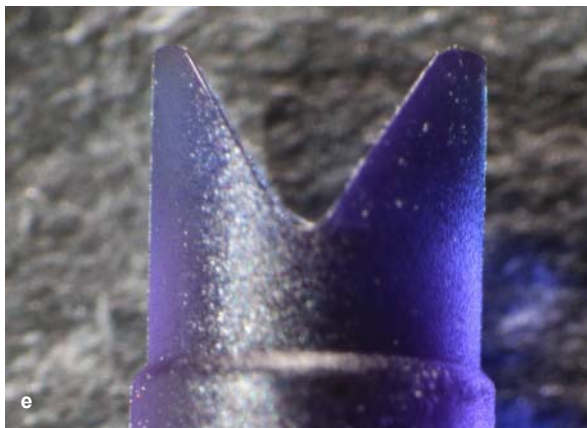
Abb. 4 Implantate und Instrumente



(a) Zur Stabilisierung der Osteosynthese verwendete Implantate - K-Draht, Asnis Schraube, Sonic Pin.
(b) Asnis Instrumente: K-Draht, Bohrer, Messlehre, Schraubendreher mit Asnis Schraube.



(c) Ultraschallkonsole mit Handstück und Fußschalter.
(d) Pin Instrumente: Abschneidevorrichtung, Bohrer, Dilator, Sonic Pin konnektiert an der Sonotrode des Ultraschallhandstück.



(e) Detailansicht der optimierten Spitze des Sonic Pins für die Ultraschallinsertion.
(f) Detailansicht des Kopfes mit Innengewinde zum Anschluss der Ultraschallsonotrode des Sonic Pins.

Zur besseren intraoperativen Sichtbarkeit ist der Pin mit 3H-Indole-3-one, 2-(1,3-dihydro-3-oxo-2H-indole-2-ylidene)-1,2-dihydro (CAS No.: 482-89-3) indigo-blau gefärbt mit einer Konzentration von 0,01 bis 0,04 Gewichtsprozent (Degradable Solutions, Schlieren, Schweiz).

Das Ultraschallgerät arbeitet mit einer Frequenz von 30kHz bei einer maximalen Leistung von 12 Watt und einer konstanten Amplitude von 20 μm (Peak-to-Peak). Über das Handstück wurde der Ultraschall für maximal 6 Sekunden auf den Sonic Pin appliziert.

3.2 Versuchsplanung und Versuchsablauf

3.2.1 Versuchstiere

Für die experimentelle Untersuchung galt es ein Versuchstier zu wählen, dessen anatomische Voraussetzungen es zuließen, Bedingungen zu simulieren, die den Verhältnissen beim Menschen sehr nahe kommen.

Unter diesem Gesichtspunkt wurden 66 sechs Monate alte, männliche Kaninchen der Rasse New Zealand White 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, H et al; 1990].

Zusätzlich laufen beim Kaninchen alle Umbauvorgänge am Knochen in Form eines Zeitraffers, aber unter ähnlichen Bedingungen wie in der Humansituation ab. Hinzu kommt, dass sich Kaninchen in der artgerechten Haltung als wenig anspruchsvoll und widerstandsfähig gegenüber einem operativen Trauma zeigen.

Die im Rahmen dieser Untersuchung verwendeten Tiere stammen aus einem amtlich anerkannten Zuchtbetrieb für Kaninchen (Niederwünsch, Thüringen). Es handelte sich um männliche Tiere mit einem durchschnittlichen Gewicht von circa 5404 g \pm 505 g.

Die Operation, sowie 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 Versuchsgruppen.

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.

3.2.2 Versuchsablauf

Für die Umsetzung dieser *in vivo*-Untersuchung am Kleintiermodell wurden insgesamt 66 Kaninchen benötigt, 6 für die Pilotstudie und die restlichen 60 für die Hauptstudie.

Im Rahmen einer Pilotstudie wurden zunächst je zwei Kaninchen der Kontrollgruppe mit zwei K-Drähten, zwei Kaninchen mit einem Sonic Pin und einem K-Draht und zwei Kaninchen mit zwei Sonic Pins operiert. Nach 42 Tagen wurden diese Pilottiere euthanasiert, die Stabilität der Versorgung beurteilt und die entnommenen Knochenproben histologisch untersucht.

Da die K-Drähte keine zuverlässige Stabilität erzielten, wurde für die Hauptstudie in der Kontrollgruppe jeweils ein K-Draht durch eine Schraube ersetzt.

Die histologische Beurteilung der Präparate aus der Pilotstudie ergab eine gute Biokompatibilität des eingebrachten Fremdmaterials, so dass die Hauptstudie begonnen werden konnte.

Es wurden als Standzeiten für jede Gruppe sieben Tage (7d), 21 Tage (21d), 42 Tage (42d) und 84 Tage (84d) gewählt (Tab. 2).

Jedem einzelnen Zeitraum wurden in der Kontrollgruppe KD/S jeweils 3 Tiere und in der P/S und P/P Gruppe jeweils 6 Tiere zugeordnet. Für den Untersuchungszeitraum 42d wurden nochmals in allen drei Gruppen zusätzlich sechs Tiere zur biomechanischen Testung integriert.

Bei insgesamt acht Tieren erfolgte wegen einer aufgetretenen ipsilateralen Femurschaftfraktur (vier Tiere aus P/S und vier Tiere aus P/P) eine frühzeitige Euthanasie, so dass nochmal Kaninchen nachoperiert werden mußten.

Osteosynthesemittel	Beobachtungszeitpunkt [d]	Anzahl der Tiere [n]	Summe [n]
Schraube/ K-Draht (KD/S) Kontrolle	7	3	18
	21	3	
	42	3 (+6 Biomechanik)	
	84	3	
Sonic Pin / Schraube (P/S)	7	6	30
	21	6	
	42	6 (+6 Biomechanik)	
	84	6	
Sonic Pin/Sonic Pin (P/P)	42	6 (+6 Biomechanik)	12

Tab. 2 Übersicht Kaninchenstudie: Einteilung nach Gruppen und Beobachtungszeitpunkten

3.2.3 Narkoseverfahren

Die Narkoseeinleitung erfolgte mit 0,1mg/kg Atropin (Atropinum sulfuricum[®], Eifelfango, Bad Neuenahr-Ahrweiler) und eine Sedierung mit 6mg/kg Xylazin (Rompun[®], Bayer, Leverkusen). Die Injektionsnarkose wurde durch eine intramuskuläre Gabe von 60mg/kg Ketamin (Ursotamin[®], Serumwerk Bernburg) in den M. semitendinosus/M. semimembranosus erreicht. Die Operationsdauer betrug $21,3 \pm 6,4$ Minuten, wofür eine Injektionsnarkose ausreichend war. Im Bedarfsfall erfolgte zur Aufrechterhaltung der Narkose eine Nachdosierung von Ketamin (0,2-0,6 ml).

3.2.4 Operationstechnik

Die operativen Eingriffe wurden unter streng aseptischen Kriterien durchgeführt. Alle Tiere wurden einseitig operiert.

Die Grobrasur des Operationsgebietes erfolgte mit einer elektrischen Schermaschine der Fa. Hauptner und die Feinrasur mit einem Einmal-Rasierer. Zur Hautdesinfektion

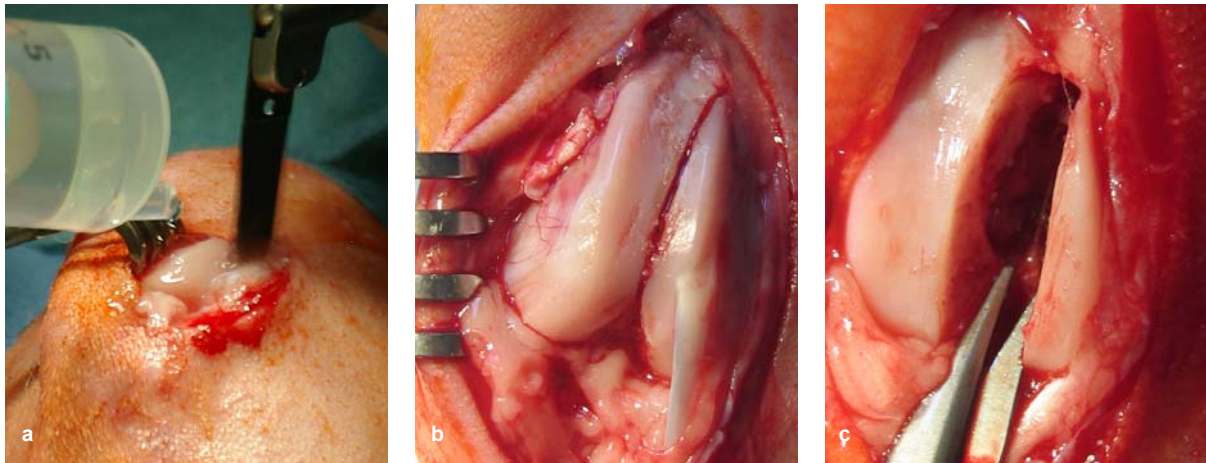
wurde der gesamte Hinterlauf dreimal desinfiziert (mit jodhaltiger Desinfektionslösung, Betaisodonna-Lösung).

Nach steriler Abdeckung des Operationsfeldes wurde über einen medialen parapatellaren Hautschnitt das jeweilige Kniegelenk eröffnet und die Osteotomie des lateralen Femurcondylus durchgeführt.

Zuvor wurde das mediale Retinakulum gespalten, die Äste der Arteria profunda mit ihrem Abzweig zum Gelenk hin ligiert und dann das Gelenk eröffnet.

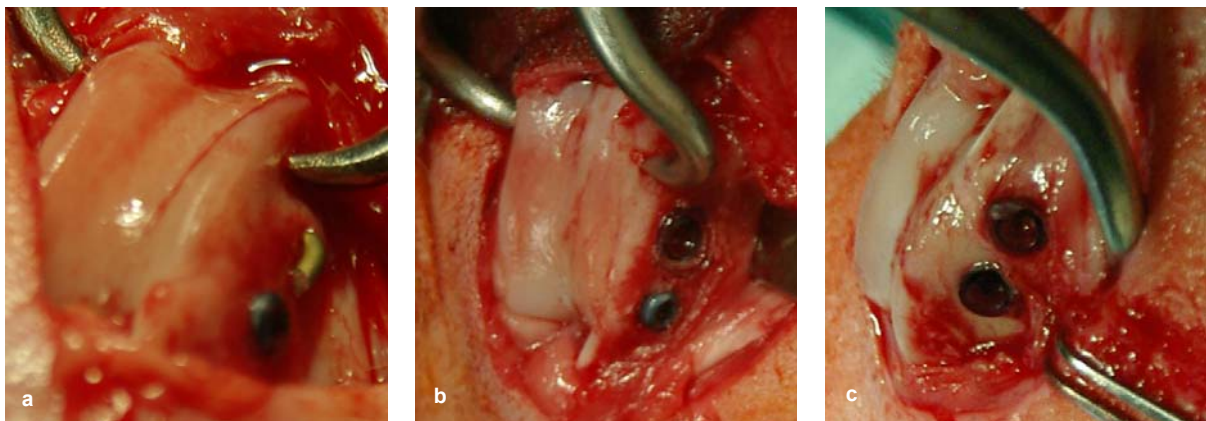
Zunächst wurde die Patella nach lateral luxiert und mit Hilfe einer oszillierenden Säge (Fa. Synthes, Bochum) die laterale Femurkondyle vollständig osteotomiert (Abb. 5).

Abb. 5 Osteotomie des lateralen Femurcondylus



- (a) Sägen bei gleichzeitiger Kühlung
- (b) Osteotomieverlauf
- (c) Absetzen der Femurkondyle

Abb. 6 Fixation des Femurcondylus



- (a) KD/S Gruppe
- (b) P/S Gruppe
- (c) P/P Gruppe

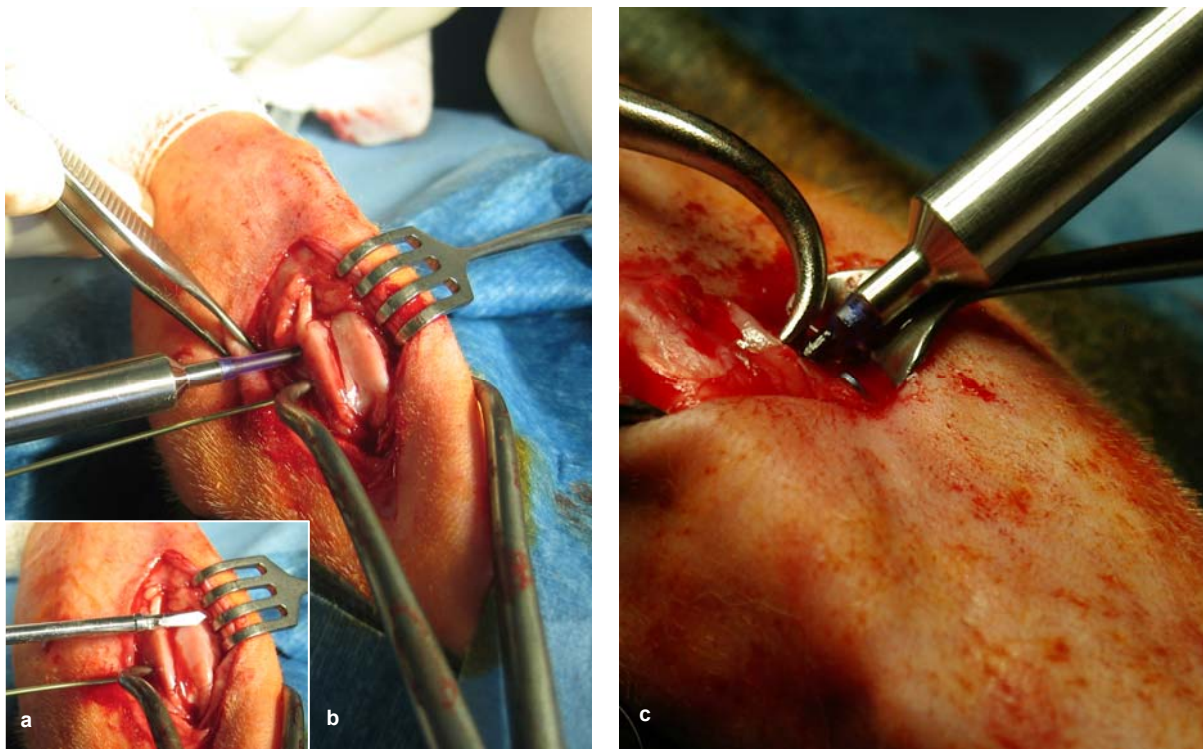
Nach Separation der lateralen Kondyle erfolgte das mehrfache Spülen mit NaCl Lösung des Osteotomiespaltes und die Trockenlegung dieses Gebietes. Danach wurde die korrekte anatomische Reposition der lateralen Femurkondyle durch eine Repositionszange wieder hergestellt. Die Fixation der Osteotomie erfolgte durch die Implantation von K-Draht/Schraube, Schraube/Sonic Pin oder Sonic Pin/Sonic Pin (Abb. 6).

Die Positionierung der Implantate erfolgte senkrecht zur Osteotomiefläche.

Um eine Wanderung zu verhindern, konnten die maschinell implantierten Kirschner-Drähte problemlos mit einer Zange gekürzt und umgeknickt werden.

Die Applikation der 2,0mm Asnis Schrauben über einen Führungsdraht erforderte ein Vorbohren mit einem 1,7mm Bohrer.

Abb. 7 Implantationsschritte Sonic Pin



- (a) Vorbereitung zur Dilatation der Vorbohrung.
 (b) Vorschieben des Sonic Pins in den Bohrkanal.
 (c) Endposition des Pins in der Vorbohrung, danach Ultraschallfixierung der Spitze des Sonic Pins.

Nachdem die Sonic Pins mit einer Länge von 22mm auf 18mm in einer speziellen Vorrichtung (siehe Kap. 3.1) gekürzt waren, konnten sie anschließend mittels Ultraschall in eine vorgebohrte und freidilatierte (vollständige Entfernung des Bohrmehles) Bohrung eingeschweißt werden. Hierbei wurde zunächst der Sonic Pin

ohne Ultraschall und größeren Kraftaufwand in die Bohrung eingeführt, bis ein ungefährer Überstand von 5mm erreicht war (Abb.7). Danach führte die Aktivierung des Ultraschalls (über die Konsole zeitgesteuert für 6 Sekunden) zur Verschweißung der Spitze des Sonic Pins in den Knochen.

Zur Sicherstellung der Verfestigung des aufgeschmolzenen Bereichs verblieb die Sonotrode bis zu einem akustischen Signal (10 Sekunden nach Beendigung des Ultraschalls) der Konsole am Sonic Pin.

Nach erfolgreicher Osteosynthese wurde das Repositionsergebnis nochmals überprüft, die Patella zurückverlagert, die Gelenkkapsel und die Haut durch Vicryl-Nähte verschlossen und ein Pflastersprühverband (Nobecutan[®], Fa. Astra Chemicals, Norderstedt) aufgebracht.

3.2.5 Nachsorge der Tiere

Sämtliche Tiere wurden in hygienischer Umgebung und Einzelhaltung bis zur Abheilung und Belastung der Gelenke auf sauberer Einstreu gehalten. Danach erfolgte die Unterbringung in Gruppen in Laufställen.

Die Gabe von Schmerzmitteln wurde vom postoperativen Verhalten der Tiere abhängig gemacht.

Die Kontrolle des postoperativen Verlaufes erfolgte täglich, wobei das Verhalten und das Aussehen der Tiere, eine lokale Adspektion der Wunde sowie die Bewegungsaktivität und Futteraufnahme befundet und protokolliert wurde.

3.2.6 Euthanasie und Perfusion

Nach 7, bzw. 21, 42 und 84 Tagen wurden die Tiere schmerzlos, unter Vorliegen der oben beschriebenen Narkose, durch eine intrakardiale Injektion von 2,5–3,0ml T61[®] (Fa. Aventis, Frankfurt) euthanasiert und die Femura mit angrenzendem Gewebe entnommen.

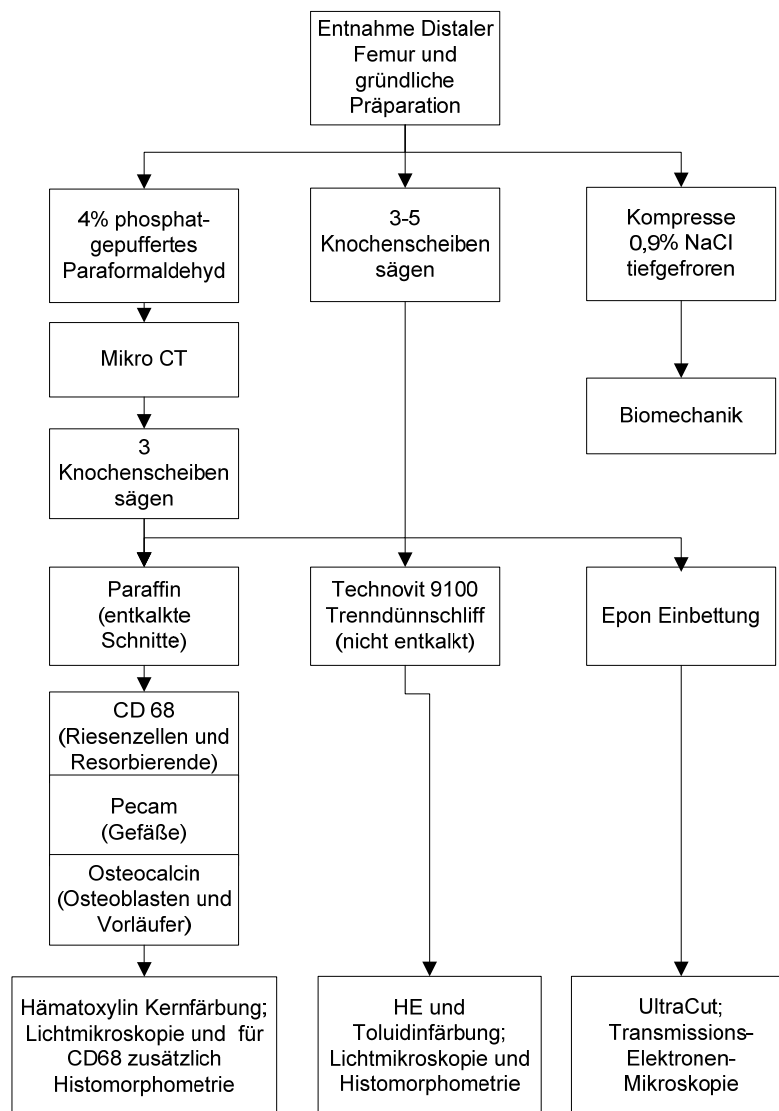
In der Tabelle 3 ist der Algorithmus zur weiteren Verwendung der explantierten Femora dargestellt.

Direkt nach der Entnahme erfolgte eine gründliche Freipräparation der entnommenen Femura, durch Entfernung der Weichteil- und Bänderreste.

Die Femura, die der weiteren Bearbeitung zur Herstellung entsprechender Histologien zugeführt werden sollten, wurden in 3mm dicke Scheiben gesägt und fixiert (Tab. 3).

Für die röntgenologische Analyse vorgesehene Femura blieben komplett fixiert in 4% phosphatgepufferten Paraformaldehyd.

Die Femura, die für die biomechanische Untersuchung vorgesehen waren, wurden unfixiert in einer 0,9% Natriumchlorid Komresse tiefgefroren.



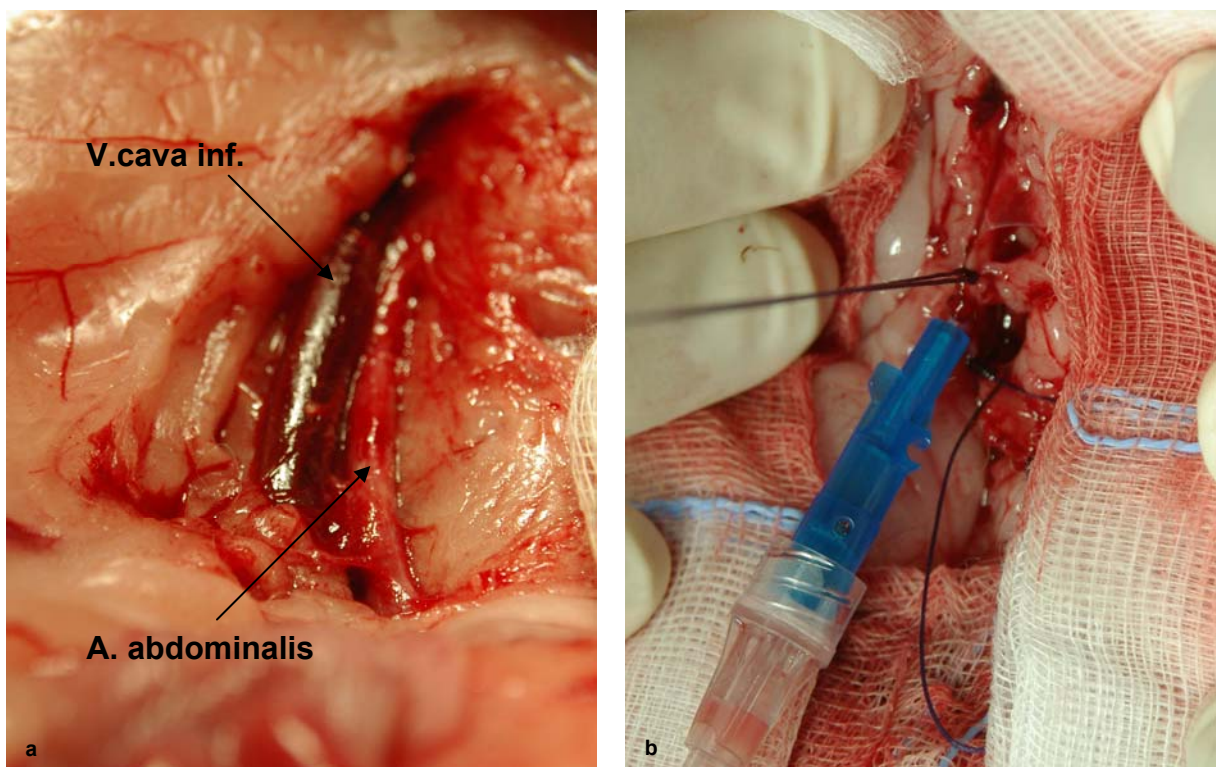
Tab 3 Algorithmus zur Verwendung der explantierten Femura

Für die histologische Aufarbeitung wird die Perfusion der Versuchstiere als wesentlich erachtet, um die sofortige Fixierung des Gewebes sicherzustellen. Nach der Euthanasie wurde je Standzeit ein Versuchstier und ein Kontrolltier über die linke A. iliaca externa mit 4% Paraformaldehydlösung (PFA, Merck, Darmstadt,

Deutschland) nach gründlicher Spülung mit physiologischer Kochsalzlösung perfundiert.

Die Perfusion erfolgte in Inkubationsnarkose in der oben beschriebenen Weise. Der Abdomen wurde in der Medianlinie eröffnet, der Darm auf die rechte Seite verlagert und das Retroperitoneum gespalten. Die Aorta abdominalis und die Vena cava inferior wurden in ganzer Länge dargestellt und freipräpariert (siehe Abb. 8a), die Aorta nach proximal ligiert und ein Katheter bis in die Art. Iliaca externa der operierten Extremität eingesetzt. In die Vene wurde in derselben Weise ein PVC Schlauch platziert (Siehe Abb. 8b).

Abb. 8 Vorbereitung der Perfusion

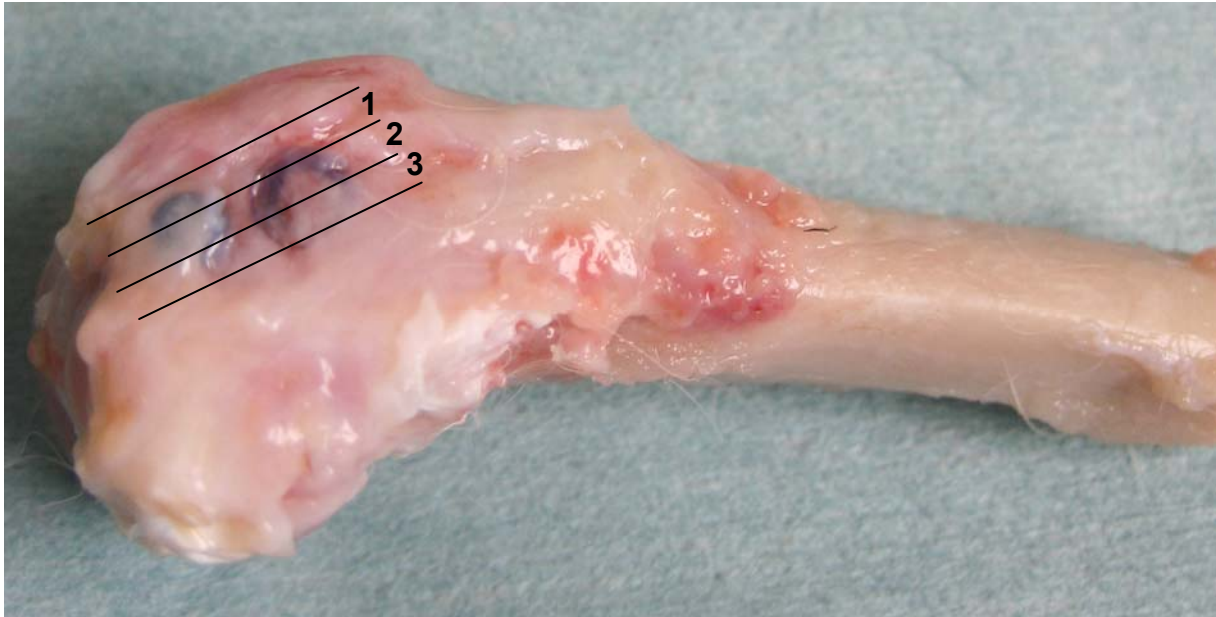


(a) Präparation der Aorta abdominalis und Vena cava inferior
(b) Angelegter Katheter für die Perfusion

Das Blut wurde mit Ringerlösung ausgespült. Unmittelbar nach der Tötung der Tiere mit 2,5 – 3,0 ml T61[®] erfolgte die Perfusionsfixierung mit einer körperwarmen 4%iger PFA-Lösung.

Danach erfolgte die Exartikulation der Femura im Hüft- und Kniegelenk, die sorgfältige Freipräparation mit Entfernung des Weichteilgewebes und anfertigen von 3mm dicken Knochenscheiben für die histologische Aufarbeitung.

Abb. 9 Exemplarische Darstellung der Schnittebenen



Die Femura wurden parallel zur Implantatebene (Abb. 9) in Scheiben von ca. 4mm Dicke gesägt (Bandsäge, Exakt-Apparatebau, Norderstedt, Deutschland). Je nach Präparat entstanden hierdurch 3-4 Scheiben, die randomisiert den verschiedenen Histologieaufbereitungsverfahren zugeführt wurden.

3.3 Mikro-Computertomographie

Jeweils ein Präparat aus der P/S Gruppe und aus der Kontrollgruppe KD/S nach 21d und 42d wurde exemplarisch radiologisch untersucht.

Die Aufnahmen erfolgten im Mikrocomputertomographen in der Abteilung für Diagnostische Radiologie, Sektionsbereich „Experimentelle Radiologie“ (Leitung: Prof. Dr. med. A. C. Langheinrich) der Justus Liebig Universität Giessen am "SkyScan 1072" (Firma SkyScan, Kontich, Belgien).

Anhand der CT Bilder konnte der korrekte Sitz der Implantate und die Reposition der Osteotomie überprüft werden.

3.4 Histologische Verfahren

Die distalen Femura wurden für die Einbettung in Paraffin und Technovit-9100 (Kulzer, Friedrichsdorf, Deutschland) 18 Stunden (h) in 4% PFA sowie für die Einbettung für die Transmissionselektronenmikroskopie (TEM) 6 h in 2% PFA mit 2% Glutardialdehyd (Merck) und 0,02% Pikrinsäure (Merck) nachfixiert.

Nach der Fixierung wurden die Proben für die Paraffineinbettung in 0,1M Phosphatpuffer pH 7,4 (PB) gespült, in einem 0,281 M Tris-Puffer mit 10% Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA, Merck) entkalkt, erneut gespült und durch eine aufsteigende Alkoholreihe entwässert. Die Proben wurden 2x 30 Minuten (min) in Xylol inkubiert, in flüssiges Paraffin (3x 2h bei 64°C) überführt und in einer Paraffinausgießstation (Leica, Bensheim, Deutschland) ausgebettet.

Mit einem Rotationsmikrotom (RM 2155, Leica) wurden Paraffinschnitte mit einer Dicke von 4-5µm hergestellt, auf Objektträger aufgezogen und mit Hämatoxylin-Eosin (HE) und Toluidinblau gefärbt. Für diese Färbungen wurden die Paraffinschnitte über eine Inkubation in Xylol (2x 5min) und eine absteigende Alkoholreihe entparaffiniert und hydriert. Die weiteren Schritte für die Färbungen erfolgten analog zu den unten beschriebenen Schritten der Knochenschliffe in der Technovit-9100 Einbettung.

Die Proben für die Einbettung in Technovit-9100 wurden nach der Fixierung in 0,1 M PB gewaschen, in einer aufsteigenden Alkoholreihe dehydriert, 2x 1h in Xylol inkubiert, in Xylol/Technovit-9100-Gemischen mit steigendem Technovit-Gehalt infiltriert und schließlich in Technovit-9100 überführt und ausgebettet.

Zur Herstellung dünner Schliffe von 20-30µm Dicke wurde die von DONATH etablierte Methode der Trenn-Dünnschliff-Technik verwendet [Donath, K et al; 1987], bei der die Schliffe mit dem Exakt-Trennschleifsystem (Exakt-Apparatebau) hergestellt und mit einem Schleifpapier (Diaplust, Oststeinbrück, Deutschland) poliert wurden. Anschließend wurden die Schliffe mit HE und Toluidinblau gefärbt. Vor der Färbung wurde das Einbettmedium durch 10min Inkubation mit 10% H₂O₂ angeätzt, gründlich mit Wasser abgespült und getrocknet.

Die Proben wurden 15 min mit Toluidinblau bzw. 40 Sekunden (s) mit Hämatoxylin und 20s mit Eosin gefärbt und mit Eukitt (Fluka, Taufkirchen, Deutschland) eingedeckelt.

Färbeergebnis Hämatoxylin-Eosin- (HE): Durch diese 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.

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

Die fotografische Dokumentation erfolgte mit einem Photomikroskop (Axiophot-2, Zeiss, Jena, Deutschland) und einer digitalen Kamera (Leica DC 500, Benzheim, Deutschland).

3.5 Immunhistochemie

Für die Immunhistochemie dienten Paraffinschnitte, die über Inkubation in Xylol und eine absteigende Alkoholreihe entparaffiniert und rehydriert wurden. Die endogene Peroxidase erfolgte durch 5min Inkubation in 3% H₂O₂ in Tris-NaCl Puffer (pH 7,4) mit 0,025% Triton-X-100 (TBS) inkubiert.

Nach gründlichem Waschen in TBS wurden die Schnitte mit dem primären Antikörper, der in Verdünnungspuffer (Dako, Glostrup, Dänemark) verdünnt wurde, über Nacht bei 4°C inkubiert. Als Primärantikörper wurden CD68 (1:5, Dako), Osteocalcin (1:50, R&D Systems, Minneapolis, MN, USA) und PECAM-1 (platelet/endothelial cell adhesion molecule-1, CD31, Santa Cruz, CA, USA) verwendet.

Nach erneutem Waschen konnten die Schnitte mit folgenden sekundären Antikörpern für 30min bei Raumtemperatur inkubiert werden: biotinylierter anti-Maus Sekundärantikörper (1:400 in TBS mit 3% bovinem Serumalbumin (BSA), für CD68 und Osteocalcin; Dako) und biontinyliertem anti-Ziegen Sekundärantikörper (1:800 in TBS mit 3% BSA, für PECAM-1; Dako). Nach weiteren Waschschrritten wurden die Schnitte mit dem Streptavidin-Biotin-Peroxidase-Komplex (Dako) für 30min bei Raumtemperatur inkubiert.

Der Streptavidin-Biotin-Peroxidase-Komplex wurde durch den Nova-Red Substrat-Kit für Peroxidase (5min bei Raumtemperatur, Vector, Wertheim-Bettingen, Deutschland) sichtbar gemacht.

Zur besseren Orientierung wurden die Kerne mit Hämatoxylin (Ht) gegengefärbt. Als Negativkontrollen wurden a) eine Inkubation des Verdünnungspuffers ohne primären Antikörper und b) eine Präabsorptionskontrolle (für PECAM-1) durchgeführt.

3.6 Transmissionselektronenmikroskopie

Für die Untersuchungen mit dem Transmissionselektronenmikroskopie (TEM) wurden die Proben nach der Fixierung gründlich gewaschen, in 1% Osmiumtetroxidlösung (Fluka Chemie AG, Schweiz) inkubiert, erneut gewaschen und in einer aufsteigenden Alkoholreihe dehydriert. Nach Inkubation in Xylol (3x 30min) erfolgte die Einbettung der Proben in Epon (Serva, Heidelberg, Deutschland).

Anschließend diente ein Ultramikrotom (Reichert-Ultracut, Leica, Wetzlar, Deutschland) der Erstellung von 0,5-1µm dicke Semidünnschnitte, die dann eine Färbung mit Toluidinblau und Safraninrot erhielten. Weiterhin wurden von ausgesuchten Regionen Ultradünnschnitte mit einer Dicke von 60-80nm hergestellt, mit Uranylacetat und Bleicitrat in einem Ultrastainer (Leica, Wetzlar) nachkontrastiert und im TEM EM 109 (Zeiss, Jena, Deutschland) untersucht.

Die fotografische Dokumentation erfolgte mit einer Planfilmkamera. Die Negative wurden eingescannt (Scan Jet 4c, Hewlett Packard, Bad Homburg, Deutschland) und konvertiert.

3.7 Histomorphometrie

Die Histomorphometrie ermöglicht die quantitative Messung von zweidimensionalen Strukturen in histologischen Präparaten. Sie kann Informationen liefern, die andere Messverfahren, wie die Knochendichtemessung oder biologische Marker des Knochenumbaus, nicht erbringen. [Compston, JE; 1998].

In der vorliegenden Arbeit wurden quantitativ das Interface der Implantate und der Knochenumbau im Osteotomiespalt gemessen. Die Methoden werden im Folgenden detailliert.

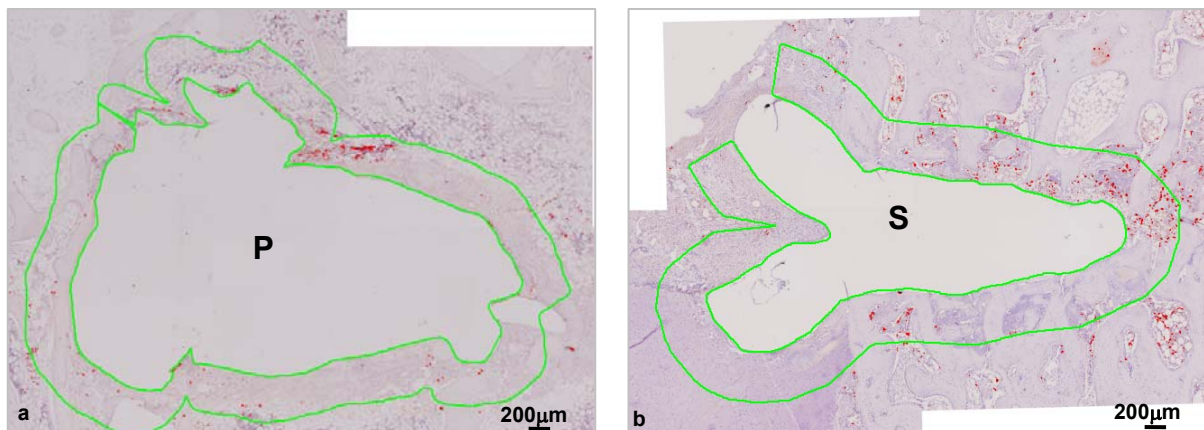
Die histomorphometrische Bestimmung der Fremdkörperreaktion erfolgte anhand der CD68 Immunmarkierung. Für die Vermessung wurden lichtmikroskopische Bilder

erstellt und mit der Image-Pro Plus Software (Media Cybernetic, Maryland, USA) vermessen.

Als „Area of interest“ (AOI) um den Sonic Pin (Abb. 10a), die Schraube (Abb. 10b) bzw. den K-Draht galt der 0,5mm breite Bereich direkt angrenzend an der Oberfläche des Osteosynthesematerials. Der Osteotomiespalt wurde bei dieser Messung nicht berücksichtigt.

Im AOI wurde die rot-braun gefärbte Fläche, die die CD68 positiven Zellen darstellt in mm^2 bestimmt, in Relation zur Gesamtfläche des AOIs gesetzt und die so erhaltenen Werte statistisch mit der SPSS-Software (SPSS, Chicago, Ill, USA) analysiert, wobei der Kruskal-Wallis- (H-Test, parameterfrei) und der Mann-Whitney-Test (U-Test, parameterfrei) durchgeführt wurden.

Abb. 10 Festlegung der AOI (Fläche zwischen den grünen Linien)



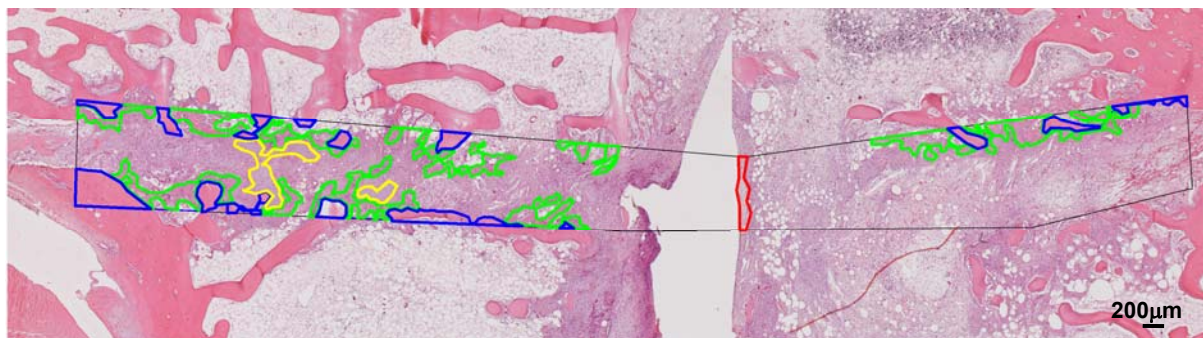
(a) Sonic Pin (P) 21 Tage, deutlich zu erkennen sind die rötlichen, CD 68 markierten Zellen
 (b) Schraube (S) 21 Tage, deutlich zu erkennen sind die rötlichen, CD 68 markierten Zellen

Die Ergebnisse wurden als Boxplots dargestellt, um die verschiedenen Streuungs- und Lagemaße in einer graphischen Darstellung zusammenzufassen. Hierbei entspricht die Box dem Bereich, in dem die mittleren 50% der Daten liegen. Der Median wird als durchgehender Strich in der Box eingezeichnet. Weiterhin wird das untere Quartil (25%) durch den Beginn der Box und das obere Quartil (75%) durch das Ende der Box gekennzeichnet. Die Whiskers markieren den kleinsten (0%) und den größten Datenwert (100%) des Datensatzes, die keine Ausreißer sind. Werte, die mehr als das 1,5 fache des Interquartilsabstandes vom Median abweichen, wurden als Ausreißer gewertet und als Kreise gekennzeichnet. Werte von $p < 0,05$

galten als signifikant und Werte von $p < 0,01$ als hoch signifikant. Die Kennzeichnung in den Diagrammen erfolgte mit einem Stern ($p < 0,05$) bzw. zwei Sternen ($p < 0,01$).

Für die histomorphometrische Vermessung der Frakturheilung mit der Image-Pro Plus Software wurde eine Abwandlung der von KRISCHAK beschriebene Methode verwendet [Krischak, GD et al; 2007]. Hierbei ist als „Area of interest“ (AOI) die Fläche des Osteotomiespalt definiert worden. Innerhalb dieser AOI konnten unterschiedliche Gewebearten markiert werden (Abb. 11).

Abb. 11 Exemplarische Darstellung der AOI im Osteotomiespalt und der unterschiedlichen Gewebe



Grün = neu gebildeter Knochen
Blau = alter Knochen
Gelb = Knorpel
Rot = Bindegewebe

Unterscheidbar waren alter Knochen, neu gebildeter Knochen, Knorpel, Knochenmark und Binde- und Granulationsgewebe. Anschnitte der Osteosynthesematerialien fanden keine Berücksichtigung bei der Messflächenbestimmung.

Die Quotienten aus Gewebeflächen und Osteotomiespaltfläche wurden statistisch mit der SPSS-Software analog zum Vorgehen der Histomorphometrie der Fremdkörperreaktion analysiert und dargestellt.

3.8 Biomechanik

3.8.1 Versuchsaufbau

Die biomechanischen Untersuchungen werden als wesentlicher Bestandteil dieser experimentellen Arbeit erachtet. Sie wurden im Institut für Biomechanik der

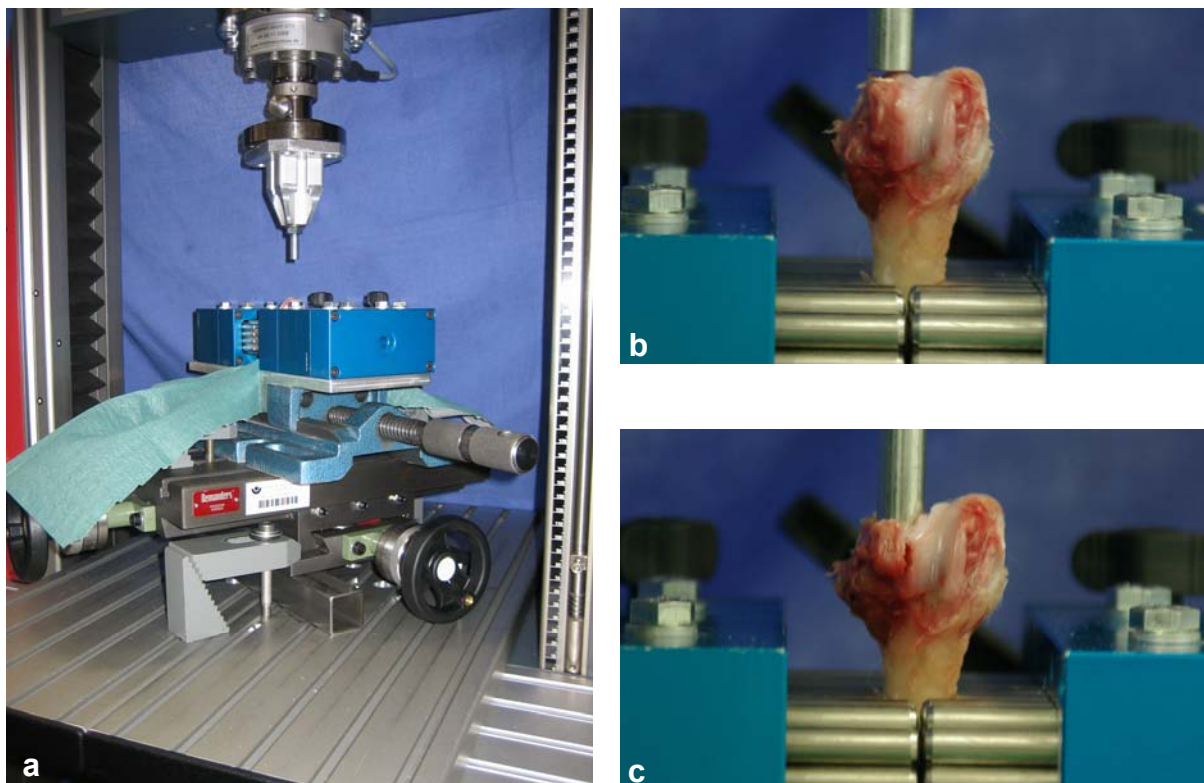
Berufsgenossenschaftlichen Unfallklinik Murnau und der Paracelsus Medizinischen Privatuniversität Salzburg durchgeführt.

Eine ZWICK Z010 Prüfmaschine, Typ BT1 - FR 010TH.A50, Ser.Nr. 167 642/2005/E (Hersteller: Zwick/Roell GmbH & Co KG, Ulm) und eine Kraftmessdose Gassmann/Theiss, Ser.Nr. 49213, interne Prüfmittelnummer PM02, Genauigkeitsklasse 1 für Messbereich 20 N bis 10 kN, Genauigkeitsklasse 0.5 für Messbereich 100 N bis 10 kN nach DIN EN 7500-1 wurden für die Tests verwendet (Abb. 12a).

Zur Aufnahme der Knochen diente die universelle Spannvorrichtung Matrix X-Grip XL (Hersteller: MATRIX GmbH Stuttgart).

Um vergleichbare Einspannungen zu gewährleisten, war es wichtig, den distalen Schaftbereich des Femurs parallel zur Lastachse auszurichten. Der Lastangriffspunkt war definiert als der höchste Punkt der lateralen Kondyle unter Beachtung eines genügend großen Abstandes zur Frakturlinie (Abb.12b).

Abb. 12 Versuchsaufbau für die Biomechanik



(a) Übersicht Versuchsstand.

(b) Femurkondyle schaftseitig eingespannt in universeller Spannvorrichtung.

(c) Endpunkt der Belastung, abgescherte Kondyle.

Mit einer Verfahrensgeschwindigkeit von 0,1mm/s wurde statisch bis zum Versagen (Abb. 12c) belastet und für jedes Präparat ein Kraft-/Verformungsdiagramm aufgenommen (Abb. 13).

3.8.2 Analyse

Folgende Werte konnten aus dem Kraftverformungsdiagramm ermittelt werden:

- F_{max} , maximale erreichte Scherkraft vor Versagen der Osteosynthese
- Steifigkeit, Steifigkeitsverhalten der Femurkondyle inklusive Osteosynthese unter aufgebrachter Scherlast vor Versagen ermittelt aus dem größten linearen Bereich ($\Delta F/\Delta d$) ohne Setzungserscheinungen
- d_{max} , gemessene Verformung der Femurkondyle inklusive Osteosynthese unter aufgebrachter Scherlast unmittelbar vor dem Versagen
- d_{calc} , berechnet aus dem Produkt aus Steifigkeit und maximaler Kraft. Diese Verformung eliminiert aufgetretene Setzungserscheinungen

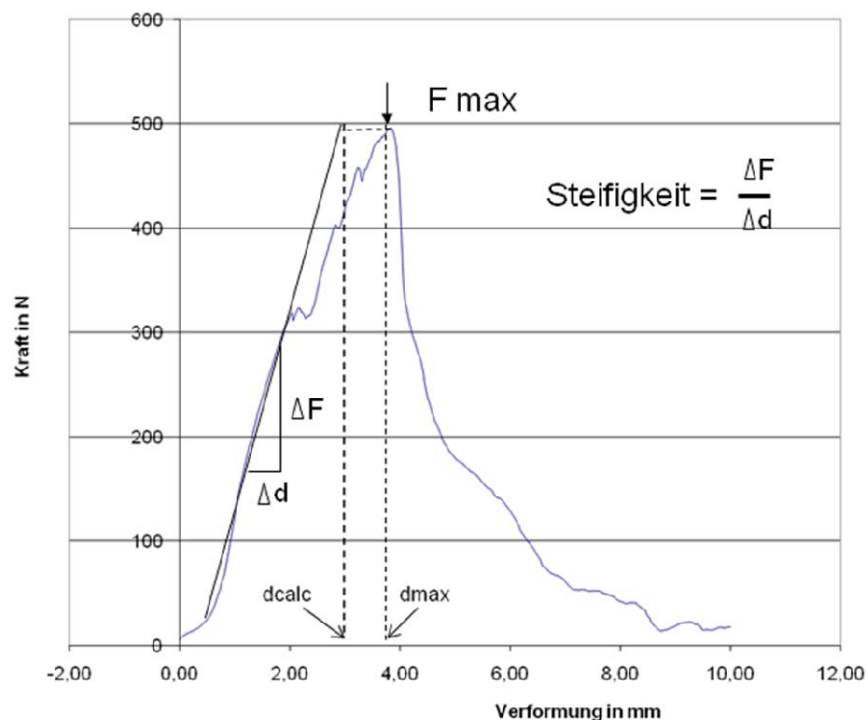


Abb. 13 Exemplarisches Kraft-/Verformungsdiagramm mit schematischer Darstellung der Maximalkraft F_{max} , der gemessenen Verformung d_{max} , der ermittelten Verformung d_{calc} und der Steifigkeit.

Zur Analyse wurden die Daten in Microsoft Excel übertragen. Die statistische Auswertung der Daten erfolgte mit der im Excelprogramm vorhandenen RGP Funktion. RGP berechnet die Statistik für eine Linie unter Verwendung der Methode der kleinsten Quadrate zur Berechnung einer Regressionsgeraden, wobei die Steigung dieser Geraden die Steifigkeit des Systems ist. Zusätzlich wurde das Bestimmtheitsmaß R^2 berechnet. Dieses vergleicht die berechneten mit den tatsächlichen Werten und ist bei vollkommener Korrelation 1 und bei absolut ungeeigneter Korrelation 0.

Die statistische Untersuchung der errechneten Steifigkeiten und Maximalkräfte lief in folgenden Schritten ab:

Nach der Zusammenfassung aller validen Messergebnisse erfolgte die Berechnung aller wichtigen deskriptiven Kennzahlen zur Bestimmung von Lage, Streuung und weiteren Parametern für jede Untersuchungsgruppe. Die geringen Fallzahlen in jeder der vier Untersuchungsgruppen lassen keinen eindeutigen Rückschluss auf eine Verteilungsform zu. Aus diesem Grund können hier für einen statistischen Vergleich der Untersuchungsgruppen untereinander keine parametrischen Methoden wie z.B. der t-Test zum Einsatz kommen, da diese eine eindeutig bewiesene Verteilungsform (im Falle des t-Tests die Normalverteilung) voraussetzen.

Es wurde als Alternative der Mann-Whitney Test (Rangsummentest und parameterfreies Analogon zum t-Test) zum Vergleich der Mediane jeweils zweier Untersuchungsgruppen ausgewählt (Alpha 5%).

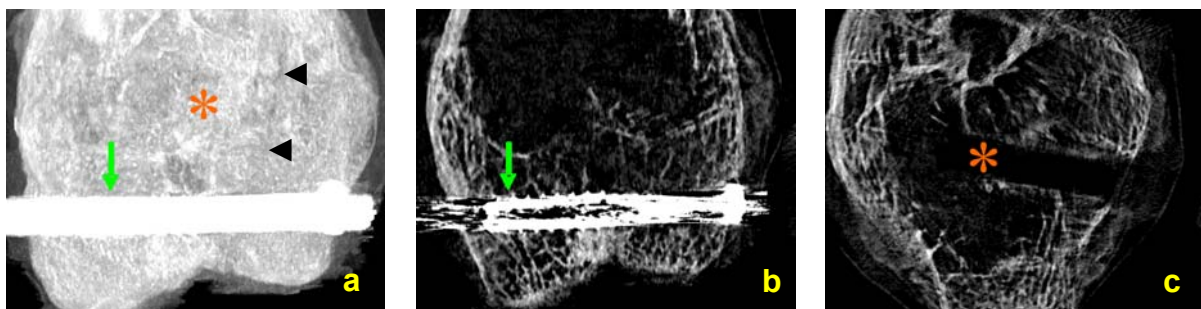
Die Software SPSS (Version 17.0.0, SPSS Inc. Chicago, Illinois) diente als Grundlage für alle Berechnungen. Die Ergebnisse wurden als Boxplots wie für die Histomorphometrie dargestellt (siehe Kapitel 3.7).

4 Ergebnisse

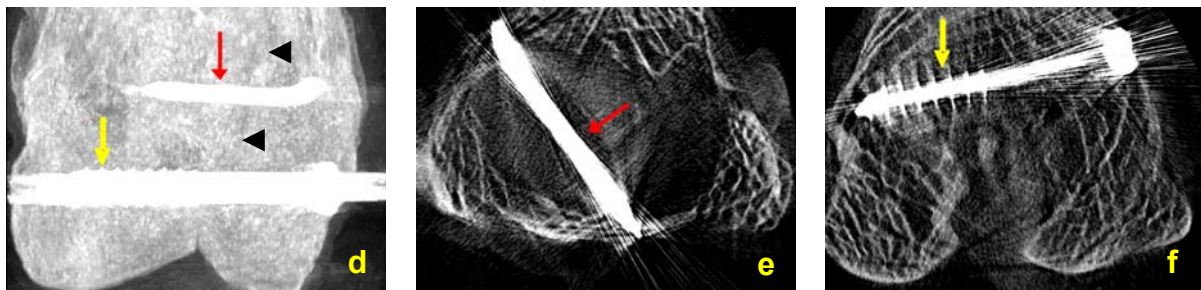
4.1 Mikro-Computertomographie

Aus dem 21d Zeitpunkt werden exemplarisch die CT-Aufnahmen von einem Tier aus der P/S Gruppe (Abb. 14a, b, c) und von einem Tier aus der KD/S Gruppe (Abb. 14d, e, f) dargestellt. Die Osteotomie war teilweise knöchern durchbaut (Abb. 14a, d) und die Implantate Schraube (Abb. 14b, f), Sonic Pin (Abb. 14c) und K-Draht (Abb. 14e), gut im Knochengewebe integriert.

Abb. 14 Mikro CT Aufnahmen am 21d Zeitpunkt



- (a) P/S Gruppe, Darstellung der Schraube (grüner Pfeil) und des Sonic Pins (*). Der Osteotomiespalt (◄) ist teilweise knöchern durchbaut.
(b) P/S Gruppe, Die Schraube (Pfeil) ist gut integriert.
(c) P/S Gruppe, der Sonic Pin (*) ist gut integriert.

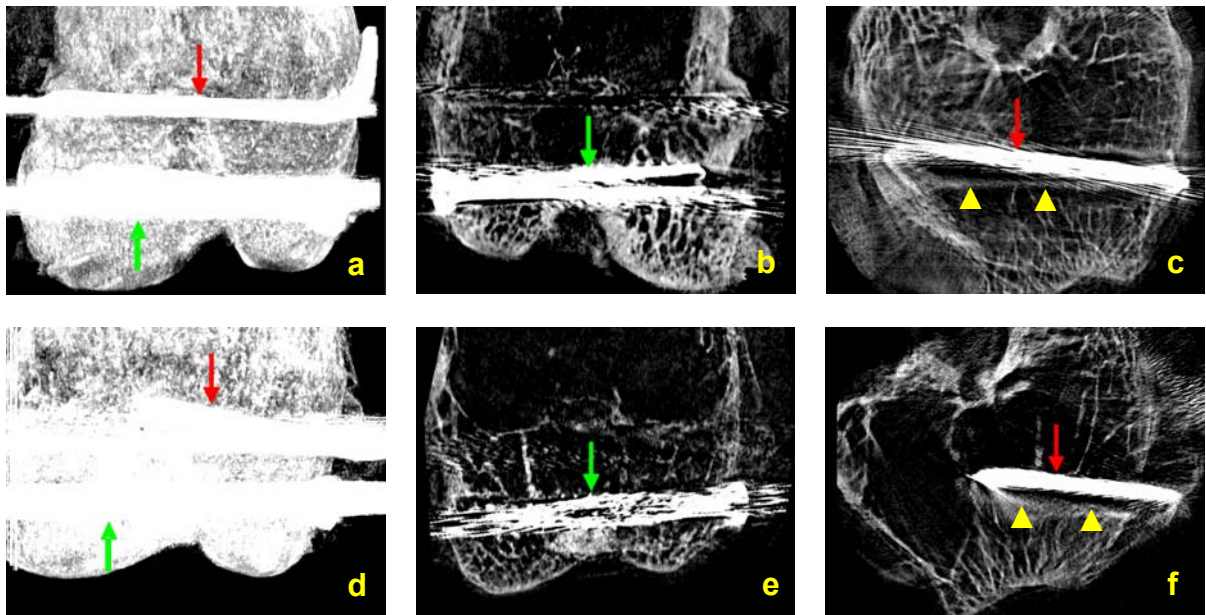


- (d) KD/S Gruppe: Darstellung des K-Drahtes (roter Pfeil) und der Schraube (gelber Pfeil). Der Osteotomiespalt (◄) ist teilweise knöchern durchbaut.
(e) KD/S Gruppe, der K-Draht (roter Pfeil) ist gut integriert.
(f) KD/S Gruppe, die Schraube (gelber Pfeil) ist gut integriert.

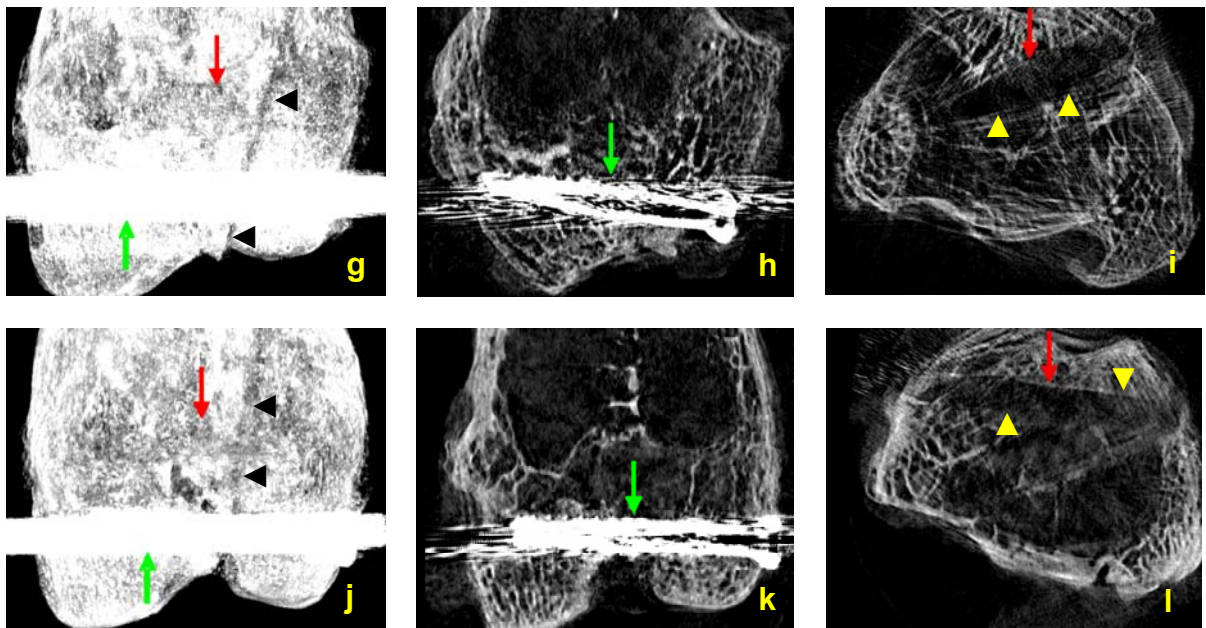
Für die 42d Standzeit werden jeweils zwei Tiere der KD/S Gruppe und zwei der S/P Gruppe dargestellt (Abb. 15).

In allen Gruppen war nach 42d die Osteotomie knöchern durchbaut und der Osteotomiespalt nur noch schwach zu erkennen (Abb. 15a, d, g, j). Es gab keine Anzeichen von Osteonekrosen oder Osteolysen und es war lediglich am K-Draht ein Resorptionssaum festzustellen (Abb.15c, f). Deutlich sichtbar ist ein röntgendichter Saum um die Sonic Pins (Abb.15i, l).

Abb. 15 Mikro-CT Aufnahmen am 42d Zeitpunkt



- (a, d) KD/S Gruppe, Darstellung des K-Drahtes (roter Pfeil) und der Schraube (grüner Pfeil). Der Osteotomiespalt ist nicht mehr zu erkennen.
 (b, e) KD/S Gruppe. Die Schraube (grüner Pfeil) ist gut integriert.
 (c, f) KD/S Gruppe. Der K-Draht (roter Pfeil) ist von einem Knochensaum (▲) umgeben.



- (g, j) P/S Gruppe, Darstellung des Sonic Pins (roter Pfeil) und der Schraube (grüner Pfeil). Der Osteotomiespalt (◄) ist noch zu erkennen. K-Draht (roter Pfeil) / Schraube (gelber Pfeil).
 (h, k) P/S Gruppe. Die Schraube (grüner Pfeil) ist gut integriert.
 (i, l) P/S Gruppe. Der Sonic Pin (roter Pfeil) ist von einem Knochensaum (▲) umgeben.

Zusammenfassend war in allen ausgewerteten Femura sowohl die Lage der Implantate als auch die Reposition zufriedenstellend.





4.2 Histologie

Die Ergebnisse der makroskopischen Beurteilung sowie der Lichtmikroskopie werden nachfolgend anhand der Beobachtungszeiträume (7d, 21d, 42d und 84d) und der Gruppeneinteilung (KD/S, P/S und P/P) beschrieben.

Mit Hilfe der Lichtmikroskopie wurde besonders das Knochenremodelling im Osteotomiespalt, das Implantatinterface für den K-Draht, die Schraube und den Sonic Pin, sowie die Resorption des Sonic Pins untersucht.

4.2.1 Makroskopische Beurteilung

Die makroskopische Beurteilung der Femurkondylen erfolgte qualitativ anhand der Breite des Osteotomiespalt und der Symmetrie der Kondylen (Tab. 4).

Wertung	Makroskopische Kriterien	Beispiel
--	Breiter Osteotomiespalt (>2mm) und sehr deutliche Asymmetrie der Kondylen	
-	Schmaler Osteotomiespalt (<2mm) und deutliche Asymmetrie der Kondylen	
+	Schmaler Osteotomiespalt (<2mm) und geringe Asymmetrie der Kondylen	
++	Ehemaliger Osteotomiespalt nur noch als Linie zu erkennen und sehr geringe Asymmetrie der Kondylen	

Tab. 4 Kriterien für die makroskopische Bewertung des Osteotomiespalt

Es zeigte sich, dass die Wertungen individuell verschieden waren und kein einheitliches Bild für eine Gruppe oder für eine Standzeit auswiesen (Tabelle 5). Allerdings waren tendenziell die Osteotomiespalte bei allen Tieren nach 84d Standzeit sehr schmal und somit aus makroskopischer Sicht geheilt.

Standzeit	Gruppe	Tier	Wertung
7d	KD/S	3	++
		2	++
		4	+
		7*	-
	P/S	23	++
		21	++
		12	+
18		+	
10		+	
27		-	
21d	KD/S	5	++
		6	-
	P/S	11	++
		19	+
		17	+
		16	-
		20	--
15	--		
42d	KD/S	29	++
		28	+
		30	+
	P/S	36	++
		61	++
		62	++
		32	++
		34	--
		35	--
	P/P	66	+
		49	+
		52	-
		47	-
68		--	
65		--	
84d		KD/S	1
	9		+
	8		+
	P/S	14	++
		22	++
		24	++
		25	+
		26	+
		13	+

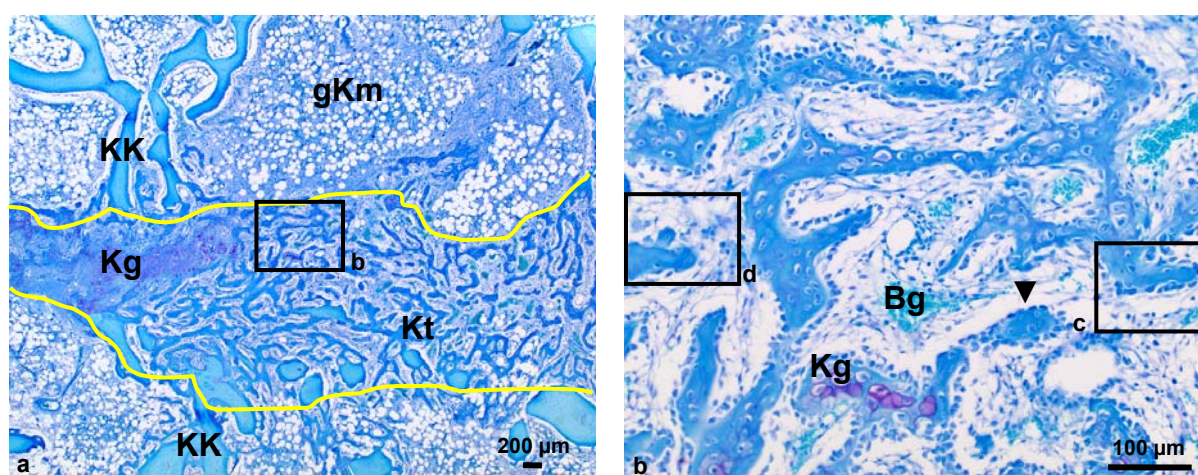
Tab. 5 Makroskopische Beurteilung der Osteogenese

*Tier 7 vorgesehen für die 21d Standzeit mußte wegen allgemeinen gesundheitlichen Problemen frühzeitig nach 7d euthanisiert werden.

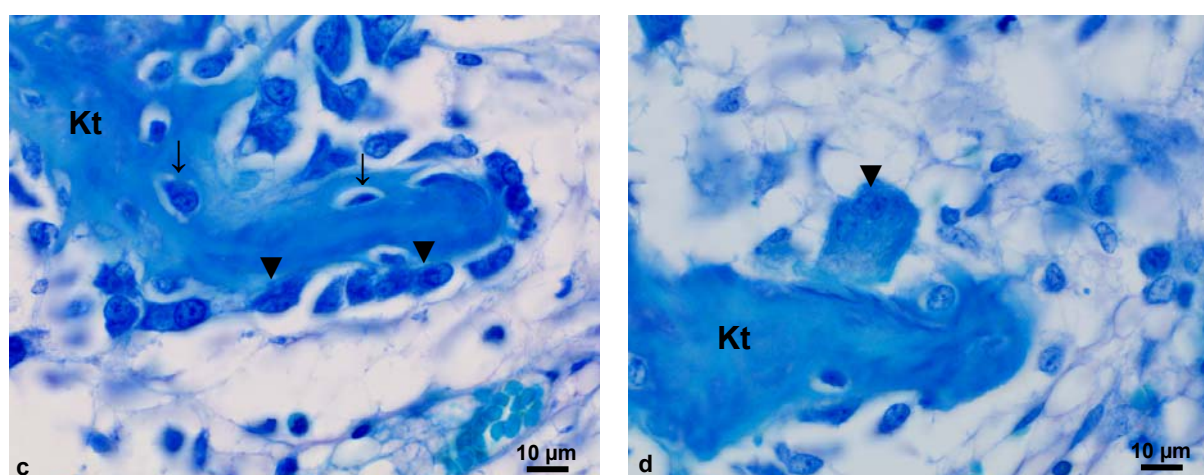
4.2.2 Knochenremodelling im Osteotomiespalt

Es wurden bei der Beurteilung keine Unterschiede im Knochenstatus festgestellt, wenn die Proben entkalkt (Paraffineinbettung) bzw. nicht entkalkt wurden (Technovit 9100 und Epon-Einbettung). Bei der Paraffineinbettung wird das Kopolymer des Sonic Pins aufgelöst, während es in den Schnitten der Technovit 9100- und Eponeinbettung zu erkennen war. Zunächst werden die histologischen Beobachtungen im Osteotomiespalt in Relation zu den verschiedenen Standzeiten beschrieben.

Abb. 16 Knochenremodelling Osteotomiespalt 7d KD/S (Paraffinschnitte TB)



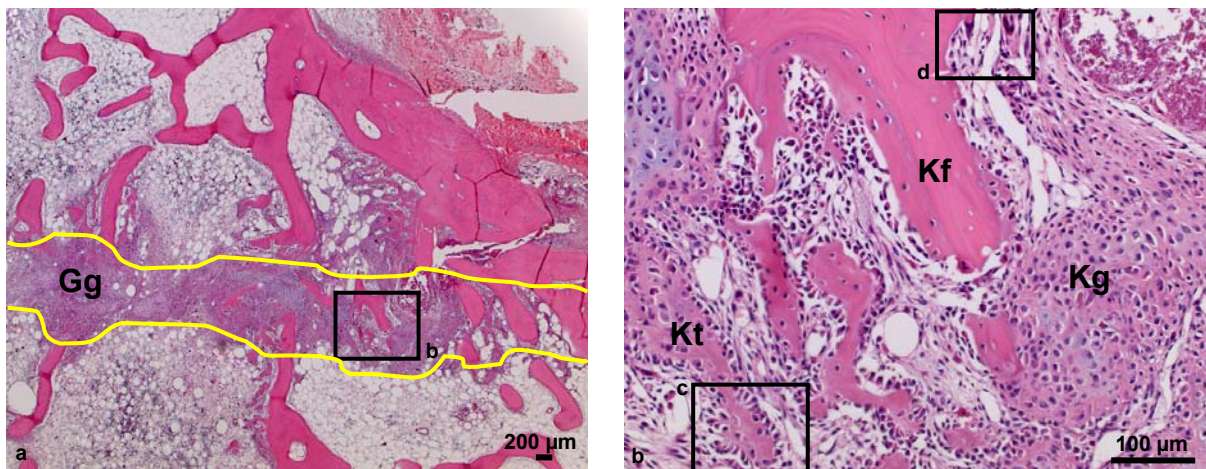
- (a) Dieses Tier zeigte eine optimale Osteogenese. Der Osteotomiespalt bestand hauptsächlich aus neu gebildeten Knochen trabekeln (Kt) und nah der Kortikalis (KK) aus viel hypertrophes Knorpelgewebe (Kg). In der Nähe befindet sich gelbes Knochenmark (gKm).
- (b) Die neu gebildeten Knochen trabekeln werden von Osteoblasten (▼) gesäumt. Zwischen den Knochen trabekeln befinden sich Blutgefäße (Bg) und Knorpelgewebe (Kg).



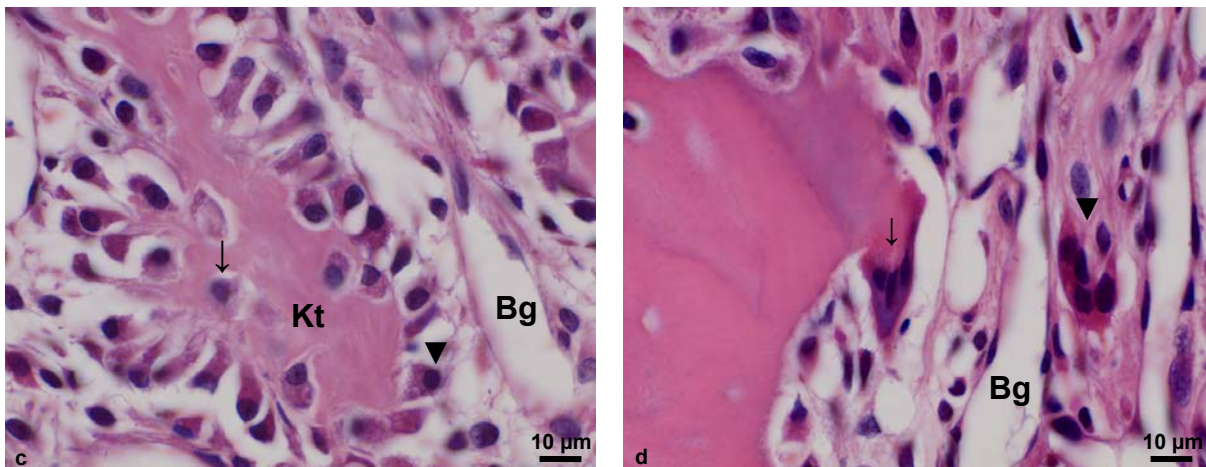
- (c) Frisch eingemauerte Osteozyten (↓) an einem neu gebildeten Knochen trabekel (Kt), der von Osteoblasten (▼) gesäumt ist.
- (d) An einem Knochen trabekel (Kt) anliegender multinuklearer Makrophage (▼).

Nach 7 Tagen war der Osteotomiespalt in der KD/S Gruppe bei manchen Tieren bereits weitgehend knöchern durchbaut mit vielen neugebildeten Knochen trabekeln. Teilweise wurde eingeschlossener hypertropher Knorpel, einige Blutgefäße und angrenzend vermehrt gelbes Knochenmark beobachtet. In Kortikalisnähe befand sich vermehrt Knorpel (Abb. 16a, b). In den neu gebildeten Knochen trabekeln waren schon einige Osteozyten eingemauert (Abb. 16c). Im angrenzenden Gewebe wurden vereinzelt mehrkernige Makrophagen befundet (Abb. 16d).

Abb. 17 Knochenremodelling Osteotomiespalt 7d P/S (Paraffinschnitte HE)



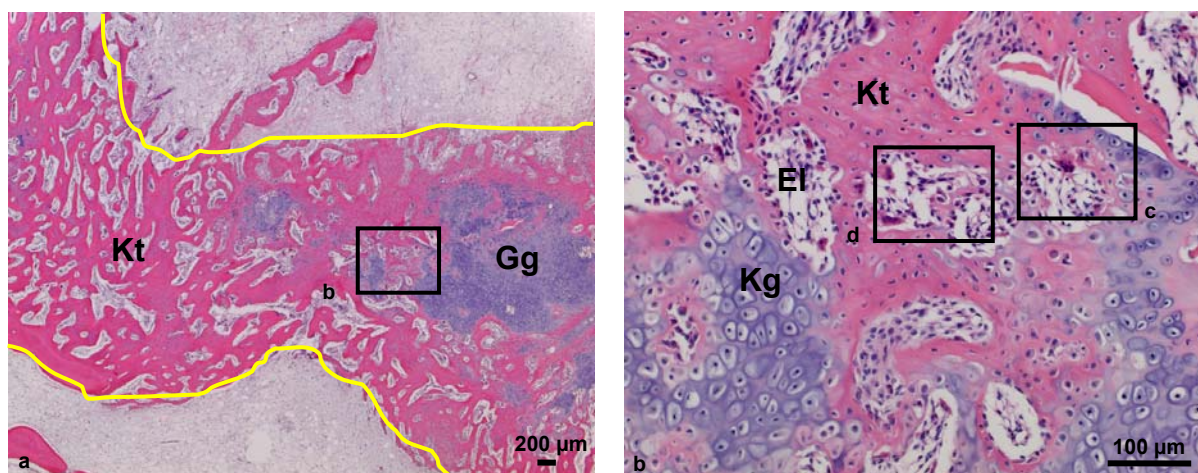
- (a) Bei diesem Tier weist der Osteotomiespalt noch viel Granulationsgewebe (Gg) auf. In der Nähe befindet sich Knochenmark (Km).
 (b) Knorpelgewebe (Kg) mit teilweise eingeschlossenen alten Knochenfragmenten (Kf) und neuen Knochen trabekeln (Kt).



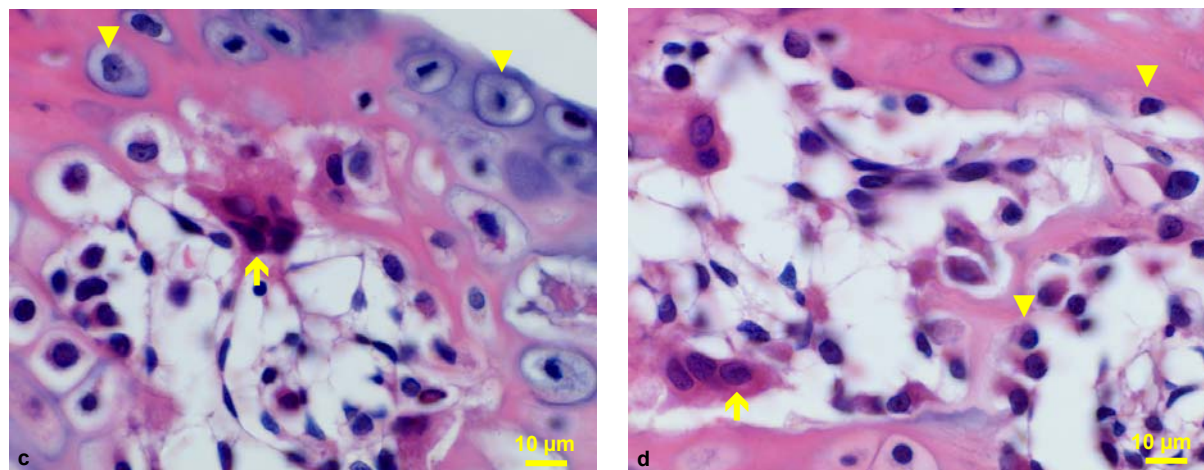
- (c) Die neuen Knochen trabekel (Kt) werden von Osteoblasten (▼) gesäumt und sind von Blutgefäßen (Bg) umgeben. In den Knochen trabekeln liegen frisch eingemauerte Osteozyten (↓).
 (d) An dem Knochen fragment liegt ein Osteoklast (↓). Das angrenzende Gewebe ist von Blutgefäßen (Bg) durchsetzt zwischen denen teilweise multinukleare Makrophagen (▼) liegen.

In der P/S Gruppe war die Osteogenese nach 7d noch nicht so weit fortgeschritten wie in der KD/S Gruppe. Der Osteotomiespalt bestand bei den meisten Tieren hauptsächlich aus Granulationsgewebe mit nur teilweise neugebildeten Knochen trabekeln und eingeschlossenen Knochenfragmenten (Abb. 17a, b), an denen viele Osteoblasten und einige Osteoklasten angelagert waren (Abb.17c, d). In den Erosionslakunen konnten viele Blutgefäße festgestellt werden (Abb. 17c, d).

Abb. 18 Knochenremodelling Osteotomiespalt 21d KD/S (Paraffinschnitte HE)



- (a) Dargestellt ist der Osteotomiespalt, der teilweise Granulationsgewebe (Gg) und dichte Knochen trabekel (Kt) aufweist.
 (b) Knorpelgewebe (Kg) und Erosionslakunen (EI) sind zwischen den neu gebildeten Knochen trabekeln (Kt) lokalisiert.

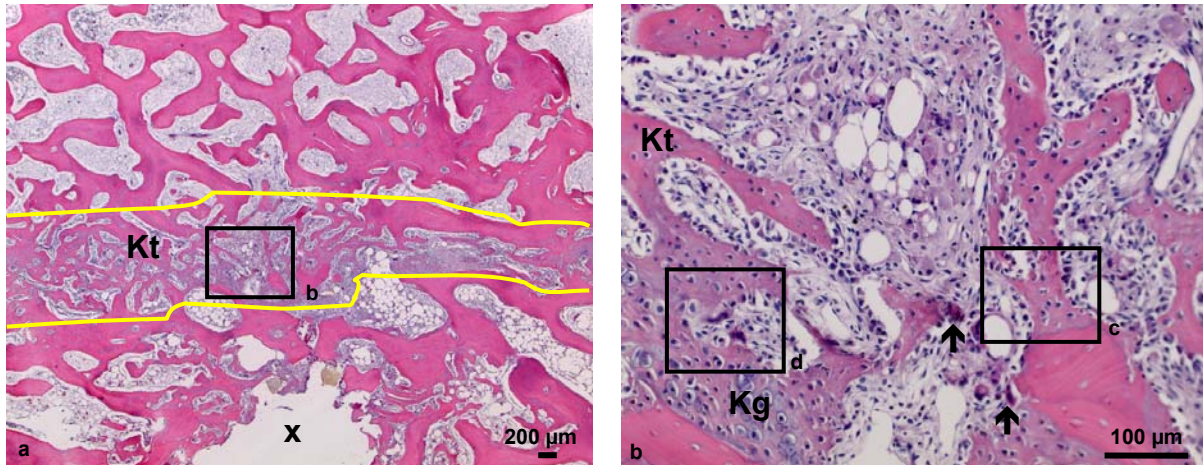


- (c) In den Erosionslakunen befinden sich multinukleare Makrophagen (↑). Hypertropher Knorpel (▼).
 (d) Osteoblasten (▼) liegen an den neuen Knochen trabekeln und multinukleare Makrophagen (↑) in den Lakunen.

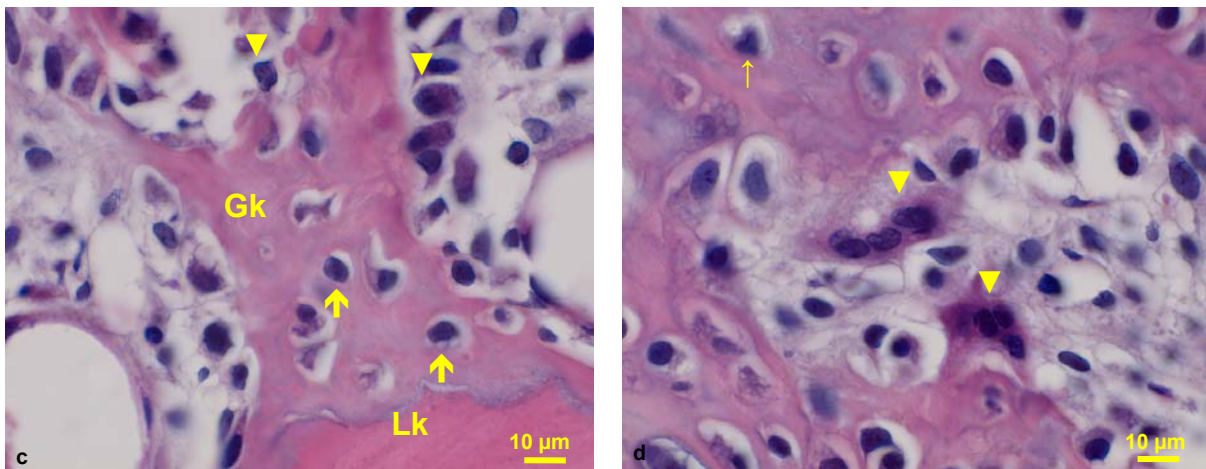
Nach 21 Tagen waren beide Gruppen überwiegend durch eine fortschreitende Osteogenese gekennzeichnet.

Der Osteotomiespalt der KD/S Tiere bestand aus dichten Knochen trabekeln, teilweise noch unterbrochen von Granulationsgewebe und Knorpelgewebe (Abb. 18a, b). In den Erosionslakunen konnten multinukleare Makrophagen nachgewiesen werden (Abb. 18c, d). Osteoblasten lagen am neu gebildeten Knochen (Abb. 18d).

Abb. 19 Knochenremodelling Osteotomiespalt 21d P/S (Paraffinschnitte HE)



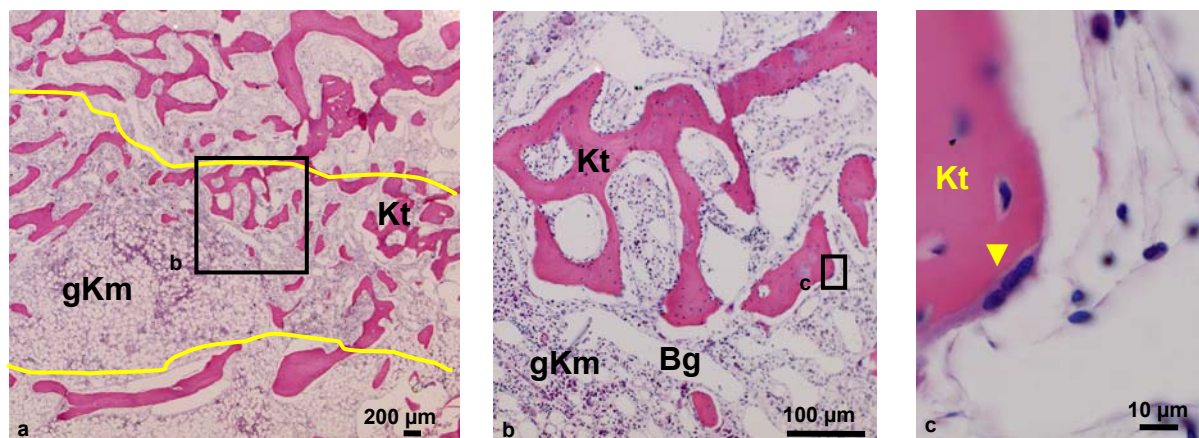
- (a) Der Osteotomiespalt weist hauptsächlich neu gebildete Knochen trabekel (Kt) auf. Durch den Sonic Pin verursachtes Loch (x).
 (b) Knorpelgewebe (Kg), neu gebildete Knochen trabekel (Kt) und einige Osteoklasten (↑, Ok).



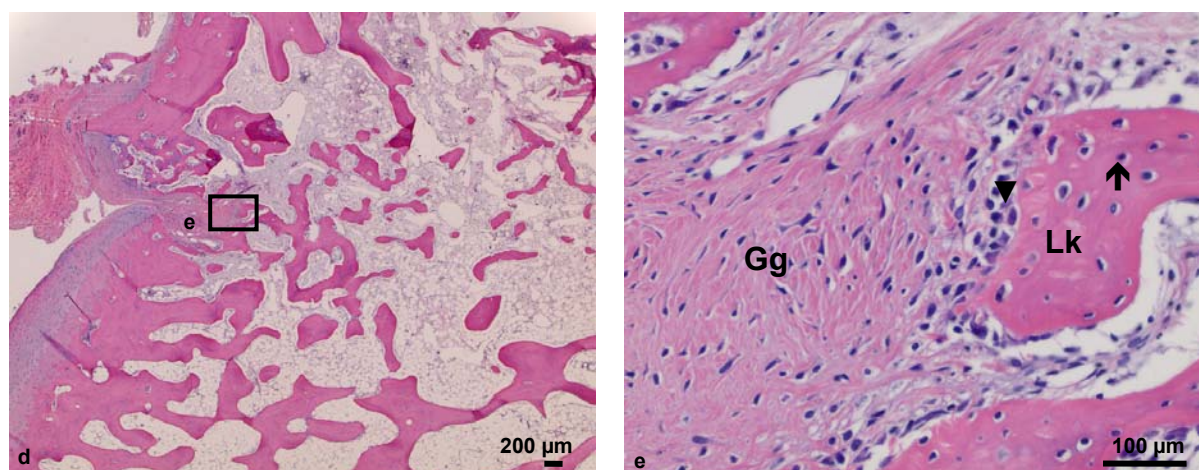
- (c) Osteoblasten (▼) und Osteozyten (↑) eingemauert im neu gebildeten Geflechtknochen (Gk), der an Lagerknochen (Lk) angrenzt.
 (d) Multinukleare Makrophagen (▼) liegen in den Erosionslakunen. Im neuen Knochen befinden sich Osteozyten (↑).

Die P/S Gruppe zeigte ein ähnliches Bild von dichten Knochen trabekeln. Es konnte keine Beeinflussung durch den Sonic Pin festgestellt werden (Abb. 19a, b).

Am neu gebildeten Geflechtknochen befanden sich Osteoblasten (Abb. 19c) und bereits eingemauerte Osteozyten. (Abb. 19c, d). In den Erosionslakunen traten vermehrt mehrkernige Makrophagen auf (Abb. 19d).

Abb. 20 Knochenremodelling Osteotomiespalt 42d KD/S (Paraffinschnitte HE)

- (a) Dargestellt ist der Osteotomiespalt im spongiösen Bereich, der hauptsächlich neu gebildete Knochen trabekel (Kt) mit Bereichen von bereits umgebildetem gelbem Knochenmark (gKm) aufweist.
- (b) Neu gebildete Knochen trabekel mit gelbem Knochenmark (gKm) und mehreren Blutgefäßen (Bg).
- (c) Ein Osteoklast (▼) liegt an einem neu gebildeten Knochen trabekel (Kt).



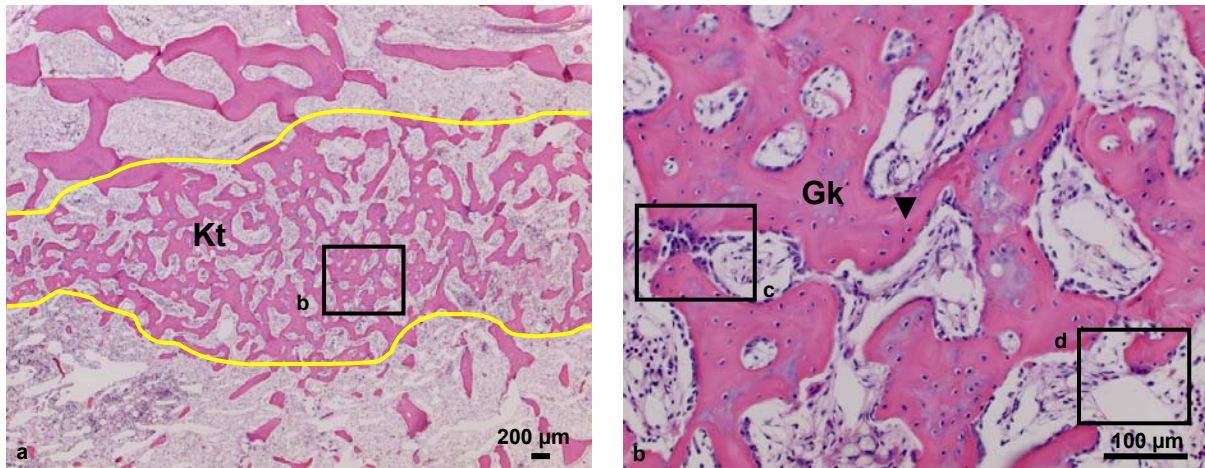
- (d) Im kortikalen Bereich der Osteotomie findet die Osteotomieheilung verzögert statt.
- (e) Im Osteotomiespalt kommt in der Kortikalis meist Granulationsgewebe (Gg) vor. Der neu gebildete Lamellenknochen (Lk) ist von Osteoblasten (▼) gesäumt und weist Osteozyten (↑) auf.

Zur Standzeit 42 Tage standen alle 3 Gruppen zur Beurteilung zur Verfügung.

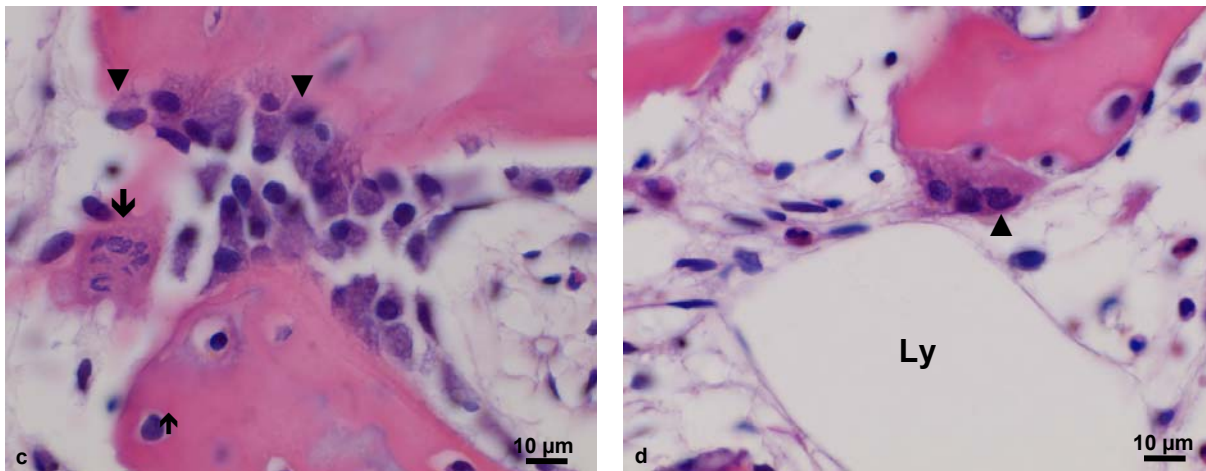
In der KD/S Gruppe wies der Osteotomiespalt neben hauptsächlich neu gebildeten Knochen trabekeln bereits umgebildetes gelbes Knochenmark (Abb. 20a) mit mehreren Blutgefäßen auf (Abb. 20b). Teilweise bauten Osteoklasten den Geflechtknochen um (Abb. 20c).

Im Lamellenknochen waren Osteozyten frisch eingemauert (Abb. 20e). Im kortikalen Bereich lag hauptsächlich Granulationsgewebe vor, was darauf hindeutet, dass die Osteogenese hier noch nicht so weit fortgeschritten war (Abb. 20d, e).

Abb. 21 Knochenremodelling Osteotomiespalt 42d P/S (Paraffinschnitte HE)



(a) Dargestellt ist der Osteotomiespalt, der hauptsächlich dichte, neu gebildete Knochen trabekel (Kt) aufweist. (b) Geflechtknochen (Gk) mit eingemauerten Osteozyten (▼).

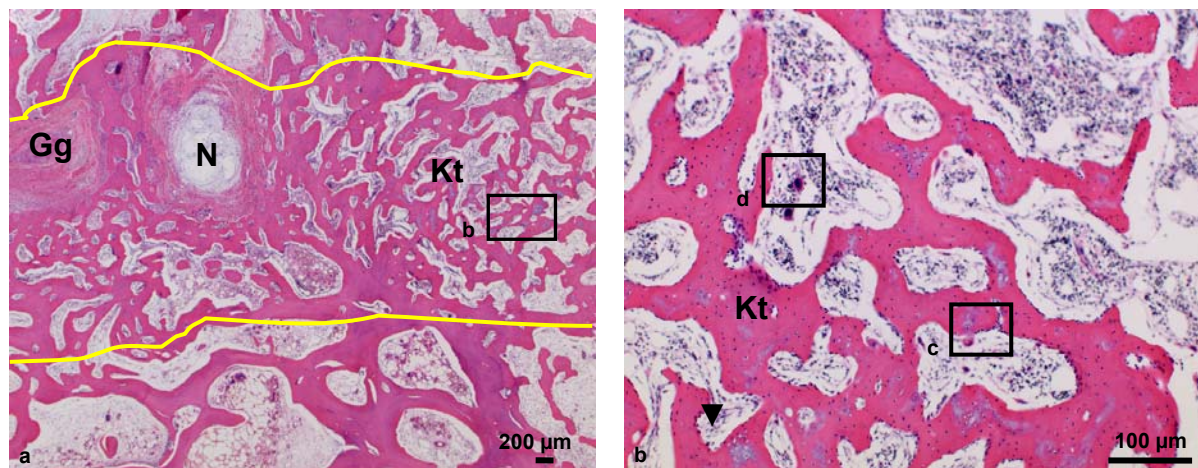


(c) Osteoblasten (▼) unmittelbar am Geflechtknochen in dem Osteozyten (↑) eingemauert sind. In der angrenzenden Lakune liegt ein absterbender mehrkerniger Makrophage (↓). (d) Osteoklast (▲) am Knochen in der Nähe eines Lymphgefäßes (Ly).

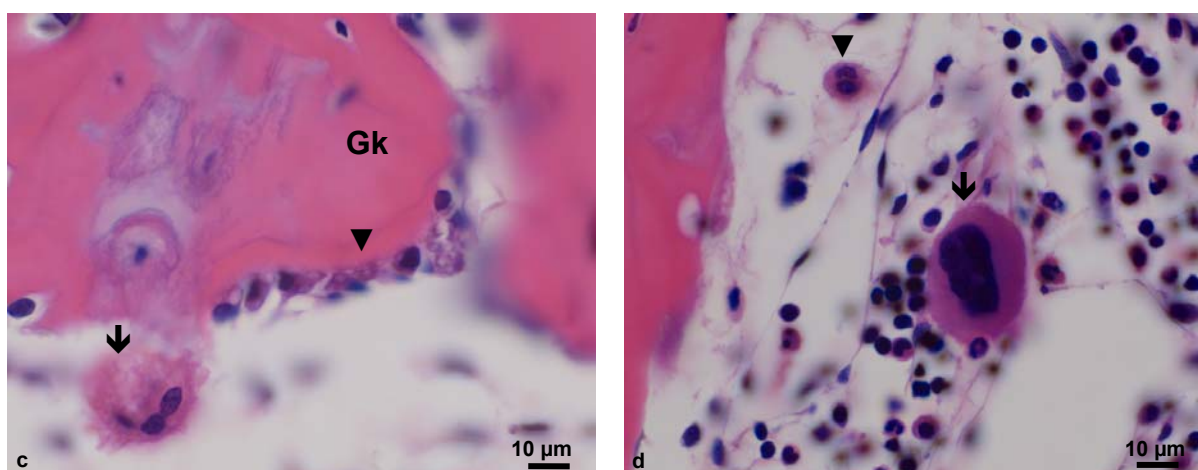
Überwiegend dichte, neu gebildete Knochen trabekel waren im Osteotomiespalt der P/S Gruppe lokalisiert (Abb. 21a). In den neu gebildeten Geflechtknochenarealen waren Osteozyten eingemauert (Abb. 21b).

Eine hohe Osteoblasten und Osteoklastenaktivität konnte festgestellt werden (Abb. 21c, d).

Die Heilung in der P/S Gruppe schien leicht verzögert gegenüber der KD/S Gruppe zu sein.

Abb. 22 Knochenremodelling Osteotomiespalt 42d P/P (Paraffinschnitte HE)

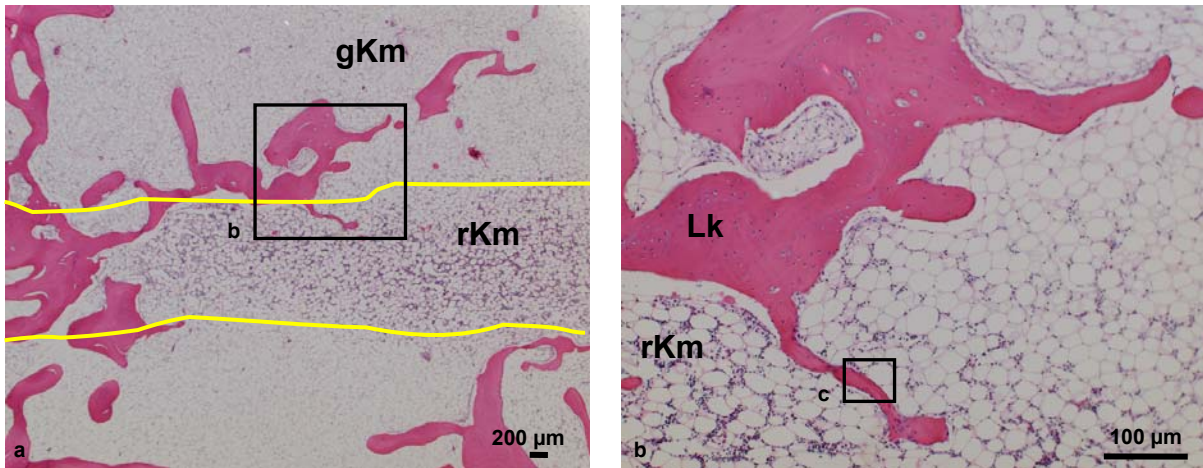
- (a) Der Osteotomiespalt besteht überwiegend aus neu gebildeten Knochen trabekeln (Kt). Neben einem Areal von Granulationsgewebe (Gg) befindet sich noch ein vereinzelt Fibrinnetz (N).
 (b) Zwischen den neu gebildeten Knochen trabekeln (Kt) liegen teilweise noch Reste von Knorpelgewebe (▼).



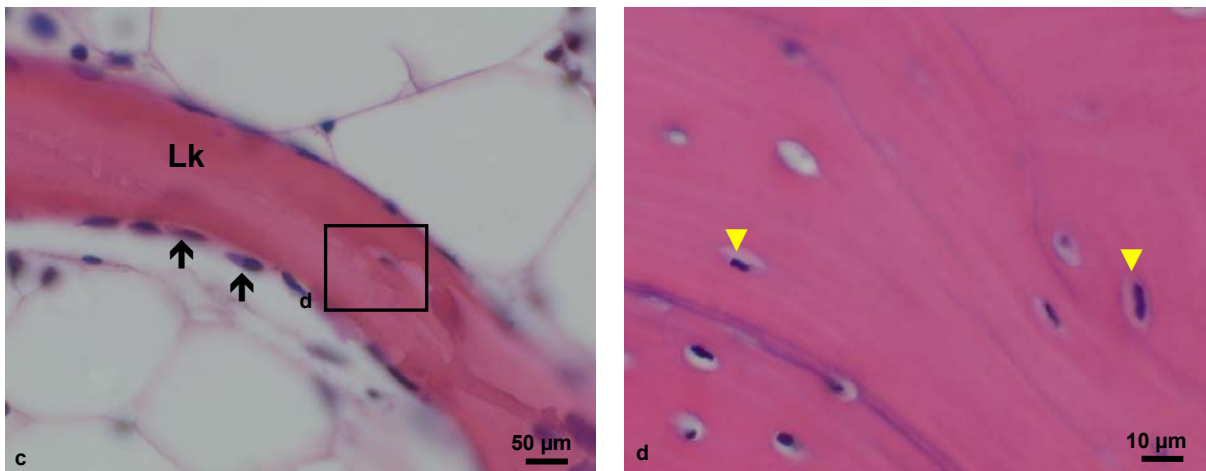
- (c) Osteoblasten (▼) liegen am Geflechtsknochen (Gk). Mehrkerniger Makrophage (↓) in einer Erosionslakune.
 (d) In einer Erosionslakune befindet sich ein multinukleärer Makrophage (▼) und eine Zelle aus der Thrombozytopoese, ein Megakaryozyt (↓).

Ebenfalls leicht verzögert schien die Osteogenese bei den Tieren der P/P Gruppe gegenüber den anderen beiden Gruppen nach 42d zu sein. Neben dichten Knochen trabekeln (Abb. 22a, b) wurden an einigen Stellen noch Granulationsgewebe und sogar ein vereinzelt Fibrinnetz gefunden (Abb. 22a). Osteoblasten lagen am Geflechtsknochen (Abb. 22c) und mehrkernige Makrophagen traten in den Erosionslakunen auf (Abb. 22d). Ein Megakaryozyt konnte dort ebenfalls identifiziert werden (Abb. 22d).

Abb. 23 Knochenremodelling Osteotomiespalt 84d KD/S (Paraffinschnitte HE)



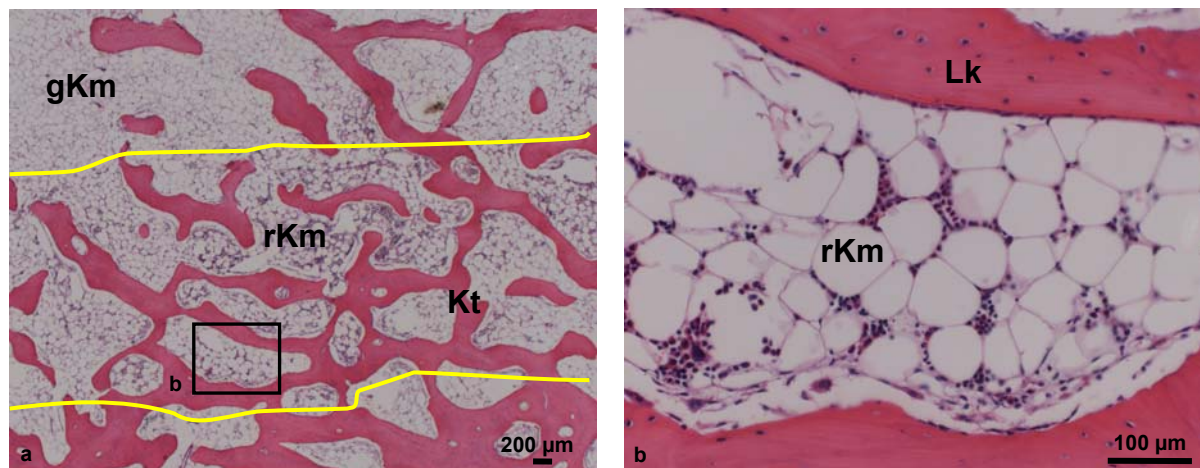
- (a) Dargestellt ist der Osteotomiespalt, der hauptsächlich rotes, gefäßreiches Knochenmark (rKm) aufweist und von gelbem Knochenmark (gKm) umgeben ist. Der Osteotomiespalt ist vollständig geheilt.
 (b) Rotes Knochenmark (rKm) liegt am umgebauten Lamellenknochen (Lk).



- (c) Bone lining cells (↑) (endostale Saumzellen) liegen am Lamellenknochen (Lk).
 (d) Deutlich zu erkennen ist die Lamellenstruktur des umgebauten Knochens mit eingemauerten Osteozyten (▼).

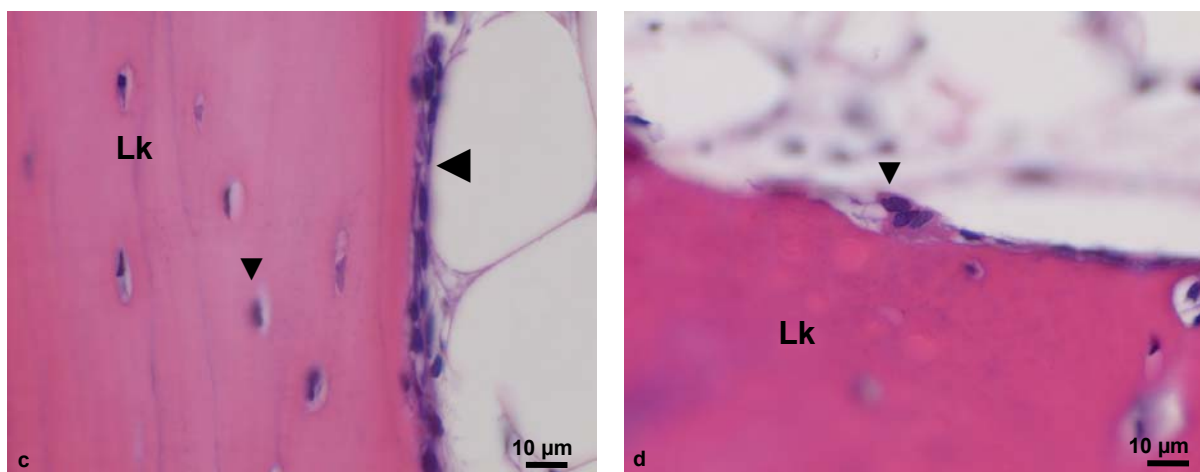
Nach 84 Tagen war das Remodelling in der KD/S Gruppe fast vollständig abgeschlossen. Der Geflechtknochen (Reparaturknochen) war in lamellären Knochen (Endzustand) umgebaut.

Der Osteotomiespalt ließ sich nur noch am roten Knochenmark identifizieren (Abb. 23a). Osteoblasten traten nur noch selten am neuen Knochen auf und es konnten Bone lining cells (endostale Saumzellen) nachgewiesen werden (Abb. 23c). Die Lamellenstruktur des Knochens mit eingelagerten Osteozyten war deutlich zu erkennen (Abb. 23d).

Abb. 24 Knochenremodelling Osteotomiespalt 84d P/S (Paraffinschnitte HE)

(a) Der Osteotomiespalt ist vollständig knöchern durchbaut. Zwischen den ungebauten Knochen trabekeln (Kt) befindet sich hauptsächlich rotes Knochenmark (rKm), das von gelbem Knochenmark (gKm) umgeben ist.

(b) Rotes Knochenmark (rKm) umgeben von Lamellenknochen (Lk).



(c) Eingemauerte Osteozyten (▼) liegen im Lamellenknochen (Lk) mit angrenzenden Bone lining cells (◄).

(d) Ein vereinzelter Osteoklast (▼) am Lamellenknochen (Lk).

Die P/S Gruppe zeigte ein sehr ähnliches Bild zum Beobachtungszeitpunkt 84d. Der Osteotomiespalt wies hauptsächlich vollständig neugebildete Knochenlamellen mit rotem und gelbem Knochenmark auf (Abb. 24a, b).

Der Lamellenknochen war an einigen Stellen von Bone lining cells gesäumt (Abb. 24c). Vereinzelt lagen Osteoklasten am umgebauten Knochen (Abb. 24d). Es wurden nur noch selten Osteoblasten am neuen Knochen gefunden im Gegensatz zu den früheren Zeitpunkten.

Zusammenfassend entsprach die Osteogenese bei allen Tieren den physiologischen Erwartungen. Unterschiede zwischen den Gruppen konnten nur tendenziell beobachtet werden und lagen in der Toleranz von individuellen, biologischen Schwankungen.

4.2.3 Implantatinterface

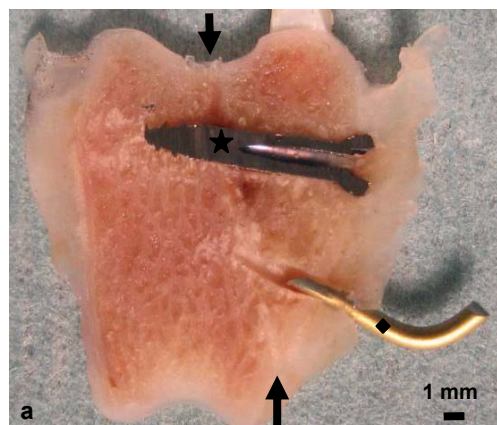
Im Interface - dem Raum zwischen Implantat und angrenzendem Knochengewebe - spielen sich die interaktiven zellulären und materialspezifischen Prozesse ab. Diese werden anhand der nachfolgenden Präparate und histologischen Schnittbilder dargestellt.

Im Zeitraum von 7 Tagen fanden sich makroskopisch und histologisch zwischen den einzelnen Gruppen keine wesentlichen Unterschiede an den Implantatinterfacen. Sowohl am K-Draht, an der Schraube als auch am Sonic Pin wurden Knochenfragmente, Granulationsgewebe und Knochenbälkchen nachgewiesen (Abb. 25c-f, Abb. 26c-f). Vereinzelt wurden Osteoblasten an Knochenfragmenten in unmittelbarer Nähe zum Sonic Pin gefunden (Abb. 26c).

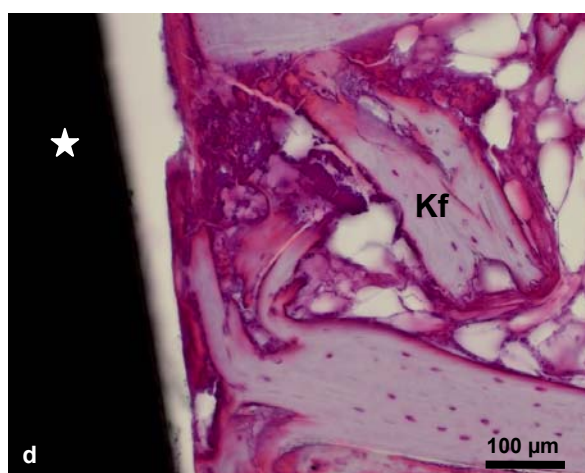
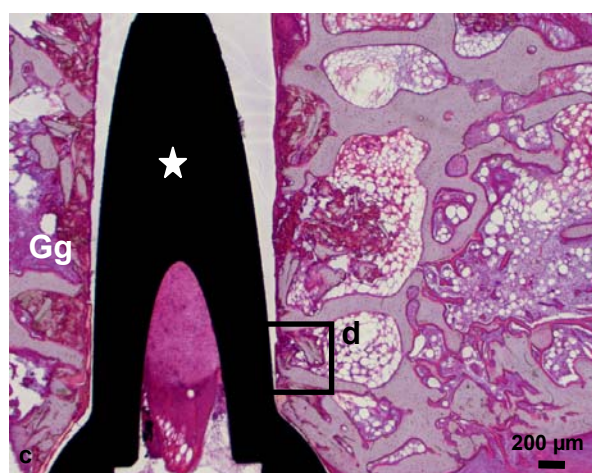
Für die 21 Tage Standzeit ließen sich in allen Gruppen angrenzend an die unterschiedlichen Implantate Granulationsgewebe und Knochenzellen nachweisen. (Abb. 27, 28). An der Oberfläche der implantierten Sonic Pins (Polylaktid) konnten gehäuft Makrophagen identifiziert werden (Abb. 28b).

Nach 42 Tagen ergaben sich Unterschiede in der Umgebung der verschiedenen Implantate. Am K-Draht lag meist zell-, faser- und gefäßreiches Granulationsgewebe (Abb. 29d) und neu gebildeter Knochen (Abb. 29b, d). Die Schraube war außen umgeben von Knochen trabekeln mit angrenzenden vereinzelt Makrophagen. In der Kannulierung der Schraube befand sich eingewachsenes Gewebe (Abb. 29c). Am nichtaufgeschmolzenen Teil des Sonic Pins waren meist Knochen trabekel aufzufinden (Abb. 30c, d, Abb. 31c). Im Gegensatz dazu konnte im erstarrten Bereich an der Spitze des Sonic Pins vorwiegend Granulationsgewebe (Abb. 30e) und vermehrt Makrophagen nachgewiesen werden (Abb. 31d). Manche Makrophagen lagen eingeschlossen im Sonic Pin Material (Abb. 31d, e). Bei drei von sechs Tieren waren die Sonic Pins gebrochen (Abb. 31a).

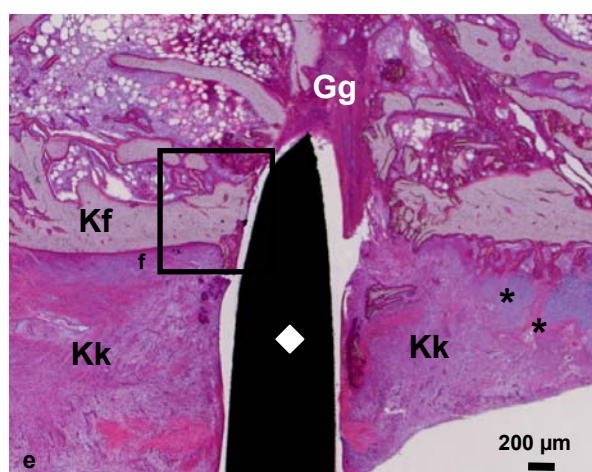
Zur Standzeit von 84 Tagen waren die meisten K-Drähte von Bindegewebe umgeben, was auf eine Lockerung schließen lässt (Abb. 32d). Im Gegensatz dazu befand sich unmittelbar am Interface der Schraube mineralisiertes Knochengewebe (Abb. 32e) und Knochenmark (Abb. 33e). Das Interface des Sonic Pins bestand ebenfalls vorwiegend aus Knochenmark (Abb. 33c). Am erstarrten Teil wurden noch teilweise Granulationsgewebe und mineralisierte Knochenmatrix beobachtet (Abb. 33d).

Abb. 25 Implantatinterface 7d KD/S

- (a) Makroskopische Darstellung der 1. Scheibe. Es sind die Schraube (*), der K-Draht (♦) und die Osteotomie (↑) angeschnitten.
- (b) CT- 3D Darstellung des distalen Femurs mit der Schraube (*) und dem K-Drahts (♦) und eingblendete Axialschnittdarstellung. Die Reposition und Fixation der Osteotomie ist gut gelungen.

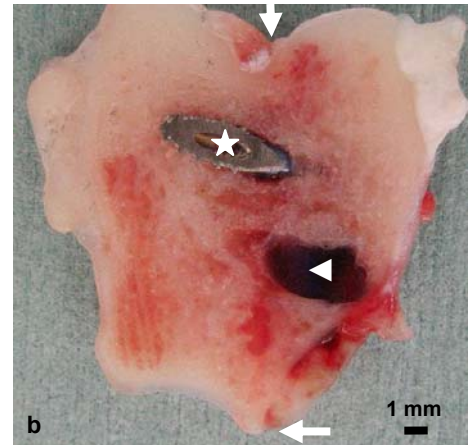
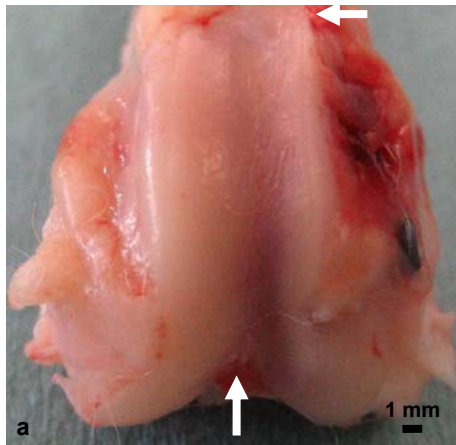


- (c) Am Interface der Schraube (*) befindet sich teilweise Granulationsgewebe (Gg). (Knochenschliff, HE)
- (d) Einige Knochenfragmente (Kf) liegen direkt an der Schraube (*). (Knochenschliff, HE)

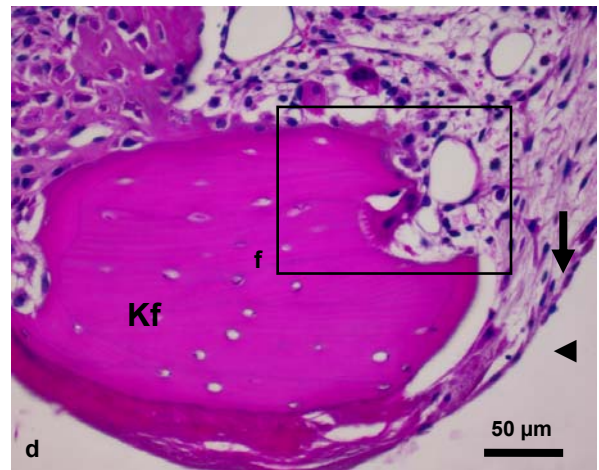
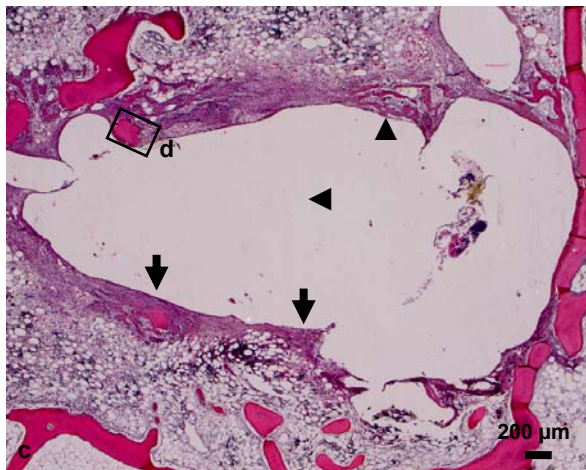


- (e) Anschnitt des K-Drahts (♦) beim Durchtritt durch die Kortikalis (Kk). Am Interface des K-Drahts sind Knochenfragmente (Kf), Granulationsgewebe (Gg) und hypertropher Knorpel (*) anzutreffen. (Knochenschliff, HE)
- (f) Außerhalb der Kortikalis befindet sich ein Kallus (Ka) aus Granulationsgewebe. (Knochenschliff, HE)

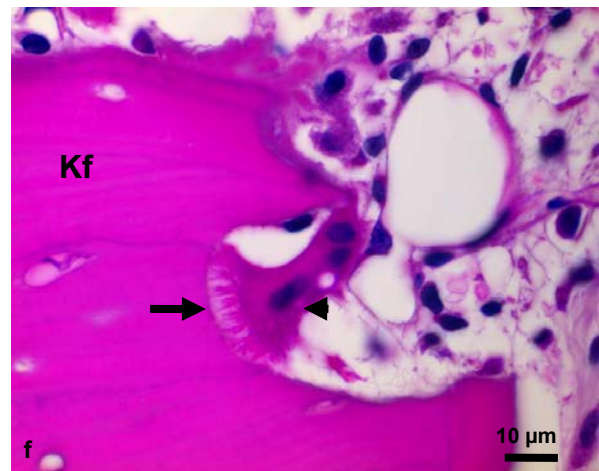
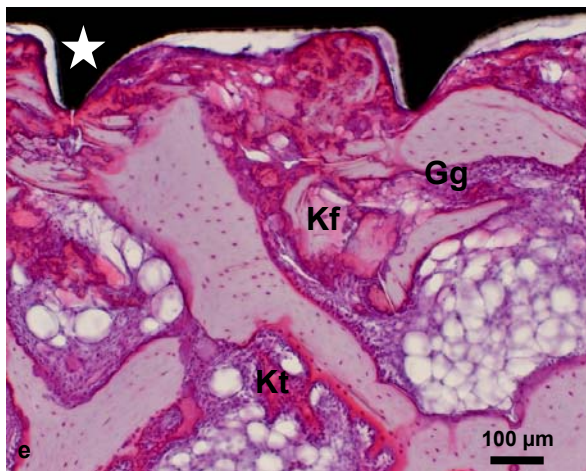
Abb. 26 Implantatinterface 7d P/S



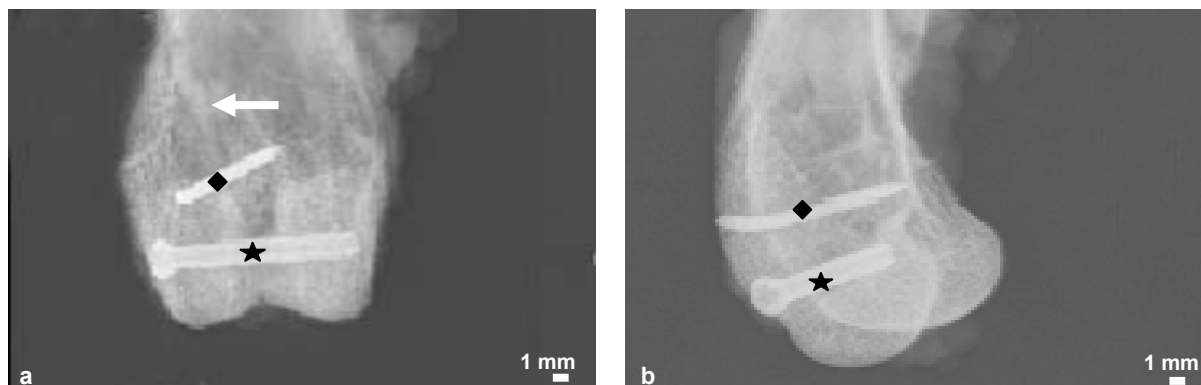
- (a) Makroskopische Aufnahme des Femurs nach der Euthanasie. Der Osteotomiespalt (↑) ist sehr schmal, keine Asymmetrien der Kondylen sowie sonstige Mängel der Reposition sind zu beobachten.
 (b) Angeschnitten ist der Osteotomiespalt (↑), die Schraube (*) und der Sonic Pin (◄).



- (c) Das Interface des Pins (◄) wird durch zell- und gefäßreiches Granulationsgewebe (↓) und neugebildeten Knochenbälkchen (▲) dargestellt. (Paraffinschnitt, HE)
 (d) Osteoblasten (↑) an einem Knochenfragment (Kf) in unmittelbarer Nähe zum erstarrten Bereich des Sonic Pins (◄). (Paraffinschnitt, HE)

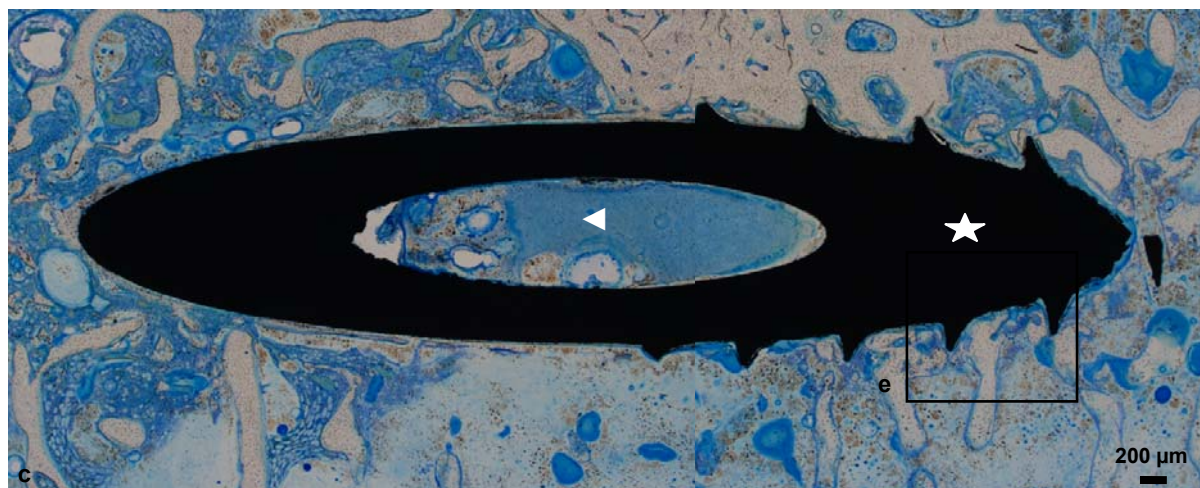


- (e) Am Interface der Schraube (*) sind Knochenfragmente (Kf), neu gebildete Knochen trabekel (Kt) und etwas Granulationsgewebe (Gg) nachzuweisen. (Knochenschliff, HE)
 (f) Ein Osteoklast (◄) mit einer „ruffled border“ (→) anliegend am Knochenfragment (Kf). (Paraffinschnitt, HE)

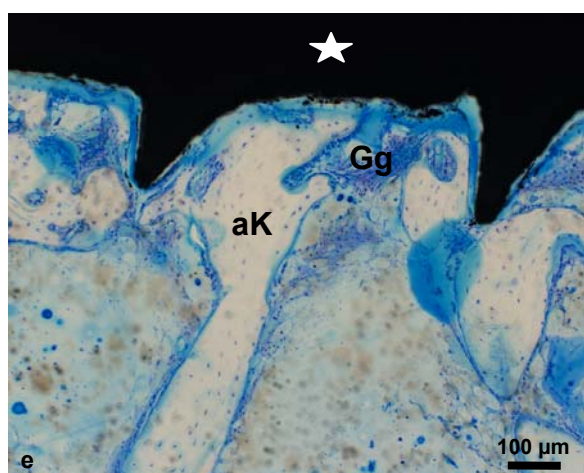
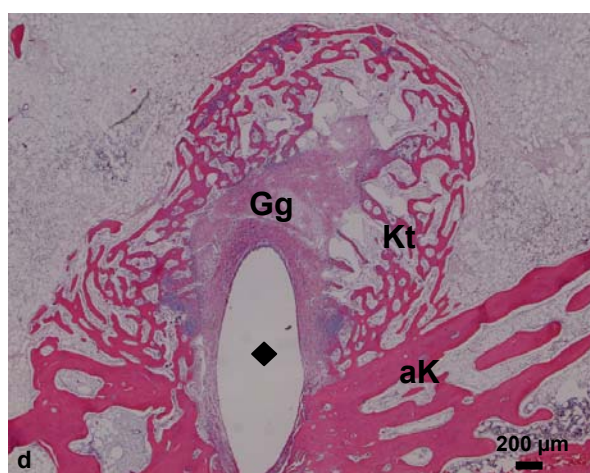
Abb. 27 Implantatinterface 21d KD/S

Die Röntgenbilder zeigen eine gute Reposition der Osteotomie. Die Schraube (*) und der K-Draht (◆) sind deutlich erkennbar

- (a) Frontalschnitt mit sichtbarem Osteotomiespalt (→).
 (b) Darstellung des Femurs in Sagittalebene.

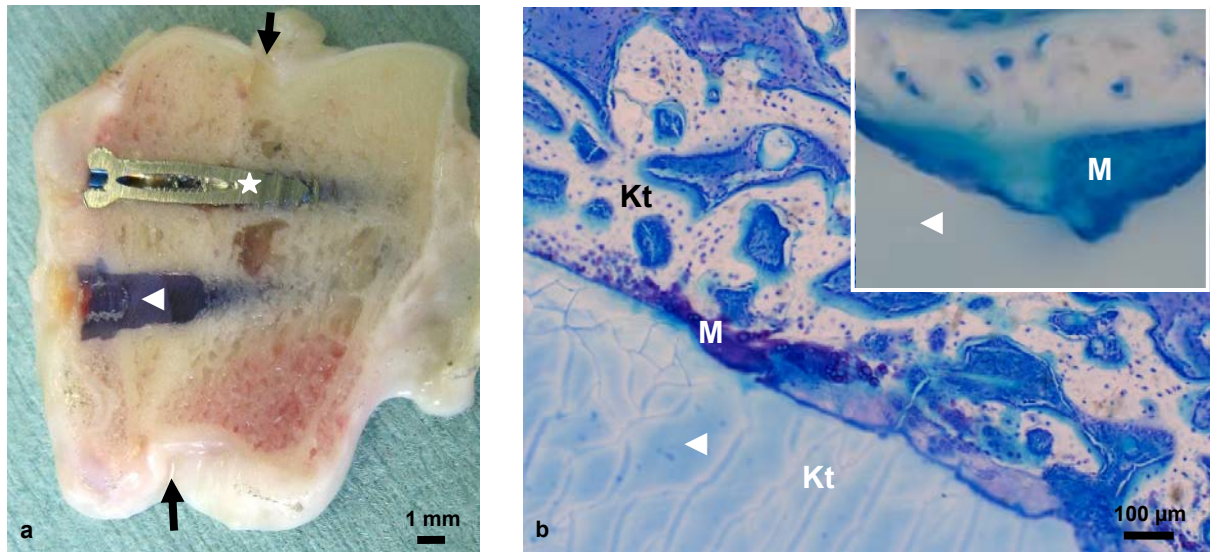


- (c) Anschnitt durch die Schraube (*) mit eingewachsenem Gewebe (◆) in der Kannulierung des Implantates. (Knochenschliff, TB)

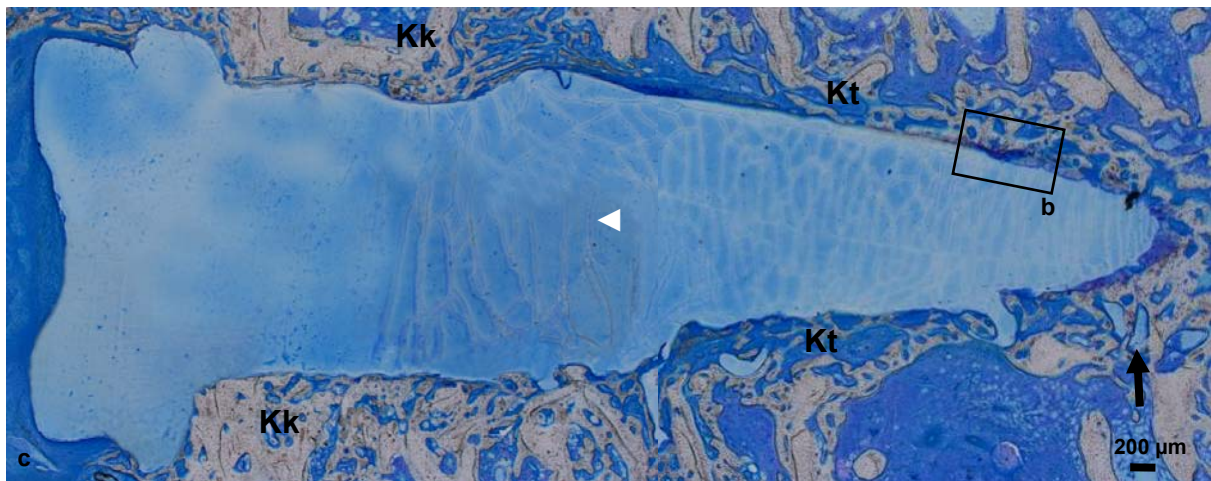


- (a) Das Interface des K-Drahts (◆) wird von Granulationsgewebe (Gg) gebildet, das von neu gebildeten Knochen trabekeln (Kt) und von anlagernden Lagerknochen (aK) umgeben wird. (Paraffinschnitt, HE)
 (b) Am Interface der Schraube (*) sind Knochenfragmente, Granulationsgewebe (Gg) und Reste des alten Lagerknochens (aK). (Knochenschliff, TB)

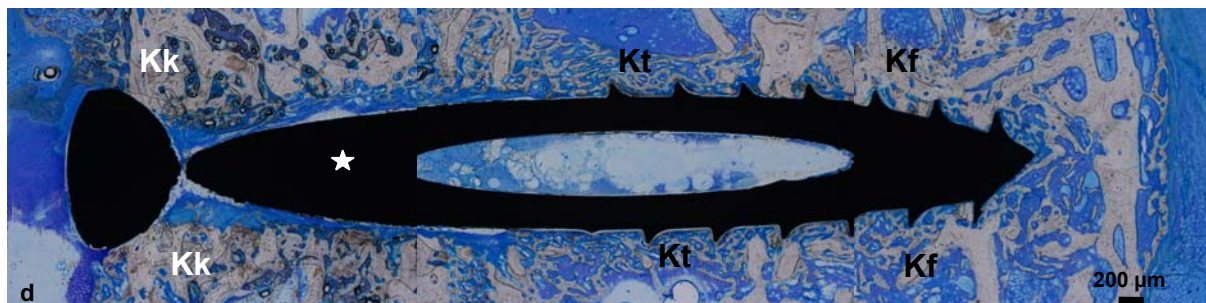
Abb. 28 Implantatinterface 21d P/S



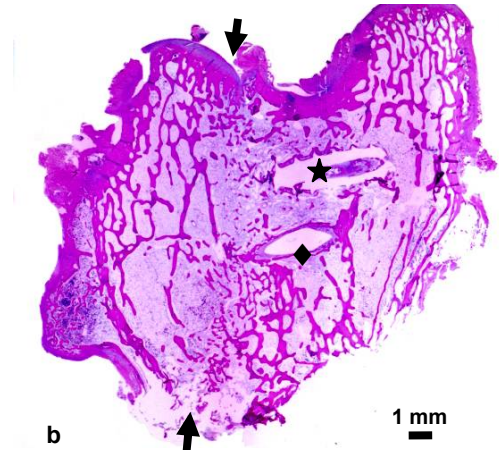
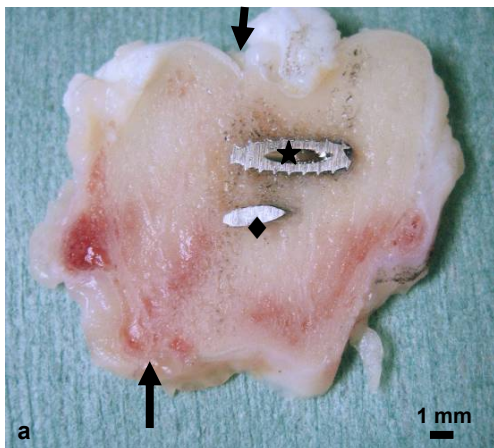
- (a) Makroskopie der Scheibe, die für die Technovit 9100 Einbettung verwendet wurde. Es ist der Osteotomiespalt (→), der Sonic Pin (◄) und die Schraube (*) angeschnitten.
 (b) Am Interface des Sonic Pins (◄) befinden sich neu gebildete Knochen trabekel (Kt) und mehrkernige Makrophagen (M). (Knochenschliff, TB)



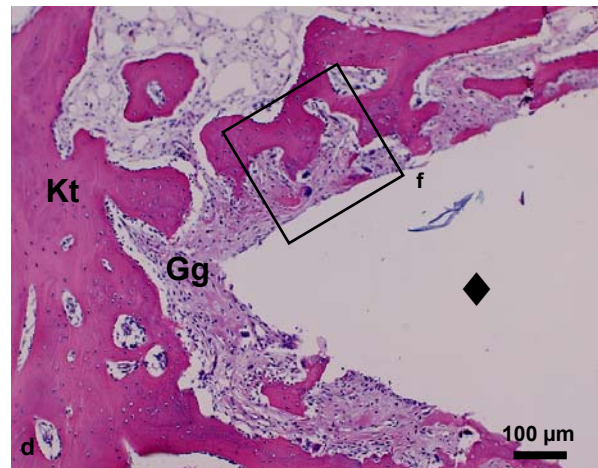
- (c) Übersicht Sonic Pin (◄): Im Interface des Sonic Pins befinden sich neu gebildete Knochen trabekel (Kt) und an der Eintrittsstelle ist die Kortikalis (Kk) zu erkennen. An der Spitze ist das Polylaktid (↑) in den Knochen penetriert und somit der Sonic Pin gut verankert. (Knochenschliff, TB)



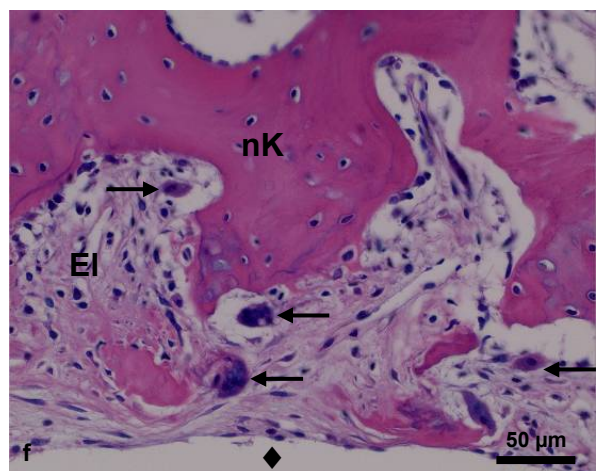
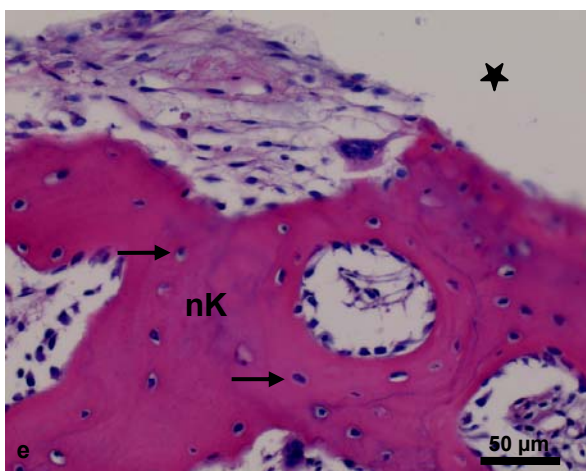
- (d) Histologisches Bild der Schraube (*). Am Interface sind neu gebildete Knochen trabekel (Kt) und Knochenfragmente (Kf) und an der Eintrittsstelle die Kortikalis (Kk) erkennbar. (Knochenschliff, TB)

Abb. 29 Implantatinterface 42d KD/S

- (a) Makroskopische Darstellung, der für die Paraffineinbettung verwendeten Scheibe. Erkennbar sind die Osteotomie (↓), die Schraube (*) und der K-Draht (◆).
 (b) Auf dieser Übersicht ist der Osteotomiespalt (↓) abgebildet, der durch eine Schraube (*) und einen K-Draht (◆) fixiert wird. (Paraffinschnitt, HE)

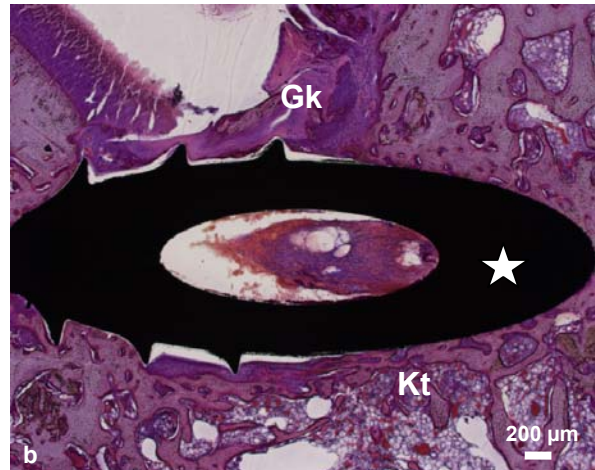
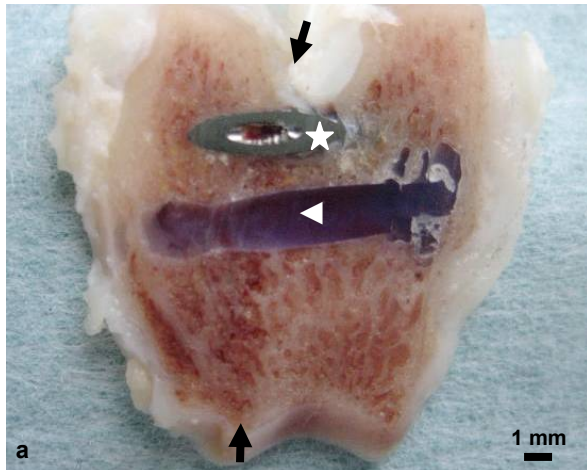


- (c) Im Inneren der Schraube (*) ist Gewebe (G) und im Außenbereich sind Knochen trabekel (Kt) vorzufinden. (Paraffinschnitt, HE)
 (d) Der K-Draht (◆) wird von zell- und gefäßreichem Granulationsgewebe (Gg) umgeben. Direkt im Anschluss an das Granulationsgewebe befinden sich neu gebildete Knochen trabekel (Kt). (Paraffinschnitt, HE)

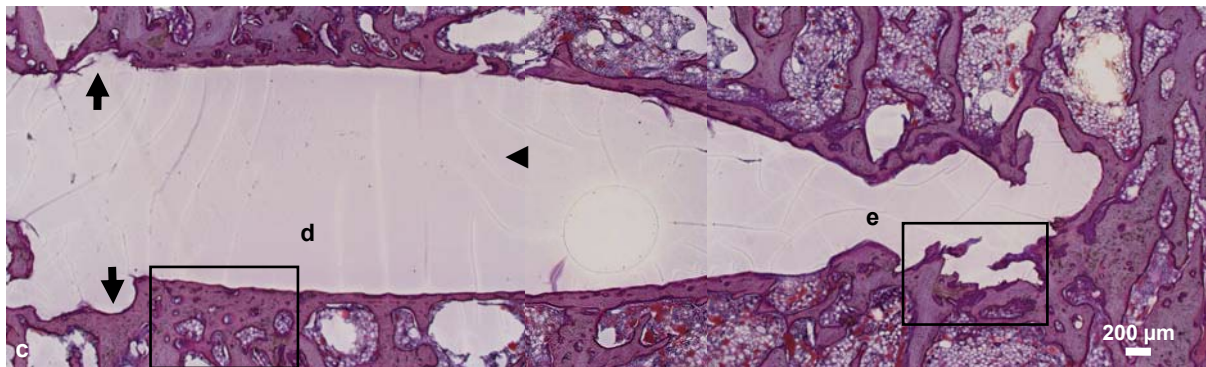


- (e) Im neu gebildeten Knochen (nK) sind Osteozyten (→) eingemauert. (Paraffinschnitt, HE)
 (f) Der neu gebildete Knochen (nK) reicht teilweise bis an die Oberfläche des K-Drahts (◆). Bone lining cells (▼) liegen am neuen Knochen (nK) und Makrophagen (→) in den Erosionslakunen (EI). (Paraffinschnitt, HE)

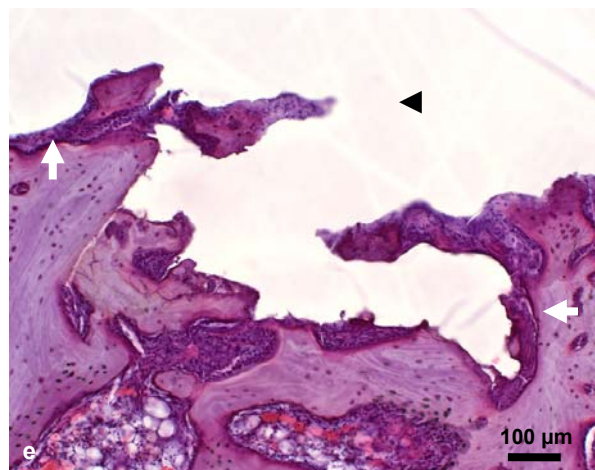
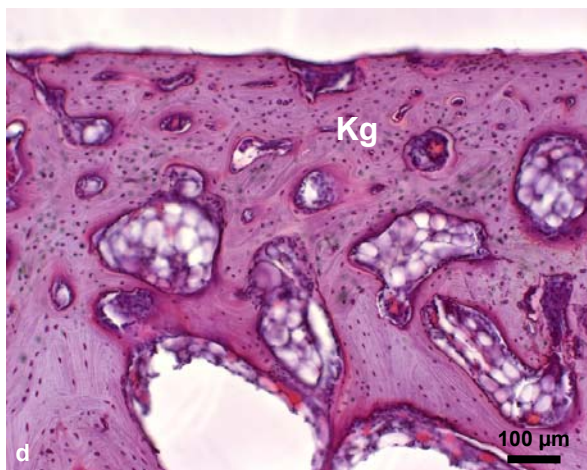
Abb. 30 Implantatinterface 42d P/S



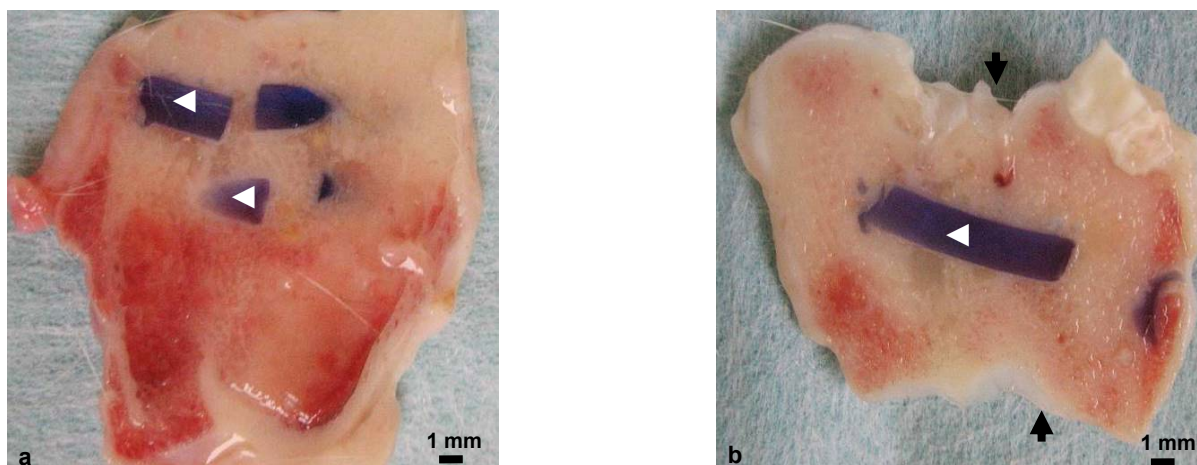
(a) Darstellung des Osteotomiespaltes (↓), der durch eine Schraube (*) und einen Sonic Pin (◄) stabilisiert wird.
 (b) Die Schraube (*) liegt im Gelenkknorpel (Gk), der die Femurkondylen überzieht. Das Schraubeninterface wird von Knochen trabekeln (Kt) gebildet. (Knochenschliff, HE)



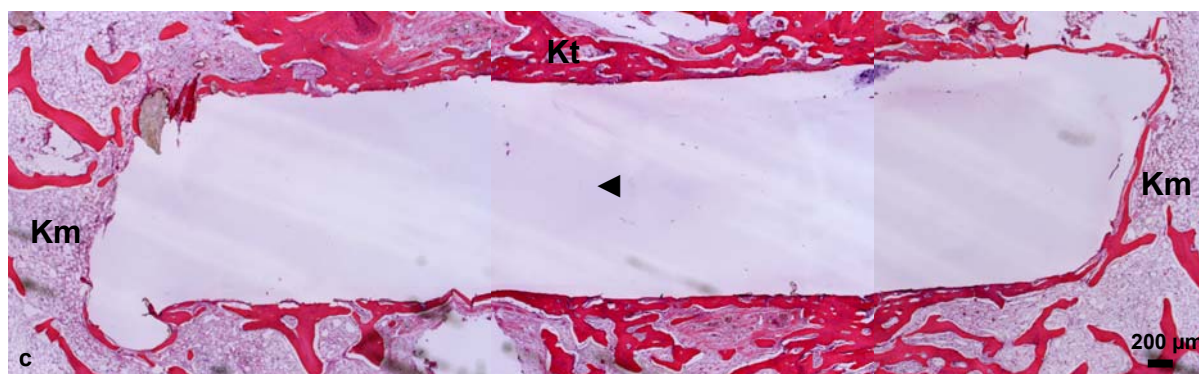
(c) Interface des Sonic Pins (◄). Der Pin ist an der Spitze (Bereich e) und teilweise am Kopf (↓) vom USS geschmolzen und dann erstarrt. (Knochenschliff, HE)



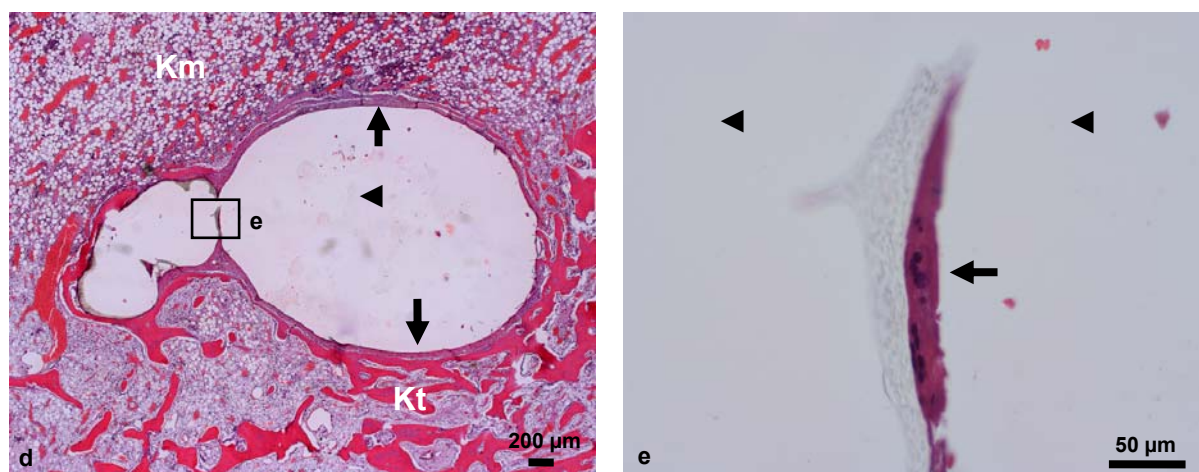
(d) Im ungeschmolzenen Bereich des Sonic Pins (◄) ist am Interface vor allem Knochengewebe (Kg) zu finden. (Knochenschliff, HE)
 (e) Im erstarrten Bereich des Sonic Pins (◄) ist eine schmale Zone von Granulationsgewebe (←). (Knochenschliff, HE)

Abb. 31 Implantatinterface 42d P/P

- (a) In der P/P Gruppe wiesen 3 von 6 Tieren gebrochene Sonic Pins (◄) auf.
 (b) Makroskopische Übersicht eines Tieres mit intakten Sonic Pins (◄), der den Osteotomiespalt (⌋) stabilisiert.

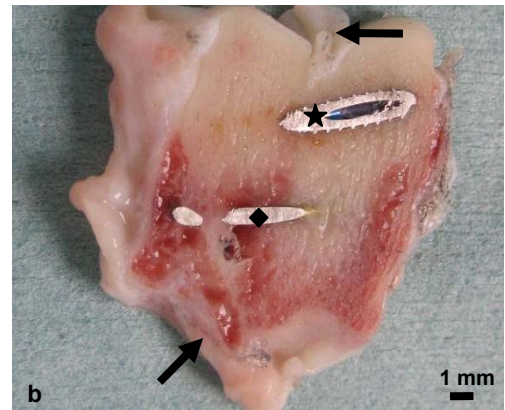
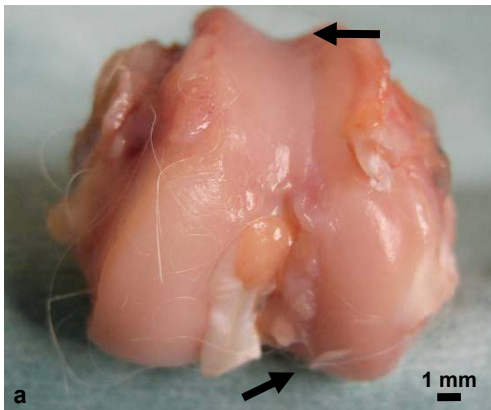


- (c) Übersichtsaufnahme eines Sonic Pins (◄), der im Schaftbereich von Knochentrabekeln (Kt) umgeben ist und an den Enden teilweise im direkten Kontakt mit dem Knochenmark (Km) steht. (Paraffinschnitt, HE)

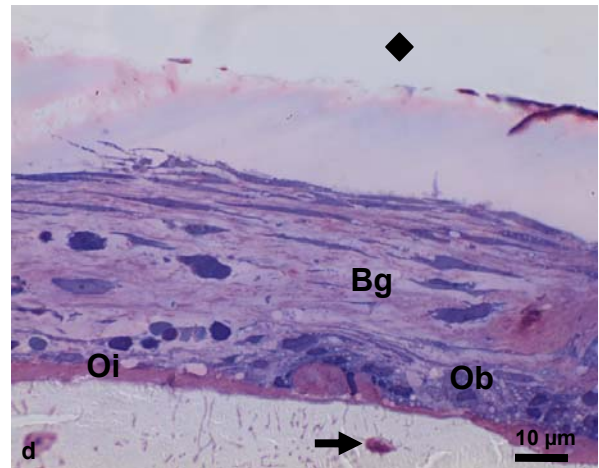
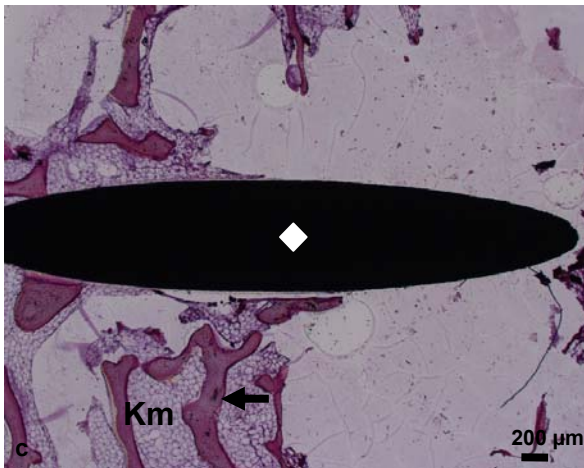


- (d) Am Interface des Sonic Pins (◄) bei einem weiteren Tier aus der P/P Gruppe ist ein Ring aus Makrophagen (↓) lokalisiert. An diesen Ring schließen sich Knochentrabekel (Kt) und Knochenmark (KM) an. (Paraffinschnitt, HE)
 (e) Am Übergang zum erstarrten Bereich des Sonic Pins (◄) befindet sich ein mehrkerniger Makrophage (←), der vom Pinmaterial umgeben ist. (Paraffinschnitt, HE)

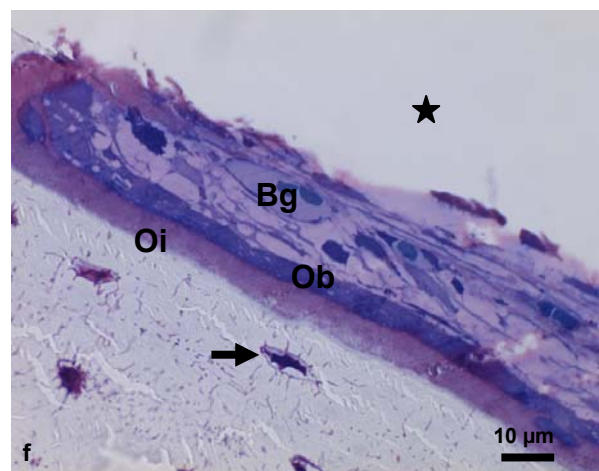
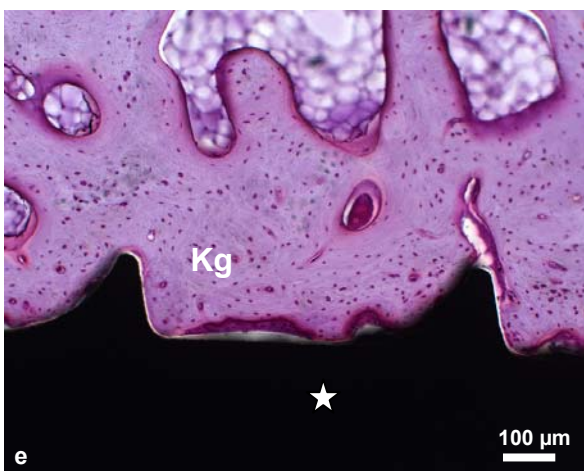
Abb. 32 Implantatinterface 84d KD/S



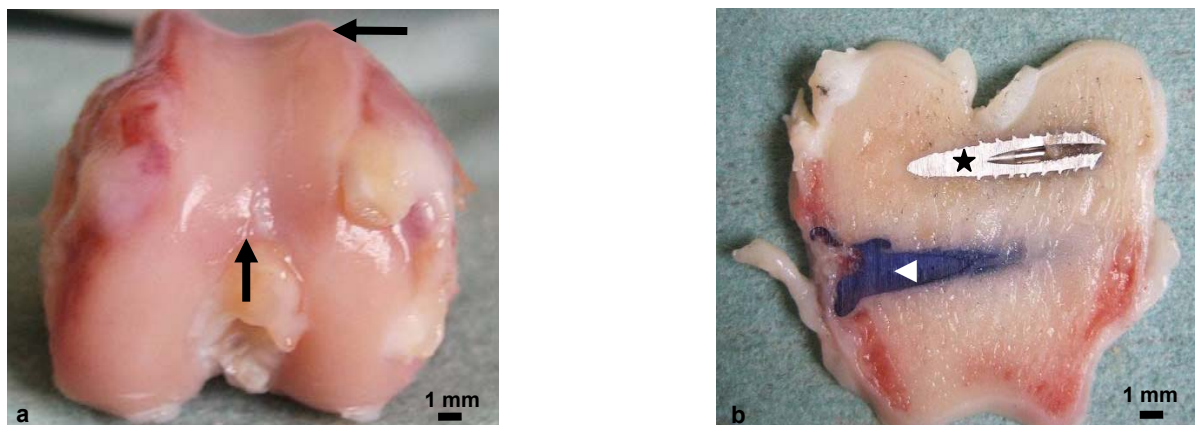
- (a) Makroskopie des Femurs in der vom Osteotomiespalt (↓) nur eine schmale Linie zu erkennen ist. Die Kondylen sind symmetrisch.
 (b) Das Gewebe am Interface des K-Drahts (◆) ist durch die Einblutungen (▶) größtenteils nicht erhalten.



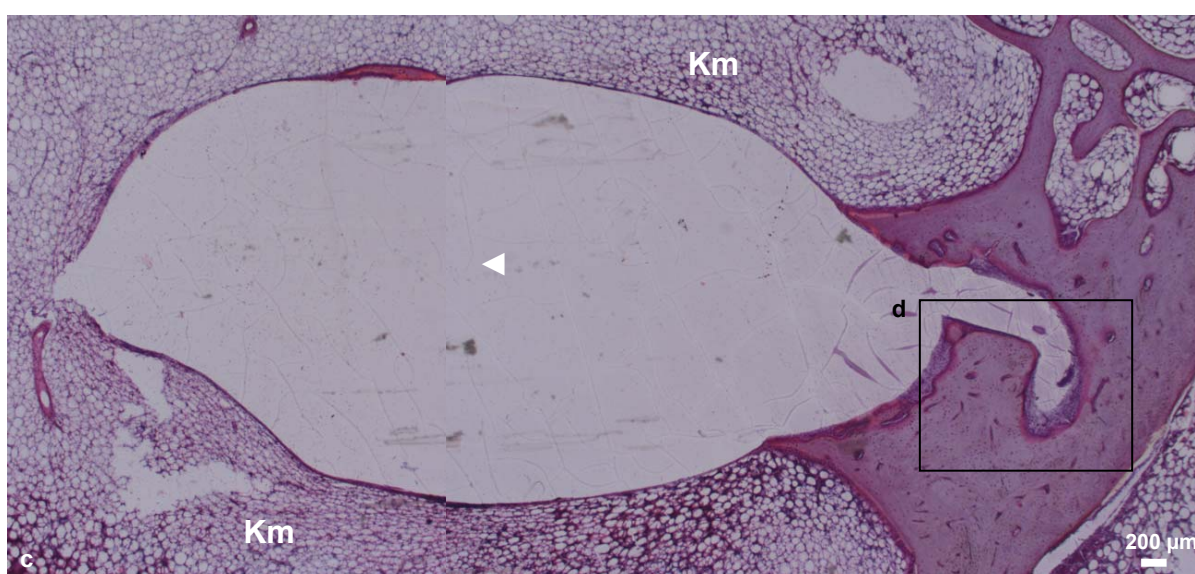
- (c) Dort wo das Gewebe erhalten geblieben ist, werden Knochen trabekel (←) und helles Knochenmark (Km) gefunden. (Knochenschliff, HE)
 (d) Der K-Draht (◆) ist bei einem anderen Tier aus der KD/S Gruppe von Bindegewebe (Bg) umgeben, an dem Osteoblasten (Ob) lokalisiert sind, die Osteoid (Oi) produzieren. Eingemauerter Osteozyt (→). (Semidünnschnitt, HE)



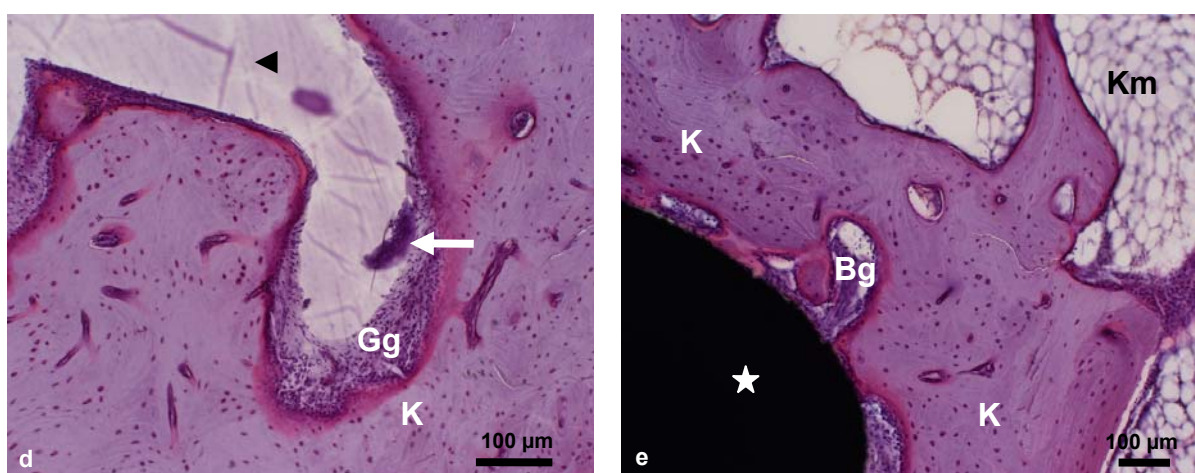
- (e) Am Interface der Schraube (*) befindet sich mineralisiertes Knochengewebe (Kg). (Knochenschliff, HE)
 (f) Detailaufnahme des Interface Schraube. Am Bindegewebe (Bg) schließt sich ein Saum von Osteoblasten (Ob), die Osteoid (Oi) produzieren. Eingemauerte Osteozyten (→). (Semidünnschnitt, HE)

Abb. 33 Implantatinterface 84d P/S

- (a) Die ehemalige Osteotomie (→) ist auf der Gelenkfläche des Femurs nur noch als feine Naht zu erkennen.
 (b) Angeschnitten sind die Schraube (*) und der Sonic Pin (◄).



- (c) Das Interface des Sonic Pins (◄) besteht vorwiegend aus Knochenmark (Km). (Knochenschliff HE)



- (d) Am Interface des erstarrten Teils des Sonic Pins (◄) sind Granulationsgewebe (Gg), Makrophagen (◄) und mineralisierte Knochenmatrix (K) lokalisiert. (Knochenschliff HE)
 (e) Am Interface der Schraube (*) bei einem anderen Tier der P/S Gruppe befindet sich mineralisierte Knochenmatrix (K), Knochenmark (Km) und in den Erosionslakunen Bindegewebe (Bg). (Knochenschliff HE)

Zusammenfassend waren die Unterschiede zwischen dem Sonic Pin und der Schraube zu den verschiedenen Standzeiten sehr gering (Tab. 6), bewertet nach den qualitativ definierten Kriterien für die knöchernen Integration (Tab. 7).

Standzeit	Gruppe	Tier	Sonic Pin	Schraube	K-Draht
7d	KD/S	3		++	+
		2		+	+
		4		+	+
		7*		+	+
	P/S	18	++	+	
		27	++	+	
		10	+	+	
		21	+	+	
23		+	+		
12		+	+		
21d	KD/S	5		+	-
		6		+	-
	P/S	11	++	++	
		20	++	++	
		16	++	++	
		17	++	++	
		19	+	++	
15	+	+			
42d	KD/S	28		++	++
		29		++	+
		30		+	+
		32	+++	+++	
		34	+++	+++	
		35	+++	+++	
	P/P	36	+++	+++	
		61	++	++	
		62	++	++	
		68	++		
		49	++		
		52	++		
		66	++		
65	+				
47	+				
84d	KD/S	9		+++	++
		8		+++	++
		1		+++	-
	P/S	13	+++	+++	
		14	+++	+++	
		22	+++	+++	
		25	+++	+++	
		24	++	+++	
26	++	++			

Tab. 6 Zusammenstellung zur knöchernen Integration der Osteosynthesematerialien
 *Tier 7 vorgesehen für die 21d Standzeit musste wegen allgemeinen gesundheitlichen Problemen frühzeitig nach 7d euthanisiert werden.

Wertung	Kriterien
-	Das Osteosynthesematerial ist im Gewebe instabil verankert und von Bindegewebe umgeben.
+	Das Osteosynthesematerial ist von Granulationsgewebe, Knochenfragmenten und teilweise hypertrophen Knorpel umgeben.
++	Am Osteosynthesematerial sind neu gebildete Knochen trabekeln angelagert.
+++	Das Osteosynthesematerial ist von einer Manschette aus mineralisiertem Knochen umgeben.

Tab. 7 Kriterien zur Bewertung der knöchernen Integration der Implantate

Im Gegensatz dazu schien der K-Draht, zu den späteren Beobachtungszeitpunkten, schlechter als die Schrauben und der Sonic Pin eingebaut.

Das Knochenremodelling in der P/P Gruppe 42d postoperationem schien lichtmikroskopisch leicht verzögert, da hier bei keinem Tier bereits eine Manschette von mineralisiertem Knochen befundet werden konnte. Allerdings war diese Verzögerung zum späteren Zeitpunkt nicht mehr feststellbar. Bei allen Proben mit 84d Standzeit unterschied sich der Bereich der ehemaligen Osteotomie kaum von der umgebenden Spongiosa (Tab. 6).

Die lichtmikroskopischen Befunde bestätigten die physiologisch zu erwartenden Stadien des Knochenremodellings.

4.2.4 Resorptionsverhalten am Sonic Pin

Ein wichtiger Aspekt dieser Arbeit war die Beurteilung des Resorptionsverhaltens des Polylaktids. Hierfür standen alle Gruppen, mit implantierten Sonic Pins (P/S und P/P Gruppe) zur Verfügung. Anzumerken ist zu dieser Untersuchung, dass bei den Tieren mit einer 7d Standzeit die Makrophagen aufgrund ihrer geringen Größe und Anzahl nur in den Semidünnschnitten beobachtet wurden.

Nach 7d Standzeit waren die Sonic Pins meist von Granulationsgewebe mit vereinzelt auftretenden Makrophagen umgeben (Abb. 34a, b). Die Makrophagen

lagen teilweise vollständig im Polylaktidmaterial (Abb. 34c, d). In der näheren Umgebung des Sonic Pins wurden Knochenfragmente, bedingt durch die Implantation, Knochenmark und erste neugebildete Knochen trabekel gefunden (Abb. 34e).

Bei der 21d Standzeit umgab eine fast zusammenhängende Knochenmanschette den Sonic Pin (Abb. 35a). Eine vermehrte Anzahl von Makrophagen lag am sehr gefäßreichen Granulationsgewebe und ragte teilweise ins Polylaktid hinein (Abb. 35b, c, d). Teilweise waren Makrophagen und Lymphgefäße zwischen dem Sonic Pin und dem Knochengewebe lokalisiert (Abb. 35e, f).

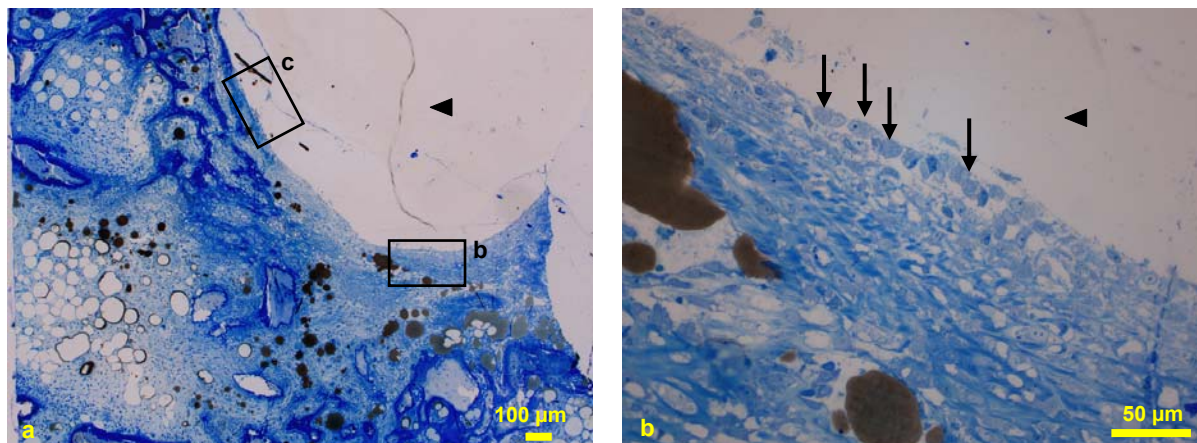
In den 42d Gruppen war an den Sonic Pins meist gefäßreiches Knochenmark lokalisiert. Ein schmaler Bindegewebering lag zwischen dem Knochenmark und dem Polylaktid (Abb. 36a). Es konnte eine deutliche Zunahme in der Zahl der vielkernigen, großen Makrophagen insbesondere am erstarrten Bereich des Sonic Pins beobachtet werden (Abb. 36a, c, d). Die Makrophagen ragten teilweise ins Polylaktid hinein (Abb. 36d) oder waren vollständig vom Polylaktid umgeben (Abb. 36e, f).

Zum 84d Zeitpunkt war der Sonic Pin von rotem Knochenmark und neuen Knochen trabekeln umgeben (Abb. 37a). An der Pinsubstanz und insbesondere dort am erstarrten Bereich fanden sich eine sehr große Anzahl von Makrophagen (Abb. 37b), die entweder im Bindegewebe auftraten (Abb. 37c, d) oder direkt ins Polylaktid eindrangen (Abb. 37e, f).

Zusammenfassend traten Makrophagen bereits 7d nach der Operation am Polylaktid vereinzelt auf. Nach 21d waren vermehrt vielkernige Makrophagen zu finden, die bei der 42d Standzeit mit einer deutlichen Steigerung zu beobachten waren und die auch bei 84d noch mit gleicher Intensität vorzufinden waren.

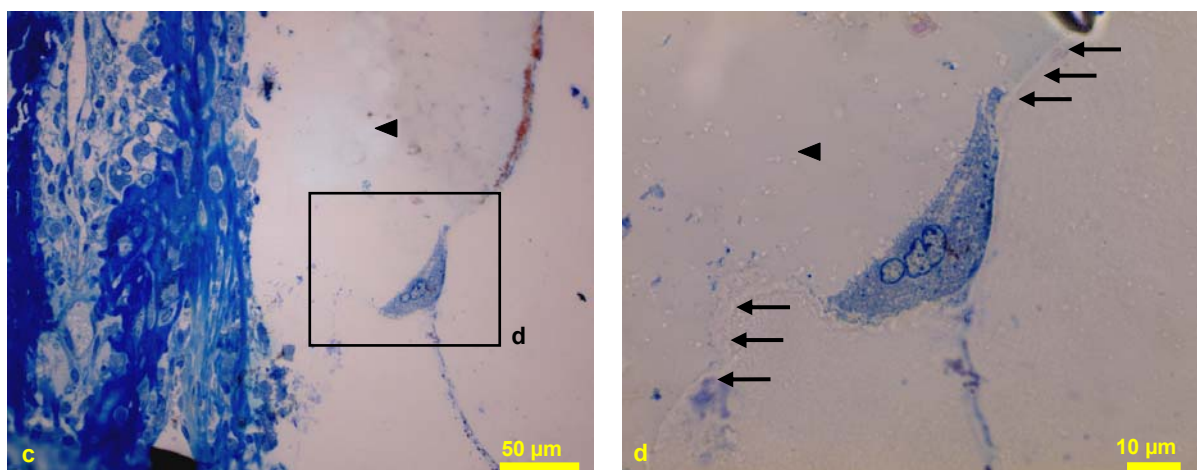
Der erstarrte Bereich des Sonic Pins schien von den Makrophagen zu allen Standzeiten besonders bevorzugt zu sein. Da durch das USS eine relativ große Kontaktfläche im erstarrten Bereich des Sonic Pins entsteht, können sich dort vermutlich viele Zellen anlagern und eindringen.

Der Sonic Pin zeigte bei allen Tieren und zu allen Standzeiten lichtmikroskopisch eine gute gewebeverträgliche Integration.

Abb. 34 Resorption / Sonic Pin 7d post operationem

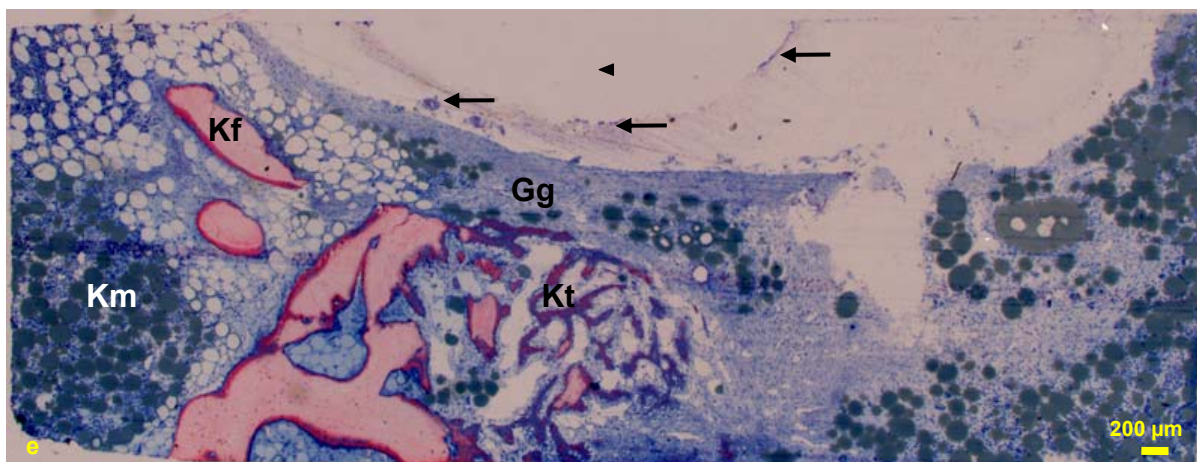
(a) Interface des Sonic Pins (◄) am erstarrten Bereich. (Semidünnschnitt, TB)

(b) Direkt anliegend am Poly(laktid)material des Sonic Pins (◄) befinden sich Makrophagen (↓). (Semidünnschnitt, TB)



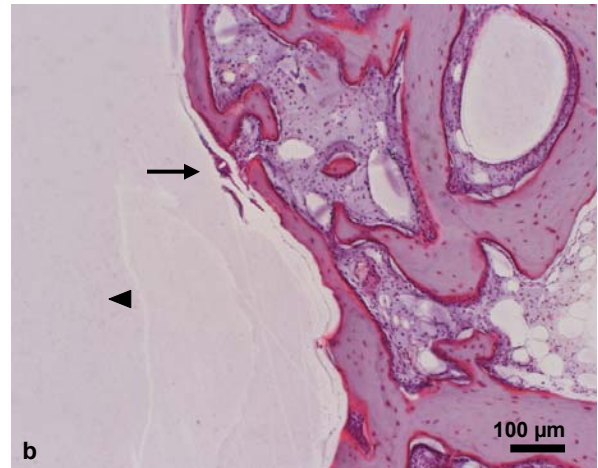
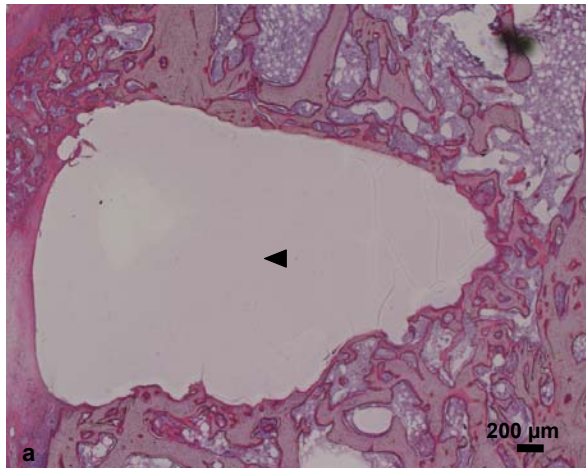
(c) Ein mehrkerniger Makrophage (Rahmen d) befindet sich im Material des Sonic Pins (◄). (Semidünnschnitt, TB)

(d) Detailaufnahme des mehrkernigen Makrophagen. Auffällig ist die scharfe Grenze im Pinmaterial (←). (Semidünnschnitt, TB)

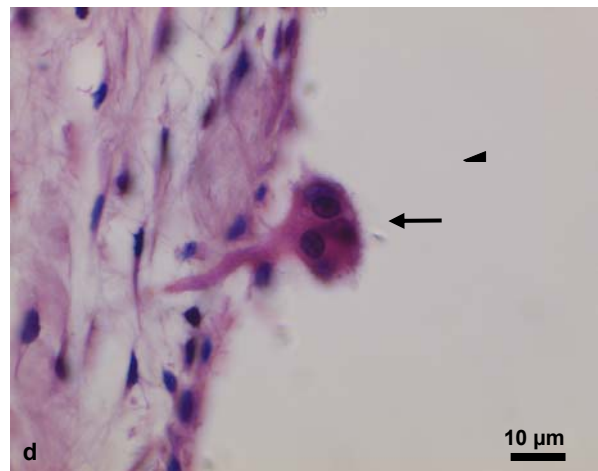
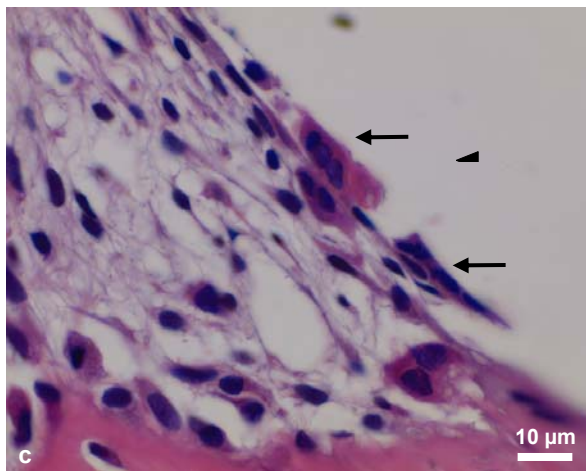


(e) Am Interface des Pins ist Granulationsgewebe (Gg) lokalisiert, dem in Richtung Sonic Pin (◄) Makrophagen (←) aufgelagert sind. In der Umgebung des Pins sind fettreiches Knochenmark (Km), Knochenfragmente (Kf) und neu gebildete Knochen trabekel (Kt) zu beobachten. (Semidünnschnitt, TB)

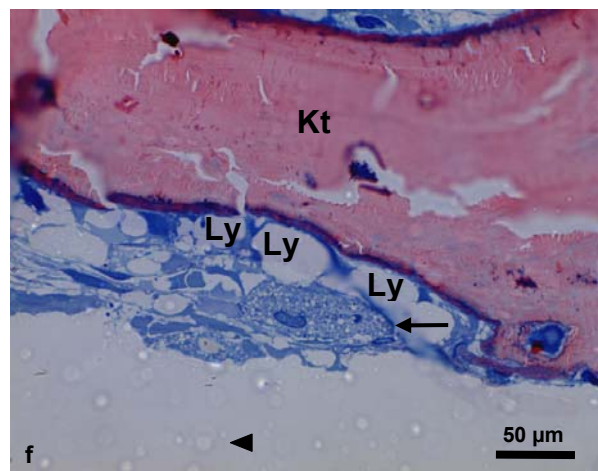
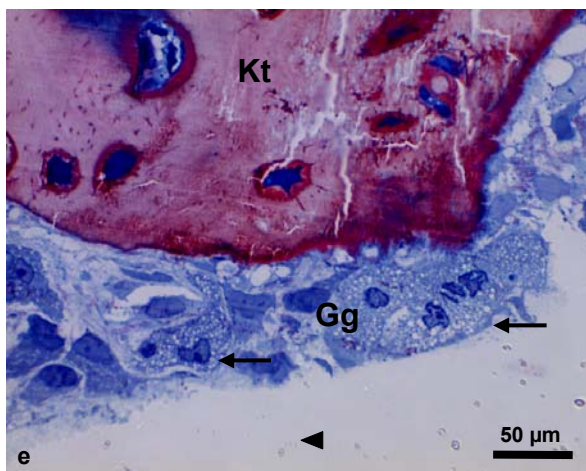
Abb. 35 Resorption / Sonic Pin 21d postoperationem



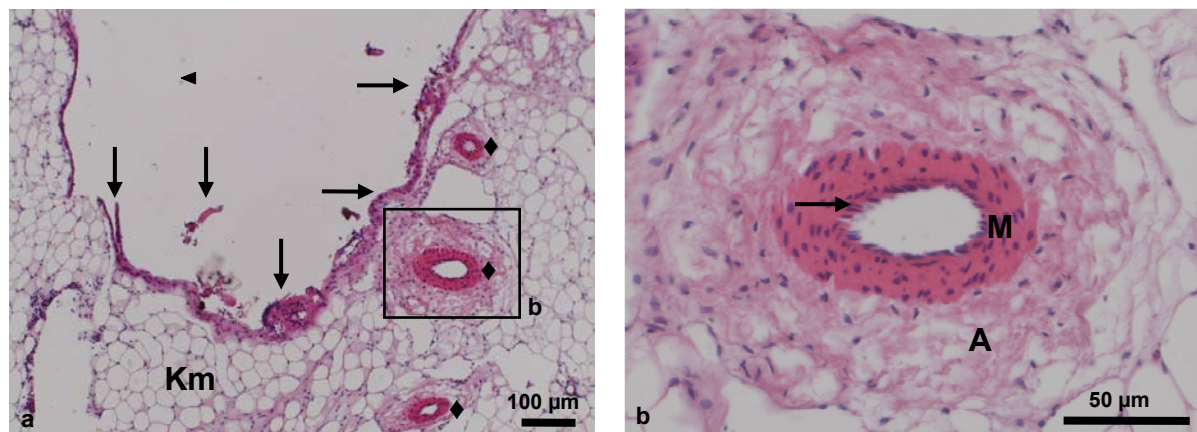
- (a) Der Sonic Pin (◄) ist fast vollständig von Knochengewebe umgeben. (Knochenschliff, HE)
 (b) Vereinzelt finden sich am Implantatinterface Makrophagen (→), die in den Sonic Pin (◄) hineinragen. (Knochenschliff, HE)



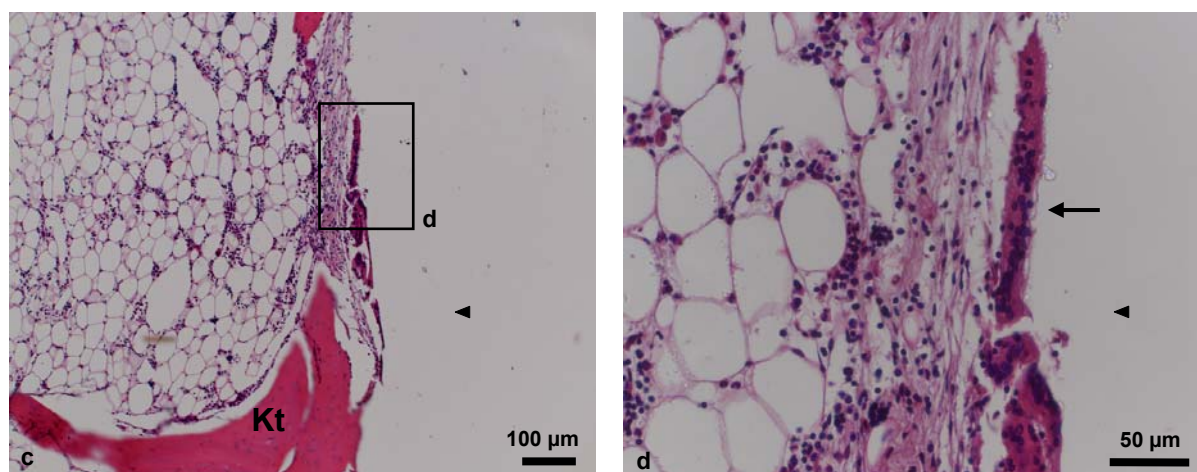
- (c) Das sehr gefäßreiche Granulationsgewebe am Interface des Sonic Pins (◄) zeigt mehrkernige Makrophagen (←). (Parafinschnitt, HE)
 (d) Dabei ragen vereinzelt mehrkernige Makrophagen (←) pilzförmig in den Sonic Pin (◄) Bereich. (Parafinschnitt, HE)



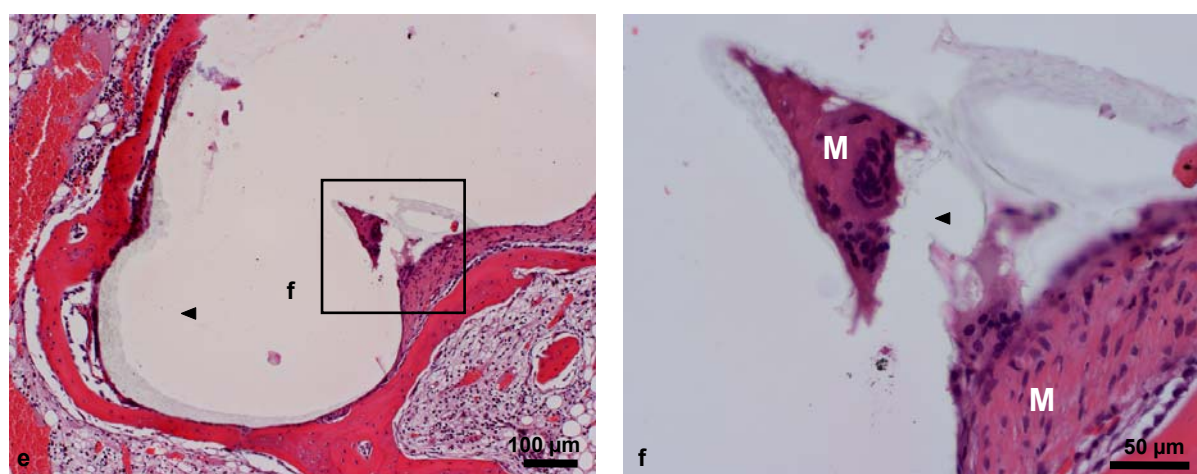
- (e) Zwischen den Knochentrabekeln (Kt) und dem Sonic Pin (◄) finden sich im Granulationsgewebe (Gg) eine Vielzahl von mehrkernigen Makrophagen (←) mit blasigen Vakuolen. (Semidünnschnitt, TB)
 (f) Zwischen Knochengewebe (Kt) und Sonic Pin (◄) liegen Makrophagen (←) und einige Lymphgefäße (Ly). (Semidünnschnitt, TB)

Abb. 36 Resorption / Sonic Pin 42d postoperationem

- (a) Der Sonic Pin (◄) wird im erstarrten Bereich von gelbem Knochenmark (Km) umgeben, das durch einen schmalen Ring aus Bindegewebe und Makrophagen (→) vom Pin getrennt ist. Im Knochenmark liegen mehrere Gefäße (◆). (Paraffinschnitt HE)
- (b) Detailaufnahme eines Gefäßes, deutlich zu erkennen ist die Media (M) mit ihrem Endothel der Intima (→) und die Adventitia (A). (Paraffinschnitt HE)

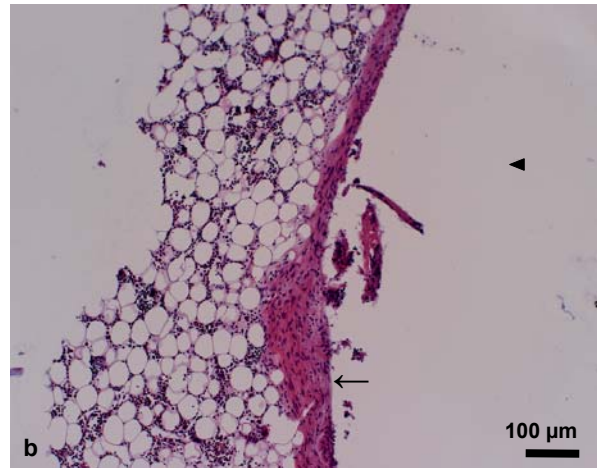
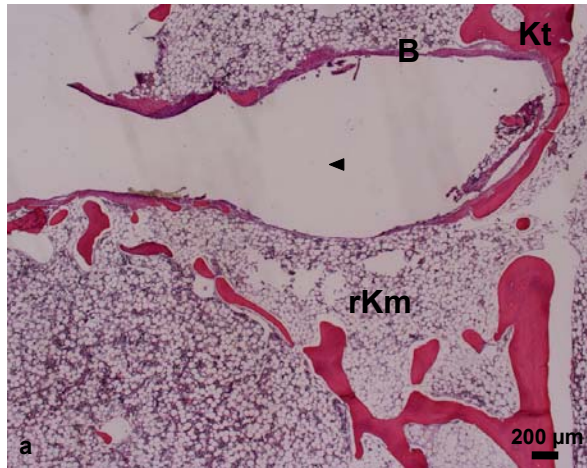


- (c) Am Interface des Sonic Pin (◄) befinden sich auch Knochenstrabekel (Kt). (Paraffinschnitt HE)
- (d) Die Makrophagen (←) am Sonic Pin (◄) enthalten sehr viele Zellkerne. (Paraffinschnitt HE)

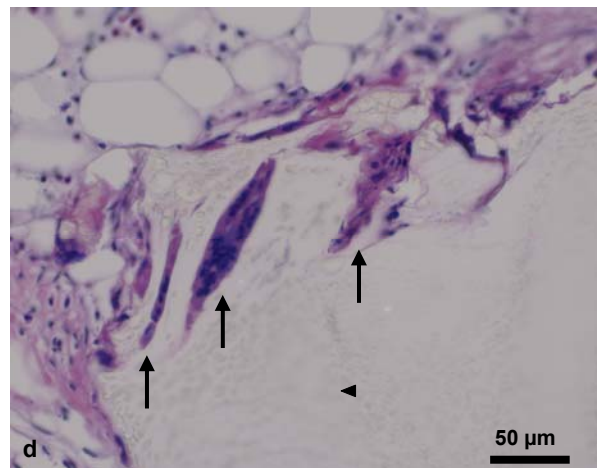
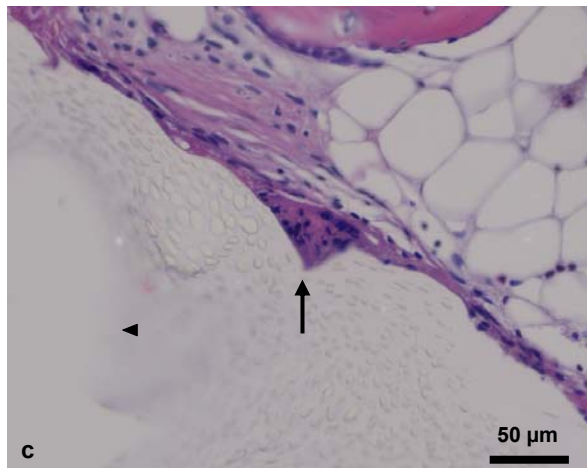


- (e) In der erstarrten Pinsubstanz (◄) ist ein großer mehrkerniger Makrophage (Rahmen f) lokalisiert. (Paraffinschnitt HE)
- (f) Das Sonic Pin Material (◄) wird von den beiden Makrophagen (M) eingeschlossen. (Paraffinschnitt HE)

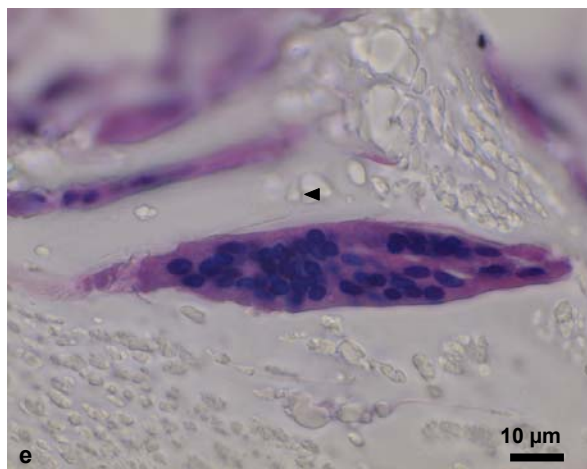
Abb. 37 Resorption / Sonic Pin 84d postoperationem



- (a) Am Interface des Sonic Pins (◄) befindet sich überwiegend rotes Knochenmark (rKm) und Knochen trabekel (Kt). Der erstarzte Bereich des Sonic Pin Materials (◄) ist teilweise durch Bindegewebe (B) vom Knochenmark getrennt. (Paraffinschnitt HE)
- (b) Zwischen dem Bindegewebe und der Pinsubstanz (◄) befinden sich große, vielkernige Makrophagen (←). (Paraffinschnitt HE)



- (c, d) Am Interface der Sonic Pins (◄) befinden sich große mehrkernige Makrophagen (↑), die teilweise bis in die Pinsubstanz hinein ragen. (Paraffinschnitt HE)



- (e, f) Detailaufnahme der Makrophagen im Sonic Pin Material (◄). (Paraffinschnitt HE)

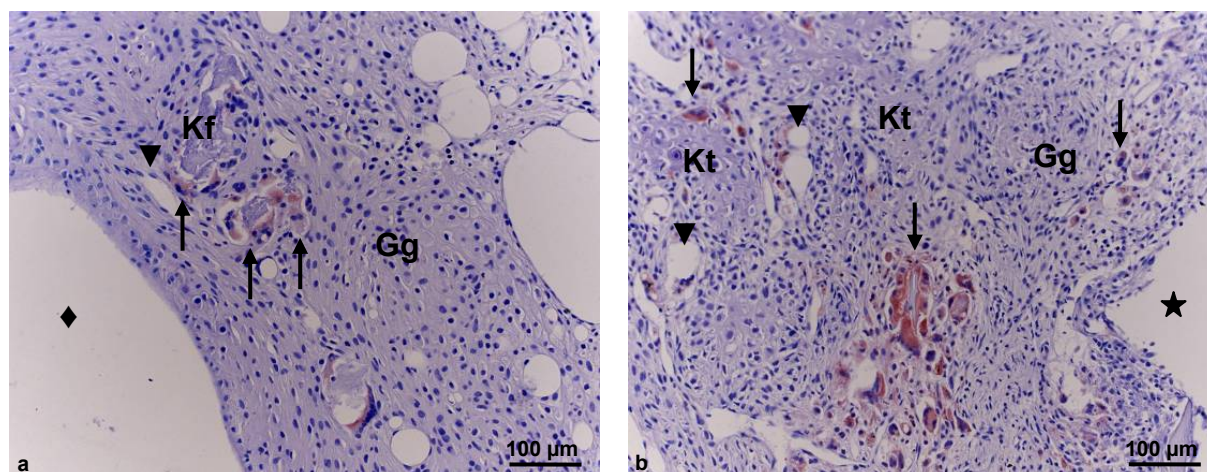
4.3 Immunhistochemie

Mit Hilfe der immunhistochemischen Methoden wurden die lichtmikroskopischen Befunde in Bezug auf die Lokalisation von Makrophagen, Osteoblasten und einsprießenden Gefäßen bestätigt.

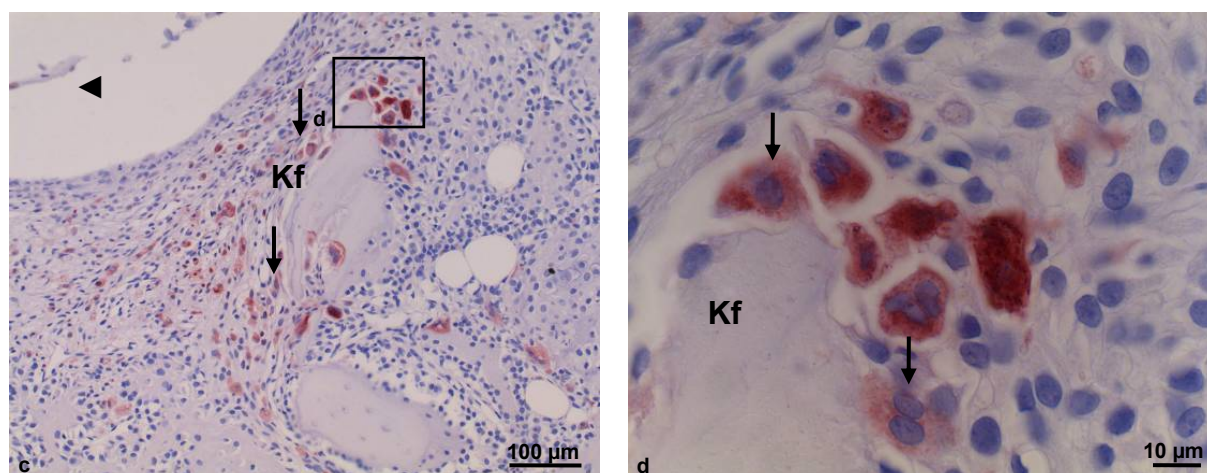
Cluster of Differentiation 68 (CD68)

Resorbierende Zellen wurden durch einen Antikörper gegen das CD68 mittels Immunhistochemie markiert. [Strobl, H et al; 1995]. Im Folgenden werden die einzelnen Implantatinterfaces zu den verschiedenen Standzeiten analysiert.

Abb. 38 CD68-Immunmarkierung 7d. (Paraffinschnitte Ht)



- (a) KD/S Gruppe - Im Granulationsgewebe (Gg) im Umkreis des K-Drahts (♦) werden CD68 positive Zellen (↑) gefunden, bei denen es sich um Makrophagen handelt, die die Knochenfragmente (Kf) abbauen. Im Granulationsgewebe (Gg) befinden sich mehrere Blutgefäße (▼).
- (b) KD/S Gruppe - CD68 positive Zellen (↓) in der Nähe des Schraubenloches (*) an neu gebildeten Knochen trabekeln (Kt), Granulationsgewebe (Gg) und häufig in der Nähe von Gefäßen (▼).

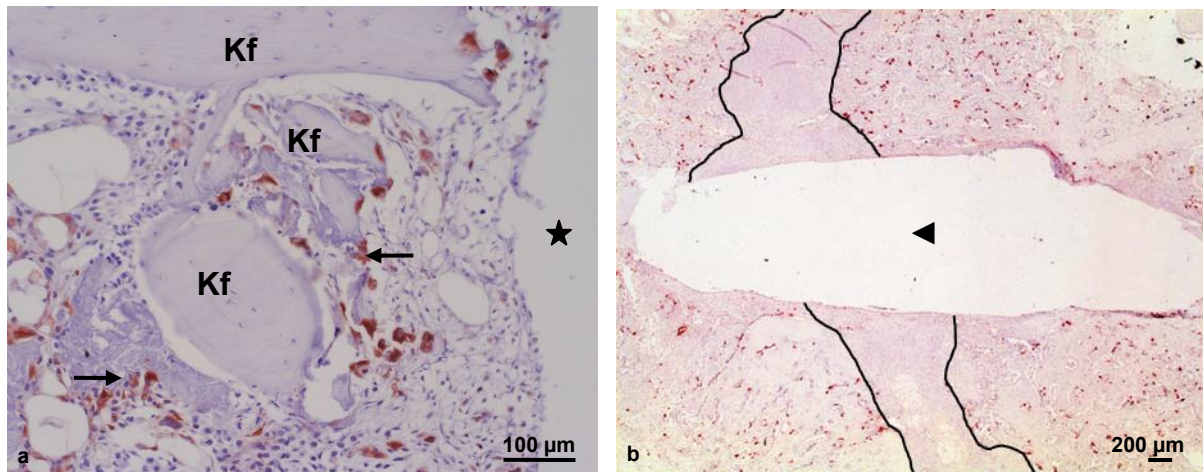


- (c) P/S Gruppe - An den Knochenfragmenten (Kf) im Umkreis des Sonic Pins (◄) sind CD68 positive Zellen (↓).
- (d) P/S Gruppe - Osteoklasten (↓) bauen ein Knochenfragment (Kf) ab.

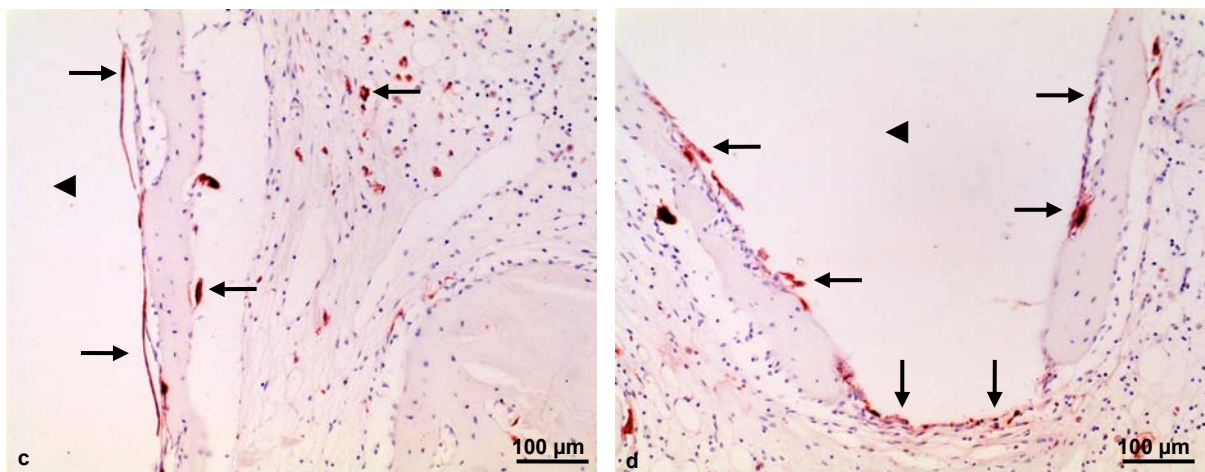
Bei den Tieren mit einer Standzeit von 7d konnten in der näheren Umgebung bei allen verwendeten Osteosynthesematerialien viele CD68 immunmarkierte Zellen beobachtet werden (Abb. 38). Bei den Zellen handelte es sich um Osteoklasten und Makrophagen (Abb. 38 c, d).

Direkt am Interface des Pins, der Schraube oder des K-Drahtes wurden zum 7d Zeitpunkt keine CD68 immunpositive Zellen befundet.

Abb. 39 CD68-Immunmarkierung 21d (Paraffinschnitte Ht)



- (a) P/S Gruppe - Die Schraube (*) wird von Knochen trabekeln umgeben, zwischen denen sich Bereiche mit Knochenfragmenten (Kf) befinden. Hier werden viele CD68 positive Zellen (←) beobachtet.
 (b) P/S Gruppe - Der Sonic Pin (◄) wurde im Bereich der Osteotomie (Markierung) geschnitten. Die Osteotomie ist mit hypertrophem Knorpelgewebe gefüllt und weist keine CD68 positiven Zellen auf.



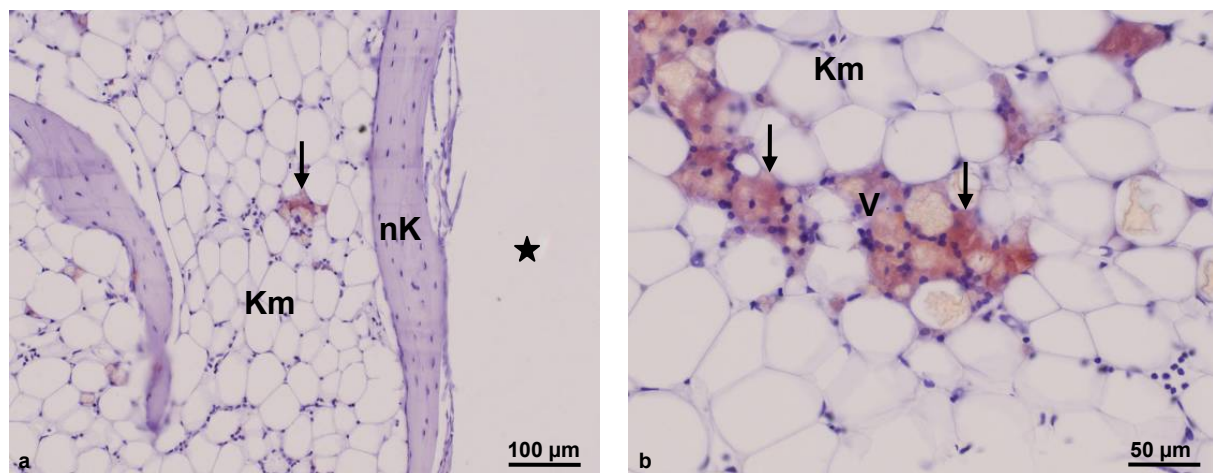
- (c) P/S Gruppe - Teilweise sind die CD68 immunpositiven Zellen (←) am Interface des Sonic Pins (◄) sehr dünn und langgestreckt und im mineralisierten Knochen zu finden.
 (d) P/S Gruppe - Am erstarrten Bereich des Sonic Pins (◄) ist das Interface mit CD68 immunpositiven Zellen (←) gesäumt.

Auch bei den Tieren mit einer Standzeit von 21d konnten direkt am Interface der Schraube und des K-Drahts keine CD68 positive Zellen lokalisiert, allerdings waren

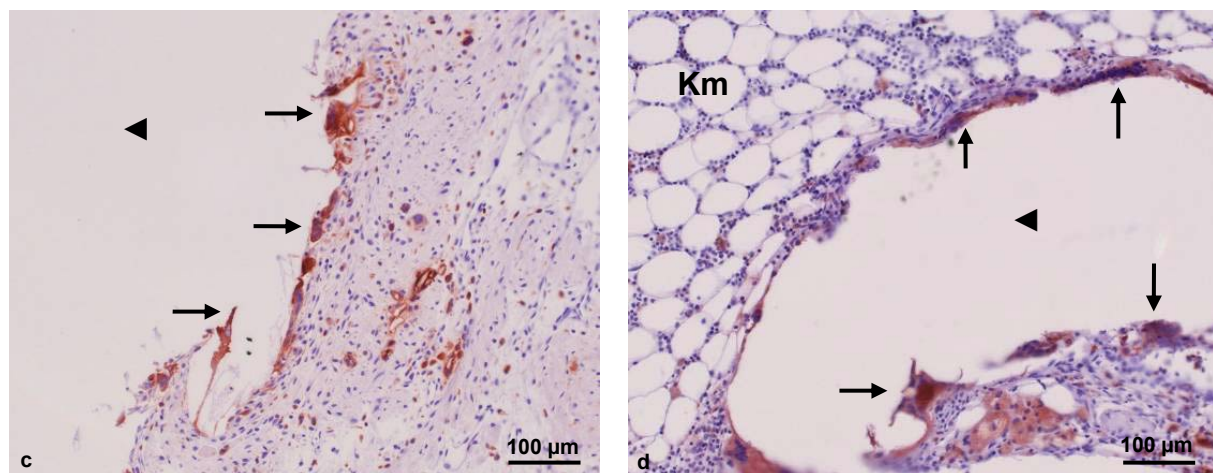
in der Umgebung der Schraube und des K-Drahts, vor allem an den Knochenfragmenten und im Granulationsgewebe CD68 positive Zellen. (Abb. 39a).

An den Sonic Pins traten häufig Makrophagen auf, die teilweise ins Pinmaterial eindringen und sehr flach und lang waren (Abb. 39c). Direkt am Interface und hier vor allem am erstarrten Bereich des Polylaktids waren sehr viele Makrophagen aufzufinden (Abb. 39d).

Abb. 40 CD68-Immunmarkierung 42d und 84d (Paraffinschnitte Ht)



- (a) 84d P/S Gruppe - In der Umgebung der Schraube (*) sind CD68 positiven Zellen (↓) im hellen Knochenmark (Km) lokalisiert. Unmittelbar angrenzend an der Schraube befindet sich neuer Knochen (nK).
 (b) 84d P/S Gruppe - Im Knochenmark (Km) sind Makrophagen (↓) lokalisiert, die im Cytoplasma Vesikel (V) mit hellem schaumig aussehenden Inhalt enthalten und über einige Zellkerne verfügen.



- (c) 42d P/P Gruppe - Am Interface des Pins (◄) befinden sich viele Makrophagen (→), die teilweise ins Material hineinragen.
 (d) 84d P/S Gruppe - Zwischen dem hellen Knochenmark (Km) und der Pinsubstanz (◄) befinden sich viele flache Makrophagen (→).

Bei den Tieren mit einer Standzeit von 42d und 84d wurden noch mehr CD68 immunpositive Zellen am Interface des Pins beobachtet. Wie auch bei den 21d Tieren beobachtet, ragten die Makrophagen in das Pinmaterial hinein (Abb. 40c, d).

Wie bei den früheren Standzeiten traten CD68 immunpositive Zellen nur im Umkreis der Schraube und des K-Drahtes auf. Eine Ansammlung von großen Makrophagen konnte befundet werden, die in ihrem Cytoplasma viele Vesikel enthielten und dadurch einen schaumigen Eindruck vermittelten (Abb. 40a, b).

Osteocalcin

Zur Identifizierung der Osteoblasten in den verschiedenen Präparaten wurden die Zellen mit Osteocalcin markiert [Price, PA; 1985].

Am Interface des Sonic Pins ist nach 7d viel Granulationsgewebe mit Osteocalcin immunpositiven Zellen zu finden, bei denen es sich vermutlich um Osteoblasten-Vorläuferzellen handelt (Abb. 41a).

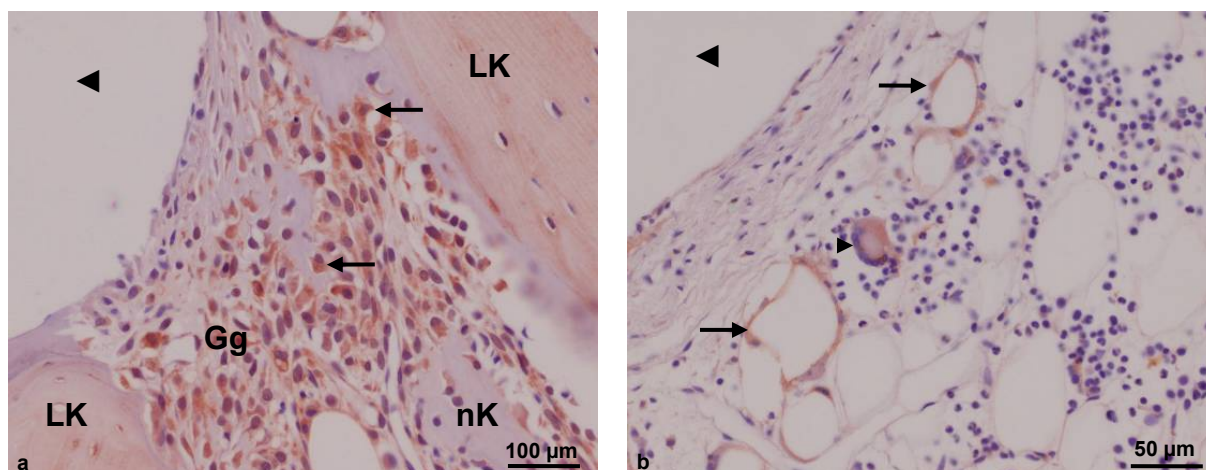
Osteocalcin markiert auch Makrophagen und Zellen im Bindegewebe (Abb. 41b).

Zwischen den Knochentrabekeln am Sonic Pin befinden sich Lakunen mit Granulationsgewebe, in denen Knochen neu gebildet wird. Am neu gebildeten Knochen sind Osteocalcin immunpositive Zellen lokalisiert, bei denen es sich um Osteoblasten handelt. Außerdem sind auch viele Osteoblasten-Vorläuferzellen positiv (Abb. 41c, d).

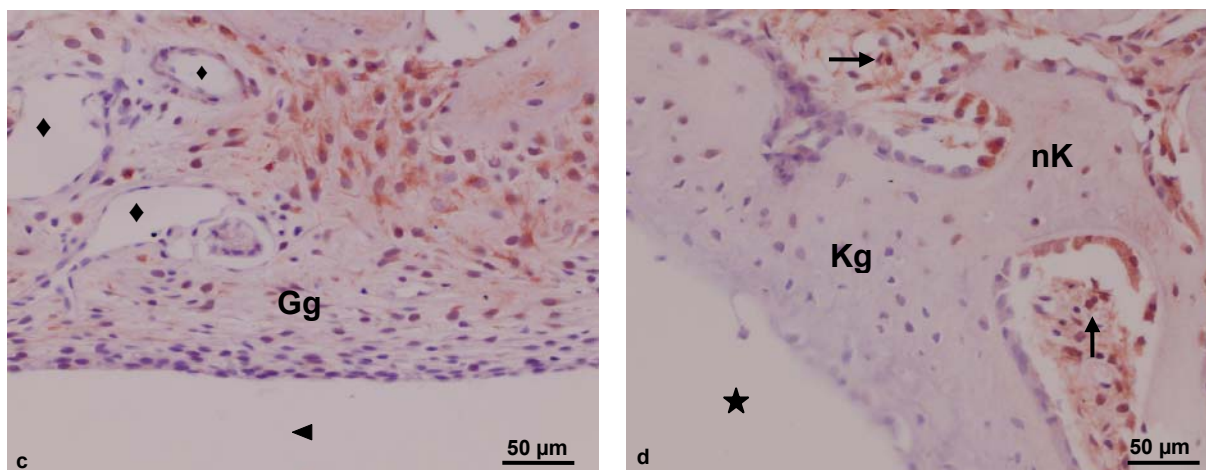
Nach 21d enthält das Granulationsgewebe im Interface der Implantate keine Osteocalcin immunmarkierten Zellen. Anschließend an das Granulationsgewebe sind neu gebildete Knochentrabekel lokalisiert, die von Osteocalcin immunpositiven Osteoblasten besetzt sind (Abb. 41c).

Auch bei den 42d Tieren sind direkt am Interface der Implantate keine Osteocalcin positiven Zellen zu beobachten. Das Interface wird von Granulationsgewebe und hypertrophem Knorpel gebildet.

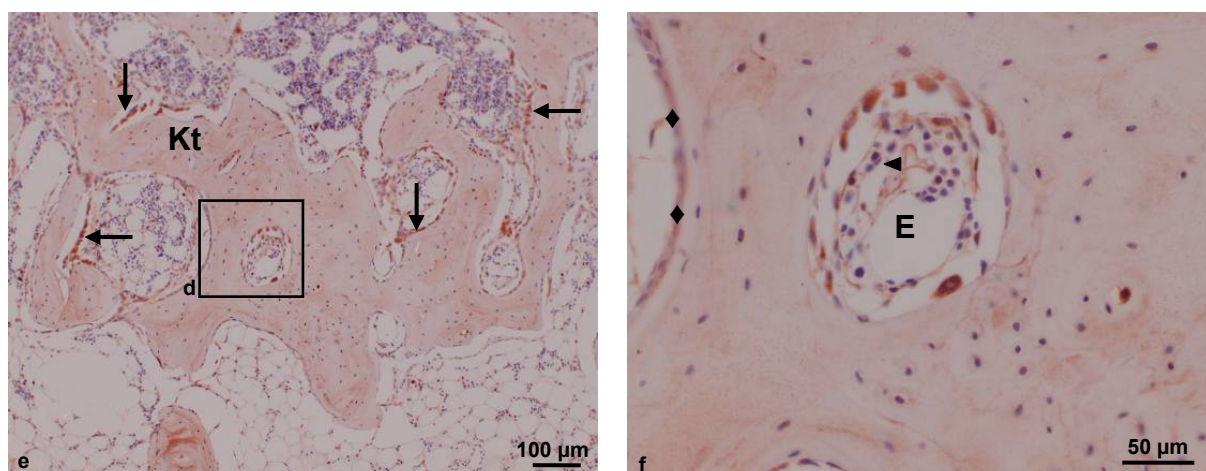
Der hypertrophe Knorpel geht in neu gebildete Knochenbälkchen über, die von Osteocalcin positiven Osteoblasten gesäumt sind. In den Erosionlakunen sind auch Osteocalcin positive Zellen zu beobachten (Abb. 41d).

Abb. 41 Osteocalcin-Immunmarkierung (Paraffinschnitte Ht)

- (a) 7d P/S Gruppe - Zwischen dem Lagerknochen (LK) am Sonic Pin (◄) befinden sich Lakunen mit Granulationsgewebe (Gg), in denen von Osteoblasten (→) neuer Knochen (nK) gebildet wird.
 (b) 7d P/S Gruppe – Im Bindegewebe befinden sich Osteocalcin positive Zellen (→), sowie Makrophagen (►).



- (c) 21d P/S Gruppe - Am Sonic Pin (◄) befindet sich Granulationsgewebe (Gg) mit zahlreichen Gefäßen (◆).
 (d) 42d P/S Gruppe - Am Interface der Schraube (*) geht das hypertrophe Knorpelgewebe (Kg) in neuen Knochen (nK) über. In den Erosionslakunen liegen immunpositive Osteoblasten-Vorläuferzellen (←).



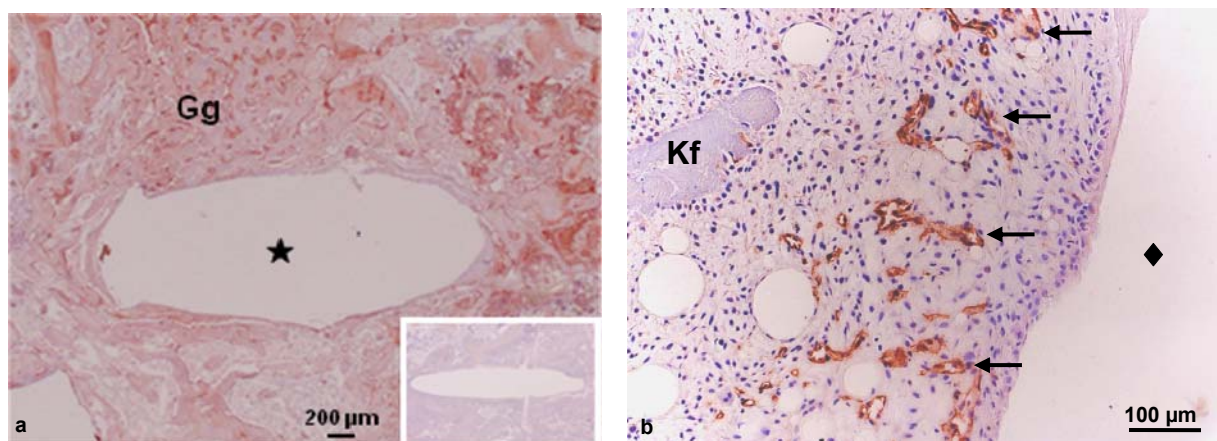
- (e) 84d P/S Gruppe - Osteotomiespalt. Die Knochentrabekel (Kt) von Osteoblasten (←) gesäumt.
 (f) 84d P/S Gruppe - In den Erosionslakunen (E) sind Osteoblasten-Vorläuferzellen (◄). Angrenzend befinden sich endostale Saumzellen (◆), sogenannte „Bone lining cells“ im Ruhestadium.

Nach 84d ist der Osteotomiespalt nur noch durch eine Anhäufung dichter Knochentrabekel zu erkennen. Die Knochentrabekel sind von Osteoblasten gesäumt (Abb. 41e). In den Erosionslakunen sind auch Ausläufer von Zellen aus dem Bindegewebe Osteocalcin positiv, bei denen es sich wahrscheinlich um Osteoblasten Vorläuferzellen handelt. An der Grenzschicht der Knochentrabekel wurden endostale Saumzellen, sogenannte Bone lining cells identifiziert (Abb. 41f).

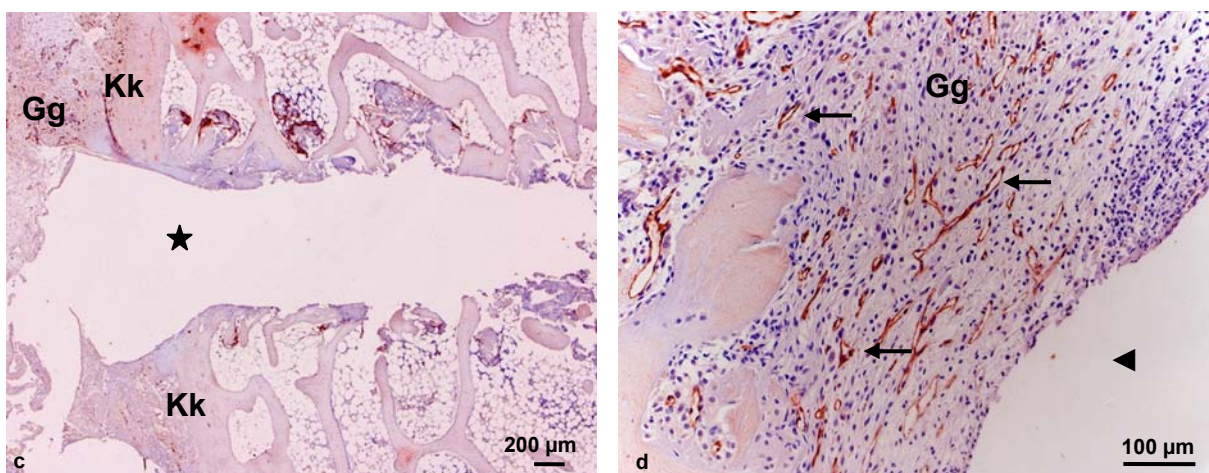
Platelet-Endothelial-Cell-Adhesion-Molecule-1 (Pecam)

Pecam markiert aussprossende Gefäße [Ilan, N et al; 1999]. Der Antikörper ist

Abb. 42 Pecam-Immunmarkierung 7d (Paraffinschnitte Ht)



- (a) Anschnitt der Schraube (*), die aufgrund mangelnder Osteotomiestabilisierung von Granulationsgewebe (Gg) umgeben wird. Kleines Bild: Präabsorptionskontrolle.
 (b) Der K-Draht (♦) wird von Granulationsgewebe umgeben, in dem viele Pecam-positive Gefäßanschnitte (←) sind. Knochenfragmente (Kf) liegen in der Umgebung.



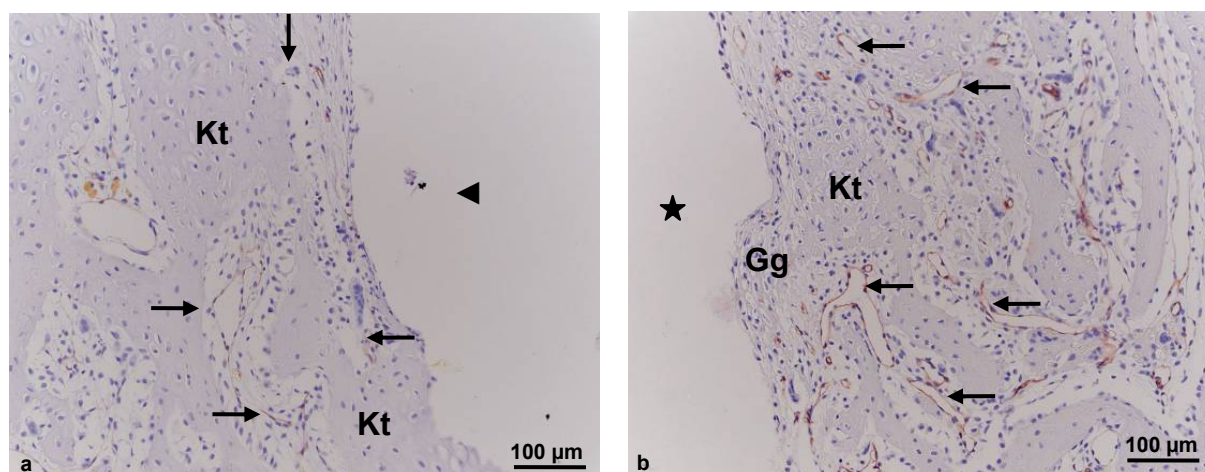
- (c) Die Schraube (*) wird vor allem von Knochenfragmenten umgeben. Im Bereich außerhalb der Kortikalis (Kk) wird auch Granulationsgewebe (Gg) angetroffen.
 (d) Am Interface des Sonic Pins (◄) befindet sich Granulationsgewebe (Gg), das viele Pecam-positive Gefäße (←) enthält.

spezifisch, wie durch exemplarisch dargestellte Präabsorptionskontrollen nachgewiesen wurde (Abb. 42a).

Bei den Tieren mit einer 7d Standzeit wurden viele Pecam-positive Gefäße beobachtet. Die Anzahl der immunpositiven Gefäße war am Interface des K-Drahtes (Abb. 42b) und des Sonic Pins (Abb. 42d) deutlich größer als am Interface der Schraube (Abb. 42c).

Die Anzahl der Pecam-markierten Gefäße verringert sich bereits bei den Tieren mit einer Standzeit von 21d am Interface K-Draht und Sonic Pin. Diese Reduktion korreliert mit dem geringeren Vorkommen von Granulationsgewebe und der zunehmenden Bildung von neuem Knochen am K-Draht und am Sonic Pin (Abb. 43a). Im Gegensatz dazu traten nun besonders viele Pecam-immunpositive Gefäße am Interface der Schraube, im dort nun verstärkt (im Vergleich zu den Tieren mit 7d Standzeit) vorkommenden Granulationsgewebe, auf (Abb. 43b).

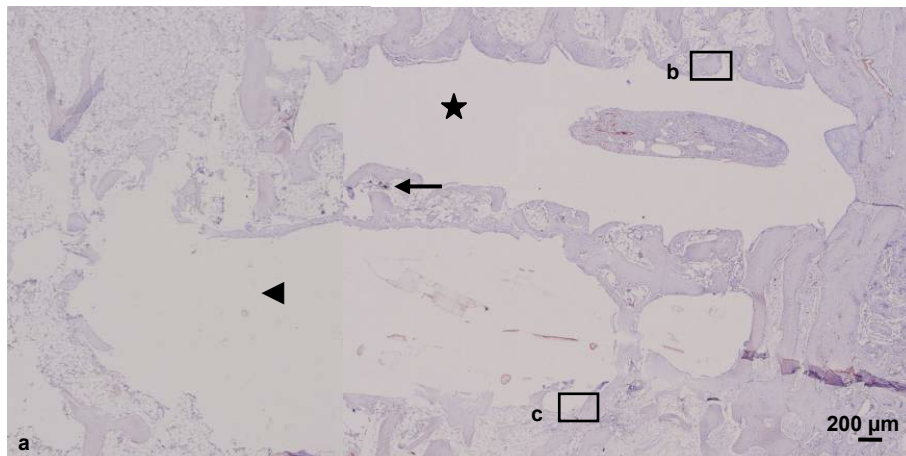
Abb. 43 Pecam-Immunmarkierung 21d (Paraffinschnitte Ht)



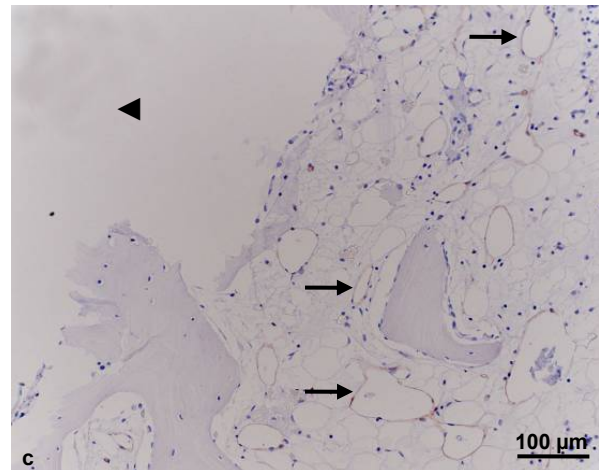
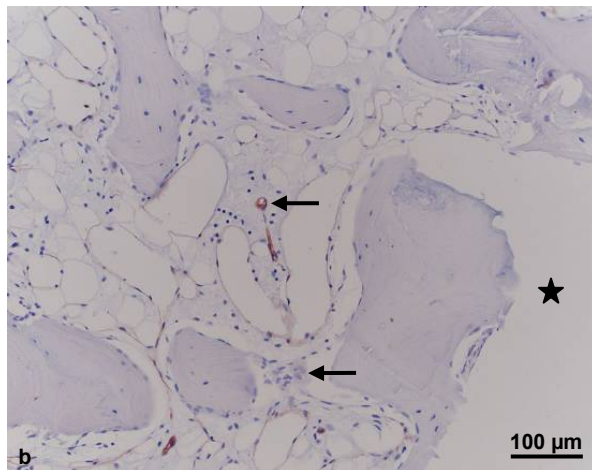
- (a) Am Interface des Sonic Pins (◄) sind vorwiegend neu gebildete Knochentrabekel (Kt) zu finden, zwischen denen einige neu gebildete Pecam positive Gefäße (←) vorkommen.
- (b) Die Schraube (*) ist von einer schmalen Schicht aus Granulationsgewebe (Gg) und anschließenden neu gebildeten Knochentrabekeln (Kt) umgeben. Zwischen den Knochentrabekeln im Granulationsgewebe (Gg) erkennt man viele Pecam immunreaktive Gefäße (←).

Bei den Tieren mit einer Standzeit von 42d nahm die Anzahl der Pecam-immunpositiven Gefäße weiter ab, was besonders bei der KD/S Gruppe und bei der P/S Gruppe deutlich wurde (Abb. 44a-c). Bei der P/P Gruppe war noch mehr Granulationsgewebe zu beobachten, in dem viele Pecam-positive Gefäße vorkommen (Abb. 44d, e).

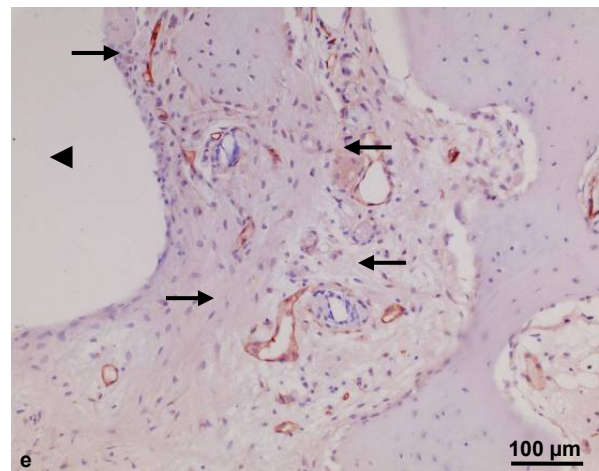
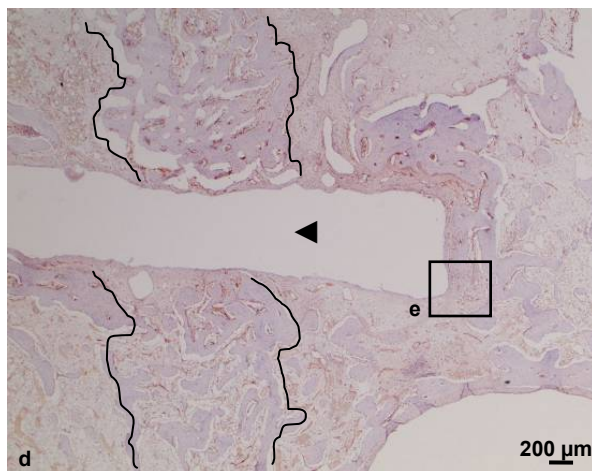
Abb. 44 Pecam-Immunmarkierung 42d (Paraffinschnitte Ht)



(a) P/S Gruppe - Sowohl am Interface der Schraube (*) als auch am Interface des Sonic Pins (◄) ist Knochengewebe zu beobachten. Im Bindegewebe zwischen den Knochenstrabekeln sind Pecam positive Gefäße (←) lokalisiert.



(b) P/S Gruppe - Sowohl im Bindegewebe am Interface der Schraube (*) als auch **(c)** im Bindegewebe um den Sonic Pin (◄) werden Pecam-immunmarkierte Gefäße (←) beobachtet.

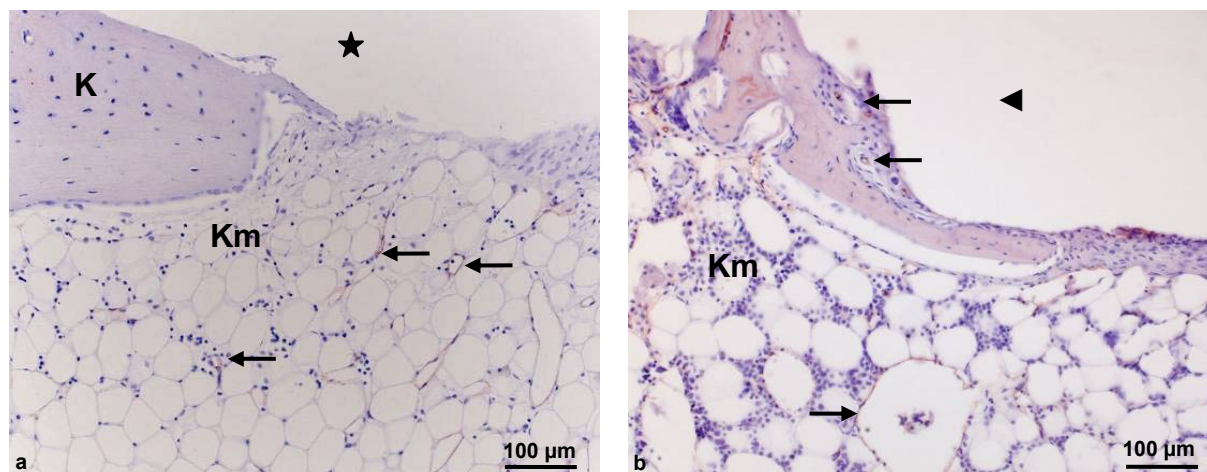


(d) P/P Gruppe - Anschnitt des Sonic Pins und der Osteotomie (Begrenzung).

(e) P/P Gruppe - Am Interface des Sonic Pins (◄) sind mehr Pecam-immunpositive Gefäße (←) zu beobachten als bei den anderen Gruppen.

Eine weitere Reduktion der Pecam-immunpositiven Gefäße wurde auch bei den Tieren mit einer Standzeit von 84d beobachtet, was damit korreliert, dass bei diesen Tieren kein Granulationsgewebe mehr vorkommt. Die Pecam-immunmarkierten Gefäße werden bei den 84d Tieren im Knochenmark (Abb. 45a) und im Bindegewebe in den Erosionslakunen (Abb. 45b) nachgewiesen.

Abb. 45 Pecam-Immunmarkierung 84d (Paraffinschnitte Ht)



- (a) P/S Gruppe - Anschnitt des Schraubenloches (*). Die Schraube wird von Knochengewebe (K) und Knochenmark (Km) umgeben. Im hellen Knochenmark am Interface der Schraube sind einige Pecam-immunpositive Gefäße (→) zu beobachten.
- (b) P/S Gruppe - Im Bindegewebe und Knochenmark (Km) am Interface des Sonic Pins (◄) sind einige Pecam-immunpositive Gefäße (←) zu beobachten.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass die Anzahl der Pecam-markierten Gefäße mit der Gewebeverteilung im Osteotomiespalt und um die Osteosynthesematerialien korreliert. Im anfänglichen gefäßreichen Granulationsgewebe treten viele Gefäße auf. Mit der fortschreitenden Osteotomieheilung (spätere Standzeiten) nehmen diese ab.

Aussprossende Blutgefäße wurden ebenfalls im Bindegewebe der Erosionslakunen und im Knochenmark gefunden.

4.4 Transmissionselektronenmikroskopie

Die TEM diente als ergänzende feingewebliche Untersuchungsmethode. Repräsentative Bilder aus den Untersuchungen zum Implantatinterface und zum Resorptionsverhalten des Sonic Pins wurden ausgewählt, um nachfolgend beschrieben und analysiert zu werden.

Implantatinterface

Im Transmissionselektronenmikroskop wurde zunächst das Interface der Schraube und des Sonic Pins und die Zellen des Knochenremodellings in der Umgebung dieser Implantate (Abb. 46a) bei der 7d Standzeit vergleichend untersucht.

In geringer Entfernung von der Schraube waren Osteoblasten, umgeben von neu gebildeten Kollagenfasern, lokalisiert (Abb. 46b). Osteoklasten phagozytierten Knochenfragmente (Abb. 46c) und im angrenzenden Gewebe lagen vereinzelt Makrophagen (Abb. 46d).

Vermutlich führte die Temperaturerhöhung durch den notwendigen Bohrvorgang zur Implantation der Schraube bei manchen Zellen zu Hitzenekrosen (Abb. 46b, d).

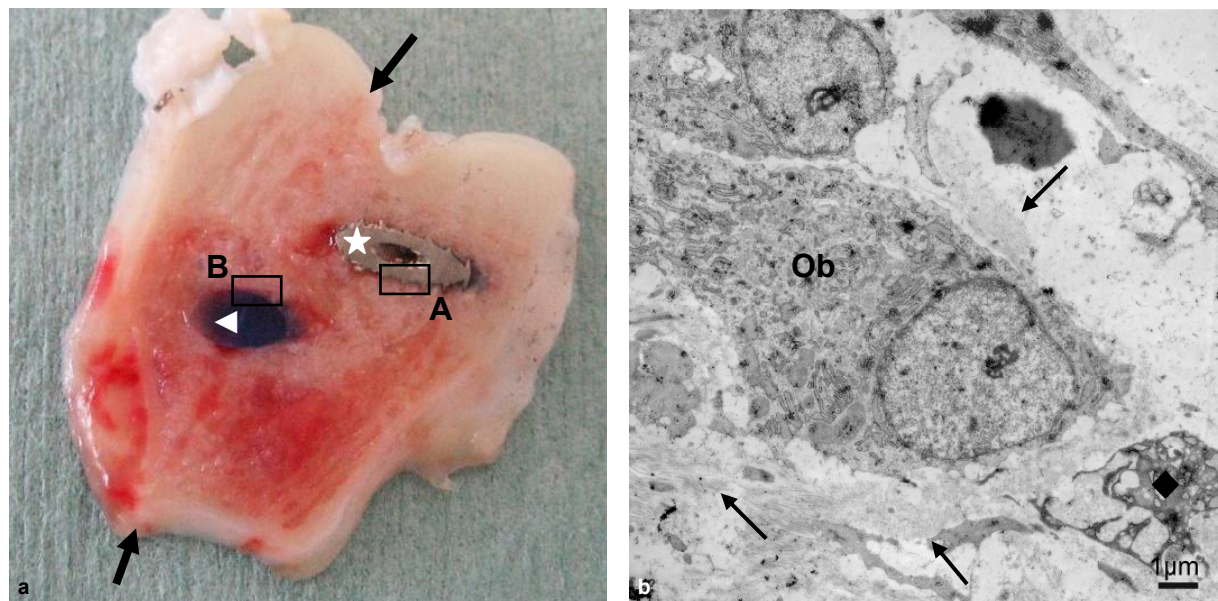
Manchmal lagen größere Teile des Polylaktids des Sonic Pins vereinzelt vor (Abb. 47a).

Ansonsten war das Erscheinungsbild beim Sonic Pin nach 7d ähnlich dem der Schraube. In der Nähe des Implantates befanden sich Osteoblasten (Abb. 47b) und es wurden einige absterbende Zellen, wahrscheinlich beschädigt durch die Temperaturerhöhung des Bohrens oder des USS während der Implantation (Abb. 47c).

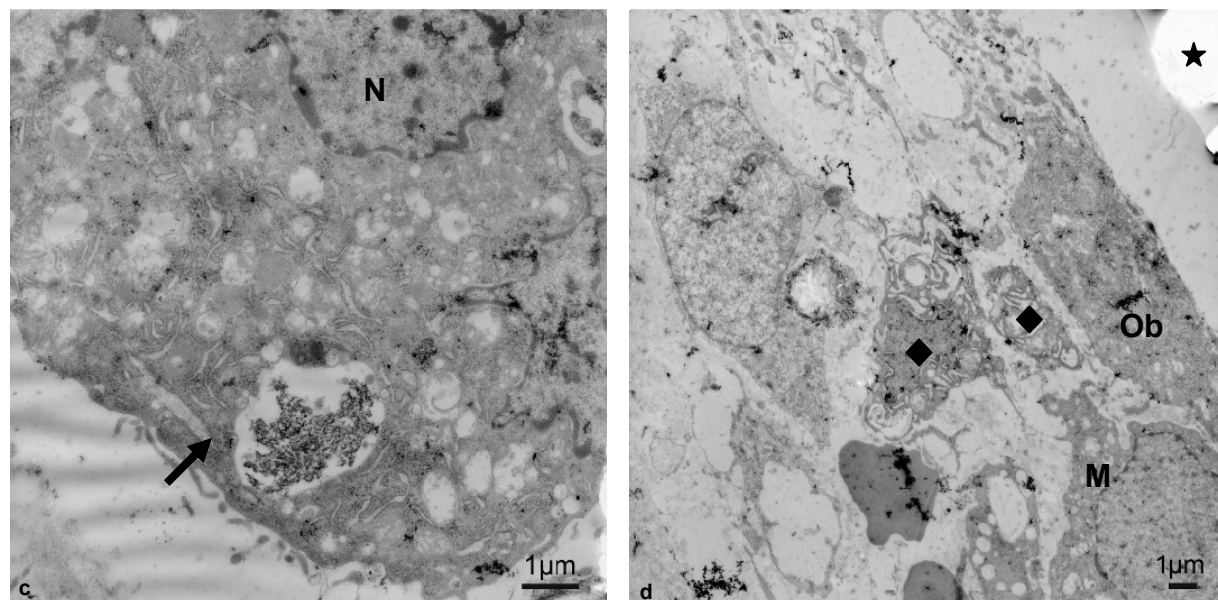
Zusätzlich befanden sich am Implantatinterface Makrophagen, insbesondere am erstarrten Bereich, die das Pinmaterial aufnahmen (Abb. 47d).

Da der Vergleich zwischen Schraube und Sonic Pin keine weiteren Erkenntnisse als die, die bereits lichtmikroskopisch gefunden wurden, ergab, wurde bei den weiteren Standzeiten auf diesen Vergleich verzichtet und der Schwerpunkt auf den Sonic Pin gesetzt.

Abb. 46 TEM 7d / Interface Schraube

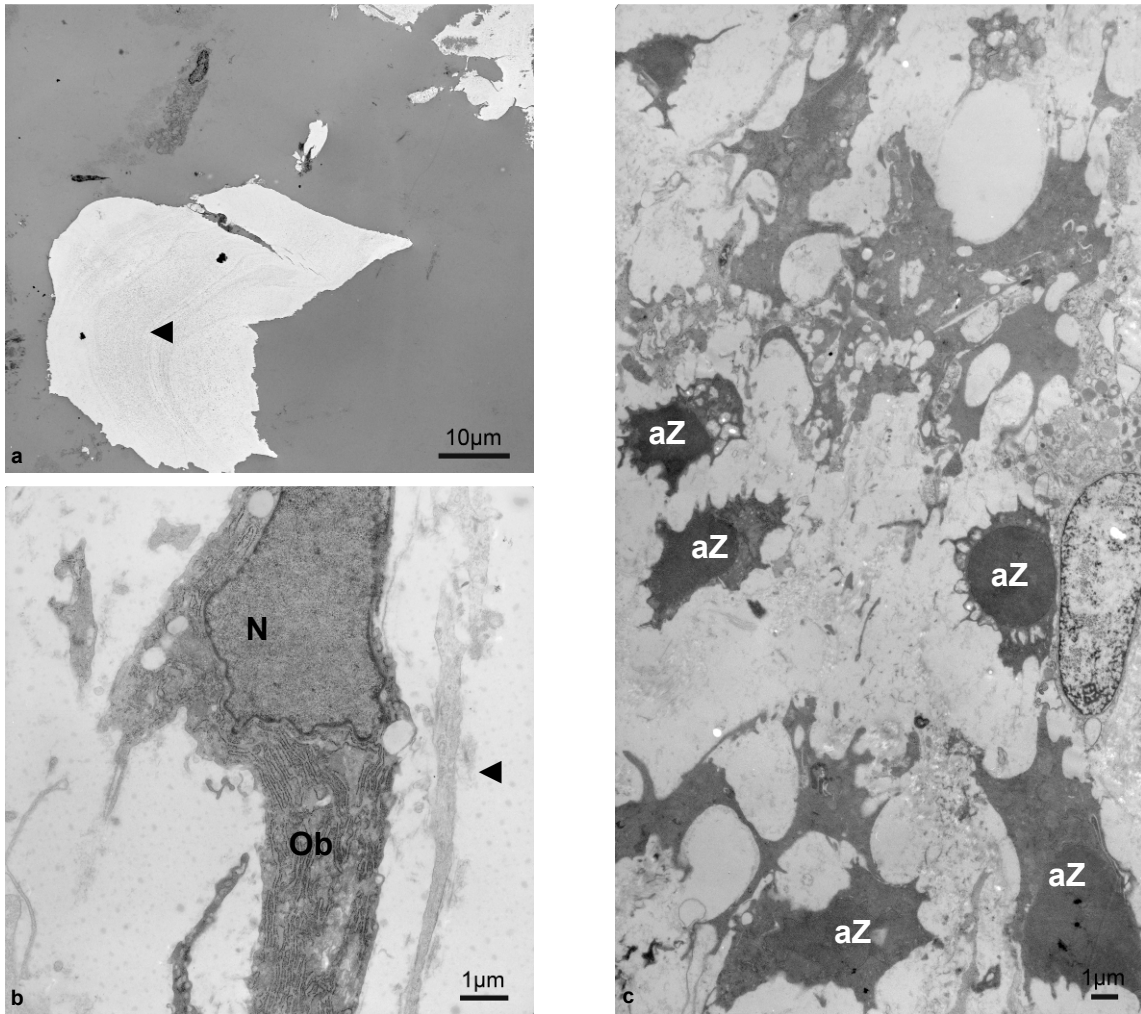


- (a) Makroskopie der verwendeten Scheibe mit der Schraube (*) und dem Sonic Pin (◄), die den Osteotomiespalt (↓) stabilisieren. A stellt den Bereich der Schraube (Abb. 46b, c, d) und B den Bereich des Pins (Details siehe Abb. 47) dar, die für die TEM angeschnitten wurden.
- (b) In geringer Entfernung zur Schraube befinden sich Osteoblasten (Ob), die von neugebildeten Kollagenfasern (→) umgeben sind. Weiterhin werden Zellen (◆) beobachtet, die eine Hitzenekrose zeigen, die wahrscheinlich durch das Bohren verursacht wurde.

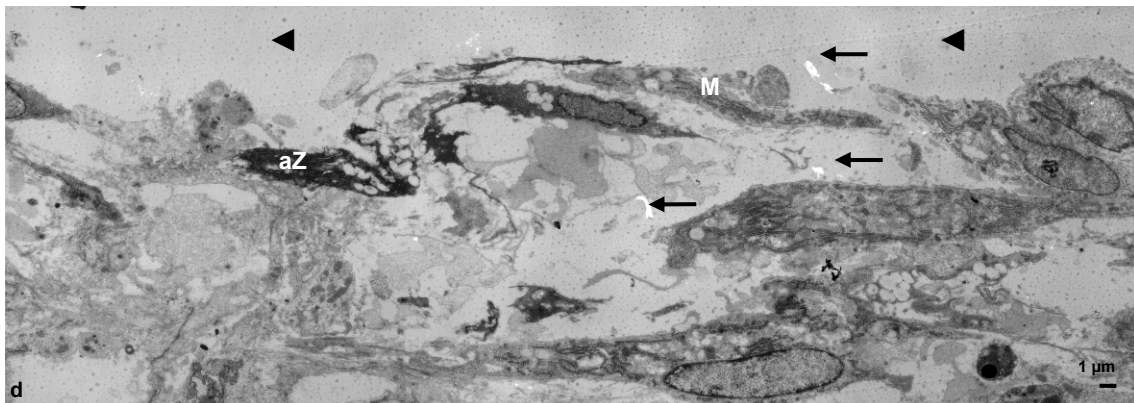


- (c) Darstellung eines Osteoklasten, der Knochenfragmente (→) phagozytiert hat. Im oberen Bereich ist ein Nucleus (N) des Osteoklasten angeschnitten.
- (d) Am Interface der Schraube (*) befindet sich anschließend an einen schmalen Spalt ein Osteoblast (Ob). Weiterhin sind absterbende Zellen (◆) aufgrund einer Hitzenekrose zu finden. Ein Makrophage (M) liegt im angrenzenden Gewebe.

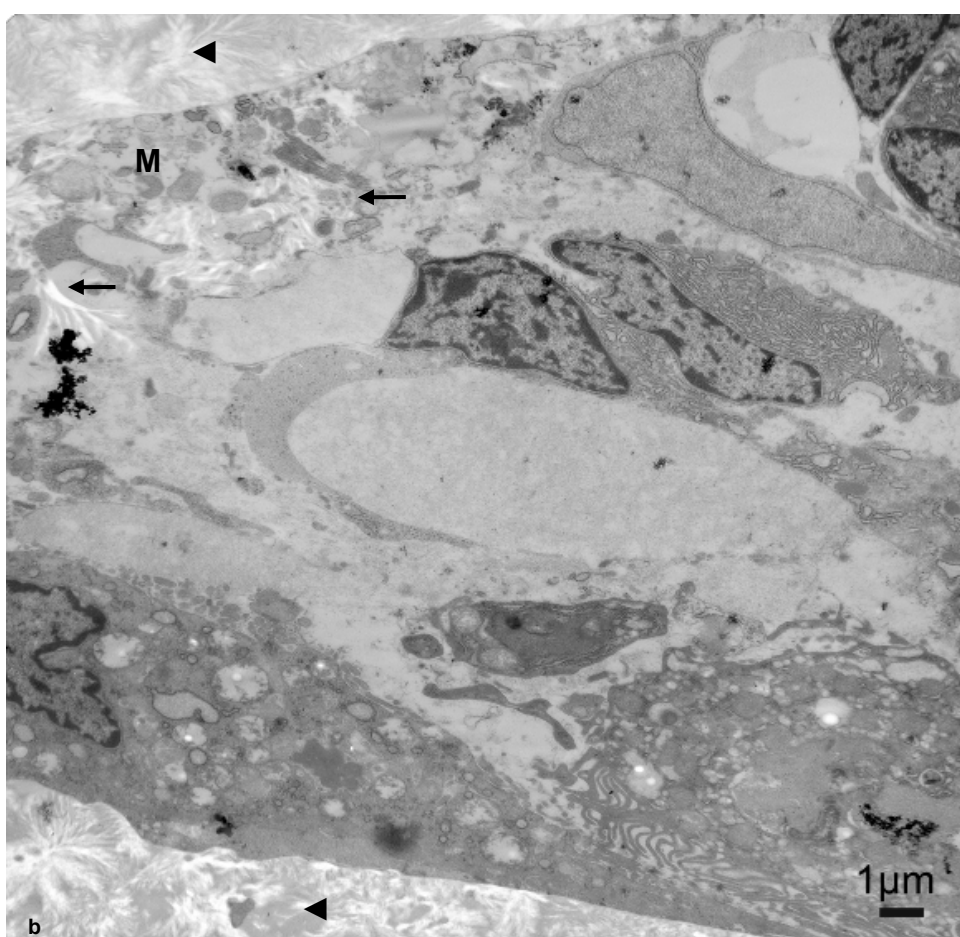
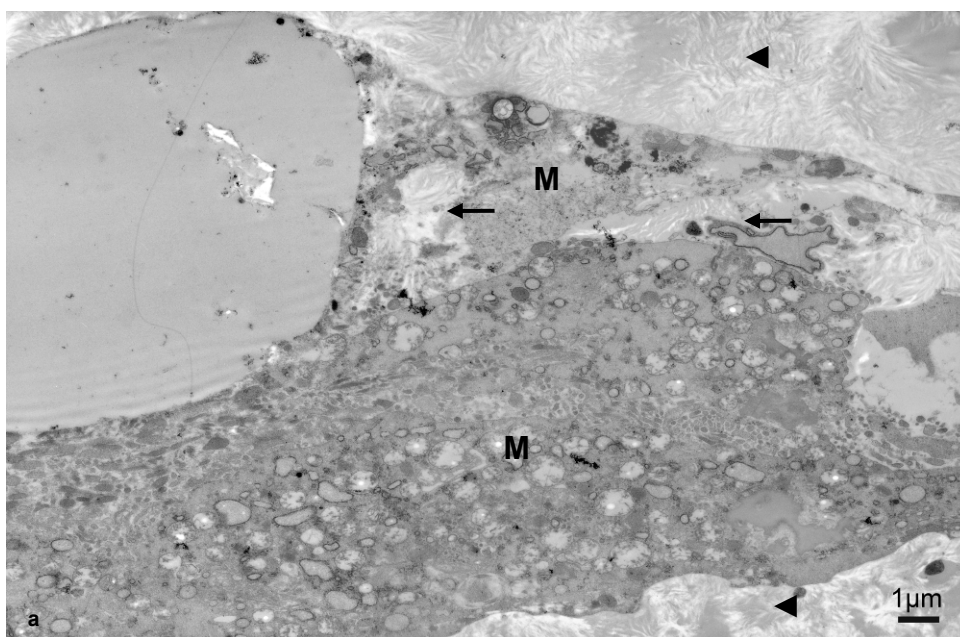
Abb. 47 TEM 7d / Interface Sonic Pin



- (a) Vereinzelt liegt die weiße Substanz des Sonic Pins (◄) in größeren Teilen vor.
 (b) In der Nähe des Sonic Pins (◄) befindet sich ebenfalls ein Osteoblast (Ob), der durch den hohen Gehalt an endoplasmatischem Retikulum in seinem Cytoplasma charakterisiert ist. N: Nucleus.
 (c) Im Gewebe am Sonic Pin sind viele apoptotische Zellen (aZ) zu finden, die wahrscheinlich durch die Hitze beim Aufschmelzen oder beim Vorbohren des Pins beschädigt wurden.



- (d) Am Interface des Sonic Pins (◄) befinden sich Makrophagen (M) sowie apoptotische Zellen (aZ). Bei den weißen Stellen (←) handelt es sich wahrscheinlich um Pinmaterial.

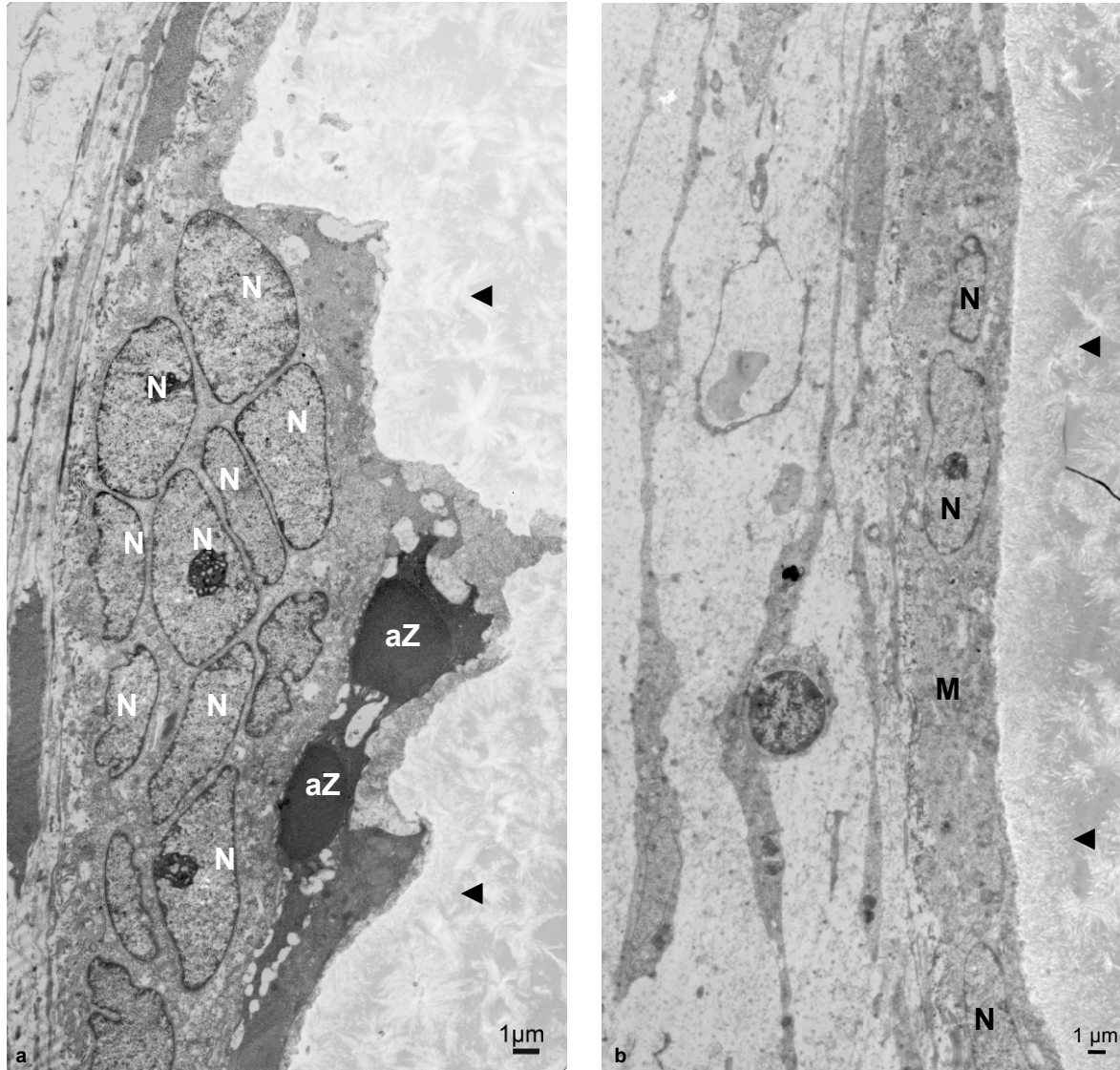
Abb. 48 TEM 21d Interface Sonic Pin

- (a)** Am Interface des Sonic Pins (\blacktriangleleft) befinden sich Makrophagen (M), die das Pinmaterial (\leftarrow) aufnehmen.
- (b)** Ein resorbierender Makrophage (M) am Interface des Sonic Pins (\blacktriangleleft), deren Zytoplasma Pinmaterial (\leftarrow) enthält.

Die Struktur des Pinmaterials veränderte sich bei den späteren Zeitpunkten, vermehrt traten weiße Kristalle (Nadeln) auf (Abb. 48).

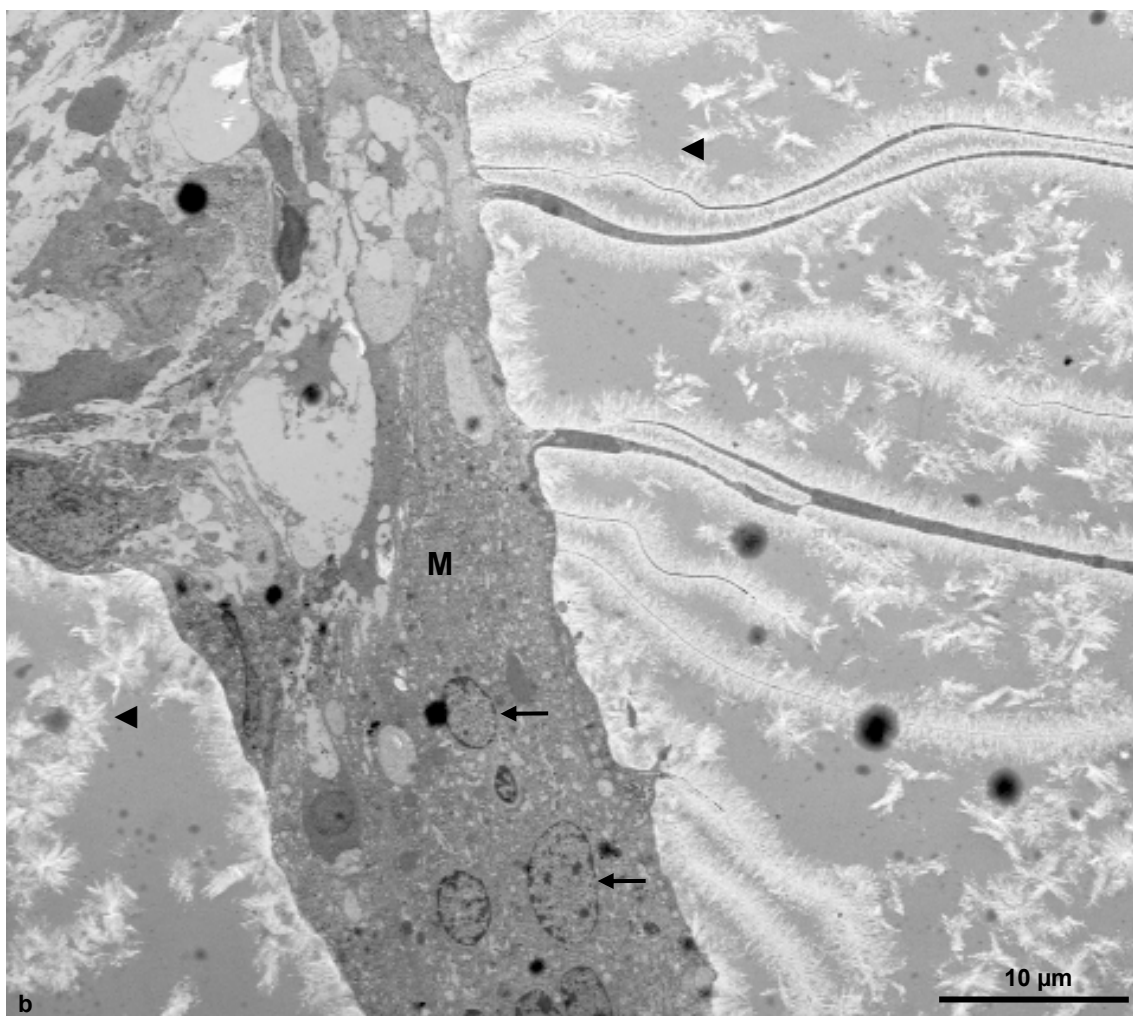
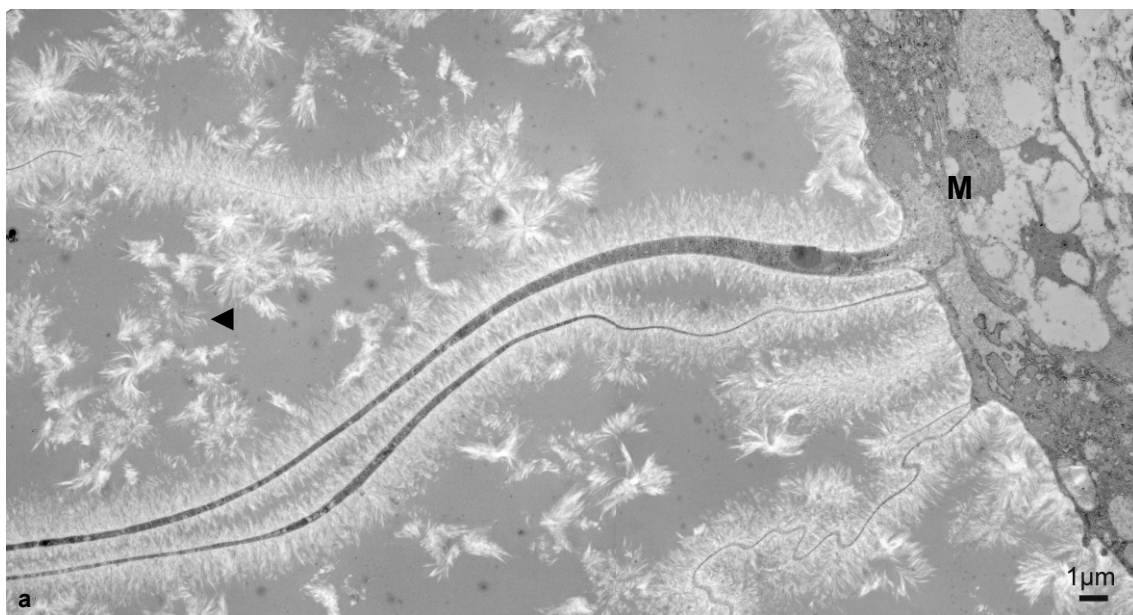
Nach 21d fanden sich Makrophagen, die teilweise Polylaktidmaterial des anliegenden Sonic Pins aufgenommen hatten (Abb. 48a, b).

Abb. 49 TEM 42d / Interface Sonic Pin



- (a) Am Interface des Sonic Pins (◄) befinden sich absterbende Zellen (aZ) und Makrophagen, die zum Teil sehr viele Kerne (N) aufweisen.
(b) Einige Makrophagen (M) mit mehreren Nuclei (N) am Interface des Sonic Pins (◄) sind dünn und langgestreckt.

In der 42d Gruppe waren die resorbierenden Zellen am Interface und in der Umgebung des Pins sehr groß mit vielen Zellkernen (Abb. 49a) und teilweise dünn und langgestreckt (Abb.49b).

Abb. 50 TEM 84d / Interface Sonic Pin

- (a) Am Interface des Pins (\blacktriangleleft) werden Ausläufer von Makrophagen (M) beobachtet, die in das Pinmaterial hineinragen. An ihrer Oberfläche haben sich die weißen Partikel des Pins charakteristisch ausgerichtet.
- (b) Die Makrophagen (M) sind zu meist mehrkernig (\leftarrow) und werden von beiden Seiten vom Pinmaterial (\blacktriangleleft) eingeschlossen.

Bei den 84d Tieren wurden vermehrt Ausläufer der mehrkernigen Makrophagen im Pinmaterial nachgewiesen (Abb. 50).

Resorptionsverhalten Sonic Pin

Bei den Tieren der 7d Standzeit waren am Sonic Pin Makrophagen mit vielen Lysosomen und zum Polylaktid ausgerichtete Zellausläufer lokalisiert (Abb. 51a).

Das Pinmaterial befand sich im Cytoplasma in Vesikeln, wobei die Makrophagen teilweise mit ihren Zellausläufern das Polylaktid umgreifen (Abb. 51c). In den Zellkernen traten ebenfalls polylaktidartige Substanzen auf (Abb. 51b, d). Auch bei den späteren Standzeiten sind vereinzelt weiße Strukturen im Cytoplasma und teilweise im Nukleus sichtbar, die sich methodisch nicht sehr vom Pinmaterial differenzieren lassen.

Bei 21d ragten die Zellausläufer der Makrophagen in das Pinmaterial hinein, wobei sich die weiße Substanz des Pins in ihrer Orientierung an den Ausläufern der Makrophagen scheinbar ausrichtete (Abb. 52a). Zwischen Makrophagen und Polylaktid war teilweise eine zweite Membran ausgebildet (Abb. 52c), die an manchen Stellen unterbrochen war. Durch diese Öffnungen könnte Pinmaterial in die Zelle gelangt sein (Abb. 52b).

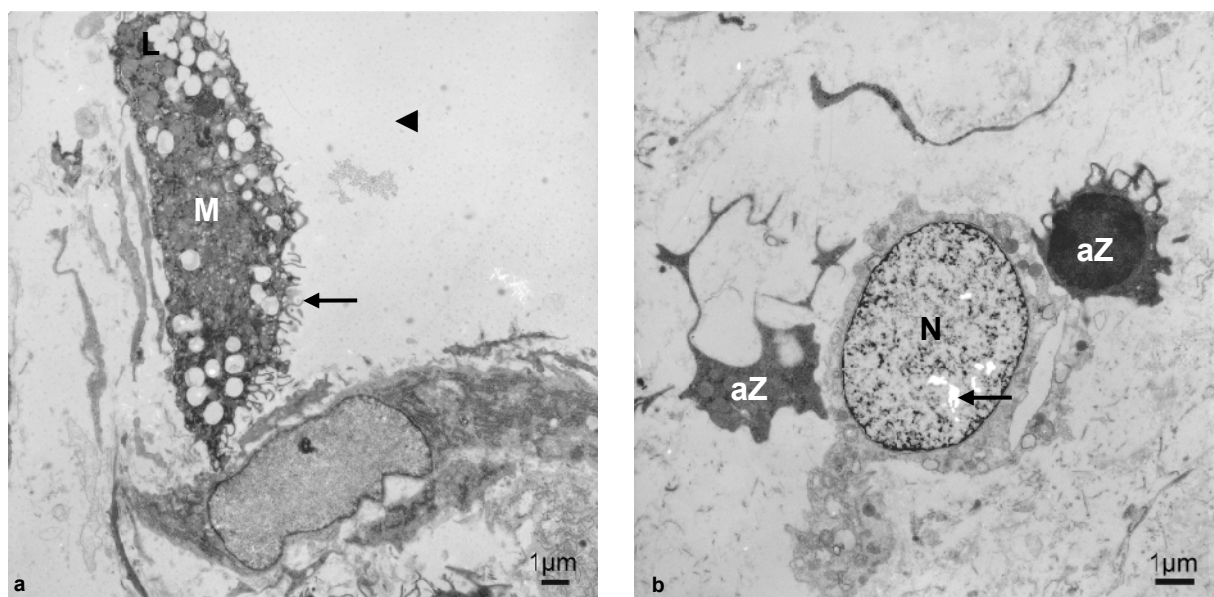
Ebenfalls wurde Pinmaterial in Lysosomen beobachtet, die durch Fusion zu großen lysosomalen Komplexen verschmolzen (Abb. 53) waren.

Manche der mehrkernigen Makrophagen waren nach 42d dünn und langgestreckt (Abb. 54a). Die Makrophagen bilden dünne, kleine Kanäle, die der Resorption des Pinmaterial dienen könnten (Abb. 54b, c).

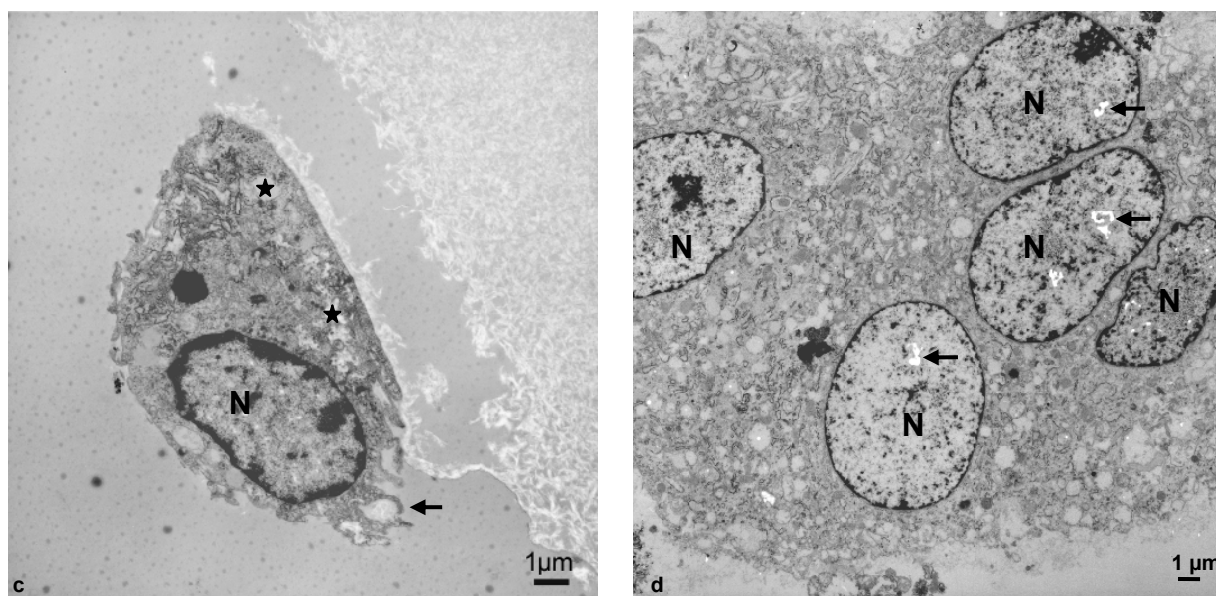
84d nach der Implantation ragten eine große Anzahl von Makrophagenzellausläufern ins Pinmaterial hinein (Abb. 55a). Es konnte Polylaktid in einem Lymphgefäß und in einer Vene gefunden werden, was darauf hindeutet, dass das resorbierte Pinmaterial über Lymphgefäße (Abb. 55b) und über Venen (Abb. 55c) abtransportiert wird.

Die Anzahl der absterbenden Zellen, die eine typische Hitznekrose aufwiesen, nahm mit steigender Standzeit ab, wohingegen eine Zunahme der Makrophagen zu beobachten war.

Abb. 51 TEM Resorptionsverhalten Sonic Pin 7d

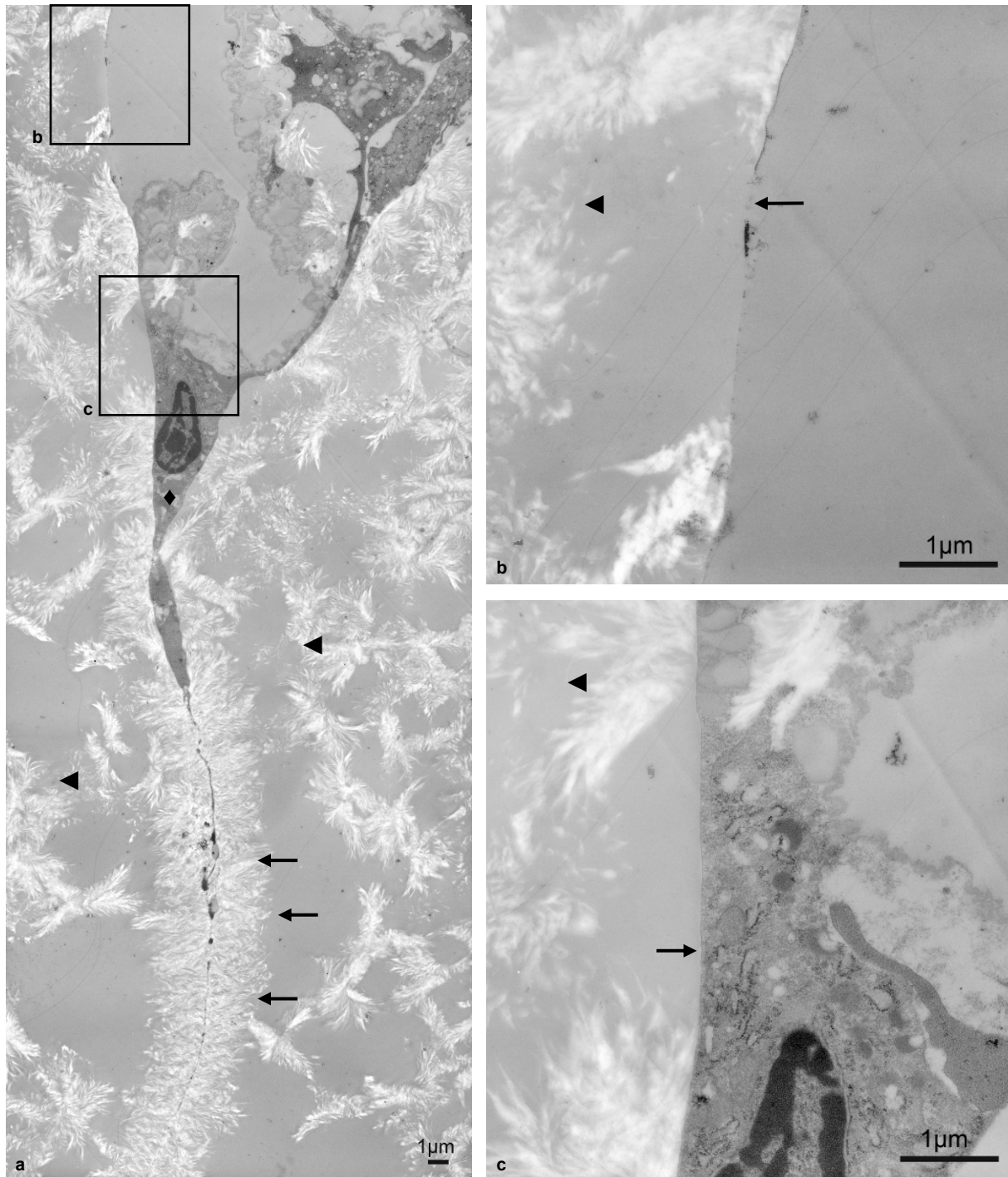


- (a) Makrophage (M) mit vielen Lysosomen (L) mit zum Sonic Pin (◄) ausgerichteten Zellausläufern (←).
 (b) Zellkern (N) mit sichtbaren weißen Strukturen (←) eines Makrophagen, der mitten im Granulationsgewebe um den Pin lag. Angrenzend sind absterbende Zellen (aZ) zu sehen.

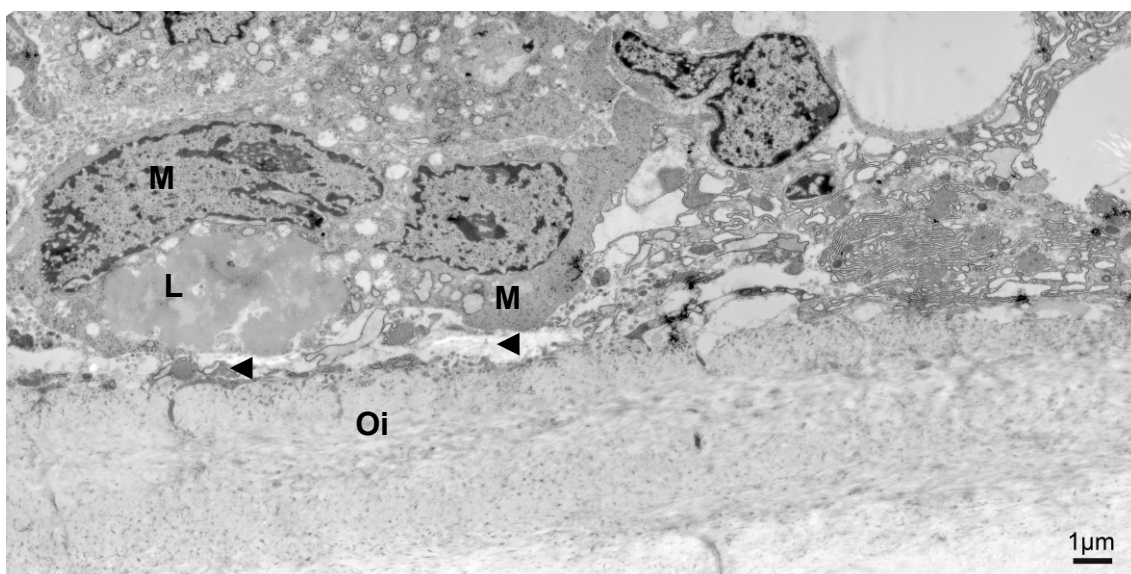


- (c) Ein resorbierender Makrophage umgreift mit seinen Zellausläufern Pinmaterial (←). Im Zytoplasma dieser Zelle ist ebenfalls Pinmaterial in den Vesikeln (*) lokalisiert (*). N: Nucleus.
 (d) Mehrkerniger Makrophage mit pinmaterialähnlichen weißen Strukturen (←) in den Zellkernen (N).

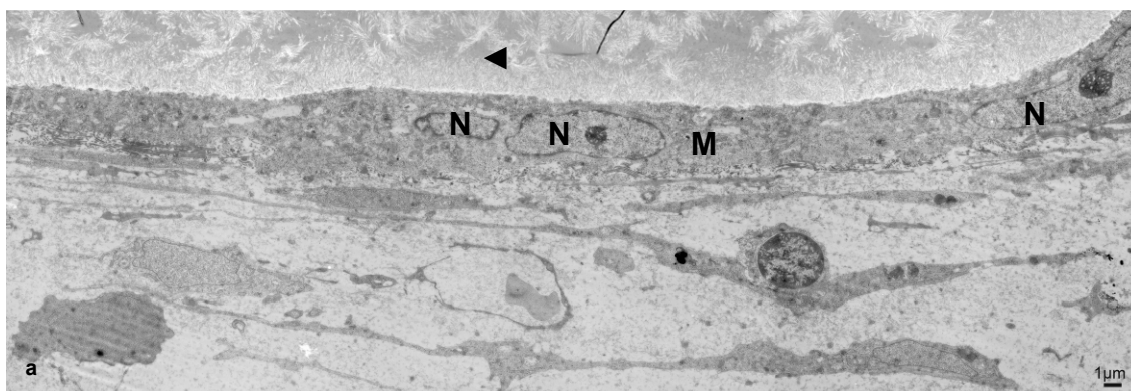
Abb. 52 TEM 21d Resorptionsverhalten Sonic Pin



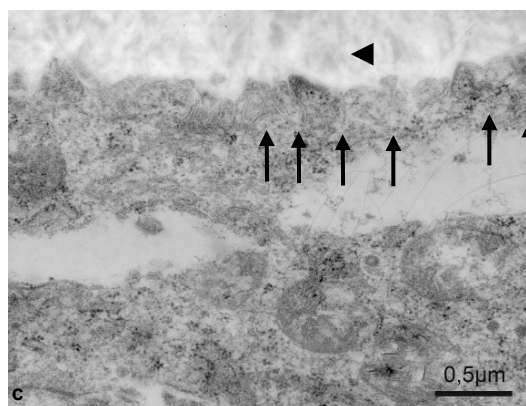
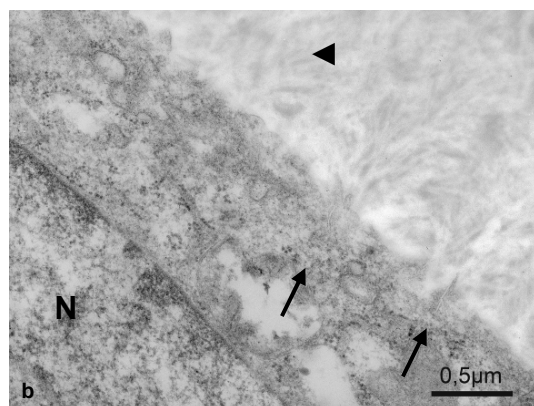
- (a) Darstellung eines Zellausläufers eines Makrophagen, der in das Pinmaterial (◄) eindringt. Die weiße Substanz des Pins scheint sich an dem Ausläufer in ihrer Orientierung auszurichten (←). Im Cytoplasma des Zellausläufers befindet sich weiße Pinsubstanz (◆).
- (b) Der Sonic Pin (◄) grenzt an einer Plasmamembran, die ein Fenster enthält, durch das Pinmaterial in die Zelle gelangt sein könnte (←). Es ist jedoch fraglich ob es sich bei diesem Gebilde um eine Zelle handelt, da keine Zellorganellen enthalten sind.
- (c) An dieser Stelle entsteht der Eindruck als würde eine zweite Plasmamembran (→) als Abgrenzung zum Sonic Pin (◄) gebildet.

Abb. 53 TEM 21d Resorptionsverhalten Sonic Pin

In der Nähe von neu gebildetem Knochen befinden sich resorbierende Zellen, bei denen es sich um Makrophagen (M) handelt. Ein Makrophage enthält in seinem Cytoplasma ein sehr großes Lysosom (L), das vermutlich mit Pinmaterial gefüllt ist. Auch bei dieser Detailaufnahme ist Pinmaterial (◄) im Interstitium zu beobachten. Oi: Osteoid.

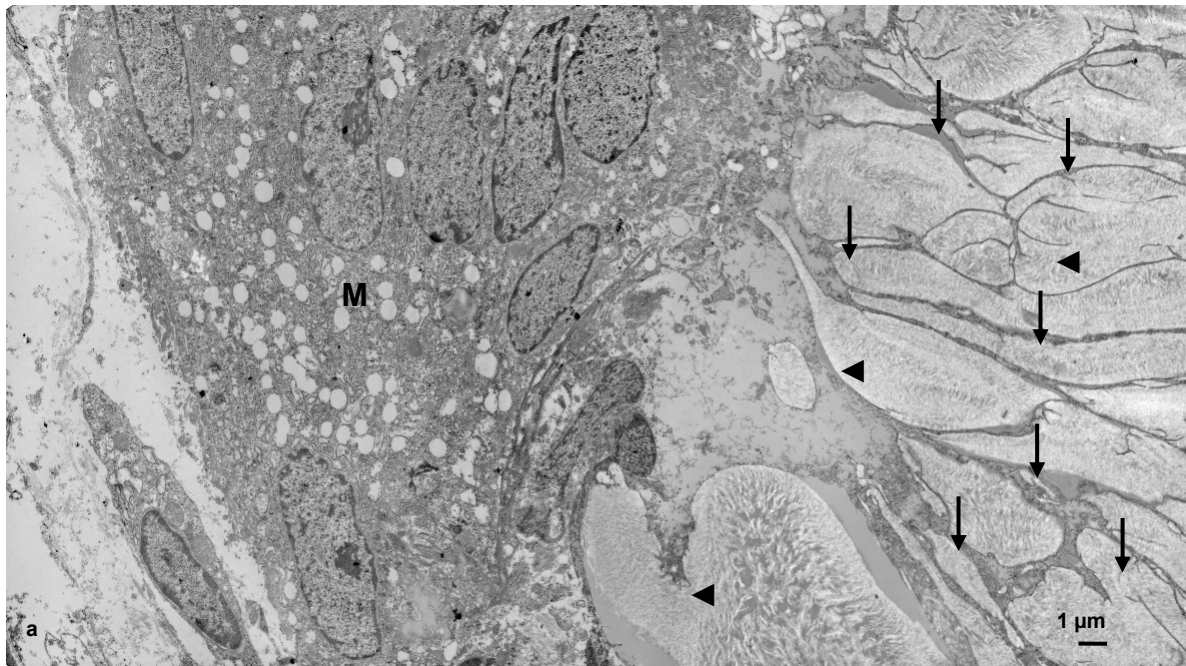
Abb. 54 TEM 42d Resorptionsverhalten Sonic Pin

(a) Einige der mehrkernigen Makrophagen (M) am Interface des Sonic Pins (◄) sind dünn und langgestreckt. N: Nukleus

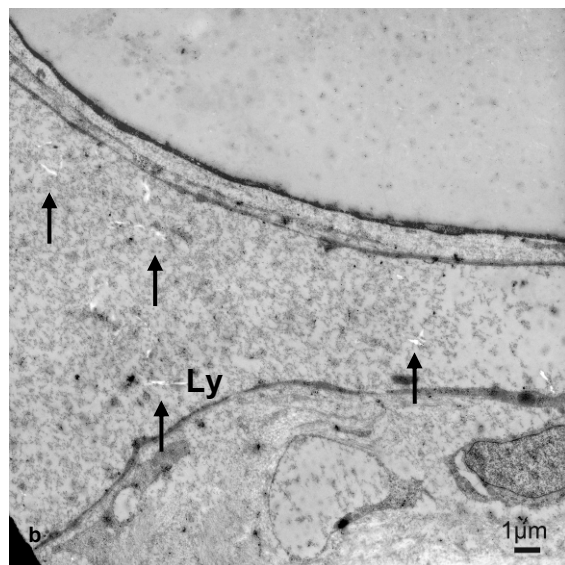


(b, c) Am Interface der mehrkernigen Makrophage sind kleine Kanäle (↑) ausgebildet, die der Resorption des Pinmaterials (◄) dienen könnten. N: Nukleus

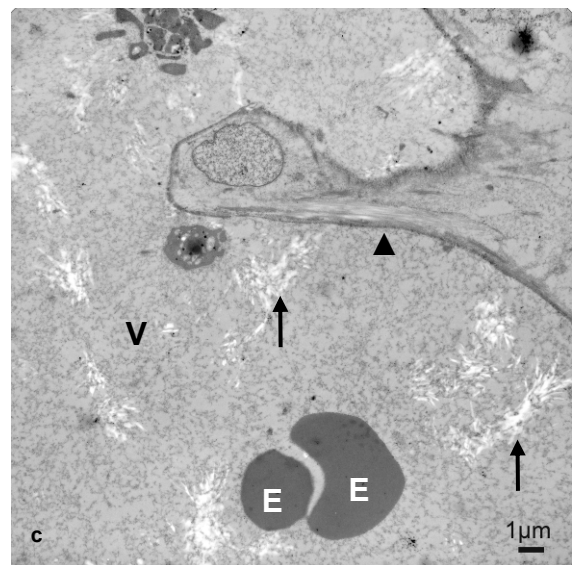
Abb. 55 TEM 84d Resorptionsverhalten Sonic Pin



(a) Am Interface des Sonic Pins (◄) werden Ausläufer (↓) von Makrophagen (M) beobachtet, die in das Pinmaterial hineinragen.



(b) Die weiße Pinsubstanz (↑) wird weiterhin im Lumen von Lymphgefäßen (Ly) gefunden.



(c) Zusätzlich wurde helles Pinmaterial (↑) in einer Vene (V) gefunden, was den Verlauf des weiteren Resorptionswegs andeuten könnte. E: Erythrozyt. Endothel (▲) der Vene.

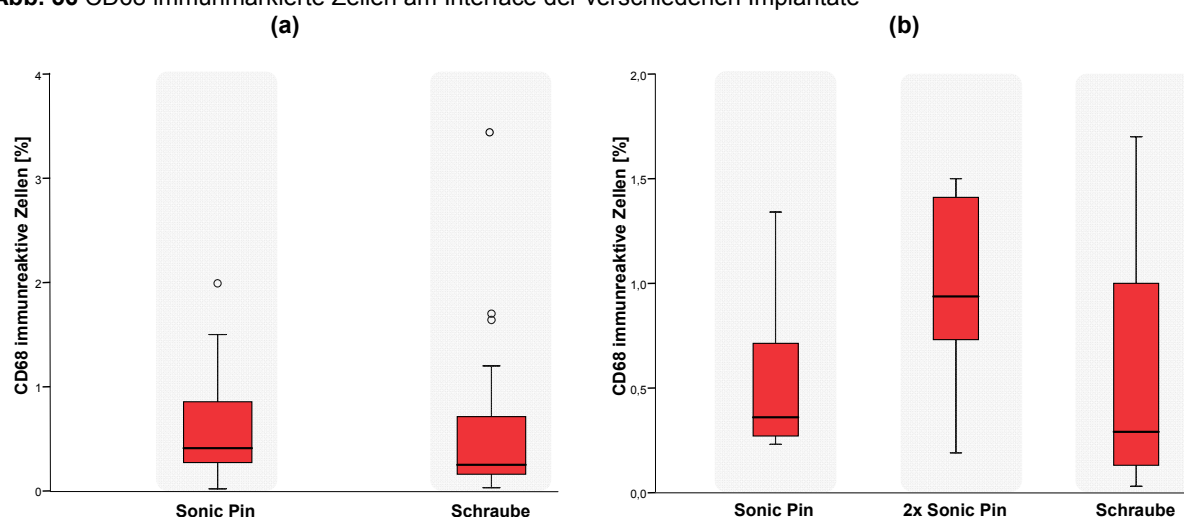
4.5 Histomorphometrie

4.5.1 Histomorphometrie der Fremdkörperreaktion CD68

Die Fremdkörperreaktion auf die verschiedenen Implantate wurde anhand der Fläche von CD68 markierten Zellen, die diese im Vergleich zur Gesamtfläche einnahmen, vermessen.

Die ersten statistischen Analysen befaßten sich mit der Fragestellung, ob es unterschiedliche Fremdkörperreaktionen auf den Sonic Pins im Vergleich zu den Schrauben gab. Hierfür wurden alle Interfaces der Sonic Pins (n=27) und alle der Schrauben (n=21) für alle Standzeiten zusammengefasst. Es ergaben sich keine signifikanten Unterschiede (p=0,228) (Abb. 56a). Die Kreise markieren Ausreißer, die mehr als das 1,5 fache des Interquartilsabstandes vom Median abweichen.

Abb. 56 CD68 immunmarkierte Zellen am Interface der verschiedenen Implantate

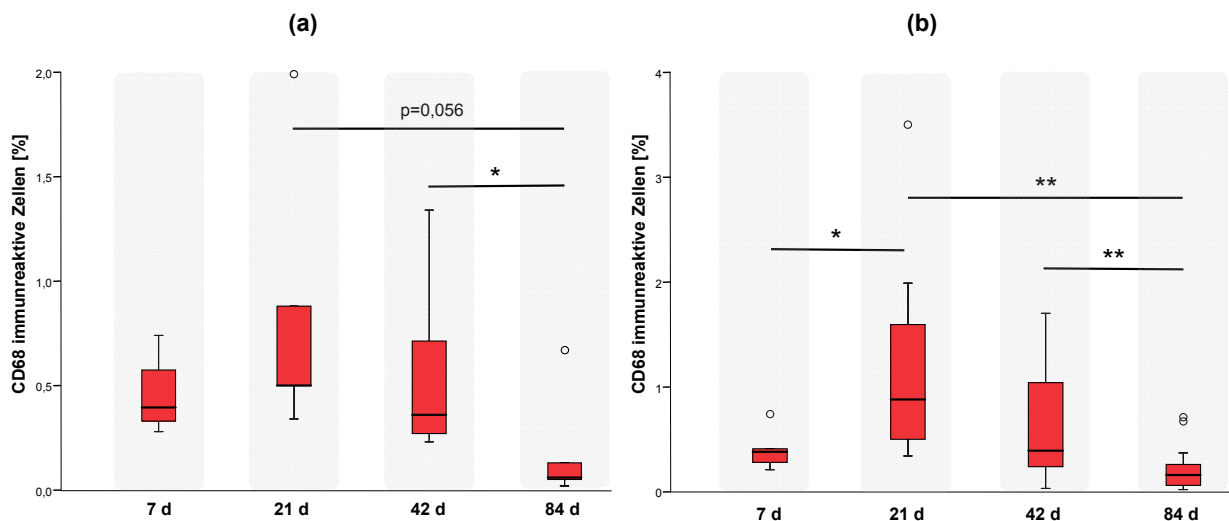


- (a) Boxplot des statistischen Vergleichs der CD68 immunmarkierten Zellen am Interface des Sonic Pin (n=27) und der Schraube (n=21) zusammengefasst für alle Standzeiten. Es wurden keine signifikanten Unterschiede festgestellt. Die Kreise markieren Ausreißer, die mehr als das 1,5 fache des Interquartilsabstandes vom Median abweichen.
- (b) Boxplot des statistischen Vergleichs der CD68 immunmarkierten Zellen nach 42d am Interface des Sonic Pin in der P/S, in der P/P und am Interface der Schraube in der KD/S und P/S Gruppe. Es wurden keine signifikanten Unterschiede gemessen.

Innerhalb der 42d Standzeit erfolgten weitere Berechnungen. Die prozentuale CD68 gefärbte Fläche am Interface der Schraube verglichen mit der Fläche am Interface des Pins, ergab keine signifikanten Unterschiede. Weiterhin konnten ebenfalls keine signifikanten Unterschiede gemessen werden bei den Tieren, die mit zwei Pins versorgt wurden aus der P/P Gruppe, in Relation zu den Tieren mit einem Pin aus der S/P Gruppe (Abb. 56b).

Weiterhin wurden die CD68 immunmarkierten Zellen am Interface des Sonic Pins bei den unterschiedlichen Standzeiten verglichen. Von der 7d Standzeit standen Messungen von n=4 Tieren, von der 21d Standzeit von n=5 Tieren, von der 42d Standzeit von n=7 Tieren und von der 84d Standzeit von n=5 Tieren zur Verfügung. Ein signifikanter Unterschied konnte beim Vergleich der 42d mit der 84d Tiergruppe gemessen ($p=0,048$) werden. Der Vergleich der 21d mit der 84d Gruppe ergab einen Wert von $p=0,056$, womit eine tendenzielle Abnahme der CD68 immunmarkierten Zellen von der 21d zur 84d Standzeit dokumentiert wurde (Abb. 57a).

Abb. 57 CD68 immunmarkierte Zellen an verschiedenen Standzeiten



- (a) Boxplot des statistischen Vergleichs der CD68 immunreaktiven Zellen am Interface des Sonic Pins bei den verschiedenen Standzeiten. Ein signifikanter Unterschied bestand zwischen der 42d und 84d Gruppe und ein tendenzieller zwischen der 21d und 42d Gruppe ($p=0,056$). Die Kreise markieren Ausreißer, die mehr als das 1,5 fache des Interquartilsabstandes vom Median abweichen.
- (b) Boxplot des statistischen Vergleichs der CD68 immunreaktiven Zellen am Interface des Sonic Pins und der Schrauben zusammengefasst. Es wurden signifikante Unterschiede beim Vergleich von 7d- und 21d Gruppen, 21d- und 84d Gruppen und 42d- und 84d Tiergruppen gemessen. Beim Vergleich der 7d mit der 84d Gruppe wurde ein tendenzieller ($p=0,059$) Anstieg beobachtet. Die Kreise markieren Ausreißer, die mehr als das 1,5 fache des Interquartilsabstandes vom Median abweichen.

Ein abschließender Vergleich der CD68 immunmarkierten Zellen für die Zusammenfassung aller Interface der Schrauben und der Sonic Pins, ergab folgende Ergebnisse. Von der 7d Standzeit Gruppe standen Messungen von n=5 Implantaten, bei der 21d Gruppe von n=7 Implantaten, bei der 42d Gruppe von n=23 Implantaten und von der 84d Gruppe von n=13 Implantaten zur Verfügung. Ein signifikanter Unterschied wurde beim Vergleich der 7d Gruppe mit der 21d Gruppe ($p=0,048$), beim Vergleich der 21d Gruppe mit der 84d Gruppe ($p=0,001$) und beim Vergleich der 42d mit der 84d Tiergruppe gemessen ($p=0,004$). Somit gab es einen

signifikanten Anstieg zwischen 7d und 21d und danach eine signifikante kontinuierliche Abnahme der CD68 positiven Zellzahl bis 84d (Abb. 57b).

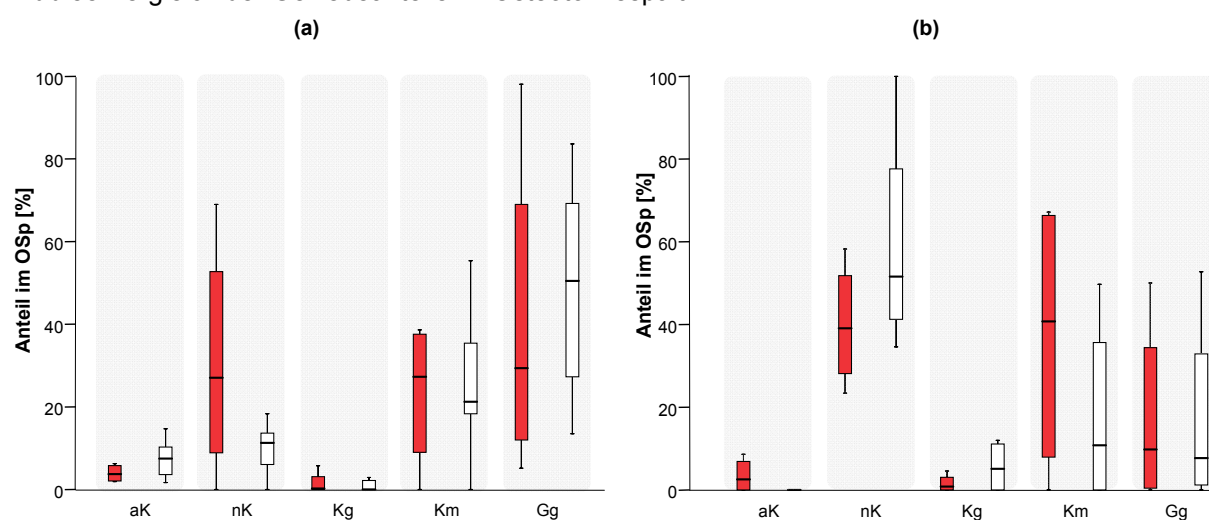
4.5.2 Histomorphometrie der Gewebeanteile im Osteotomiespalt

Gewebeanteilvergleich der Gruppen KD/S mit P/S und P/S mit P/P

Der Vergleich der Gruppe KD/S mit der Gruppe P/S konnte nur bei der 7d Standzeit durchgeführt werden, da nur bei dieser Standzeit Proben von 4 Tieren vorliegen, bei denen die Osteotomie durch Schraube/K-Draht stabilisiert war. Bei den anderen Standzeiten liegen jeweils nur Proben von 2 Tieren der Gruppe KD/S vor.

Es wurden keine signifikanten Unterschiede gemessen: alter Knochen (aK): $p=0,413$; neu gebildeter Knochen (nK): $p=0,286$; Knorpelgewebe (Kg): $p=0,905$; Knochenmark (Km): $p=0,905$; Granulationsgewebe (Gg): $p=0,73$ (Abb. 58a).

Abb.58 Vergleich der Gewebeanteile im Osteotomiespalt



(a) Boxplot des statistischen Vergleichs der Gewebeverteilung im Osteotomiespalt nach 7d von der Gruppe KD/S (rote Balken, $n=4$) mit der Gruppe P/S (weiße Balken, $n=5$). Es wurden keine signifikanten Unterschiede festgestellt.

(b) Boxplot des statistischen Vergleichs der Gewebeverteilung im Osteotomiespalt nach 42d von der Gruppe P/S (rote Balken, $n=4$) und der Gruppe P/P (weiße Balken, $n=4$). Es wurden keine signifikanten Unterschiede festgestellt.

Der Vergleich der Gruppe P/S mit der Gruppe P/P konnte nur bei der 42d Standzeit durchgeführt werden, da nur bei dieser Standzeit die Gruppe P/P durchgeführt

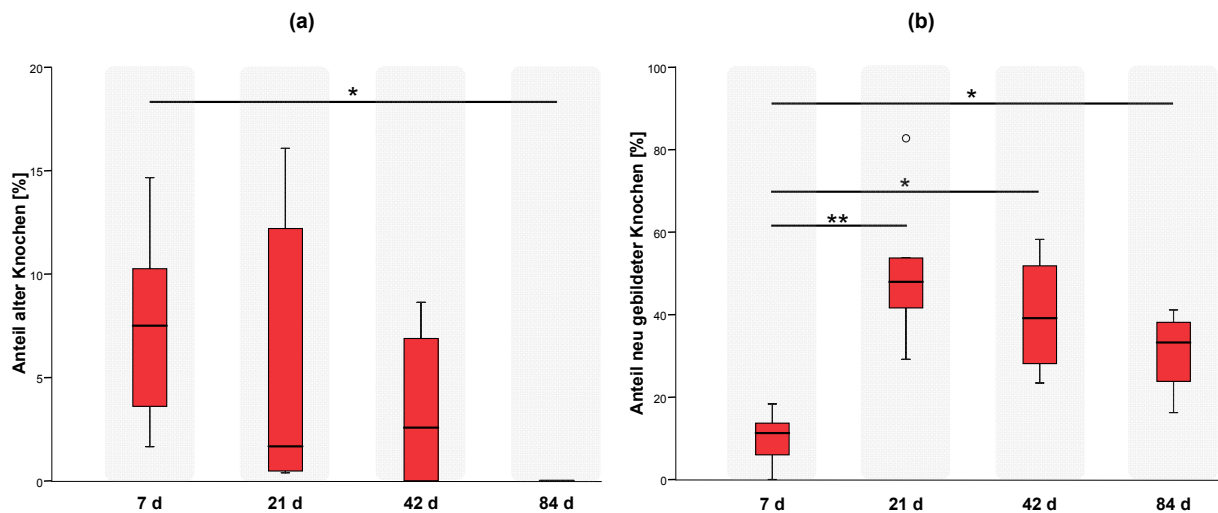
wurde. Es wurden keine signifikanten Unterschiede gemessen: alter Knochen: $p=0,343$; neu gebildeter Knochen: $p=0,343$; Knorpel: $p=0,686$; Knochenmark: $p=0,486$; Granulationsgewebe: $p=0,886$ (Abb. 58b).

Gewebeanteilvergleich pro Standzeit der P/S Gruppe

Im Folgenden werden die anteiligen Veränderungen für die Gewebsarten alter Knochen (Knochenfragmente und Lagerknochen), neugebildeter Knochen, Knorpel, Knochenmark und Granulationsgewebe im Osteotomiespalt zu den unterschiedlichen Standzeiten dargestellt. Diese Untersuchung basiert ausschließlich auf der P/S Gruppe.

In der 7d Standzeit war der Anteil des alten Knochens signifikant erhöht im Vergleich zur 84d Standzeit ($p<0,016$) (Abb. 59a). Dieses deckt sich mit den histologischen Befunden. Bei den 7d Tieren waren Knochenfragmente und alter Knochen zu beobachten, während bei den 84d Tieren der Osteotomiespalt mit neuem Knochen durchbaut war. Die Knochenfragmente waren ab- bzw. umgebaut.

Abb. 59 Anteile alter Knochen und neugebildeter Knochen im Osteotomiespalt der P/S Gruppe



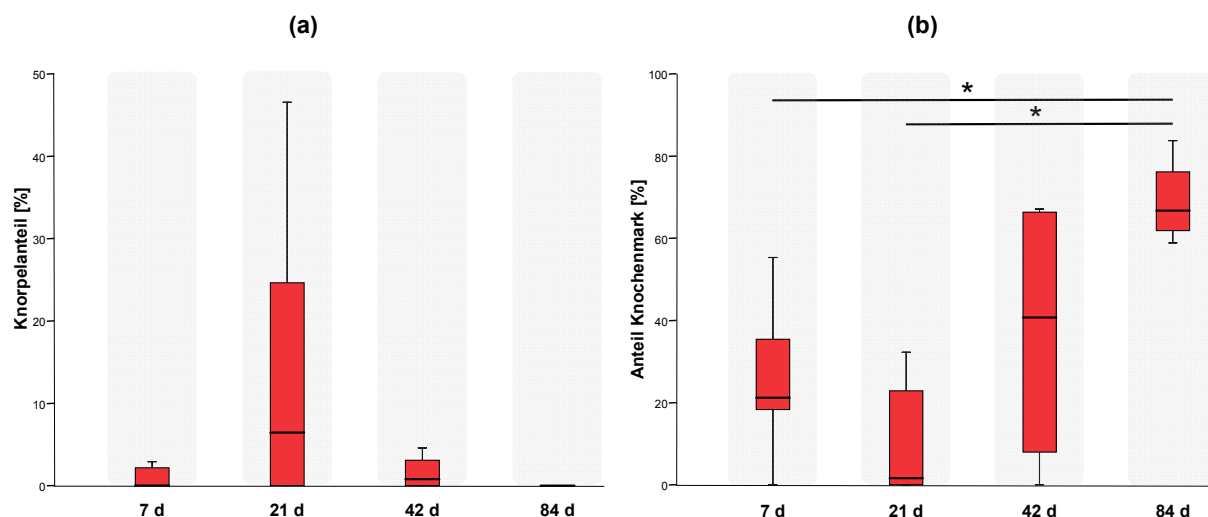
- (a) Vergleich des prozentualen Abbaus der Knochenfragmente und Reste des Lagerknochens im Osteotomiespalt. Ein signifikanter Unterschied wurde zwischen 7d und 84d beobachtet.
- (b) Vergleich der prozentualen Zunahme des neugebildeten Knochens im Osteotomiespalt. Ein signifikanter Anstieg wurde zwischen der 7d Standzeit und allen späteren Standzeiten beobachtet. Der Kreis markiert einen Ausreißer, der mehr als das 1,5 fache des Interquartilsabstandes vom Median abweicht.

Neu gebildeter Knochen im Osteotomiespalt war bei der 7d Standzeit im Vergleich zu allen anderen Standzeiten jeweils signifikant weniger vorhanden (7d–21d: $p= 0,004$;

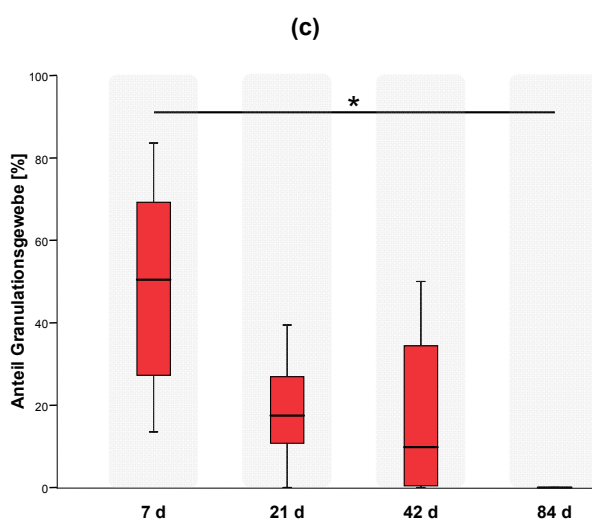
7d–21d: $p=0,016$; 7d-42d: $p=0,032$; 7d–84d: $p=0,032$) (Abb. 59b).

Für den Knorpelanteil im Osteotomiespalt ließen sich keine signifikanten Unterschiede beobachten (Abb. 60a), jedoch konnten für die Anteile von Knochenmark bei der 84d Standzeit signifikant mehr Anteile als bei der 7d- und 21d- Standzeit beobachtet werden (7d–84d: $p=0,016$; 21d–84d: $p=0,016$) (Abb.60b).

Abb. 60 Knorpelanteile, Knochenmark und Granulationsgewebe im Osteotomiespalt der P/S Gruppe



- (a) Vergleichs des Knorpelanteils im Osteotomiespalt der Tiere zu verschiedenen Standzeiten. Keine signifikanten Unterschiede konnten festgestellt werden.
- (b) Verteilung des Anteils des Knochenmarks im Osteotomiespalt. Bei den Tieren mit einer 84d Standzeit wurde ein signifikant höherer Anteil an Knochenmark im Osteotomiespalt gemessen als bei denen mit 7d- oder 21d Standzeit.



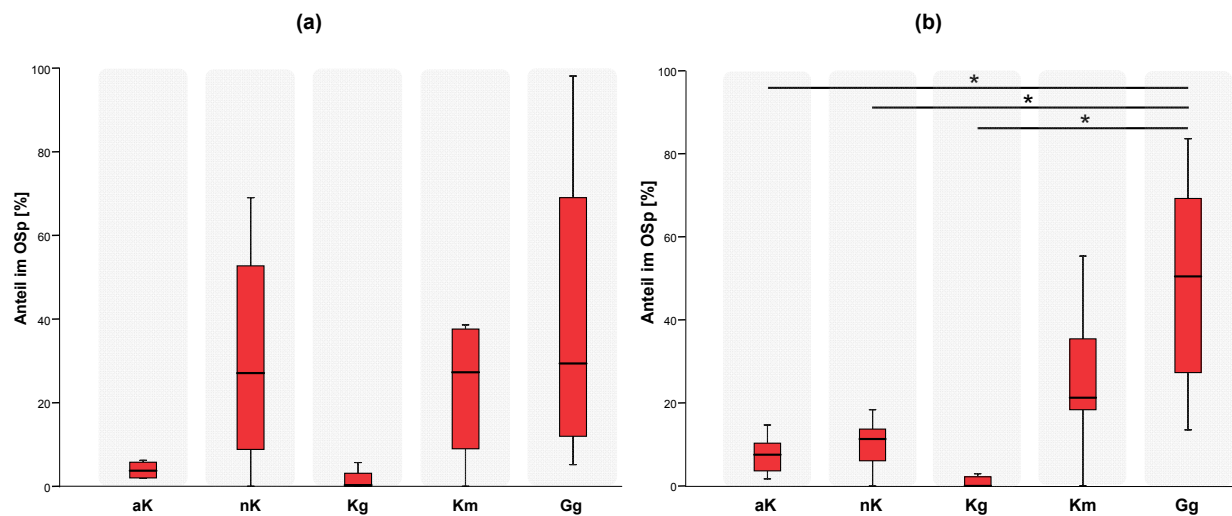
- (c) Prozentuale Verteilung des Anteils an Granulationsgewebe im Osteotomiespalt. Bei den Tieren mit einer 7d Standzeit wurde signifikant mehr Granulationsgewebe gemessen als bei der 84d Gruppe.

Granulationsgewebe war bei der 7d Standzeit signifikant mehr zu finden als bei der 84d Gruppe (7d–84d: $p=0,016$) (Abb. 60c). Dieser Befund verdeutlicht, dass die Tiere 7d nach der Operation im ersten Stadium der Frakturheilung sind, das u.a. durch die Bildung von Granulationsgewebe charakterisiert ist.

Gewebeanteilvergleich pro Gruppe und Standzeit

Zunächst wurden die Gewebeanteile im Osteotomiespalt bei den 7d Gruppen KD/S und P/S) verglichen.

Abb. 61 Gewebeverteilung KD/S und P/S Gruppe im Osteotomiespalt nach 7d

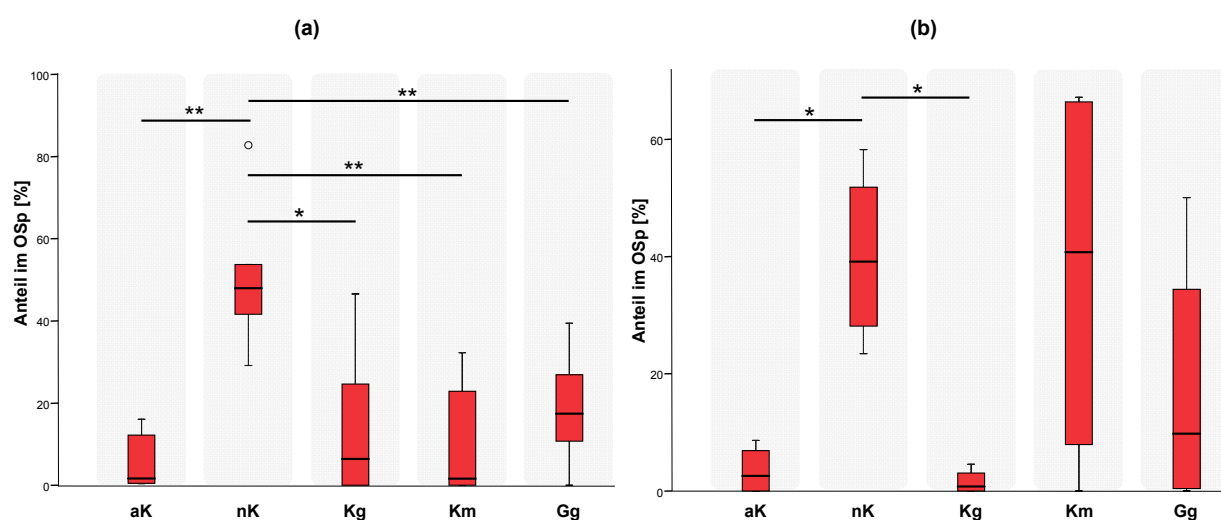


- (a) Boxplot Vergleich der Gewebeverteilung innerhalb der KD/S Gruppe mit einer Standzeit von 7d. Es wurden keine signifikanten Unterschiede beobachtet.
- (b) Boxplot Vergleich der Gewebeverteilung innerhalb der P/S Gruppe mit einer Standzeit von 7d Tagen. Es wurde signifikant mehr Granulationsgewebe (Gg) als alter Knochen (aK), neu gebildeter Knochen (nK) und Knorpelgewebe (Kg) beobachtet. Km = Knochenmark.

Bei der Standzeit 7d der Gruppe KD/S konnten keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden (Abb. 61a), jedoch ergab sich in der Gruppe P/S signifikant mehr Granulationsgewebes im Vergleich zum alten Knochen ($p=0,016$), zum neu gebildeten Knochen ($p=0,032$) und im Vergleich zum Knorpelgewebe ($p=0,008$) (Abb. 61b).

Nun erfolgte die gleiche Analyse bei den Pin Gruppen P/S und P/P zu den späteren Standzeiten.

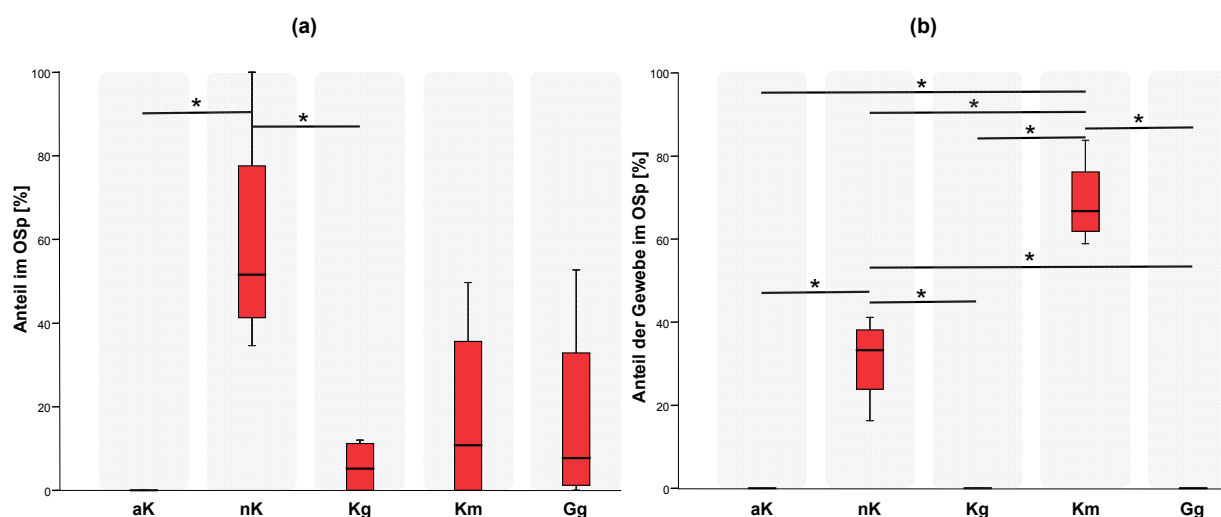
Beim Vergleich der Gewebeanteile im Osteotomiespalt von Tieren der Gruppe P/S der 21d Standzeit konnte ein signifikant höherer Anteil des neuen Knochens gemessen werden (aK: $p=0,002$; Kp: $p=0,015$; Km: $p=0,004$; Gg: $p=0,004$) (Abb. 62a).

Abb. 62 Gewebeverteilung der P/S Gruppe im Osteotomiespalt nach 21d und 42d

(a) Boxplot Vergleich der Gewebeverteilung innerhalb der P/S Gruppe mit einer Standzeit von 21d. Es wurde signifikant mehr neu gebildeter Knochen (nK) als alter Knochen (aK), Knorpelgewebe (Kg), Knochenmark (Km) und Granulationsgewebe (Gg) beobachtet. Der Kreis markiert einen Ausreißer, der über der dreifachen Standardabweichung liegt.

(b) Boxplot Vergleich der Gewebeverteilung innerhalb der P/S Gruppe der Tiere mit einer Standzeit von 42d. Es wurde signifikant mehr neuer Knochen (nK) gebildet wie der statistische Vergleich mit dem alten Knochen (aK) und Knorpelgewebe (Kg) zeigt.

Nach 42d wurde in der Gruppe P/S signifikant mehr neuer Knochen im Vergleich zum alten Knochen und zum Knorpelgewebe gemessen (nK-aK: $p=0,029$; nK-Kg: $p=0,029$) (Abb. 62b).

Abb. 63 Gewebeverteilung der P/P Gruppe nach 42d und der P/S Gruppe nach 84d

(a) Boxplot Vergleich der Gewebeverteilung innerhalb der P/P Gruppe mit einer Standzeit von 42d. Es wurde signifikant mehr neu gebildeter Knochen (nK) als alter Knochen (aK) und Knorpelgewebe (Kg) beobachtet.

(b) Boxplot Vergleich der Gewebeverteilung innerhalb der P/S Gruppe mit einer Standzeit von 84d. Es wurde signifikant im Osteotomiespalt neu gebildeter Knochen (nK) und Knochenmark (Km) nachgewiesen, während alter Knochen (aK), Knorpel- (Kg) und Granulationsgewebe (Gg) nicht beobachtet wurde.

Der Osteotomiespalt von Tieren der P/P Gruppe nach 42d Standzeit zeigte signifikant mehr neuen Knochen im Vergleich zum alten Knochen und zum Knorpel (nK-aK: $p=0,029$; nK-Kg: $p=0,029$)(Abb. 63a).

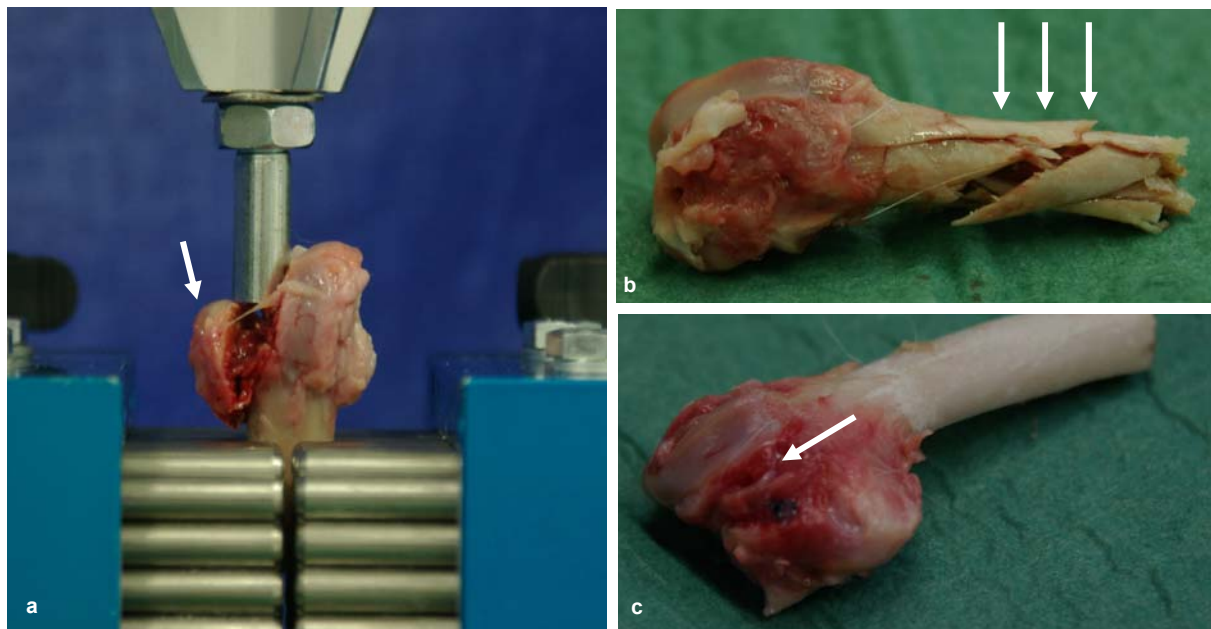
Abschließend nach 84d Standzeit in der P/S Gruppe war im Osteotomiespalt ausschließlich neu gebildeter Knochen und Knochenmark feststellbar (nK-aK: $p=0,029$; nK-Kg: $p=0,029$; nK-Km: $p=0,029$; nK-Gg: $p=0,029$; Km-aK: $p=0,029$; Km – Kg: $p=0,029$; Km-Gg: $p=0,029$) (Abb. 63b).

4.6 Biomechanik

Typisches Versagensbild bei der biomechanischen Untersuchung war die vollständige Abscherung der Kondyle bei der maximalen Kraft (Abb. 64a).

Zwei Femurkondylen wurden von der Auswertung ausgeschlossen, da die Diaphyse in der Einspannung gesplittert war (Abb. 64b). Bei weiteren zwei Femurkondylen in der P/P Gruppe war der Osteotomiespalt nicht geheilt und sehr breit (Abb. 64c). Dadurch waren bei diesen Tieren (Tab. 8, Tier 50 und 56) die gemessenen Werte für F_{max} (148,5N und 450,2N) vergleichsweise gering.

Abb. 64 Biomechanik Ergebnisse



(a) Typisches Versagensbild einer abgescherten Femurkondyle (↓).
(b) Ausschlußkriterium: Versagen durch Schaftbruch (↓) in der Einspannung und
(c) nicht geheilter Osteotomiespalt (←).

Die durchschnittliche gemessene maximale Kraft lag in der KD/S Gruppe bei 656,3N (n=5), in der P/S Gruppe bei 684,6N (n=4), in der P/P Gruppe bei 630,5N (n=5) und bei den intakten Femura 533,1N (n=4). Da die berechnete Verformung d_{calc}

Gruppe	Tier	F max [N]	d max [mm]	d calc [mm]	Steifigkeit [N/mm]	R ²	Bemerkung
KD/S	37	720,2	2,29	2,61	275,71	0,99	Stempel leicht medial
	38	488,0	1,26	1,33	365,81	0,98	
	39	998,3	3,52	2,40	415,95	0,98	
	40	493,7	1,99	2,32	212,72	0,99	
	42	581,4	1,27	1,23	474,4	0,98	nekrotisch laterale Kondyle
P/S	43	671,9	4,12	1,91	351	0,98	bei 300N erstes Versagen
	51	889,1	2,48	1,99	447,42	0,98	Schraube locker
	63	265,8	2,82	1,71	155,34	0,92	*Schaftbruch durch Einspannung
	64	668,1	2,84	3,46	193,16	0,93	
	67	509,4	1,51	1,68	303,16	0,99	
P/P	50	148,5	4,27	4,15	35,78	0,99	Osteotomiespalt nicht geheilt
	54	949,4	2,83	1,93	491,74	0,99	
	55	1094,8	4,46	3,57	306,98	0,98	Stempel eingedrückt ins Plateau
	56	450,2	4,25	2,76	162,98	0,99	Osteotomiespalt nicht geheilt
	58	364,4	2,74	2,86	127,58	0,96	*Schaftbruch durch Einspannung
	67	509,4	1,51	1,68	303,16	0,99	
Intakt	11	653,6	2,30	2,36	277,32	0,97	
	12	440,7	2,15	0,85	517,12	0,99	
	13	384,6	1,86	1,15	333,38	0,99	
	14	653,6	2,30	2,36	277,32	0,97	

Tab. 8 Ergebnisse Biomechanik

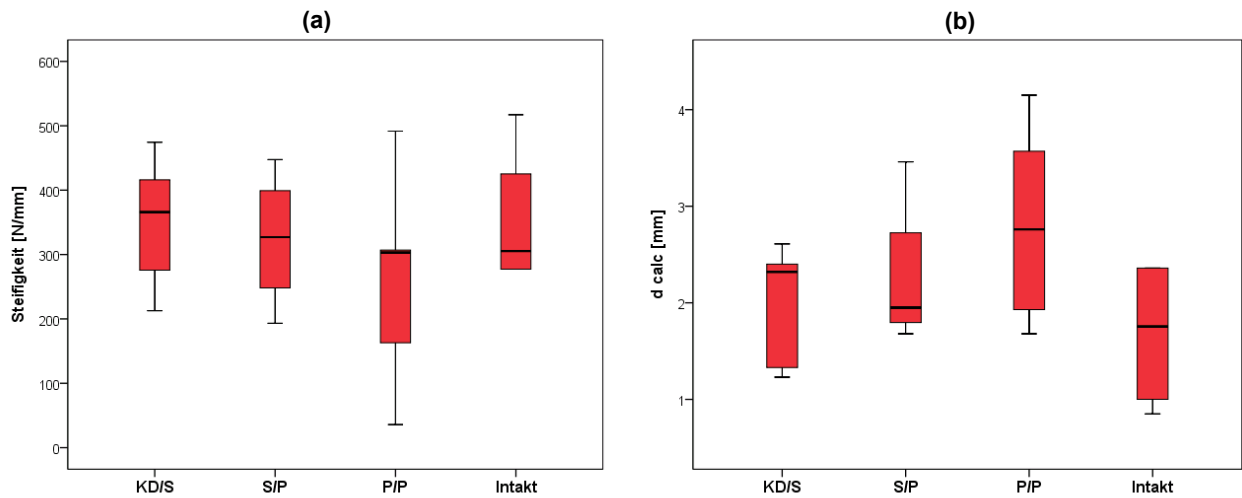
Fmax= maximale Kraft vor dem Versagen des Osteotomiespalt, dmax= maximale gemessene Verformung bei Fmax, dcalc= theoretische Verformung bei Fmax, Steifigkeit= ermittelte Steifigkeit aus linearem Bereich des Kraft-Verformungs-Diagramms, R²= Bestimmtheitsmaß für die Ermittlung der Steifigkeit.

*Probe für statistische Auswertung ausgeschlossen.

aufgetretene Setzungserscheinungen während der Versuchsdurchführung eliminiert, wurde dieser Wert zur Analyse herangezogen.

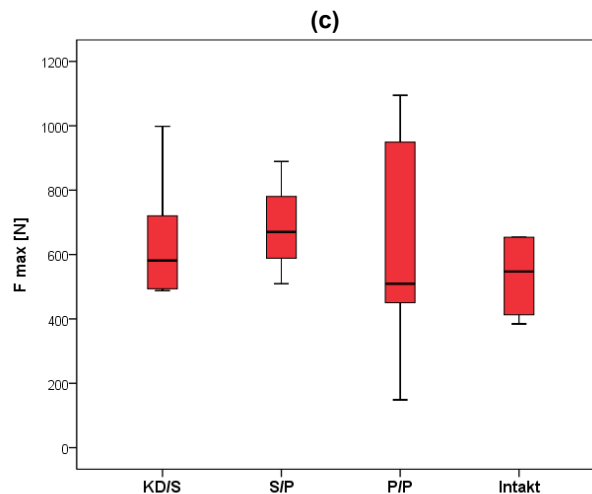
Die ermittelte durchschnittliche Steifigkeit betrug für die KD/S Gruppe 348,9N/mm (n=5), in der P/S Gruppe bei 323,7N/mm (n=4), in der P/P Gruppe bei 260,1N/mm (n=5) und bei den intakten Femura 351,3N/mm (n=4).

Abb. 65 Statistische Ergebnisse Biomechanik



(a) Boxplot Biomechanik Steifigkeitsvergleich. Es wurden keine signifikanten Unterschiede festgestellt.

(b) Boxplot Biomechanik Maximale-Verformung-Vergleich. Es wurden keine signifikanten Unterschiede festgestellt.



(c) Boxplot Biomechanik Maximale-Kraft-Vergleich. Es wurden keine signifikanten Unterschiede festgestellt.

Die statistische vergleichende Auswertung wies keine signifikanten Unterschiede sowohl für die Steifigkeiten (Abb. 65a) als auch für die maximalen Kräfte (Abb. 65b) und für die maximalen berechneten Verformungen (Abb. 65c) auf.

5 Diskussion

Bei der Anwendung des USS in der Traumatologie und operativen Orthopädie müssen verschiedene Voraussetzungen und Anforderungen an das Implantat und die ultraschallbasierende Insertionsmethode gestellt werden.

Grundvoraussetzungen sind Biokompatibilität, Festigkeit und Resorption des Materials, welche eine ungestörte Heilung und ein physiologisches Knochenremodelling erlauben müssen. Dieses wurde durch licht-, elektronenmikroskopische, immunhistochemische, histomorphometrische und biomechanische Verfahren ausgewertet. In nachfolgender Diskussion sollen die Ergebnisse kritisch analysiert und vergleichend diskutiert werden.

Die Biokompatibilität ist die Fähigkeit des Materials, eine angemessene Gewebereaktion des Empfängers bei spezifischer Applikation zu erzeugen. [Williams, DF et al; 1988]. Ein Material ist dann biokompatibel, wenn es weder toxisch, kanzerogen noch mutagen auf den Organismus wirkt. [Kawahara, H; 1985].

Die klinische Anwendung von bioresorbierbaren Kopolymeren (PLDLA identisch zum Material des in dieser Studie verwendeten Sonic Pins) gilt als sicher und biokompatibel [Prokop, A et al; 2004].

5.1 Tiermodell und Studiendesign

Für die Studie wurde ein Osteotomiemodell am Femurcondylus des Kaninchens gewählt. Die Frakturheilung des Säugetieres ist im Grundsatz nicht unterschiedlich zum Menschen. [Wissing, H et al; 1990]. Bei der Übertragung auf menschliche Verhältnisse muss allerdings die höhere Wachstumsgeschwindigkeit (Kaninchen/Mensch: Faktor 40) [Eitel, F et al; 1981] und die schnellere Frakturheilung (Kaninchen/Mensch: Faktor 3) berücksichtigt werden. [Orsini, G et al; 2004; Staets, E et al; 2007].

In der vorliegenden Studie wurden die Standzeiten so gewählt, dass möglichst die verschiedenen Phasen der Knochenheilung und Osteogenese beurteilbar sind. 7 Tage entsprechen hierbei der frühen Phase der Knochenheilung nach der Entzündungsreaktion und der Bildung von Granulationsgewebe, 21 Tage typischerweise der Umwandlung des Granulations- und Knorpelgewebes in

Geflechtknochen, 42 Tage der weit fortgeschrittenen Knochenneubildung und der Umwandlung von Geflechtknochen in Lamellenknochen und schließlich 84 Tage dem vollständigen Remodelling. Individuelle biologische Schwankungen, bedingt durch zum Beispiel der Reposition oder postoperativen Belastung, können die Osteogenese in ihrer Geschwindigkeit beeinflussen. Dieses konnte auch in der vorliegenden Studie beobachtet werden.

Das Femurkondylenmodell hat folgende wesentliche Vorteile: [Heiss, C; 2006]

1. Die Frakturheilung von Femurkondylenosteotomien beim Kaninchen ist von seinen Abläufen annähernd mit denen des Menschen vergleichbar.
2. Die exakte Definition von Sägeansatzpunkt und Sägerichtung gewährleisten ein einfaches, standardisiertes Osteotomiemodell.
3. Die beim Kaninchen im Vergleich zum Menschen im Zeitraffer ablaufenden physio-logischen Frakturheilungsvorgänge ermöglichen die Beurteilung einer kompletten Osteogenese.

Weitere Vorteile beim Kaninchen als Versuchstier sind die zahlreichen tierexperimentellen Untersuchungen und Ergebnisse zur Frakturheilung, die zum Vergleich herangezogen werden können. Darüberhinaus sind keine Allergien, Unverträglichkeiten, erhöhte Infektneigungen oder Abstoßungsreaktionen bei verschiedenen Osteosynthesematerialien bekannt. [Bostman, O et al; 1992; Egli, PS et al; 1988; Nunamaker, D et al; 1998]. Demgegenüber ist jedoch wegen der Robustheit des Modells und der generellen Einschränkung Ergebnisse aus tierexperimentellen Studien auf die humane Situation zu übertragen, die Limitation der Interpretation der Ergebnisse hervorzuheben.

Die Operationen verliefen größtenteils problemlos. Besondere Sorgfalt erforderte das Absetzen der Femurkondyle, da das Femur des Kaninchens relativ spröde ist. So führte dieser schwierige Operationsschritt bei vier Tieren aus der P/S Gruppe und bei vier Tieren aus der P/P Gruppe zu einer sekundären Femurschaftfraktur. Bei der Verwendung dieses Tiermodells für weiterführende Untersuchungen wird empfohlen, die Kondyle nicht vollständig abzuspalten, sondern die Osteotomie auf den Sägeschnitt zu beschränken.

Die genaue Vorbohrung und penible Dilatation für die Sonic Pins erwies sich als essentiell für eine erfolgreiche Ultraschallschweißung. Wurde dieses nicht erreicht,

traten bei den Sonic Pins ungewollte Schmelzungen im Kopfbereich auf. Die Schmelzungen resultierten vermutlich aus einem Verklemmen des Sonic Pins im suboptimal präparierten Bohrloch, die eine Oberflächenspannung im Implantatkopf hervorruft und somit zum Aufschmelzen führt. Diese Komplikation trat bei 8 Sonic Pins auf (Komplikationsrate 12,3%: 8 von 65 insgesamt verwendeten Sonic Pins) und der erstarrte Bereich musste mit dem Luer sorgfältig entfernt werden, was später häufig zu Osteolysen an der lateralen Kondyle führte.

Dieses sogenannte Kopfschmelzen wurde auch von LANGHOFF berichtet, wobei hier die histologische Untersuchung eine keilförmige Erscheinung des Umbaus in der Kortikalis unmittelbar am Implantateintrittspunkt ergab. Eine gestörte Vaskularisierung durch die Schmelzkappe wurde als Grund für eine vermehrte Resorption des Knochens in diesem Bereich vermutet. [Langhoff, JD; 2006]. Diese beschriebenen Beobachtungen könnten die bei den Tieren aufgetretenen Osteolysen erklären. Die durch die Kopfschmelze entstandene Hitze und die durch den Luer verursachte mechanische Beeinträchtigung des Gewebes initiierten vermutlich die festgestellten Osteolysen.

Die Operationsdauer war für die verschiedenen Gruppen in dieser Studie nicht signifikant unterschiedlich. Die zeitlichen Unterschiede zwischen den Implantationsschritten einer Schraube, eines K-Drahtes oder eines Sonic Pins waren nicht groß genug um die Gesamtdauer signifikant zu beeinflussen.

In der klinischen Anwendung beim Menschen ist dieses anders zu erwarten. Das Einschrauben einer resorbierbaren Schraube erfordert neben dem Vorbohren häufig das Vorschneiden des Gewindes und dauert damit wesentlich länger, als die USS Implantation eines resorbierbaren Pins. So wurde bei der Anwendung des Ultraschallschweißens in Cranioplastien die Operationsdauer im Vergleich zu konventionellen Verfahren um bis zu 50% reduziert [Eckelt, U et al; 2007].

5.2 Knochenheilung

Beim Vergleich der erarbeiteten Befunde in der Licht- und Elektronenmikroskopie der unterschiedlichen Standzeiten in der vorliegenden Studie konnten keine signifikanten Unterschiede zur physiologisch ablaufenden Frakturheilung festgestellt werden [Büttner, R et al; 2001, Thomas, C; 2001]. Allerdings schien die Heilung der P/S

Gruppe gegenüber der KD/S Gruppe leicht verzögert. So wies der Osteotomiespalt nach 42d bereits neben neu gebildeten Knochen trabekeln helles Knochenmark auf. In der P/P Gruppe wurden noch mehrere Knorpelareale und einige Fibrinanteile nachgewiesen. Die verzögerte Osteotomieheilung der P/P Gruppe war auffallend.

Dies könnte bei einigen Tieren dieser Gruppe durch eine instabile Fixierung der Osteotomie bei ausschließlicher Anwendung von Sonic Pins gedeutet werden. Bei zwei Tieren der P/P Gruppe waren beide Pins gebrochen. Die Ergebnisse weisen eindrücklich darauf hin, dass die operative Versorgung ausschließlich mit Sonic Pins nicht für postoperativ vollbelastete Frakturen (wie in unserem Modell der Femurkondylenosteotomie beim Kaninchen) geeignet ist. Es ist jedoch davon auszugehen, dass die Situation beim Menschen sich besser darstellen würde, da die Kaninchen direkt postoperativ voll belasten. Menschliche Patienten wären im Unterschied zu den Kaninchen in der Lage eine Fraktur postoperativ zu entlasten, so dass die Probleme, die bei diesem Osteotomiemodell am Kaninchen auftraten, beim Menschen nicht auftreten sollten. Inwieweit jedoch die Muskelkraft durch die zwingend notwendige Bewegungstherapie zur Osteotomie-/Frakturdislokation führt, bleibt einer weiteren experimentellen diesbezüglichen Untersuchung vorbehalten.

Nach 84d jedoch war das Remodelling bei allen Gruppen fast vollständig abgeschlossen. Im Osteotomiespalt, der nur noch durch kleinere Irregularitäten in der Kortikalis identifiziert werden konnte, wurde viel Knochenmark vorgefunden.

Ebenfalls auffällig waren die Unterschiede zwischen der mikroskopischen und makroskopischen Beurteilung der Osteotomieheilung bei allen Gruppen. Makroskopisch sah die Osteotomie oft weniger gut verheilt aus als mikroskopisch. Dies kann dadurch erklärt werden, dass makroskopisch nur die Kortikalis beurteilt werden kann, die bei der Osteotomieheilung zuletzt verheilt. Während häufig in der Spongiosa der Osteotomiespalt kaum noch zu erkennen ist, ist im Bereich der Kortikalis noch ein deutlicher Spalt erhalten. Dieser Befund bestätigt die Ergebnisse aus früheren Studien [Heiss, C; 2005].

Zur Absicherung der Erkenntnisse wurden zusätzlich immunhistochemische Markierungen mit Osteocalcin und PECAM durchgeführt und bewertet. Dabei zeigten die Markierung der Osteoblasten und deren Vorläuferzellen mit Osteocalcin keine Unterschiede zu den lichtmikroskopischen Befunden. Direkt am Interface der Implantate lagen keine Osteocalcin positiven Zellen. Allerdings wurden im

Granulationsgewebe in unmittelbarer Nähe viele Osteoblasten und deren Vorläuferzellen nachgewiesen. Mit zunehmender Standzeit nahmen diese vermehrt zu. Die Umwandlung des Knorpelgewebes in neuen Knochen trabekel erfordert Osteoblasten, die entsprechend nachgewiesen wurden. Nach 84d war der Osteotomiespalt lediglich durch dichte Knochen trabekel mit angelagerten Osteoblasten zu erkennen und in den Erosionslakunen traten gehäuft Osteocalcin positive Zellen auf. Diese Befunde decken sich mit den in der Literatur beschriebenen Erkenntnissen [Einhorn, TA; 1998].

Zur Beurteilung der Osteogenese wurde es als wichtig erachtet, aussproßende Blutgefäße zu untersuchen.

Die Angiogenese (von bestehenden Gefäßen aussproßende neue Gefäße) und die Vaskulogenese (neue Gefäße aus angioblastischen Stammzellen) nimmt eine wesentliche Stellung in der Frakturheilung ein [Jain, RK; 2003; Risau, W; 1997; Beck, L et al; 1997]. Das Endothel ist eine der wichtigen Komponenten in der Vaskularisierung, nicht nur wegen der Funktion als essentielle Barriere für Zellen und Moleküle im Austausch zwischen dem Gefäßsystem und dem Gewebe, sondern es ist ein aktives Organ zur direkten Kommunikation mit anliegendem Gewebe und den zirkulierenden Blutzellen [Cleaver, O et al; 2003]. Die Signalgebung ist bidirektional und erfolgt dabei über Hormone und Wachstumsfaktoren, Zytokine und Chemokine, reaktive Metabolite und polarisierte, oberflächenassoziierte Moleküle. [Brandi, ML et al; 2006].

Vaskularisierung spielt auch eine große Rolle in der Osteogenese und hämostatischen Aufrechterhaltung von lebendem Knochen. Ohne sie würde das Knochengewebe absterben und nicht repariert beziehungsweise erneuert werden können [Carano, R et al; 2003].

Osteoklasten produzieren während der Frakturheilung Heparinase, ein Enzym, das eine aktive Form des VEGF von Heparin freisetzt und dabei zur lokalen Angiogenese, zur Osteoklastformation und zur Kallusresorption in der enchondralen Ossifikationphase der Frakturheilung beiträgt [Saijo, M et al; 2003].

VEGF ist nicht nur ein wichtiger Regulator in der physiologischen Angiogenese [Kanczler J.M. 2008], sondern auch im Skelettwachstum [Zelzer, E et al; 2002] und in

der Knochenreparatur [Street, J et al; 2002; Chu, TW et al; 2002; Peng, H et al; 2002].

Eine Veränderung in der Gefäßversorgung zum Knochengewebe kann zu Skeletterkrankungen wie Osteonekrose [Childs S.G. 2005], Osteomyelitis [Lazzerini, L et al; 2002] und Osteoporose [Burkhardt, R et al; 1987; Alagiakrishnan, K et al; 2003] führen.

Die immunhistologischen Untersuchungen der aussprossenden Blutgefäße mit PECAM festigten die Befunde der Gewebeverteilung im Frakturspalt und um die Osteosynthesematerialien. Das Auftreten von PECAM positiven Zellen korrelierte mit dem vorliegenden Granulationsgewebe. Zunächst war eine Zunahme von 7d nach 21d durch vermehrt auftretendes Granulationsgewebe zu verzeichnen und dann, durch die fortschreitende Heilung, bei der Granulationsgewebe durch Knochen ersetzt wird, eine Abnahme der neuen Gefäße festzustellen. Wiederum gab es keine grundsätzlichen Unterschiede zwischen den einzelnen Osteosynthesemitteln, außer bei den Tieren aus der P/P Gruppe mit einer verzögerten Osteogenese, wahrscheinlich hervorgerufen durch eine mangelnde Stabilität der Sonic Pins und der damit verbundenen verzögerten Umwandlung des Granulationsgewebes.

Um die Osteotomieheilung objektiver beurteilen zu können, wurde der Osteotomiespalt histomorphometrisch vermessen.

In Anlehnung an eine histomorphometrische Messung der Gewebeanteile im Frakturspalt [Krischak, GD et al; 2007] wurden im Osteotomiespalt neu gebildeter Knochen, alter Knochen, Knorpel- und Binde- oder Granulationsgewebe vermessen und statistische Vergleiche durchgeführt. Gegenübergestellt wurden verschiedene Standzeiten und Gruppen, Standzeiten und Gewebsverteilungen, und die verschiedenen Gewebsarten innerhalb einer Standzeit und einer Gruppe.

Die erste Fragestellung war, ob es Unterschiede der Heilung im Osteotomiespalt bei der Verwendung von K-Draht und Schraube im Vergleich zu Sonic Pin und Schraube gab. Auf Grund der zu geringen Probenzahl für die KD/S Gruppe bei späteren Standzeiten konnte nur bei der 7d Standzeit diese Frage untersucht werden. Zusammenfassend konnten auch bei der Berücksichtigung der Tierzahl keine wesentlichen Unterschiede der Heilung festgestellt werden.

Als nächstes wurde der Einfluss von einem oder zwei Sonic Pins analysiert. Dieser Vergleich der P/S mit der P/P Gruppe war nur bei der 42d Standzeit möglich. Wiederum zeigten sich keine Signifikanzen, weshalb geschlossen werden kann, dass die Verwendung von 2 Sonic Pins im Vergleich zu einem, keinen Einfluss auf die Osteotomieheilung hat.

Die Untersuchung der Veränderungen der verschiedenen Gewebeanteile über die verschiedenen Standzeiten innerhalb der P/S Gruppe ergab signifikante Ergebnisse.

Gemessen wurde ein signifikant höherer Anteil von altem Knochen bei 7d im Vergleich zu 84d, ein geringerer Anteil von neu gebildetem Knochen bei 7d im Vergleich zu allen anderen Standzeiten, ein höherer Anteil von Knochenmark bei 84d im Vergleich zu 7d und 21d und eine Reduktion des Granulationsgewebes von 7d im Vergleich zu 84d.

Die Werte verdeutlichen, dass 7d post operationem die Osteotomieheilung noch nicht im Stadium der Knochenbildung ist. Die Osteotomieheilung variiert zwischen den einzelnen Tieren, ist bei manchen bei 42 Tagen bereits erfolgt und erstreckt sich bei einigen bis zur 84d Standzeit. Würdigt man die erarbeiteten histologischen, histomorphologischen und immunhistologischen Ergebnisse und vergleicht sie kritisch mit den Ergebnissen aus der jüngeren Literatur, so findet man durchaus Ähnlichkeiten der Ergebnisse der Osteotomieheilung [Heiss, C et al; 2005; Staets, E et al; 2007].

Weiterhin wurde untersucht, ob es Unterschiede in der Gewebeverteilung innerhalb einer Standzeit und dort innerhalb einer Gruppe gibt. Hierbei wurden keine Unterschiede bei der KD/S Gruppe der 7d Standzeit ermittelt. Auf Grund der zu geringen Probenzahl konnten die späteren Standzeiten der KD/S Gruppe nicht analysiert werden.

Bei der S/P Gruppe der 7d Standzeit wurde signifikant mehr Granulationsgewebe im Osteotomiespalt nachgewiesen. Bei der S/P der 21d, der 42d Standzeit und bei der P/P Gruppe der 42d Standzeit wurde eine signifikante Zunahme des neu gebildeten Knochens gemessen. Bei der P/S Gruppe der 84d Standzeit wurde ausschließlich neu gebildeter Knochen und Knochenmark im Frakturspalt angetroffen. Die Werte verdeutlichen, dass bei den Tieren der 84d Standzeit der Osteotomiespalt bereits knöchern durchbaut ist und die vielen kleinen Knochen trabekel, die während der

Osteotomieheilung beobachtet wurden, in einige wenige größere Knochentrabekel umgebaut wurden, zwischen denen viel helles Knochenmark liegt.

Zusammenfassend korrelierten die Unterschiede in der Gewebeverteilung im Osteotomiespalt mit der bei der Osteotomieheilung zu erwartenden Gewebeverteilung zu den entsprechenden Zeitpunkten. Die Osteotomieheilung bei einer zusätzlichen Stabilisierung mit einer Schraube differiert nicht wesentlich von der Heilung, wenn eine Schraube und ein K-Draht eingesetzt werden.

Der Fortschritt der Osteogenese hing in dieser Studie nicht vom verwendeten Implantatsystem ab, sondern vermutlich eher von der Qualität der Reposition und der Stabilität im Osteotomiespalt.

5.3 Interface der Implantate und Resorptionsverhalten des Pins

Das Einbringen von Osteosynthesematerialien kann eine Fremdkörperreaktion auslösen, die durch eine Infiltration von Makrophagen und die Fusion von einkernigen zu mehrkernigen Makrophagen charakterisiert ist.

7d nach der Operation traten erste einkernige und mehrkernige Makrophagen vereinzelt am Pin auf. Nach 21d traten diese gehäuft auf und erfuhren eine deutliche Steigerung nach 42d, und nochmals nach 84d. MAI berichtete von einer Schafstudie, in der ein USS Platten/Pin-System, bestehend aus einem ähnlichen Polymer wie der Sonic Pin, zur Fixierung einer Kondylenhalsfraktur der Mandibula verwendet wurde. Weder nach zwei noch nach neun Wochen gab es Anzeichen von Hitzenekrosen in der Implantatumgebung. Am Polymer-Knochen-Interface wurden histologisch nach zwei Wochen Makrophagen registriert, die mit deutlich gesteigerter Intensität nach neun Wochen am Pin beobachtet wurden [Mai, R et al; 2007].

Es stellte sich natürlich die Frage, ob ein Auftreten von Makrophagen bereits als Anzeichen einer Resorption gedeutet werden kann. Im Cytoplasma der Zelle befanden sich helle Regionen, bei denen es sich um aufgenommenes Pinmaterial handeln könnte. Um diese Vermutung abzusichern, wurde die Herstellung von Ultradünnschnitten und die Auswertung mittels Transmissionselektronenmikroskopie durchgeführt.

Die TEM Befunde bestätigten die lichtmikroskopischen Ergebnisse. Makrophagen wurden zu allen Standzeiten direkt am Sonic Pin gefunden. In der 84d Gruppe wurde abgebautes Pinmaterial im Lumen von Lymphgefäßen und von Venen gefunden. Dieser Befund könnte Aufschluß über den weiteren Verlauf des resorbierten Fremdmaterials geben. Aus aktuellen Untersuchungen von [Kilian, O et al; 2007] ist bekannt, dass Knochenersatzmaterialien (Hydroxylapatit) auch über das Lymphsystem abtransportiert wird. Zur genaueren Untersuchung wäre ein zukünftiger Tierversuch mit längeren Standzeiten, wie zum Beispiel 12 Monaten und 24 Monaten sinnvoll. Die Anzahl von nekrotischen Zellen durch die beim Implantieren entstehende Temperaturentwicklung war an allen Implantatinterfaces ähnlich und tolerabel.

LANGHOFF stellte im Schaftstiermodell nach 6 Monaten die ersten Risse in wenigen oberflächlichen Bereichen eines Polymerstiftes (ähnlich dem Sonic Pin) fest. Nach 2 Monaten wurden vereinzelt auftretende mehrkernige Riesenzellen gefunden, die nach 6 Monaten deutlich vermehrt waren [Langhoff, JD; 2006].

Zur genaueren Befundung und quantitativen Erfassung wurden die Makrophagen mittels CD68 Immunhistochemie angefärbt.

Die lichtmikroskopische Auswertung ergab, dass bei allen Standzeiten die CD68 immunpositiven Zellen nicht direkt am Interface des K-Drahtes und der Schraube, sondern im Granulationsgewebe in der näheren Umgebung vorzufinden waren.

Es war jedoch häufig eine wesentlich größere Ansammlung von Makrophagen in der näheren Umgebung der Schraube zu beobachten. Dies lässt sich dadurch erklären, dass im Umkreis der Schraube sehr viel mehr Knochenfragmente auftreten, als in der Umgebung des Pins und des K-Drahtes, wo viel Granulationsgewebe beobachtet wurde.

Beim Sonic Pin wurden die immunpositiven Zellen, mit zunehmender Anzahl bei längeren Standzeiten, direkt am Interface lokalisiert. Es wurde eine Korrelation zum Heilungsverlauf festgestellt. Bei guter Osteotomieheilung und wenig Granulationsgewebe direkt am Sonic Pin wurden sehr viele Makrophagen, die teilweise bis ins Pinmaterial hineinragten, nachgewiesen. Bei verzögerter Osteotomieheilung war die Anzahl der Makrophagen wesentlich geringer.

An den CD68 markierten Geweben wurde eine histomorphometrische Vermessung der Fremdkörperreaktion durchgeführt, mit dem Ziel die Unterschiede der Fremdkörperreaktion von Sonic Pin und Schraube, von den unterschiedlichen Standzeiten nach der Operation und von der P/S Gruppe zur P/P Gruppe, quantitativ zu vergleichen.

Es wurde die prozentuale Fläche der CD68 immunmarkierten Zellen am Interface verglichen. Die Zellgröße und die Lage der Zellen wurden hierbei nicht berücksichtigt.

Im Gegensatz zur qualitativen histologischen Bewertung, ergab die vergleichende quantitative Auswertung der Reaktionen um die Schrauben keine signifikanten Unterschiede zu denen um die Sonic Pins. Lichtmikroskopisch war der Eindruck entstanden, dass am Interface des Sonic Pins wesentlich mehr Makrophagen lokalisiert waren, als am Interface der Schraube. Die Unterschiede zur subjektiven Wahrnehmung bei der Durchsicht der Histologien könnten dadurch bedingt sein, dass die hier durchgeführten Messungen einen Bereich von 0,5 mm um das jeweilige Osteosynthesematerial einbezogen und dass im histologischen Präparat nicht alle Makrophagen erkannt wurden.

Es wurde auch die Reaktion um den Sonic Pin bei den unterschiedlichen Standzeiten verglichen. Hierbei wurde festgestellt, dass 42d nach der Operation signifikant mehr Fläche in der gemessenen Region durch CD68 immunreaktive Zellen eingenommen wird, als 84d nach der Operation. Tendenziell war ebenfalls 21d nach der Operation eine größere Fläche mit CD68 immunreaktiven Zellen bedeckt, als 84d nach der Operation.

Diese Zeitkurve scheint unabhängig vom Osteosynthesematerial zu sein. Dies zeigte der nächste Vergleich, bei dem die immunreaktive Fläche von Schraube und Sonic Pin von jeder Standzeit gemeinsam mit der Fläche der anderen Standzeiten verglichen wurde. Festgestellt wurde eine signifikante Vergrößerung der CD68 immunreaktiven Flächen bei 21d und 42d im Vergleich zu 84d, sowie beim Vergleich von 7d mit 21d. Dies deutet darauf hin, dass im vorliegenden Tierversuchsmodell nicht das Osteosynthesematerial entscheidend für den Zuwachs der prozentualen Fläche der CD68 Immunreaktion war, sondern der postoperative Zeitpunkt.

Ein abschließender Vergleich der Fremdkörperreaktion der P/P Gruppe und der S/P Gruppe bei 42d Standzeit zeigte keine signifikanten Unterschiede und bestätigte somit, dass die Anzahl der Pins keinen Einfluss auf die Reaktion hatte.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass der Sonic Pin keinen signifikanten Zuwachs der Fremdkörperreaktion nach Stabilisierung einer Fraktur im Vergleich zur Verwendung einer Schraube auslöst.

Eine bindegewebsartige Membran oder Kapsel wurde an keinem der Sonic Pins festgestellt, womit eine Fremdkörperreaktion auf das Implantat oder die Verwendung von Ultraschall als Insertionsmethode ausgeschlossen werden kann [Bergsma, EJ et al; 1993; Hoffmann, R; 1997; Donath, K; 1992]. Des Weiteren darf geschlussfolgert werden, dass es keine über das Maß hinausgehenden Hitzenekrosen durch die ultraschallgestützte Implantationstechnik gab.

Abschießend kann postuliert werden, dass die neuartige Methode der Knochenfixation bzw. des Knochenverschweißens eine gute knöchernen Integration des Osteotomiespaltes zeigte und das Sonic Pin Material eine sehr gute Biokompatibilität aufwies. Nach 84d konnten Abbauprodukte des Sonic Pin Materials in Venen und Lymphgefäßen und somit die Resorption nachgewiesen werden. Jedoch ist für eine genauere Untersuchung der Resorptionswege eine Langzeitstudie erforderlich.

LANGHOFF beurteilt die Biokompatibilität der eingeschweißten Implantate in einer Schafstudie als fehlende Anzeichen von Entzündungsreaktionen und einer erfolgten Integration des Implantates in den Knochen. Die Implantate verursachten keine Entzündungsreaktionen und waren nach zwei Monaten signifikant mehr von Knochen umgeben. Nach 6 Monaten war der neu gebildete Knochen bereits umgebaut und in seiner Struktur optimiert. Die Titanimplantate zeigten eine tendenziell größere Knochendichte als die PLA Implantate [Langhoff, JD; 2006].

Hochleistungsultraschall wird in der Medizin therapeutisch z.B. in der hyperthermischen Behandlung von Tumoren [Dewey, WC; 1994; Rivens, I et al; 2007] oder zur Knochenstimulation [Watanabe, Y et al; 2010; Iwashina, T et al; 2006; Malizos, KN; 2006] eingesetzt. Hierbei wird jedoch mit wesentlich höheren Leistungen und einer längeren Expositionszeit gearbeitet. Auch wenn das USS mit einer vergleichsweise viel geringeren Leistung eingesetzt wird, ergab sich die Frage

nach der lokalen Temperaturerhöhung und damit der potentiellen Gefahr der Verletzung der zellulären knöchernen Bestandteile bis hin zu deren Absterben. FERGUSON platzierte in einer Studie im Kadaverknochen Temperaturfühler im Abstand von 0,5mm bis 1mm von der Implantatoberfläche. Die Ergebnisse zeigten eine über wenige Sekunden wirkende durchschnittliche Temperaturerhöhung von 14°C bis maximal 22°C [Ferguson, SJ et al; 2002]. Diese Werte sind sowohl in ihrer Höhe als auch in ihrer Einwirkzeit deutlich geringer als intraoperativ auftretende Temperaturerhöhungen beim notwendigen Aufbohren der Markhöhle bei Verriegelungsnagelosteosynthesen [Bennington, IC et al; 2002; Davidson, SRH et al; 2003], beim Sägen mit der oszillierenden Säge [Stanczyk, M et al; 2004], bei der intramedullären Zementierung von Prothesen [Goodman, SB et al; 1985] oder bei Vertebroplastien mit Knochenzementen [Deramond, H et al; 1999; Baroud, G et al; 2006].

5.4 Biomechanik

In der vorliegenden Arbeit wurde der Osteotomiespalt hinsichtlich seiner biomechanischen Festigkeit nach 42 Tagen Standzeit getestet und als wichtige Parameter zur Beurteilung dabei die Steifigkeit, die maximale Kraft und die Verformung der Kondyle herangezogen.

Die Einspannung der Präparate zeigte sich in zwei Fällen als problematisch, da diese in der diaphysären Aufnahme versagten. Hierzu trug möglicherweise die Einspannungsart per multiple Zylinderstifte in der universellen Spannvorrichtung bei. Die Zylinderstifte üben eine punktuelle mechanische Spannung auf die Diaphyse der Präparate aus, die während der biomechanischen Testung im ungünstigen Fall zur Überbeanspruchung beiträgt. Hier sollte für spätere Studien als Alternative eine homogenere Einspannung, z.B. Kunstharzeinbettung verwendet werden.

Die Ergebnisse ergaben keine signifikanten Unterschiede sowohl im Vergleich innerhalb der Gruppen, als auch mit der für die Biomechanik definierten Kontrollgruppe, den intakten Femura.

Aus den gleichen Steifigkeitswerten lässt sich schließen, dass die physiologischen Belastungen durch die operierten Kondylen gut übertragen werden können.

Bei zwei Tieren aus der P/P Gruppe war die Osteotomie nicht durchbaut. Dieses kann nicht eindeutig auf eine Ursache zurückgeführt werden. Möglicherweise war die

Reposition suboptimal, die Fixation durch die Implantate nicht ausreichend oder aber die postoperative Belastung zu hoch. Da bei den restlichen Tieren die maximalen Lastniveaus denen der Kontrollgruppe glichen, lässt sich jedoch definitiv eine grundsätzliche biomechanische Überbelastung während der Heilungsphase ausschließen.

Für eine physiologische Frakturheilung ist eine optimale Fixation durch die Osteosyntheseverfahren notwendig [Lujan, TJ et al; 2010]. Da sämtliche Gruppen ähnliche Lastniveaus erreichten wie die unoperierte Kontrollgruppe, ist der Schluss zulässig, dass alle verwendeten Implantate eine erfolgreiche Osteotomieheilung ermöglichten.

Die maximalen Verformungen waren ebenfalls auf gleichem Niveau wie die der Kontrollgruppe. Folgernd wurde die Durchbiegung im Osteotomiespalt nicht negativ durch ein zu biegeweiches Implantat beeinflusst. Andere Autoren zeigten, dass bioresorbierbare Implantate zur Fixation geeignet sind [Claes, LE et al; 1996].

Hieraus lässt sich schließen, dass die Festigkeit des Osteotomiespalt unbeeinflusst von der Insertionsmethode der Implantate und den verwendeten Osteosynthesemitteln ist.

ABDULAZIM und Mitarbeiter untersuchten die Scherfestigkeit eines Sonic Pins im Vergleich zu einer Titanspongiosaschraube (4mm Durchmesser) in frisch gefrorenen humanen Tibiae. Als Frakturmodell wurde eine Osteotomie des medialen Maleolus gewählt. Die maximale Kraft bei der Titanschraube war ungefähr doppelt so hoch wie die beim Sonic Pin [Abdulazim, A et al; 2008].

Zusätzlich zeigten statische Pullout- und Scherversuche in Spongiosablöcken von Rinderwirbelkörpern ähnliche Versagensfestigkeiten für zwei Sonic Pins verglichen mit einer Titanschraube [Abdulazim, A et al; 2008]. Die in dieser experimentellen Arbeit gewonnenen Ergebnisse lassen schlussfolgern, dass die Verwendung von zwei Sonic Pins bei der Stabilisierung einer Osteotomie eine zu einer 4mm Titanschraube vergleichbare Scher- und Pulloutfestigkeit aufweisen.

Die Ergebnisse unterstützen die Schlussfolgerung, dass biomechanisch eine hinreichende Versorgung der Osteotomie durch die Verwendung von zwei Sonic Pins vorliegt, da diese vergleichbare Scher- als auch Pullout-Festigkeit bieten, wie eine 4mm Titanspongiosaschraube.

Darüberhinaus finden sich neben dem hier untersuchten System auch andere auf Ultraschall basierende resorbierbare Osteosynthesemittel, die interessante biomechanische Aspekte in den spezifischen Studien gezeigt haben.

Bei der Untersuchung eines winkelstabilen Osteosynthesystems, bestehend aus mehreren in einer Platte verschweißten Pins, zeigte sich in einer Schafstudie am Craniosynostosemodell ein deutlicher Stabilitätsvorteil gegenüber einem unverschweißten System [Pilling, E et al; 2007].

Am Knochenmodell [Ferguson, SJ et al; 2006], sowie an humanen osteoporotischen Knochen [Meyer, DC et al; 2006], wurden ultraschallgestützt resorbierbare Pins implantiert. In hochporösen und spröden Substraten (wie beim osteoporotischen Knochen) fand sich in beiden Studien eine signifikant verbesserte Verankerung durch die vorteilhafte Kopplung der Knochenstruktur mit den eingeschmolzenen Implantaten.

5.5 Das USS im Vergleich zu anderen Technologien

Das USS könnte eine alternative Lösung zu den Forschungen und der Anwendung von Knochenklebesystemen darstellen. Im Folgenden wird ein zusammenfassender Überblick zum Stand der Kleberforschungen beschrieben.

Knochenkleber, die nach ihrer Funktionserfüllung resorbiert und zu nicht toxischen Substanzen umgebaut werden, sind seit langem von großem Forschungsinteresse [Heiss, C et al; 2006]. Der Vorteil eines Klebers ist die optimierte Kraftverteilung von einer Frakturseite zur anderen, da die Verbindung die gesamte Fläche nutzt und nicht wie beim Einsatz von gängigen Osteosynthesemitteln nur wenige Kontaktstellen [Donkerwolke, M et al; 1998]. Ein zusätzlicher Vorteil im Vergleich zu metallischen Implantaten könnte die Vermeidung von zu rigiden Osteosynthesen durch den Einsatz eines wesentlich elastischeren Klebers sein [Heiss, C et al; 2003].

Für die Frakturheilung von Vorteil wäre auch die ungestörtere Blutversorgung, vor allem von der periostalen Seite, im Vergleich zu Metallsystemen [Donkerwolke, M et al; 1998].

Der erste Versuch einen Knochenkleber zu benutzen kam vor mehr als 4000 Jahren aus Ägypten. Seit dem wurden viele Materialien erforscht und erprobt. Trotz dieser

sehr langen Geschichte in der medizinischen Kleberforschung ist bis heute kein klinisch anwendbarer Knochenkleber bekannt [Heiss, C. et al; 2006].

Kleber sind Substanzen, die aufgrund von molekularer Anziehung und im Gegensatz zu Zementen auf einer Oberfläche haften, die auf eine mechanische Verbindung zur umgebenden Struktur beruhen [Charnley, J; 1996]. Bei einem guten Kleber ist die Adhäsion und Kohäsion genauso stark wie die interne Kohäsion der Objekte, die zusammengefügt werden sollen [Rimpler, M; 1994].

Grundsätzlich können Knochenadhäsive in synthetische (Epoxyharze, Polyurethanschaum, Cyanoacrylate, Polymethylmethacrylate) und biologische (Fibrinadhäsive, Adhäsive auf Peptidbasis) Materialien eingeteilt werden [Heiss, C et al; 2006]. Epoxyharze initiieren fibröse Kapseln um den Adhäsive, die eine Barriere für die Kallusbildung darstellen und bedingen durch die Polymerisationshitze Gewebenekrosen [Donkerwolke, M et al; 1998]. Polyurethanschäume zeigten eine langsame Resorption, geringe Adhäsion und führten in vielen Studien zu Pseudarthrosen, Infektionen und Gewebenekrosen. [Buchner, H et al; 1962, Hullinger, L. 1962]. Cyanoacrylate führten ebenfalls in Studien zu Infektionen und schweren lokalen Reaktionen [Brauer, GM; 1979; Meyer, G et al; 1979]. Polymethylmethacrylate (PMMA) werden im Dentalbereich seit 1930 und zur Prothesenzementierung eingesetzt. CHARNLEY und KETTLEWELL erprobten die Verwendung bei Hüftendoprothesen. Menschliche Frakturen heilen um PMMA, wenn nicht die gesamte Frakturfläche vom Zement okkludiert ist [Charnley, J; 1966]. PMMA dient daher häufig als Defektfüller oder zur Augmentation von konventionellen Implantaten in verschiedenen Fraktursituationen [Heiss, C et al; 2006].

Fibrinadhäsive sind weit verbreitet in der Weichteilklebung mit sehr guten Eigenschaften in Bezug auf Hämostasis, Heilung, Vaskularisierung in Knochengrafts und Bänderrefixationen. Die mechanische Stabilität ist dabei so gering, dass der Einsatz nur bei Knochenfragmenten in Frage kommt, bei denen keine oder nur sehr geringe biomechanische Belastungen wirken [Bosch, P; 1981]. Osteochondrale Defekte sowie Nervenverbindungen sind derzeit die empfohlene Anwendung.

Wasserpflanzen und Muscheln benutzen Kombinationen aus Proteinen und Polysacchariden als Klebstoff [Kitamura, M et al; 1999]. Die Adhäsionseigenschaft dieser Materialien ist sehr stark, allerdings ist die industrielle Herstellung sehr aufwendig, da eine große Anzahl von Muscheln in äußerst schwierigen Prozessen

benötigt wird. Eine klinische Anwendung ist derzeit noch nicht abzusehen und es werden Schwierigkeiten mit allergischen Reaktionen auf diese großen fremden Proteine in vivo erwartet [Kitamura, M et al; 1999].

Die Problematik eines Knochenklebesystems besteht darin, einen Kleber mit optimalen Adhäsions-, Resorptions- und Biokompatibilitätseigenschaften zu finden. Verläuft die Degradation zu schnell, oder die Osteogenese zu langsam, so hat keine ausreichende Frakturüberbrückung stattgefunden und die Verbindung wird instabil. Verläuft die Degradation zu langsam, besteht im Frakturspalt kein Platz für die Knochenneubildung. Aus diesen Gründen war es in der Vergangenheit nicht möglich, ein Klebesystem für die Frakturheilung zu etablieren, da die Knochenneubildung und die Kleberdegradation den gleichen Raum einnehmen [Heiss, C et al; 2005].

Hier könnte das USS eine Alternative zu den Klebstoffen darstellen. Durch das Einschweissen des Implantates wäre eine primärstabile Osteosynthese erreichbar. Da der durch das USS zunächst aufgeschmolzene und dann erstarrte Bereich des PLA Materials nicht im kritischen Raum für die Knochenneubildung des Frakturspaltes liegt, ist eine ungestörte Heilung zu erwarten. Des Weiteren ist auch die Degradationszeit wesentlich unkritischer, da das Implantat von Anfang an genug Raum für die Osteogenese lässt.

Das untersuchte USS System steht in direkter Konkurrenz zu verschiedenen anderen Verfahren, die eine erhöhte Primärstabilität adressieren, und die sich durch eine verbesserte Tragfähigkeit in der Spongiosa, ein geringeres Operationstrauma, in der Einfachheit der Anwendung und in der Dauer bis zur vollen Belastbarkeit unterscheiden (Tab.9).

Das USS weist dabei potentiell ein ausgeglichenes Eigenschaftsprofil auf, welches vor allem auf der schnell erreichbaren maximalen mechanischen Tragfähigkeit beruht [Mayer, J et al; 2008].

Die Technik des USS wird seit 2005 in der kranio-maxillofazialen Chirurgie eingesetzt [Mayer, J et al; 2008]. Das Implantatdesign basiert auf einem konventionellen resorbierbaren Platten/Schrauben System, bei dem die Schrauben durch kurze Pins ersetzt wurden.

Technologien	Tragfähigkeit in Spongiosa	Trauma durch Operation	Einfachheit der Anwendung	Zeit bis zur vollen Tragfähigkeit
Ultraschallschweißen	++	++	++	++
Press-fit basierte Verankerung	+	+++	+++	-
Polymerer Knochenzement	+++	+	++	+
In-situ polymerisierende, degradable Polymere	++	-	+	+
Biodegradable Knochenzemente	+	+	-	+
Kleber	-	-	-	+
Mechanische Expansionssysteme	+	+	-	+++

Tab. 9 Qualitative Bewertung von etablierten und in Entwicklung befindlichen Ansätzen zur Erhöhung der Primärstabilität [Modifiziert nach Mayer, J et al; 2008]

In-vivo-Vergleichs-Studien zu nicht eingeschweißten Implantaten zeigten für die Indikationen der Kraniotomie [Pilling, E et al; 2007] und der Osteotomie am Kiefergelenk [Mai, R et al; 2007] hinsichtlich Biokompatibilität und Funktionalität gute Ergebnisse.

5.6 Ausblick

Die Ultraschallschweißung von Knochen und Fragmenten ist ein zukunftsweisendes und innovatives Verfahren mit einem vielfältigen Einsatzspektrum in der operativen Traumatologie und Orthopädie, um Knochen einfach und schnell miteinander zu verbinden, selbst unter schwierigen Randbedingungen. Der axiale Implantationsprozess bietet neue Ansätze in der Implantatkonstruktion, da für die Implantation keine Rotation erforderlich ist [Mayer, J et al; 2008].

REHM berichtet von 5% Dislokationsproblemen in einer prospektiv randomisierten Radiusköpfchenfrakturstudie bei der Verwendung von resorbierbaren Pins [Rehm, KE et al; 1997]. Das USS des Pins könnte hier möglicherweise zu einer Reduktion dieser Komplikation führen. Allerdings sind hierfür weitere klinische Studien notwendig.

Vermehrte Anwendungen der Technologie auf weitere traumatologische Indikationen werden entscheidend davon abhängen, ob es gelingt, höheren biomechanischen Belastungen gerecht zu werden.

Ein vielversprechender Ansatz sind zukünftige Hybridimplantate, bei denen eine Kombination aus Metall und Polymer realisiert wird. Hierbei wird die Primärstabilität durch eine Polymer-Augmentierung des metallischen Implantates erreicht, bei gleichzeitiger Langzeitstabilität durch den metallischen Grundkörper [Zander, N: 2007].

Ein weiteres Konzept wären polymerbeschichtete, metallische Schrauben-Platten-Systeme, die durch Ultraschall eine winkelstabile Schraubenkopf-Platte Verbindung erreichen [Sonntag, R; 2007].

Die Kombination von potentiellen Arzneistoffen mit bioabbaubaren Polymeren, deren kontinuierliche Arzneistofffreisetzung über die Degradation des Polymers gesteuert werden könnte, stellt einen weiteren interessanten Ansatz dar [Gollwitzer, H; 2003].

6 Zusammenfassung

Die Fixation von Osteosynthesematerialien in strukturgeschwächtem Knochen, wie zum Beispiel der Osteoporose, ist eine ungelöste Herausforderung für die Unfallchirurgie und Orthopädie. Die ultraschallgestützte Implantatfixation könnte hier eine mögliche Lösung darstellen. Beim Ultraschallschweißen (USS) wird die Oberfläche eines thermoplastischen Implantates im Kontakt mit Knochen durch hochfrequente Vibrationen lokal aufgeschmolzen. Das Material dringt in die poröse Knochenstruktur ein, erstarrt innerhalb weniger Sekunden und führt zu einer Osteotomie- (Fraktur-) stabilisierung.

Ziel der vorliegenden experimentellen Arbeit war es, den Einfluss eines neuen resorbierbaren Poly-(L-DL)-Laktid-Pin (Sonic Pin) nach Einsatz des USS auf die physiologischen knöchernen Umbauvorgänge in ihrem zeitlichen Ablauf radiologisch, histologisch, immunhistochemisch, elektronenmikroskopisch und histomorphometrisch darzustellen. Des Weiteren wurde nach erfolgter Heilung biomechanisch die Festigkeit des Konstruktes untersucht.

Als Tierspezies wurde das Kaninchen gewählt, da die Knochen in Struktur und Stoffwechsel den menschlichen Verhältnissen sehr nahe kommen.

Ein standardisiertes Osteotomiemodell am Femurcondylus diente für die Untersuchungen. Die Osteotomie wurde entweder mit einem Sonic Pin und einer Titanschraube oder mit einem K-Draht und einer Titanschraube (Kontrolle) stabilisiert. Zusätzlich wurde für die 42 Tage Standzeit eine Tiergruppe mit zwei Sonic Pins versorgt.

Am Ende der Nachbeobachtungszeit von 7, 21, 42 und 84 Tagen wurden die Tiere getötet und die entsprechende Extremität den verschiedenen Auswertemethoden zugeführt. Quantitative und qualitative Untersuchungen, Mikro-Computertomographie, Schliffpräparate, Semidünnschnittverfahren, Lichtmikroskopie und Transmissionselektronenmikroskopie sowie biomechanische Tests konnten für die experimentelle Arbeit herangezogen werden.

Im histologischen Schliff konnte eine ungestörte Knochenneubildung über Granulationsgewebe, Geflechtknochen und Lamellenknochen für alle Gruppen nachgewiesen werden. Die immunhistochemische Untersuchung der Markierung von

Makrophagen, von Osteoblasten und neu einsproßenden Gefäßen bestätigte die lichtmikroskopischen Befunde.

Histomorphometrisch konnte nachgewiesen werden, dass die Gewebeverteilung im Osteotomiespalt unbeeinflusst von den verschiedenen Osteosynthesemitteln der einzelnen Gruppen war und dass der Sonic Pin keine nachweisbare Fremdkörperreaktion verursachte.

An den Osteosynthesematerialien befanden sich keine Anzeichen von Resorptionssäumen oder Abkapselungen.

Biomechanisch zeigten alle Femurkondylen eine hinreichende Festigkeit. Die Steifigkeiten, Dehnungen und maximal übertragbaren, statischen Lasten waren nicht signifikant verschieden.

Am resorbierbaren Polylaktid des Sonic Pins waren viele ein- oder mehrkernige Makrophagen lokalisiert, die das Material abbauten. Hinweise über die Ausscheidung der Abbauprodukte über das Lymph- oder Gefäßsystem konnten bei der 84 Tage Standzeit nachgewiesen werden.

Die ultraschallgestützte Implantatfixation hatte keinen negativen Einfluss auf das physiologische Knochenremodelling in dieser experimentellen Studie. Der Einsatz des Sonic Pins zur Fixation von Frakturen kann unter ausgewählten biomechanischen Bedingungen und entsprechenden postoperativen Belastungseinschränkungen empfohlen werden.

Es wird aufgrund der hier erzielten Ergebnisse empfohlen in Form einer Langzeitstudie, ggf. auch in osteoporotischem Knochen das Resorptionsverhalten des Polylaktids zu untersuchen.

7 Summary

The fixation of implants in structurally weakened bone, e.g. osteoporotic bone, remains a challenge in Traumatology and Orthopaedics. The ultrasound based welding of implants may represent a potential solution. Using ultrasound on a thermoplastic implant leads to high frequency vibration and hence to a melting of the surface of the implant material, which is in contact with the bone. The molten material penetrates into the porous structure of the bone, solidifies in a few seconds and results in a stabilized fracture or osteotomy.

The objective of this experimental project was to investigate the influence on the bone remodelling process when a new resorbable pin (Sonic Pin) made from Poly-(L-DL)-Lactide was inserted with ultrasound. The investigation was conducted by means of radiology, histology, immunohistology, electronmicroscopy and histomorphometric methods. In addition after healing of the osteotomy a biomechanical strength test was performed.

A Lapine animal model was chosen because the structure and metabolism of the bone was considered to be comparable to human bones.

A standardized osteotomy model of the condyle of the femur was used. The osteotomy was either stabilized with a Sonic Pin and a Titanium Screw or with a K-wire and a Titanium Screw (control group). For the 42 day timeframe, an additional group treated with two Sonic Pins was implemented.

At the end of the different observation times of 7, 21, 42 and 84 days the animals were sacrificed and the corresponding extremity investigated by the various methods. Quantitative and qualitative methods, Micro Computer Tomography, cutting-grinding-technique for hard tissue, semi-thin cuts, light microscopy and transmission electron microscopy as well as biomechanical testing were utilized for examination.

New undisturbed development of bone via granular tissue, cancellous bone and laminar bone could be demonstrated for all groups on histological specimens. The immunohistochemical marking of macrophages, osteoblasts and new blood vessels supported the results seen with the light microscope.

It could be histomorphologically proven that the tissue distribution in the osteotomy gap was not influenced by the different fixation treatments of the groups and the Sonic Pin caused no noticeable negative foreign body reaction.

None of the implants used to stabilize the osteosynthesis showed a resorption layer or isolation gap.

Biomechanically all femora in all groups achieved a sufficient strength and there was no significant difference between the groups in terms of stiffness, maximal static load and elongation.

The interface of the resorbable polylactide showed many single nucleated or multiple nucleated macrophages resorbing the material. At 84 days preliminary evidence could be observed for the eliminative process of the polylactide via the lymphatic and vascular system.

The ultrasound implant fixation did not impede physiological bone remodelling in this study. The use of the Sonic Pin for the fixation of fractures can be recommended under the restriction of biomechanical loads and a corresponding post operative protocol.

Further to the results of this investigation a longer term study in osteoporotic bone is proposed to further research the resorption process of the polylactide.

8 Verzeichnisse

8.1 Literaturverzeichnis

- 1 Abdulazim A, Penzkofer R, Wipf F, Augat P. 2008. Vortrag 16th ESB Congress 7.Juli 2008. J Biomech; 41 (S1): 93.
- 2 Alagiakrishnan K, Juby A, Hanley D, Tymchak W, Sclater A. 2003. Role of vascular factors in osteoporosis. J Gerontol A Biol Sci Med Sci; 58: 362-366.
- 3 Ambrose CG, Clanton TO. 2004. Bioabsorbable implants: review of clinical experience in orthopedic surgery. Ann Biomed Eng; 32: 171-177.
- 4 Augat P. 1995. Biomechanik und Morphometrie des Kallusgewebes bei der sekundären Frakturheilung: Dissertationsschrift der Medizinischen Fakultät der Universität Ulm.
- 5 Baroud G, Swanson T, Steffen T. 2006. Setting properties of four acrylic and two calcium-phosphate cements used in vertebroplasty. Journal of Long-Term Effects of Medical Implants; 16: 51–59.
- 6 Beck L, D'Amore P. 1997. Vascular development: Cellular and molecular regulation. FASEB J; 11: 365-373.
- 7 Becker W, Hujoel PP, Becker BE, Willingham H. 2000. Osteoporosis and implant failure: an exploratory case-control study. J Periodontol; 71(4): 625-631.
- 8 Benninghoff, Drenckhahn. 2003. Anatomie: Bd.1. Makroskopische Anatomie, Histologie, Embryologie, Zellbiologie. Urban & Fischer Verlag 145-185.
- 9 Bennington IC, Biagioni PA, Briggs J, Sheridan S, Lamey P-J. 2002. Thermal changes observed at implant sites during internal and external irrigation. Clin Oral Impl Res; 13: 293–297.
- 10 Bergsma EJ, Rozema FR, Bos RR, de Bruijn WC. 1993. Foreign body reactions to resorbable poly(L-lactide) bone plates and screws used for the fixation of unstable zygomatic fractures. J Oral Maxillofac Surg; 51(6): 666-670.
- 11 Bonewald LF. 2007. Osteocytes as dynamic multifunctional cells. Ann N Y Acad Sci; 1116: 281-290.
- 12 Bosch P. 1981. Die Fibrinspongiosaplastik. Experimentelle Untersuchungen und klinische Erfahrung. Wien Klin Wochenschr (Suppl); 124: 1-26.
- 13 Bostman O, Paivarinta U, Partio E, Vasenius J, Manninen M, Rokkanen P. 1992. Degradation and tissue replacement of an absorbable polyglycolide screw in the fixation of rabbit femoral osteotomies. J Bone Joint Surg; 74(7): 1021-1031.
- 14 Boyle WJ, Simonet WS, Lacey DL. 2003. Osteoclast differentiation and activation. Nature; 423(6937): 337-342.
- 15 Brandi ML, Collin-Osdoby P. 2006. Perspective. Vascular Biology and the Skeleton. Journal of bone and mineral research; 21: 183–192

- 16 Brauer GM, Kumpula JW, Termini DJ, Davidson KM. 1979. Durability of the bone between bone and various 2-cyanoacrylates in an aqueous environment. *J Biomed Mater Res*; 13: 593-606.
- 17 Brug E, Braunsteiner E, v. Gemmern C. 1976. Die Ultraschallverschweißung von Knochen. *Chirurg*; 47: 555-558.
- 18 Buchner H, Feischl P. 1962. Spätergebnisse bei der Behandlung von Knochenbrüchen mit Polyurethanschaum. *Arch Orthop Unfallchir*; 54: 48-57.
- 19 Büttner R, Thomas C. 2001. *Allgemeine Pathologie*. Schattauer, Stuttgart 27-79: 141-181.
- 20 Burkhardt R, Kettner G, Bohm W, Schmidmeier M, Schlag R, Frisch B, Mallmann B, Eisenmenger W, Gilg T. 1987. Changes in trabecular bone, hematopoiesis and bone marrow vessels in aplastic anemia, primary osteoporosis, and old age: a comparative histomorphometric study. *Bone*; 8:157-164.
- 21 Burns AE, Varin J. 1998. Poly-L-lactic acid rod fixation results in foot surgery. *J Foot Ankle Surg*; 37: 37-41.
- 22 Carano R, Filvaroff E. 2003. Angiogenesis and bone repair. *Drug Discov Today*; 8:980-989.
- 23 Charnley J. 1966. The healing of human fractures in contact with self-curing acrylic cement. *Clin Orthop*; 47: 157-63.
- 24 Childs SG. 2005. Osteonecrosis: death of bone cells. *Orthop Nurs*; 24: 295-301
- 25 Chu TW, Wang ZG, Zhu PF, Jiao WC, Wen JL, Gong SG. 2002. Effect of vascular endothelial growth factor in fracture healing. *Zhongguo Xiu Fu Chong Jian Wai Ke Za Zhi*; 16: 75-78.
- 26 Claes LE, Ignatius AA, Rehm KE, Scholz C. 1996. New bioresorbable pin for the reduction of small bony fragments: design, mechanical properties and in vitro degradation. *Biomaterials*; 17: 1621-1626.
- 27 Cleaver O, Melton DA. 2003. Endothelial signaling during development. *Nat Med*; 9: 661-668.
- 28 Compston JE. 1998. Bone histomorphometry. In: *Methodes in bone biology*. Arnett TR, Henderson B, eds., Chapman&Hall, London Weinheim New York Tokyo Melbourne Madras: 177-194.
- 29 Daniels AU, Chang MK, Andrano KP. 1990. Mechanical properties of biodegradable polymers and composites proposed for internal fixation of bone. *J Appl Biomater*; 1: 57-78.
- 30 Davidson SRH, James DF. 2003. Drilling in Bone: Modelling heat generation and temperature distribution. *Journal of Biomechanical Engineering*; 125: 305–314.
- 31 Debrunner AM. 2002. *Orthopädie – Orthopädische Chirurgie. Patientenorientierte Diagnostik & Therapie des Bewegungsapparates*. Hans Huber Verlag.
- 32 Deramond H, Wright NT, Belkoff SM. 1999. Temperature elevation caused by bone cement polymerization during vertebroplasty. *Bone*; 25: 178–218.
- 33 Dewey WC. 1994. Arrhenius relationships from the molecules and the cells to the clinic. *Int J. Hyperthermia*; 10: 457–483.

-
- 34 Donath K, Breuner G. 1982. A method for the study of undecalcified bones and teeth with attached soft tissues. The Sage-Schliff (sawing and grinding) technique. *J Oral Pathol*; 11(4): 318-326.
- 35 Donath K. 1987. Die Trenn-Dünnschliff-Technik zur Herstellung histologischer Präparate von nicht schneidbaren Geweben und Materialien. Exakt/Kulzer Druckschrift, Norderstedt.
- 36 Donkerwolcke M, Burny F, Muster D. 1998. Tissues and bone adhesives-historical aspects. *Biomaterials*; 19: 1461-1466.
- 37 Eckelt U, Nitsche M, Muller A, Pilling E, Pinzer T, Roesner D. 2007. Ultrasound aided pin fixation of biodegradable osteosynthetic materials in cranioplasty for infants with craniosynostosis. *J Craniomaxillofac Surg*; 35-4-5: 218-21.
- 38 Egli PS, Müller W, Schenk RK. 1988. Porous hydroxyapatite and tricalcium phosphate cylinders with two different pore size ranges implanted in the cancellous bones of rabbits. *Clin Orthop*; 232: 127-138.
- 39 Einhorn TA. 1998. The cell and molecular biology of fracture healing. *Clin Orthop Relat Res*; 355: 7-21.
- 40 Eitel F, Jacobson W, Schweiberer L. 1981. Bone regeneration in animals and in man. A contribution to understanding the relative value of animal experiments to human pathophysiology. *Arch Orthop Trauma Surg*; 99(1): 59-64.
- 41 Ferguson SJ, Weber U, von Rechenberg B, Mayer J. 2006. Enhancing the mechanical integrity of the implant-bone interface with BoneWelding technology: determination of quasi-static interfacial strength and fatigue resistance. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*; 77: 13-20.
- 42 Ferguson Stephen J, Weber U, von Rechenberg B, Mayer J. 2002. BoneWelding®: Thermal and Mechanical Characterisation of the Bone / Polymer Interface. Poster presentation on 12th Annual Meeting, European Orthopaedic Research Society, Lausanne Switzerland.
- 43 Gollwitzer H, Ibrahim K, Meyer H, Mittelmeier W, Busch R, Stemberger A. 2003. Antibacterial poly (D,L-lactic acid) coating of medical implants using a biodegradable drug delivery technology. *J Antimicrobial Chemotherapy*; 51: 585-591.
- 44 Goodman SB, Schatzker J, Sumner-Smith G, Fornasier VL, Gofen N, Hunt C. 1985. The effect of polymethylmethacrylate on bone: an experimental study. *Arch Orthop Trauma Surg*; 104: 150-154.
- 45 Grewell DA, Benatar A, Park J (eds.). 2003. *Plastics and Composites Welding Handbook*, Hanser Publishers Munich.
- 46 Heiss C. 2006. Biokompatibilität, Degradation und Verbundfestigkeit eines neuartigen bioresorbierbaren Knochenklebers in der Traumatologie und operativen Orthopädie. Habilitationsschrift Giessen.
- 47 Heiss C, Hahn N, Pokinskyj P, Wenisch S, Stahl JP, Meyer Ch, Schnettler R. 2004. Properties and degradation of a new bioresorbable bone glue. *Biomed Technik*; 49: 163-169.
-

- 48 Heiss C, Hahn N, Wenisch S, Alt V, Pokinskyj P, Horas U, Kilian O, Schnettler R. 2005. The tissue response to an alkylene bis(dilactoyl)-methacrylate bone adhesive. *Biomaterials*; 26: 1389-1396.
- 49 Heiss C, Kraus R, Schluckebier D, Stiller AC, Wenisch S, Schnettler R. 2006. Bone Adhesives in Trauma and Orthopedic Surgery. *Eur J Trauma*; 32: 141–148.
- 50 Heiss C, Schnettler R. 2003. Bioresorbable adhesives in trauma and orthopaedic surgery. *Biomaterialien*; 4: 298-304.
- 51 Heiss C, Schnettler R. 2005. Bioresorbable bone adhesives. Historical perspective and current status. *Unfallchirurg*; 108(5): 348-355.
- 52 Hernandez CJ, Hazelwood SJ, Martin RB. 1999. The relationship between basic multicellular unit activation and origination in cancellous bone. *Bone*; 25: 585 – 587.
- 53 Hoffmann R, Weiler A, Helling HJ, Krettek C, Rehm KE. 1997. Lokale Fremdkörperreaktion auf biodegradierbare Implantate; Eine Klassifikation. *Unfallchirurg*; 100: 658-666.
- 54 Hofbauer LC, Gori F, Riggs BL, Lacey DL, Dunstan CR, Spelsberg TC, Khosla S. 1999. Stimulation of osteoprotegerin ligand and inhibition of osteoprotegerin production by glucocorticoids in human osteoblastic lineage cells: potential paracrine mechanisms of glucocorticoid-induced osteoporosis. *Endocrinology*; 140: 4382 – 4389.
- 55 Hsu H, Lacey DL, Dunstan CR, Solovyev I, Colombero A, Timms E, Tan HL, Elliott G, Kelley MJ, Sarosi I, Wang L, Xia XZ, Elliott R, Chiu L, Black T, Scully S, Capparelli C, Morony S, Shimamoto G, Bass MB, Boyle WJ. 1999. Tumor necrosis factor receptor family member RANK mediates Osteoclast differentiation and activation induced by osteoprotegerin ligand. *Proc Natl Acad Sci USA*; 96: 3540-3545.
- 56 Hullinger L. 1962. Untersuchungen über die Wirkung von Kunstharzen „Palacos“ und „Ostamer“ in Gewebekulturen. *Arch Orthop Unfallchir*; 54: 504-512.
- 57 Ignatius AA, Augat P, Hollstein E, Schorlemmer S, Peraus M, Pokinskyj P, Claes L. 2005. Biocompatibility and functionality of the degradable polymer alkylene bis(dilactoyl)-methacrylate for screw augmentation in vivo. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*; 75:128-136.
- 58 Ignatius AA, Augat P, Ohnmacht M, Pokinskyj P, Kock HJ, Claes LE. 2001. A new bioresorbable polymer for screw augmentation in the osteosynthesis of osteoporotic cancellous bone: a biomechanical evaluation. *J Biomed Mater Res*; 58: 254-60.
- 59 Ignatius AA, Claes LE. 1996. In vitro biocompatibility of bioresorbable polymers: poly(L, DL-lactide) and poly(L-lactide-co-glycolide). *Biomaterials*; 17: 831-839.
- 60 Ilan N, Mahooti S. 1999. PECAM-1 (CD31) functions as a reservoir for and a modulator of tyrosine-phosphorylated bcatenin. *J. Cell Sci*; 112 (Pt 18): 3005–3014.
- 61 Iwashina T, Mochida J, Miyazaki T, Watanabe T, Iwabuchi S, Ando K, Hotta T, Sakai D. 2006. Low-intensity pulsed ultrasound stimulates cell proliferation and proteoglycan production in rabbit intervertebral disc cells cultured in alginate. *Biomaterials*; 27: 354–361.
- 62 Jain RK. 2003. Molecular regulation of vessel maturation. *Nat Med*; 9: 685-693.

-
- 63 Jensen CH, Jensen CM. 1996. Biodegradable pins versus Kirschner wires in hand surgery. *J Hand Surg*; 21: 507-510.
- 64 Jilka RL. 2003. *Medical Pediatric Oncology*; 41(3): 182-185.
- 65 Junqueira LC, Carneiro J. 2005. *Histologie*. Springer Verlag 92-105.
- 66 Junqueira LC, Carneiro J. 1996. Übersetzt, überarbeitet und ergänzt von Schiebler TH. Knochen und Knochenverbindungen in *Histologie: Zytologie, Histologie und mikroskopische Anatomie des Menschen unter Berücksichtigung der Histophysiologie*. Springer Verlag 190-217.
- 67 Kanczler JM, Oreffo ROC. 2008. Osteogenesis and angiogenesis the potential for engineering bone. *European Cells and Materials*; Vol.15: 100-114.
- 68 Katthagen BD. 1986. Knochenregeneration mit Knochenersatzmaterialien. *Unfallheilk* 178.
- 69 Kawahara H. 1985. Biological requirements for biomaterials. I. Cytotoxicity of biomaterials, in vitro. II. Cell adhesion to biomaterials, in vitro. *Implantologist*; 3(2): 41-49.
- 70 Kilian O, Wenisch S, Alt V, Lauer M, Fuhrmann R, Dingeldein E, Jonuleit T, Schnettler R, Franke RP. 2007. Effects of platelet factors on biodegradation and osteogenesis in metaphyseal defects filled with nanoparticulate hydroxyapatite - an experimental study in minipigs. *Growth Factors*; 25(3): 191-201.
- 71 Khosla S, Westendorf JJ, Oursler MJ. 2008. Building bone to reverse osteoporosis and repair fractures. *Journal of Clinical Investigation*; 118(2): 421-428.
- 72 Kim WY, Han CH, Park JI, Kim JY. 2001. Failure of intertrochanteric fracture fixation with a dynamic hip screw in relation to pre-operative fracture stability and osteoporosis. *Int Orthop*; 25: 360-362.
- 73 Kitamura M, Kawakami K, Nakamura N, Tsumoto K, Uchiyama H, Ueda Y, Kumagai I, Nakaya T. 1999. Expression of a model peptide of a marine mussel adhesive protein in *Escherichia coli* and characterization of its structural and functional properties. *J Polym Sci A: Polym Chem*; 37: 729-736.
- 74 Kong YY, Yoshida H, Sarosi I, Tan HL, Timms E, Capparelli C, Morony S, Oliveira-dos-Santos AJ, Van G, Itie A, Khoo W, Wakeham A, Dunstan CR, Lacey DL, Mak TW, Boyle WJ, Penninger JM. 1990. OPGL keyregulator of osteoclastogenesis, lymphocyte development and lymph-nod organogenesis. *Nature*; 397: 315-323.
- 75 Krischak GD, Augat P, Sorg T, Blakytyn R, Kinzli L, Claes L, Beck A. 2007. Effects of diclofenac on periosteal callus maturation in osteotomy healing in an animal model. *Arch Orthop Trauma Surg*; 127: 3-9.
- 76 Kumta SM, Leung PC. 1998. The technique and indications for the use of biodegradable implants in fractures of the hand. *Techniques in Orthopaedics*; 13: 160-163.
- 77 Lacey DL, Timms E, Tan HL, Kelley MJ, Dunstan CR, Burgess T, Elliott R, Colombero A, Elliott G, Scully S, Hsu H, Sullivan J, Hawkins N, Davy E, Capparelli C, Eli A, Qian YX, Kaufman S, Sarosi I, Shalhoub V, Senaldi G, Guo J, Delaney J, Boyle WJ. 1998. Osteoprotegerin Ligand is a Cytokine that regulates osteoclast differentiation and activation. *Cell*; 93: 165-176.
-

- 78 Langhoff JD. 2006. Evaluation der BoneWelding Technologie zur Verankerung von Implantaten im Knochen – eine Studie am Schaf. Dissertation Universität Zurich.
- 79 Lazzarini L, De Lalla F, Mader JT. 2002. Long Bone Osteomyelitis. *Curr Infect Dis Rep*; 4: 439-445.
- 80 Lee FYChoi YW, Behrens FF, DeFouw DO, Einhorn TA. 1998. Programmed removal of chondrocytes during enchondral fracture healing. *J Orthop Res*; 16: 144–50.
- 81 Lujan TJ, Henderson CE, Madey SM, Fitzpatrick DC, Marsh JL, Bottlang M. 2010. Locked plating of distal femur fractures leads to inconsistent and asymmetric callus formation. *J Orthop Trauma*; 24(3):156-162.
- 82 Mai R, Gunter Lauera G, Pilling E, Jung R, Leonhardt H, Proff P, Stadlinger B, Pradel W, Eckelt U, Fanghanel J, Gedrange T. 2007. Bone welding – A histological evaluation in the jaw. *Annals of Anatomy*; 189(4): 350-355.
- 83 Malizos KN, Hantes ME, Protopappas V, Papachristos A. 2006. Low-intensity pulsed ultrasound for bone healing: an overview. *Injury*; 37(1): 56-62.
- 84 Mayer J, Plasonig G. 2008. Innovation durch Paradigmenwechsel - zur Bone Welding Technologie. In: *Medizintechnik – Life Science Engineering*. Hrsg. E. Wintermantel. 4. überarbeitete und erweiterte Auflage. Springer Verlag 1345-1363.
- 85 McKibbin B. 1978. The biology fracture healing in long bones. *J Bone Joint Surg Br*; 60–B: 150–162.
- 86 Meyer DC, Mayer J, Weber U, Mueller A, Koch PP. 2006. Ultrasonically implanted PLA suture anchors are stable in osteopenic bone. *Clin Orthop Relat Res*; 442: 143–148.
- 87 Meyer G, Muster D, Schmitt D, Jung P, Jaeger JH. 1979. Bone bonding through bioadhesives: present status. *Biomater Med Devices Artif Organs*; 7: 55-71.
- 88 Mizoguchi T, Muto A, Udagawa N, Arai A, Yamashita T, Hosoya A, Ninomiya T, Nakamura H, Yamamoto Y, Kinugawa S. 2009. Identification of cell cycle-arrested quiescent osteoclast precursors in vivo. *Journal of Cell Biology*; 184(4): 541-554.
- 89 Nakashima K, Zhou X, Kunkel G, Zhang Z, Deng JM, Behringer RR, De Crombrughe B. 2002. The novel zinc finger-containing transcription factor Osterix is required for osteoblast differentiation and bone formation. *Cell*; 108(1): 17-29.
- 90 Nunamaker D, Perren S. 1998. Experimental models of fracture repair. *Clin Orthop*; 355: 56-65.
- 91 Orsini G, Ricci J, Scarano A, Pecora G, Petrone G, Lezzi G, Piattelli A. 2004. Bone defect healing with calcium-sulfate particles and cement: an experimental study in rabbit. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*; 68: 199-208.
- 92 Peng H, Wright V, Usas A, Gearhart B, Shen HC, Cummins J, Huard J. 2002. Synergistic enhancement of bone formation and healing by stem-cell-expressed VEGF and bone morphogenetic protein-4. *J Clin Invest*; 110: 751-759.
- 93 Perren SM. 2002. Evolution of the internal fixation of long bone fractures. The scientific basis of biological internal fixation: choosing a new balance between stability and biology. *J Bone Joint Surg Br*; 84(8): 1093-1110.

-
- 94 Pilling E, Mai R, Theissig F, Stadlinger B, Loukota R. 2007. An experimental in vivo analysis of the resorption to ultrasound activated pins (Sonic weld) and standard biodegradable screws (ResorbX) in sheep. *British Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*; 45: 447-450.
- 95 Pilling E, Meissner H, Jung R, Koch R, Loukota R. 2007. An experimental study of the biomechanical stability of ultrasound-activated pinned (SonicWeld Rx+Resorb-X) and screwed fixed (Resorb-X) resorbable materials for osteosynthesis in the treatment of simulated craniosynostosis in sheep. *British Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*; 45: 451-456.
- 96 Price PA. 1985. Vitamin K-dependent formation of bone Gla proteins (Osteocalcin) and its function. *Vitam Horm*; 42: 65–108.
- 97 Prokop A, Jubel A, Helling HJ, Eibach T, Peters C, Baldus SE, Rehm KE. 2004. Soft tissue reactions of different biodegradable polylactide implants. *Biomaterials*; 25: 259-267.
- 98 Rehm KE, Helling HJ, Gatzka C. 1997. Neue Entwicklungen beim Einsatz resorbierbarer Implantate. *Der Orthopäde*; 26:489-497.
- 99 Rimpler M. 1994. 8. Internationales Symposium – Leistungsfähigkeit der modernen Klebetechnik. In: *Swissbonding, Rapperswil, Tagungsband*: 161-175.
- 100 Risau W. 1997. Mechanism of angiogenesis. *Nature*; 386: 671-674.
- 101 Rivens I, Shaw A, Civalo J, Morris H. 2007. Treatment monitoring and thermometry for therapeutic focused ultrasound. *Int J Hyperthermia*; 23: 121–139.
- 102 Saijo M, Kitazawa R, Nakajima M, Kurosaka M, Maeda S, Kitazawa S. 2003. Heparinase mRNA expression during fracture repair in mice. *Histochem Cell Biol*; 120: 493-503.
- 103 Schenk RK, Willenegger HR. 1977. Histology of primary bone healing: modifications and limits of recovery of gaps in relation to extent of the defect. *Unfallheilkunde*; 80(5): 155-160.
- 104 Sonntag, R. 2007. Machbarkeitsstudie der Befestigung von bioresorbierbaren Polymerplatten mittels Ultraschall zur Behandlung traumatisierter Knochen. Diplomarbeit an der Fakultät für Maschinenbau an der Universität Karlsruhe.
- 105 Staets E, Carmeliet G, Naert I, Duyck J. 2007. Early trabecular bone healing around titanium implants: a histologic study in rabbits. *J Periodontol*; 78: 510-517.
- 106 Stanczyk M, Telega JJ. 2004. Heat transfer problems in orthopaedics. *Engineering Transactions*; 51: 267–275.
- 107 Stein GS, Stein JL, Lian JB, Van Wijnen AJ, Montecino M, Javed A, Zaidi SK, Young D, Choi JY, Pockwinse S. 2004. Nuclear microenvironments: An architectural platform for the convergence and integration of transcriptional regulatory signals. *European Journal of Histochemistry*; 48(1): 65-76.
- 108 Street J, Bao M, de Guzman L, Bunting S, Peale FV, Jr, Ferrara N, Steinmetz H, Hoeffel J, Cleland JL, Daugherty A, van BN, Redmond HP, Carano RA, Filvaroff EH. 2002. Vascular endothelial growth factor stimulates bone repair by promoting angiogenesis and bone turnover. *Proc Natl Acad Sci USA*; 99: 9656-9661.
-

- 109 Strobl H, Scheinecker C., Csmarits B., Majdic O., Knapp W. 1995. Flow cytometric analysis of intracellular CD68 molecule expression in normal and malignant haemopoiesis. *Br. J. Haematol*; 90(4): 774–782.
- 110 Thomas C. 2001. *Histopathologie, Lehrbuch u. Atlas zur allgemeinen u. speziellen Pathologie*. Schattauer, Stuttgart New York: 367-368.
- 111 Watanabe Y, Matsushita T, Bhandari M, Rad Z, Schemitsch EH. 2010. Ultrasound for Fracture Healing: Current Evidence. *J Orthop Trauma*; 24: 56-61.
- 112 Williams DF, Putter C, Lange GL, Groot K, Lee AJC. 1988. Consensus and definitions in biomaterials. *Implant Materials in Biofunction. Advances in Biomaterials*, Elsevier Science Publishers BV; 8: 11-16.
- 113 Wissing H, Stürmer KM, Breidenstein G. 1990. Die Wertigkeit verschiedener Versuchstiere für experimentelle Untersuchungen am Knochen. *Unfallheilkunde*; 212: 479-488.
- 114 You LD, Weinbaum S, Cowin SC, Schaffler MB. 2004. Ultrastructure of the osteocyte process and its pericellular matrix. *The anatomical record. Part A, Discoveries in molecular, cellular, and evolutionary biology*; 278(2): 505-513.
- 115 Zander N. 2007. Mündliche Mitteilung aus internem Laborbericht Stryker Trauma GmbH
- 116 Zelzer E, McLean W, Ng YS, Fukai N, Reginato AM, Lovejoy S, D’Amore PA, Olsen BR. 2002. Skeletal defects in VEGF (120/120) mice reveal multiple roles for VEGF in skeletogenesis. *Development*; 129: 1893-1904.

8.2 Tabellenverzeichnis

Tab. 1	Übersicht der verwendeten implantatspezifischen Instrumente	Seite 13
Tab. 2	Übersicht Kaninchenstudie: Einteilung nach Gruppen und Beobachtungszeitpunkten	Seite 17
Tab. 3	Algorithmus zur Verwendung der explantierten Femura	Seite 21
Tab. 4	Kriterien für die makroskopische Bewertung des Osteotomiespaltes	Seite 35
Tab. 5	Makroskopische Beurteilung der Osteogenese	Seite 36
Tab. 6	Zusammenstellung zur knöchernen Integration der Osteosynthesematerialien	Seite 56
Tab. 7	Kriterien zur Bewertung der knöchernen Integration der Implantate	Seite 57
Tab. 8	Ergebnisse Biomechanik	Seite 91
Tab. 9	Qualitative Bewertung von etablierten und in Entwicklung befindlichen Ansätzen zur Erhöhung der Primärstabilität [Modifiziert nach Mayer, J. et al; 2008]	Seite 109

8.3 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1	Primäre Frakturheilung unter absolut stabilen Verhältnissen	Seite 8
Abb. 2	Histologische Phasen der Frakturheilung	Seite 10
Abb. 3	Einschweißen des Sonic Pins in Rinderknochen	Seite 12
Abb. 4	Implantate und Instrumente	Seite 14
Abb. 5	Osteotomie des lateralen Femurcondylus	Seite 18
Abb. 6	Fixation der Femurcondylus	Seite 18
Abb. 7	Implantationsschritte Sonic Pin	Seite 19
Abb. 8	Vorbereitung der Perfusion	Seite 22
Abb. 9	Exemplarische Darstellung der Schnittebenen.	Seite 23
Abb. 10	Festlegung der AOI	Seite 27
Abb. 11	Exemplarische Darstellung der AOI und der unterschiedlichen Gewebe	Seite 28
Abb. 12	Versuchsaufbau für die Biomechanik	Seite 29
Abb. 13	Exemplarisches Kraft-/Verformungsdiagramm mit schematischer Darstellung der Maximalkraft F_{max} , der gemessenen Verformung d_{max} , der ermittelten Verformung d_{calc} und der Steifigkeit	Seite 30
Abb. 14	Mikro CT Aufnahmen am 21d Zeitpunkt	Seite 33
Abb. 15	Mikro CT Aufnahmen der 42d Zeitpunkt	Seite 34
Abb. 16	Knochenremodelling Osteotomiespalt 7d KD/S (Paraffinschnitte TB)	Seite 37
Abb. 17	Knochenremodelling Osteotomiespalt 7d P/S (Paraffinschnitte HE)	Seite 38
Abb. 18	Knochenremodelling Osteotomiespalt 21d KD/S (Paraffinschnitte HE)	Seite 39
Abb. 19	Knochenremodelling Osteotomiespalt 21d P/S (Paraffinschnitte HE)	Seite 40
Abb. 20	Knochenremodelling Osteotomiespalt 42d KD/S (Paraffinschnitte HE)	Seite 41
Abb. 21	Knochenremodelling Osteotomiespalt 42d P/S (Paraffinschnitte HE)	Seite 42
Abb. 22	Knochenremodelling Osteotomiespalt 42d P/P (Paraffinschnitte HE)	Seite 43
Abb. 23	Knochenremodelling Osteotomiespalt 84d KD/S (Paraffinschnitte HE)	Seite 44
Abb. 24	Knochenremodelling Osteotomiespalt 84d P/S (Paraffinschnitte HE)	Seite 45
Abb. 25	Implantatinterface 7d KD/S	Seite 47
Abb. 26	Implantatinterface 7d P/S	Seite 48
Abb. 27	Implantatinterface 21d KD/S	Seite 49
Abb. 28	Implantatinterface 21d P/S 52	Seite 50
Abb. 29	Implantatinterface 42d KD/S 61	Seite 51
Abb. 30	Implantatinterface 42d P/S	Seite 52
Abb. 31	Implantatinterface 42d P/P	Seite 53
Abb. 32	Implantatinterface 84d KD/S	Seite 54
Abb. 33	Implantatinterface 84d P/S	Seite 55
Abb. 34	Resorption / Sonic Pin 7d post operationem	Seite 59
Abb. 35	Resorption / Sonic Pin 21d post operationem	Seite 60
Abb. 36	Resorption / Sonic Pin 42d post operationem	Seite 61

Abb. 37	Resorption / Sonic Pin 84d post operationem	Seite 62
Abb. 38	CD68-Immunmarkierung 7d (Paraffinschnitte Ht)	Seite 63
Abb. 39	CD68-Immunmarkierung 21d (Paraffinschnitte Ht)	Seite 64
Abb. 40	CD68-Immunmarkierung 42d und 84d (Paraffinschnitte Ht)	Seite 65
Abb. 41	Osteocalcin-Immunmarkierung (Paraffinschnitte Ht)	Seite 66
Abb. 42	Pecam-Immunmarkierung 7d (Paraffinschnitte Ht)	Seite 68
Abb. 43	Pecam-Immunmarkierung 21d (Paraffinschnitte Ht)	Seite 69
Abb. 44	Pecam-Immunmarkierung 42d (Paraffinschnitte Ht)	Seite 70
Abb. 45	Pecam-Immunmarkierung 84d (Paraffinschnitte Ht)	Seite 71
Abb. 46	TEM 7d / Interface Schraube	Seite 73
Abb. 47	TEM 7d / Interface Sonic Pin	Seite 74
Abb. 48	TEM 21d / Interface Sonic Pin	Seite 75
Abb. 49	TEM 42d / Interface Sonic Pin	Seite 76
Abb. 50	TEM 84d / Interface Sonic Pin	Seite 77
Abb. 51	TEM Resorptionsverhalten Sonic Pin 7d	Seite 79
Abb. 52	TEM 21d Resorptionsverhalten Sonic Pin	Seite 80
Abb. 53	TEM 21d Resorptionsverhalten Sonic Pin	Seite 81
Abb. 54	TEM 42d Resorptionsverhalten Sonic Pin	Seite 81
Abb. 55	TEM 84d Resorptionsverhalten Sonic Pin	Seite 82
Abb. 56	CD68 immunmarkierte Zellen am Interface der verschiedenen Implantate	Seite 83
Abb. 57	CD68 immunmarkierte Zellen an verschiedenen Standzeiten	Seite 84
Abb. 58	Vergleich der Gewebeanteile im Osteotomiespalt	Seite 85
Abb. 59	Anteile alter Knochen und neugebildeter Knochen im Osteotomiespalt	Seite 86
Abb. 60	Knorpelanteile, Knochenmark und Granulationsgewebe im Osteotomiespalt	Seite 87
Abb. 61	Gewebeverteilung KD/S und P/S Gruppe im Osteotomiespalt nach 7d	Seite 88
Abb. 62	Gewebeverteilung der P/S Gruppe im Osteotomiespalt nach 21d und 42d	Seite 89
Abb. 63	Gewebeverteilung der P/P Gruppe nach 42d und der P/S Gruppe nach 84d	Seite 89
Abb. 64	Biomechanik Ergebnisse	Seite 90
Abb. 65	Statistische Ergebnisse Biomechanik	Seite 92

8.4 Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
aK	alter Knochen
aZ	Apoptose
AOI	Area of Interest
BMP-2	Bone-morphogenetic protein-2
BMU	Basic multicellular Units
BSA	Bovines Serumalbumin
CD-68	Cluster of Differentiation 68
CT	Computertomographie
d	Tage
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EI	Erosionslakune
eM	einkerniger Makrophage
FBGC	Fremdkörperriesenzellen
Gg	Granulationsgewebe
Gk	Geflechtknochen
GM-CSF	Granulocytemacrophage-colony-stimulating-factor
H	Stunden
HE	Hämatoxylin-Eosin Färbung
HSC	Hämatopoetische Stammzellen
Ht	Gegenfärbung der Kerne mit Hämatoxylin
IL	Interleukin
Ka	Kallus
KD/S	Gruppe 1 K-Draht/ Schraube
Kf	Knochenfragment
Kg	Knorpelgewebe
Kk	Kortikalis
Km	Knochenmark
Kt	Knochen trabekel
LaK	Lagerknochen
LIF	Leukämia in hipitori Faktor
Lk	Lamellenknochen
Ly	Lymphgefäße
min	Minuten
M-CSF	Macrophage-colony-stimulating-factor
mM	mehrkerniger Makrophage
MSC	Mesenchymale Stammzellen
N	Newton
nK	neuer Knochen
Ob	Osteoblasten
OPG	Osteoprotegerin
Oi	Osteoid
Ok	Osteoklasten
OGP	Osteopoketerien

OPG	Osteoprotegerin
OSp	Osteotomiespalt
Oz	Osteozyt
P/P	Gruppe 3 Sonic Pin/ Sonic Pin
P/S	Gruppe 2 Sonic Pin/ Schraube
PB	Phosphatpuffer
PECAM	Platelet/endothelial cell adhesion molecule
PFA	Paraformaldehyd-Lösung
PLDLA	Poly-(L,DL)laktid
PMMA	Polymethylmethacrylat
PTH	Parathormon
RANKL	Rezeptor Aktivator of Nuclear Factor- κ B Ligand
Tab	Tabelle
TB	Toluidin Blau Färbung
TBS	Tris-NaCl Puffer (pH 7,4) mit 0,025% Triton-X-100
TEM	Transmissionselektronenmikroskopie
TNF	Tumor-Nekrosefaktor
USS	Ultraschallschweißen

9 Erklärung

„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.

10 Danksagung

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

Ich danke meinem Doktorvater Herrn Univ.-Prof. Dr. Dr. R. Schnettler, Direktor der Klinik und Poliklinik für Unfallchirurgie des Universitätsklinikum Giessen und Marburg für die Überlassung des Dissertationsthemas, sowie die ausgezeichnete Betreuung bei der Planung, Durchführung und Anfertigung dieser Arbeit.

Ich danke ebenfalls Herrn Prof. Dr. C. Heiß und Herrn Dr. Dr. V. Alt für die 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 Prof. Dr. K. Lips für ihre engagierte Hilfe bei den histologischen Auswertungen und weit darüber hinaus.

Gedankt seien auch den Mitarbeitern der Bad Langensalza Tierklinik für die Operation und Versorgung der Tiere, dem Institut für Biomechanik der BG Klinik Murnau für die Durchführung der Laborversuche und der Radiologie der Justus Liebig Universität in Gießen für die Mikro CT Aufnahmen.

Mein Dank gilt auch meinem Arbeitgeber Stryker für die großzügige Unterstützung dieser Arbeit und insbesondere dem Stryker OP Support Team Jörg Arnoldi, Ingo Bauer, Ronald Prager, Jan Hendrik Steinfeldt und Manfred Wieland. Für die konstruktiven Diskussionen danke ich Claudia Beimel, Geert von Oldenburg, Torben Sörensen, Andreas Speitling und Nils Zander.

Schließlich danke ich meiner Familie Annette, Mirko und Dennis und allen Freunden für ihre Geduld und unterstützenden und motivierenden Worte. Insbesondere möchte ich mich bei meinen Eltern bedanken, die mich immer gefördert und unterstützt haben.