

**Überprüfung der Biokompatibilität und der Degradation
eines neuartigen bioresorbierbaren Knochenklebers –
Ergebnisse einer tierexperimentellen Untersuchung an der
Kaninchenfemurkondyle**

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

vorgelegt von Niels Eric Hahn
aus Lich

Gießen 2007

Aus dem Medizinischen Zentrum für Chirurgie, Anästhesiologie und Urologie;
Klinik und Poliklinik für Unfallchirurgie des Universitätsklinikums
Gießen und Marburg GmbH, Standort Gießen
Direktor: Univ.-Prof. Dr. Dr. Reinhard Schnettler

Gutachter: PD Dr. Ch. Heiss
Gutachter: Prof. Dr. U. Harland

Tag der Disputation: 13.12.2007

Meinen Eltern

Erika und Horst Hahn

Ich erkläre: Ich habe die vorgelegte Dissertation selbstständig, 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 der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten. Giessen im Mai 2007.

Niels Eric Hahn

Veröffentlichungen von Daten dieser Dissertation.

Originalarbeiten:

Heiss C^B, Pokinskyj P, Hahn N, Wenisch S, Horas U, Kilian O, Nies B, Schnettler R (2002) The Biocompatibility of a New Bone Glue - First Results of an Experimental Study. Osteo Trauma Care 10: 22-24.

Heiss C^B, Hahn N, Pokinskyj P, Wenisch S, Stahl JP, Meyer C, Schnettler R (2004) Eigenschaften und Degradation eines neuartigen bioresorbierbaren Knochenklebers - Properties and Degradation of a New Bioresorbable Bone Glue. Biomed Technik 49 (6): 163-169.

Heiss C^B, 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 (12): 1389-1396.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung und Fragestellung	1
2	Theoretische Grundlagen	3
2.1	Die Geschichte der Erforschung von Klebstoffen	3
2.2	Die Klebung als Fügeverfahren	11
2.3	Anwendungsmöglichkeiten eines moderenen Knochenklebstoffes	12
2.4	Knochenaufbau und -umbau (Remodeling)	13
2.5	Zellen des Knochengewebes	17
2.5.1	Vorläuferzellen	17
2.5.2	Der Osteoblast	17
2.5.3	Der Osteozyt	18
2.5.4	Der Osteoklast	19
2.6	Frakturheilung	20
3	Material und Methoden	23
3.1	Zur Wahl der Versuchstiere	23
3.2	Prüfsubstanz Knochenklebstoff	23
3.2.1	Chemische Zusammensetzung	23
3.2.2	Degradation	26
3.3	Versuchsplanung und Versuchsablauf	29
3.4	Narkose	30
3.5	Operationsmodell	31
3.6	Die Nachsorge der Tiere	35
3.7	Perfusion	36
3.8	Röntgendiagnostik	36
3.9	Microcomputertomographie	38
3.10	Fotodokumentation	38
3.11	Feingewebliche Untersuchungen	39
3.11.1	Durchlichtmikroskopie	39
3.11.2	Rasterelektronenmikroskopie (REM)	39
3.11.3	Transmissionselektronenmikroskopie (TEM)	41

3.12	Probenbearbeitung (Trenn-Dünnschliff-Technik).....	41
3.12.1	Vorbereitung der Knochenpräparate für die Fixation.....	42
3.12.2	Infiltration.....	42
3.12.3	Einbettung und Polymerisation.....	42
3.12.4	Einteilung der Schnittebenen.....	42
3.12.5	Herstellung eines Dünnschliffes.....	43
3.12.6	Färbetechniken der unentkalkten Knochenschliffe.....	44
4	Ergebnisse.....	45
4.1	Subcutane Applikation.....	45
4.2	Röntgenuntersuchungen.....	48
4.3	Microcomputertomographie.....	54
4.4	Feingewebliche Untersuchungen.....	59
4.4.1	Durchlichtmikroskopie (Histologie).....	59
4.4.2	Rasterelektronenmikroskopie (REM).....	84
4.4.3	Transmissionselektronenmikroskopie (TEM).....	87
5	Diskussion.....	94
6	Zusammenfassung.....	113
7	Summary.....	114
8	Literaturverzeichnis.....	116
9	Abkürzungsverzeichnis.....	127
10	Abbildungs- und Tabellenverzeichnis.....	129
11	Danksagung.....	131
12	Lebenslauf.....	132

1 Einleitung und Fragestellung

Ziel einer Osteosynthese ist die korrekte anatomische Reposition, die stabile Fixation und Retention sowie die Wiederherstellung der Kontinuität und mechanischen Belastbarkeit. Die bekannten Verfahren wie Platten- und Nagelosteosynthese, Fixateur externe, Schrauben und Kirschner-Drähte liefern bei guter Indikationsstellung eine ausreichend stabile und sichere Verbindung. Es zeigen sich jedoch auch bei diesen Verfahren gelegentlich Schwächen und Nachteile:

1. Häufig lassen sich kleinere Fragmente nicht oder nur ungenügend fixieren.
2. Bei vielen Osteosyntheseverfahren besteht keine flächenhafte Kraftverteilung.
3. Der Bohrvorgang kann zu Hitzenekrosen und Mikrofrakturierungen des Knochens führen.

Zur sicheren Fixation von Fragmenten, bei denen herkömmliche Fixationsmethoden häufig zur Fragmentzerstörung oder aber instabilen Versorgung führen, stehen so genannte Knochenkleber/-klebstoffe schon seit Jahren in der Diskussion. Frühere Versuche verliefen jedoch erfolglos, da zum Beispiel der verwendete Fibrinkleber keine mechanische Festigkeit aufwies und Cyanoacrylate eine unüberwindbare Barriere für die knöcherne Durchbauung der geklebten Frakturflächen darstellte.

Das Postulat der exakten anatomischen Reposition bei Mehrfragment- oder Trümmerbrüchen führt nicht selten aufgrund iatrogenen Zerstörung der Vaskularisierung von Fragmenten zur Heilungsverzögerung bis hin zur Pseudarthrosenbildung [137]. Somit liegt es nahe, einen Klebstoff zu entwickeln, der zum einen biokompatibel und degradierbar ist, zum anderen aber auch die zellulären Abläufe der Knochenheilung nicht behindert und darüber hinaus im feuchten Milieu des Organismus wirksam ist.

Die Gewebeklebung und im Besonderen das Kleben von Knochen, das Kleben von Knochenbrüchen und das Aneinanderkleben von Knochenfragmenten stellt ein zukunftsweisendes und innovatives Verfahren in der experimentellen und klinischen Unfallchirurgie sowie der orthopädischen Chirurgie dar.

Kleben ist eine innovative Technik, um einzelne Materialien einfach und schnell miteinander zu verbinden ohne Schrauben, Platten oder Pins zu verwenden. Ebenso könnte man Kleinstfragmente von Trümmerbrüchen oder abgesprengte

Knochenfragmente, die zu klein für eine Osteosynthese sind, mit dem Klebstoff wieder in den Knochenverbund einfügen.

Re-Operationen zur Osteosynthesematerialentfernung würden gänzlich überflüssig und damit das Risiko eines Infektes oder einer Thrombose/Embolie bei älteren Patienten deutlich gesenkt.

Grundlage dieser experimentellen Arbeit bildet die Überprüfung der Biokompatibilität eines neuartigen Knochenklebstoffes auf histologischer und radiologischer Basis im Kleintiermodell.

Hierfür sind zu überprüfen:

1. Überprüfung der Biokompatibilität des Knochenklebstoffes sowie der physiologischen Knochenneubildung (Frakturheilung) nach Applikation von Knochenklebstoff in einem experimentellen Frakturmodell an der Kaninchenfemurkondyle.
2. Beurteilung der Osteointegration (Osteoneogenese) und der Zellmigration (osteoblastische Reaktion), der Bioaktivität und des Abbaus des Klebstoffes (Resorption).
3. Überprüfung der Klebstoffdicke, Oberfläche und Struktur der Knocheneinsprossung (new bone apposition) mittels licht-, raster- und transmissionselektronenmikroskopischen Untersuchungen sowie 2D-3D Microcomputertomographie.
4. Beurteilung der Zelltoxizität und der entzündlichen Gewebsreaktion.
5. Klärung und Festlegung des Einsatzgebietes bzw. der Indikation des Knochenklebstoffes.

2 Theoretische Grundlagen

2.1 Die Geschichte der Erforschung von Klebstoffen

Die Geschichte der Klebstoffe kann viele Jahrhunderte zurückverfolgt werden. Ursprünglich wurden Klebstoffe aus Haut, Sehnen, Knorpel und Knochen von Tieren gewonnen. Die Römer, wie auch die Menschen im antiken China, erzeugten aus dem Saft der Mistel einen "Vogel-Leim", den sie zur Jagd benutzten. Bitumen, Bienenwachs und Pech wurden zum Versiegeln von Gefäßen benutzt. Die adhäsiven Eigenschaften des natürlichen Gummis (Kautschuk) wurden 1791 entdeckt [148]. Bis auf die Entdeckung des Gummis und des "pyroxylin cements" (Nitrocellulose) gab es bis zum 20. Jahrhundert nur wenig Fortschritte auf dem Gebiet der Adhäsiv-Forschung [123].

Im Allgemeinen muss eine Einteilung der nachfolgend genannten Gewebeklebstoffe, im Besonderen bei der Verwendung am Knochen, in zwei große Produktklassen vorgenommen werden. Zum einen gibt es **synthetisch** hergestellte körperfremde Produkte, auf der anderen Seite **biologische** aus körpereigenen oder körperverwandten Stoffen. Obwohl diese biologischen Gewebeklebstoffe heute auch industriell (synthetisch) hergestellt werden, sind sie vom Ursprung und der Basisbestandteile her jedoch als biologisch zu bezeichnen (Tab. 1).

Synthetische Gewebeklebstoffe	Biologische Gewebeklebstoffe
Epoxidharze	Frühe Kleberversuche - Lithocolle, Ossocol
Polyurethane	Fibrinklebstoffe
(Alkyl)-Cyanoacrylate	Klebstoffe auf Gelatine-Resorcin Basis
Polymethylmethacrylate	Protein-Aldehyd-Systeme
	Klebstoffe auf der Basis resorbierbarer Oligo- und Polylactone
	Klebstoffe auf Peptidbasis (marine Organismen, Muscheln)

Tab. 1: Einteilung der Adhäsive in synthetische und biologische Stoffklassen (eigene Einteilung).

Biologische Gewebeklebstoffe

GLUCK aus Berlin berichtete schon im vorletzten Jahrhundert (1891) von der Idee der Knochenklebung [46], als er Weichteilgewebe mit Hühnerblutderivaten und Knochengewebe mit **Lithocolle** klebte. Dieser Knochenkleber bestand aus: Geigenharz, Bimsstein und "Plaster of Paris" (Gips). 1931 berichtete HEDRI [52] auf der 55. Tagung der Deutschen Gesellschaft für Chirurgie über sein »Neues Prinzip der Osteosynthese« mit sterilem Knochenleim. Er benannte seine Mixtur aus Kollagen und "Fibrous tissue proteins" (Proteine des fibrösen Bindegewebes) **Ossocol** und beschrieb eine gute initiale Verbindungsstärke sowie eine knöcherne Heilung der Fraktur. Heftige allergische Reaktionen verhinderten jedoch die weitere Verwendung. Da die Ursache dieser Symptome in den antigen wirkenden xenogenen Proteinen des Leimes zu suchen ist, fand das Verfahren wegen dieser nicht unerheblichen Nebenwirkungen keine weitere Verbreitung.

Schon zu Beginn des 20. Jahrhunderts war die hämostatische Wirkung des Fibrins bekannt [5, 49, 51]. **Fibrinklebstoffe** wurden seit 1940 für chirurgische Klebungen benutzt indem YOUNG und MEDAWAR [154] Fibrin zur Klebung durchtrennter Nerven einsetzten. Fibrinklebstoffe stellen gegenwärtig den weitverbreitetsten Gewebeklebstoff dar. Eine genügende Klebefestigkeit konnte jedoch erst MATRAS et al. 1972 [89] bei der Verklebung von Nerven Anastomosen erreichen. Grundlage hierfür bildete die Entdeckung des Faktor XIII durch LAKI und LORAND 1948 [79]. Hierdurch war es möglich auch höher konzentrierte Fibrinogen-Lösungen herzustellen. 1976 fixierten PASSL et al. [100] bei Schafen homologe Gelenkknorpeltransplantate ohne subchondrale Knochenplatten mit Fibrin und berichtete über gute Ergebnisse, wenn postoperativ das Gelenk ruhig gestellt wurde. Über erfolgreiche klinische Studien wurde 1978 von RUPP und STEMBERGER berichtet [109]. BRAUN et al. [15] berichteten ebenfalls 1978 über am Kaninchen geklebte osteochondrale Frakturen. Die Klebeverbindung war aber nicht so fest, dass die Gelenke sofort, sondern erst nach 14 Tagen zur Belastung freigegeben werden konnten. Eine Beschleunigung der Knochenheilung und Einheilung von reimplantierten Knochenzylindern konnten 1977 sowohl BÖHLER et al. als auch BÖSCH et al. beobachten [9, 12].

Obwohl die mit Fibrin erreichte Adhäsion als gering angesehen wurden [15] und die im weiteren Verlauf auftretende Lösung der Gewebe ein Problem darstellte, zeigte

sich jedoch die Adhäsionsfähigkeit von Fibrin im feuchten Milieu im Vergleich zu den synthetischen Klebern überlegen.

Von Vorteil gegenüber den Epoxidharzen, den Polyurethanen und den Cyanoacrylaten ist die fehlende Hitzeentwicklung beim Polymerisieren und die günstige Abbindezeit von etwa 30 Sekunden, die bei den Polyurethanen und Epoxidharzen zu lange, bei den Cyanoacrylaten mit 10 Sekunden zu kurz ist. Der Abbau des Fibrinklebestoffes geht im Gegensatz zu den Epoxidharzen, Polyurethanen und Cyanoacrylaten mühelos ohne größere Gewebsreizung, allergische- oder allgemeintoxische Reaktionen in wenigen Tagen vonstatten, welches für die Knochenklebung aber in vielen Fällen zu kurz sein könnte. Wirken keine starken mechanischen Kräfte, wie bei Spongiosaplastiken oder Knochen-Knorpeltransplantationen, scheint das Fibrinklebesystem geeigneter als die bisher verwendeten Klebstoffe [43].

Ein 1966 in den USA entwickelter **Gelatine-Resorcin-Aldehyd-Gewebeklebstoff**, der aus einer Gelatine-Resorcin-Mischung besteht und mit Formaldehyd gehärtet wird, fand experimentell und klinisch Anwendung bei parenchymatösen Organen, Gefäßen und im Bereich der Haut. Zur Knochenklebungen wurde er dagegen noch nicht benutzt. Resorcin und Formaldehyd reagieren zu einem dreidimensionalen Netzwerk und Gelatine dient als Füllstoff. Da der Klebstoff in der Zubereitung aufwendig und histotoxisch war, konnte er sich jedoch nicht durchsetzen [43]. In der Weiterentwicklung wurde Formaldehyd schließlich durch mindertoxische Dialdehyde (Glutaraldehyd, Glyoxal) ausgetauscht. Anwendung findet der Kleber noch heute vor allem in der Rekonstruktion von insuffizienten Aortenklappen sowie bei der Behandlung von Aortendissektionen [39]. Im größeren Umfang konnte sich dieses Klebstoffsystem bisher nicht etablieren.

Während Proteine (Gelatine) im Falle der Gelatin-Resorcin-Aldehyd-Klebstoffe als Füllstoffe dienen, agieren sie bei **Protein-Aldehyd-Systemen** direkt als reaktive vernetzbare Komponenten. Für die Knochenklebung wird dieser Kleber nicht eingesetzt, ist aber seit 1998 unter dem Namen **BioGlue** zur Unterstützung der chirurgischen Naht in der Behandlung von Aortendissektionen zugelassen.

Die auf dem Markt befindlichen Klebstoffsysteme unterliegen einer ständigen Weiterentwicklung. Eine der neusten Forschungsrichtungen auf diesem Gebiet ist die Entwicklung von **Klebstoffen auf Peptidbasis**. Peptide und Proteine bieten sich als natürliche, im Organismus vorkommende Substanzen hinsichtlich ihrer Bioverträglichkeit und Abbaubarkeit für die Herstellung resorbierbarer medizinischer Klebstoffe an. Die Fibrinklebung, als Teil der Blutgerinnung, stellt nur einen der vielen komplexen Vorgänge unterschiedlicher Mechanismen der Verklebung durch chemische Vernetzung von Bestandteilen des Tierreiches und der Pflanzenwelt dar.

Es wurde daher in den letzten Jahren versucht Peptide als Bausteine resorbierbarer Klebstoffe zu verwenden und durch entsprechende Modifizierung in vernetzungsfähige Derivate zu überführen. So wurden von RIMPLER et al. [106] im Jahre 1991 radikalisch aushärtende Zweikomponenten-Klebstoffsysteme, so genannte **Peptoplaste**, auf der Basis acrylierter bzw. methacrylierter Aminosäuren und Peptide synthetisiert. Im Tierversuch zeigten diese Klebstoffe bei der Verklebung von kleineren Knochenfragmenten gute Ergebnisse bezüglich Klebefestigkeit sowie Verträglichkeit, wiesen aber eine unvollständige Biodegradation auf [107].

Eine Entwicklungsrichtung, die sich noch stärker am Vorbild der Natur orientiert, geht von den Klebstoffen mariner Organismen aus. Es ist seit langem bekannt, dass verschiedene Muschelarten Klebstoffe auf Proteinbasis bilden, die im Meerwasser bei unterschiedlichen Temperaturen aushärten und eine erstaunliche Klebefestigkeit auf verschiedenen Materialien aufweisen. Die Herstellung ist zurzeit mit einem erheblichen finanziellen und technischen Aufwand verbunden und somit für die weitere Anwendung nur schwer realisierbar. Darüber hinaus ist der exakte Klebermechanismus noch nicht abschließend erforscht. Hoch interessant für die Knochenklebung, d.h. die Anwendung im feuchten Milieu, sind jedoch die deutlich höhere Haltefestigkeit der aus marinen Quellen stammenden Peptid-Klebstoffe.

Resorbierbare Polylactone, vor allem Polylactide, Glycolide und deren Copolyester bilden die Basis von **Klebstoffsystemen resorbierbarer Oligo- und Polylactone**. Aufmerksamkeit erlangten sie in jüngster Zeit als biodegradierbare Osteosynthesen (Pins, Schrauben, Platten) sowie als Trägermaterialien für Pharmaka. Im Vergleich zu natürlichen Polymeren besitzen sie den Vorteil der wesentlich leichteren Zugänglichkeit durch chemische Synthese. Hergestellt werden sie durch Ringöffnungs-Polymerisation der entsprechenden kommerziell verfügbaren Lactone

[50]. Im Falle der Polylactide kann das Ausgangsmaterial Milchsäure aus nachwachsenden Rohstoffen gewonnen werden. In der Regel besitzen Poly lactone eine freie terminale Hydroxylgruppe, die für die Modifizierung, unter anderem zur Einführung vernetzungsfähiger Gruppierungen, geeignet ist und die Herstellung von Klebstoffen auf Polylacton-Basis ermöglicht. Ein solcher Klebstoff wurde in den USA entwickelt [113]. Anwendung findet dieser durch UV-Strahlung photochemisch aushärtbare Klebstoff auf Polyethylenglykol-Basis beim Verschluss von Luftleckagen nach Lungenoperationen. Der Klebstoff wird hier zusätzlich zu den konventionellen Techniken (Naht, Klammer) eingesetzt. Ähnliche Systeme finden als Beschichtung in der Dentaltechnik Anwendung [146]. Folgeentwicklungen auf Basis der funktionalisierten Oligolactide sind ebenfalls Gegenstand der aktuellen Forschung. Der neue bioresorbierbare Knochenkleber (Firma BIOMET, Deutschland), welcher in dieser experimentellen Arbeit vorgestellt wird, lässt sich keiner der oben beschriebenen Gruppen eindeutig zuordnen. Am besten kann er aufgrund der Methacrylsäure als Grundbaustein den Polymethylmethacrylaten zugeordnet werden. Durch den zweiten Baustein der Milchsäure ist hingegen auch eine **biologische Komponente** vorhanden. Dies entspricht in etwa dem Mehrkomponentensystem des Gelatine-Resorcin-Aldehyd-Klebstoffes (Gelatine als biologischer und Resorcin-Aldehyd als körperfremder Baustein). Dem zufolge ergibt sich für den neuentwickelten und in dieser Arbeit nachfolgend vorgestellten Kleber eine neue Stoffgruppe.

Synthetische Gewebeklebstoffe

Die ersten Literaturangaben über die Verwendung von synthetischen Klebstoffen als Osteosynthesematerial finden sich um 1958. Die Entwicklungen der Kunststoffindustrie ließ neue Klebstoffe entstehen. **Epoxidharze**, d.h. duroplastische Kunstharze, die durch Reaktion von Epichlorhydrin mit aromatischen Dihydroxyverbindungen entstehen und industriell zum Kleben, als Gießharz und Lacke verwendet wurden, weckten das Interesse der Forscher.

1958 berichtete der Australier BLOCH [7] als erster über die Verwendung von **Araldit** (Kunststoffkleber aus Ethoxylinharzen) als Knochenkleber bei Frakturen an Vorderläufen von 20 Schafen. 12 der durch Kunststoffmanschetten fixierten Frakturen waren in 12 Tagen dauerhaft fest. In 8 Fällen versagte die Methode entweder infolge einer aufgetretenen Infektion oder weil die Fragmente zu fetthaltig bzw. feucht waren. Bei 32 Patienten mit frischen und pathologischen Frakturen sowie

bei Pseudarthrosen erzielte der russische Arzt GOLOVIN 1959 mit **Osteoplast** gute Ergebnisse. Er mischte Ethoxylinharze mit Zusätzen von Knochenmehl und Fibrin [47, 48].

Wie NIGST et al. 1960 [97] zeigten, erreichen mit Epoxidharzen trocken geklebte Tibia-Frakturen bei Kaninchen die Hälfte der normalen Knochen-Biegefestigkeit, was einer 3-4wöchigen Frakturheilung entsprach. Im feuchten Milieu sank diese jedoch auf 1/7 [42]. RIETZ deckte 1964 bei fehlender Infektion jedoch folgende Schwächen des anfangs so positiv bewerteten Klebers aus Epoxidharz auf [105]:

- Fehlende Biokompatibilität mit Fremdkörperreaktion und Bindegeweber Umscheidung des Klebers.
- Fehlende Degradation, damit Kleberbestandteile im Bruchspalt.
- Fehlende Kallusbildung und fehlende knöcherne Durchbauung auch nach einem Jahr.
- Polymerisationshitze führt zu Osteolysen.
- Fehlende mechanische Stabilität durch ausbleibende Haftung des Klebers im feuchten Milieu.

Eine weitere Neuentwicklung war 1959 ein **Poly-Urethan-Hartschaum (Ostamer)**. Nach Vermischung zweier Komponenten erfolgte eine Reaktion, bei der Kohlendioxid freigesetzt wurde und eine schwammähnliche Poly-Urethanverbindung mit 7-10% Hohlraumbildung entstand. Diese erstarrte nach 20-30 Minuten und erreichte ihre maximale Festigkeit nach 18-24 Stunden.

MANDARINO und SALVATORE [88] nutzten 1959/60 **Ostamer**, um bei Frakturen und Pseudarthrosen in die Markhöhle eingebrachte Metallsplinte durch ausgießen der Höhle zu fixieren. Sie behandelten so u.a. eine Tibiafraktur, 3 Pseudarthrosen an Tibia und Femur sowie 2 pathologische Frakturen. Nachteilig wurden von HOYT 1960 [58] und RIETZ 1964 [105] eine Polymerisationstemperatur von über 70° Celsius angegeben. Wie auch beim Epoxidharz war auch hier im Feuchten ein Verlust der Adhäsion vorhanden [42].

Untersucher	Operation	Knöchern konsolidierte Frakturen	Nicht konsolidierte Frakturen
Mandarino und Salvatore 1960 [87]	Mensch	268	40
Redler 1960 [102]	Mensch	8	42
Drompp 1960 [33]	Mensch	13	2
Leemann 1961 [80, 81]	Ratte	-	54
Buchner 1961 [17]	Mensch	-	9

Tab. 2: Ergebnisse der Knochenklebung mit Ostamer von 1960-1961 [aus 43].

Allgemein fand man keine Systemschädigung durch den Kleber [80, 102], jedoch Wundheilungsstörungen [17] und Infektionen [102, 135] mit Dehiszenzen, Hautnekrosen und Fistelungen [33]. Für das umliegende Gewebe erwies sich Ostamer als toxisch, nicht resorbierbar und die Osteogenese hemmend [18, 81, 141]. MANDARINO, SALVATORE und JONES beurteilten die lokale Verträglichkeit wiederum als gut [87, 88, 112]. Eine Übersicht über die verschiedenen Ostamer-Arbeitsgruppen von 1960-61 zeigt die Tabelle 2 [43]. Da nur wenige Autoren die Frakturen zuverlässig und komplikationslos mit Polyurethan zur Ausheilung bringen konnten, verlor man nach 1964 bald das Interesse an der weiteren Verwendung dieses Klebstoffes.

1959 entdeckten COOVER et al. [48] die hohe Klebekraft von **Cyanoacrylaten**, die heute als Sekundenkleber bekannt sind. Schon ein Jahr später fand dieser Kleber in der experimentellen und klinischen Chirurgie Verwendung. Seine Hauptbestandteile sind verschiedene Ester der Acrylsäure und kalthärtende Einzelkomponenten. Die hohe Adhäsionsfähigkeit sollte durch kovalente Bindungen erreicht werden [83].

Mit steigender C-Atomzahl der Alkylreste nahmen die Klebefestigkeit und die Toxizität der Verbindung ab, wohingegen die Elastizität und die Polymerisationszeit zunahm [27, 44, 53]. Durch tauschen der Alkylgruppe ließen sich die Klebeeigenschaften verändern. Als chirurgische Klebstoffe wurden hauptsächlich n-Butyl- bzw. der n-Octylester eingesetzt (Bucrylat), da diese die geringste Toxizität aufwiesen. Bei den mit Cyanoacrylaten durchgeführten Knochenklebeversuchen waren die Erfolge überwiegend unbefriedigend. CHALUPNIK et al. [21] sowie GIEBEL [44] erzielten 1968 nur eine ungenügende Festigkeit der geklebten

Knochen. Die Klebverbindungen waren primär nicht fest oder sie lockerten sich nach wenigen Wochen infolge resorptiver Veränderungen bei der Knochenheilung [84]. Schon 1963 wurde von "guter Bioadhäsion und Frakturheilung" bei Knochenklebung mittels **Cyarin**, einem Ethylcyanoacrylat berichtet [94, 137, 138, 139, 140]. Im weiteren Verlauf der Forschung konnten diese Ergebnisse aber nicht bestätigt werden.

In Europa kam **Biobond**, ein Gemisch aus Ethylcyanoacrylat mit Polyisocyanat und Nitril-Gummi auf den Markt. Die ersten Resultate im Tierexperiment wurden als günstig beschrieben [90]. Die Mehrzahl der Forscher berichtete aber über Komplikationen wie: hohe Infektionsraten, Dislokation, lokale Gewebsreaktionen, Toxizität und Fremdkörperreaktionen [1, 26, 55, 82, 110, 152, 153]. Man führte dies zum größten Teil auf die entstandenen toxischen Abbauprodukte zurück (Cyanessigsäure, Formaldehyd). Der genaue Verlauf des Polymerabbaus sowie dessen Dauer ist bis heute nicht vollständig geklärt. Karzinogenität wurde bisher nur in einer Studie beschrieben [128]. Andere Studien konnten dies bei Butyl- und Isobutyl-Cyanoacrylaten (Bucrylat) nicht nachweisen und beschrieben nur eine Fremdkörperreaktion.

Zusammenfassend gibt es Berichte einiger Autoren [3, 6, 96] über gute Ergebnisse bei Verwendung von Cyanoacrylaten. Dies betrifft vor allem die weniger toxischen n-Butyl- bzw. n-Octylester. Die überwiegende Mehrheit der Forscher und Anwender [10, 29, 62, 72, 74, 75, 85, 104, 136] teilen diese Meinung jedoch nicht. Hauptprobleme waren Dislokation der Frakturenenden und Gewebstoxizität, was zu einem hohen Anteil von Pseudarthrosen und Infektionen führte. Dies gilt vor allem für Ethyl- und Methylcyanoacrylate.

Polymethylmethacrylate (PMMA) werden in der Zahnheilkunde seit 1930 eingesetzt. CHARNLEY und KETTLEWELL [23] benutzten PMMA 1965 als erste für die Verankerung einer Hüft-Total-Endoprothese. Komplikation dieses Klebverfahrens war die Polymerisationshitze sowie die Toxizität der Monomere und Polymere. Begleitend fand sich eine minimale benigne Fremdkörperriesenzellreaktion. Vor der systematischen Anwendung des **Palacos** wurde die biologische Verträglichkeit durch HULLINGER 1962 [60] an Gewebekulturen geprüft, während ZOLLINGER 1962 [155] in St. Gallen histopathologische Untersuchungen

vornahm. HULLINGER [60] zeigte, dass ausgehärtetes Methacrylat von den Zellen sehr gut vertragen wurde. ZOLLINGER [155] fand in der Umgebung des Palacos bei Sektionen 6 und 12 Monate nach dem Eingriff weder Abbau noch reaktive Erscheinungen, wie die Bildung von Granulationsgewebe. Er bezeichnete das Präparat, analog zu HOPPE [57], als ausgesprochen gewebsfreundlich.

Im Tiermodell wurde PMMA in der Frakturbehandlung auf verschiedene Weise verwendet. Als externe Manschette zur Frakturstabilisierung [59, 63], als intramedullarer Splint [11, 59, 70, 122, 131] sowie direkt als Kleber in der Frakturzone [103, 131]. Zumeist wurde von einer guten Fixation und adäquaten Frakturheilung berichtet. Spätere Untersuchungen von TKACHENKO und RUTSKI [138] im Jahre 1968 zeigten gute Ergebnisse bei Klebungen an der Mandibula. Bei Klebungen an der Wirbelsäule, wie auch bei der Klebung von Frakturen langer Röhrenknochen, zeigten sich signifikante Lösungen und Dislokationen der geklebten Fraktur. Ebenfalls erwies sich PMMA als ineffektiv bei der Klebung von osteochondralen Defekten [93].

2.2 Die Klebung als Fügeverfahren

Allgemein ist das Kleben eines der ältesten Fügeverfahren [142]. Werden zwei Substanzen miteinander verbunden, so sind die mechanischen Charakteristika von den Eigenschaften der beiden Materialien und der Verbindungsstärke (Adhäsion) abhängig. Diese Interaktion ist auch bekannt als die Wissenschaft der Zygology (aus dem griechischen ζυγν), einem Begriff der für alles steht, was zwei Körper verbindet [145]. Kleber und Adhäsive beschreiben Materialien, dessen Verbindung zur Oberfläche prinzipiell durch molekulare Anziehung entsteht, wohingegen Kitt und Zemente hauptsächlich durch mechanische Verzahnung und als "spaltfüllende" Stoffe wirken [125]. Bei der Klebung von Objekten resultiert die Verbindung aus zwei verschiedenen physikalischen Prinzipien: Adhäsion und Kohäsion. Die Verbindung zwischen Objekt und aufgetragenem Kleber entsteht durch Adhäsion zwischen den verschiedenen Materialien durch intermolekulare Kräfte. Mit einem guten Kleber sind Adhäsion und Kohäsion ebenso stark, wie die interne Kohäsion der verbundenen Objekte und sichert im Idealfall im Gegensatz zu Schrauben, Nägeln, Drähten und Platten eine gleichmäßige flächenhafte Kraftverteilung [32]. Materialunebenheiten können durch den Klebstoff ausgeglichen und Knochenfragmente in den

ursprünglichen Verbund eingefügt werden. Notwendige Metallentfernungen wären bei der Verwendung eines resorbierbaren und wirksamen Klebstoffes überflüssig.

So positiv die theoretischen Anwendungsmöglichkeiten auch sein könnten, so werden jedoch auch hohe Anforderungen (Grundvoraussetzungen) an einen Knochenkleber gestellt:

- Weder der Kleber noch eines seiner Abbauprodukte darf zelltoxisch, kanzerogen oder teratogen sein. Darüber hinaus darf keine allergische Reaktion auftreten [128].
- Die Klebeverbindung muss so fest sein, dass sie möglichst sofort oder nach einigen Minuten eine funktionelle Beanspruchung erlaubt, wobei aber ein genügend langer Bearbeitungszeitraum des Klebers gewährleistet sein muss [43].
- Der Kleber sollte biologisch abbaubar (degradierbar) sein.
- Der Abbau des Klebers sollte umgekehrt proportional zur Heilung des geschädigten Gewebes ablaufen, um eine durchgehende mechanische Stabilität und ungehinderte Osteoneogenese zu gewährleisten.

2.3 Anwendungsmöglichkeiten eines modernen Knochenklebstoffes

Durch die nachfolgend beschriebenen tierexperimentellen Untersuchungen sollen Grundlagen für eine Verbesserung der Versorgung von Frakturen und Knochendefekten erarbeitet werden. Vor allem beim Vorliegen von Abscherfragmenten bei Trümmerfrakturen (z.B. distale Radiusfrakturen) sollen diese Untersuchungen zur Optimierung der Refixation von Fragmenten und der Knochendefektheilung bei Trümmerfrakturen ohne zusätzliche osteosynthetische Versorgung durch den neuartigen Knochenkleber beitragen.

Dabei ist zu erwähnen, dass die distale Radiusfraktur weltweit die häufigste Fraktur mit 1,96 Millionen Fällen pro Jahr ist. Im Jahr 2010 wird die Zahl der distalen Radiusfrakturen schätzungsweise auf 3,86 Millionen ansteigen. Man muss davon ausgehen, dass die Hälfte dieser Frakturen operativ versorgt werden muss und dass 1/3 der Frakturen unter dem Gesichtspunkt der ansteigenden Osteoporose Trümmerfrakturen sein werden.

Nachfolgend beispielhaft aufgeführt die Zahlen des Statistischen Bundesamtes aus dem Jahr 1999 für Hand- und Fußfrakturen:

Fraktur eines oder mehrerer Fingerglieder	13.303 Fälle
Fraktur eines oder mehrerer Mittelhandknochen	15.265 Fälle
Fraktur eines oder mehrerer Handwurzelknochen	2.633 Fälle
Multiple Frakturen der Handknochen	711 Fälle
Fraktur eines oder mehrerer Fußwurzel- und Mittelfußknochen	24.326 Fälle
Fraktur eines oder mehrerer Zehenglieder	2.591 Fälle

Darüber hinaus stellt sich die Frage einer Anwendung des Klebers in anderen operativen Gebieten, wie der Mund-Kiefer-Gesichtschirurgie und der Oral- und Dentalchirurgie, in der schon seit Jahrzehnten verschiedenste synthetische Kleber erforscht und teilweise eingesetzt werden.

Insbesondere Klebesysteme auf Cyanoacrylat-Basis und Methacrylat-Basis fanden hier Anwendungsmöglichkeiten, konnten sich aber nicht durchsetzen. In diesem Gebiet wurden im Jahr 1999 insgesamt 34.789 Frakturen der Gesichtsknochen und 6.842 Frakturen der Schädelkalotte gezählt. Ebenso könnte die operative Hals-Nasen-Ohrenheilkunde ein mögliches Einsatzgebiet sein.

Aufgrund möglicher Materialeigenschaften mit guter Biokompatibilität und vollständiger Degradation könnte ein Kleber auch als Wirkstoffträger (z.B. für Antibiotika) Verwendung finden.

Um die Frage nach der Indikation eines Knochenklebers zu beantworten, müssen jedoch Biokompatibilitätsprüfungen durchgeführt werden, die in dieser Arbeit vorgestellt und bewertet werden sollen.

2.4 Knochenaufbau und -umbau (Remodeling)

Das Knochengewebe kann in Faser- und Lamellenknochen unterschieden werden. Der Faser- oder auch Geflechtknochen, die entwicklungsgeschichtlich ältere Form des Knochens, ist durch die geflechtartige Anordnung der Kollagenfasern gekennzeichnet. In der Embryonalentwicklung wird dieser Knochen zuerst gebildet, jedoch bereits vor der Geburt teilweise in Lamellenknochen umgewandelt. Dieser Vorgang ist im 2. bis 5. Lebensjahr fast vollständig abgeschlossen.

Ausnahmen bilden die Insertionsstellen der größeren Sehnen und Bänder, die knöcherne Labyrinthkapsel, der äußere Gehörgang, die Nahränder der Schädelknochen und der Processus coronoideus der Mandibula.

Der Lamellenknochen ist durch die lamellenartige Anordnung der Kollagenfibrillen gekennzeichnet. Man unterteilt die Knochenbestandteile in Substantia compacta oder kortikaler Knochen und die Substantia spongiosa oder trabekulärer Knochen. Der Aufbau der Kortikalis besteht aus äußeren Grundlamellen, Speziallamellen oder Havers-Lamellen, Schaltlamellen oder Zwischenlamellen und inneren Grundlamellen (Abb. 1).

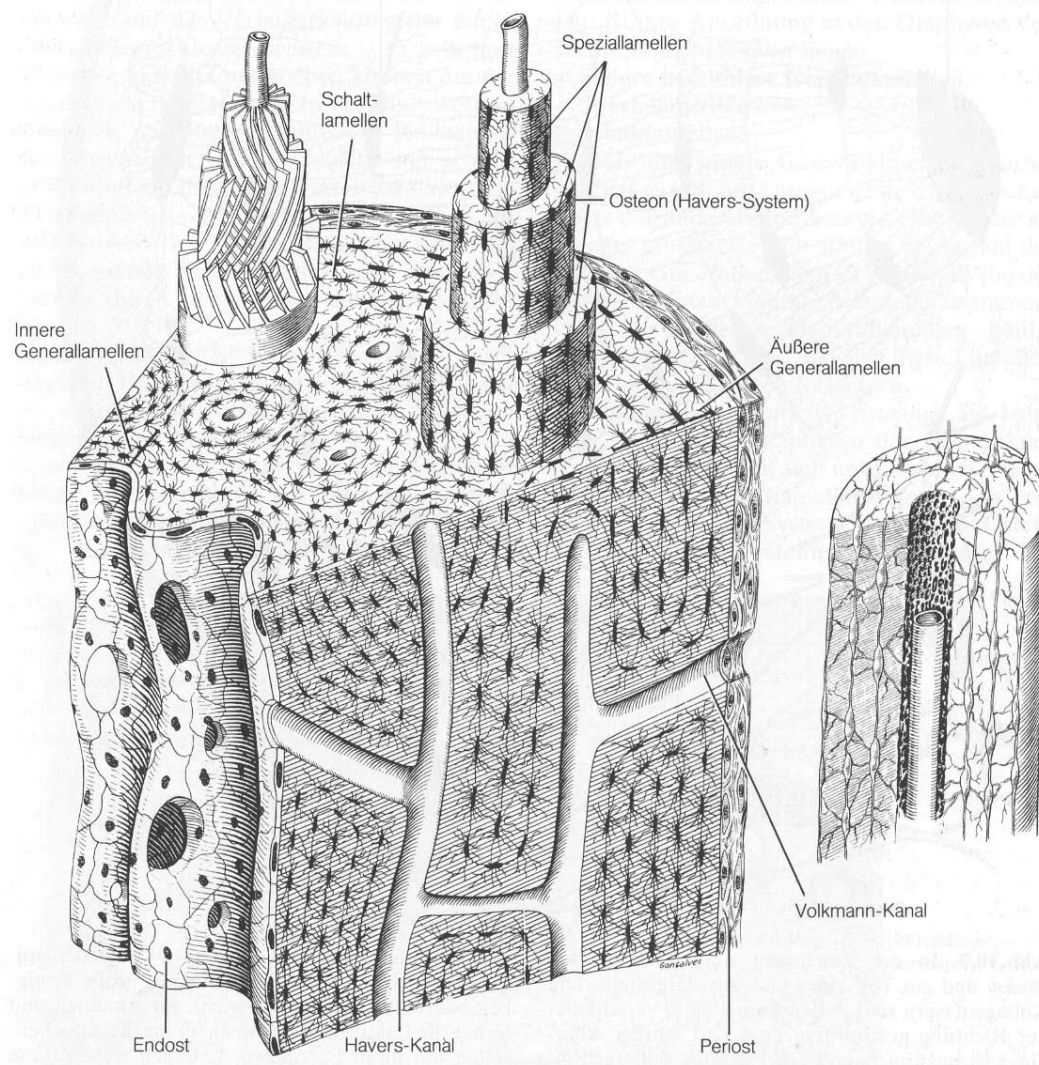


Abb. 1: Schematische Zeichnung eines Ausschnitts der Substantia compacta der Diaphyse eines Röhrenknochens. Zu unterscheiden sind 4 Lamellensysteme: Osteone (Havers-System) mit Speziallamellen eines Osteons dargestellt. Rechts sind ein Osteon mit Zentralkanal, der ein Blutgefäß enthält, Speziallamellen und Osteozyten mit Fortsätzen herausgezeichnet [aus 66].

In der Spongiosa ist ebenfalls der lamelläre Knochenaufbau wieder zu finden, jedoch sind hier die Lamellen und die aus ihnen gebildeten Osteone nicht so deutlich ausgebildet. Das Osteon ist die Grundeinheit des Lamellenknochens. Zentral liegt ein Hohlraum, Havers-Kanal genannt, in dem sich Blutgefäße und vegetative Nervenfasern befinden. Dieser ist von Speziallamellen umgeben und orientiert sich längs der Achse des Knochens. Die Lamellen sind in eine verkalkte Grundsubstanz eingebettet und können rechts- oder linksgewickelt sein, wodurch sich die mechanische Festigkeit deutlich erhöht.

Untereinander sind die Havers-Kanäle durch spitzwinkelige Verzweigungen und durch Volkmann-Kanäle, diese sind nicht von Lamellen umgeben, verbunden. Zwischen den Osteonen liegen Schalt- oder Zwischenlamellen, die zurückgebildete Osteone sind [66].

Im Knochen finden im Rahmen des Stoffwechsels ständig Umbauprozesse statt. Die Resorption durch Osteoklasten folgt sofort im Anschluss an die Formation durch die Osteoblasten. Dieser Vorgang, genannt Bone Remodeling Unit (BRU) oder Bone Metabolic Unit (BMU), wird in sechs verschiedene Abschnitte geteilt (Abb. 2):

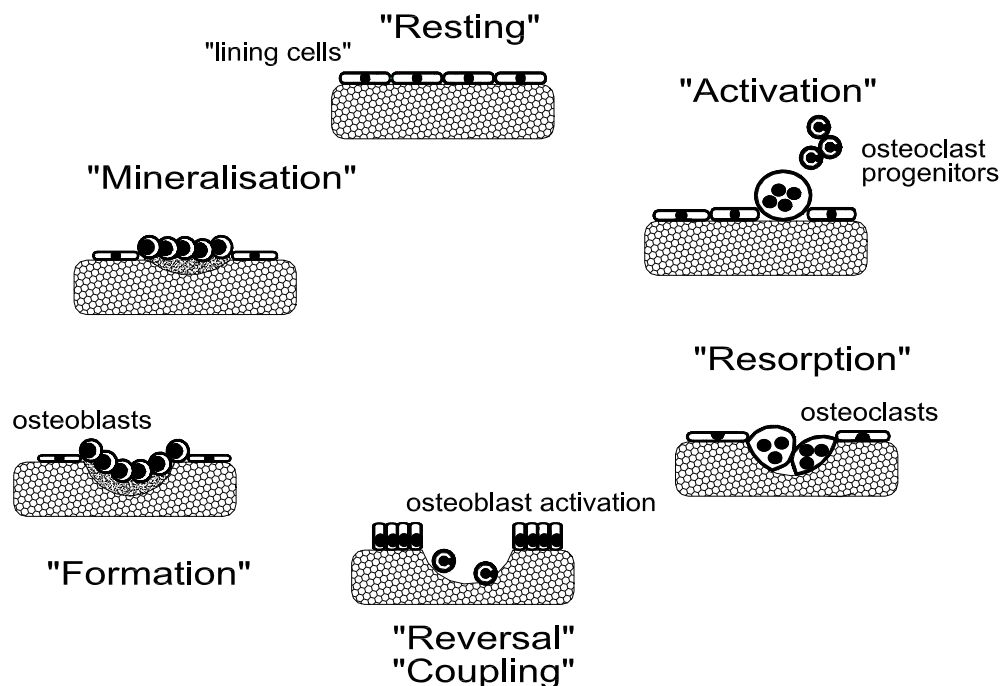


Abb. 2: Stoffwechselbedingte Umbauprozesse im Knochen (BMU/BRU) – [eigene Zeichnung].

Activation. Die Osteoklasten werden aus den hämatopoetischen Stammzellen gebildet und über Blutgefäße zu den Knochen transportiert.

Resorption. Die Osteoklasten bauen Kollagen und andere Proteine ab und setzen Mineralien frei. Im Kontaktbereich mit dem Knochen ("ruffled border") ist eine erhöhte Konzentration von lysosomalen Enzymen und Wasserstoffionen zu erkennen [2]. Ebenso werden Proteasen und saure Phosphatasen gebildet.

Coupling. Die Osteoklasten verschwinden aus den Howship-Lakunen und werden durch mononukleäre Zellen unbekannter Herkunft ersetzt, welche die Resorption vervollständigen. Erste Präosteoblasten differenzieren sich aus periostalen Fibroblasten oder aus undifferenzierten Knochenmarksstammfibroblasten.

Formation. Im Anschluss an die Zellbesiedlung mit Osteoblasten erfolgt die Sekretion der extrazellulären Matrix. Hauptbestandteil ist hier das Kollagen Typ I.

Mineralisation. Nach der Sekretion der unmineralisierten Matrix (Osteoid) wird alkalische Phosphatase sezerniert. Diese führt zur Mineralisation durch: Calcium, Carbonat, Phosphat, Natrium, Magnesium und Eisen.

Resting (Ruhephase). Nach Abschluss der Mineralisation nehmen die Syntheseleistungen der Zellen ab und endostale Belegzellen bedecken die von den Osteoblasten wieder aufgefüllte Lakune [91].

Ungefähr 10% des Knochens wird so pro Jahr in dieser Form umgebaut. Dabei findet dieser Vorgang vorrangig an der Knochenoberfläche statt, so dass wegen seiner größeren Oberfläche der trabekuläre Knochen stärker betroffen ist [66, 86]. Dieser Zyklus dauert etwa 4 Monate, wobei die Resorption 2-4 Wochen und die anschließende Formation 3 Monate dauert. Im gesunden Knochen liegt damit eine ausgeglichene Balance zwischen abgebauter und aufgebauter Substanz vor.

2.5 Zellen des Knochengewebes

Knochenzellen liegen in 4 verschiedenen Formen vor, die nachfolgend beschrieben werden. Die Osteoblasten entstehen aus den Vorläuferzellen und entwickeln sich weiter zu Osteozyten. Osteoklasten sind vielkernige Riesenzellen, die dem Knochenabbau dienen und vermutlich eine andere Herkunft haben als die übrigen Knochenzellen [66].

2.5.1 Vorläuferzellen

Präosteoblasten oder Osteoprogenitorzellen sind die Stammzellen der Knochenzellen. Sie entstehen aus undifferenzierten Mesenchymzellen und liegen in der Nähe der äußeren und inneren Knochenoberfläche sowie in den Havers-Kanälen

2.5.2 Der Osteoblast

Osteoblasten sind mononukleäre Zellen, die aus periostalen Fibroblasten gebildet werden und eine den Osteoklasten entgegengesetzte Funktion besitzen [4]. Die Hauptfunktion der Osteoblasten ist die Synthese der organischen Bestandteile der Knochenmatrix und der Hartsubstanzbildung (Mineralisation). Anzutreffen sind Osteoblasten an der Oberfläche von Knochenbälkchen, wo sie dicht nebeneinander liegen. Gesteuert wird ihre Aktivität vor allem durch Hormone (z.B. somatotropes Hormon).

Die Osteoblasten produzieren Typ-I-Kollagen, welches eine primäre strukturelle Rolle in der extrazellulären Matrix spielt. Osteoblasten sind polarisierte Zellen. Die Abgabe der Syntheseprodukte erfolgt jeweils dort, wo die Zellen mit der Knochengrundsubstanz in Berührung stehen. Hier kommt es auch zur Abschnürung von Matrixvesikeln, die der Hartsubstanzbildung dienen. Die noch nicht verkalkte Grundsubstanz, welche die Osteoblasten abgeben, wird als Osteoid oder Vorknochen bezeichnet.

Bestandteile sind: Kollagen, Proteoglykane und Glykoproteine. Wenn die unmineralisierte Osteoidschicht dicker wird kommt es zur Mineralisation [126]. Dieser noch größtenteils unbekannte Prozess beinhaltet eine Produktion von alkalischen phosphatreichen Matrixvesikeln (alkalische Phosphatase) durch den Osteoblasten

sowie die Bindung von Calcium durch bestimmte Komponenten der Knochenmatrix [41].

Eine Konzentrationserhöhung der alkalischen Phosphatase im Serum spricht für einen gesteigerten Knochenanbau (Wachstum, Frakturheilung). Die Anwesenheit von massenhaften Mineralien erlaubt dem Knochen die Absorption von großen Mengen Proteinen aus extrazellulären Flüssigkeiten. Die Konsequenzen dieses Vorganges sind jedoch bisher ungeklärt [86].

2.5.3 Der Osteozyt

Nach Abschluss der Knochenbildung werden die meisten Osteoblasten in die Knochenmatrix eingemauert und zu **Osteozyten** umgewandelt, andere gehen zugrunde und weitere werden offenbar wieder zu Vorläuferzellen [67]. Die Osteozyten erhalten nicht die vollständige Kapazität der Syntheseleistung der Osteoblasten und zeigen auch eine zu Osteoblasten unterschiedliche Antigenität. Die Mechanismen, durch welche die Osteoblasten ihre Polarität und Synthesefunktion verlieren, um zu Osteozyten zu werden, sind weitgehend unbekannt [86]. Eine Knochenzelle wird dann als Osteozyt bezeichnet, wenn sie ringsum von Knochengrundsubstanz umgeben ist. Reife Osteozyten liegen in verkalkter Grundsubstanz und sind in Schichten angeordnet.

Charakteristisch für die Osteozyten sind feine filopodienartige Zellfortsätze, durch welche die Osteozyten miteinander in Verbindung stehen. Sie dienen dem Stofftransport und stehen untereinander durch „Gap junctions“ in Verbindung, so dass Informationen wie zum Beispiel extrinsische Faktoren (u.a. mechanische Belastungen) mit der Zelloberfläche ausgetauscht werden können [124, 67].

Es gibt 2 funktionell verschiedene Typen:

Die **osteoblastischen Osteozyten** dienen vor allem der Erhaltung der vorhandenen Grundsubstanz, indem sie Kalziumphosphat in ihrem Zytoplasma konzentrieren, welches später zum Aufbau der interzellulären Hartschubstanz verwendet wird. Die **osteolytischen Osteozyten** (mit vielen Lysosomen) haben die Fähigkeit in tiefen Lagen Hartschubstanz abzubauen und damit Kalzium aus dem Knochen freizusetzen [66].

2.5.4 Der Osteoklast

Der Osteoklast ist eine multinukleäre, stark verzweigte, bewegliche (Riesenzelle) Zelle, welche man nur im Knochen findet. Er hat die Fähigkeit mineralisierte Knochenmatrix zu resorbieren [132]. Wie die Makrophagen besitzt diese Zelle eine große Anzahl von Lysozymen, Golgi-Apparaten und Mitochondrien. Sie enthält jedoch nur vereinzelt endoplasmatisches Retikulum und Ribosomen [66].

Die Osteoklasten und Makrophagen besitzen eine gemeinsame Antigenität [64], obwohl Osteoklasten nicht an der Immunantwort beteiligt sind und ihnen Fc- und C3-Rezeptoren fehlen [22]. Bis vor kurzem wurde angenommen, dass auch Osteoklasten aus Vorläuferzellen hervorgehen. Diese Hypothese wird gegenwärtig jedoch bezweifelt. Es gibt nämlich Hinweise, dass Osteoklasten durch Verschmelzung von mononukleären Monozyten entstehen, die aus dem Blut stammen [66]. Ursprung sind somit die pluripotenten Knochenmarkszellen [130].

Dort wo Knochen abgebaut wird findet sich der Osteoklast in Einbuchtungen der Grundsubstanz, den Howship-Lakunen oder Resorptionslakunen [66]. Raster-elektronenmikroskopisch zeigt die der Knochengrundsubstanz zugewandte Oberfläche aktiver Osteoklasten eine unregelmäßige Auffaltung ("ruffled border"), die oft vielfach verzweigt und in dauernder Bewegung ist. Dadurch werden die Zelloberflächen und die aktiv resorbierenden Abschnitte der Osteoklasten vergrößert. Die Wirkungsweise der Osteoklasten ist bisher nicht vollständig geklärt. Der Osteoklast ist in der Lage den extrazellulären Raum zwischen sich selbst ("ruffled border") und dem Knochen zu alkalisieren [2]. Dies erleichtert die Auflösung von Calciumphosphat-Hydroxylapatit-Kristallen der Matrix und hat die Resorption des Knochens durch verschiedene Proteinasen und saure Hydrolasen zur Folge. Studien haben gezeigt, dass der pH-Wert in diesen Bereichen kleiner als 3 ist [120].

Ein Osteoklast kann pro Zeiteinheit die gleiche Knochenmenge abbauen, die von 100-150 Osteoblasten aufgebaut wurde. Die Steuerung der Osteoklasten erfolgt hormonell: Hemmung durch Kalzitonin und Östrogene, Förderung durch Parathormon [132].

2.6 Frakturheilung

Eine Fraktur zerstört die anatomische Kontinuität des Knochens und dies führt zu einer mechanischen Instabilität zwischen den Frakturrenden. Oberste Priorität der Frakturbehandlung ist daher die Wiederherstellung der Kontinuität und der mechanischen Stabilität. Die Wiederherstellung dieser beiden Parameter kann entweder durch offene Reposition und stabile innere Fixation (ORIF = open reduction and stable internal fixation), auf konservativem Weg mit partieller Immobilisierung oder durch spontane Frakturheilung erreicht werden [144]. Sitzen die Frakturrenden direkt aneinander und es herrscht eine stabile Verbindung ohne interfragmentäre Bewegungen, so wird die Frakturheilung hauptsächlich durch **primäre** oder **direkte Knochenneubildung** erreicht. Die **sekundäre Knochenheilung** unter nicht stabilen Verhältnissen ist durch mehr oder weniger prominente Kallusbildung als entscheidendes Kriterium gekennzeichnet. Bei der **indirekten Knochenheilung** als Sonderform der sekundären Knochenheilung findet eine Frakturheilung über Ersatzgewebe statt. Charakteristisch für sie sind: Faserknorpelentstehung und enchondrale Ossifikation in der interfragmentären Region [16].

Primäre (Direkte) Frakturheilung

In Abhängigkeit von der Form der Frakturflächen lassen sich bei der Bildung des Knochengewebes zwei Arten der primären (direkten) Frakturheilung unterscheiden, die so genannte **Kontaktheilung** und die **Spaltheilung**.

Das Modell der direkten Frakturheilung wurde ursprünglich an experimentell erzeugten Schaftfrakturen, mit Kompressionsplatten als Osteosyntheseverfahren, beschrieben. Radiologisch stellt sich dies als allmähliches Verschwinden der Frakturlinie und Fehlen einer Kallusbildung dar. Histologisch zeigt sich eine direkte Knochenneubildung im Frakturspalt, gefolgt von intensivem Knochenumbau an den Frakturrenden.

Die reine **Kontaktheilung** kommt jedoch nur bei experimentell erzeugter glatter Durchtrennung des Knochens mittels einer sehr dünnen Trennscheibe vor [101]. In Wirklichkeit sind die Frakturrenden nicht glatt, sondern uneben. Selbst bei peinlich genauer Reposition wird eine vollständige Kongruenz zwischen den Kontaktflächen fast nie erreicht.

Kontakt folgt der Kompression nur in begrenzten Zonen (oder Punkten). Hier stehen die Kortikales in direktem Kontakt zueinander, so dass es über die Frakturebene hinweg zu Remodelling kommt. Hierzu bilden sich an den Enden der Osteone, die dem Frakturspalt am nächsten liegen, so genannte „Cutting Cones“ (Resorptionskanäle).

Ihre Spitze ist mit Osteoklasten, ihr hinteres Ende mit Osteoblasten ausgekleidet. Die Knochenresorption und -bildung erfolgen simultan, während sich die Cutting Cones vorwärts schieben und den Frakturspalt überqueren [61, 77, 117]. Nach SCHENK [116] wird ein Bohrkanal durch die Osteoklastentätigkeit pro Tag etwa 50-100 µm vorangetrieben. In den Kanälen entsteht sodann Osteonknochen, der den Frakturspalt „bolzenartig“ überbrückt [115].

Neben den Flächen mit absoluter Kongruenz gibt es große Gebiete mit schmalen Spalten, die durch angrenzende Kontaktflächen gegenüber mechanischen Deformationen geschützt werden.

Die Knochenenden sind somit nicht exakt aneinandergelagert. Die Verschiebung muss weniger als 2% betragen und der Spalt darf maximal 1 mm weit sein. Die Knochenbruchheilung in diesen Bereichen bezeichnet man dann als **Spaltheilung**. Sie läuft in zwei Phasen ab. Zunächst dringen Kapillaren der endostalen und periostalen Gefäße in den Spalt. Aus dem perivaskulären Bindegewebe differenzieren sich Osteoblasten, die Faserknochen/Geflechtknochen bilden.

Im zweiten Schritt wird das initiale Grundgerüst durch Parallelfaser- und/oder Lamellenknochen verstärkt. Nach Ablauf einiger Wochen erfolgt der Umbau der gesamten Frakturregion in Lamellenknochen. An einer durch Kompression ruhig gestellten Fraktur kann man stets beide Formen der primären Knochenheilung nebeneinander beobachten [16, 101].

Die primäre Knochenheilung wird bei der modernen operativen Frakturversorgung (Osteosynthese) angestrebt. Hierbei werden mittels Metallplatten und Schrauben (Druckplattenosteosynthese) oder intramedullärer Nägel die Frakturteile unter Druck exakt adaptiert und optimal stabilisiert. Damit kann eine primäre Frakturheilung als Kontakt- oder Spaltheilung eintreten.

Weitere Vorteile der Osteosynthese sind die frühe Belastbarkeit der Frakturenenden, eine frühe Mobilisierung der Patienten und damit eine Verminderung häufiger Komplikationen (Muskelatrophie, Inaktivitätsatrophie der Knochen, Lungenembolie).

Infolge einer lokalen Druckatrophie oder Nekrosen im Plattenbereich können jedoch unter Umständen nach Entfernung der Osteosyntheseplatte bei zu starker Belastung Refrakturen auftreten.

Sekundäre Frakturheilung

Die Stabilität reicht bei diesem Heilungstyp nicht aus, um Verschiebungen innerhalb des Frakturspalt es derart zu reduzieren, dass der Knochen angelagert werden kann. Es gibt vielmehr Bereiche im Frakturspalt, die instabil sind und in denen ein starker interfragmentärer Zug vorherrscht.

Hier kommt es zur Resorption der Knochenenden, wodurch sich der Frakturspalt vergrößert und die interfragmentäre Belastung verringert wird. Die spontane Heilung einer Fraktur erfolgt in der Regel über ein bindegewebig vorgebildetes Reparationsgewebe, den so genannten Kallus. Er kann als periostaler, kortikaler oder endostaler Kallus auftreten.

Art und Ausdehnung des Frakturkallus hängen im Wesentlichen von der Größe des Frakturspalt es und der Beweglichkeit der Fraktarenden ab. Durch frakturbedingte Risse im Periost oder Endost bildet sich primär ein Frakturhämatom, das durch unspezifisches Granulations- und Fasergewebe zum provisorischen Faser- oder Füllkallus organisiert wird. Bei ausreichender Stabilität der Fraktur können sich Fibroblasten zu Osteoblasten umwandeln und unreifen Geflechtknochenkallus bilden.

Dieser primäre Knochenkallus ist zwar mineralisiert, aber nicht belastbar und muss erst zu sekundärem lamellärem Knochen (sekundärer Knochenkallus) umgebaut werden, wobei auch resorptive und sklerosierende Knochenumbauvorgänge eine Rolle spielen. Die Bildung des endgültigen belastbaren Knochenkallus ist nach etwa 6-8 Wochen abgeschlossen [61, 77, 115, 116, 117].

Bei ungenügender Stabilisierung der Fraktarenden bildet sich je nach Beweglichkeit im Faserkallus metaplastisches hyalines Knorpelgewebe, Knorpelkallus, der wie bei der enchondralen Ossifikation zu primärer und sekundärer Spongiosa umgebaut werden kann (indirekte Knochenheilung). Bei bleibender oder ausgeprägter Beweglichkeit der Fraktarenden kann das Knorpelgewebe persistieren und die knöchernen Frakturteile umschließen, so dass eine Neoarthrose oder Pseudarthrose entstehen kann.

3 Material und Methoden

3.1 Versuchstiere

Als Versuchstiere wurden ZiKa-Kaninchen verwendet. ZiKa bedeutet „Zimmermann-Kaninchen“ und ist eine vom Züchter selbst gezüchtete Rasse. Vergleichbar sind diese Tiere in Größe und Gewicht mit der Rasse "Deutscher Riese". Insbesondere wegen der überproportionalen Größe und Gewicht im Vergleich zu anderen Kaninchen wurden diese Tiere ausgewählt.

Die Versuche erfolgten erst nach einer ausreichenden Eingewöhnungszeit der Tiere an ihre Umgebung. Im weiteren Versuchsablauf wurden die Kaninchen im Tierstall der Firma MERCK, Darmstadt untergebracht. Die Haltung erfolgte in Gruppen auf Stroh, damit die Tiere genügend Bewegung hatten und die Beine entsprechend belastet waren. Bei der täglichen Fütterung erfolgte die Kontrolle des Allgemeinverhaltens. An definierten Terminen erfolgte die veterinärmedizinische Nachuntersuchung und Dokumentation des Heilungsverlaufes der OP-Wunde am Hinterlauf.

Die Bestimmungen des Tierschutzgesetzes (§ 8 Abs. 1 in der Fassung vom 18.8.1986, BGB1.I.S. 1319 mit Änderung des Artikels 3 vom 20.8.1990), nach Genehmigung des Tierversuches im August 2000 durch die Tierschutzkommission, wurden strikt eingehalten. Die Ernährung erfolgte mit Wasser und standardüblichem Trockenfutter ad libitum.

3.2 Prüfsubstanz Knochenklebstoff

3.2.1 Chemische Zusammensetzung

Ausgangspunkt für die Entwicklung eines degradierbaren Polymers für das Kleben von Knochenfragmenten waren Adhaesivsysteme auf der Basis von Alkylen-bis(oligolactoyl)methacrylaten. Die Monomere werden dabei aus einem Diol (z.B. Ethylenglykol), einer Hydroxycarbonsäure (z.B. Milchsäure, eingesetzt in Form von Lactid) und Methacrylsäure (MAS) aufgebaut (Abb. 3). Das Monomer Ethylenglycol-oligolactid-dimethacrylat (ELAMA) wird hieraus in zwei Syntheseschritten gefertigt und kann in seiner Struktur durch Variationen der Alkoholkomponente und der Hydroxycarbonsäure modifiziert werden. Synthesebedingt enthalten die Monomere 1 Masse-% Methacrylsäure (MAS) als hydrophiles Comonomer.

Für die durchgeführten Kleinterversuche (Serie 1 und 2) wurden zur Einstellung der Aushärte- und Abbaueigenschaften (Abbaugeschwindigkeit) verschiedene weitere Comonomere dem oben beschriebenen Hauptmonomeren zugesetzt.

Als Comonomer können verwendet werden:

- Methacrylsäure (MAS)
- Methylmethacrylat (MMA)
- Cyclohexylmethacrylat (cHMA)
- Hydroxyethylmethacrylat (HEMA)
- Hydroxyethylmethacrylat-oligolactid (HEMALA)

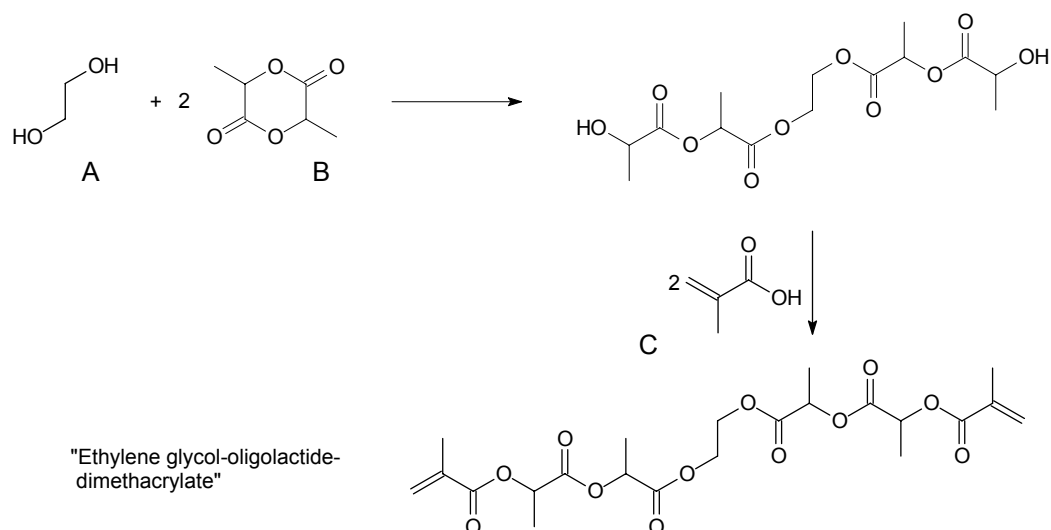


Abb. 3: Zweistufige Synthese von Ethylenglycol-oligolactid-dimethacrylat (ELAMA), ausgehend von Ethylenglykol (A), Lactid/Milchsäure (B) und Methacrylsäure (C).

Da sich bei den Operationen der ersten Serie im September 2000 herausstellte, dass das verwendete Material für eine sichere Applikation zu dünnflüssig war, wurde für die zweite Serie im Dezember 2000 ein Comonomer mit einer höheren Viskosität verwendet. Hierzu wurde MMA durch HEMALA-1,3 (3 Mol Lactid, d.h. 6 Milchsäureeinheiten pro Hydroxyethylmethacrylat) ersetzt. Alle weiteren Inhaltsstoffe blieben unverändert. Zusätzlich zu 1 Masse-% Methacrylsäure enthielten die verwendeten Abmischungen somit folgende weiteren Verbindungen (Abb. 4):

Serie 1 (September 2000)

4 Masse-% Methylmethacrylat (MMA)

Serie 2 (Dezember 2000)

5 Masse-% Hydroxyethylmethacrylat-
oligomilchsäureester (HEMALA-1,3)

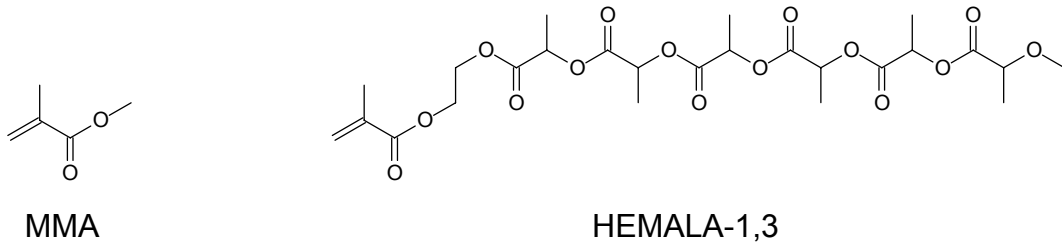


Abb. 4: Die Comonomere der Serie 1: MMA und der Serie 2: HEMALA-1,3.

In allen Versuchen diente eine 3 Masse-%ige Lösung von 9-Borabicyclononan (9-BBN) gelöst in einem Träger von Polyethylenglycol-400 (PEG-400) als Starterkomponente.

Als Träger können verwendet werden:

- Ethylenglykol-oligolactid (ELA)
- Polyethylenglykol-400 (PEG-400)

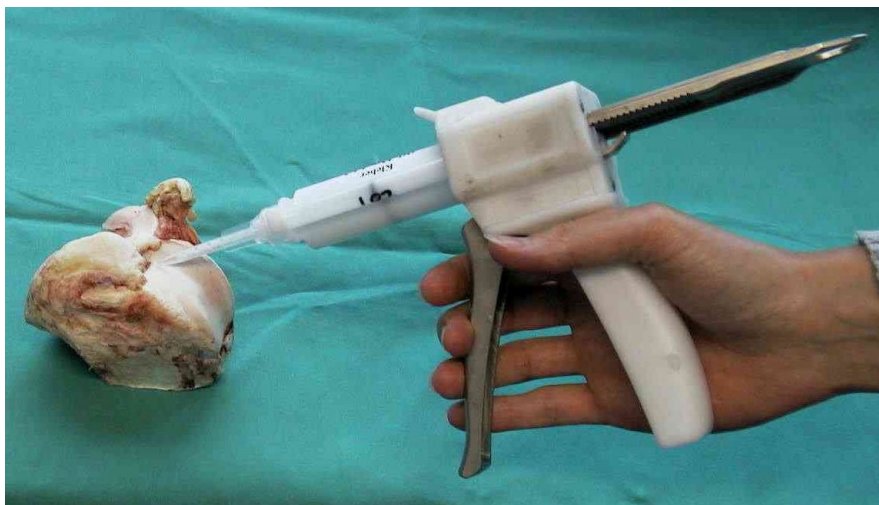


Abb. 5: 2-Kammermischsystem zur Applikation des Knochenklebstoffes.

Als Polymerisationsbeschleuniger enthalten alle Monomermischungen 2 Masse-% tert.-Butylperoxybenzoat. Starterträgerkomponente und Monomer (ELAMA + Comonomer) werden im Verhältnis 1:10 durch ein 2-Kammermischsystem mit einem aufgesetzten Statikmischer appliziert (Abb. 5).

Der verwendete Knochenklebstoff weist eine pastöse Konsistenz auf und beginnt nach ca. 1 Minute auszuhärten. Nach 5 Minuten ist die mechanische Festigkeit erreicht und nach 24 Stunden ist das Polymer komplett ausgehärtet.

Das ausgehärtete Polymer besteht dabei aus ca. 65 Masse-% Milchsäure, zu 25 Masse-% aus wasserlöslichen Polymethacrylsäuren und zu 10 Masse-% aus Ethylenglykol (Abb. 3, 6, 7).

3.2.2 Degradation

Der Abbau des polymeren Klebstoffnetzwerkes beginnt mit der Hydrolyse der Ester-Verbindungen (Abb. 6). Es entstehen Ethylenglykol, Milchsäure und Oligomere/ Polymere der Methacrylsäure (Abb. 7).

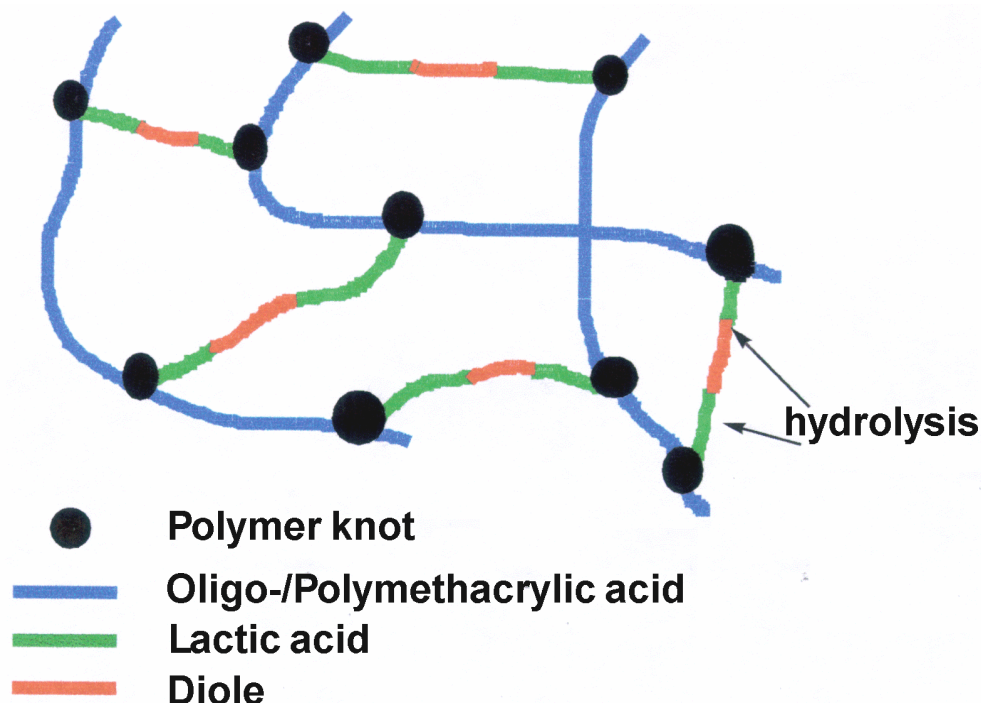


Abb. 6: Polymeres Netzwerk des Knochenklebstoffes.

Ethylenglykol und Milchsäure sind Metabolite des menschlichen Stoffwechsels. Sie fließen in den "Zitronensäurezyklus" ein, werden verstoffwechselt und verlassen den Körper als Kohlendioxid und Wasser. Die verbleibenden Oligomere/Polymere der Methacrylsäure, welche hoch wasserlöslich sind, können vom Körper über die Niere ausgeschieden werden. Voraussetzung hierfür ist ein Molekulargewicht kleiner 8000 g/mol. Bei den Methacrylsäureoligomeren im Klebstoff kann davon ausgegangen werden, dass sie durch stereometrische Hemmung während der Polymerisation dieses Molekulargewicht nicht erreichen.

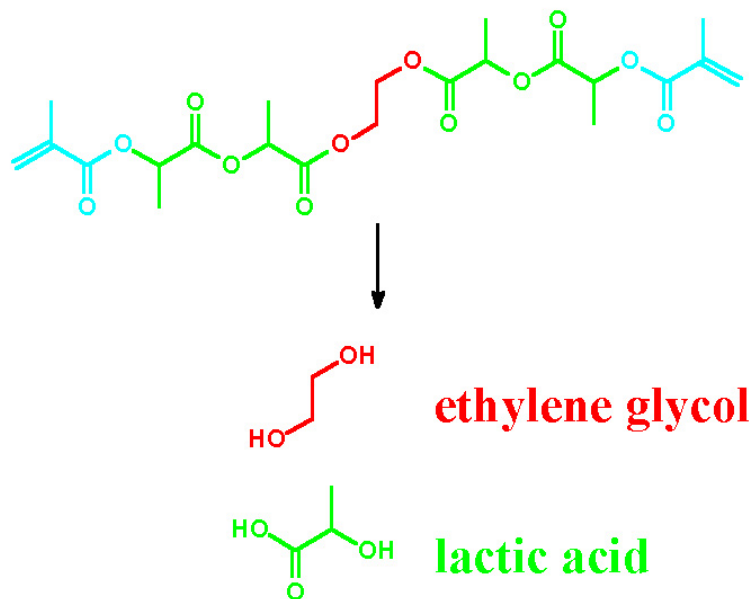


Abb. 7: Degradationsprodukte des Knochenklebstoffes (blau - Methacrylat).

Die in vitro Abbauuntersuchungen wurden in Soerensen Puffer (pH = 7,4) bei 37°C nach ISO 15814 (Implants for surgery - Copolymers and based on polylactide - In vitro degradation testing) durchgeführt. Es erfolgte die Herstellung von Klebstoffzylindern mit einem Durchmesser von 5 mm und einer Höhe von 10 mm. Diese wurden für 24 Stunden ausgehärtet und dann in der Pufferlösung inkubiert (Abb. 8). Der pH-Wert der Lösung wurde wöchentlich überprüft und wenn nötig durch Zugabe von 0,1 N KOH nachgestellt. Für jeden Zeitpunkt wurden sechs Proben entnommen, getrocknet und gewogen. Die Untersuchungen zeigten für alle Monommischungen in der ersten Woche einen Masseverlust von ca. 12 %. Von Woche 2 bis 26 wurde ein annähernd linearer Masseverlust von circa drei Prozent pro Woche ermittelt (Abb. 9).



Abb. 8: Hydrolyse-Stadien der Klebstoffzylinder - unterschiedliche Ansicht.

Bis zu Woche 12 blieben die Zylinder äußerlich intakt bevor ausgedehnte Hydrolyse zu einer verstärkten Wasseraufnahme in das Polymernetzwerk mit starkem Aufquellen der Proben führte (Abb. 8). Die Polymerpellets waren nach 30 Wochen Abbau in vitro verschwunden, da sich die verbliebenen Polymethacrylsäure Ketten aufgelöst hatten.

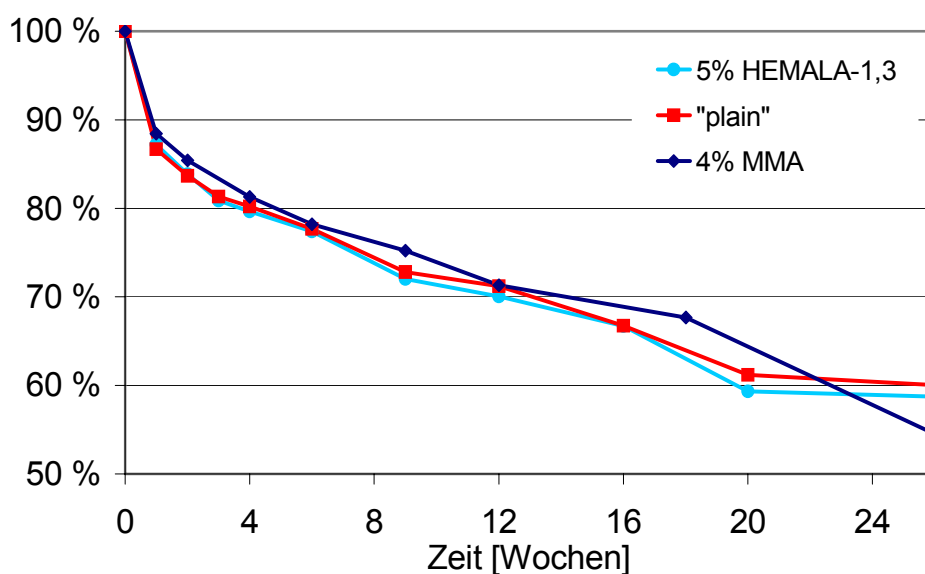


Abb. 9: Mittlere Probenmasse der Polymerzylinder nach Degradation in Soerensen Puffer (pH = 7,4 in vitro).

Anmerkung zu den Abbauprobieren in Abb. 9:

Dunkelblaue Kurve: **Serie 1** - ELAMA mit 4 % MMA/3g 9-BBN in PEG-400

Hellblaue Kurve: **Serie 2** - ELAMA mit 5 % HEMALA-1,3/3g 9-BBN in PEG400

Rote Kurve: **Großtierversuch (Planung)** - ELAMA "plain"/3g 9-BBN in PEG-400

Die verwendeten Varianten der Serie 1 und 2 unterschieden sich nur durch das Comonomer (4 % MMA vs. 5 % HEMALA), wobei die Unterschiede der Abbaugeschwindigkeit in vitro gering waren.

Die in den in vivo Untersuchungen aufgetretenen Auffälligkeiten (siehe Kapitel 3 - Ergebnisse) können durch das Comonomer HEMALA-1,3 (Serie 2) hervorgerufen worden sein.

Für die anschließend geplanten Versuche (Großtierversuche) wurde entschieden, auf ein weiteres Comonomer zu verzichten. Die im Vergleich zu Serie 2 dann etwas niedrigere Viskosität erschien akzeptabel.

3.3 Versuchsplanung und Versuchsablauf

Am Hinterlauf von 48 Kaninchen wurde eine monokondyläre Osteotomie mit Abtrennung der lateralen Femurkondyle durch Osteotomie unter Verwendung einer oszillierenden Säge bei kontinuierlicher Kühlung mit physiologischer Kochsalzlösung (NaCl 0,9 %) erzeugt. Es wurden 3 Gruppen gebildet (Tab. 3). Gruppe 1 diente als Kontrollgruppe mit Fixation der lateralen Femurkondyle mit je zwei Kirschner-Drähten ohne Applikation von Knochenklebstoff.

In Gruppe 2 wurde vor Reposition und Fixation der lateralen Femurkondyle Knochenklebstoff durch ein 2-Kammermischsystem mit aufgesetztem Statikmischer in die Osteotomiezone eingebracht. Die Kontroll- und Klebstoffgruppe bildeten zusammen die Serie 1.

Bei der Serie 2 wurde anstelle der Fixation mit 2 Kirschner-Drähten eine Reposition mit einem Kirschner-Draht und einer 3,5 mm kanülierten Spongiosazugschraube (Firma SYNTHES, Umkirch) durchgeführt. Hierdurch sollte eine absolut stabile Versorgung der Osteotomie, ohne Bewegung zwischen den beiden Fragmenten, erzeugt werden. Innerhalb der Versuchsgruppen erfolgte die Einteilung nach dem Beobachtungszeitraum. Die Tiere der Serie 1 wurden nach 7, 21, 42 und 84 Tagen euthanasiert, die der Serie 2 nach 21 und 42 Tagen (Tab. 3).

Fixations- Verfahren	Euthanasie nach OP (Tage)	Anzahl (n)	Gesamt (n)
Serie 1 Kontrolle: K-Drähte	7	3	n=12
	21	3	
	42	3	
	84	3	
Serie 1 Knochenklebstoff + K-Drähte	7	6	n=24
	21	6	
	42	6	
	84	6	
Serie 2 Knochenklebstoff + Schraube	21	6	n=12
	42	6	

Tab. 3: Versuchsprotokoll - Gruppeneinteilung.

Randomisierung

Um für die Versuchs- und Kontrolltiere den statistischen Regeln entsprechend gleichmäßige Ausgangssituationen zu schaffen, wurde die Randomisierung in Klebstoff- und Kontrollgruppen, erst nach Beendigung der Osteotomie intraoperativ vorgenommen. Vor Beginn der 1. und 2. Versuchsreihe war eine Randomisierungsliste erstellt worden. Die jeweilige Zuordnung bestimmte das Losverfahren.

3.4 Narkose

Nach der Prämedikation (Atropin 1-2 mg/kg s.c. pro Tier, eventuell Valium® 0,25 ml s.c. pro Tier) wurden nach einer Wartezeit von ca. 30 Minuten Ketavet® (35-70 mg/kg) und Rompun® 2% (4-5 mg/kg) gemeinsam intramuskulär injiziert. Die Nachdosierung erfolgte intravenös über eine Butterfly-Kanüle in die Ohr randvene des Kaninchens mittels Rompun® und Ketavet® (1,2 ml Ketavet® + 0,4 ml Rompun® ad 5,0 ml) Die Applikation erfolgte bei Bedarf nach Wirkung.

Jedes Tier erhielt zum Zeitpunkt der Narkoseeinleitung (präoperativ) eine Antibiotische Infektionsprophylaxe: Refobacin® 5 mg/kg KG i.v. + Cefuroxim 250® 20 mg/kg KG i.v.

3.5 Operationsmodell

Um auf die Humanmedizin übertragbare Verhältnisse zu generieren war es notwendig, ein Fraktur- bzw. Osteotomiemodell zu erstellen, welches in seiner Aussagekraft der operativen Versorgung und den ablaufenden biologischen Formations- und Resorptionsvorgängen des Knochens (Osteogenese) dem des Menschen bei monokondylären Femurfrakturen gleichzusetzen war.

Da beim Menschen in Anlehnung an die 3 Typen der monokondylären Femurfraktur die laterale am häufigsten auftritt und sich dieses ausgewählte Fraktur-/Osteotomiemodell als erprobt und etabliert zeigt, wurde die laterale Femurkondyle der Kaninchen abgesetzt [99, 151].

Nach Einleitung der Narkose erfolgte das Scheren der betroffenen Extremität, die Desinfektion und die sterile Abdeckung mit OP-Tüchern.

Lateraler Zugang zum Kniegelenk mit Luxation der Patella nach medial und Beugen des Kniegelenkes auf 90° (siehe Abb. 10 und 11).



Abb. 10: Lagerung.

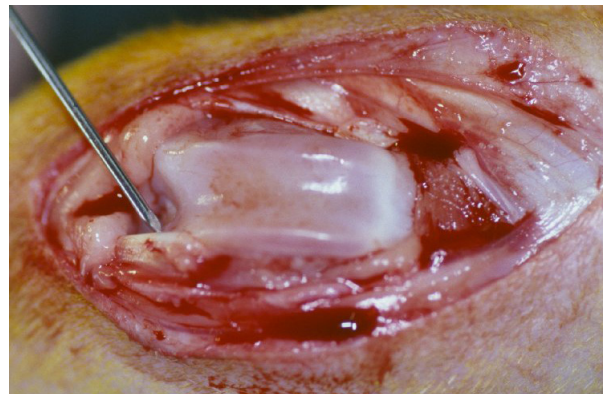


Abb. 11: Lateraler Zugang.

Nun erfolgte die Markierung der Osteotomiehöhe mit Hilfe eines 1 mm Kirschnerdrahtes und dann die Osteotomie der lateralen Femurkondyle mit einer oszillierenden Säge (Firma SYNTHES, Umkirch) unter kontinuierlicher Wasserkühlung (Abb. 12 A und B, Abb. 13 A und B). Durch Separation der lateralen Femurkondyle bei jedem Tier wurde die komplette Osteotomie überprüft und damit ein standardisiertes und reproduzierbares Vorgehen gewährleistet.

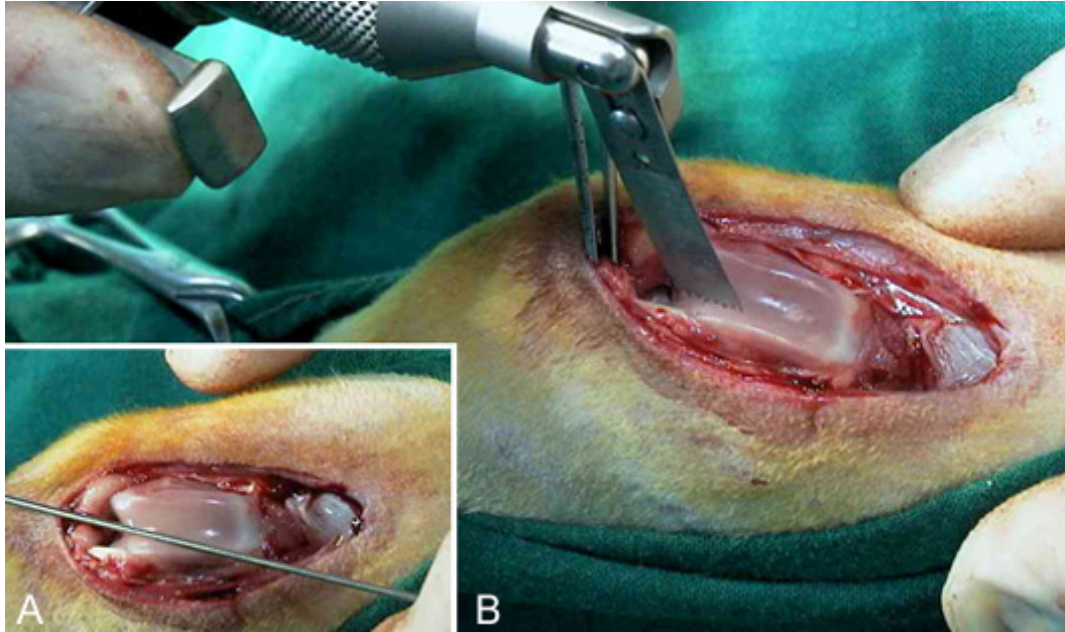


Abb.12: B - Osteotomie mit oszillierender Säge (Absetzen der lateralen Femurkondyle).
A - Markierung der Osteotomie-richtung durch K-Draht.

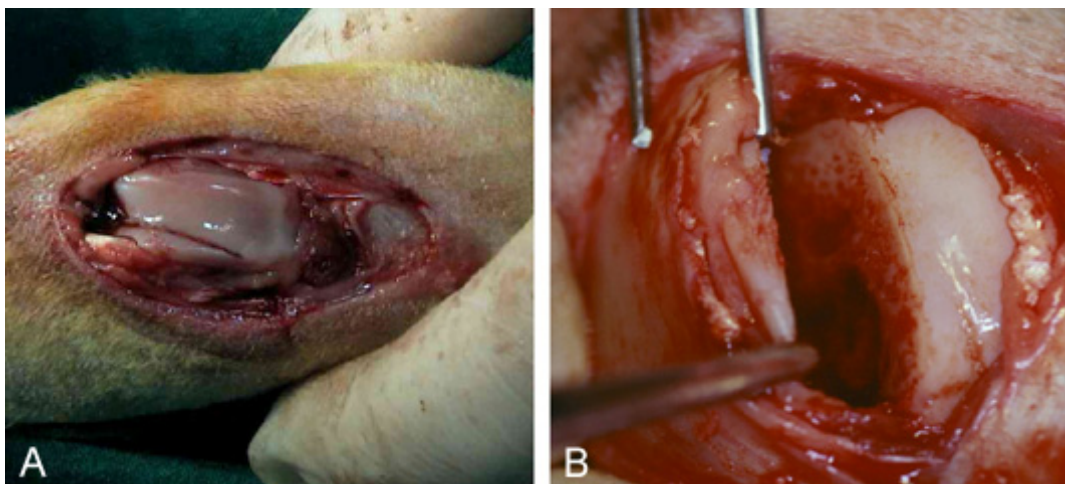


Abb. 13: A+B: Komplettierte Osteotomie der lateralen Femurkondyle.

Klebstoffapplikation – Reposition der lateralen Femurkondyle in Serie 1 und 2

Nach Dislokation der lateralen Femurkondyle erfolgte zunächst mehrmaliges Spülen der Osteotomiezone mit physiologischer NaCl-Lösung. Anschließend wurden die Osteotomieflächen mit sterilen Kompressen getrocknet.

Die langsame und gleichmäßige Applikation des Knochenklebstoffes erfolgte auf beide Osteotomieflächen mit einem 2-Kammermischsystem (Abb. 5 und 14 A). Nach der Applikation erfolgte die korrekte anatomische Reposition der lateralen Femurkondyle durch eine Repositionszange (Abb. 14 B). Grundvoraussetzung für

dieses Manöver war die exakte Reposition innerhalb von 60 Sekunden. Nach Überschreiten dieser Zeitgrenze konnte eine Unwirksamkeit bzgl. der mechanischen Festigkeit des Knochenklebstoffes durch eine ausbleibende Verklebung der beiden Osteotomieenden bei beginnender Aushärtung des Klebstoffes beobachtet werden. Bei missglückter oder nicht zufrieden stellender Reposition wurde das Manöver frühzeitig abgebrochen und nach Abtragung der ausgehärteten Klebstoffreste aus der Osteotomiezone ein erneuter Repositionsversuch begonnen. Wurde die korrekte anatomische Reposition erzielt, musste nun bei jedem Tier (aus der Klebstoffgruppe) nach Klebstoffapplikation eine Ruhephase (Fixationsphase) von 5 Minuten eingehalten werden. Nach diesem Zeitraum konnte nach kurzfristiger und vorsichtiger Entfernung der Repositionszange eine komplette Aushärtung, eine Verankerung zwischen Klebstoff und Spongiosa der Osteotomiezone sowie eine mechanische Festigkeit beobachtet werden.

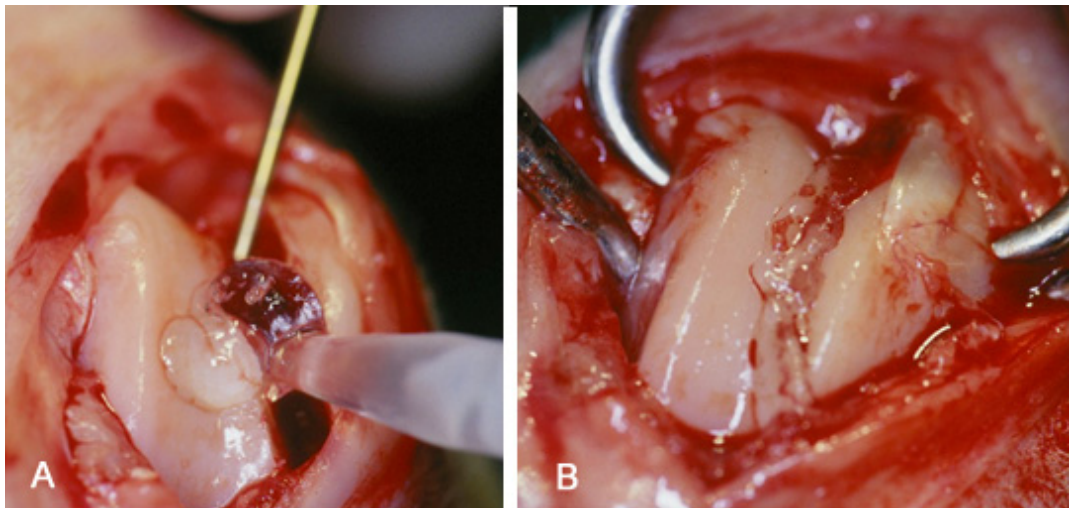


Abb. 14: A - Klebstoffapplikation in den Osteotomiespalt. B - Anatomische Reposition der lateralen Femurkondyle mit einer Repositionsklemme (Fixationsphase).

Fixation der lateralen Femurkondyle in Serie 1

Im Anschluss an die Fixationsphase von 5 Minuten wurde bei den Tieren der Klebstoffgruppe nachfolgend die laterale Femurkondyle mit zwei parallel senkrecht zur anatomischen Achse eingebrachten 1 mm starken Titan-Kirschner-Drähten fixiert (Abb. 15), im Abstand von 1 cm zum Knochen abgetrennt und umgebogen, um eine Wanderung der Drähte zu verhindern. Die Fixation der lateralen Femurkondyle erfolgte dabei ohne Kompression. Die Repositionszange wurde schließlich entfernt

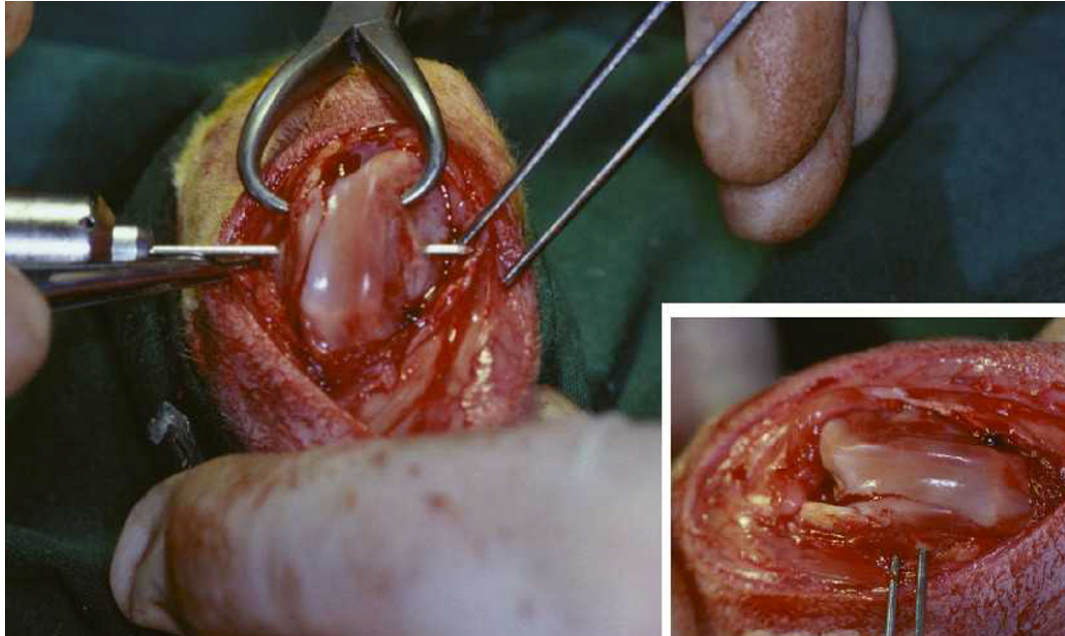


Abb. 15: Fixation der lateralen Femurkondyle durch zwei 1 mm starke, parallel eingebrachte Kirschner-Drähte aus Titan (senkrecht zur anatomischen Achse) (Serie 1).

und das Repositionsergebnis nochmalig überprüft und beurteilt. Zuletzt wurde die Cutis verschlossen und nach Desinfektion ein Pflastersprühverband (Nobecutan, Firma ASTRA Chemicals, Norderstedt) aufgebracht. Zusätzlich erfolgte die Applikation eines Klebstoffdepots bei drei Kaninchen in eine subcutan präparierte Tasche am Rücken des Kaninchens (Abb. 16).



Abb. 16: Klebstoffapplikation in eine subcutan präparierte Tasche am Rücken eines Kaninchens.

Fixation der lateralen Femurkondyle in Serie 2

In Serie 2, bei der insgesamt 12 Klebstoff-Kaninchen (in einem Abstand von 3 Monaten zur Serie 1) nachuntersucht wurden, kam ebenfalls das zuvor beschriebene Osteotomiemodell der lateralen Femurkondylenfraktur zum Einsatz. Wie in Serie 1 wurde die Klebstoffapplikation sowie eine Reposition der lateralen Femurkondyle durchgeführt. Nach der Fixationsphase von 5 Minuten wurde, im Gegensatz zur Serie 1, ein 1 mm starker Kirschner-Draht aus Titan senkrecht zur anatomischen Achse eingebracht. Neben diesen Kirschner-Draht (Führungsdraht) wurde nach Vorbohren mit einem 2,7 mm Bohrer und gemäß der ermittelten Länge eine 3,5 mm kanülierte Titan-Schraube mit kurzem Gewinde (Firma SYNTHES, Umkirch) platziert und mit dem durchbohrten Schraubenzieher fest bis zur Verankerung in der Gegenkortikalis der medialen Femurkondyle geschraubt (Abb. 17, 18).

Dadurch konnte im Vergleich zur Serie 1 ein Kompressions-Klebstoffmodell zusätzlich untersucht werden. Zuletzt erfolgte wie in der Serie 1 beschrieben, die Reposition der Patella und Verschluss der einzelnen Gewebeschichten.

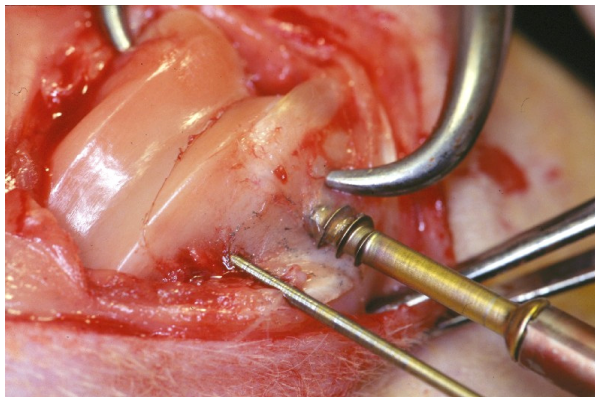


Abb. 17: 3,5 mm kanülierte Titan-Schraube (Zugschraube) mit kurzem Gewinde (Serie 2).



Abb. 18: Fixationsergebnis in Serie 2 – kanülierte Titan-Schraube und K-Draht.

3.6 Die Nachsorge der Tiere

Nach der Operation wurden die Kaninchen in eine Aufwachbox gebracht, in der mit Hilfe von Infrarotlampen eine warme und ruhige Umgebung geschaffen wurde. Anschließend wurden sie in ihre Ställe zurückgebracht, die mit viel Stroh ausgepolstert waren.

Während des gesamten Beobachtungszeitraums befanden sich die Tiere in veterinärmedizinischer Betreuung und Überwachung. Die Tierhaltung erfolgte im Tierstall der Firma MERCK (Darmstadt).

Das Allgemeinbefinden, das Gewicht, das Verhalten und die Operationswunde der Tiere wurden täglich kontrolliert und protokolliert.

Ein Tier (Nummer 07) musste infolge einer Patellaluxation einer K-Draht Dislokation nach 2 Wochen getötet werden.

3.7 Perfusion

Für die histologische Aufarbeitung wurde die Perfusion der Versuchstiere als wesentlich erachtet, um die sofortige Fixierung des Gewebes sicherzustellen. Sie erfolgte in Narkose in der Folgend beschriebenen Weise. Das Abdomen wurde in der Medianlinie eröffnet, der Darm auf die Seite verlagert und das Retroperitoneum gespalten. Die Aorta abdominalis und die Vena cava inferior wurden in ganzer Länge dargestellt, die Aorta nach proximal ligiert, ein dünner Katheter eingebracht und eingebunden. Das Einbringen eines PVC-Schlauches in die Vene erfolgte in gleicher Weise. Es wurden 500-1000 ml Ringerlösung in das Blutgefäßsystem gegeben um das restliche Blut herauszuspülen. Um die Blutgefäße für die anschließende Fixierung weit zustellen, wurden nun 40 ml Rheomacrodex[®] verabreicht. Unmittelbar nach Tötung der Tiere mit T61[®] erfolgte eine Perfusionsfixation mit einer körperwarmen Karnowsky-Lösung. Danach erfolgte die Exartikulation der Femura in Hüft- und Kniegelenk. Die Knochen wurden in 70%igen Alkohol eingelegt.

3.8 Röntgendiagnostik

Die Röntgenaufnahmen der Femurkondylen erfolgten sofort post mortem an der exartikulierten unteren Extremität nach Präparation und Entfernung der Weichteile. Aufnahmen wurden in zwei Ebenen und zwar im anterior-posterioren und lateralen Strahlengang durchgeführt. Nachfolgend wurden die Knochen in 70%igen Alkohol eingelegt.

Die Röntgenaufnahmen wurden mit einem fest installierten Röntgengerät Gierth HF80 (Firma GIERTH, Neu-Isenburg) in den Laboratorien der Firma MERCK, Darmstadt angefertigt. Als Filme wurden Kodak Insight D IDS-1 (Firma KODAK,

Krefeld) verwendet. Die Spannung betrug im anterioren-posterioren Strahlengang 50 kV und die Belichtungszeit 0,16 Sekunden.

Alle Röntgen- und Microcomputertomographiebilder wurden mit einem Flachbrettscanner in hoher Qualitätsstufe eingescannt und weitergehend digital bearbeitet.

Die Beurteilung der Frakturheilung, der spongiösen Kallusbildung (Osteogenese) sowie das endgültige Repositionsergebnis erfolgte deskriptiv und unter Zuhilfenahme eines eigenständig entwickelten Scores (Tab. 4). Grundlage hierfür war ein semiquantitativer Score von SIEBERT et al. [119]. Hierzu wurden drei verschiedene Parameter beurteilt. Zum einen die Dehiszenz des Osteotomiespaltes, die Position der reponierten lateralen Femurkondyle und die Frakturheilung. Schwierig zu analysieren waren Tiere, die Besonderheiten oder Komplikationen aufwiesen. Auf besondere Ausschlusskriterien wird im Ergebnisteil (Kapitel 4.2) eingegangen.

Tab. 4 Semiquantitativer Score zur Osteotomiebeurteilung [modifiziert nach 119]

- Osteotomiespalt	
2	eng
1	mittel
0	weit
- Reposition der lateralen Kondyle	
2	Die Kondyle sitzt achsengerecht. In allen drei Ebenen findet sich keine Dislokation oder Rotation
1	Dislokation der Kondyle nach proximal/distal oder Rotation der Kondyle
0	Dislokation der Kondyle nach proximal/distal und Rotation der Kondyle
- Frakturheilung	
3	Osteotomie vollständig und gleichmäßig knöchern durchbaut, Osteotomie nicht mehr erkennbar
2	Defektüberbrückung an einer oder mehreren Stellen bei inhomogener Strahlendichte
1	Geringere Darstellung von strahlendichtem Material in der Osteotomiezone
0	Keine Darstellung von strahlendichtem Material in der Osteotomiezone
Maximales Score Ergebnis:	7
Sehr gutes Ergebnis:	7
Gutes Ergebnis:	6-5
Befriedigendes Ergebnis:	4
Schlechtes Ergebnis:	<3

3.9 Microcomputertomographie

Für die Analyse der Knochenstruktur der Kaninchenfemurkondyle, der Frakturheilung und der Neubildung einer feintrabekulären Osteotomiespaltüberbrückung ist die Microcomputertomographie (Micro-CT) eine aussagekräftige Untersuchung, um die durch das konventionelle Röntgen und die lichtmikroskopischen Untersuchungen gewonnenen Ergebnisse zu bestätigen und zu ergänzen.

Als Untersuchungsmaterial dienten hier die in Kapitel 3.12.4 beschriebenen Knochenscheiben. Zu jedem Beobachtungszeitraum wurden je ein Kontrolltier und zwei Knochenklebstofftiere nach dem Zufallsprinzip ausgewählt. Um vergleichbare Bedingungen zu schaffen, wurde jeweils die erste Knochenscheibe gewählt, da diese bei allen Tieren im gleichen Kondylenbereich entnommen wurde (Abb. 19). Außerdem gab es aufgrund unterschiedlich großer Knochenpräparate nicht bei allen Tieren eine zweite Knochenscheibe. Bei diesen Proben handelte es sich um frisch präparierte in 70 %igem Alkohol eingelegte Knochen. Eine besondere Aufarbeitung der Proben war für diese Untersuchung nicht notwendig. Analysiert wurden die Proben mit dem "SkyScan 1072" (Firma SkyScan, Aartselaar, Belgien), welches in der Abteilung für Diagnostische Radiologie (Direktor: Univ.-Prof. Dr. W. Rau) des Universitätsklinikum der Justus-Liebig-Universität Gießen verfügbar ist.

3.10 Fotodokumentation

Die Operationen der Serie 1 und 2 wurden im Detail festgehalten. Zusätzlich wurden sämtliche Arbeitsschritte, die benötigten Gerätschaften sowie alle präparierten Knochen durch Filmaufnahmen dokumentiert.

Die Aufnahmen erfolgten mit unterschiedlichen Vergrößerungen durch eine Digitalkamera (Canon powershot 70, Firma CANON, Krefeld) sowie eine Spiegelreflexkamera (Minolta dynax 3xi, Firma MINOLTA, Langenhagen - auf Kodak Elitechrome 100 Diapositivfilm, Firma KODAK, Stuttgart). Zum Fotografieren der präparierten Knochen wurde eine komplette Foto- und Belichtungseinheit verwendet, wie man sie auch in pathologischen Instituten für die Dokumentation von pathologischen Präparaten verwendet.

Ebenfalls wurden Aufnahmen vom Knochenklebstoff und von den Schliffpräparaten gefertigt. Des Weiteren wurden die histologischen Schliffe in unterschiedlicher Vergrößerung fotodokumentiert. Hierbei wurde ein AXIOPLAN 2 Mikroskop (Firma

ZEISS, Oberkochen) mit zugehöriger Fotodokumentationseinheit AXIOPHOT 2 (Firma ZEISS, Oberkochen) verwendet. Als Film wurde ein KODAK Ektachrom E100 VF Tageslichtfilm mit 100 ASA Diapositiv (Firma KODAK, Stuttgart) und ein KODAK Ektachrom Professionell 64T Diapositiv (Firma KODAK, Stuttgart) benutzt. Alle entwickelten Diapositive wurden eingescannt und digitalisiert.

3.11 Feingewebliche Untersuchungen

Die feingeweblichen Untersuchungen erfolgten mittels lichtmikroskopischer und elektronenmikroskopischer Methoden. Der Schwerpunkt der Untersuchungen lag auf der Analyse mit Hilfe des Durchlichtmikroskops.

3.11.1 Durchlichtmikroskopie

Zur histologischen Analyse und Auswertung der Schliffpräparate kam das Großfeldforschungsmikroskop Axioplan 2 (Firma ZEISS, Oberkochen, Labor für experimentelle Unfallchirurgie, Giessen) zum Einsatz. Als besondere Ausstattung verfügt dieses Mikroskop über eine Fotobelichtungsanlage – Axiophot 2 an der sämtliche Bilder der Knochenpräparate auf Dia-Positiv Film aufgenommen werden können. Der Objektisch ist frei drehbar. Es ist mit Okularen Kpl W 10x/20, den Objektiven 2,5/0,08, Planopo 4/0,14, Planopo 10/0,32, Plan 40/0,65 und einer 12 Volt Lichtquelle ausgestattet.

3.11.2 Rasterelektronenmikroskopie (REM)

Die Rasterelektronenmikroskopie als Untersuchungsmethode stellt, wie auch die Transmissionselektronenmikroskopie, eine Ergänzung zur lichtmikroskopischen Hauptuntersuchung dar. Ihre Aussagekraft ist in dieser Studie nur unterstützend, so dass sich die Präsentation der Ergebnisse im Kapitel 4.4.2 des Ergebnisteiles auf einige ausgesuchte Bilder konzentriert.

Die Rasterelektronenmikroskopie ist heute ein relativ weit verbreitetes Verfahren zur Darstellung und Untersuchung der Mikrostruktur fester Proben. Hierbei wird die Oberfläche der Objekte mit einem fokussierten Elektronenstrahl abgerastert. Durch die Wechselwirkungen, der in die Probe eindringenden Primärelektronen, werden eine Vielzahl verschiedener Signale erzeugt wie z.B. Sekundärelektronen,

rückgestreute Elektronen, Auger-Elektronen, Röntgenstrahlen oder Lichtstrahlung. Durch Verwendung verschiedener Detektoren lassen sich diese Signale zur Darstellung unterschiedlicher Probenkontraste heranziehen. Die häufigste und bekannteste Anwendung ist die Darstellung der Oberflächenstruktur (Topographiekontrast) von festen Proben mittels Sekundärelektronenbildern. Hiermit lassen sich die Mikrostrukturen der Probenoberfläche in hoher Auflösung und Tiefenschärfe sehr plastisch darstellen.

Im Rasterelektronenmikroskop erzeugte Rückstreuelektronenbilder (BSE-Bilder = Back Scattered Electron) sind vom Bildungsprozess her als Reflexionsbilder aufzufassen. In vereinfachter Analogie zum Lichtmikroskop entspricht dies dem Auflichtbild. Die Signalerzeugung findet hierbei in Abhängigkeit von der gewählten Beschleunigungsspannung und Probendichte nur in den obersten Schichten eines Präparates im Bereich von 500 nm bis wenige μm statt. Ferner können die Untersuchungen aufgrund der Bildentstehung auch an planen Blockpräparaten durchgeführt werden und die Herstellung dünner planparalleler Schiffe ist nicht zwingend erforderlich.

Die beiden Knochenscheiben, welche schon in der Microcomputertomographie als Untersuchungsmedien Verwendung fanden, wurden auch für die Rasterelektronenmikroskopie verwendet (je zwei Klebstoff- und ein Kontrolltiere pro Beobachtungszeitraum). Vor der Untersuchung wurden die Probenoberflächen nochmals hochglanzpoliert. Danach wurden die Scheiben mittels graphithaltigen Leit-Tabs auf Aluminium-Probeteller geklebt und allseitig am Rand des Untersuchungsbereiches mit Aluminiumfolie ummantelt, um einen stetigen Elektronenabfluss zu gewährleisten.

Die Untersuchungen erfolgten im Feldemissionsrasterelektronenmikroskop LEO 1530 (Firma LEO Elektronenmikroskopie GmbH, Oberkochen, Labor für experimentelle Unfallchirurgie, Giessen) bei verschiedenen Beschleunigungsspannungen, Arbeitsabständen, Vergrößerungen und unter Einsatz aller verfügbaren Detektoren zur Abbildung der verschiedenen Probensignale mit Schwerpunkt auf Abbildung der Rückstreuelektronen (BSE-Bilder, Back Scattered Electron). Aussagekräftige Bilder der Untersuchung wurden digital als Bilddateien dokumentiert.

3.11.3 Transmissionselektronenmikroskopie (TEM)

Aus den entnommenen Femura wurden Knochenscheiben herausgesägt und diese in Yellow-Fix (Paraformaldehyd, Glutardialdehyd) mit 0,1 M Na-Phosphatpuffer (pH: 7,3) für 24 Stunden bei -4° Celsius fixiert.

Es folgte ein gründliches Spülen mit 0,1 M Na-Phosphatpuffer. Anschließend wurden die Knochenscheiben in einer aufsteigenden Alkoholreihe bis 100 % dehydriert. Abschließend folgte die Ausbettung der Proben in reinem Epon - Polymerisieren bei 45° Celsius für 2 h und folgend bei 60° Celsius für 20 h

Mit dem Ultramikrotom Reichert-Ultracut (Firma LEICA, Wetzlar) erfolgte die Herstellung von Semidünnschnitten mit einer Dicke von ca. 1 µm, welche mit 1 %igem Toluidinblau mit 1 % Borax gefärbt wurden. Unter dem Lichtmikroskop wurden nun der Osteotomiespalt und der angrenzende Lagerknochen aufgesucht. Von den zu untersuchenden Stellen wurden Ultradünnschnitte mit einer Dicke von 60-80 nm angefertigt. Die Nachkontrastierung erfolgte mit Uranylacetat + Bleicitrat mittels des Ultrastainer-Reichert (Firma LEICA, Wetzlar).

Die nachfolgenden transmissionselektronenmikroskopischen Untersuchungen der Ultradünnschnitte wurden an einem TEM-Gerät EM 109 (Firma ZEISS, Institut für Veterinäranatomie, Justus-Liebig-Universität Giessen) bei 80 kV Beschleunigungsspannung bei unterschiedlicher Vergrößerung durchgeführt. Die fotografische Dokumentation erfolgte auf Mittelformnegativfilmen mit nachfolgender Erstellung von Papierabzügen.

3.12 Probenbearbeitung (Trenn-Dünnschliff-Technik)

Die Trenn-Dünnschliff-Technik nach DONATH ist eine Methode zur Erstellung von Schliffen mit Stärken bis 10 µm [31]. Dies gilt insbesondere für Gewebe und Präparate, die nicht mit einem Mikrotom schneidbar sind, wie in diesem Falle die Kaninchenknochen mit K-Drähten und Schrauben. Durch die Trenn-Dünnschliff-Technik kann man auch mit diesen Geweben histologische, mikroradiographische und fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen durchführen.

Die Herstellung aller Schnitte und Färbungen erfolgte im "Labor für experimentelle Unfallchirurgie" (Kerkraederstr. 9, 35394 Gießen; Leiter: Univ. Prof. Dr. Dr. Schnettler), der Klinik und Poliklinik für Unfallchirurgie, Justus-Liebig Universität Gießen.

3.12.1 Vorbereitung der Knochenpräparate für die Fixation

Nach Euthanasie der Kaninchen wurde den Tieren die Femura (Kondyle + Diaphysenschaft) entnommen, nummeriert und in 70 % Alkohol eingelegt. Es erfolgte der Transport in das "Labor für experimentelle Unfallchirurgie" und Freipräparierung der Knochen (Entfernung von Muskeln, Bändern und Kniegelenkscapsel) sowie Entwässern für 21 Tage in aufsteigender Alkoholreihe (von 70% - 100%).

3.12.2 Infiltration

Die ersten drei Stufen (je 3 Tage) der Kunststoffinfiltration wurden mit einem Gemisch aus reinem Alkohol und Technovit 7200[®] VLC (Firma KULZER, Friedrichsdorf) in aufsteigendem Technovitverhältnis durchgeführt (bis auf 70% Technovit). Es handelt sich hierbei um einen lichthärtenden Einkomponentenkunststoff auf Methacrylatbasis. Die nachfolgende Infiltration erfolgte in reinem Technovit für 15 Tage unter wechselnden Druckverhältnissen (Normdruck und Unterdruck).

3.12.3 Einbettung und Polymerisation

Die mit Technovit infiltrierten Präparate wurden in kleine Plastischälchen gelegt und komplett mit dem Einbettkunststoff bedeckt. Die Polymerisation erfolgte durch Exposition der Proben mit Licht einer Wellenlänge 400-500 nm, vorpolymerisieren mit Gelblicht zur langsamen Einleitung der Polymerisation und zur Vermeidung von Spannungsrissen für 2 Stunden sowie endgültige Polymerisation mit Blaulicht für 4 Stunden. Der gesamte Vorgang erfolgte automatisch durch das wassergekühlte Kulzer-EXAKT Lichtpolymerisationsgerät (Temperatur < 40 Grad Celius).

3.12.4 Einteilung der Schnittebenen

Die Einteilung der Femurkondyle erfolgte in neun Längsschnitte und zwei Querschnitte (Abb. 19). Zusätzlich zu den Längsschnitten erfolgte die Entnahme eines Knochenblockes für die Rasterelektronenmikroskopie und Microcomputertomographie zwischen der dritten und vierten sowie der sechsten und siebten Schnittebene.

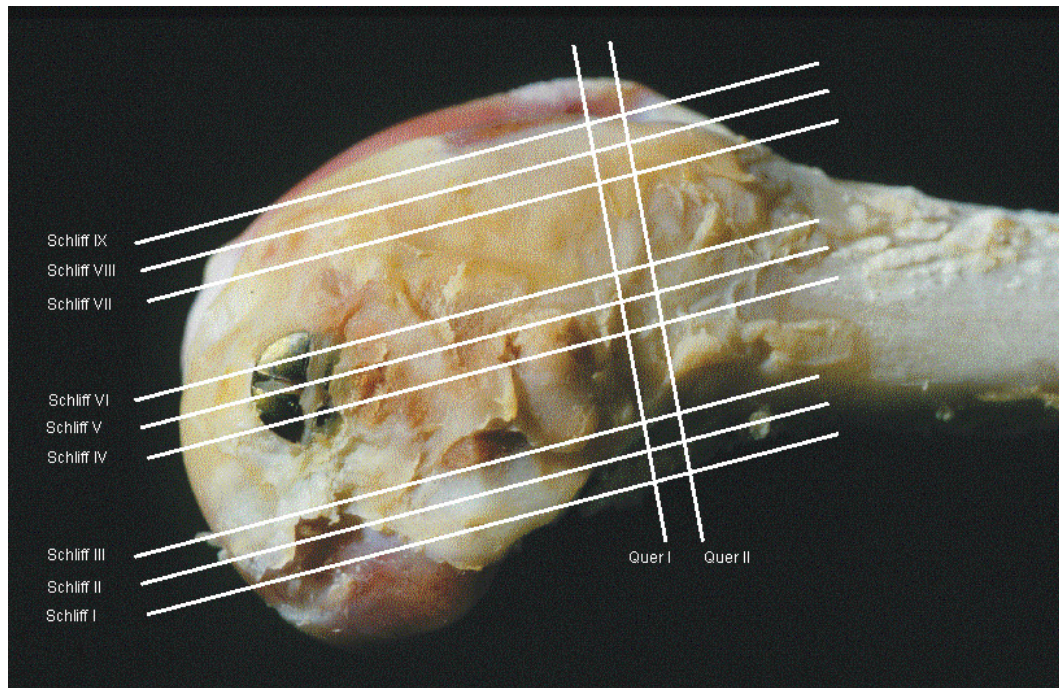


Abb. 19: Einteilung der Schnittebenen - 9 Längsschnitte (I-IX), 2 Querschnitte (Quer I-II).

3.12.5 Herstellung eines Dünnschliffes

Wie in Abb. 20 sichtbar wurde der eingebettete Knochen nun im Verhältnis 2:1 geteilt.

- *2/3 Kondylenregion*
- *1/3 Übergang zur Diaphyse*

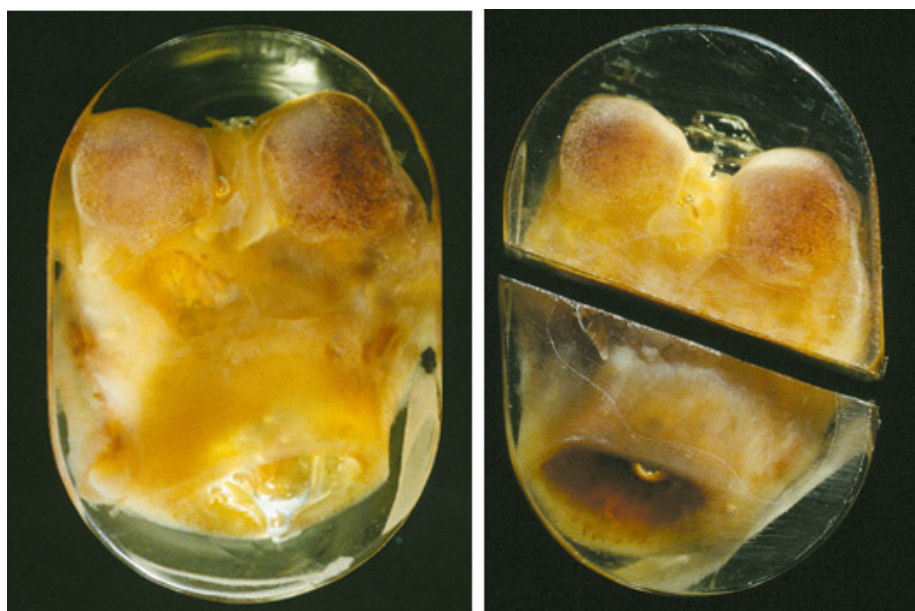


Abb. 20: Auspolymerisierte TECHNOVIT Knochenblöcke.

Aus dem proximalen Drittel des Knochenblockes wurden zwei Querschnitte erstellt: Quer I und Quer II. Aus dem vorderen distalen Teil (Kondylenregion) wurden neun Schnitte in Längsrichtung angefertigt.

Die einzelnen Arbeitsschritte sahen hier wie folgt aus (Abb. 19):

1. Querschleifen der Oberfläche bis die Osteotomiezone sichtbar war
2. Schliff I, II, III → 1. Ebene
3. Absägen einer ca. 2-3 mm dicken Scheibe für Micro-CT Analysen
4. Schliff IV, V, VI → 2. Ebene
5. Bei ausreichender Knochendicke 2. Scheibe für Micro-CT Analysen
6. Schliff VII, VIII, IX → 3. Ebene (bei dünnen Knochen teilweise nur bis VII)
7. Schliff Quer I und Quer II

3.12.6 Färbetechniken der unentkalkten Knochenschliffe

Je ein Längsschliff aus allen drei Ebenen sowie ein Querschiff wurden mit Toluidinblau und einer nach Richardson-Levai-Laczko für die Auswertung gefärbt.

Toluidinblau-Färbung:

Mineralisierte Hartgewebematrix: ungefärbt bis blassblau

Zellen und Weichgewebe: blau

Knorpelmatrix: metachromatisch bis rotviolett

verkalkte Knorpelmatrix: dunkelblau

Richardson-Levai-Laczko:

Mineralisierte Hartgewebematrix: hellrosa bis rötlich

Zellen, Zellkerne, Osteoidsäume, Kittlinien, Kollagenfasern: blau

Knorpelmatrix, frühe Wundheilungsareale: metachromatisch bis rotviolett

H und E (Hämatoxilin-Eosin):

Kerne: blau,

Cytoplasma: blassrot

Kollagene Fasern: rot, elastische Fasern blassrosa

Interzellulärsubstanz im hyalinen Knorpel: blassblau bis violett

Muskelzytoplasma: rot

4 Ergebnisse

4.1 Subcutane Applikation

Bei 3 Kaninchen (Tier 14, 31, 33) wurde der Knochenklebstoff in einer "Hauttasche" am Rücken deponiert. Die Tiere wurden nach 7 Tagen getötet und die Applikationsstelle histopathologisch untersucht (siehe auch Kapitel 3.5 Operationsmodell)

Befund:

Lichtmikroskopisch stellt sich der Knochenklebstoff in allen Präparaten als amorphes, eosin-positives Material dar. Das angrenzende Gewebe (Fettgewebe, Hautmuskulatur) ist nekrotisch, bei ausgeprägter Granulationsgewebesbildung mit zahlreichen mononucleären Phagen und Fremkörper-Riesenzellen. Bei Tier Nr. 14 ist die Infiltration des Granulationsgewebes in das Knochenklebstoffmaterial gut sichtbar (Resorptionsbeginn).

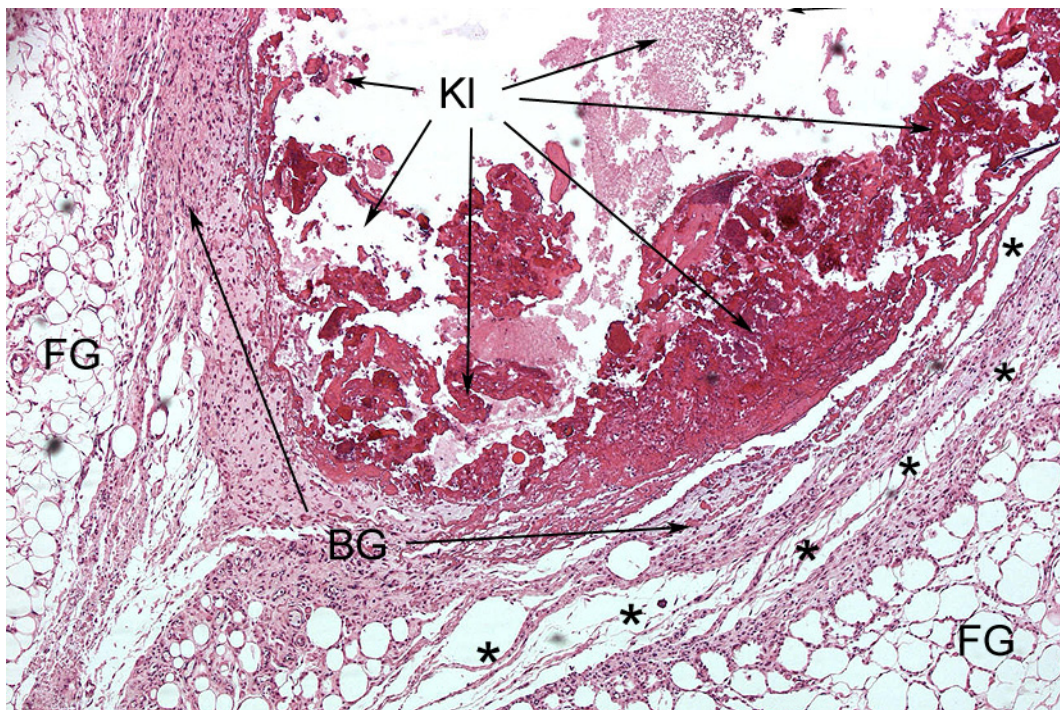


Abb. 21: Klebstoffimplantation (KI) in subcutane Hauttasche nach 7 Tagen. Umgebendes Bindegewebe (BG) und Fettgewebe (FG). Fixationsartefakte (*) im Bereich des Bindegewebes. (H. und E., Vergrößerung 200 x).

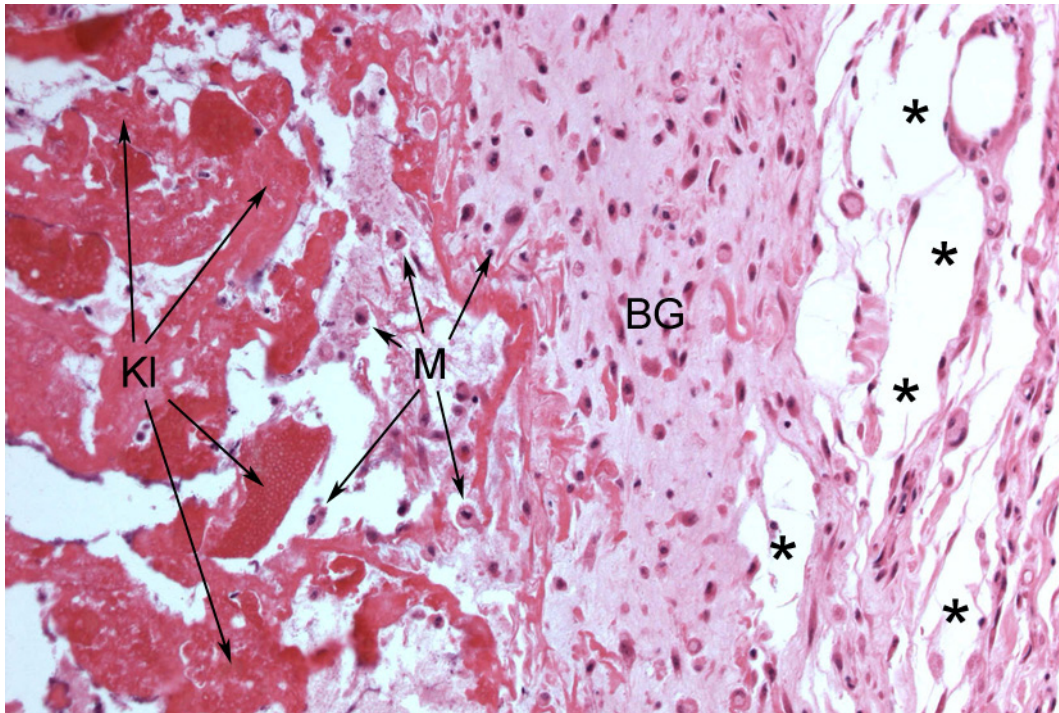


Abb. 22: Klebstoffimplantation nach 7 Tagen. Grenzfläche zwischen Klebstoff (KI) und Bindegewebe (BG). Viele Makrophagen (M) angrenzend an das Klebstoffareal. Fixationsartefakte (*). (H. und E., Vergrößerung 50 x).

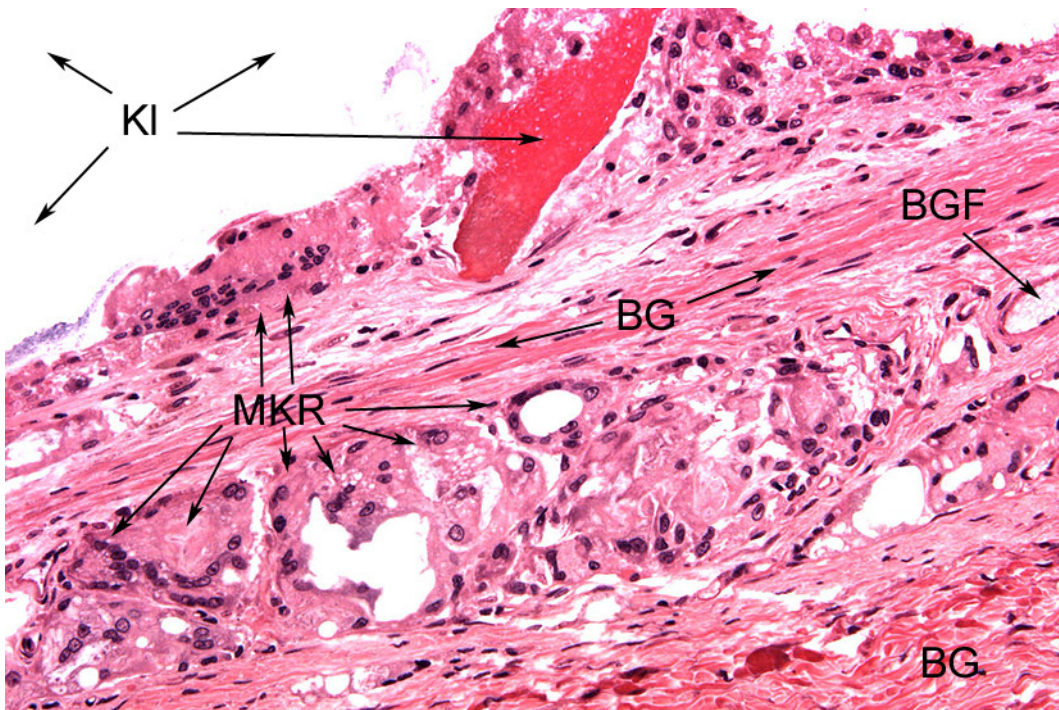


Abb. 23: Klebstoffimplantation (KI) nach 7 Tagen. Es finden sich viele mehrkernige Riesenzellen (MKR) sowie faseriges Bindegewebe (BG) an der Klebstoffgrenzfläche. Blutgefäß (BGF). (H. und E., Vergrößerung 300 x).

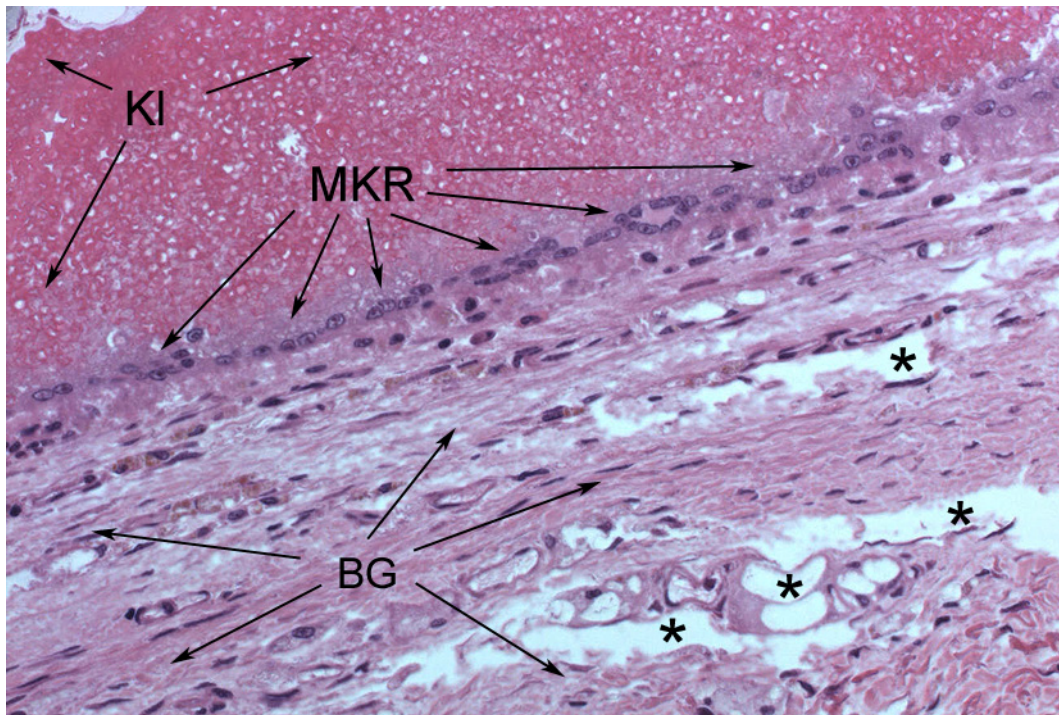


Abb. 24: Klebstoffimplantation (KI) nach 7 Tagen. „Wallartige“ Anordnung der mehrkernigen Fremdkörperriesenzellen (Mehrkernige Riesen­zellen – MKR) am Klebstoffrand. Einkapselung des Klebstoffes (KI) durch faseriges Bindegewebe (BG). Fixationsartefakte (*). (H. und E., Vergrößerung 200 x).

In Abb. 21 und Abb. 22 ist nach 7 Tagen Klebstoffimplantation zu erkennen, dass das Eosinophile (=roten Farbstoff stark annehmend) Implantatmaterial (KI) von einer schmalen Kapsel (BG) umgeben wird und eine gering bis mittelgradige Infiltration von Entzündungszellen zeigt.

Abb. 23 und 24 lassen eine Kapsel mit resorptiver Entzündung und Fremdkörperentzündung in der Umgebung des Implantats erkennen. Das Implantat (KI) ist innen unverändert hell durchscheinend und als verändertes eosinophiles Material (fortschreitender Abbau) mit resorptiver Entzündung sichtbar.

Abb. 24 zeigt einen Schichtaufbau von außen (unten) nach innen: Bindegewebe (BG), Fremdkörperriesenzellen/mehrkernige Riesen­zellen (MKR) und rotes Implantatmaterial (KI). Aus diesen Beobachtungen lässt sich folgendes Fazit ziehen: Der Abbau des Knochenklebstoffes durch phagozytierende Zellen ist nachweisbar, mit Entzündungsreaktionen in gering- bis mittelgradigem Ausmaß. Eine etwaige Abkapselung des Knochenklebstoffes muss bei den Knochenschnitten aufmerksam betrachtet werden.

4.2 Röntgenuntersuchungen

Die nachfolgenden Tabellen zeigen das Ergebnis der Radiologischen Untersuchung mittels des in Kapitel 3.8 beschriebenen Röntgen-Scores.

1. Serie

7 Tage					
	Tier Nummer	Osteotomie-spalt	Reposition Kondyle	Fraktur-heilung	Gesamt
<i>Kontrolle</i>	34	1	1	*	2
<i>Kontrolle</i>	35	2	1	*	3
<i>Kontrolle</i>	36	2	0	*	2
<i>Klebstoff</i>	28	2	2	*	4
<i>Klebstoff</i>	29	1	0	*	1
<i>Klebstoff</i>	30	0	0	*	0
<i>Klebstoff</i>	31	1	1	*	2
<i>Klebstoff</i>	33	2	1	*	3

* Frakturheilung radiologisch noch nicht sichtbar.

Tab. 5: 1. Serie, 7 Tage Ergebnisse Röntgen-Score.

21 Tage					
	Tier Nummer	Osteotomie-spalt	Reposition Kondyle	Fraktur-heilung	Gesamt
<i>Kontrolle</i>	25	2	2	2	6
<i>Kontrolle</i>	26	2	2	3	7
<i>Kontrolle</i>	27	2	2	3	7
<i>Klebstoff</i>	2	2	1	3	6
<i>Klebstoff</i>	19	0	2	2	4
<i>Klebstoff</i>	20	1	2	1	4
<i>Klebstoff</i>	21	2	1	1	4
<i>Klebstoff</i>	22	2	2	2	6
<i>Klebstoff</i>	23	2	2	1,5	5,5

Tab. 6: 1. Serie, 21 Tage Ergebnisse Röntgen-Score.

42 Tage					
	Tier Nummer	Osteotomie-spalt	Reposition Kondyle	Fraktur-heilung	Gesamt
<i>Kontrolle</i>	16	*	1	3	4
<i>Kontrolle</i>	17	*	2	3	5
<i>Kontrolle</i>	18	*	2	3	5
<i>Klebstoff</i>	4	*	1	3	4
<i>Klebstoff</i>	11	*	1	3	4
<i>Klebstoff</i>	12	*	1	2	3
<i>Klebstoff</i>	13	*	0	3	3
<i>Klebstoff</i>	15	*	1	3	3
<i>Klebstoff</i>	32	*	0	2	2

* Osteotomiespalt nicht mehr sichtbar

Tab. 7: 1. Serie, 42 Tage Ergebnisse Röntgen-Score.

84 Tage	Tier Nummer	Osteotomie-spalt	Reposition Kondyle	Fraktur-heilung	Gesamt
<i>Kontrolle</i>	8	*	1	3	4
<i>Kontrolle</i>	9	*	2	3	5
<i>Klebstoff</i>	10	*	2	2	4
<i>Klebstoff</i>	24	*	2	3	5

* Osteotomiespalt nicht mehr sichtbar

Tier-Nr. 1, 3, 5 und 6 wurden nicht in die Auswertungen mit einbezogen, da die K-Drähte an den Enden nicht umgebogen wurden. Die Drähte sind durch die frühzeitige Belastung gewandert und es haben sich Pseudarthrosen ausgebildet.

Tab. 8: 1. Serie, 84 Tage Ergebnisse Röntgen-Score.

2. Serie

21 Tage	Tier Nummer	Osteotomie-spalt	Reposition Kondyle	Fraktur-heilung	Gesamt
Klebstoff	38	2	1	3	6
Klebstoff	39	2	1	3	6
Klebstoff	40	2	1	2	5
Klebstoff	43	2	2	2	6
Klebstoff	45	2	2	2	6
Klebstoff	48	2	2	3	7

Tab. 9: 2. Serie, 21 Tage Ergebnisse Röntgen-Score.

42 Tage	Tier Nummer	Osteotomie-spalt	Reposition Kondyle	Fraktur-heilung	Gesamt
Klebstoff	37	1	1	2	4
Klebstoff	41	2	1	2	5
Klebstoff	42	2	1	2	5
Klebstoff	44	2	1	2	5
Klebstoff	46	2	2	2	6
Klebstoff	47*	2	2	2	6

* Fragment im Rö-Bild latero-kaudal der abgesetzten Kondyle sichtbar

Tab. 10: 2. Serie, 42 Tage Ergebnisse Röntgen-Score.

Durchschnittsergebnis:

1. Serie

Zeitpunkt	Durchschnitt
7 Tage	
Kontrolle	2,33
Klebstoff	2
21 Tage	
Kontrolle	6,66
Klebstoff	4,92
42 Tage	
Kontrolle	4,66
Klebstoff	3,16
84 Tage	
Kontrolle	4,5
Klebstoff	4,5

2. Serie

Zeitpunkt	Durchschnitt
42 Tage	
Klebstoff	6
84 Tage	
Klebstoff	5,16

Tab. 11 (links), Tab. 12 (rechts):
Durchschnitt der Gesamtpunktzahlen pro Beobachtungszeitpunkt für die 1. und 2. Serie.

Mit Hilfe der drei Parameter (Osteotomiespalt, Reposition und Frakturheilung) bietet der benutzte Score eine einfache Möglichkeit, die Röntgenaufnahmen der einzelnen Zeiträume zu beurteilen. Die Auswertung dieses selbstentwickelten Scores entspricht keinem gängigen Testverfahren und ist nicht statistisch signifikant. Somit wurde bewusst auf die Berechnung von Median, Mittelwert und Standardabweichung verzichtet. Sie soll nur eine Möglichkeit aufzeigen, die Erkenntnisse der Auswertung der Röntgenbilder in qualitativer Form darzustellen.

Vergleichbar sind nur die Ergebnisse der Kontrollgruppe mit der Klebstoffgruppe zu jedem Beobachtungszeitraum. Ein Verlaufsvergleich ist mit den gewählten radiologischen Parametern in der ersten Serie nicht möglich, da der Osteotomiespalt aufgrund der fortschreitenden Knochen-/Frakturheilung nur zum Beobachtungszeitpunkt von 7 und 21 Tagen sichtbar ist. Gleiches gilt für die Heilung, die nach 7 Tagen noch nicht im Röntgenbild sichtbar ist.

In der 84 Tage Gruppe konnten drei Tiere aufgrund einer beginnenden Pseudarthrose nicht im Score berücksichtigt werden. Der Grund für die beginnende Pseudarthrose war ein Abgleiten der reponierten Femurkondyle, weil bei diesen 3 Tieren der 84 Tage Gruppe (diese Gruppe wurde zuerst operiert) die beiden Kirschner-Drähte an den Enden nicht umgebogen wurden. Durch die frühe Belastung des operierten Beines zeigte sich bei diesen Tieren, im Vergleich zu den anderen, ein funktionell schlechteres Repositionsverfahren.

Insgesamt bestätigen die Ergebnisse der 1. Serie die Aussagen der weiteren radiologischen und mikroskopischen Untersuchungen. Während der ersten drei Beobachtungszeitpunkte (7, 21 und 42 Tagen) zeigt sich ein höherer Score-Wert für die Kontrollgruppe als für die Klebstoffgruppe. Lediglich nach 84 Tagen zeigt sich ein gleicher Wert für die Bewertung des Osteotomiespaltes im Röntgenbild.

In der zweiten Serie sind zu beiden Beobachtungszeitpunkten (21 und 42 Tage) alle drei gewählten radiologischen Parameter beurteilbar. Eine direkte Kontrollgruppe gibt es hier nicht. Der Vergleich der beiden Zeitpunkte 21 und 42 Tage weist eine Verschlechterung des Score-Wertes auf. Maßgeblich hierfür ist eine schlechtere Bewertung der Knochenheilung zum Zeitpunkt von 42 Tagen.

1. Serie - 7 Tage



Abb. 25: 7 Tage Klebstoff – Tier 28, a. p.

Sehr gutes Repositionsergebnis. Der Osteotomiespalt ist eng, nicht sichtbar. Die Femurkondylen stehen auf gleicher Höhe. Die Kirschnerdrähte liegen achsengerecht horizontal. (Score-Ergebnis: 4).



Abb. 26: 7 Tage Klebstoff – Tier 30, a. p.

Mäßiges Repositionsergebnis. Die Kondyle ist nach proximal disloziert oder zu weit proximal refixiert worden. Im ersten Drittel des Osteotomiespaltes, von der Gelenkfläche aus, ist ein Substanzverlust sichtbar. (Score-Ergebnis: 0).



Abb. 27: Klebstoff 7 Tage – Tier 31 a. p.

Mäßiges Repositionsergebnis. Die Kondyle ist verschoben, es besteht hier eine kleine Gelenkstufe. (Score-Ergebnis: 2).



Abb. 28: Kontrolle 7 Tage – Tier 35, a. p.

Gutes Repositionsergebnis. Der Osteotomiespalt ist eng und nicht sichtbar. Die beiden Femurkondylen stehen fast auf gleicher Höhe. Die laterale Kondyle ist diskret nach proximal verschoben. (Score-Ergebnis: 3).

1. Serie - 21 Tage



Abb. 29: Klebstoff 21 Tage – Tier 21, a. p. Aufn.
Gute Reposition. Enger Osteotomiespalt, Spalt nach 21 Tagen noch deutlich sichtbar. Abgesetzte Femurkondyle ist zu weit proximal refixiert worden, kleine Gelenkstufe sichtbar. (Score-Ergebnis: 4).

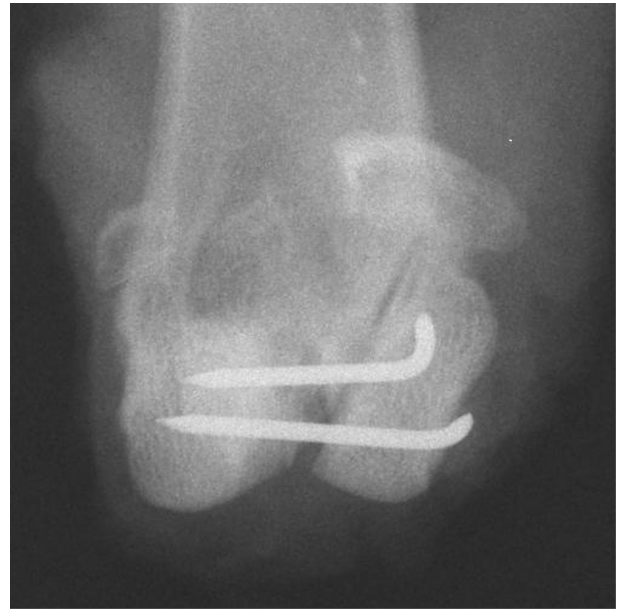


Abb. 30: Klebstoff 21 Tage – Tier 20, a. p. Aufn.
Gute Reposition. Unregelmäßig breiter Osteotomiespalt, nach proximal enger werdend. (Score-Ergebnis: 4).

1. Serie - 42 Tage



Abb. 31: Klebstoff 42 Tage – Tier 11, a. p. Aufn.
Gute Reposition. Osteotomiespalt nicht mehr sichtbar. Die Aufnahme ist etwas verdreht, daher keine genaue a.p. Aufnahme. (Score-Ergebnis: 4).



Abb. 32: Kontrolle 42 Tage – Tier 17, a. p. Aufn.
Sehr gute Reposition. Osteotomiespalt nicht mehr sichtbar. Exakte anatomische Verhältnisse. (Score-Ergebnis: 5).

1. Serie - 84 Tage



Abb. 33: Klebstoff 84 Tage – Tier 10, a. p. Aufn.
Gutes Repositionsergebnis. Der Osteotomiespalt ist fast nicht mehr zu erkennen. Die Femurkondylen stehen korrekt zueinander. (Score-Ergebnis: 4).

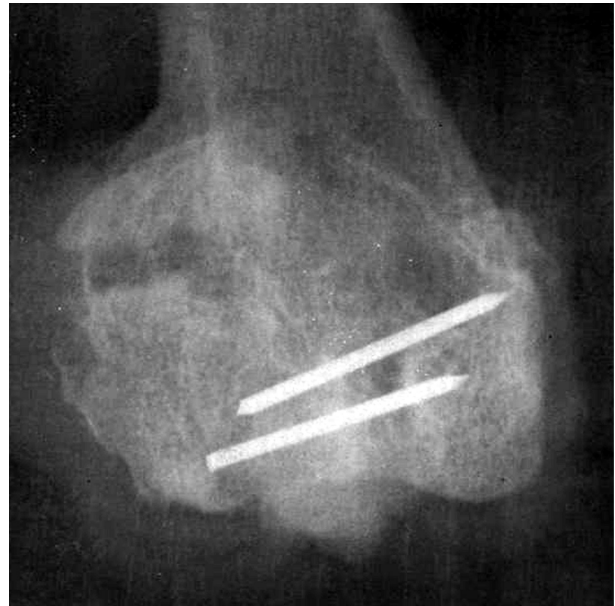


Abb. 34: Klebstoff 84 Tage – Tier 05, a. p. Aufn.
Schlechtes Repositionsergebnis. Die Kirschner-Drähte sind penetriert. Deformität der lateralen Femurkondyle durch eine intensive ungerichtete Knochenneubildung (hypertrophe Pseudarthrose). (Score-Ergebnis: 0).

2. Serie - 21 und 42 Tage



Abb. 35: Klebstoff 21 Tage – Tier 45, a. p. Aufn.
Gute Reposition nach 21 Tagen. Der Osteotomiespalt ist in seinem Verlauf noch schwach sichtbar. Gute Kompression der Osteotomiezone (Score-Ergebnis: 6).



Abb. 36: Klebstoff 42 Tage - Tier 42, a. p. Aufn.
Gute Reposition. Osteotomiespalt nicht mehr sichtbar. Gute Kompression des Osteotomiespaltes (Score-Ergebnis: 5).

4.3 Microcomputertomographie

Die Microcomputertomographie (Micro-CT) ist die Methode der Wahl, um aus dem zweidimensionalen Beobachtungsraum der Lichtmikroskopie, Raster- und Transmissionselektronenmikroskopie hin zu einer dritten Ebene zu gelangen. In der Lichtmikroskopie muss sich der Betrachter aus den Einzelschnitten gedanklich ein dreidimensionales Bild zusammensetzen. Hier ist es mit Hilfe eines Computerprogramms möglich, aus den gefertigten Einzelschnitten des Micro-CTs zwei- und dreidimensionale Rekonstruktionen des Knochens und der Osteotomiezone anzufertigen.

Dies ermöglicht es, die Knochenneubildung sowie die Frakturheilung über den gesamten Verlauf der Osteotomie und damit auch die knöcherne Konsolidierung der abgesetzten, reponierten und refixierten Femurkondyle, zu beurteilen.

Gebiete mit schwachem Trabekelbau sowie verzögerter Osteogenese sind somit gut beurteilbar. Die unterschiedliche knöcherne Durchbauung zwischen Klebstoff- und Kontrollgruppe sind besser beurteilbar als in der Durchlichtmikroskopie.

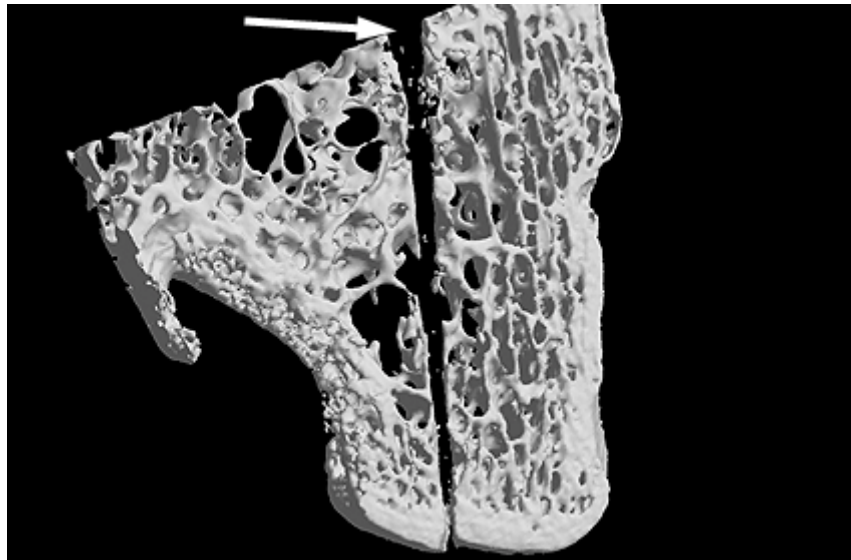
Die nachfolgenden 3D-Darstellungen des Micro-CT zeigen ausgewählte Präparate aus der Klebstoff- und Kontrollgruppe nach 7, 21, 42 und 84 Tagen der 1. Serie sowie ausgewählte Präparate aus der Klebstoffgruppe nach 21 und 42 Tagen der 2. Serie.

Zum Zeitpunkt von 7 Tagen erkennt man in beiden Gruppen (Klebstoff- und Kontrollgruppe) der 1. Serie ein Osteotomiespalt mit glatten Rändern. Die Frakturheilung geht über in eine Geflechtknochenbildung (21 Tage) und eine Umwandlung in Lamellenknochen (21 und 42 Tagen) bis hin zur vollständigen knöchernen Konsolidierung und Überbrückung der Osteotomiezone durch Lamellenknochen nach 84 Tagen.

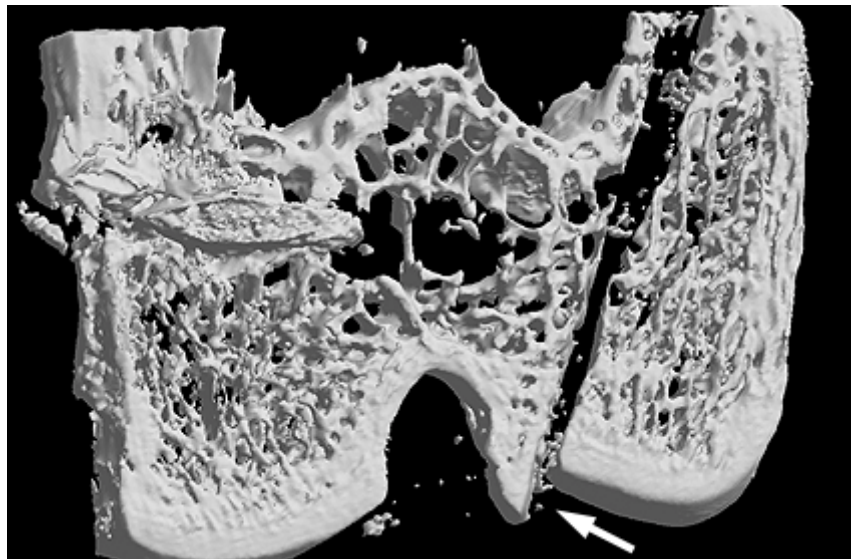
In der 2. Serie ist die ausbleibende Überbrückung des Osteotomiespaltes in der Klebstoffgruppe durch fehlende Osteogenese sichtbar. Weder nach 21 noch nach 42 Tagen findet eine adäquate bzw. physiologische Frakturheilung statt. Lediglich in klebstofffreien Arealen zeigt sich eine geringe Knochenneubildung.

Abb. 37:

3D Micro-CT 7 Tage-
Klebstoffgruppe 1. Serie.
Sehr gute Reposition mit
engem Spalt (Pfeil) und
wenig Fragmenten in der
Osteotomiezone.

**Abb. 38:**

3D Micro-CT 7 Tage-
Kontrollgruppe 1. Serie.
Gute Reposition, enger
Osteotomiespalt mit Frag-
menten. Deutlich sichtbarer
Spalt mit kleiner Stufe an
der Gelenkfläche (Pfeil).

**Abb. 39:**

3D Micro-CT 21 Tage-
Klebstoffgruppe 1. Serie.
Knochenneubildung (Osteo-
genese) im gesamten
Osteotomieverlauf. Der
Osteotomiespalt erscheint
durch schräge Aufsicht
komplett überbrückt.
„Bridging“ aber nur stellen-
weise (Pfeil). Noch kein
Lamellenknochen, sondern
Reparaturknochen (Ge-
flechtknochen).

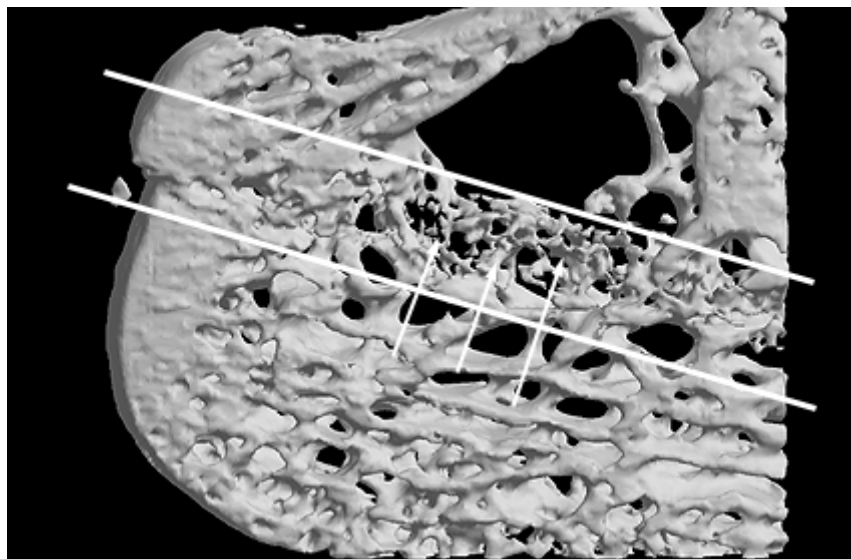


Abb. 40:

3D Micro-CT 21 Tage-
Klebstoffgruppe 1. Serie.
An den Osteotomie-
rändern sind deutliche Umbau-
vorgänge sichtbar. Gute
Reposition aber keine Über-
brückung der Osteotomie-
zone durch Geflecht-
knochen erkennbar. Licht-
mikroskopisch zeigt sich der
Spalt komplett mit hyalinem
Knorpel ausgefüllt. (*kleines
Bild: 2D-Schichtbild - eine
Ebene*).

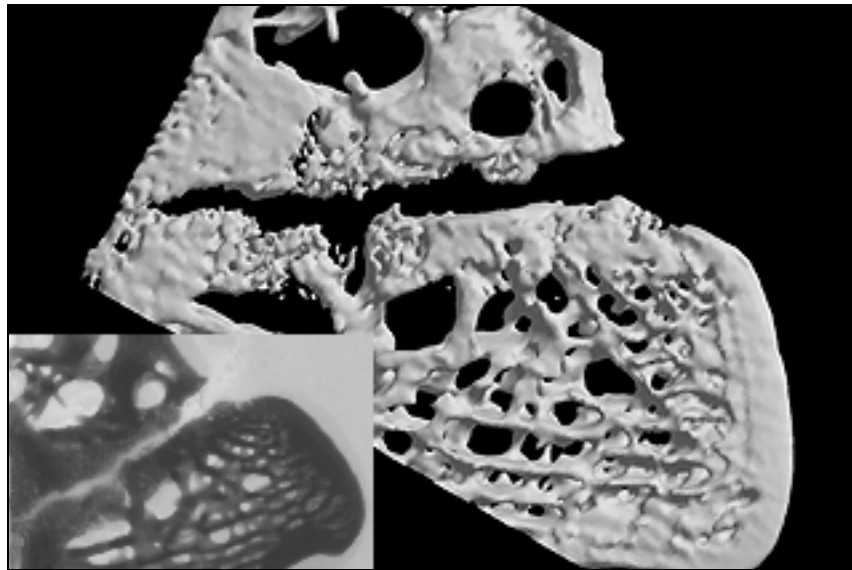


Abb. 41:

3D Micro-CT 21 Tage-
Kontrollgruppe 1. Serie.
Optimale Reposition, enger
Osteotomiespalt. Am Ende
des ersten Spaltdrittels
beginnende knöcherne
Überbrückung. Im rechten
Drittel Überbrückung durch
Geflechtknochen. (Licht-
mikroskopisch zeigt sich der
Osteotomiespalt mit hya-
linem Knorpel gefüllt - im
Micro-CT nicht differenzier-
bar).

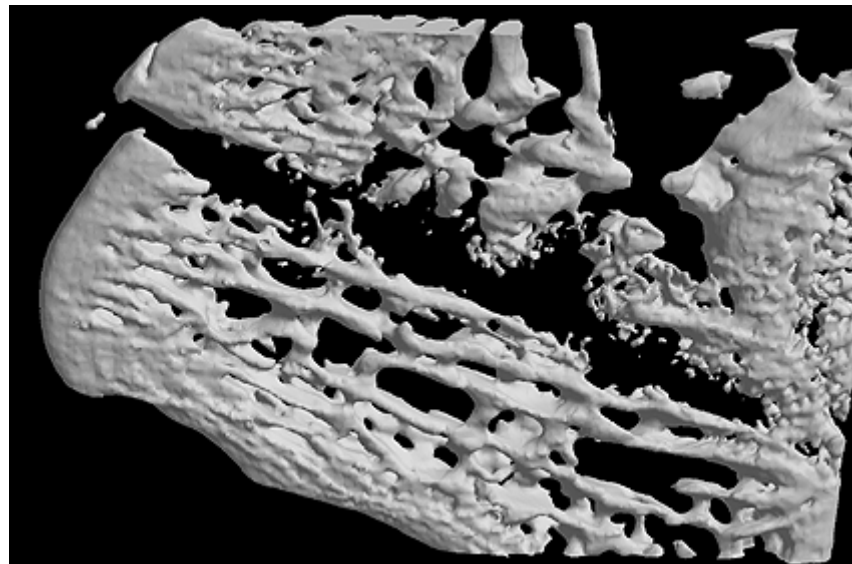


Abb. 42:

3D Micro-CT 21 Tage-
Kontrollgruppe 1. Serie.
Sehr gute Reposition der
lateralen Femurkondyle. Im
gesamten Osteotomiespalt
Neubildung feiner Knochen-
trabekel. Im kleinen Bild ist
der Osteotomieverlauf mar-
kiert. Die etwas verdrehte
Sichtebene täuscht eine
komplette Durchbauung der
Osteotomie vor. (*kleines
Bild: 2D-Schichtbild - eine
Ebene*).

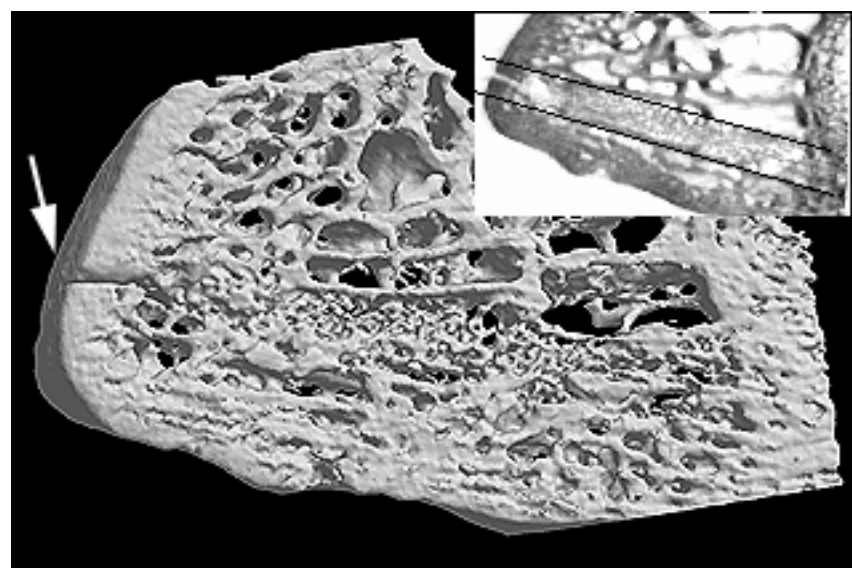
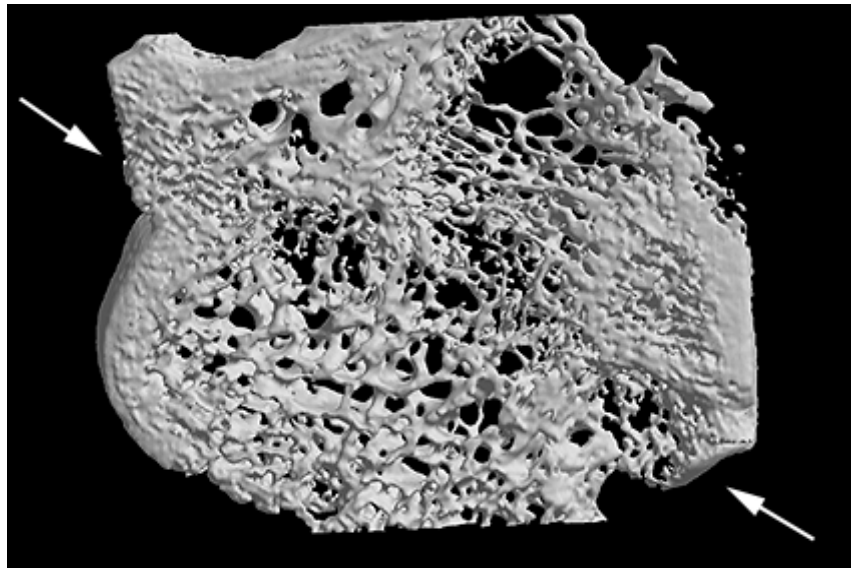
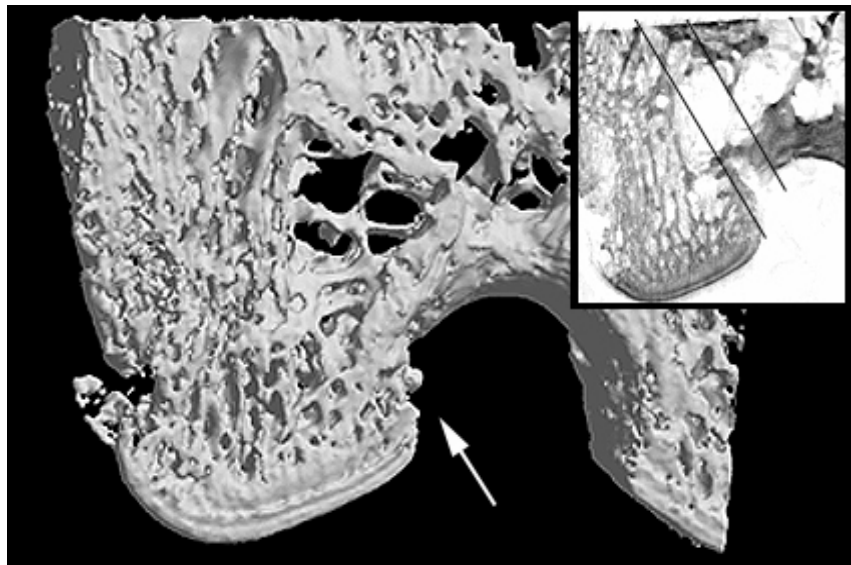


Abb. 43:

3D Micro-CT 42 Tage-
Klebstoffgruppe 1. Serie.
Komplette Überbrückung
und Durchbauung der ehe-
maligen Osteotomie durch
dichten Geflecht- und
Lamellenknochen. Lediglich
im Zentrum finden sich
einige trabekelschwache
Bezirke.

**Abb. 44:**

3D Micro-CT 42 Tage-
Kontrollgruppe 1. Serie.
Im dreidimensionalen Bild
der Kondyle erscheint die
Frakturheilung, durch einen
ungünstigen Beobachtungs-
winkel, abgeschlossen. Im
Schnittbild sieht man jedoch
noch trabekelschwache
Areale und eine ausge-
prägte Markhöhle mit einer
geringen Anzahl von
Trabekeln. *(kleines Bild: 2D-
Schichtbild – eine Ebene).*

**Abb. 45:**

3D Micro-CT 84 Tage-
Klebstoffgruppe 1. Serie.
Die ehemalige Osteotomie
(Zone zwischen den beiden
weißen Strichen) ist voll-
ständig knöchern durchbaut.
Intakte Gelenkoberfläche,
sowie vitale Trabekel-
strukturen aus Lamellen-
knochen.

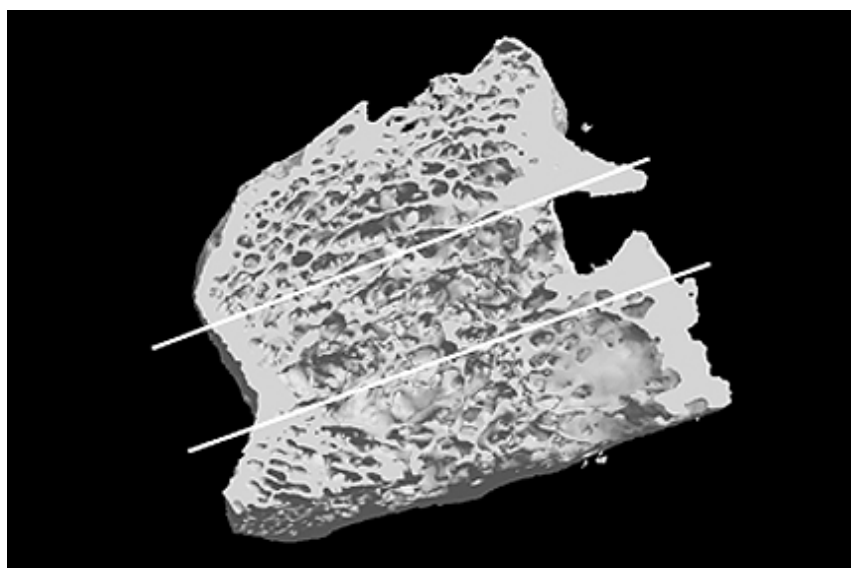


Abb. 46:

3D Micro-CT 84 Tage-
Kontrollgruppe 1. Serie.

Die Osteotomiezone
(zwischen den beiden
weißen Strichen) ist voll-
ständig knöchern durchbaut.
Lediglich an der Gelenk-
fläche finden sich noch
kleinere Defekt. Sonst vitale
Trabekelstrukturen aus
Lamellenknochen.

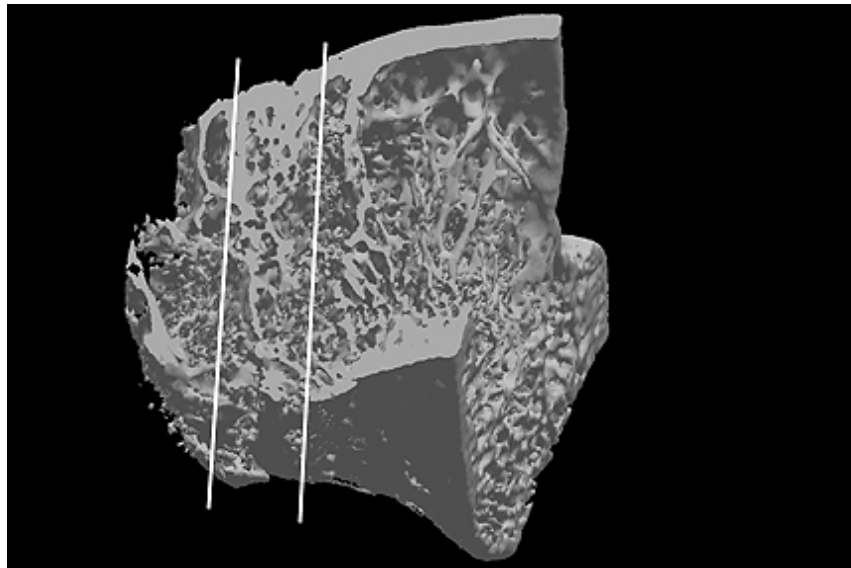


Abb. 47:

3D Micro-CT 21 Tage-
Klebstoffgruppe 2. Serie.

Es findet sich eine geringe
Knochenneubildung und be-
ginnende Überbrückung im
gesamten Verlauf des
Osteotomiespaltes. Im Be-
reich der Gelenkfläche zeigt
sich eine feintrabekuläre
Osteotomieüberbrückung.

*(kleines Bild: 2D-Schichtbild
- eine Ebene).*

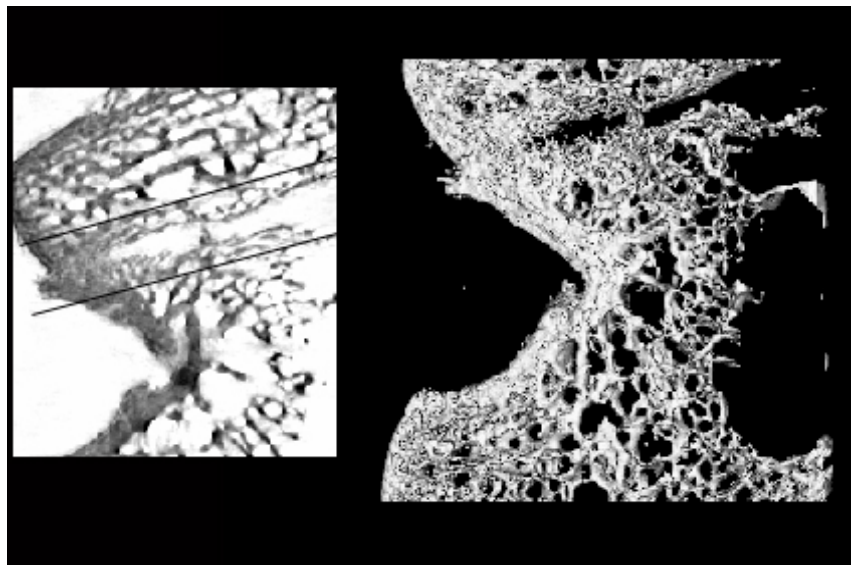
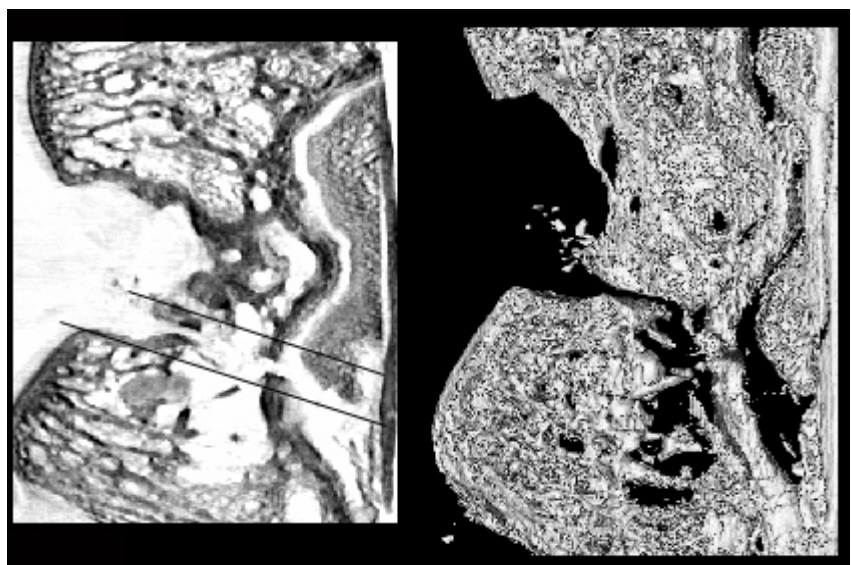


Abb. 48:

3D Micro-CT 42 Tage-
Klebstoffgruppe 2. Serie.

Nach 42 Tagen ist keine
Defektüberbrückung sicht-
bar. Eine Knochenneu-
bildung hat nicht stattge-
funden (keine Osteoneo-
genese). Es finden sich
glatte Osteotomieränder.

*(kleines Bild: 2D-Schichtbild
- eine Ebene).*



4.4 Feingewebliche Untersuchungen

4.4.1 Durchlichtmikroskopie (Histologie)

Die Ergebnisse der Lichtmikroskopie werden nachfolgend anhand der Beobachtungszeiträume (1. Serie: 7, 21, 42 und 84 Tage; 2. Serie: 21 und 42 Tage) und Gruppeneinteilung (Klebstoff und Kontrolle) der einzelnen Tiere wiedergegeben. Nach einer vergleichenden Beschreibung der Klebstoff- und Kontrollgruppe des jeweiligen Beobachtungszeitraums folgt bei stärkerer Vergrößerung eine Detailbeschreibung der beiden Gruppen.

1. SERIE – 7 Tage

Nach sieben Tagen zeigt sich in der Übersichtsvergrößerung der Klebstoff- (Abb. 49-50) und Kontrollgruppe (Abb. 55) ein vergleichbares Bild. Deutlich sichtbar ist der erzeugte Frakturspalt (Osteotomiespalt) mit seinen beidseitig glatten Osteotomieändern. Die Breite des Osteotomiespalt variiert innerhalb der Klebstoff- und Kontrollgruppe. Im Osteotomiespalt zeigt sich zunächst ein Frakturhämatom, das bereits im Begriff ist sich zu organisieren und als feines Netzwerk den gesamten Osteotomiespalt überbrückt. Die Größe dieser Fibrinnetze und des Granulationsgewebes hängen maßgeblich vom Repositionsergebnis ab, d.h. bei schlechter Reposition erkennt man viel Fibrin, bei einem sehr engen Osteotomiespalt nach exakter Reposition stellen sich fast keine Fibrinablagerungen dar. Auch lässt sich bei einigen Tieren eine "Stufe" an der Gelenkfläche zwischen abgesetzter lateraler Kondyle und der medialen Femurkondyle nachweisen. Offensichtlich ist die Kondyle ungenügend reponiert worden oder sekundär durch Belastung nach kranial gewandert.

Im Osteotomiespalt selbst sowie in den Spongiosazwischenräumen nahe der Osteotomiezone, sieht man in beiden Gruppen Knochenfragmente, abgetrennte Knochenbälkchen, Knochenmehl und versprengte Knorpelstücke von der Gelenkoberfläche (Abb. 49, 50, 55). An der medialen Femurkondyle (Schnittkante) erkennt man vereinzelt avitale Osteozyten. Diese zeigen einen hyperchromatischen Kern und einen Verlust der differenzierten Zellstrukturen. Die glatte Schnittkante lässt ansonsten dicht liegende Osteozytenhöhlen und ein vitales Knochengewebe erkennen. Sie ist nicht nekrotisch und weist keine thermischen Schäden durch den Osteotomievorgang auf (Abb. 50).

Klebstoffgruppe – 7 Tage:

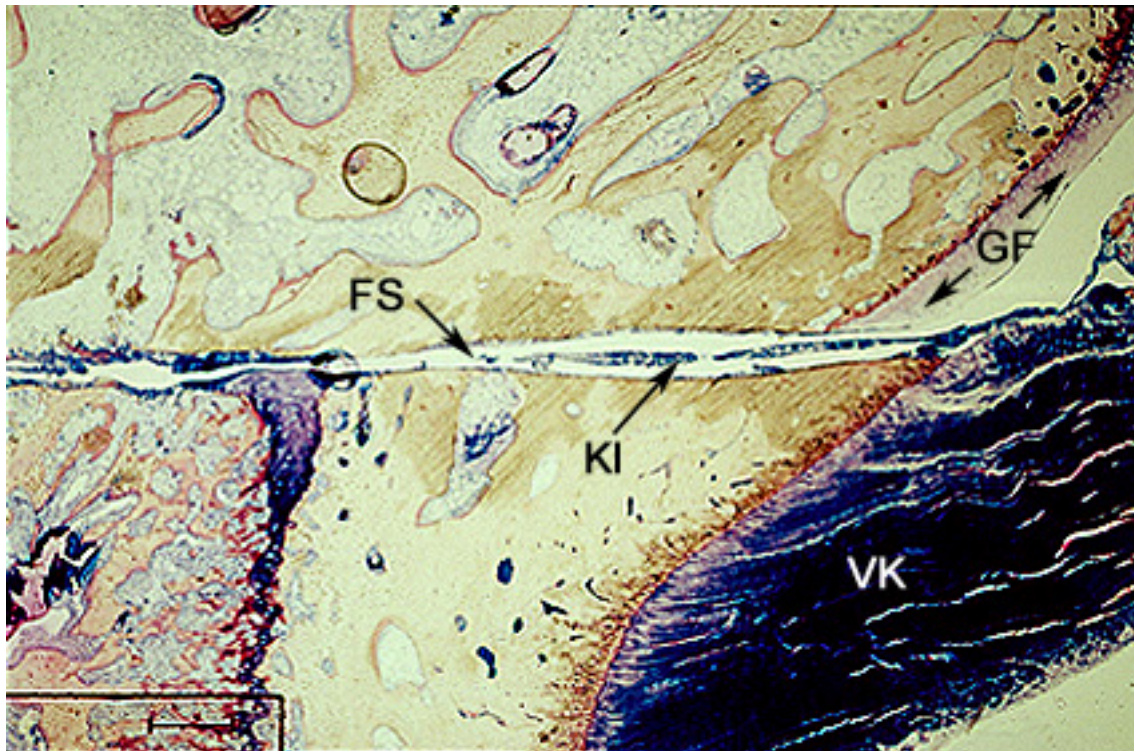


Abb. 49: 7 Tage-Klebstoffgruppe. Sichtbarer glatter Osteotomiespalt (OS) mit einem schmalen weißlichen Film (Knochenklebstoff - KI). Im Bereich der Interkondylenregion sind das vordere Kreuzband (VK) und die Gelenkfläche (GF) mit Knorpel sichtbar. Diskrete Gelenkstufe (Levai-Laczko, Vergrößerung 6,25 x).

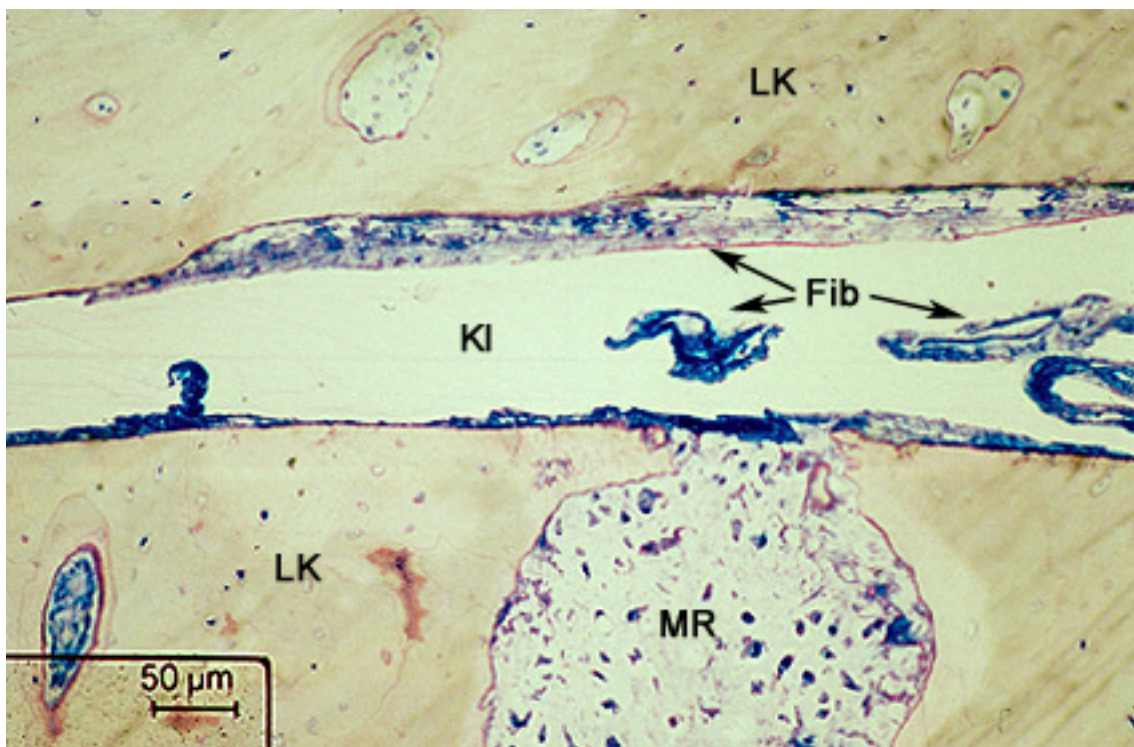


Abb. 50: 7 Tage-Klebstoffgruppe. Osteotomiespalt mit den Klebstoffablagerungen (KI), Fibrin (Fib) und seitlich eröffnetem Markraum (MR). Lagerknochen (LK). (Levai-Laczko, Vergrößerung 50 x).

Der Knochenklebstoff zeigt sich in einigen Präparaten sehr deutlich als klare durchsichtige Struktur, welche sich als schmaler Film durch den gesamten Osteotomiespalt zieht (Abb. 49-50). Bei anderen Präparaten wiederum ist der Klebstoff eher unregelmäßig im Osteotomiespalt verteilt, mit Fibrin und Granulationsgewebe durchsetzt (Abb. 51). Darüber hinaus ist der Klebstoff in benachbarten, durch die Osteotomie eröffneten Markräumen zu finden.

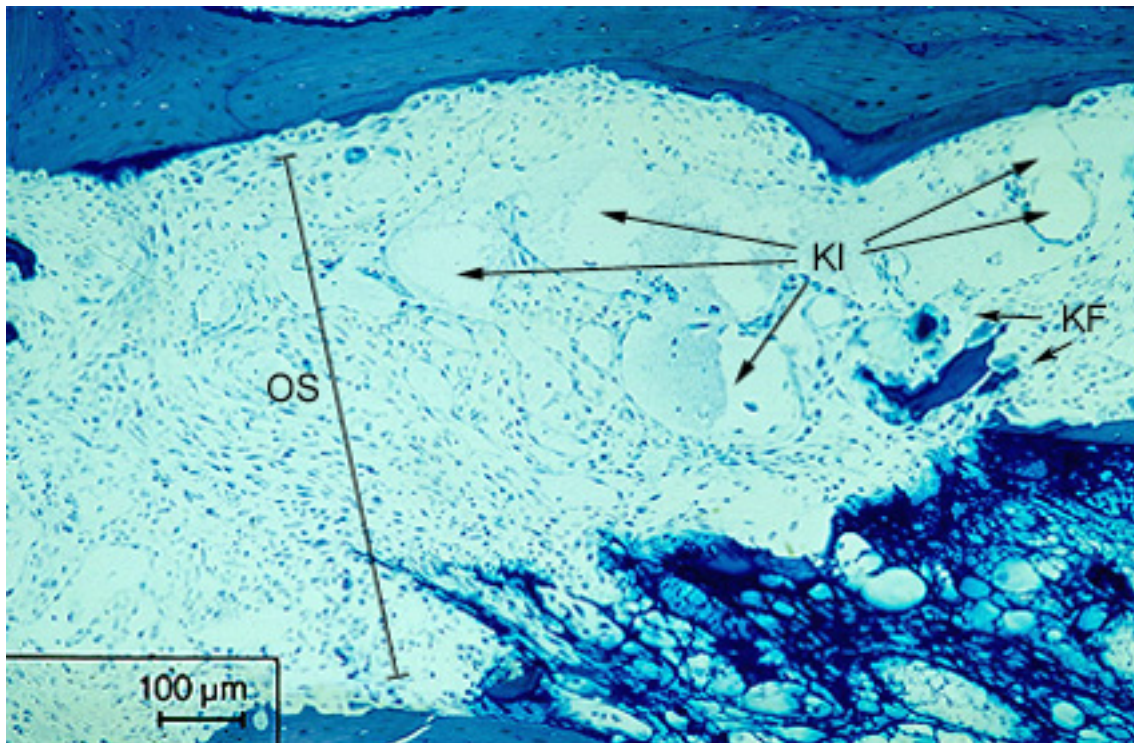


Abb. 51: 7 Tage-Klebstoffgruppe. Unregelmäßige inselförmige Anordnung des Klebstoffes (KI) im Osteotomiespalt (OS), durchmischt mit Granulationsgewebe und Fibrinablagerungen. Einzelne Knochenfragmente (KF). Durchsichtsmikroskopie (Toluidinblau, Vergrößerung 25 x).

Den ungefärbten Klebstoff vom umgebenden Gewebe zu unterscheiden gelingt durch das Schließen der Kondensorblende. Der Klebstoff zeigt sich in der Durchsicht weiterhin als klar und durchsichtig, wohingegen beim übrigen Gewebe deutlich der Kontrast zunimmt.

Auffällig ist eine Fibrinablagerung an der Klebstoff-Knochengrenze, die sich durch den gesamten Osteotomiespalt zieht. Sie entsteht, wenn der Klebstoff wie oben beschrieben als bandförmige Struktur vorliegt (Abb. 50). In diesen Präparaten finden sich lediglich sehr mäßig ausgeprägte Fibrinnetze und es entsteht eine Art Schichtaufbau (Osteotomierand - Fibrin - KLEBSTOFF - Fibrin - Osteotomierand).

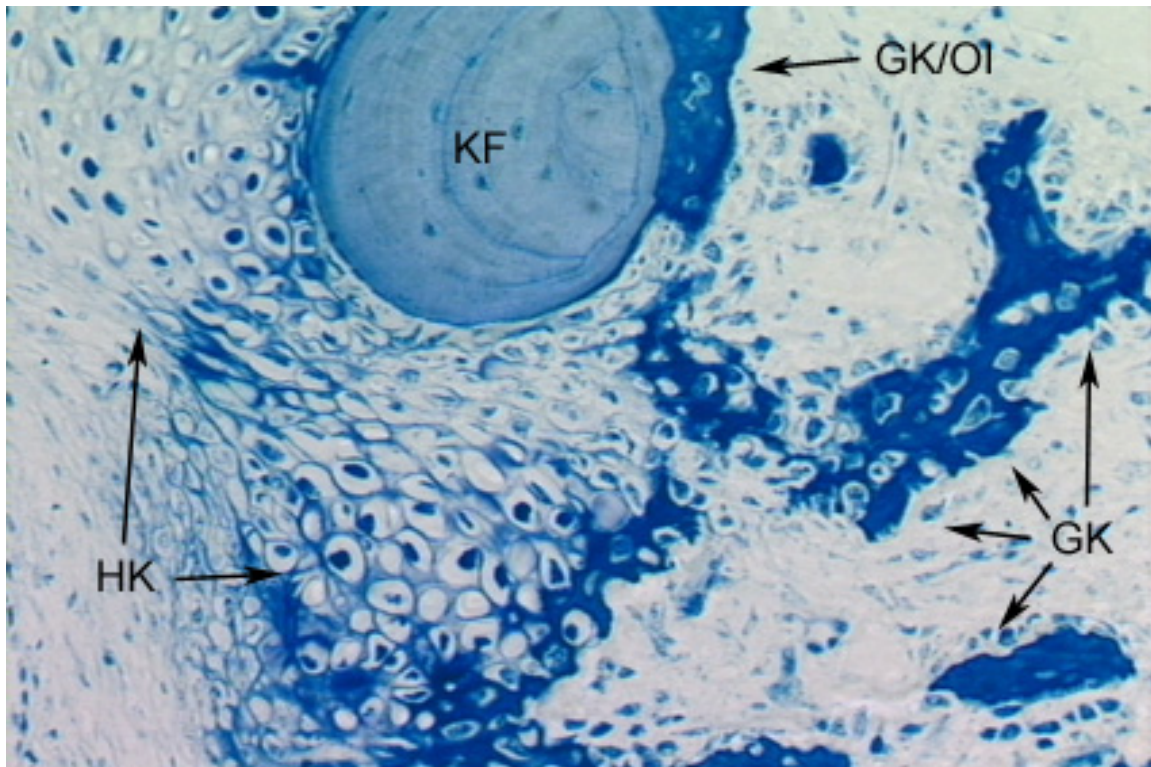


Abb. 52: 7 Tage-Klebstoffgruppe. In klebstoffschwachen Zonen innerhalb des Osteotomiespaltes ist hyaliner Knorpel (HK) sowie die Bildung von Geflechtknochen (GK) und Osteoid (OI) sichtbar. Sichtbar auch Knochenfragmente (KF). (Toluidinblau, Vergrößerung 80 x).

Vom Osteotomierand ausgehend, erkennt man erste Anzeichen einer chondrogenen Knochenneubildung. In den Resorptionslakunen am Osteotomierand finden sich Osteoklasten. Ansonsten sind die Spaltränder glatt.

Im Osteotomiespalt selbst beginnt die Formation von Granulationsgewebe (Gefäß-einsprossung und Bildung von Bindegewebe). In Gebieten mit mengenmäßig sehr geringen Klebstoffanteilen innerhalb des Osteotomiespaltes finden sich viele Knorpelzellen. Diese sind zu kleinen Zellverbänden inselförmig angeordnet. Dort wo kein Klebstoff liegt, sieht man einzelne Knorpelareale den Osteotomiespalt überbrücken (Abb. 52).

Entzündungsreaktionen im Allgemeinen und speziell in Gegenwart des Klebstoffes sind gering. Sie beschränken sich auf einzelne Zellinfiltrate, bestehend aus Histiozyten, Makrophagen und mehrkernigen Riesenzellen (Abb. 53).

Diese finden sich besonders in der Nähe der Knochenfragmente sowie in den Spongiosaräumen des defektbegrenzenden Knochengewebes. Eine Besonderheit ist das Auftreten von Makrophagen, deren Zytoplasma eine schaumartige Struktur aufweist. Sie werden im Folgenden als "Schaumzellen" bezeichnet (Abb. 54).

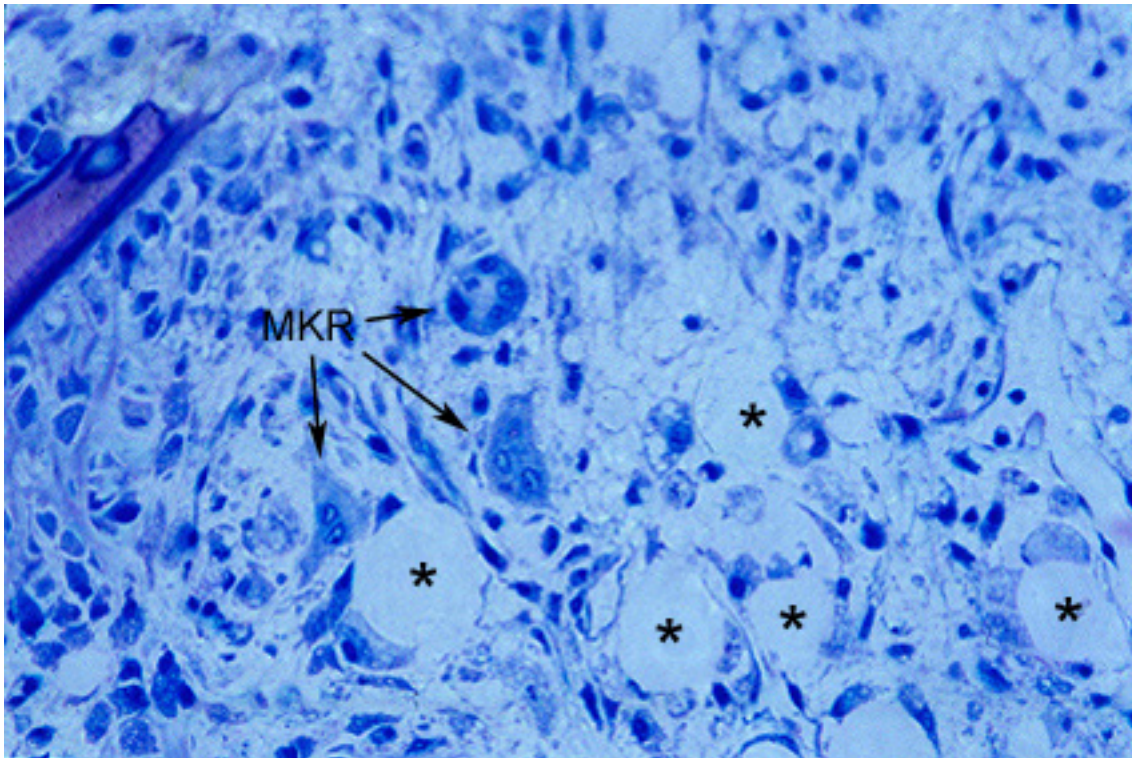


Abb. 53: 7 Tage-Klebstoffgruppe. Im Osteotomiespalt finden sich mehrkernige Riesenzellen (MKR) sowie Makrophagen, die den Klebstoff (*) bzw. die Knochenfragmente phagozytieren. (Levai-Laczko, Vergrößerung 100 x).

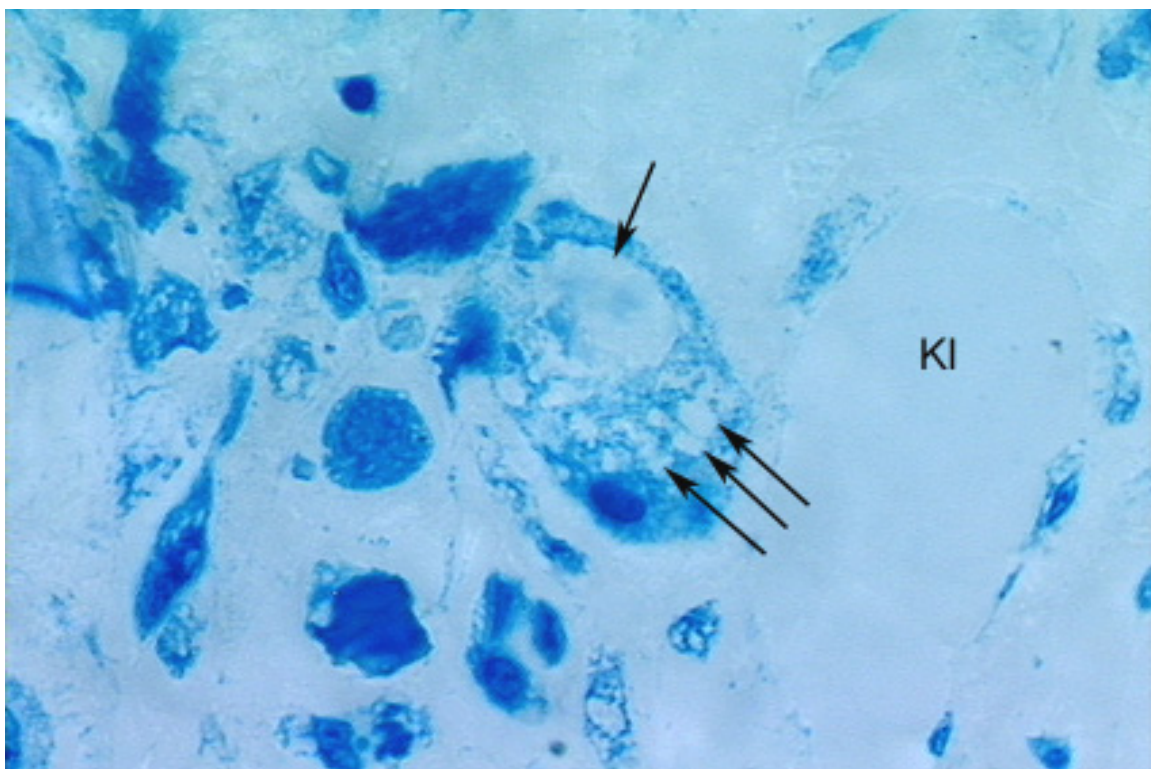


Abb. 54: 7 Tage-Klebstoffgruppe. Makrophage mit multiplen Vakuolen („Schaumzellen“) innerhalb des Zytoplasmas (Pfeile). Klebstoffareale (KI). (Toluidinblau, Vergrößerung 200 x)

Kontrollgruppe – 7 Tage:

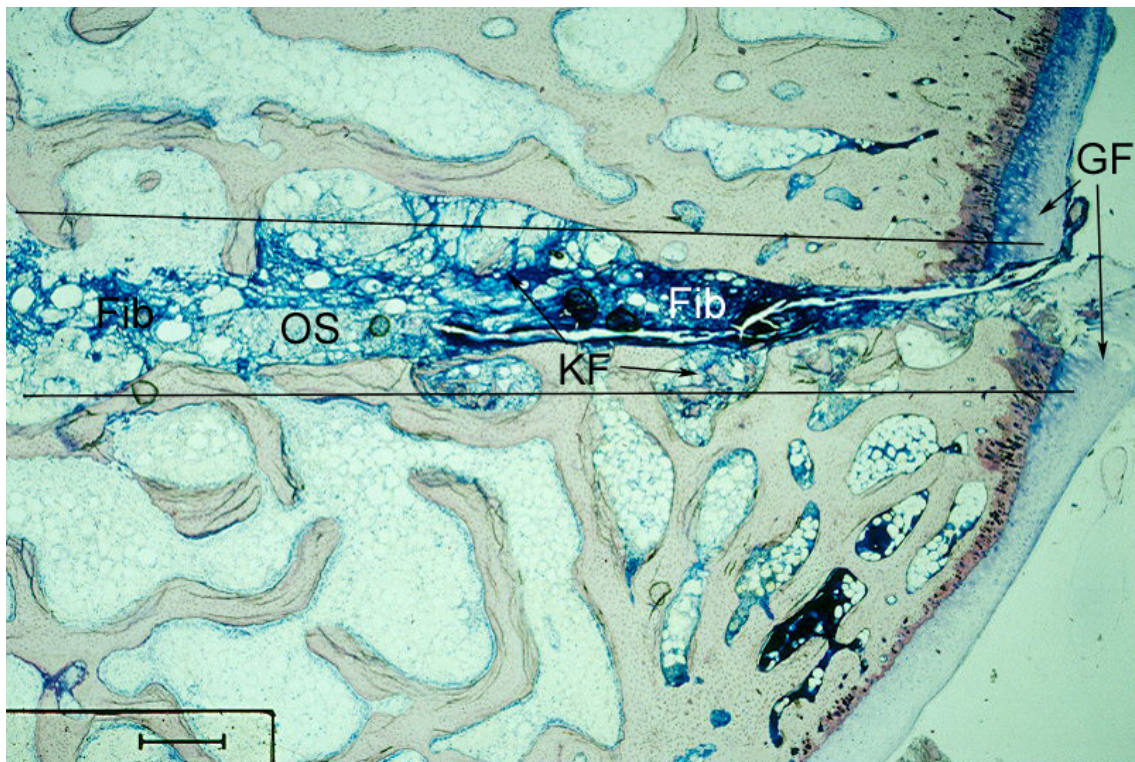


Abb. 55: 7 Tage-Kontrollgruppe. Deutlich sichtbarer glatter Osteotomiespalt (OS) gefüllt mit Fibrin (Fib) und Knochenfragmenten (KF). Rechts im Bild zeigt sich der Gelenkknorpel/Gelenkfläche mit einer diskreten Stufe (GF). (Levai-Laczko, Vergrößerung 6,25 x).

Auch in der Kontrollgruppe finden sich Hinweise auf die Bildung eines Frakturhämatoms, Knochenmehl und Knochenfragmente. Im Osteotomiespalt liegen zellreiches Bindegewebe, viele Fibroblasten und Fibrin vor. Das Fibringewebe zeigt sich im Osteotomiespalt in Form des oben beschriebenen Netzwerkes (Abb. 55). Vereinzelt sieht man auch in der Kontrollgruppe mononukleäre Phagozyten (Makrophagen), welche die Knochenfragmente phagozytieren.

In der Kontrollgruppe lässt sich keine oder nur eine sehr geringe periostale Knochenneubildung nachweisen. Eindeutige resorptive und knochenbildende Vorgänge sind in der Klebstoffgruppe zum Zeitpunkt von sieben Tagen ausgeprägter als in der Kontrollgruppe.

Zusammenfassend ist festzustellen, dass nach einem Zeitraum von 7 Tagen nur geringe Unterschiede bezüglich der Osteogenese und des zellulären Status zwischen der Klebstoff- und der Kontrollgruppe beobachtet werden können.

1. SERIE – 21 Tage

In den Übersichten aller Präparate zeigt sich repositionsabhängig ein unterschiedlich ausgebildeter Osteotomiespalt. Zum einen kann ein enger Osteotomiespalt oder auch ein weiter Spalt, teilweise mit Gelenkstufe zwischen der abgesetzten lateralen Femurkondyle und der Knorpeloberfläche des restlichen Femurknochens, zum anderen ein V-förmiger Verlauf des Osteotomiespalt nachgewiesen werden.

Beide Gruppen sind durch eine fortschreitende Frakturheilung (Osteogenese) gekennzeichnet. Auch die Abbauvorgänge der Knochenfragmente und des Frakturhämatoms schreiten weiter voran. Es lassen sich Osteoklasten am Lagerknochen (Osteotomierand) und an den verbliebenen Knochenbruchstücken darstellen. Das Knochenmehl, entstanden durch die Osteotomie, ist fast nicht mehr zu sehen. Das nach 7 Tagen sichtbare Frakturhämatom ist bei allen Tieren, bis auf unregelmäßig verteilte Restareale, vollständig organisiert. Auffallend sind die unterschiedlichen Wege der Knochenneubildung (Osteogenese). Einerseits eine direkte Geflechtknochenbildung, andererseits erst eine Bildung von Knorpel- und Kallusgewebe. Als zweiter Schritt folgt dann die Geflechtknochenbildung.

Klebstoffgruppe – 21 Tage:

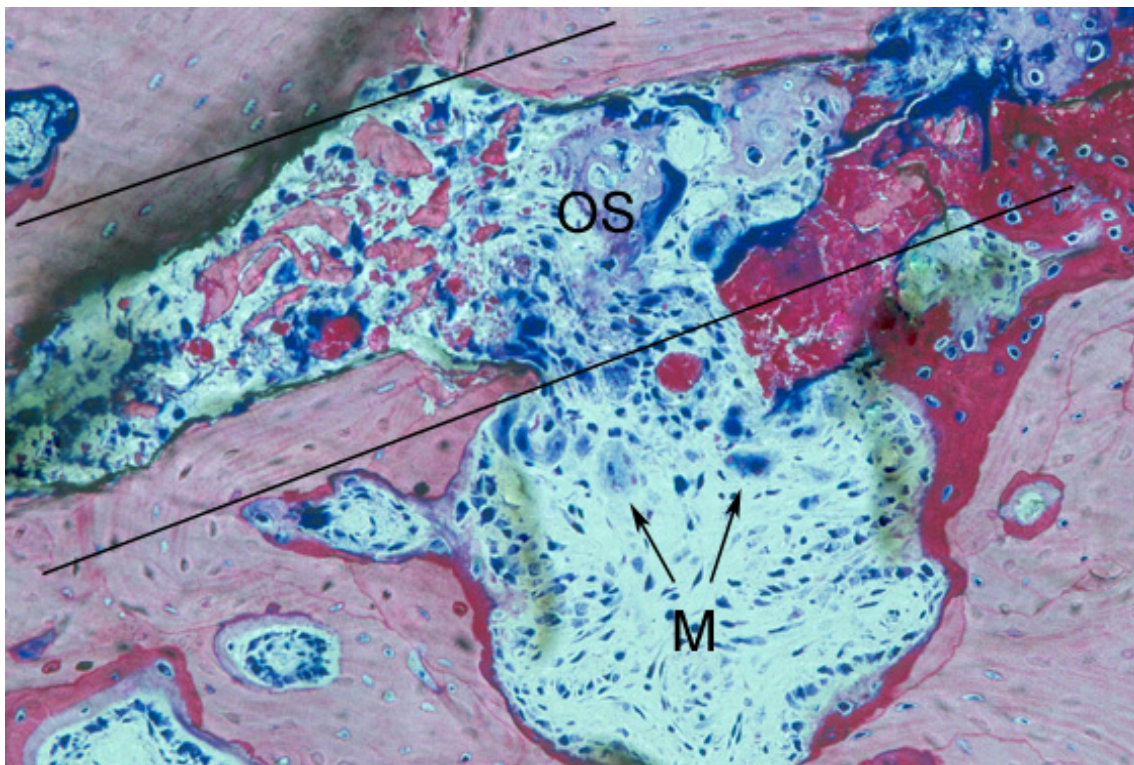


Abb. 56: 21 Tage-Klebstoffgruppe. Im Osteotomiespalt (OS) liegen Knochenfragmente vom Osteotomievorgang. In den eröffneten Spongiosaräumen finden sich Makrophagen (M). (Lavai-Laczko, Vergrößerung 50 x).

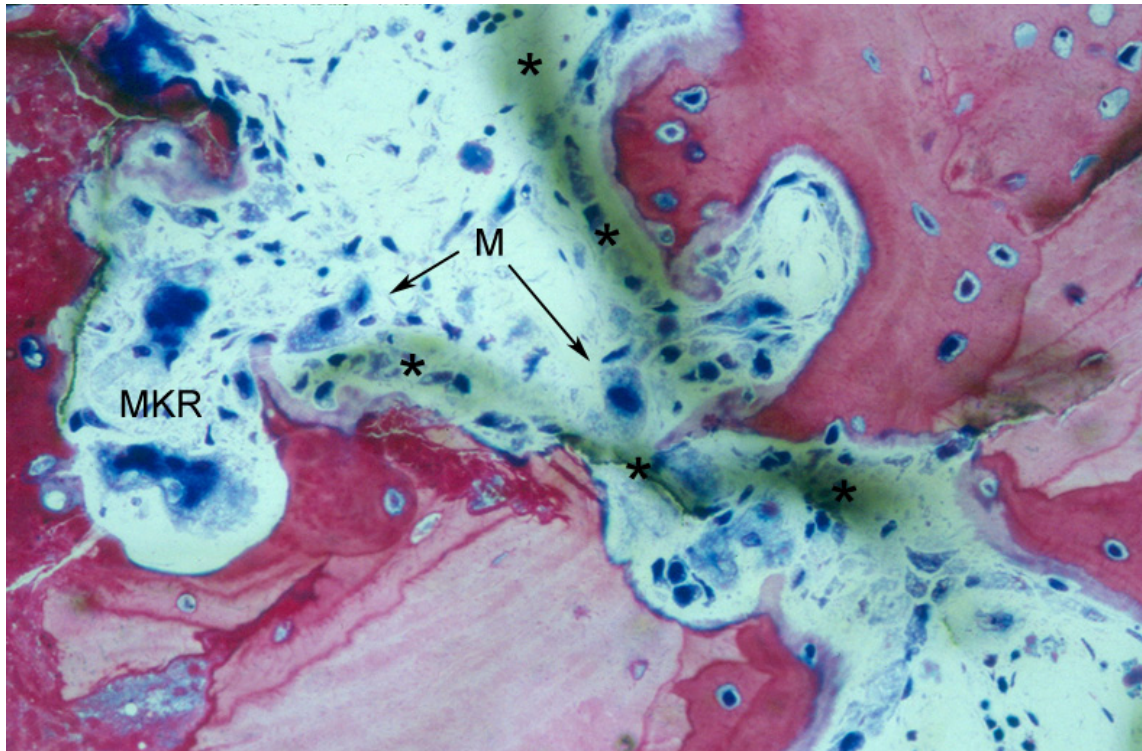


Abb. 57: 21 Tage-Klebstoffgruppe. In den osteotomiebegrenzenden Spongiosaräumen liegen Makrophagen (M) und mehrkernige Riesenzellen (MKR). Die schwarzen Schatten sind Fixationsartefakte (*). (Levai-Laczko, Vergrößerung 100 x).

21 Tage nach Klebstoffapplikation ist in den Schliff-Präparaten der Knochenklebstoff im Osteotomiespalt noch sichtbar. Dieser kommt aber eher in einzelnen inselförmigen Arealen vor und nicht mehr als den gesamten Spalt durchlaufendes Band. Im Osteotomiespalt selbst und um den Klebstoff finden sich nur geringe Entzündungsreaktionen. Es können wie zum Beobachtungszeitraum 7 Tage Schaumzellen, Makrophagen und mehrkernige Riesenzellen beobachtet werden (Abb. 56-57). Hinzu kommen vereinzelt noch Plasmazellen und Lymphozyten. Ausgedehnte Entzündungsreaktionen, Fremdkörpergranulome oder eine Abkapselung des Klebstoffes lassen sich in keinem der Präparate beobachten.

Bei einigen Präparaten fallen im Osteotomiespalt bizarre plumpe, teilweise schlecht mineralisierte, neu gebildete Knochentrabekel auf. Es finden sich breite Osteoidsäume im Sinne einer Mineralisationsverzögerung (Mineralisationsstörung) des neu gebildeten Knochens.

In der Klebstoffgruppe können insgesamt zwei verschiedene Formen der Frakturheilung (Osteogenese) beschrieben werden. Zum einen liegt eine direkte Geflechtknochenbildung vor, welche durch einzelne Knochentrabekel den

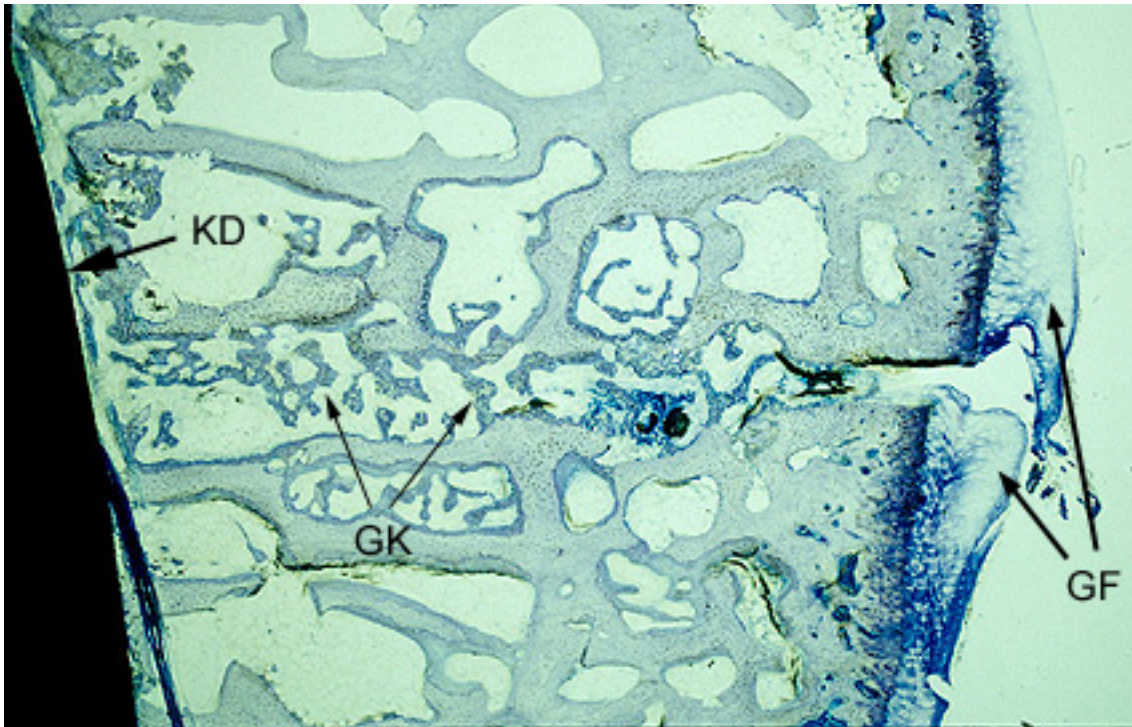


Abb. 58: 21 Tage-Klebstoffgruppe. Links im Bild sind Anteile eines Kirschner-Drahtes (KD) sichtbar. Im Osteotomiespalt hat eine Überbrückung durch Geflechtknochen (GK) begonnen. Deutlich sichtbar die Gelenkfläche (GF) mit Knorpelanteilen. (Toluidinblau, Vergrößerung 3,125 x).

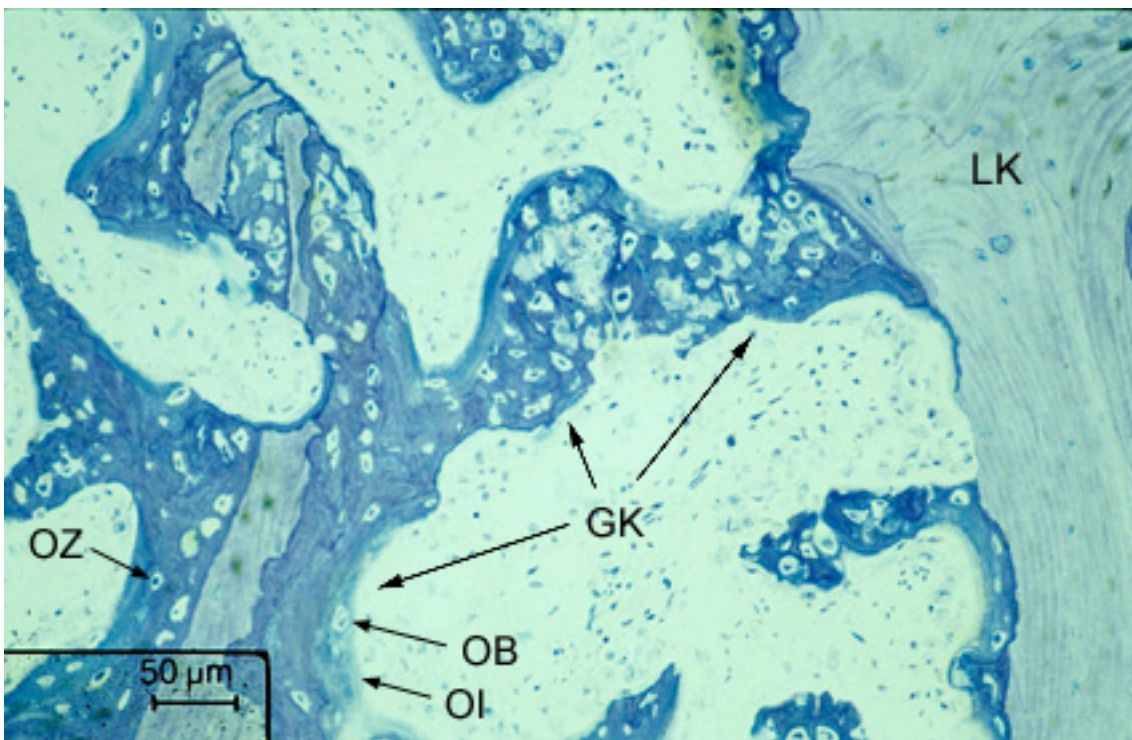


Abb. 59: 21 Tage-Klebstoffgruppe. Neugebildeter Geflechtknochen (GK) vom Lagerknochen (LK) ausgehend. „Bridging“-Osteoblasten (OB) bilden Osteoid (OI) und überbrücken den Osteotomiespalt. Eingemauerte Osteozyten (OZ). (Toluidinblau, Vergrößerung 50 x).

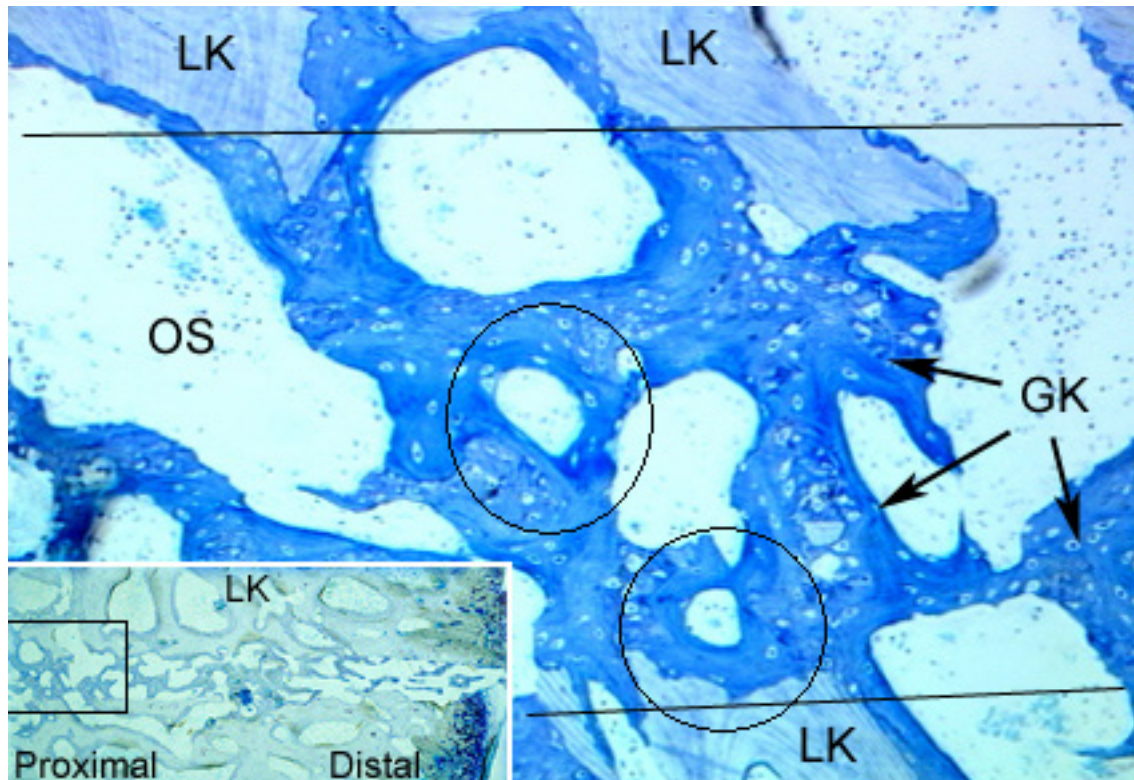


Abb. 60: 21 Tage Klebstoffgruppe. Überbrückung des Osteotomiespalts (OS) durch Geflechtknochen (GK). Verzögerte Osteogenese zum Gelenk hin (distal). Beginnende Lamellenknochenbildung (Kreise). Lagerknochen (LK). (Toluidinblau, Vergrößerung 40 x).

Osteotomiespalt überbrückt (primäre Frakturheilung - Spaltheilung) (Abb. 58-60). Die Knochenneubildung innerhalb dieser Frakturheilungsform ist zwischen den einzelnen Präparaten sehr individuell gestaltet. Bei einer weit fortgeschrittenen Knochenneubildung einzelner Präparate findet sich neben dem Geflechtknochen schon ein Umbau in Lamellenknochen (Abb. 60).

Deutlich zu sehen ist eine gerichtete Frakturheilung innerhalb der Osteotomiezone von proximal nach distal (Abb. 60 kleines Bild). Während im diaphysär proximalen Bereich der Osteotomie der Spalt schon überbrückt ist, zeigt sich oftmals im distalen Bereich in Richtung Gelenkfläche (bzw. Gelenkknorpel) noch Bindegewebe ohne Knochenneubildung oder nur schwaches „Bridging“ (Abb. 60 kleines Bild).

Die zweite Form der Frakturheilung läuft über eine ausgeprägte interfragmentäre Knorpelreaktion innerhalb des Osteotomiespaltes ab (Abb. 61-62). Bei einigen Tieren der Klebstoffgruppe ist eine komplette Überbrückung des Osteotomiespaltes durch Knorpel zu erkennen (sekundäre Frakturheilung/indirekte Knochenheilung). Der Knorpel füllt den gesamten Spalt aus. Hierbei findet sich distal in der

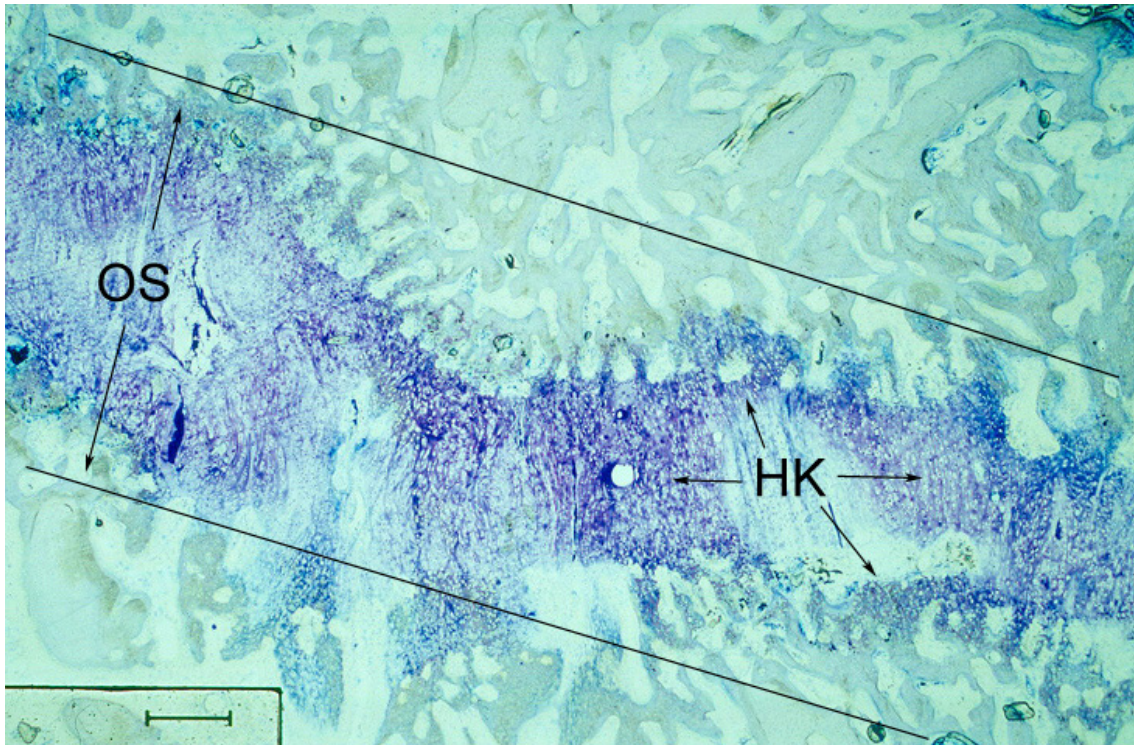


Abb. 61: 21 Tage-Klebstoffgruppe. Chondrogene Osteogenese im Osteotomiespalt (OS), Osteotomiespalt durch Begrenzungslinien markiert. Osteotomiezone ist mit hyalinem Knorpel (HK) aufgefüllt. (Toluidinblau, Vergrößerung 6,25 x).

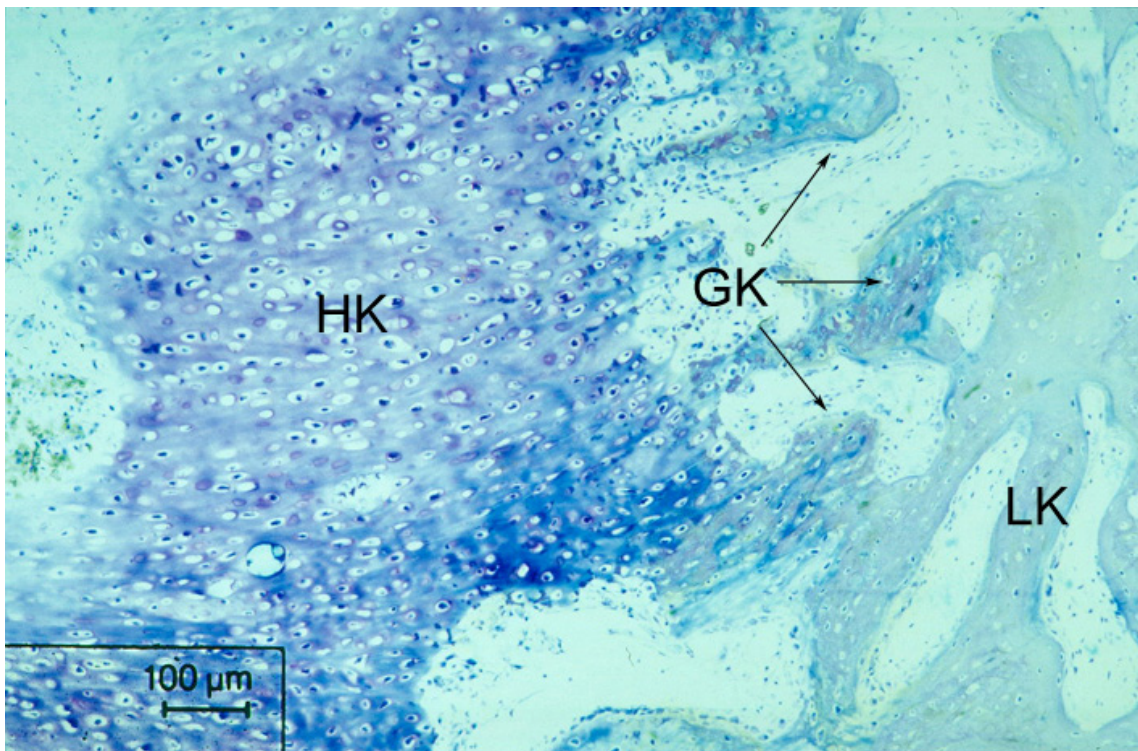


Abb. 62: 21 Tage-Klebstoffgruppe. Vergrößerung aus Abb.61. Sichtbarer hyaliner Knorpel (HK). Chondrogene Knochenneubildung (Geflechtknochen GK) in der Osteotomiezone zwischen Knorpel (HK) und Lagerknochen (LK). (Toluidinblau, Vergrößerung 25 x).

Osteotomiezone faseriges Bindegewebe mit zellarmen Faserknochen und weiter proximal hyaliner Knorpel. In diesen Präparaten sieht man im Osteotomiespalt neben der ausgeprägten Knorpelbildung fast keinen Klebstoff mehr. Eine Umwandlung des Knorpels in Knochengewebe (Geflechtknochen) ist zu diesem Zeitpunkt (21 Tage) weit proximal in Höhe der Diaphyse und Markhöhle sichtbar. Stellenweise findet sich, ausgehend vom Lagerknochen, auch eine Geflechtknochenneubildung (Abb. 62).

Kontrollgruppe – 21 Tage:

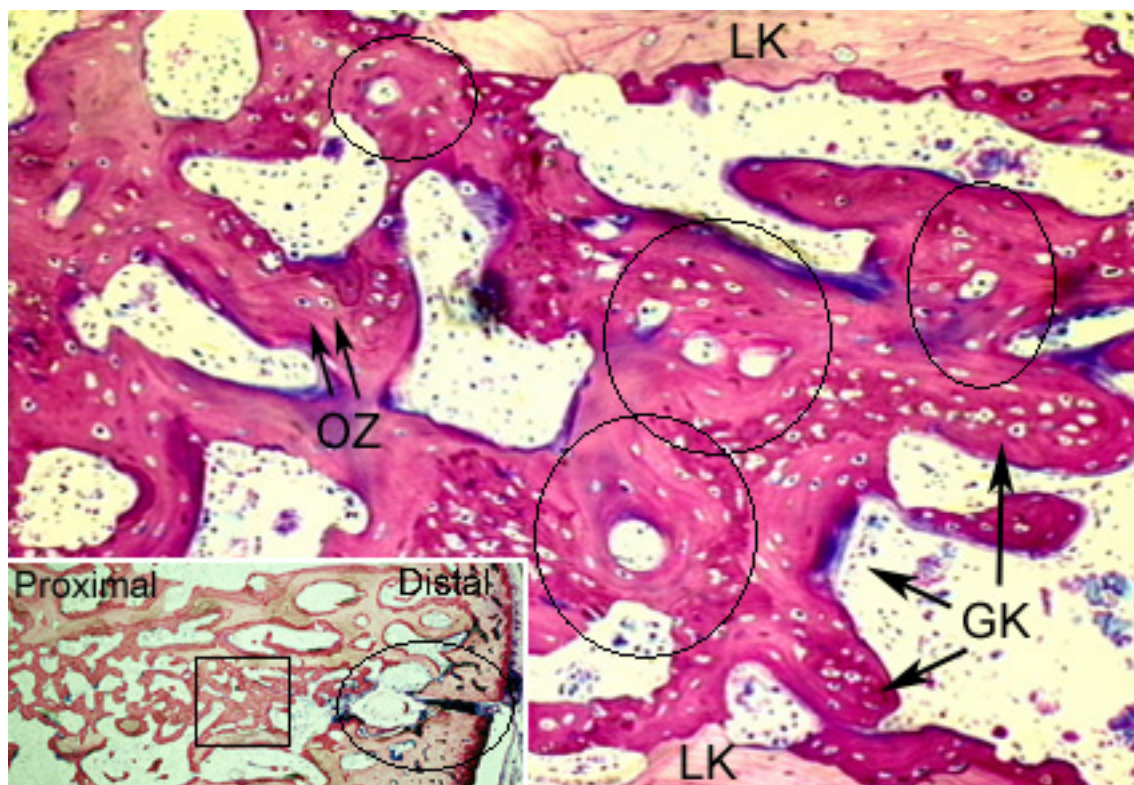


Abb. 63: 21 Tage-Kontrollgruppe. Vorangeschrittene Frakturheilung. Der gesamte Osteotomiespalt ist durch Geflechtknochen (GK) überbrückt. Beginnender Umbau zu Lamellenknochen (großes Bild - Kreise). Verzögerte Osteogenese zum Gelenk hin (kl. Bild - Kreis). Osteozyten (OZ). Am Rand Lagerknochen (LK). (Levai-Laczko, Vergrößerung 40 x).

Hier zeigt sich bei zwei von drei Tieren eine sehr weit fortgeschrittene Frakturheilung (Osteogenese). Der Osteotomiespalt ist nach 21 Tagen auf 3/4 bis 4/5 der Strecke knöchern durchbaut. Die noch nicht durchbauten Bezirke sind mit stark vaskularisiertem Granulationsgewebe durchsetzt. Es findet sich ein reifer, gut mineralisierter Geflechtknochen mit dicht liegenden Osteozytenhöhlen. An vielen Stellen vollzieht sich ein Umbau zu Lamellenknochen (Abb. 63). Die Osteotomieränder im 1. Drittel von der Gelenkfläche ausgehend sind glatt (Abb. 63 -

kleines Bild, Kreis). Hier hat noch keine Knochenneubildung oder „Bridging“ stattgefunden. Dem entgegen ist beim dritten Tier der Kontrollgruppe der Osteotomiespalt schnittebenenabhängig unterschiedlich weit. Innerhalb des Spaltes befindet sich, wie bei drei Tieren in der Klebstoffgruppe, eine deutliche Ansammlung von hyalinen Knorpelzellen, welche den Osteotomiespalt trabekelartig überspannen. In proximaler Richtung zur Diaphyse besteht eine komplette Überbrückung. Am Lagerknochen zeigt sich neu gebildeter Geflechtknochen, während distal in Richtung Gelenkfläche noch keine Überbrückung (Verzögerung der Osteogenese) sichtbar ist. Man erkennt jedoch reichlich Bindegewebe sowie Fibrinansammlungen und Knochenfragmente. Osteoklasten, einzelne Makrophagen und Riesenzellen prägen das Bild der hier immer noch vorhandenen Abbauvorgänge.

Zusammenfassend lässt sich in beiden Gruppen eine Organisation des Frakturhämatoms, die Einwanderung von Granulationsgewebe sowie eine Resorption der Knochenfragmente nachweisen. Eine zunehmende Osteoblastentätigkeit lässt eine Geflechtknochen- und Trabekelbildung (Bridging) im Osteotomiespalt erkennen, wobei die Osteoblastentätigkeit und die Knochenneubildung in der Klebstoffgruppe leicht verzögert erscheinen.

1. SERIE – 42 Tage

Zum diesem Beobachtungszeitpunkt sieht man in beiden Gruppen eine weiter fortschreitende Frakturheilung. Schwierig ist die Beurteilung der unterschiedlichen Trabekeldicken des neu gebildeten Knochens in den einzelnen Präparaten.

Teilweise findet sich bei den einzelnen Tieren eine sehr unterschiedlich stark ausgeprägte Knochenneubildung und eine Überbrückung des Osteotomiespaltes innerhalb der Schnitte I-IX (siehe Kapitel 3.12.4). Dies ist am ehesten durch die unterschiedliche Größe der einzelnen Kaninchen und die damit auch verbundene Größe der Femurkondyle zu erklären. Hierdurch bedingt finden sich auch unterschiedlich große Markhöhlen im Bereich der Kondylen.

Klebstoffgruppe – 42 Tage:

42 Tage nach Klebstoffapplikation findet sich eine abgeschlossene Resorption mit ausgeprägten Resorptionslakunen im osteotomiebegrenzenden Knochen. Ein

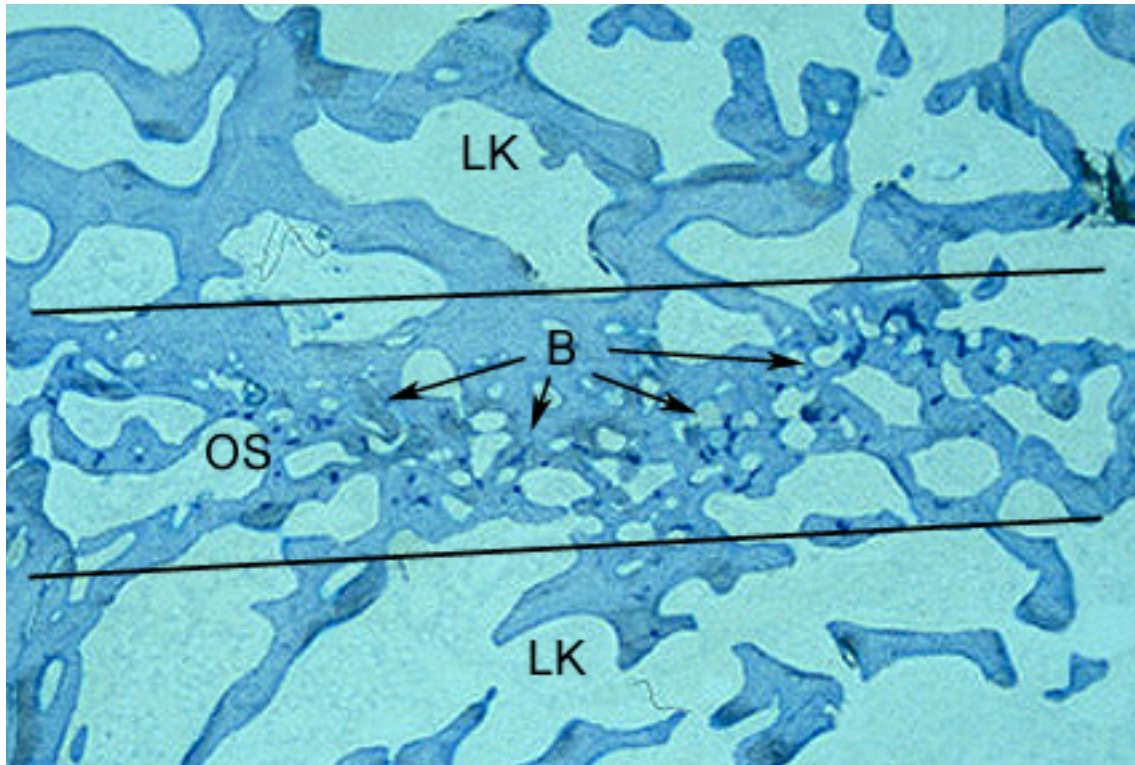


Abb. 64: 42 Tage-Klebstoffgruppe. Bei schwacher intrakondylärer Trabekeldichte ist der Osteotomiespalt (OS) komplett durchbaut. Umwandlung von Geflechtknochen in Lamellenknochen (B - „Bridging“). Lagerknochen (LK). (Toluidinblau, Vergrößerung 6,25 x).

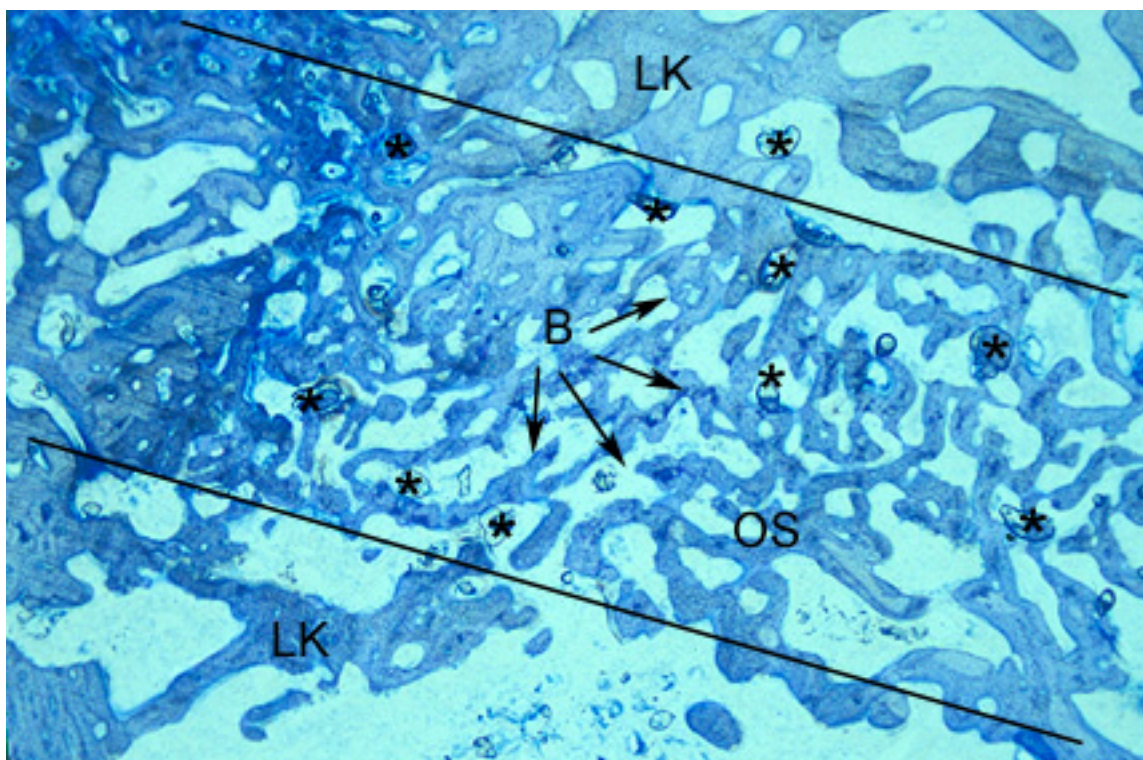


Abb. 65: 42 Tage-Klebstoffgruppe. Durchbaute Osteotomiezone mit dichtem vitalem Lamellenknochen (B - „Bridging“). Beidseits des Osteotomiespaltes (OS) Lagerknochen (LK). (Die Luftblasen sind Fixierungsartefakte *). (Toluidinblau, Vergrößerung 6,25 x).

osteoblastenreiches Zellbild zeigt sich in allen Präparaten. Im ehemaligen Osteotomiebereich kann die Umwandlung des Geflechtknochens in Lamellenknochen beobachtet werden (Abb. 64-65). Die Osteoneogenese befindet sich größtenteils im Umwandlungsprozess von Reparaturknochen hin zu lamellärem Knochen als Endzustand der Frakturheilung - *restitutio ad integrum*.

Als Zellinfiltrate können in allen Präparaten mehrkernige Riesenzellen, Makrophagen, vereinzelt Histiozyten (Gewebs-Makrophagen) und sehr selten Lymphozyten sowie Mastzellen beobachtet werden. Auch perinukleär zytoplasmareiche Schaumzellen sind in fast allen Präparaten in geringer Anzahl zu finden.

Innerhalb der Gruppe bestehen hier jedoch auch Unterschiede. Das histologische Bild bezüglich des Fortschrittes der Frakturheilung und -überbrückung zeigt zu diesem Zeitpunkt (42 Tage) ein sehr inhomogenes Bild. Die Osteoneogenese ist bei den einzelnen Tieren zeitlich unterschiedlich weit vorangeschritten. Die angrenzenden Zeitpunkte 21 und 84 Tage zeigen ein eher gleichmäßiges Bild der Frakturheilung und -überbrückung innerhalb der Klebstoffgruppe.

Somit ist von einem Maximum an Stoffwechselvorgängen zum Zeitpunkt von 42 Tagen auszugehen. Es zeigt sich ein unterschiedlich ausgeprägtes Trabekelwerk zwischen den einzelnen Tieren der Klebstoffgruppe aber auch zwischen den einzelnen Schliffebenen des jeweiligen Tieres. Der Übergang zwischen den resorptiven Vorgängen (Klebstoff, Knochenbruchteile - vor allem 7 und 21 Tage) und reparativen Vorgängen (Knochenneubildung - Beginn nach 21 Tagen, Maximum 42 Tage, Abschluss 84 Tage) zeigt sich somit am deutlichsten in der Klebstoffgruppe.

Kontrollgruppe – 42 Tage:

Die Kontrollgruppe zeigt ein sehr einheitliches Bild. Im Gegensatz zur Klebstoffgruppe ist hier die Frakturheilung und somit auch die Osteogenese weiter vorangeschritten. Der Osteotomiespalt ist über die gesamte Länge gut durchbaut und überbrückt. Der Geflechtknochen (Reparaturknochen, Faserknochen) ist in Lamellenknochen umgebaut worden (Abb. 66). Bei einem der Präparate gestaltet es sich schwierig nach 42 Tagen den Osteotomieverlauf bzw. die Osteotomiezone unter dem Lichtmikroskop wieder aufzufinden, da die Heilungsvorgänge fast komplett abgeschlossen sind. Selbst kleine Stufenbildungen an der „Knochen-Knorpel-

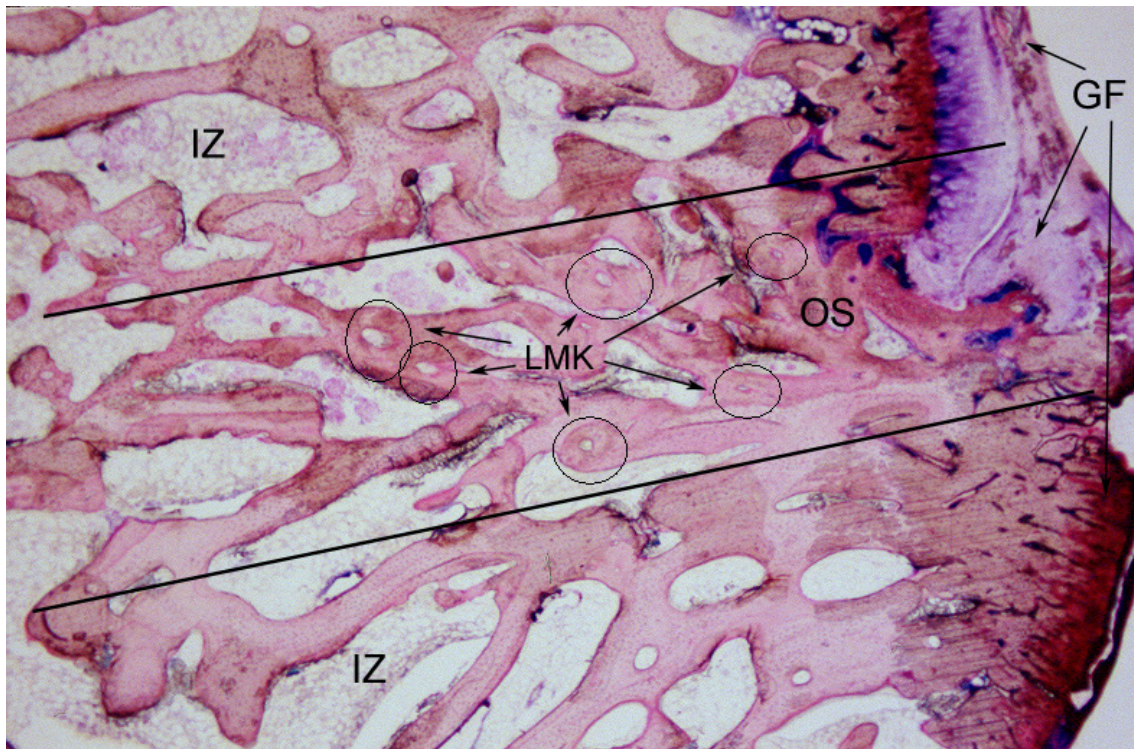


Abb. 66: 42 Tage-Kontrollgruppe. Der Osteotomiespalt (OS) ist knöchern durchbaut. Geflecht-knochen ist fast vollständig durch Lamellenknochen (LMK) ersetzt. Gelenkfläche (GF) zum Kniegelenk hin. Intertrabekuläre Zwischenräume (IZ). (Levai-Laczko, Vergrößerung 6,25 x).

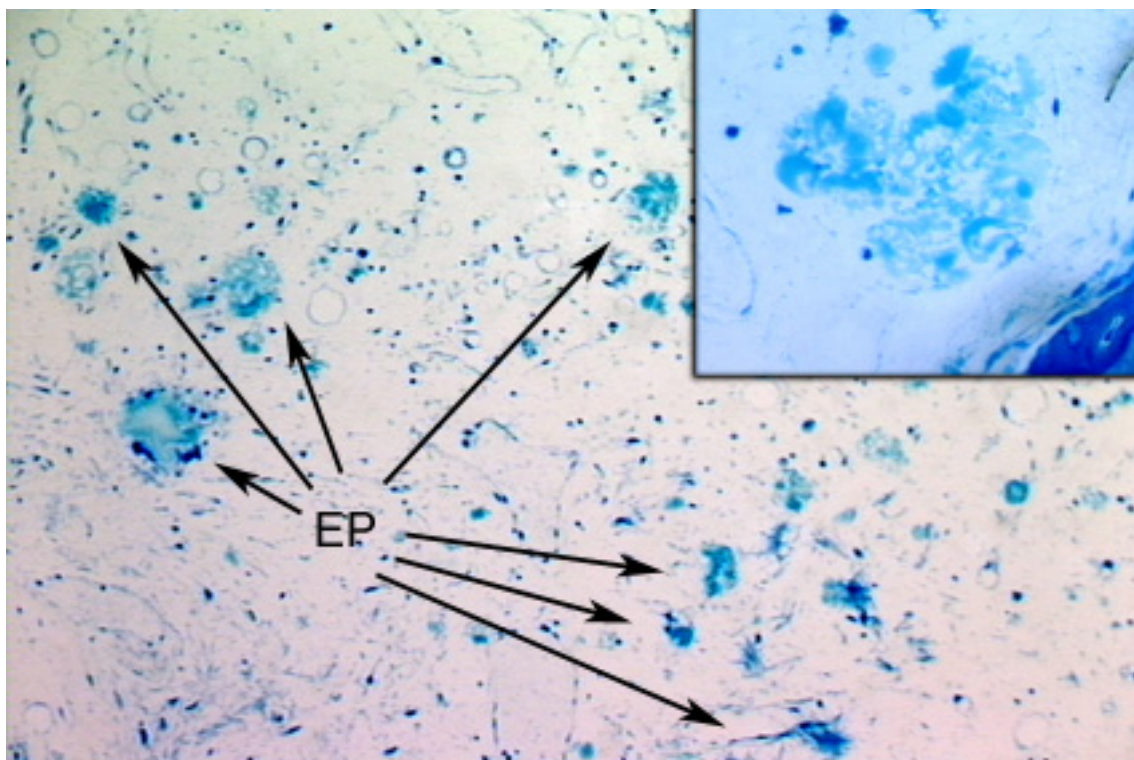


Abb. 67: 42 Tage-Kontrollgruppe. Eiweißpräzipitate (EP) in, der Osteotomiezone angrenzenden Markräumen. (Toluidinblau, Vergrößerung 40 x).

Grenze“ durch schlechte Reposition oder durch kaudales Abgleiten der reponierten Femurkondyle sind durch Umbauten der Knochenarchitektur im Sinne des „Remodellings“ beseitigt, so dass die ursprüngliche Gelenkfunktion wieder gegeben ist (Abb. 66). Die Bereiche um die Osteotomiezone sind ebenso wie die begrenzenden Markräume insgesamt sehr zellarm. Nahe der Osteotomiezone finden sich in den Markräumen intensive basophile Areale. In diesen fällt ein massives Vorkommen von hellbläulichen "knäulartigen" Eiweißpräzipitaten auf (Abb. 67).

Im Bereich der Osteotomie finden sich keine Zellinfiltrate, in sämtlichen weiteren Präparaten der Kontrollgruppe keine oder nur vereinzelt Makrophagen, Riesenzellen, Histiozyten (Gewebsmakrophagen) oder Lymphozyten.

Insgesamt ist in der Kontrollgruppe nach 42 Tagen eine komplette Durchbauung des Osteotomiespaltes zu sehen, während sich in der Klebstoffgruppe eine abgeschlossene Resorption des Klebstoffes mit einer verzögerten Frakturheilung erkennen lässt. Die Klebstoffgruppe hat nach 42 Tagen den zeitlichen Vorsprung der Kontrollgruppe gegenüber dem Beobachtungszeitpunkt 21 Tage weiter verkürzt.

1. SERIE – 84 Tage

In beiden Versuchsgruppen ist zum Zeitpunkt 84 Tage die Frakturheilung abgeschlossen.

Die mit Kirschnerdraht stabilisierte Osteotomie entwickelte bei 3 von insgesamt 6 Klebstofftieren eine Pseudarthrose. Dies kann als Ausdruck einer deutlichen Instabilität gewertet werden.

Klebstoffgruppe – 84 Tage:

Bei drei Tieren aus der Klebstoffgruppe kann 84 Tage nach Klebstoffapplikation eine abgeschlossene Frakturheilung beobachtet werden. Der Osteotomiespalt ist in der Übersicht nicht mehr vom umgebenden Knochengewebe zu differenzieren. Die überbrückte und durchbaute Osteotomiezone besteht zum größten Teil aus vitalem und gut mineralisiertem Lamellenknochen. Lediglich die etwas dichtere Trabekelstruktur oder geringe Stufen an der Gelenkoberfläche lassen den ehemaligen Verlauf der Osteotomiezone noch erahnen (Abb. 68). Der

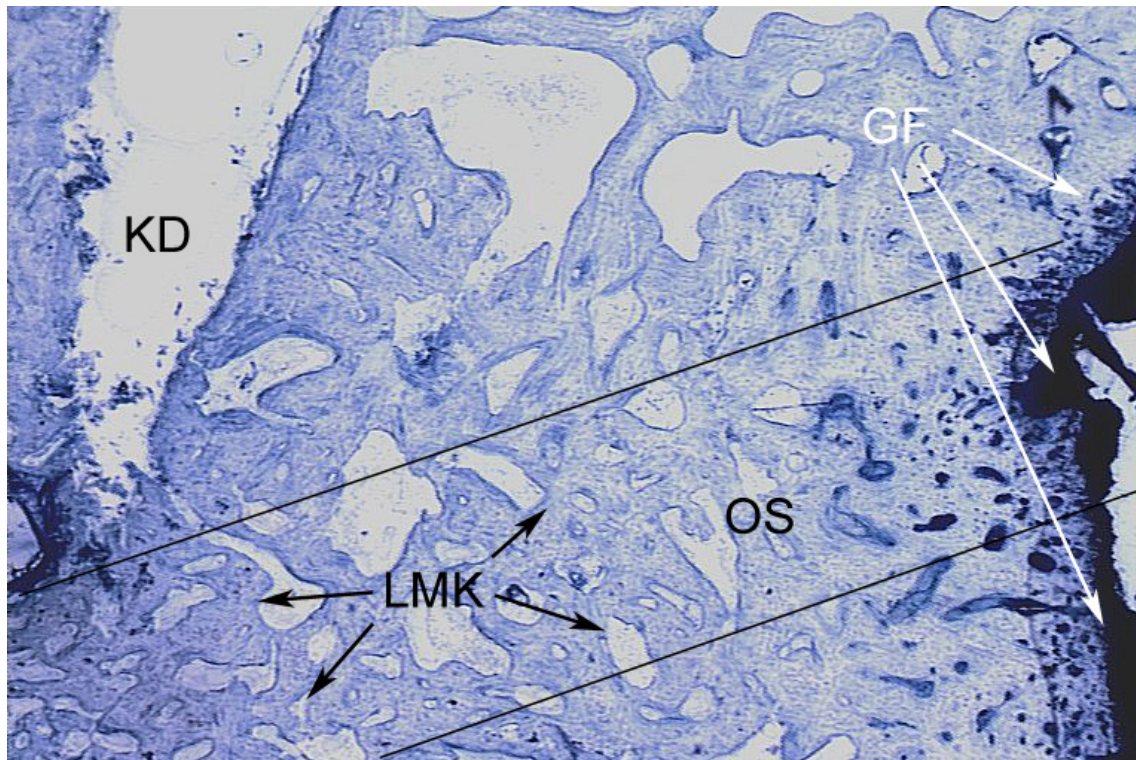


Abb. 68: 84 Tage-Klebstoffgruppe. Vollständig knöcherne Überbrückung und Durchbauung der Osteotomiespalt (OS) durch dichten Lamellenknochen (LMK). Sichtbar am linken Bildrand die verbliebene Höhle des eingebrachten Kirschner-Drahtes (KD) sowie rechtsseitig die Gelenkfläche (GF). (Toluidinblau, Vergrößerung 6,25 x).

Knochenklebstoff ist in keinem dieser Präparate mehr sichtbar. Entzündungszellen oder phagozytierende Zellen können in dieser Gruppe ebenfalls nicht mehr beobachtet werden. Das Zellbild ist unauffällig und gleicht dem der Kontrollgruppe. Im Vergleich dazu zeigt sich bei den anderen drei Tieren aus der Klebstoffgruppe nach 84 Tagen schon in der Übersicht das Bild einer Pseudarthrose. Der Osteotomiespalt ist weit, die abgesetzte laterale Femurkondyle ist disloziert.

Anhand der Röntgenbilder kann nachgewiesen werden, dass die Kirschner-Drähte gewandert sind. Der weite Osteotomiespalt ist mit Bindegewebe aufgefüllt. Nur entlang des Lagerknochens hat sich hyaliner Knorpel und teilweise Geflechtknochen ausgebildet. In einem Präparat zeigt sich eine mäßige Überbrückung der Osteotomie mit hyalinem Knorpel. Der Knochenklebstoff liegt hier, analog zu den Präparaten der 7 Tage Gruppe, als ein durch den gesamten Osteotomiespalt laufendes Band. Es hat keinerlei Abbau oder Resorption stattgefunden.

Kontrollgruppe – 84 Tage:

Die Kontrollgruppe weist ein ähnliches Bild wie die Klebstoffgruppe (Tiere mit Pseudarthrose ausgeschlossen) auf. Die Osteogenese in der Osteotomiezone ist abgeschlossen. Der Geflechtknochen ist in Lamellenknochen umgewandelt worden.

Dichtere Trabekelstrukturen mit vielen kleinen Knochenhöhlen im Bereich der ehemaligen Osteotomiezone und kleine Stufen im Knorpel an der Gelenkfläche sind ein Zeichen für den Verlauf der Osteotomiezone. Zum Teil finden sich noch kleinere Unebenheiten im Bereich des bradytrophen Knorpels der Gelenkfläche (Abb. 69-70).

In beiden Gruppen (Klebstoff- und Kontrollgruppe) liegt eine vollständige Durchbauung und Überbrückung der Osteotomiezone mit vollständiger Resorption des Klebstoffes vor.

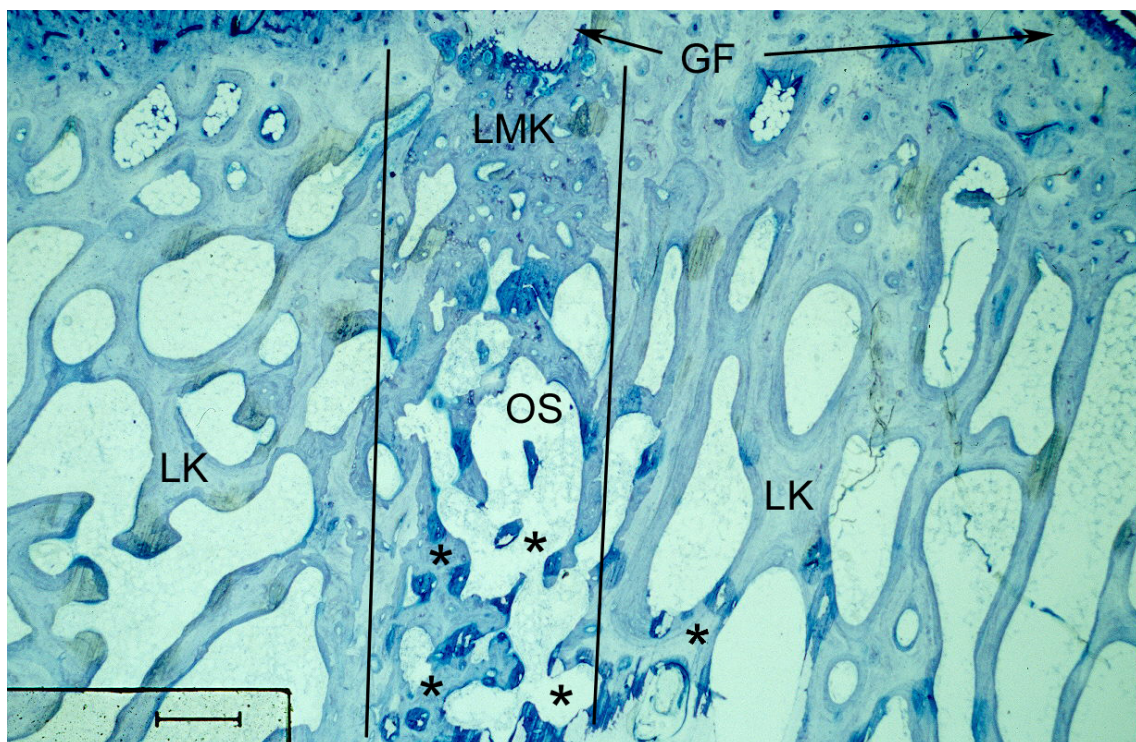


Abb. 69: 84 Tage-Kontrollgruppe. Überbrückung und Durchbauung des Osteotomiespaltes (OS) im Bereich der Gelenkfläche (GF) durch kompakten Lamellenknochen (LMK). In Richtung Diaphyse geringer Trabekeldichte. Fixationsartefakte (*). Die Umwandlung von Geflecht- in Lamellenknochen ist abgeschlossen. Lateral des Osteotomiespaltes findet sich der Lagerknochen (LK). (Toluidinblau, Vergrößerung 6,25 x).

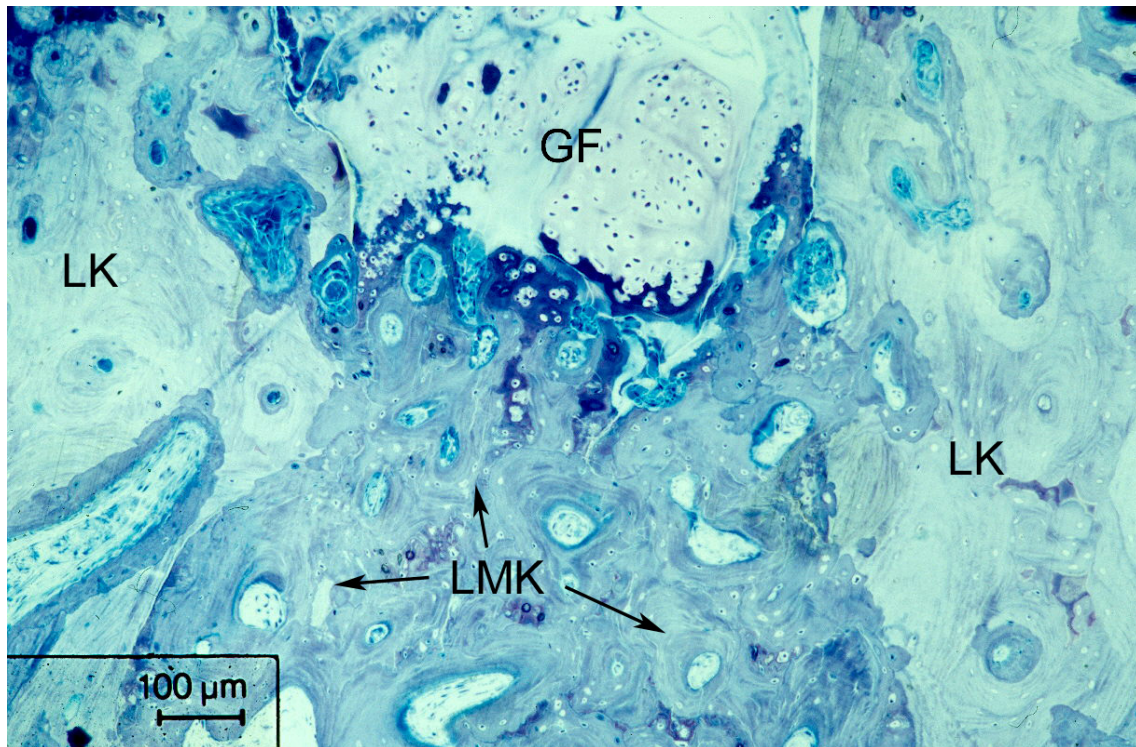


Abb. 70: 84 Tage-Kontrollgruppe. Ausschnittsvergrößerung aus Abb. 69. Dichter kompakter Lamellenknochen (LMK) in der Osteotomiezone. Auch im Bereich der Gelenkfläche (GF) Überbrückung der Osteotomiezone durch hyalinen Gelenkknorpel. Lagerknochen (LK). (Toluidinblau, Vergrößerung 25 x).

In der zweiten Serie werden, wie im Versuchsprotokoll - Kapitel 3.3 beschrieben, nur noch Klebstofftiere analysiert. Als Kontrollgruppe dienen hier die Kontrolltiere der ersten Serie. Die Beobachtungszeiträume betragen 21 und 42 Tage nach Klebstoffapplikation.

2. SERIE – 21 Tage:

Nach 21 Tagen Klebstoffapplikation finden sich in allen Präparaten der sechs Tiere ein sichtbarer Osteotomiespalt mit Fibrinnetzen, Knochenfragmenten und dem angefärbten Knochenklebstoff (Abb. 71-72). Alle Präparate zeigen ein optimales Repositionsergebnis. Eine Stufe an der Gelenkoberfläche, bei sehr gut reponierter und refixierter lateraler Femurkondyle, kann nicht beobachtet werden. Der Osteotomiespalt zeigt sich in allen Präparaten eng bis sehr eng (gute Kompression). Es besteht ein gleichmäßiger Abstand zwischen den beiden Osteotomieenden. Auffallend ist in dieser Gruppe, dass der Knochenklebstoff eine hellblaue Färbung aufweist. Diese Färbung sieht man sowohl bei den Toluidinblau, wie auch bei den

Levai-Laczko gefärbten Schliffpräparaten. Sie zeigt sich besonders deutlich bei größeren Klebstoffarealen innerhalb des Osteotomiespaltes. Hier kann die Färbung als besonders intensiv beobachtet werden.

Nach 21 Tagen zeigen sich innerhalb des Osteotomiespaltes keinerlei resorptive Vorgänge. Die Osteotomieränder sind absolut glatt. An den Knochenfragmenten innerhalb des Spaltes sieht man nur einzelne Osteoklasten oder andere stoffwechselaktive Zellen. Das Fibrin liegt selbst nach 21 Tagen noch unverändert im Osteotomiespalt (Abb. 71-72). Die Gewebsreaktion auf den Knochenklebstoff ist ebenfalls auffällig. Es findet sich nur eine minimale zelluläre Reaktion auf den Knochenklebstoff. Man sieht vereinzelt Makrophagen, mehrkernige Riesenzellen, Lymphozyten, Mastzellen, Plasmazellen oder Granulozyten. Eine immunologische Reaktion auf den Klebstoff bleibt vollkommen aus. Eine Resorption des Klebstoffes durch Makrophagen oder mehrkernige Riesenzellen ist vereinzelt zu sehen. Auch eine bindegewebige Abkapselung, wie man sie bei anderen Fremdkörpern sieht, kann hier nicht nachgewiesen werden. Eine Knochenneubildung innerhalb des Osteotomiespaltes ist nicht zu beobachten. Es findet sich kein neu gebildeter Geflechtknochen im Osteotomiespalt oder am Lagerknochen.

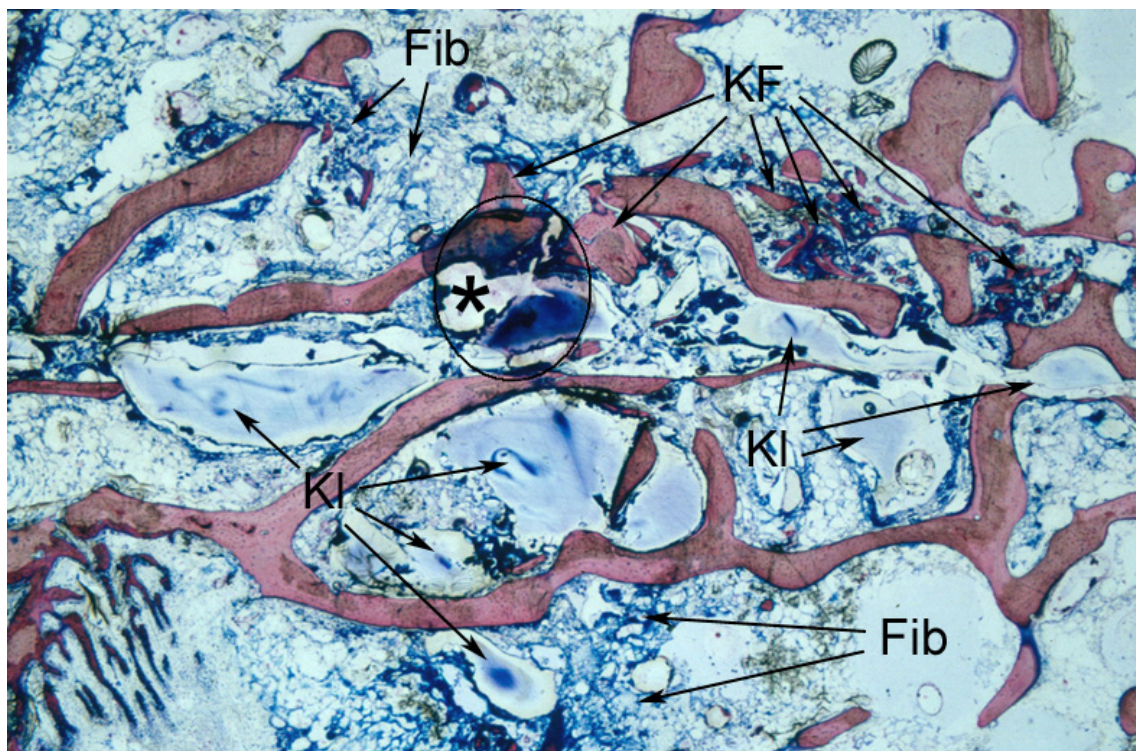


Abb. 71: 21 Tage-Klebstoffgruppe, 2. Serie. Frakturhämatom mit Knochenfragmenten (KF) und Fibrinnetzwerken (Fib) in der Osteotomiezone. Anfärbung des Klebstoffes (KI). Fixationsartefakt (Kreis - *). (Levai-Laczko, Vergrößerung 6,25 x).

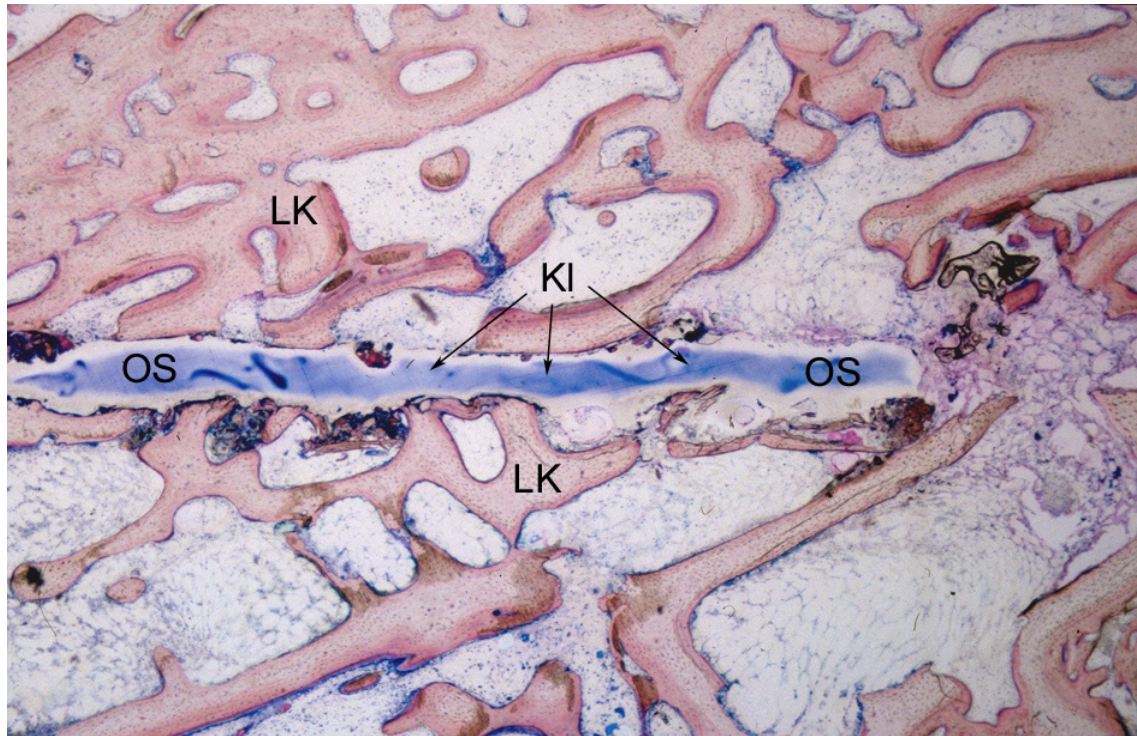


Abb. 72: 21 Tage-Klebstoffgruppe, 2. Serie. Osteotomiezone mit Knochenklebstoff (KI). Der Klebstoff liegt „bandförmig“ im Osteotomiespalt (OS). Eine Klebstoffresorption oder Knochenneubildung ist nicht sichtbar. Lagerknochen (LK). (Levai-Laczko, Vergrößerung 6,25 x).

Lediglich in klebstofffreien Arealen in der Nähe der Gelenkfläche oder am Übergang zur Diaphyse zeigt sich eine dezente Geflechtknochenbildung (Osteogenese).

Zusammenfassend zeigen sich 21 Tage nach Klebstoffapplikation keine Resorption oder Degradation des Knochenklebstoffes sowie eine ausbleibende Osteogenese und fehlende Überbrückung des Osteotomiespalt durch Geflechtknochen.

Lediglich physiologische Reaktionen durch den Osteotomievorgang innerhalb der Osteotomiezone sind zu erkennen. Hierzu gehören ein Frakturhämatom und die Bildung von Granulationsgewebe.

2.Serie – 42 Tage:

42 Tage nach Knochenklebstoffapplikation hat sich im Vergleich zur 21 Tagegruppe innerhalb des Osteotomiespalt nicht viel verändert. Resorptive Vorgänge sind nicht sichtbar. Die Osteotomieränder sind immer noch glatt und Osteoklasten sowie Osteoblasten sind fast nicht nachzuweisen (Abb. 73). Ebenfalls finden sich noch Fibrinablagerungen und Knochenfragmente im Osteotomiespalt.

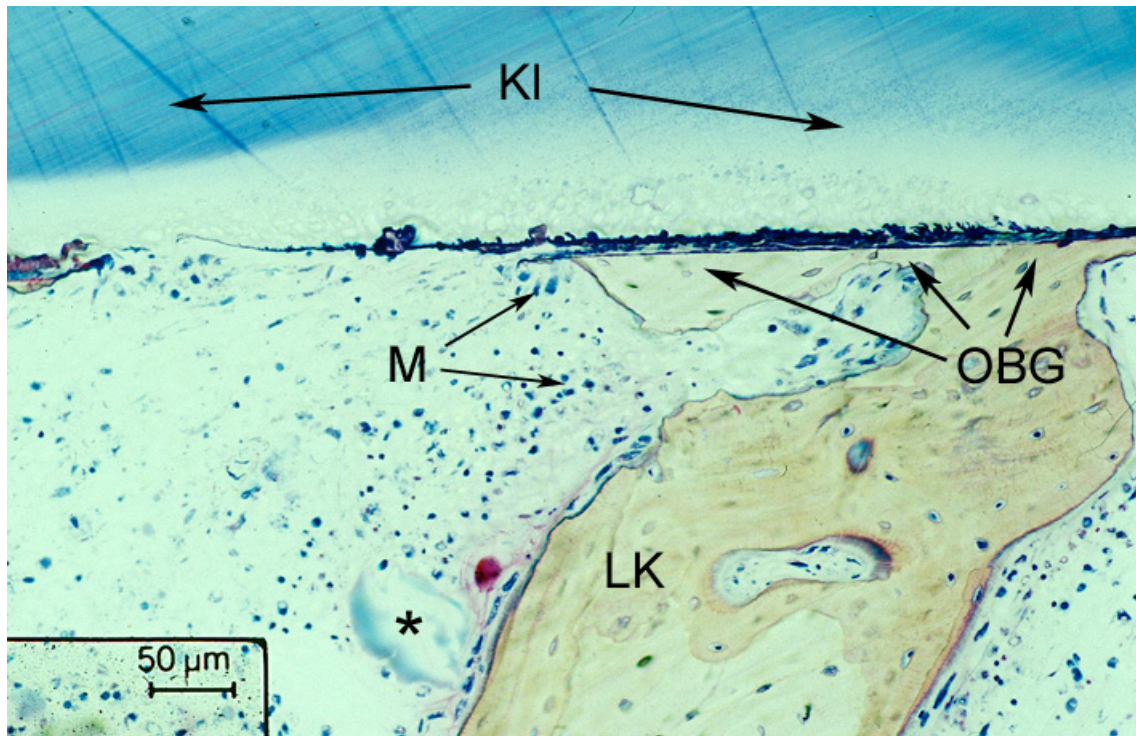


Abb. 73: 42 Tage-Klebstoffgruppe, 2. Serie. Knochen-Klebstoff-Interface (OBG - Osteotomiebegrenzung). Der Klebstoff (KI) wird nicht als Fremdkörper abgekapselt. Einzelne Makrophagen (M), keine Fremdkörperreaktionen, keine Knochenneubildung. Lagerknochen (LK). Fixationsartefakt (*). (Levai-Laczko, Vergrößerung 50 x).

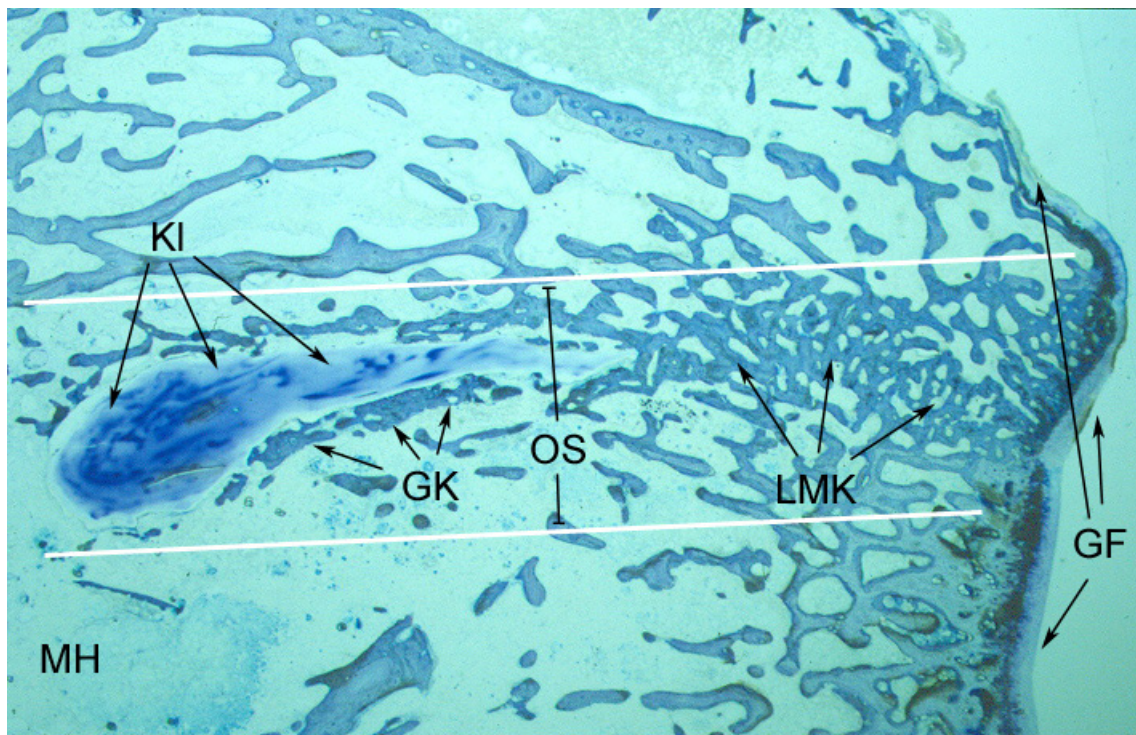


Abb. 74: 42 Tage-Klebstoffgruppe, 2. Serie. Der Klebstoff (KI) liegt „tropfenförmig“ im Osteotomiespalt (OS). In klebstofffreien Arealen hat eine Frakturheilung stattgefunden. Dort findet sich Lamellenknochen (LMK) oder zum Teil noch Geflechtknochen (GK). Rechts die Gelenkfläche (GF), links beginnend die Markhöhle (MH). (Toluidinblau, Vergrößerung 3,125 x).

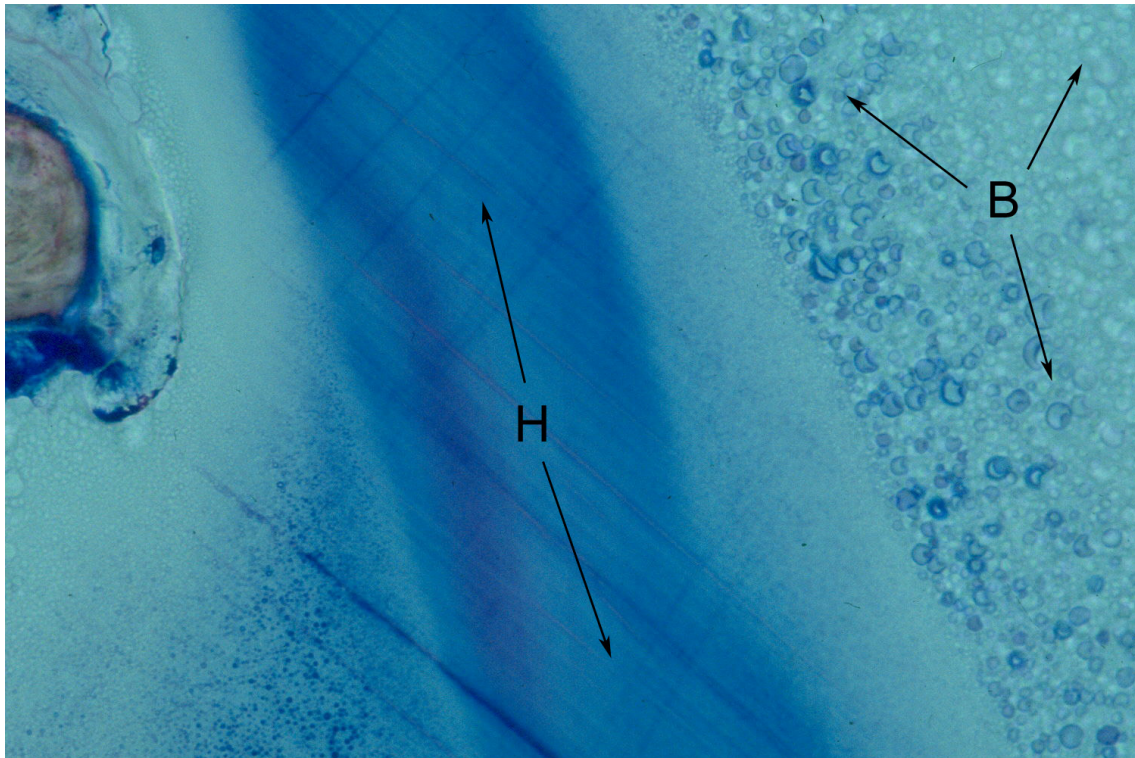


Abb. 75: 42 Tage-Klebstoffgruppe, 2. Serie. Binnenstruktur des Knochenklebstoffes. Homogen blaue Areale (H) in unterschiedlicher Blaufärbung (Färbeartefakt) sowie blasige Areale (B) prägen das Bild. (Levai-Laczko, Vergrößerung 100 x).

Der Klebstoff liegt immer noch als blaue homogene Masse im Osteotomiespalt (Abb. 74-75). In sehr engen Osteotomiezonon mit dichter Trabekelstruktur hat sich der Knochenklebstoff durch die Kompression der Zugschraube gleichmäßig im gesamten Osteotomiespalt verteilt. In seiner Struktur zeigt sich der Klebstoff immer noch, wie nach 21 Tagen, zum Teil als blasige Rundareale in den Randbereichen (Abb. 73, 75).

Ein anderes Bild zeigt sich bei einigen Präparaten. Hier ist die Trabekelstruktur weniger dicht und größere Bereiche der Kondyle gehören zur Markhöhle. Der Klebstoff liegt hier mittig im Osteotomiespalt. Meist in Form einer oder mehrerer rund kugeligter Strukturen (ähnlich wie Vakuolen). In einem Präparat sieht man den Klebstoff wie einen in die Osteotomie "geflossenen Tropfen" (Abb. 74). In diesen Präparaten hat sich der Klebstoff nicht durch die Kompression im Osteotomiespalt verteilt, sondern liegt dort vor Ort, wo er appliziert wurde. In diesen Präparaten zeigt sich in klebstofffreien Bereichen eine normale physiologische Frakturheilung. Man sieht hier nach 42 Tagen eine Osteotomieüberbrückung durch Geflechtknochen und einen Umbau in Lamellenknochen (Abb. 76).

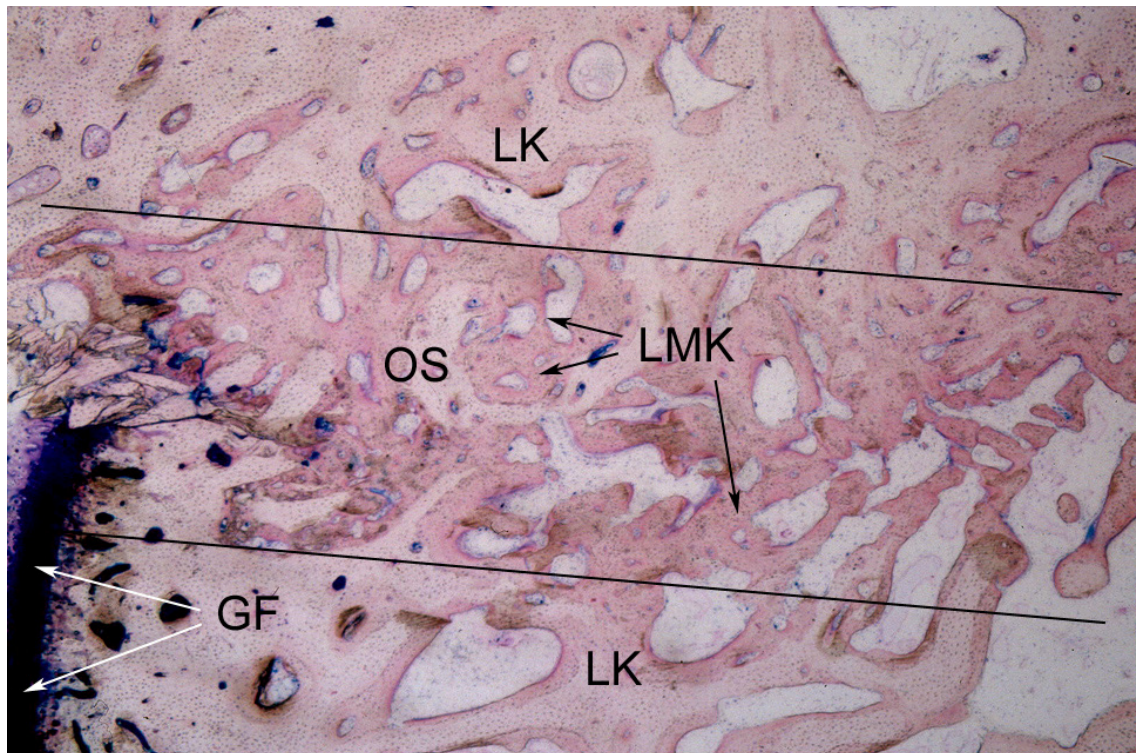


Abb. 76: 42 Tage-Klebstoffgruppe, 2. Serie. Der Randbereich der Femurkondyle ohne Klebstoffablagerungen zeigt eine vollständige Überbrückung des Osteotomiespalt (OS) durch Lamellenknochen (LMK) Lagerknochen (LK), Gelenkfläche (GF). (Levai-Laczko, Vergrößerung 6,25 x).

Diese Zonen finden sich besonders in den Randbereichen der Osteotomie nahe der Gelenkfläche sowie am Übergang zur Diaphyse. In den peripheren Schliften (besonders I und IX - siehe: Kapitel 3.12.4) ist teilweise ein völlig klebstofffreier Osteotomiespalt sichtbar, der komplett mit neu gebildetem Geflechtknochen überbrückt worden ist (Abb. 76).

Die Reaktion auf den Klebstoff ist die gleiche wie in der 21 Tage-Gruppe. Lediglich in einem Präparat, wo der Klebstoff als Tropfen direkt in der Markhöhle liegt, zeigt sich eine Entzündungsreaktion an den Randbereichen des Klebstoffes. Hier sieht man Makrophagen (Schaumzellen), mehrkernige Riesenzellen, Plasmazellen, Lymphozyten und Granulozyten. Der Klebstoff in seiner "Tropfenform" bietet in diesem Präparat, mitten in der Markhöhle, die größte Angriffsfläche für immunologische Reaktionen. In anderen Präparaten zeigen sich nur vereinzelt Makrophagen. Ansonsten findet keine oder eine mikroskopisch nicht ausreichend sichtbare Resorption und Degradation des Knochenklebstoffes statt. Der Knochenklebstoff liegt wie in der 21 Tage-Gruppe (2. Serie) als Barriere für die Osteo(neo)genese (Knochenneubildung) im Osteotomiespalt.

4.4.2 Rasterelektronenmikroskopie (REM)

Mit der Rasterelektronenmikroskopie (REM) als ergänzendes Untersuchungsverfahren wurden die Ergebnisse der Lichtmikroskopie der 1. Serie bestätigt und durch qualitativ hochwertige und hochauflösende Bilder ergänzt. Gerade bei der Knochenneubildung (Osteogenese) sind die verschiedenen Entwicklungsstufen des Knochens (von Geflechtknochen zum lamellären Knochen) durch unterschiedliche Graufärbungen und Schattierungen sehr anschaulich und sehr gut beurteilbar (Abb. 77-81). Leider gelang die genauere Differenzierung zwischen Klebstoff und umliegendem Gewebe (Granulationsgewebe, mesenchymalem Bindegewebe) sowie die genauere Analyse der Klebstoffstruktur nicht wie gewünscht. Aufgrund der ähnlichen strukturellen Oberflächeneigenschaften sowie der ähnlichen Substanzklassenzugehörigkeit zwischen dem Einbettmedium Technovit 7200® und dem Knochenklebstoff, erzeugten die Rückstrahlelektronen (BSE = back scattered electron) von der Probenoberfläche ein fast identisches Bild. Eine genauere Analyse des Klebstoffes und seines Strukturverhaltens bzw. der Degradation innerhalb des Spaltes konnte somit durch dieses elektronenmikroskopische Untersuchungsverfahren nicht getätigt werden.

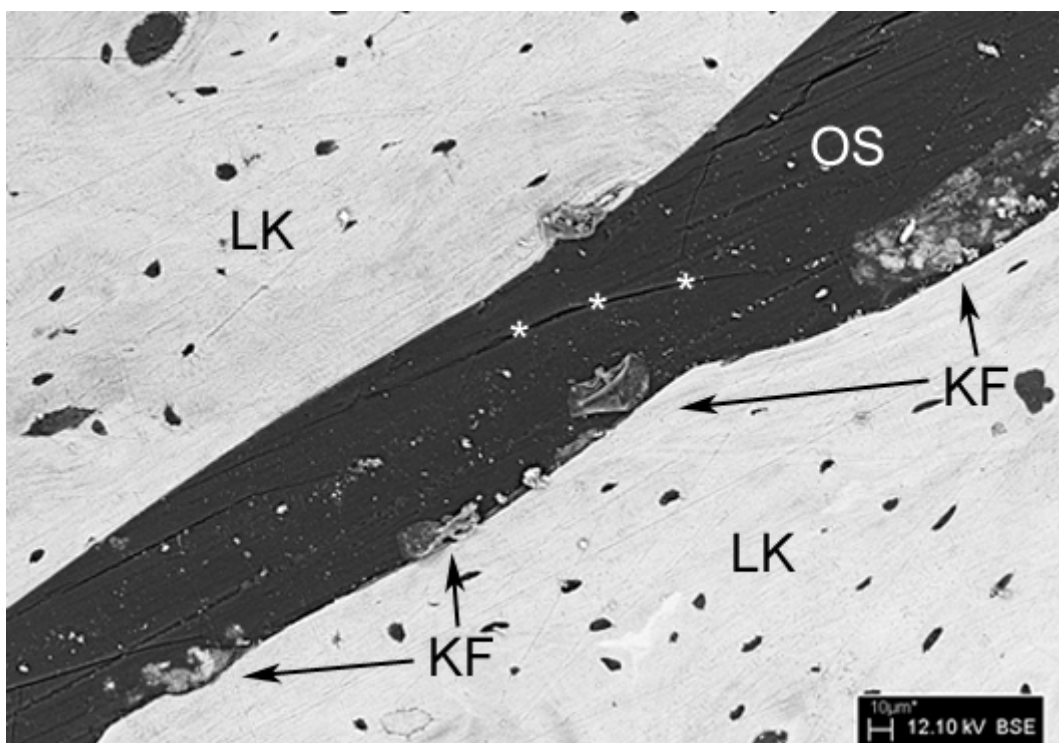


Abb. 77: REM 7 Tage-Kontrollgruppe. Osteotomiespalt (OS) mit glatten Osteotomie-rändern (LK - Lagerknochen) und Knochenfragmenten (KF) im Spalt. Durch die Einbettung künstlich bedingte strichförmige Strukturen (*) im Osteotomiespalt.

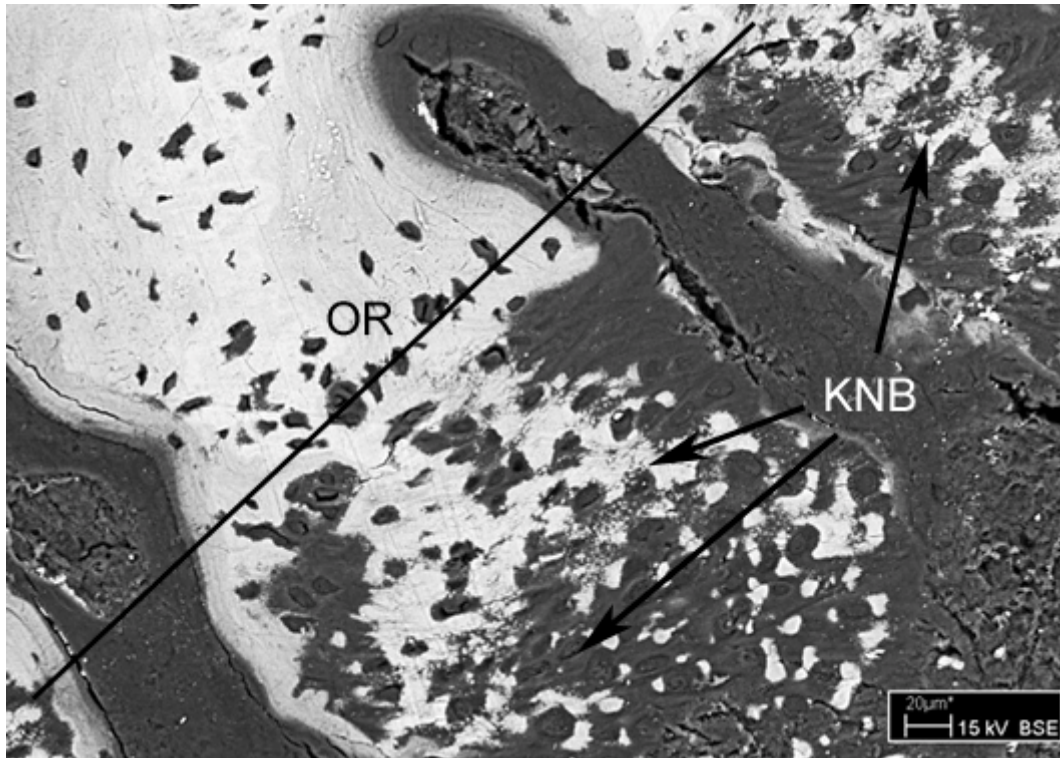


Abb. 78: REM 21 Tage-Klebstoffgruppe. Intensive Knochenneubildung (KNB) am Osteotomierand (OR). Es finden sich alle Knochenneubildungsstufen bis hin zum Faserknochen. Vereinzelt können Osteoblasten und Osteoidbildung beobachtet werden.

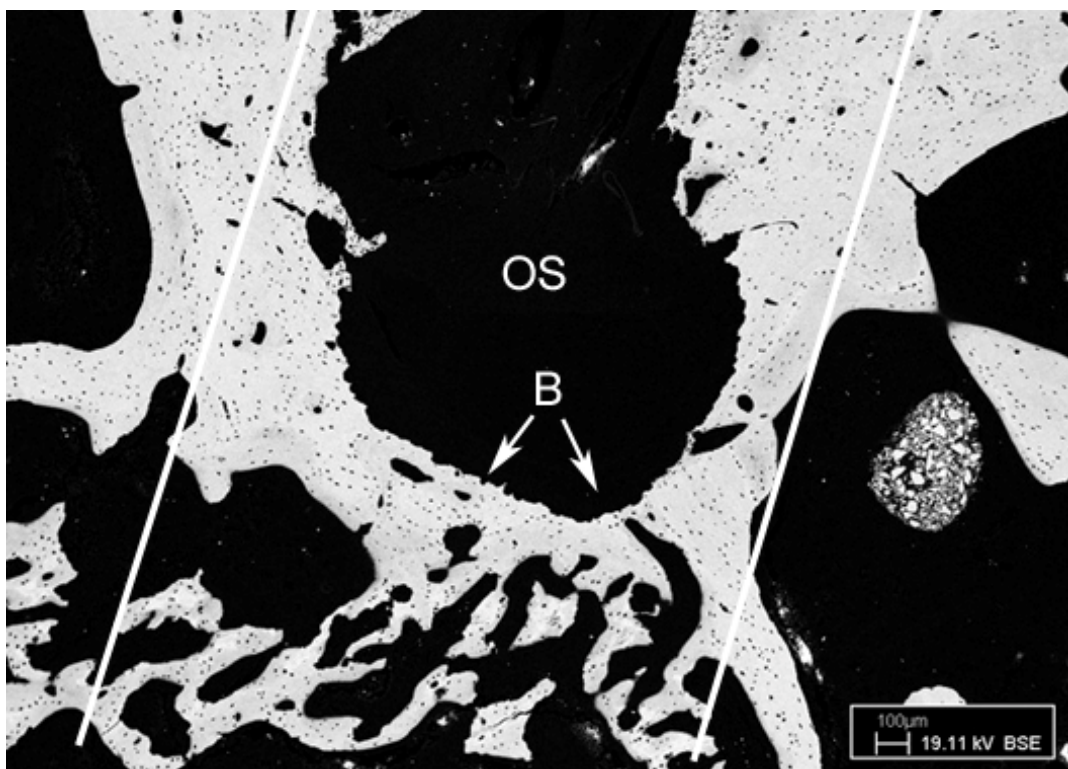


Abb. 79: REM 42 Tage-Klebstoffgruppe. Vertikal verlaufender Osteotomiespalt (OS) im ersten Osteotomiedrittel. Deutlich sichtbar ist eine Knochenbrücke „Bridging“ (B) aus Geflechtknochen, die den Osteotomiespalt überbrückt.

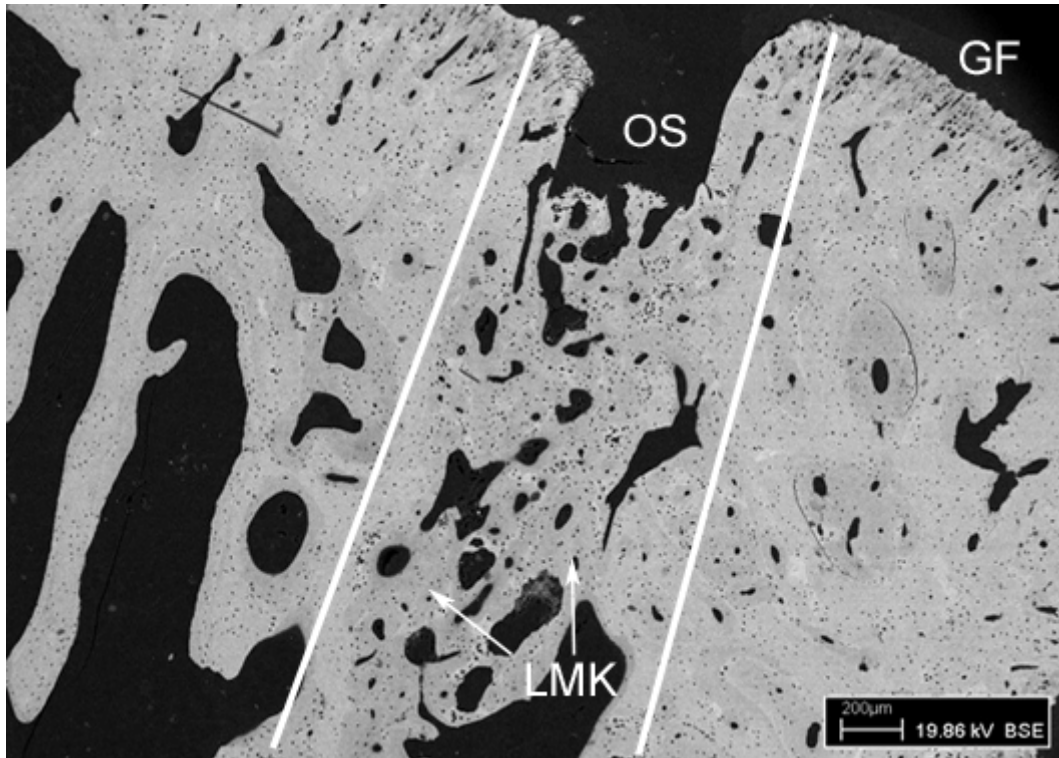


Abb. 80:REM 84 Tage-Klebstoffgruppe. Der Klebstoff ist resorbiert (degradiert) und der ehemalige Osteotomiespalt (OS) ist komplett mit Lamellenknochen (LMK) überbrückt. Lediglich im ersten Drittel an der Gelenkoberfläche (GF) sieht man noch eine Stufe und ein Ausbleiben von der Knochenneubildung.

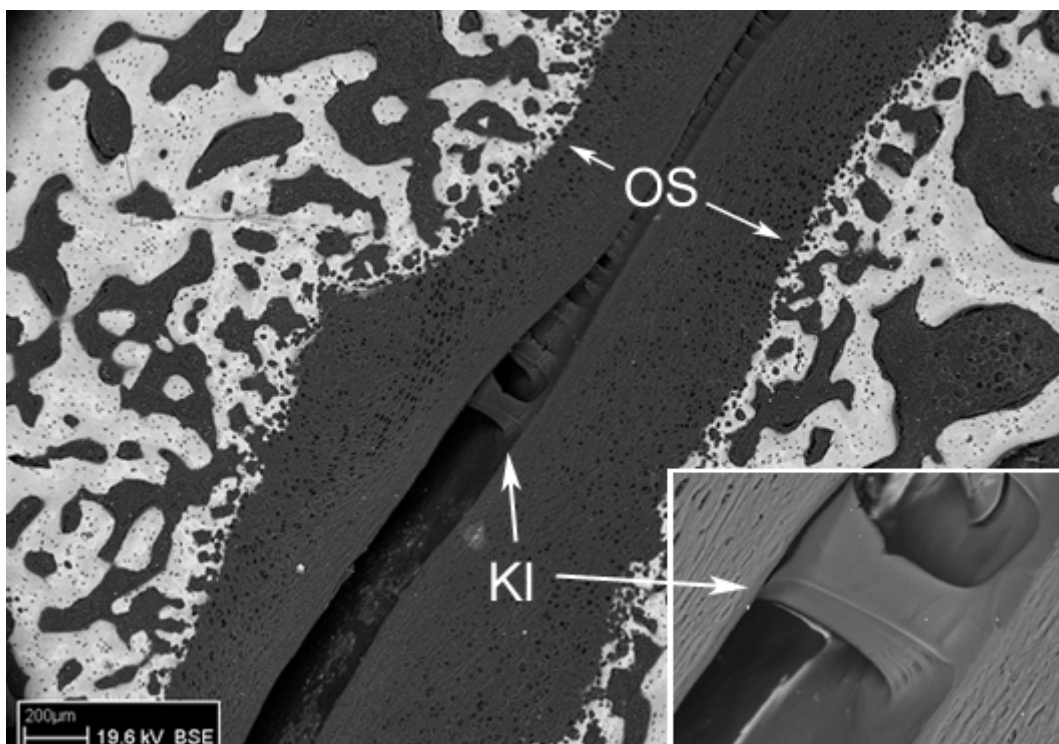


Abb. 81:REM 84 Tage-Klebstoffgruppe. Pseudarthrose durch Wanderung der Kirschner-Drähte und sekundärer Dislokation der lateralen Femurkondyle. Keine Knochenneubildung/Osteotomieüberbrückung. Der Klebstoff (KI) liegt unverändert (kleine Degradationsareale) innerhalb des Osteotomiespaltes (OS).

4.4.3 Transmissionselektronenmikroskopie (TEM)

Die Transmissionselektronenmikroskopie (TEM) fungierte wie die Rasterelektronenmikroskopie als ergänzende feingewebliche Untersuchung. Repräsentative Bilder aus der zweiten Klebstoffserie 21 Tage nach Applikation werden hier beschrieben und analysiert.

Ultrastruktur des Klebstoffes

Bei der Analyse der 84 Tage-Tiere aus der ersten Serie bestand die Schwierigkeit darin, den ehemaligen Osteotomiespalt zu finden. Da aber in der Klebstoff- sowie in der Kontrollgruppe der Osteotomiespalt gleichsam vollständig durchbaut war, gelang es im Semidünnschnitt bzw. im Ultradünnschnitt nicht den Osteotomiespalt oder die Übergänge zwischen alten Knochen (Lagerknochen) beidseits der Osteotomiezone ausfindig zu machen. Ganz anders gelingt dies in der Analyse der Präparate der zweiten Serie. Der Osteotomiespalt mit dem mittig liegenden Klebstoff ist hier schon deutlich in der Übersicht erkennbar. Der Klebstoff an sich zeigt sich wie in Abb. 82 als regelmäßige Masse mit unterschiedlich elektronendichten Vakuolen.

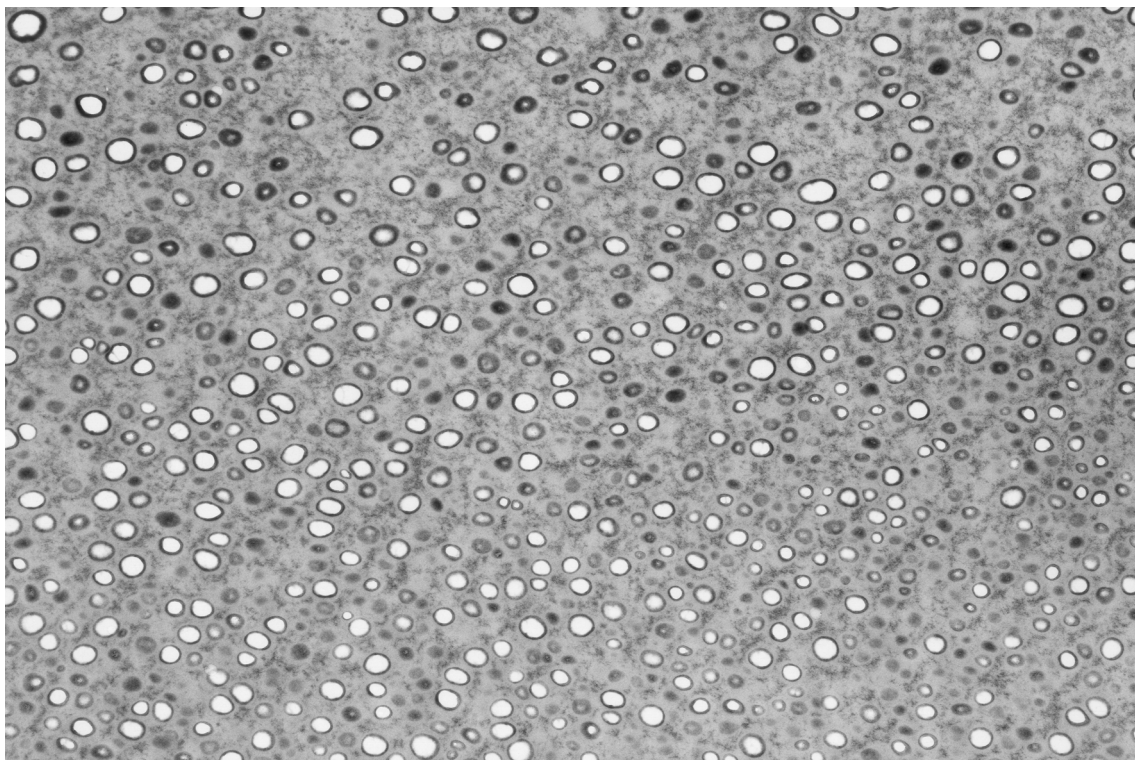


Abb. 82: TEM 21 Tage-Klebstoffgruppe. Knochenklebstoff in Osteotomiespaltmitte als homogene Masse mit unterschiedlich elektronendichten Vakuolen. (Vergrößerung 7797 x).

Man kann innerhalb dieser Vakuolen verschiedene Typen ausmachen. Maßgeblich ist hier die Elektronendichte der einzelnen Vakuolen, von elektronendicht bis hin zu optisch leer.

Die Abb. 83 als Vergrößerung aus Abb. 82 zeigt ein doch eher unregelmäßiges Bild. Die größeren Vakuolen scheinen elektronenoptisch leer mit einem elektronendichten Randsaum. Daneben finden sich teilweise unförmige kleinere runde Strukturen, welche insgesamt elektronendichter erscheinen.

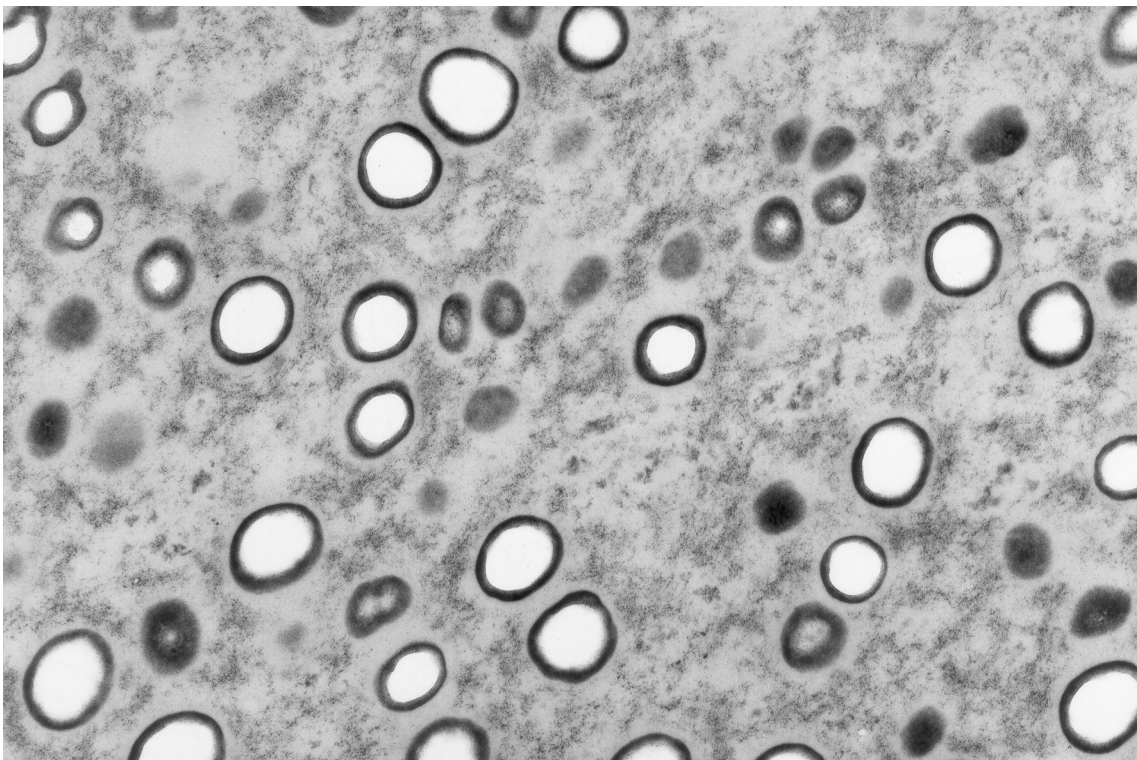


Abb. 83: TEM 21 Tage-Klebstoffgruppe. Vergrößerung aus Abb. 82. Unterschiedliche Typen von elektronendichten Vakuolen (elektronendicht bis optisch leer). (Vergrößerung 29371 x).

Zum Teil findet sich hier mittig eine geringere Elektronendichte. Die einzelnen Vakuolen sind in unterschiedlichen Ebenen angeschnitten und weichen daher im Erscheinungsbild voneinander ab. Die Matrix des Klebstoffes zeigt eine geringe Elektronendichte. In ihr befindet sich eine elektronendichte nanopartikuläre Körnung.

Zellulärer Abbau des Knochenklebstoffes

In Abb. 84 sieht man einen Makrophagen (M) in der Nähe eines, im Osteotomiespalt liegenden, Knochensplitters (KS). Splitter wie dieser, Knochenfragmente und

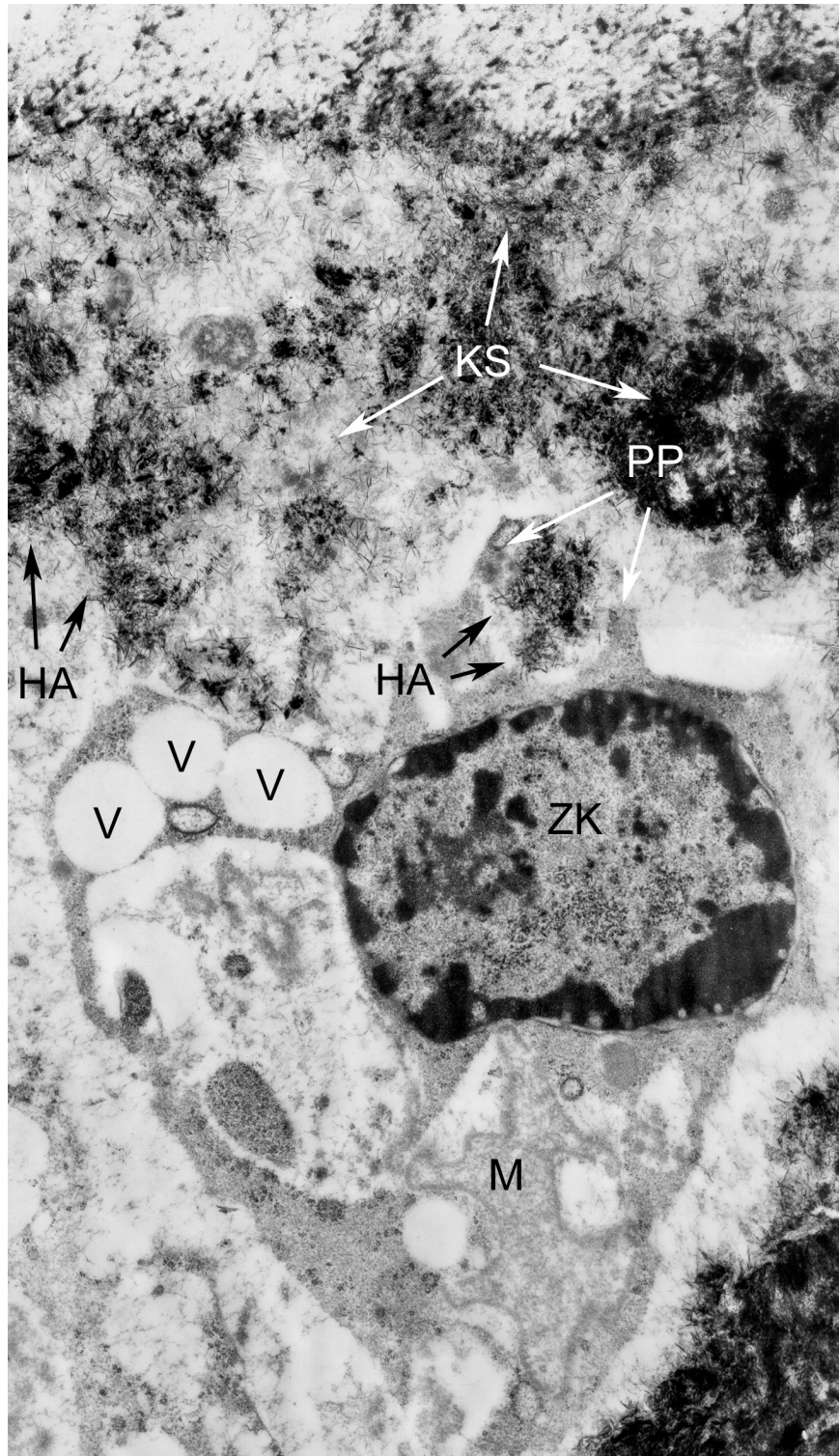


Abb. 84: TEM 21 Tage-Klebstoffgruppe. Phagozytose von Hydroxylapatit (HA) durch einen Makrophagen (M). Vakuolen (V), Pseudopodien (PP), Knochensplitter (KS), Zellkern (ZK). (Vergrößerung 15870 x).

Knochenmehl müssen von phagozytierenden Zellen wie Makrophagen oder Osteoklasten abgebaut werden, um freie Bereiche für die Knochenneubildung zu schaffen. Der einzelne Kern (ZK) unterscheidet ihn von den mehrkernigen Osteoklasten. Die heterochromatischen Kernanteile liegen kumuliert am Rand der inneren Kernmembran. Der Nucleolus ist deutlich sichtbar. Im Zytoplasma sind Mitochondrien und Ribosomen sichtbar.

Im Zytoplasma befinden sich mehrere Vakuolen (V). Man sieht die Phagozytose von Hydroxylapatit (HA) durch den Makrophagen. Ein kleiner Anteil des vorkommenden Hydroxylapatits wird von Pseudopodien umschlossen. Links oberhalb der markierten Vakuolen beginnt der Makrophage erst mit der "Umschließung" der zu phagozytierenden Anteile. Rechts oberhalb des Zellkerns ist die Aufnahme und Einschließung in eine Vakuole fast schon abgeschlossen (Abb. 84).

In den Abb. 85 und 86 sieht man die Phagozytose des Knochenklebstoffes (KI) durch Makrophagen (M). Abb. 85 zeigt einen Makrophagen in der Übersicht. Mittig liegt der elektronendichte Zellkern (ZK), dessen Heterochromatin kondensiert ist.

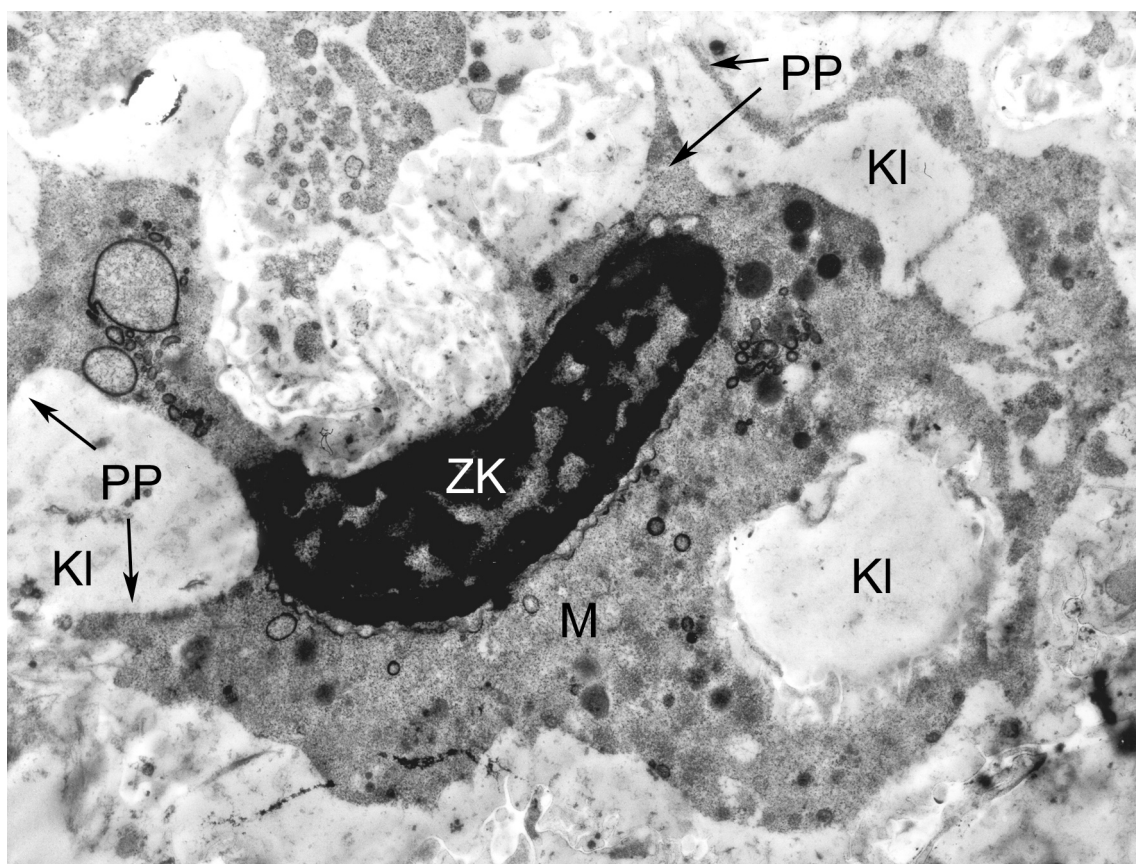


Abb. 85: TEM 21Tage-Klebstoffgruppe. Makrophage (M) mit phagozytiertem Klebstoff (KI) oder Gewebsflüssigkeit. Den Klebstoff umschließende Pseudopodien (PP). Zellkern (ZK) (Vergrößerung 11362 x).

Die äußere Kernmembran ist abgehoben. Im Zytoplasma sind Ribosomen und Lysosomen sichtbar. Da der Klebstoff eine sehr homogene Struktur aufweist, ist es teilweise schwierig, die Phagozytose von Gewebsflüssigkeit zerstörter Zellen von der Phagozytose von Knochenklebstoff zu unterscheiden.

Am rechten unteren Rand sieht man eine Vakuole (V) mit phagozytierten Klebstoffanteilen (KI). Links des Zellkerns, sowie rechts oberhalb des Zellkerns sieht man Zytoplasmafortsätze (Pseudopodien - PP), welche Knochenklebstoffanteile umschließen. Die Klebstoffstruktur ist unregelmäßig. Die intrazellulären Klebstoffstrukturen entsprechen den extrazellulären Strukturen.

In Abb. 86, einer Vergrößerung aus Abb. 85 (aber andere Schnittebene), können Vakuolen (V) mit Klebstoff und Gewebsflüssigkeit innerhalb eines Makrophagen (M) beobachtet werden.

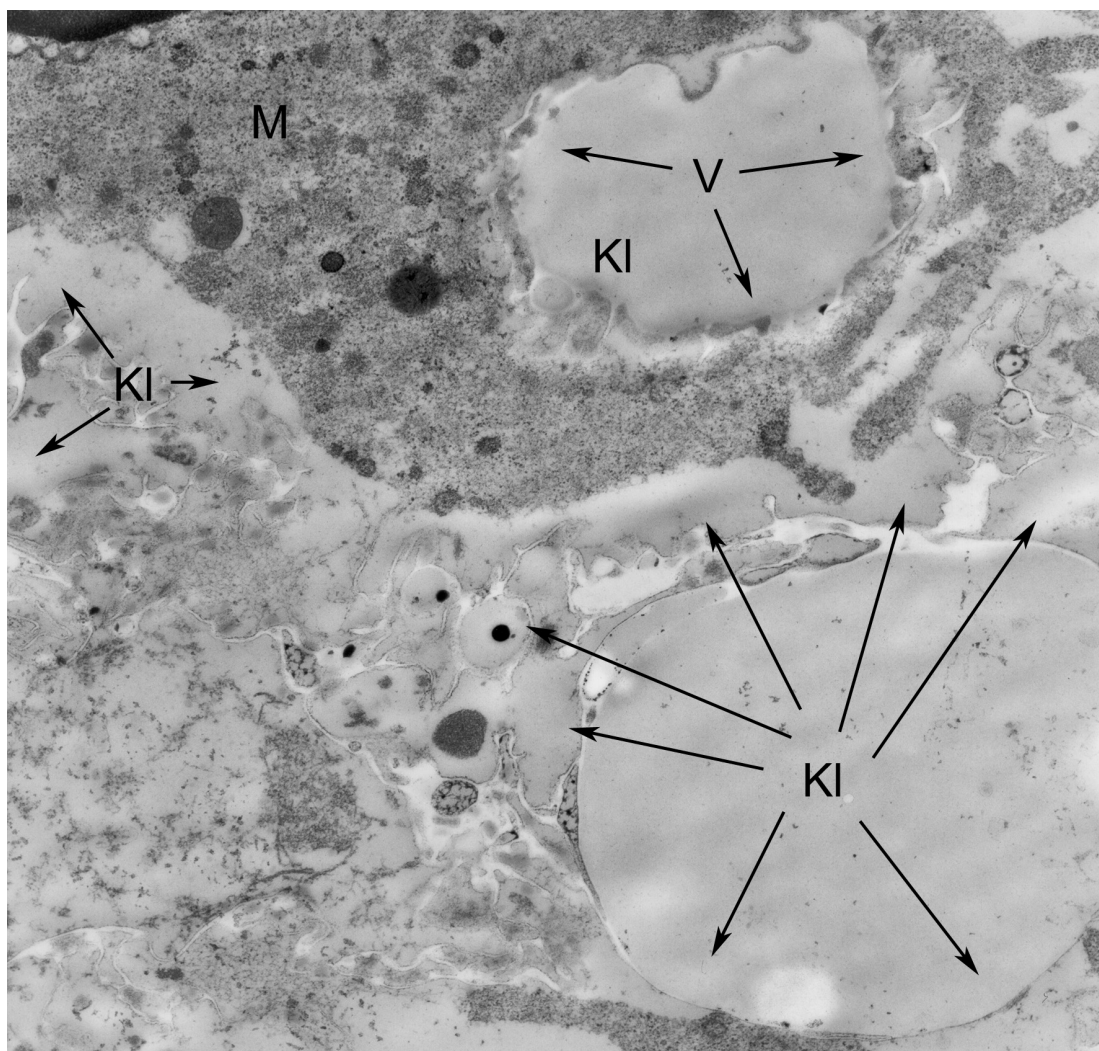


Abb. 86: TEM 21 Tage-Klebstoffgruppe. Vergrößerung aus Abb. 85 (andere Schnittebene). Phagozytierte Vakuolen (V) mit Klebstoff (KI) oder Gewebsflüssigkeit im Makrophagen (M). (Vergrößerung 15870 x).

Abb. 87 zeigt einen Zytoplasmaausschnitt einer mehrkernigen Riesenzelle. In der Vakuole (V) befinden sich mehrere "Klebstoff-Tropfen" mit unterschiedlichem Erscheinungsbild (rund-eckig, homogen-inhomogen). Zum einen sieht man zwei größere "Klebstoff-Tropfen" (Klebstoffanteile) mit einer elektronendichten Randstruktur, zum anderen zahlreiche kleinere mit einem eher homogenen Inhalt ohne elektronendichte Randstrukturen.

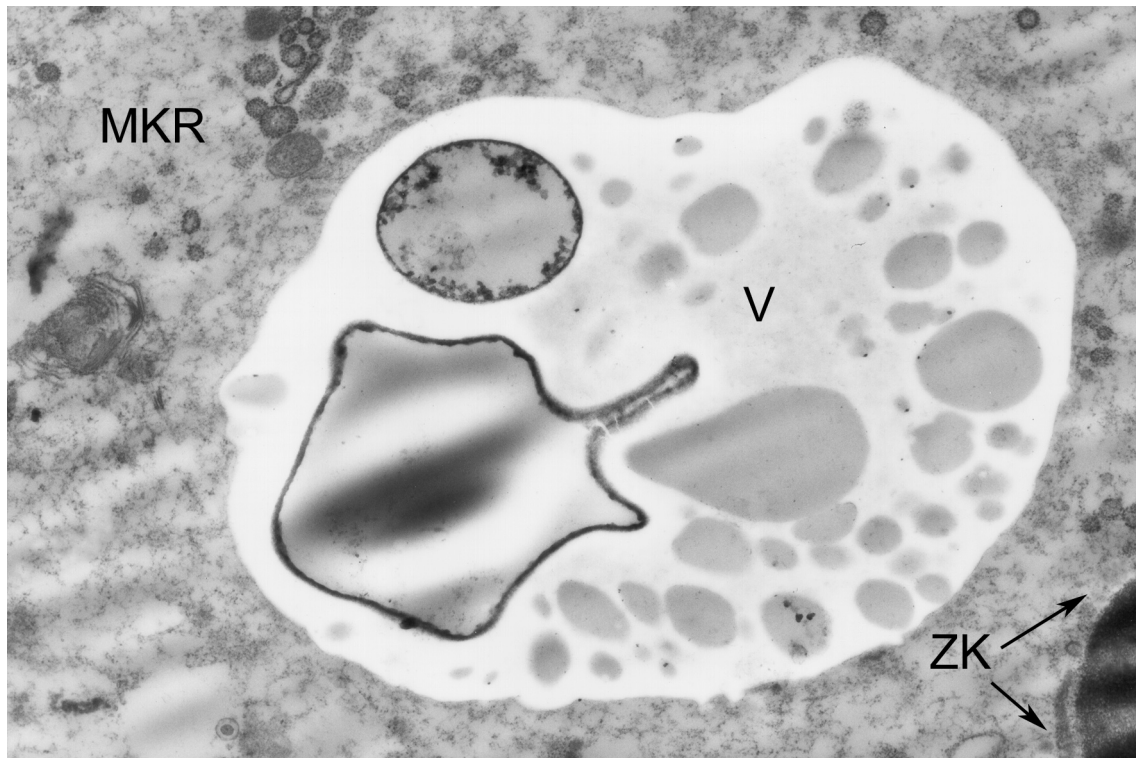


Abb. 87: TEM 21 Tage-Klebstoffgruppe. Zytoplasmaausschnitt einer mehrkernigen Riesenzelle (MKR). Vakuole (V) mit unterschiedlichen elektronendichten Strukturen. Klebstoff und Gewebsflüssigkeit. Zellkern (ZK). (Vergrößerung 15870 x).

Knochen-Klebstoff-Grenze

In Abb. 88 kann die Knochen-Klebstoff-Grenze am Rand der Osteotomie beobachtet werden. Der Knochenklebstoff ist als homogene Masse zu erkennen. Im unteren Bildanteil liegt der mäßig elektronendichte Lagerknochen (LK). Das Bindegewebe erscheint gering elektronendicht. Elektronendichter liegen die Hydroxylapatitkristalle (HA), als fein verzweigtes Netzwerk mit einem Durchmesser von 1,8 - 3,7 nm, vor. Auffallend ist hier der dunkle elektronendichte "Randsaum" an der Grenzfläche des Knochens zum Klebstoff. Er findet sich als homogen verdichtetes Band entlang der gesamten Knochen-Klebstoff-Grenze. Die feinen Hydroxylapatit-Kristalle des Lagerknochens können hier nicht mehr nachgewiesen werden.

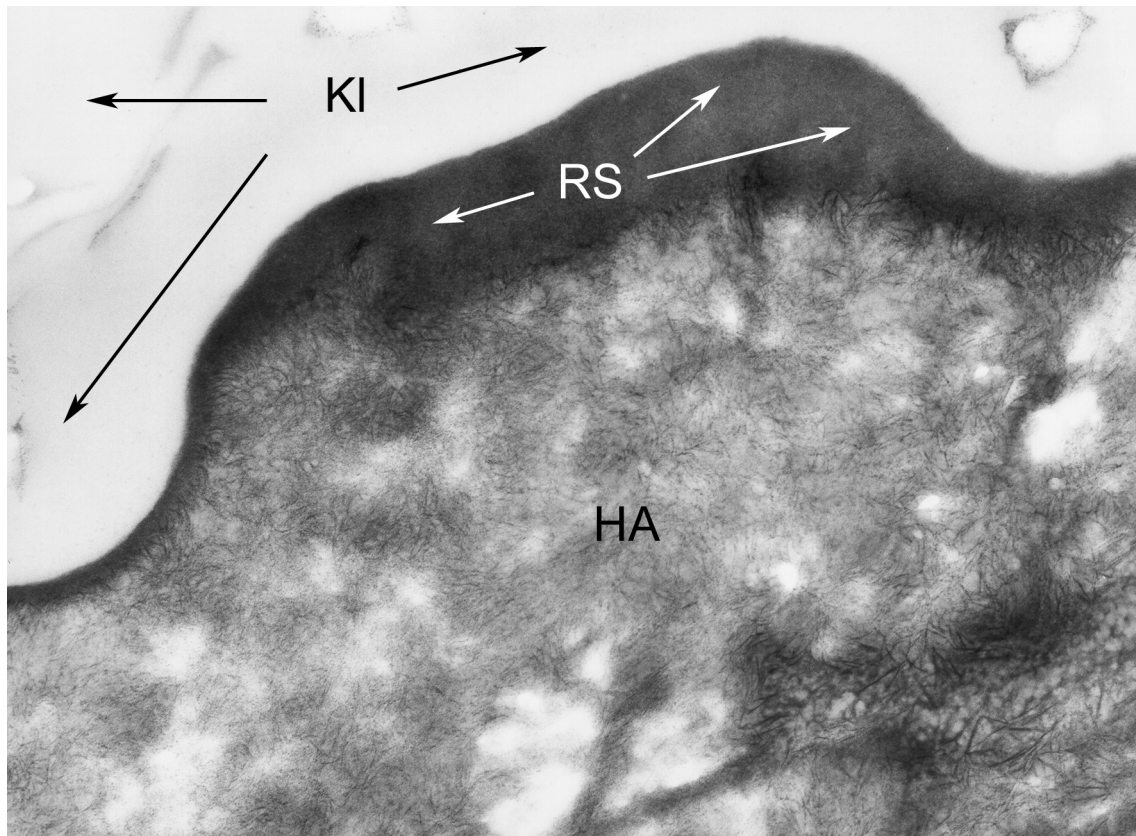


Abb. 88: TEM 21 Tage-Klebstoffgruppe. Knochen-Klebstoffgrenze mit dunklen elektronendichten Rändern, Knochenklebstoff (KI) und Hydroxylapatitkristalen (HA) des Lagerknochens. Randsaum (RS). (Vergrößerung 53314 x).

Beurteilung: Die Auswertung und Analyse der transmissionselektronenmikroskopischen Untersuchung in der zweiten Serie nach einer Applikationsphase von 3 Wochen zeigt den Klebstoff als homogene aber unterschiedlich elektronendichte Masse.

Der zelluläre Abbau des Knochenklebstoffes sowie der Abbau von Knochenfragmenten und Hydroxylapatit vollzieht sich über Makrophagen und mehrkernige Riesenzellen. Innerhalb dieser zeigt sich das unterschiedlich elektronendichte phagozytierte Material in multiplen Vakuolen. Schwierig ist die Unterscheidung zwischen phagozytiertem Klebstoff und phagozytierter Gewebsflüssigkeit, da beide Strukturen sich in der Transmissionselektronenmikroskopie als durchsichtige farblose Masse darstellen.

5 Diskussion

Bei der Anwendung eines körperfremden Klebesystems in der Chirurgie bedarf es verschiedener Voraussetzungen und Anforderungen an einen Knochenklebstoff. Diese wurden bereits im Einleitungsteil sowie Material- und Methodenteil beschrieben. Eine der wichtigsten Grundvoraussetzungen ist die Biokompatibilität des Materials, welche durch histologische, radiologische und elektronenmikroskopische Verfahren ausgewertet wurde. In nachfolgender Diskussion sollen die erzielten Ergebnisse kritisch analysiert und gewürdigt werden.

Biokompatibilität wird definiert als die Fähigkeit eines Materials, eine angemessene Gewebereaktion des Empfängers bei spezifischer Applikation zu erzeugen [150]. Dieser etwas abstrakte Begriff umfaßt mehrere Anforderungen an ein Material. Nach KAWAHARA [73] ist ein Material biokompatibel, wenn es weder toxisch, kanzerogen noch mutagen auf den Organismus wirkt. Es darf nicht zu einer Sensibilisierung führen und muß im Falle von Gewebsimplantaten adhäsiv für Zellen sein. Erfüllt ein Biomaterial diese Kriterien in idealer Weise, so dass keinerlei schädliche Wirkung von ihm ausgeht, so bezeichnet man es als "**inert**" bzw. als "**bioinert**" [54].

Als **bioaktive Materialien** werden solche bezeichnet, die körpereigenen Stoffen chemisch ähnlich sind und so zu einer physiologischen Integration in ein Gewebe führen. Dies wird z.B. bei Hydroxylapatit im Kontakt zum Knochen beobachtet [143]. Außerdem sollten diese Materialien in der Lage sein, eine Gewebsneubildung zu induzieren [98].

In Falle des vorgestellten Knochenklebstoffes entfällt die Integration ins Gewebe, da der Klebstoff im Körper abbaubar (degradierbar und resorbierbar) sein soll. Die Induktion einer Gewebsbildung (osteoinduktiv) hingegen wäre wünschenswert, aber nicht notwendig. Ziel sollte sein, die physiologische Frakturheilung nicht zu beeinträchtigen und keine Barriere für die Osteogenese und Zellmigration darzustellen.

Dagegen werden **biotolerante Materialien** als Reaktion auf ihre geringe Biokompatibilität meist bindegewebig eingeschleitet, ohne jedoch toxisch zu wirken [69]. Dies wäre bei fehlender Degradation des Knochenklebstoffes fatal für die folgende Frakturheilung. Der bindegewebige eingeschleite Knochenklebstoff innerhalb des Fraktur-/ Osteotomiespalt es würde somit die Frakturheilung behindern und im schlimmsten Falle zur Ausbildung einer Pseudarthrose führen.

Zu den Einzelbestandteilen des Knochenklebstoffes ist zu sagen, dass er überwiegend aus schon länger bekannten Materialien besteht. Milchsäure ist ein körpereigener Stoff, Ethylenglykol findet sich auch im menschlichen Organismus und Polymehtylmetacrylat (PMMA) bzw. Methylmethacrylat (MMA) wird bereits seit 1960 (erstmalig von CHARNLEY [24]) als Knochenzement (Palacos) eingesetzt.

Im Laufe der letzten 45 Jahre wurde diese Substanz hinreichend ausgetestet. Bekannter Nachteil ist bei Prothesen der Abrieb kleiner Partikel, die prothesennahe und -ferne Fremdkörperreaktionen auslösen können.

Die Anforderungen, die nun im Wesentlichen an den Knochenklebstoff gestellt werden, umfassen die Biokompatibilität nach KAWAHARA [73] sowie die Degradation des Knochenklebstoffes. Um die Biokompatibilität des neuentwickelten Knochenklebstoffes zu untersuchen wurde ein Frakturmodell (Osteotomie) am Kaninchen gewählt. Die Frakturheilung des Säugetiers unterscheidet sich grundsätzlich nicht von der des Menschen, womit das Kaninchen ideal für die vorliegende Fragestellung geeignet ist [149]. Sein Knochen ist zwar spröder als der humane Knochen, jedoch sind sich beide im Aufbau weitgehend ähnlich [30, 78]. Bei der Übertragung auf menschliche Verhältnisse muss jedoch zum einen die erheblich höhere Wachstumsgeschwindigkeit (Kaninchen : Mensch 40 : 1) und zum anderen die höhere Knochenumbaurate niedriger Spezies (beim Kaninchen: Faktor 17) berücksichtigt werden [35, 36, 71].

Zur Beantwortung der in der Fragestellung aufgeworfenen Problematik war es deshalb auch notwendig ein Versuchstier zu wählen, dessen anatomische Voraussetzungen es erlaubte, die Bedingungen einer Osteotomie/Fraktur und nachfolgender Stabilisierung derselben durch Kirschner-Drähte und Zugschrauben zu simulieren, die den Verhältnissen beim Menschen sehr nahe kommen.

Unter diesen Bedingungen wurde das Kaninchen als Versuchstier gewählt und in Analogie zum Menschen für die Versuchsdurchführung die Oberschenkelrolle (Femurkondyle) am Hinterlauf der Tiere als Frakturmodell.

Neben den sich gleichenden anatomischen Verhältnissen liegen bereits tierexperimentelle Erkenntnisse aus der Grundlagenforschung über die Umbauvorgänge hinsichtlich der normalen und gestörten Knochenbruchheilung beim Kaninchen vor [37, 56, 65]. Wichtige Erkenntnisse über die Knorpelregeneration und

die Heilvorgänge bei Gelenkfrakturen basieren ebenfalls auf tierexperimentellen Studien an Kaninchenfemora [92, 111].

Heilungsvorgänge (Osteogenese) von Gelenkfrakturen sind zwangsläufig mit der Fragestellung nach Reparation bzw. Regeneration des begleitenden Knorpelschadens assoziiert. Für diese spezielle Fragestellung nach Reparation bzw. Regeneration eines bradytrophen Gewebes ist der Zeitraffer beim Kaninchen ein wesentlicher Vorteil dieses Versuchsmodells, da somit die Möglichkeit gegeben ist, in einem überschaubaren Zeitraum alle relevanten histologischen und histomorphologischen Umbauvorgänge in fest definierten Zeitintervallen genau beobachten zu können.

Dies bedeutet: alle Umbauvorgänge am Knochen laufen in Form eines Zeitraffers, aber unter vergleichbaren Bedingungen wie beim Menschen, ab [92].

Ein weiterer Vorteil des Kaninchens als Versuchsmodell besteht darin, dass zahlreiche tierexperimentelle Untersuchungen und Ergebnisse zur Knochenbruchheilung des distalen Femurs am Kaninchen vorliegen. Dadurch konnten bereits in der Versuchsplanung Einfluss- und Störfaktoren ausreichend berücksichtigt und vermieden werden. Weiterhin spricht für das Kaninchen als Versuchstier, dass keine Allergien, Unverträglichkeiten, erhöhte Infektneigungen oder Abstoßungsreaktionen bei differenten Osteosynthesen und Werkstoffen bekannt sind [13, 14, 34]. Hinzu kommt, dass sich Kaninchen in der artgerechten Tierhaltung als wenig anspruchsvoll und widerstandsfähig gegenüber dem operativen Trauma zeigen.

Zur Standardisierung der Osteotomie bedurfte es eines einfachen, leicht reproduzierbaren Osteotomiemodells. Auf komplizierte Bruchverhältnisse wurde bewußt verzichtet, um Behandlungsverläufe und -ergebnisse vergleichen zu können. Unterschiedliche Bruchformen, Fragmentverschiebungen und damit differierende mechanische Bedingungen unter der Behandlung würden eine Vergleichbarkeit ausschließen.

Die laterale Femurkondyle wurde mittels einer kontinuierlich gekühlten oszillierenden Säge abgetrennt. Als erster warnte BLOCK 1929 [8] vor zu hoher Temperaturentwicklung. Um Knochennekrosen zu vermeiden wurden die detaillierten Untersuchungen von FUCHSBERGER 1987 [40] zum Einfluss der Kühlung mit physiologischer Kochsalzlösung auf die Temperaturentwicklung und Sägezeit strikt beachtet.

In der Literatur finden sich mehrer Berichte über Osteotomien am distalen Kaninchenfemur [13, 14, 92]. Es fehlen jedoch detaillierte Angaben über den Sägeansatzpunkt und die Sägerichtung. Diese Problematik ließ sich im vorliegenden Modell einfach lösen, indem das Sägeblatt in der Interkondylenregion angesetzt wurde und die Sägerichtung durch einen an der Knochen-Knorpel-Grenze platzierten Kirschnerdraht vorgegeben war. Auf diese Weise ließen sich standardisierte und reproduzierbare laterale Kondylenosteotomie des distalen Femurs erzeugen.

Die wesentlichen Vorteile dieses Tiermodells sind somit:

1. Die physiologische Frakturheilung von Femurkondylenosteotomien beim Kaninchen ist von seinen Abläufen her 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 physiologischen Heilungsvorgänge ermöglichen die Beurteilung einer kompletten Frakturheilung (Osteogenese) in relativ kurzer Zeit.

Bezüglich der **Diagnostik** wurden histologische, elektronenmikroskopische und radiologische Verfahren verwendet. Diese waren Durchlichtmikroskopie, Rasterelektronenmikroskopie und Transmissionselektronenmikroskopie. Radiologisch wurde neben dem Röntgen der operierten Femura in zwei Ebenen auch die Microcomputertomographie eingesetzt.

Die konventionelle Licht- oder Elektronenmikroskopie erlaubt nur die Darstellung von zweidimensionalen Bildern in Form von dünnen Scheiben oder eine Aufsicht auf eine Probenoberfläche. In den meisten Fällen kann eine Schlussfolgerung über dreidimensionale Objektstrukturen nicht anhand von zweidimensionalen Informationen getroffen werden. Man kann nur die Bilder (Schnitte) einzeln anschauen und die gewonnenen Informationen in ein dreidimensionales Strukturmodell interpolieren. Diese Methode ist aber sehr ungenau und unzuverlässig, da die Informationen zwischen den einzelnen Scheiben verloren gehen oder die Objektstruktur selbst bei der Präparation zerstört werden kann [68].

Die typische räumliche Auflösung eines konventionellen medizinischen Computertomographen liegt im Bereich von 1-2,5 mm, was einer 1-10 "cubic mm voxel" (Volumen Element) Größe entspricht. Die computergesteuerte Microcomputertomographie gibt uns nun aber die Möglichkeit, das räumliche Auflösungsvermögen deutlich zu verbessern. Das Micro-CT erlaubt die räumliche Darstellung bis zu 5 µm, welches einer 1×10^{-7} "cubic mm voxel" Größe entspricht [156].

1. Serie-Knochenklebstoff

Erwartungsgemäß zeigt sich zum Beobachtungszeitpunkt 7 Tage in der Licht- und Elektronenmikroskopie in beiden Gruppen das Bild einer frischen Osteotomie. Das Vorhandensein eines Frakturhämatoms, von Knochenfragmenten und dem Einwandern von Granulationsgewebe entspricht den physiologischen Abläufen einer Frakturheilung [19, 66, 133, 134]. Auch radiologisch wird diese Feststellung durch die 2D-3D Micro-CT-Untersuchungen und Röntgenaufnahmen bestätigt.

Diese zeigen in beiden Gruppen den deutlich sichtbaren Osteotomiespalt mit einer unterschiedlichen Spaltweite und unterschiedlich vielen Knochenfragmenten in den Osteotomiezonen. An den Randbereichen des Lagerknochens zeigt sich schon nach 7 Tagen in der Kontrollgruppe in einigen Präparaten eine beginnende Knochenneubildung (Osteogenese).

Es stellt sich hier die Frage nach der Form der Frakturheilung. Eine primäre Knochenheilung vom Typ der Kontaktheilung ist in beiden Gruppen nicht zu erwarten, auch wenn diese künstlich erzeugte Fraktur (Osteotomie) mit ihren glatten Osteotomierändern und der erfolgten Osteosynthese die idealen Voraussetzungen dafür bieten würde [101]. Zum einen ist in der Knochenklebstoff- und Kontrollgruppe der Osteotomiespalt zu breit, um diese Form der Frakturheilung zu begünstigen, zum anderen ist der Knochenklebstoff in seiner anfänglichen Aufgabe als adhäsives System eine Barriere für direkte Interaktionen zwischen den beiden Knochenenden. Darüber hinaus wird zumindest in der ersten Serie durch die Fixation der lateralen Femurkondyle mittels zweier Kirschner-Drähte keine absolut belastungsstabile Osteosynthese und damit stabile Osteotomiezone geschaffen. Diese ist aber Voraussetzung für eine Kontaktheilung (primäre Knochenbruchheilung). Dies

bestätigen auch die unterschiedlichen Knochenneubildungsformen (Spaltheilung und sekundäre Frakturheilung) in der 21 Tage-Gruppe.

Die Kaninchen konnten direkt postoperativ das operierte Bein wieder belasten, auch wenn am Anfang eine Schonhaltung durch einen Dreibeinlauf vorlag, wie sie bei Vierfüßlern physiologisch ist. Es ist also von einer Belastung der Osteotomiezonen direkt postoperativ auszugehen.

Es kommt im Rahmen der Heilung der Femurkondylenosteotomie zu keiner oder nur minimalen Kallusbildung. Periostalen oder endostalen Kallus, wie man ihn bei einer klassischen sekundären Frakturheilung erwarten würde, kann man im Bereich der Femurkondyle und auch am Übergang der Kondylenregion zur Diaphyse nicht sehen. Interfragmentär entstehender Faserknorpel oder faseriges Bindegewebe ist in keinem Präparat der 7 Tage-Gruppe sichtbar. Das Vorkommen würde für eine sekundäre Knochenbruchheilung sprechen [149]. Da im Bereich des Osteotomiespaltes nur minimal Knorpelgewebe auftritt, kann zum Beobachtungszeitpunkt von 7 Tagen von einer weitgehend primären Knochenheilung vom Typ der Spaltheilung gesprochen werden. Eine eindeutige Abgrenzung zu einer sekundären Knochenbruchheilung ist aber nur schwer möglich, da beide Heilungstypen auf die intermediäre Bildung von Geflechtknochen hinauslaufen. Kennzeichnend für die sekundäre Frakturheilung ist aber unter anderen die fehlende Stabilität der Osteotomie [61, 77, 117].

Die Gewebsreaktion auf die erzeugte Fraktur (Osteotomie) ist in beiden Gruppen ähnlich schwach, wobei die "resorptive" Reaktion (Resorption von Fibrin, Zelltrümmern, Knochensplittern und auch Klebstoff) in der Klebstoffgruppe etwas ausgeprägter ist als in der Kontrollgruppe. Somit zeigt sich hier schon zu Beginn ein stärkerer Reiz durch den Knochenklebstoff auf den Organismus. Dieser beschränkt sich in der Klebstoffgruppe auf einzelne Infiltrate ein- und mehrkerniger Phagozyten (Makrophagen, mehrkernige Fremdkörperriesenzellen), Histiozyten sowie Schaumzellen. Dieses Zellbild wäre im Falle einer Entzündungsreaktion am ehesten mit einer granulomatösen Entzündung (Fremdkörpergranulom) in Einklang zu bringen. Es fehlt aber das massive Auftreten von Lymphozyten, das Einschließen des Fremdkörpers (hier der Knochenklebstoff) durch mehrkernige Riesenzellen sowie die periphere Fibrosierung (bindegewebige Einscheidung) [133].

Eine subakute, akute oder subchronische Entzündung, welche meist einen raschen Krankheitsverlauf von Stunden oder Tagen aufweist, ist in unseren Untersuchungen nicht zu beobachten und somit nicht gegeben. Ein entsprechendes Zellbild, vor allem auch mit einer großen Anzahl von Leukozyten, ist zum Zeitpunkt von 7 Tagen in der Klebstoffgruppe nicht zu sehen [19, 133, 134]. Auch eine lokale Entzündung des operierten Gelenkes mit Hyperthermie und Hyperämie (Nekrose) innerhalb der ersten sieben Tage konnte durch Beobachtungen und tägliche Untersuchungen der Tiere sicher ausgeschlossen werden. Das allgemeine Verhalten der Tiere zeigte auch keinen Anhalt für Fieber, Sepsis oder sonstige Entzündungsvorgänge.

Die zum Zeitpunkt von **7 Tagen** in der Klebstoffgruppe beschriebenen Schaumzellen lassen sich normalerweise nur als Einlagerung von Cholesterin und Cholesterinestern in Makrophagen und andere Mesenchymzellen (z.B. glatte Muskelzellen) nachweisen [19]. Da es aber bei den Kaninchen nicht zu einer pathologisch hohen Cholesterinzufuhr gekommen ist und sich die Schaumzellen immer in Knochenklebstoffnähe finden, kann man davon ausgehen, dass es sich bei den phagozytierten Bestandteilen um Knochenklebstoffanteile handelt. Ähnliche histologische Phänomene finden sich bei Gelenkprothesen mit PVC-Inlets, deren Abrieb lymphogen verschleppt wird sowie bei exogener Zufuhr von Silikonpartikeln (z.B. aus Mammaprothesen oder aus Schlauchsystemen bei chronischer Hämodialyse). In diesen Fällen findet man eine Fremdkörperreaktion in den regionären Lymphknoten bzw. nach parenteraler Zufuhr eine systemische Silikonablagerung in Milz, Leber und Knochenmark mit Ansammlungen von Makrophagen und Riesenzellen mit einem vakuolisierten Zytoplasma, welches ein farbloses amorphes, teilweise feingranuläres Material enthält [133].

In der Transmissionselektronenmikroskopie kann für die zweite Tier-Serie gezeigt werden, dass auch Klebstoffbestandteile phagozytiert werden. Es finden sich hier Makrophagen in Klebstoffnähe, die Klebstoffbestandteile mit Zytoplasmaausläufern (Pseudopodien) umschließen und als Vakuole (Phagosom) aufnehmen.

Weiterhin lässt sich die Phagozytose durch mehrkernige Riesenzellen nachweisen. Der direkte Nachweis der Klebstoff-Phagozytose kann nur in der 2. Serie gezeigt werden, da in der ersten Serie transmissionselektronenmikroskopische Aufnahmen nur zum Zeitpunkt von 84 Tagen angefertigt wurden. In diesen Präparaten sowie den gefertigten Semidünnschnitten ist es aber nicht mehr möglich die Osteotomiezon

eindeutig zu identifizieren, da die Frakturheilung bereits abgeschlossen und der Klebstoff vollständig resorbiert und degradiert worden ist. Die weiteren histologischen Verlaufsbeobachtungen lassen aber auch auf eine Klebstoff-Phagozytose innerhalb der ersten Serie schließen.

Bezüglich der Biokompatibilität kann man festhalten, dass der Klebstoffabbau (Degradation) in der ersten Serie wie erwartet nicht nur durch einen einfachen chemischen Abbau des Klebstoffnetzwerkes abläuft. Die Abbaugeschwindigkeit des Klebstoffes ist *in vivo* schneller als bei den *in vitro* Testung in Soerensen Puffer (pH = 7.4) bei 37° C. Dies spricht für eine Akzeleration des Klebstoffabbaus in der ersten Serie durch zusätzliche Faktoren. Dies wäre hier eine Phagozytose des Klebstoffes durch oben genannte Zellpopulationen (Makrophagen, Riesenzellen und Schaumzellen). Diese zentrale Beobachtung wird im weiteren Verlauf der Diskussion zu allen Untersuchungszeitpunkten weiter gestützt und bestätigt. Somit liegt neben der Degradation des Klebers auch eine Resorption vor.

Auffallend ist in der Klebstoffgruppe das unterschiedliche Verteilungsmuster des Knochenstoffs. In einigen Präparaten liegt der Klebstoff als bandförmige, den gesamten Osteotomiespalt durchziehende Struktur vor. Dies spricht für ein sehr gleichmäßiges Auftragen des Klebstoffes und eine sehr exakte vorausgegangene Spülung und Trocknung des Osteotomiespales. Auch die Kompression durch die Repositionszange erfolgte hier gleichmäßig über die gesamte Osteotomiefläche und zeigt sich durch eine gleichmäßige Spaltbreite über die gesamte Osteotomiezone. In anderen Präparaten sieht man Knochenklebstoff wiederum durchmischt mit Fibrin, wobei sich das Fibrin "retikulär" im Osteotomiespalt aufspannt.

STEIN [127] sowie GIEBEL und RIMPLER [43] beschreiben in ihren Versuchen ein Abfließen von zu dünnflüssigem Klebstoff in feine Knochenspalten und eine Lösung des Klebstoffes durch nachsickernde Flüssigkeit. Dies wäre bei Präparaten mit schwacher Trabekelstruktur und großer Markhöhle möglich. Hier kann sich der Klebstoff in der Markhöhle verteilen und mit Blut vermischen. Bei Tieren mit dichter Trabekelstruktur in der Femurcondyle bleibt der Klebstoff hingegen nur als ganze Masse im Osteotomiespalt liegen. Da nach ca. 60 Sekunden das Aushärten des Klebstoffes beginnt, muss es bei diesen Tieren schon während der Applikation zu einer gewissen Durchmischung des Klebstoffes mit Blut gekommen sein, um diese Fibrin-Klebstoff-Strukturen zu erzeugen. Eine ungleichmäßige Kompression oder

auch eine mengenmäßig unterschiedliche Applikation hat hier möglicherweise zu unterschiedlichem Auftreten des Klebstoffes im Osteotomiespalt sowie zu verschiedenen Repositionsergebnissen geführt. Daneben konnte man radiologisch unterschiedlich breite Osteotomiezonen erkennen.

Ein auf den angefertigten Röntgenaufnahmen gering nach cranial disloziertes Kondylenfragment muss als primär ungenügende oder ungenaue Reposition angesehen werden. Da auf sämtlichen Röntgenbildern die Kirschner-Drähte vergleichbar horizontal liegen scheidet somit eine sekundäre Lockerung (Instabilität) aus. Eine sekundäre Instabilität ließe sich durch eine Verschiebung der Kirschner-Drähte in einem Winkel größer 0 Grad zur Horizontalen erklären, da die reponierte Femurkondyle bei Belastung nach cranial abgleitet.

In der **21 Tage-Gruppe** kann sowohl in der Klebstoff- als auch in der Kontrollgruppe die Bildung von Geflechtknochen beobachtet werden. Erste Überbrückungen „Bridging“ des Osteotomiespalt durch Knochentrabekel sind in beiden Gruppen vorhanden. Der Knochenklebstoff stellt somit keine Barriere dar, eine Zellmigration für die beginnende Frakturheilung (Osteogenese) ist gewährleistet. Die Frakturheilung verläuft hier wie bereits in der 7 Tage-Gruppe als Spaltheilung (primäre Frakturheilung).

Auffallend ist zu diesem Beobachtungszeitpunkt, dass in mehreren Präparaten der Kontroll- und Klebstoffgruppe der Osteotomiespalt fast komplett mit hyalinem Knorpel überbrückt ist. SCHENK und WILLENEGGER [114, 115, 116, 149] beschreiben eine Bindegewebisdifferenzierung als Folge einer Instabilität.

Durch fehlende oder partielle Immobilisierung der Osteotomie kommt es zum Auftreten von Binde- und Knorpelgewebe im Osteotomiespalt. Diese Vorgänge tragen zu einer zunehmenden Versteifung der Osteotomie bei, welche die unter einer Belastung auftretenden interfragmentären Bewegungen zunehmend kompensieren. Ein intermediäres Stützgewebe verankert sich in den Osteotomieenden, welches durch fortschreitende Ossifikationsprozesse eingemauert wird.

Im Gegensatz zu SCHENK und WILLENEGGER [114, 115, 116, 149] findet sich jedoch anstatt Faserknorpel fast nur hyaliner Knorpel im Osteotomiespalt. Minimale Anteile zellarmen Faserknorpels erkennt man nur im distalen Bereich (Richtung Gelenkfläche) der Osteotomie zusammen mit faserigem Bindegewebe.

STÜRMER [129] beschreibt die Notwendigkeit von 2 Voraussetzungen für die Heilung von spongiösem Knochen. Zur Ausbildung eines Mikrokallus und zarten Faserknochenbrücken zwischen den Spongiosabälkchen der reponierten Knochen bedarf es einer Impaktierung und einer relativ hohen intrafragmentären Ruhe. Ist dies durch die Kirschnerdraht- und Klebstoffosteosynthese nicht gegeben, kann eine Fraktur rasch zur bindegewebigen Abdeckelung und zu einer Pseudarthrose führen.

Somit ist bei dem hier verwendeten Osteosyntheseverfahren und der postoperativen Belastung von einer relativen Instabilität auszugehen. Man spricht von so genannten „Microbewegungen“ („micro motion“) im Osteotomiespalt, die zu oben genanntem Auftreten von hyalinem Knorpel führen. Bei diesen Tieren finden wir durchgehend eine sekundäre Knochenheilung über faseriges Bindegewebe, Faserknorpel, hyalinen Knorpel und Faserknochen (Geflechtknochen) [114, 115, 116, 149].

Interessanterweise findet sich bei diesen Tieren außer dem beschriebenen Knorpel fast kein Klebstoff im Osteotomiespalt. Eine mögliche Erklärung für dieses Phänomen wäre eine Lösung des Klebstoffes von den Osteotomieändern und eine beschleunigte Resorption bzw. Degradation. Phagozytierende Zellen sind in diesen Präparaten ebenfalls fast nicht zu sehen, so dass hier von einer vollständigen Degradation ausgegangen werden muss.

Demgegenüber ist bei allen anderen Tieren der Klebstoffgruppe noch Knochenklebstoff im Osteotomiespalt zu sehen. Im Unterschied zu den Befunden nach 7 Tagen, in denen der applizierte Knochenklebstoff als durchgehendes Band im Osteotomiespalt nachweisbar war, lassen sich nur noch einzelne klar umschriebene Klebstoffareale erkennen. Die beginnende Überbrückung des Osteotomiespaltes sowie das verminderte Erscheinen des Klebstoffes sprechen deutlich für die Degradation des Klebstoffes.

In vitro Degradations-Testungen in Soerensen Puffer (pH = 7,4) bei 37° C zeigen nach 3 Wochen eine Degradation des Klebstoffes um 15-20%, so dass bei reiner Klebstoffdegradation (ohne Phagozytose) nur noch 80-85% des Ausgangsvolumens vorliegen würden. Der Knochenklebstoff wird hierbei durch Hydrolyse seiner Esterverbindungen in seine Einzelbestandteile zerlegt. Milchsäure und Ethylenglycol werden im Zitronensäurezyklus verstoffwechselt und als Kohlendioxid und Wasser aus dem Stoffwechsel eliminiert. Die größeren Moleküle der Methacrylsäure

beschreibt WENZ [147] als hoch wasserlösliche Oligomere und Polymere, die durch stereometrische Hemmung ein Molekulargewicht von kleiner 8.000 g/mol haben und somit über die Niere ausgeschieden werden können.

SCHMIDT und THEWS [118] beschreiben folgende Siebkoeffizienten ([Konzentration] Filtrat/ [Konzentration] Plasma) für die gesunde Niere:

Inulin, Molekulargewicht 5.500 - Siebkoeffizient 0,98; *Myoglobin*, Molekulargewicht 17.000 - Siebkoeffizient 0,75.

Ist ein Molekulargewicht kleiner 8.000 g/mol (Dalton) gegeben, so kann von einer fast vollständigen Ausscheidung der verbleibenden Methacrylsäure über die Nieren ausgegangen werden.

Die im Osteotomiespalt vorliegende Klebstoffmasse ist aber deutlich geringer als die in Soerensen Puffer getestete Degradation auf 80-85% des Ausgangsvolumens. Somit muss der Klebstoffabbau durch weitere Faktoren beschleunigt worden sein.

Das Vorkommen von Makrophagen, Schaumzellen und mehrkernigen Riesenzellen in und um den Osteotomiespalt spricht für die zelluläre Resorption des Klebstoffes. Da sich die Anzahl der phagozytierenden Zellen im Gegensatz zur 7 Tage Gruppe nach 21 Tagen erhöht hat, kann man von einer gesteigerten Reaktion bzw. einer erhöhten Resorptionsrate des Knochenklebstoffes sprechen.

Bei Klebstoffen wie den Cyanoacrylaten und dem PMMA wurden zwar oftmals gute Klebeeigenschaften beschrieben, jedoch zeigt sich bei den meisten Versuchen ein zu geringer Abbau bzw. Degradation des Klebstoffes. Einige Arbeitsgruppen berichteten bei der Verwendung von Cyanoacrylaten von einer kompletten zellulären Resorption [44, 45, 76, 127, 138], andere Arbeitsgruppen berichten von einer Gewebspersistenz des Klebstoffes von vier Monaten bis zu zwei Jahren [1, 82, 121, 152, 153].

PMMA (Palacos®) wird beispielsweise im Körper nicht abgebaut [60, 155]. Der in unserer experimentellen Untersuchung verwendete Klebstoff erfüllt im Unterschied zu den oben beschriebenen die geforderte Degradation und Resorption.

Ein weiteres Problem bestand bei vorausgehenden Versuchen mit anderen Klebesystemen in der Toxizität der Monomere und Polymere auf das umliegende Gewebe [1, 26, 43, 55, 82, 110, 121, 152, 153]. In umfangreichen Zellkulturversuchen konnten zelltoxische Reaktionen sicher ausgeschlossen werden.

Darüber hinaus wurden bei einigen Polymeren-Klebesystemen hohe Temperaturen während des Auspolymerisierens beschrieben. Bei Palacos® sind Wärmespitzen bis zu 96° Celsius beschrieben worden [20]. Bei dem hier verwendeten neuartigen bioresorbierbaren Knochenklebstoff tritt keine derart hohe Temperatur auf. Die maximale Temperatur beträgt etwa 45° C.

Zusammenfassend kann man bei den vorliegenden zellulären Reaktionen nach 7 und 21 Tagen von einer minimalen benignen Fremdkörperreaktion sprechen, die dem Abbau (Resorption und Degradation) des Knochenklebstoffes dient, sonst aber keine weiteren Entzündungsreaktionen unterhält. Entsprechende Ergebnisse und Beobachtungen wurden auch bei der Anwendung von Polymethylmethacrylaten (PMMA) beschrieben [128].

Zwar liegt die Klebstoffgruppe gegenüber der Kontrollgruppe in den Bereichen der Knochenneubildung und Resorption zurück, aber diese Verzögerung ist bedingt durch die Notwendigkeit den vorhandenen Knochenklebstoff abzubauen, um freie Bereiche für die Knochenneubildung zu schaffen. So gesehen ist der Knochenklebstoff anfänglich schon als eine Barriere für die Fraktur-/Defektheilung der Osteotomie zu sehen, die aber durch Abbauvorgänge des Klebstoffes sukzessiv verringert wird. Somit verschwindet die Barriere und es entsteht Platz für die physiologische Frakturheilung und Zellmigration.

Die **42 Tage** Kontrollgruppe zeigt den Abschluß der ersten Phase der Frakturheilung. Die Osteotomiezonen sind mit Geflechtknochen komplett überbrückt und durchbaut, welcher zum Teil schon in Lamellenknochen umgebaut ist. In der zweiten Phase kommt es zum kompletten Umbau in Lamellenknochen. Laut JOHNER [65] kommt ein solcher Umbau nur langsam voran. Er beginnt frühestens in der zweiten Woche nach dem Osteotomieereignis. Der gesamte Umbau führt erst nach vielen Monaten zu einer Integration der untergeordneten Regeneratstrukturen in die Längsstruktur der Kortikalis.

Verglichen mit dem vorausgegangenen Beobachtungszeitpunkt (21 Tage) zeigt sich nach 42 Tagen ein ähnliches Bild zwischen Klebstoff- und Kontrollgruppe. Die Frakturheilung ist in der Kontrollgruppe weiter vorangeschritten als in der Klebstoffgruppe. Es kann eine Verzögerung der Osteogenese beobachtet werden,

wobei sich Vorsprung der Kontrollgruppe im Vergleich zum Zeitpunkt von 7 Tagen weiter verringert.

Auch zwischen den einzelnen Tieren innerhalb der Klebstoffgruppe zeigt sich eine unterschiedlich weit fortgeschrittene Frakturheilung. Dies lässt sich anhand folgender Ursachen erklären. Zum einen sind die Tiere unterschiedlich groß, deren Femurkondylen zeigen somit deutliche Unterschiede im Umfang und Durchmesser. In der Lichtmikroskopie können unterschiedlich stark ausgeprägte Trabekelstrukturen erkannt werden. Bei großen Tieren finden sich eine größere Markhöhle und weniger Trabekel in der Mitte der Osteotomien.

Weiterhin wurde keine definierte Menge an Klebstoff in den Osteotomiespalt appliziert. Die Menge der Klebstoffapplikation richtete sich subjektiv nach der Osteotomiegröße. Somit ergibt sich bei größerer Klebstoffmenge auch eine längere Resorptions- und Degradationszeit.

Der Zeitpunkt 42 Tage bildet somit gerade in der Klebstoffgruppe einen Übergang zwischen den resorptiven Vorgängen (Klebstoff, Knochenbruchteile) und den reparativen Vorgängen (Knochenneubildung). Dies zeigt sich vor allem in der Schwankungsbreite der unterschiedlich weit vorangeschrittenen Frakturheilung.

Der Klebstoffabbau zeigt in den *in vitro* Testungen in Soerensen Puffer nach 42 Tagen einen Abbau von etwa 22%, auf 78% des applizierten Ausgangsvolumens [147]. Da aber der Klebstoff bis in einigen Schliffen nicht mehr sichtbar ist, kann man von einer weit vorangeschrittenen Degradation sprechen, die deutlich schneller als der *in vitro* getestete Abbau vorangeht.

In der Klebstoffgruppe ist eine vollständige Überbrückungen des Spaltes sichtbar. Entsprechend den Beobachtungen zum Zeitpunkt von 21 Tagen lässt sich folgern, dass der Klebstoff nach fast vollständiger Degradation keine Barriere für die Frakturheilung darstellt.

Anhand des zellulären Bildes sieht man, dass weiterhin ein immunologischer Reiz durch den Klebstoff gegeben ist. Da das Zellbild jedoch schon mengenmäßig weniger stark ausgeprägt ist als zum Zeitpunkt von 21 Tagen, kann man von einem Abklingen der zellulären Abbauvorgänge sprechen. Besonders die Verminderung der Schaumzellen lässt sich mit dem weitgehenden Abbau des Klebstoffes in Einklang bringen.

In allen Präparaten der Kontrollgruppe finden sich keine oder nur eine geringe Anzahl von Makrophagen, Riesenzellen, Histiozyten oder Lymphozyten. Demzufolge kann wie bei den beiden vorausgegangenen Beobachtungszeitpunkten (7 und 21 Tage) eine vollkommene physiologische Knochenheilung ohne störende Einflüsse oder ausgeprägte Entzündungszeichen beobachtet werden.

Nach insgesamt **84 Tagen** ist die Frakturheilung abgeschlossen. In beiden Gruppen (Klebstoff- und Kontrollgruppe) kann eine vollkommen mit Lamellenknochen durchbaute Osteotomiezone beobachtet werden.

Zum Zeitpunkt von 84 Tagen zeigt sich bei der *in vitro* Degradations-Testung in Soerensen Puffer eine Verminderung des Klebstoffes auf 70% der ehemals applizierten Gesamtmenge. In den vorliegenden Präparaten ist der Knochenklebstoff im Osteotomiespalt nicht mehr sichtbar. Dies spricht zum einen für eine Degradation des Klebstoffes durch Hydrolyse des polymeren Klebstoffnetzwerkes und Verstoffwechselung bzw. Ausscheidung der Einzelbestandteile. Zum anderen müssen weitere Klebstoffanteile durch andere Stoffwechselvorgänge abgebaut worden sein, was indirekt für einen Abbau durch Makrophagen und mehrkernige Riesenzellen spricht. Für eine komplette Resorption bzw. Degradation des Klebstoffes spricht auch, dass sich nun in der Klebstoffgruppe keine mehrkernigen Riesenzellen mehr finden. Makrophagen, Lymphozyten und Mastzellen sind nur noch vereinzelt sichtbar. Somit sind ausgeprägte Entzündungsreaktionen auch zu diesem späten Zeitpunkt der Frakturheilung nicht sichtbar. Der Knochenklebstoff zeigt eine gute Biokompatibilität.

Eine chronische Entzündung, welche primär mit nur sehr geringen Symptomen einhergeht und sich über einen längeren Zeitraum (Monate bis Jahre) erstrecken, ist ebenfalls nicht sichtbar. Es zeigt sich keine dafür typische atrophische oder hypertrophische Gewebsreaktion. Auch hat eine vollständige Ausheilung stattgefunden, welche bei einer chronischen Entzündung zumeist ausbleibt [19, 66, 133, 134].

Aussagen über späte Dislokationen, wie sie von TKACHENKO und RUTSKI [138] sowie MUELLER [95] bei der Verwendung von PMMA als Knochenklebstoff beschrieben wurden, können nicht gemacht werden, da die Osteotomien durch zwei Kirschnerdrähte stabilisiert wurden. Bei drei Tieren aus der Klebstoffgruppe findet sich aber zum Beobachtungszeitpunkt (84 Tage) eine Pseudarthrose. Der Osteotomiespalt ist mit Bindegewebe aufgefüllt, Klebstoffreste sind zum Teil sichtbar. Die Tiere der 84 Tage-Gruppe wurden als erste operiert und somit ist zu berücksichtigen, dass sich der Operateur am Anfang einer „Learning-Phase“ bezüglich der Operationsmethode befand.

Bis auf die Tiere der 84 Tage-Gruppe wurde durchgängig das Ende der Kirschnerdrähte umgebogen. Folge der nicht umgebogenen Drähte war ein Wandern (Penetrieren) der Kirschnerdrähte, eine Instabilität und die daraus resultierende Pseudarthrose. Die Klebefestigkeit (Verbundfestigkeit) und Biomechanik waren eigentlich nicht Bestandteil dieser Untersuchung. Vorausblickend auf nachfolgende Studien zeigt sich aber hier ein interessantes Ergebnis. Die Tiere konnten postoperativ das Bein sofort belasten. Trotz des anfänglichen Dreibeinlaufs sind die nicht umgebogenen Kirschnerdrähte wahrscheinlich durch die Belastung gewandert bzw. die reponierte laterale Femurkondyle ist sekundär disloziert. Auch konnte dies die Klebung nicht verhindern. Aus diesen Beobachtungen kann man schlussfolgern, dass der getestete Knochenklebstoff zumindest nicht in der Hauptbelastungszone einer Osteotomie ohne Osteosynthese einsetzbar ist. Er zeigt dort bei unmittelbarer postoperativer Belastung keine ausreichende Stabilität. Resultat ist hier eine Pseudarthrose. Weiteres gilt es in Folgearbeiten bezüglich der Biomechanik zu überprüfen.

Diese sekundären Dislokationen sind bei vorliegendem Studiendesign nicht mit denen zu vergleichen, wie sie bei der Verwendung von Fibrinklebersystemen, Cyanoacrylaten und PMMA auch beschrieben wurden [25, 38, 95, 138].

Hiervon deutlich zu unterscheiden ist auch die direkt postoperativ radiologisch sichtbare nach cranial versetzte Kondyle bei primär ungenügender oder ungenauer Reposition.

Natürlich kann aus so einer kleinen Stichprobe keine Aussage über die adhäsiven Fähigkeiten gemacht werden, aber sie sollte hinweisend für nachfolgende biomechanische Untersuchungen sein. Gerade da sich in der 21 Tage-Gruppe

verschiedene Knochenheilungsformen, bedingt durch eine Instabilität, zeigen und in der 84 Tagegruppe Pseudarthrosen zu beobachten sind.

2. Serie Knochenklebstoff

In der 2. Serie finden sich grundlegend veränderte Versuchsbedingungen. Anstatt der zwei Kirschnerdrähte wurden nun eine Spongiaschraube und ein Kirschnerdraht platziert. Hierdurch soll eine stabile Osteosynthese erreicht werden, wodurch eine größere interfragmentäre Stabilität (Ruhe im Osteotomiespalt bei Belastung) durch eine vermehrte Kompression auf die Osteotomie gewährleistet werden soll. Durch die Schraube wird eine exakte Reposition mit aufeinander liegenden Osteotomieflächen (enger Osteotomiespalt) erreicht. Da aber der Klebstoff im Osteotomiespalt liegt, kann es zunächst, wie auch in der ersten Serie, keine direkte Interaktion zwischen beiden Osteotomieflächen geben. Eine primäre Knochenheilung vom Typ der Kontaktheilung kann also auch hier nicht beobachtet werden.

In der 2. Serie kann man erhebliche Probleme bezüglich der **Biokompatibilität** des Knochenklebstoffes feststellen. Die Klebungen wurden mit einer veränderten Zusammensetzung der Klebstoffbestandteile durchgeführt. Das Co-Monomer des Klebstoffes wurde ausgetauscht, um einen etwas zähflüssigeren Klebstoff zu erhalten, der von operationstechnischer Seite her leichter zu verarbeiten war. Die Abbaueigenschaften *in vitro* gleichen denen des Klebstoffes aus der 1. Serie. Die Folgen des ausgetauschten Co-Monomers sind aber veränderte *in vivo* Eigenschaften des Klebstoffes. Diese führen in den folgenden Beobachtungszeiträumen zu einem völlig unterschiedlichen Verhalten des Klebstoffes der 2. Serie im Vergleich zur 1. Serie.

Zum ersten Beobachtungszeitpunkt nach **21 Tagen** ist auffallend, dass der Klebstoff als blaugefärbte Masse sichtbar im Osteotomiespalt liegt. In der ersten Serie ist dieses Verhalten nicht zu erkennen. Diese Blaufärbung des Klebstoffes zeigt sich sowohl in den Toluidinblau, als auch in den Levai-Laczko gefärbten Präparaten. Sämtliche Labormethoden bezüglich der Probenaufarbeitung, Präparateherstellung und Färbung sind nicht verändert worden. Warum sich der Klebstoff letztendlich hier

anfärbt bleibt unklar. Möglicherweise entsteht diese Farbveränderung erst durch die Färbung der Knochenschliffe. Der Klebstoff ist in seinen Einzelkomponenten und auch in auspolymerisierter Form durchsichtig. Auch in den ungefärbten Schliffpräparaten ist keine Färbung zu sehen. Demzufolge muss der Klebstoff der 2. Serie eine veränderte Struktur oder Oberflächenstruktur im Gegensatz zur 1. Charge aufweisen, die eine Färbung zulässt.

Durch diese Färbung wird ein weiteres Problem des Klebstoffes deutlich sichtbar. Im Gegensatz zur ersten Serie, wo man zum Zeitpunkt von 21 Tagen schon eine Degradation des Klebstoffes, Organisation der Fragmente und eine beginnende Knochenneubildung sieht, liegt der Klebstoff in der 2. Serie als reaktionslose blaue Masse vor. Der Knochenklebstoff beeinflusst sämtliche Abbauprozesse, die in der ersten Serie sichtbar sind. Es zeigt sich nur eine geringe Resorption der Fragmente, der Knochenklebstoff wird nur spärlich degradiert und es findet keine Knochenneubildung statt. Weiterhin liegen auch fast keine Zellen wie Makrophagen, Riesenzellen oder Schaumzellen in Klebstoffnähe vor. Deren Erscheinen ist jedoch typisch für den Abbau des Klebstoffes, wie in Serie 1 gezeigt werden konnte.

In der Transmissionselektronenmikroskopie sieht man an phagozytierenden Zellen in den Präparaten wenige, teilweise auch keine Makrophagen und Riesenzellen, die den vorhandenen Klebstoff resorbieren. Somit zeigt sich hier, im Gegensatz zur ersten Serie, keine wesentliche Resorption des Klebstoffes oder sie setzt erst verzögert ein. Es kann aber auch keine eindeutige zelltoxische Wirkung, wie man bei vorliegendem Befund vermuten könnte, festgestellt werden. Das umliegende Gewebe ist vollkommen vital ohne Atrophien oder Zelluntergänge.

Den Knochenklebstoff der 2. Serie kann man somit als **biotolerant** im Vergleich zur 1. Serie (**biokompatibel**) bezeichnen. Im Gegensatz zur Definition von KAMEN [69] fehlt aber die bindegewebige Einscheidung des Klebstoffes.

Durch die Kompressionsschraube liegt somit eine stabile Osteosynthese mit sehr engem Osteotomiespalt, erhöhter interfragmentärer Stabilität (keine Bewegungen innerhalb des Osteotomiespalt) und Kompression vor. All dies sind Voraussetzungen, die STÜRMER und SCHUCHARDT [129] für eine störungsfreie physiologische Knochenheilung fordern. Die Frakturheilung hat hier also noch

günstigere Voraussetzungen für eine optimale physiologische Frakturheilung als in der 1. Serie. Es lässt sich aber keine Knochenneubildung nachweisen.

Auch nach **42 Tagen** finden keine großen Veränderungen im Bereich der Osteotomiezone statt. Es zeigt sich jedoch eine Überbrückung der Osteotomiezone mit Geflechtknochen in klebstofffreien Arealen. Demzufolge stellt der nicht resorbierbare Knochenklebstoff eine Barriere für die Knochenbildung dar, da er nicht degradiert und nur gering resorbiert wird. Er erfüllt zusammen mit der ausbleibenden Knochenneubildung, in großen Bereichen der Osteotomiezonen, nicht die geforderten Kriterien der Biokompatibilität.

In einem Präparat der 42 Tage-Gruppe der 2. Serie liegt der Klebstoff als großer Tropfen in der Markhöhle. Der Klebstoff bietet in diesem Präparat eine sehr große Angriffsfläche. Dies ist das einzige Präparat, in dem sich eine Entzündungsreaktion in Klebstoffnähe zeigt. Es finden sich Granulozyten, Lymphozyten und Makrophagen direkt an der Klebstoffgrenzfläche. Fraglich ist nun, ob diese Entzündungsreaktion vom Klebstoff herrührt oder durch andere Faktoren wie z.B. einer Infektion der Markhöhle begünstigt worden ist. Zumal diese Entzündungsreaktion nur bei einem Tier sichtbar ist.

Eine zweite auffällige Beobachtung ist bei einem weiteren Präparat der 42 Tage-Gruppe sichtbar. Es zeigt sich das Wachstum von Bindegewebe im Bereich der Klebstoff-Knochengrenzfläche sowie Ansatzweise eine reaktive Bindegewebsbildung im Sinne einer Abkapselung des Klebstoffes. Eine komplette bindegewebige Einkapselung ist jedoch nicht sichtbar.

Bei diesen zum Teil unbefriedigenden und nicht einheitlichen Ergebnissen der 2. Serie sowie den Reaktionen auf den Klebstoff, wäre hier ein längerer Beobachtungszeitraum zu fordern, um die möglicherweise gerade entstehenden Reaktionen auf den Klebstoff genauer beurteilen zu können. Spätere Entzündungsreaktionen oder bindegewebige Einscheidung des Klebstoffes würden das Ergebnis weiter verschlechtern. Aber schon ohne eine Entzündungsreaktion oder eine Abkapselung ist die Biokompatibilität hier nicht gegeben.

Zusammenfassend kann man sagen, dass für gegebenenfalls folgende Versuche (z.B. Großtiermodell oder Biomechanik) nur der Klebstoff der 1. Serie in Frage kommt. Der Klebstoff der 2. Serie ist aufgrund seiner Eigenschaften für eine weitere Anwendung nicht zu empfehlen.

Auch der Knochenklebstoff der 1. Serie stellt in den ersten drei Wochen ein temporäres Hindernis für die Osteogenese dar. Dies ist aber gewollt und unabdingbar für seine Funktion als adhäsives System. Die zu Beginn vorhandene temporäre Barriere verschwindet durch Resorption sowie Degradation und stellt für die nachfolgende Knochenneubildung kein wesentliches Hindernis dar. Deshalb gibt es bezüglich dem Beginn und dem weiteren Verlauf der Frakturheilung Zeitdifferenzen zwischen Klebstoff- und Kontrollgruppe. Die in den ersten 3 Wochen früher einsetzende Frakturheilung der Kontrollgruppe ist aber bereits nach 6 Wochen schon wieder in beiden Gruppen ausgeglichen. Diese verzögerte Knochenbruchheilung ist aber nötig, um eine anfängliche stabile Verbindung zwischen den beiden Osteotomieenden zu gewährleisten, die man ja gerade durch diese Klebung erreichen will.

In der ersten Phase nach der Klebung zeigen sich aber die Problematik und die Schwierigkeiten der Knochenklebung. Bezogen auf mechanische und statische Aspekte eines Knochenklebesystems gilt es einen Klebstoff mit idealen Biokompatibilitäts- und Degradationseigenschaften zu finden. Verläuft die Degradation des Klebstoffes zu schnell oder die Knochenneubildung zu langsam, hat noch keine ausreichende Osteotomieüberbrückung stattgefunden und die Verbindung wird instabil. Verläuft die Degradation zu langsam besteht im Osteotomiespalt aufgrund der Klebstoffpräsenz kein Platz für die Osteogenese. Insgesamt handelt es sich oder es sollte sich idealerweise um ein umgekehrt proportionales Verhältnis zwischen Klebstoffabbau und Knochenneubildung handeln. Aus diesen Gründen wird es schwierig sein ein Knochenklebstoffsystem für statisch belastete aber auch andere Frakturen zu etablieren, da zwei Vorgänge (Klebstoffabbau und Knochenneubildung) den gleichen Raum, nämlich die Fraktur-/Osteotomiezone einnehmen. Somit liegt ein durch viele Faktoren leicht zu beeinflussendes instabiles Gleichgewicht vor.

Nach diesen Untersuchungen muss derzeit für das Einsatzgebiet eine belastungsfreie Frakturzone gefordert werden, um sekundäre Dislokationen zu vermeiden. Weiter folgende biomechanische Testungen sind daher abzuwarten, um die Belastungsstabilität des Klebstoffes genauer beurteilen zu können.

6 Zusammenfassung

Das Ziel dieser tierexperimentellen Arbeit war der direkte Vergleich zweier Varianten eines neuentwickelten Knochenklebstoffes in einem standardisierten Fraktur-/Osteotomiemodell am Kaninchen. Durch licht-, raster- und transmissionselektronenmikroskopische Analysen sollten die Unterschiede der Frakturheilung, der knöchernen Integration und der Biokompatibilität zweier differenter Klebstoffe analysiert werden. Die beiden Knochenklebstoffe basieren auf Alkylen-bis(oligolactoyl)methacrylaten. Aus dem Monomer Ethylenglycol-oligolactid-dimethacrylat (ELAMA) polymerisieren die Klebstoffe zu hochverzweigten, hydrolysierbaren Netzwerken und unterscheiden sich durch die zugesetzten Comonomere, 4% Methylmetacrylat (MMA=Variante 1) bzw. 5% Hydroxyethylmethacrylat-oligolactid (HEMALA=Variante 2), wodurch die Materialeigenschaften variieren.

Insgesamt wurde bei 48 Kaninchen unifemoral eine monokondyläre Femurfraktur (Osteotomie) gesetzt, die abgesetzte laterale Femurkondyle mit und ohne Knochenklebstoff refixiert. Die Tiere wurden in 3 Gruppen unterteilt (Kontrolle, Knochenklebstoffvariante 1 und 2), wobei sie über einen Zeitraum von 7, 21, 42 und 84 Tagen nachbeobachtet wurden. Der quantitative und qualitative Prozess der Degradation sowie Resorption des Klebstoffes und der zeitliche Verlauf der Frakturheilung wurden durch konventionelles Röntgen, 2D-3D Micro-CT, Rasterelektronenmikroskopie, Transmissionselektronenmikroskopie und Histologie analysiert.

Die Auswertungen zeigen nach 21 Tagen in den Kontroll-/ Klebstoffgruppen eine gute Resorption der Knochenfragmente mit zunehmender Osteoblasten- und Trabekelbildung im Osteotomiespalt, wobei in der Klebstoffgruppe 1 (MMA) eine verzögerte, in der Klebstoffgruppe mit Variante 2 (HEMALA) eine größtenteils ausbleibende Frakturheilung, im Vergleich zur Kontrollgruppe, zu beobachten ist.

Nach 42 Tagen ist in der Kontrollgruppe eine komplette Durchbauung des Osteotomiespaltes zu sehen, während in der Klebstoffgruppe mit MMA sich eine gute Resorption des Klebstoffes mit einer verzögerten Frakturheilung einstellt. Im Vergleich dazu ist bei HEMALA keine Osteogenese oder osteoblastische Aktivität, aber eine Mineralisationsverzögerung/-störung des Osteoids zu sehen.

Nach 84 Tagen zeigt sich in der Klebstoffgruppe mit MMA eine vollständige Durchbauung der Osteotomiezone mit Resorption (Phagozytose) und Degradation

des Klebstoffes. Zu keinem Zeitpunkt zeigt sich nach Klebstoffapplikation mit MMA eine Barriere für die Osteogenese. Die 2D-3D-Micro-CT Analysen bestätigen die gute Biokompatibilität des Knochenklebstoffes mit MMA als Comonomer bei kompletter trabekulärer Durchbauung des ehemaligen Osteotomiespaltes.

In der Variante 2 mit HEMALA zeigt sich nur in primär klebstofffreien Bereichen eine Osteogenese. Der Klebstoff wurde hier fast nicht resorbiert und es findet nur eine minimale Degradation statt.

Die Ergebnisse zeigen signifikante Unterschiede bei den verwendeten Klebstoffvarianten. Der Knochenklebstoff mit MMA als Comonomer (Serie 1) ist mit seiner guten Biokompatibilität und Resorption der Modifikation mit HEMALA als Comonomer deutlich überlegen. Neben einer regelrechten Frakturheilung und einer Osteogenese ohne Barriere für die Zellmigration nach Klebstoffapplikation mit MMA, kann im Gegensatz dazu beim Klebstoff mit HEMALA als Comonomer (Serie 2) eine Barriere und Mineralisationsverzögerungen/-störungen beobachtet werden.

Der Klebstoff mit HEMALA als Comonomer ist somit nicht für die Anwendung zu empfehlen.

7 Summary

The intention of this experimental study was to verify the biocompatibility of two new forms of bone glues in a standardized fracture model in rabbits. The fracture healing after the application of the glue, the resorption, the degradation and the bone integration was supposed to be analysed through histologic and radiographic investigations. The new developed bone glue is based on Alkylen-bis(oligolactoyl)methacrylats. From the monomer Ethylenglycol-oligolactid-dimethacrylat (ELAMA) the glue is polymerizing into high branched, hydrolysable networks. The two glues differ in their added comonomere (4% methylmetacrylat (MMA=variant 1) and 5% hydroxyethyl-methacrylat-oligolactid (HEMALA=variant 2).

48 rabbits were operated unifemoral and the lateral condyle of the femur was reduced and refixed with and without boneglue. The animals were separated into three groups (control, variant 1 MMA and variant 2 HEMALA) and observed over a period of 7, 21, 42, and 84 days. The quantitative and qualitative prozess of resorption and degradation of the bone glue was analyzed during the observed time of fracture healing. Besides the histological light microscopy investigations and the

scanning and transmission electron microscopy, the radiological documentation was completed with X-rays and 2D-3D micro-ct images.

The light- and electron microscopy evaluations showed a good resorption of fragments with increasing osteoblasts- and trabecular-development in the fracture gap in the control group and the variant 1 MMA group after 21 days. A minor delayed fracture healing was observed in the variant 1 MMA group, a missing fracture healing was seen in the variant 2 HEMALA group.

A complete bone reconstruction of the fracture gap was visible in the 42 days control group. A good resorption and a minor delayed fracture healing were observed in the bone glue group type 1 (MMA) as well. In the variant 2 group (HEMALA), osteogenesis or osteoblast activity was not seen. Mere a delay in mineralisation of the Osteoid occurred.

A complete reconstructed fracture gap was observed after 84 days in the control and the variant 1-MMA group. The boneglue also was completely degraded and removed through phagozytosis in the variant 1-MMA group. An inflammatory tissue reaction or a barrier of the osteogenesis was not found at any point after the glue application. The computed tomography and 2D-3D-micro-ct analysis confirmed the good biocompatibility and bone integration of the bone glue. In the variant 2 HEMALA group osteogenesis was only seen in glue-free areas. There is only a minimal phagozytosis and degradation of the boneglue.

So far the results show, that there are distinct differences in the characteristics of the two bone glue groups. Variant 1 has a good biocompatibility without any inflammatory tissue reaction and a good absorption. A regular fracture healing after an adequate reduction of the boneglue can be observed, without being a barrier for cellular migration and osteogenesis.

Variant 2 seems to be a barrier for the fracture healing and its use as a bone bonding agent can not be recommended.

8 Literaturverzeichnis

1. Aaby GV, West RL, Jahnke EJ.
Myocardial response to the application of tissue adhesives. Comparison of methyl-2-cyanoacrylate.
Ann. Surg. 1967 Mar;165(3):425-431.
2. Baron R, Neff L, Louvard D, Courtot PJ.
Cell mediated extracellular acidification bone resorption: evidence for a low pH in resorbing lacunae and localization of a 100-kD lysosomal membrane protein at the osteoclast ruffled border.
Journal of Cell Biology. 1985 Dez;101(6):2210-2222.
3. Beck, H.
Kunststoffklebung mit Cyanoacrylaten an Sehnen und Knochengewebe.
Langenbecks Arch. klin. Chir. 1966; 316:563.
4. Beresford JN.
Osteogenic stem cells and the stromal system of bone and marrow.
Clin Orthop. 1989 Mar;(240):270-280.
5. Bergel S.
Über Wirkung des Fibrins.
Dtsch. Med. Wochenschr. 1909; 35:663-665.
6. Bhaskar SN, Cutright DE, Jacoway JR, Margetis P, Leonard F.
Use of chemical adhesives in the management of bone fractures.
J Am Dent Assoc. 1968 Oct;77(4):831-7.
7. Bloch B.
Bonding of Fractures by Plastic Adhesives.
J Bone Joint Surg Br. 1958 Nov;40-B(4):804-12.
8. Block W.
Über das Verhalten des Knochens nach Bohren und Nageln bei der Drahtextension.
Arch. klin. Chir. 1929; 137:315-329.
9. Böhler N, Bösch P, Sandbach G, Schlag G, Eschenberger J, Schmid L.
Der Einfluss von homologem Fibrinogen auf die Osteotomieheilung beim Kaninchen.
Unfallheilkunde. 1977; 80:501-508.
10. Bonnette GH.
Experimental fractures of the mandible.
J Oral Surg. 1969 Jul;27(7):568-71.
11. Borman ER, Putney DL.
Repair of a wing fracture with methyl methacrylate bone cement.
Vet Med Small Anim Clin. 1978 Jun;73(6):794.
12. Bösch P, Braun F, Eschenberger J, Kovac W, Spängler HP.
Die Beeinflussung der Knochenheilung durch hochkonzentriertes Fibrin.
Arch. orthop. Unfall-Chir. 1977; 89:259-273.
13. Böstman O, Pääväranta U, Partio E, Vasenius J, Manninen M, Rokkanen P.
Degradation and tissue replacement of an absorbable polyglycolide screw in the fixation of rabbit femoral osteotomies.
J Bone Joint Surg Am. 1992 Aug;74(7):1021-31.

14. Böstman O, Pääväranta U, Partio E, Vasenius J, Manninen M, Rokkanen P, Majola A.
The tissue-implant interface during degradation of absorbable polyglycolide fracture fixation screws in the rabbit femur.
Clin Orthop Relat Res. 1992 Dec;(285):263-72.
15. Braun A, Schumacher G, Heine WD.
Fibrinklebung zur Replantation osteocartilagärer Fragmente am Kniegelenk des Kaninchens.
Hefte Unfallheilkunde. 1978; 294-297.
16. Brighton CT, Friedlaender G, Lane J.
Bone Formation and Repair.
1976, American Academy of Orthopaedic Surgeons Symposium.
17. Buchner H.
Erfahrungen mit Polyurethanschaum (Ostamer) bei der Behandlung von Knochenbrüchen.
Klin. Med. (Wien) 1961; 16:284-288.
18. Buckner H, Fleischl P.
Spätergebnisse bei der Behandlung von Knochenbrüchen mit Polyurethanschaum.
Arch. orthop. Unfall-Chir. 1962; 54:48-57.
19. Büttner R, Thomas C.
Allgemeine Pathologie.
Schattauer Verlag Stuttgart 2001. 27-79; 141-181.
20. Carstensen G.
Eine neue Methode der Gefäßkonservierung durch Einbettung in einen schnellhärtenden Kunststoff.
Chirurg. 1960 Feb; 31:49-52.
21. Chalupnik J, Hejda N, Dobias J.
Zur Frage der biologischen Toleranz synthetischer Klebstoffe.
Klebstoffe in der Chirurgie, Wien.
Med. Akad., Wien. 1968:39-46.
22. Chambers TJ.
The pathobiology of the osteoclast.
J Clin Pathol. 1985 Mar;38(3):241-52.
23. Charnley J, Kettlewell J.
The elimination of slip between prosthesis and femur.
J Bone Joint Surg Br. 1965 Feb;47:56-60.
24. Charnley J.
Anchorage of the Femoral Head Prosthesis to the Shaft of the Femur.
J Bone Joint Surg Br. 1960 Feb;42-B:28-30.
25. Charnley J.
The healing of human fractures in contact with self-curing acrylic cement.
Clin Orthop. 1966; 47:157.
26. Chou SN.
Use of cyanoacrylates.
J Neurosurg. 1977; 46:266.
27. Contzen H.
Der derzeitige Stand der Gewebevereinigung durch klebende Autopolymerisate.
Melsunger Med. Mitt. 1968; 42:7.
28. Coover HW, Joyner FB, Shearer NH, Wicker TH.
Chemistry and performance of cyanoacrylate adhesives.
Soc. Plastics Engrs. 1959; 15:413.

29. Corn R, Corn O, Matsumoto T.
Osteosynthesis employing isobutyl-cyanoacrylate monomer.
Int. Surg. 1972; 57:483.
30. Demeter G, Matyas J.
Mikroskopisch vergleichende anatomische Studien am Röhrenknochen mit besonderer Berücksichtigung auf die Unterschiede menschlicher und tierischer Knochen.
Z. Anat. 1928; 87:45-99.
31. Donath, K.
Die Trenn-Dünnschliff-Technik zur Herstellung histologischer Präparate von nicht schneidbaren Geweben und Materialien.
Exakt/Kulzer Druckschrift, Norderstedt. 1987.
32. Donkerwolcke M, Burny F, Muster D.
Tissues and bone adhesives – historical aspects.
Biomaterials. 1998; 19(16):1461-1466.
33. Drompp BW.
Chemical Osteosynthesis of Fractures and Non-Unions of the Shafts of Long Bones of the Lower Extremity.
Am J Surg. 1960; 99:733-744.
34. Eggli PS, Müller W, Schenk RK.
Porous hydroxyapatite and tricalcium phosphate cylinders with two different pore size ranges implanted in the cancellous bone of rabbits.
Clin Orthop Relat Res. 1988 Jul;(232):127-38.
35. Eitel F, Klapp F, Jacobson W, Schweiberer L.
Bone regeneration in animals and in man.
Arch Orthop Trauma Surg. 1981;99(1):59-64.
36. Eitenmüller J, Gerlach KL, Schmickal T, Muhr G.
Semirigide Plattenosteosynthesen unter Verwendung absorbierbarer Polymere als temporäre Implantate. II. Tierexperimentelle Untersuchungen.
Chirurg. 1987; 58:831-839.
37. Ellsäcker J, Moyer CF, Lesker PA, Simmons DJ.
Improved healing of experimental long bone fractures in rabbits by delayed internal fixation.
J Trauma. 1975 Oct;15(10):869-76.
38. Enis JE, McCollough NC, Cooper JS.
Effects of methymethacrylate in osteosynthesis.
Clin Orthop Relat Res. 1974 Nov-Dec;(105):283-94.
39. Ennker J.
Gewebelebstoffe in der Thorax- und Kardiovaskularchirurgie.
Steinkopf Verlag, Darmstadt. 1994.
40. Fuchsberger A.
Temperatureinwirkung auf die Kompakta beim Sägen in Abhängigkeit von den Einsatzbedingungen.
Zentralbl. Chir. 1987; 112:793-804.
41. Gehorn RP.
The biochemistry of bone.
Endocrinol. Metab. Clin. North. Am. 1989; 18:858-902.
42. Giebel G, Rimpler M, Borchers L.
Klebung am Skelettsystem,
Teil 2: Untersuchung der Klebefestigkeit von 22 Klebstoffen am Knochen.
Biomedizinische Techn. 1981; 26:170-174.

43. Giebel G, Rimpler M.
Klebungen am Skelettsystem:
Klebstoffe, 50 Jahre Hilfsstoffe für den Chirurgen (Teil 1).
Biomed. Techn. 1981; 26:35-40.
44. Giebel MG.
Ergebnisse bei Klebung mit verschiedenen Klebern an verschiedenen Geweben.
Adhesives in Surgery, Wien Med. Akad., Wien. 1968,65-66.
45. Giebel MG.
Experimentelle Ergebnisse bei Klebungen statt Naht an verschiedenen Geweben.
Langenbecks Arch. klin. Chir. 1965; 313:705.
46. Gluck T.
Referat über die durch das Moderne Chirurgische Experiment gewonnen positiven Resultate.
Arch. f. klin. Chir. 1891; 41:187-239.
47. Golovin GV.
Frakturfixierung mit Kunststoffen (Russisch).
Vestn. Khir. Grekov. 1956; 77:125.
48. Golovin, GV.
Klinische Anwendung von "Osteoplast" zur Frakturfixierung (Russisch).
Vestn. Khir. Grekov. 1959; 83:45.
49. Grey EC.
Fibrin as a haemostatic in cerebral surgery.
Surg. Gyn. Obstetr. 1915; 21:452-494.
50. Hartmann MH.
In: Biopolymers from Renewable Resources (Hrsg. D.L. Kaplan).
Springer-Verlag. 1998, 367-411.
51. Harvey SC.
The use of fibrin paper and forms in surgery.
Boston Med. Surg. J. 1916; 174:659.
52. Hedri W.
Ein neues Prinzip der Osteosynthese.
Arch. f. klin. Chir. 1931; 167:145.
53. Heiss W, Guthy E, Faul P.
Vergleichende Untersuchung zur Reißfestigkeit geklebter und genähter Wunden. Adhesives in
Surgery, Wien.
Med. Akad., Wien. 1968:275-278.
54. Hench LL, Wilson J.
Surface-active biomaterials.
Science. 1984; 226:630-636.
55. Herrmann JB, Katz AR, Woodward SC.
Experimental anastomoses of small arteries employing alkyl-cyanoacrylates.
J Biomed Mater Res. 1967 Dec;1(4):395-404.
56. Holden CEA.
The role of blood supply of soft tissue in the healing of diaphyseal fractures.
J Bone Joint Surg Am. 1972 Jul;54(5):993-1000.
57. Hoppe W.
Tierexperimentelle Untersuchung über Gewebsreaktionen auf Injektion von
autopolymerisierendem Kunststoff.
Dtsch. zahnärztl. Z. 1956; 11:837-847.

58. Hoyt W.
Diskussionsbeitrag.
J Bone Joint Surg Am. 1960; 42-A (5):878.
59. Hubbard MJS.
The effect of actylic cement on the union of internally fixed experimental fractures of the femoral shaft in the rabbit.
Injury. 1980 May;11(4):325-30.
60. Hullinger L.
Untersuchung über die Wirkung von Kunstharzen („Palacos“ und „Ostamer“) in Gewebekulturen.
Arch. orthop. Unfall-Chir. 1962; 54:504-512.
61. Hulse D, Hyman B.
Fracutre Biology and Biomechanics.
In Textbook of small animal surgery.
Hrsg. Slatter D. 2. Auflg. W.B. Saunders, Philadelphia; 1993:1595-1603.
62. Hunter KM.
Cyanoacrylate tissue adhesives in osseous repair.
Br J Oral Surg. 1976 Jul;14(1):80-6.
63. Iqbal QM, Kuty MK.
The use of autopolymerizing acrylic cement in osteosynthesis: An experimental approach.
Aus. N.Z. Surg. 1973; 43:304.
64. James IE, Walsh S, Dodds RA, Gowen M.
Production and characterisation of osteoclastselective monoclonal antibodies that distinguish between multinucleated cells derived from different human tissues.
Journal of Histochemistry. 1991; 39:905-914.
65. Johner R.
Zur Knochenheilung in Abhängigkeit von der Defektgröße.
Helv. Chir. Acta. 1972; 39:409-411.
66. Junqueira L, Carneiro J.
Lehrbuch der Histologie.
Springer-Verlag Berlin-Heidelberg, New York. 1991.
67. Kaiser E, Delling G.
Osteozyten - ein Organ im Aufwind morphologischer und zellbiologischer Forschung.
Osteologie. 2002; 11 (4):219-236.
68. Kalender, WA.
Grundlagen und Technik der Spiral-CT.
Radiologe. 1999; 39(9):809-819.
69. Kamen P.
Attachement of human oral fibroblasts to a granular polymeric implant for hard tissue replacement.
J Oral Implantol. 1989;15(1):52-6.
70. Kangur TT, Tolman DE, Jowsey J.
The use of methylmethacrylate in fixation of mandibular fractures in dogs.
Oral Surg Oral Med Oral Pathol. 1976 May;41(5):578-87.
71. Katthagen BD.
Knochenregeneration mit Knochenersatzmaterialien.
H. Unfallheilk. 1986:178.

72. Kaufman RS.
The use of tissue adhesive (isobutyl cyanoacrylate) and topical steroid (0,1 percent dexamethason) in experimental tympanoplasty.
Laryngoscope. 1974; 84:793.
73. Kawahara H.
Biological requirements for biomaterials.
Implantologist. 1985; 3 (2):41-49.
74. Kerr AG, Smyth GDL.
Bucrylate (isobutyl cyanoacrylate) as an ossicular adhesive.
Arch. Otolaryngol. 1971; 94:129.
75. Kluyskens P.
Histologie van het bot naAaneenlijmen met Histoacryl.
Acta Otorhinolaryngol. Belg. 1974; 28:603.
76. Kort J.
Klebstoffe in der Chirurgie.
Stuttgart, F. K. Schattauer 1960, 878.
77. Kramers P.
Knochenheilung unter stabilen und instabilen Bedingungen.
In: Kleintierkrankheiten Band 3. Orthopädische Chirurgie und Traumatologie.
Bonath KH, Prieur WD. Ulmer Stuttgart; 1998:46-57.
78. Kurz W.
Verletzungen der Epiphysenfuge und Knochenwachstum.
Z. Exp. Chir. U. Chir. Forsch. 1981; 14 :98-106.
79. Laki K und Lorand L.
On solubility of fibrin clots.
Science. 1948; 108:280.
80. Leemann RA, Hedinger C, Jenny M.
Tierexperimentelle und histologische Ergebnisse bei der Frakturleimung mit dem Polyurethanpolymer >Ostamer<.
Schweiz. Med. Wschr. 1961; 31:908-914.
81. Leemann RA, Jenni M.
Diskussionsbemerkung zur Frage der Knochenleimung mit Ostamer.
Klin. Med. 1961; 6:287.
82. Lehman RA, Hayes GJ, Leonard F.
Toxicity of alky 2-cyanoacrylates. I. Peripheral nerve.
Arch Surg. 1966 Sep;93(3):441-6.
83. Leonhard F.
In: Klebstoffe in der Chirurgie, Hrsg. R. Gottlob. Wien.
Wien Med. Akad., Wien 1968:11-14.
84. Lightermann I, Farell JJ.
Mandibular Fractures Treated with Plastic Polymers.
Arch Surg. 1963 Nov;87:868-76.
85. Lobene RR, Sharawy AM.
The response of alveolar bone to cyanoacrylate tissue adhesives.
J. Periodontol. 1968; 39:150.
86. MacDonald BR, Gowen M.
The cell biology of bone.
Baillieres Clin. Rheumatol. 1993; 7:421-431.

87. Mandarino MP, Salvatore JE, Jones TL.
Chemical Osteosynthesis -
A new Method of Treatment of Fractures and Diseased Bone with a Polyurethane Polymer.
J Bone Joint Surg. 1960; 42-A (5):901.
88. Mandarino MP, Salvatore JE.
Polyurethan Polymers - Its use in Fractured and Diseased Bone.
Am J Surg. 1959 Apr;97(4):442-6.
89. Matras H, Dinges GP, Lassmann H, Mamoli B.
Zur nahtlosen Interfaszikularen Nerventransplantation im Tierexperiment.
Wien Med. Wochenschr. 1972; 37:517.
90. Meyer G, Muster D, Schmitt D, Jung P, Jäger JH.
Bone bonding through bioadhesives: Present status.
Biomater Med Devices Artif Organs. 1979;7(1):55-71.
91. Miller SC, Jee WS.
The bone lining cell: a distinct phenotyp?
Calcif Tissue Int. 1987 Jul;41(1):1-5.
92. Mitchell N, Shepard N.
Healing of the articular cartilage in intra-articular fractures in rabbits.
J Bone Joint Surg. 1980; 62-A:628-634.
93. Mommsen U, Scheer H, Jungbluth KH, Delling G, Siebert G.
Reaktion des Gelenkknorpels auf subchondrale Defektauffüllung mit autologer Spongiosa,
Kieler Knochenspan und Knochenzement.
Chir. Forum. Exp. Klein Forsch. 1979; 10:199.
94. Movshovich IA, Petrov NV, Khusnitdinov A.
Experimental union of the bone tissue with cyarin.
Eksp. Khir. Anestezol. 1976; 6:61.
95. Müller ME.
Ostamer und Palacos in der Knochenchirurgie.
Langenbecks Arch. klin. Chir. 1963; 304:934.
96. Müller T, Wehner W.
Gegenwärtiger Stand und Perspektive der Ultraschallosteosynthese in der Unfallchirurgie.
Beitr. Orthop. Traumatol. 1979; 26:570.
97. Nigst H, Wagener HH, Bircher J, Zuppinger P.
Industrielle Gießharze in der Knochenchirurgie.
Dtsch. Med. Wochenschr. 1960; 85:658-660.
98. Osborn JF.
Implantatwerkstoff Hydroxylapatit – Grundlagen und klinische Anwendung.
Quintessenz-Verlag. 1985:177-183.
99. Ostermann PA, Neumann K, Ekkernkamp A, Muhr G.
Long term results of unicondylar fractures of the femur.
J Orthop Trauma. 1994;8(2):142-6.
100. Passl R, Plenk H, Sauer G, Spängler HP, Radaszkiewicz T, Holle J.
Die homologe reine Gelenkknorpeltransplantation im Tierexperiment.
Arch. orthop. Unfall-Chir. 1976; 86:243-256.
101. Rauber, Kopsch.
Anatomie des Menschen, Lehrbuch und Atlas, Band 1 Bewegungsapparat.
Herausgegeben von Leonhardt H, Tillmann B, Töndury G, Zilles K.
Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York. 1987.

102. Redler I.
Chemical Osteosynthesis.
Am J Surg. 1960 May;99:730-2.
103. Renegar WR, Griffiths RC.
The use of methacrylate bone cement in the repair of acetabular fractures.
J.A.A.H.A. 1977; 13:583.
104. Riedl K, Kohout F, Rutt A.
Erste Erfahrungen mit der Ultraschallosteosynthese.
Arch. Orthop. Unfall-Chir. 1975; 82:349.
105. Rietz KA.
Polymer Osteosynthesis. Experimental studies with an epoxy resin (Araldite AW 120).
Acta Chir Scand. 1964 Oct;128:387-401.
106. Rimpler M, Berndt HO.
Adhäsion 1991; 35:23-27
107. Rimpler M.
In: Swissbonding 94, 8. Internationales Symposium „Leistungsfähigkeit der modernen Klebtechnik“.
Repperswil, 1994, Tagungsbuch. 161-175.
108. Rockwood CA, Green DP.
Fractures in adults.
Philadelphia: J.P. Lippincott 1430. 1984.
109. Rupp G, Stemberger A.
Fibrinklebung in der Orthopädie.
Med. Welt. 1978; 18:766.
110. Sachs E, Erben A, Margolis G und Wilson DH.
Fatality from ruptured intracranial aneurysm after coating with methyl 2-cyanoacrylate (Eastman 910 Monomer, M2 C-1).
J Neurosurg. 1966 May;24(5):889-91.
111. Salter RB, Simmonds DF, Malcolm BW, Rumble EJ, MacMichael D, Clements ND.
The biological effect of continuous passive motion on the healing of full-thickness defects in articular cartilage.
J Bone Joint Surg Am. 1980 Dec;62(8):1232-51.
112. Salvatore JE, Mandarino MP.
Polyurethane polymer, its use in osseous lesions.
Ann Surg. 1959 Jan;149(1):107-9.
113. Sawhney AS, Poff B, Powell M, Messier K, Doherty E, Yao F, Ensore DJ, Jarett PK.
Polym. Mater. Sci. Engn. 1993; 79:256.
114. Schenk RK, Willenegger HR.
Zur Histologie der primären Knochenheilung.
Langenbecks Arch. klin. Chir. 1964; 308, 440-452.
115. Schenk RK, Willenegger HR.
Zur Histologie der primären Knochenheilung, Modifikation und Grenzen der Spaltheilung in Abhängigkeit von der Defektgröße.
Unfallheilkunde. 1977; 80:155-160.
116. Schenk RK.
Die Histologie der primären Knochenheilung im Lichte neuer Konzeption über den Knochenumbau.
Unfallheilkunde. 1978; 81:219-227.

117. Schimke E.
Knochenbruch, Fraktur.
In: Lehrbuch der Allgemeinen Chirurgie für Tierärzte.
Hrsg. Bolz W. 5. Aufl. Enke; Stuttgart; 1985:243.
118. Schmidt RF, Thews G.
Physiologie des Menschen.
Springer Verlag Berlin, Heidelberg, New York. 1997, 737-778.
119. Siebert CH, Miltner O, Schneider U, Wahner T, Koch S, Niedhart C.
Einheilungsverhalten von osteochondralen Transplantaten – Tierexperimentelle Untersuchungen an einem Schafsmodell.
Z. Orthop. 2001; 139:382-386.
120. Silver IA, Murrills RJ, Etherington DJ.
Microelectrode studies on the acid microenvironment beneath adherent macrophages and osteoclasts.
Experimental Cell Research. 1988; 175:266-276.
121. Silver IA.
Tissue adhesives.
The veterinary record. 1976; 98:405-406.
122. Singh GR, Singh AP, Bhargava AK.
Use of methylmethacrylate as an adjunct to intramedullary fixation in small ruminants.
Indian J. Anim. Sci. 1981; 51:83.
123. Skeist I.
Introduction to adhesives. In: Skeist I, editor. Handbook of adhesives.
New York: Reinhold. 1962:2-3.
124. Skerry TM, Bitensky L, Chayen J, Lanyon LE.
Early strain-related changes in enzyme activity in osteocytes following bone loading in vivo.
J Bone Miner Res. 1989 Oct;4(5):783-8.
125. Smith DC.
Lutes, glues, cements and adhesives in medicine and dentistry.
Biomed Eng (London). 1973; 8:112-115, 120.
126. Sommerfeld DW, Rubin CT.
Biology of bone and how it orchestrates the form and function of the skeleton.
Eur Spine Jour. 2001; 10 Supp 2:86-95
127. Stein J.
Tierexperimentelle Untersuchungen von Osteosynthesen mit Acrylat-Klebern.
Dissertation Hamburg. 1969.
128. Stephen C, Weber MD, Michael W, Chapman MD.
Adhesives in Orthopaedic Surgery –
A review of the Literature and in vitro Bonding Strengths of Bone-bonding Agents.
Clinical Orthopaedics and Related Research. 1984; 191:249-261.
129. Stürmer KM, Schuchardt W.
Neue Aspekte der gedeckten Marknagelung und des Aufbohrers der Markhöhle im Tierexperiment. Teil 3: Knochenheilung, Gefäßversorgung und Knochenumbau.
Unfallheilkunde. 1980; 83:433-445.
130. Suda T, Takahashi N, Martin TJ.
Modulation of osteoclast differentiation.
Endocr Rev. 1992 Feb;13(1):66-80.

131. Sumner-Smith G, Waters EH.
The adjunctive use of methyl methacrylate bone cement in the stabilization of multiple fractures.
J.A.A.H.A. 1976; 12:778.
132. Teitelbaum SL.
Bone Resorption by osteoclasts.
Science 2000, 289 (5484); 1504-1508.
133. Thomas C.
Histopathologie.
Schattauer Verlag Stuttgart. 2001.
134. Thomas C.
Spezielle Pathologie.
Schattauer Verlag Stuttgart, New York. 1996, 527-577.
135. Thompson FR, Sezgin MZ.
An Ostamer Study in Rabbits leading to its use or Misuse in Humans.
J Bone Joint Surg 1960; 42-A,5:877.
136. Tiling T, Meffert O, Stankovic P.
Fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen über Osteosynthesen und
Knochendefektausfüllung mit Cyanoacrylat.
Langenbecks Arch. klin. Chir. 1979; 368:203.
137. Timokhiva VI, Lappo VG.
Some methodological approaches to the study of the toxic properties of cyanoacrylates polymers
used as medicinal glues.
Gig. Sanit. 1976; 6:2.
138. Tkachenko SS, Rutski VV.
Osteosynthesis with methacrylate and cyanoacrylate adhesives (A review of the domestic and
foreign literature).
Vestn. Khir. 1969; 103:135.
139. Tkachenko SS, Rutski VV.
Some characteristics of chemical osteosynthesis.
Orthop. Travmatol. Protez. 1970; 31:48.
140. Tkachenko SS, Rutski, VV.
Osteosynthesis with synthetic adhesive preparations.
Vestn. Khir. 1968; 101:63.
141. Turner J, Di Miccoli.
Über die Verwendung von Kunstharzen in der Orthopädie.
Z. Orthop. 1961; 95:82-94.
142. Ullmanns Enceklöpädie der technischen Chemie 4. Auflage.
Bd. 14. Weinheim: Verlag Chemie. 1977, 228.
143. Ulreich JB, Chvapil M.
A quantitative microassay for in vitro toxicity testing of biomaterials.
J Biomed Mater Res. 1981 Nov;15(6):913-22.
144. Urist MR, Johnson RW.
Calcification and ossification. IV. The healing of fractures in man under clinical conditions.
J. Bone Joint Surg. 1943; 25:375-426.
145. Wake WC.
Adhesion and the formulation of adhesives.
London: Applied Science Publisher. 1976.

146. Wenz R, Nies B.
DE 1996, 196 46 782.
147. Wenz R, Walenkamp GHIM (Editor).
Biomaterials in Surgery.
Georg Thieme Verlag. 1998, 132-135.
148. Wetzel FH.
Introduction to rubber-based adhesives. In: Skeist I, editor.
Handbook of adhesives. Section B: adhesives materials.
New York: Reinhold. 1962:188-208.
149. Willenegger H, Perren SM, Schenk R.
Leitthema: Knochenregeneration und Transplantation – Primäre und sekundäre
Knochenbruchheilung.
Der Chirurg 1971; 6:241-251.
150. Williams DF.
Consensus and definitions in biomaterials.
Implant Materials in Biofunction, C. De Putter, G.L. de Lange, K. De Groot and A.J.C. Lee.
Advances in Biomaterials, Elsevier Science Publishers B.V. 1988; 8:11-16.
151. Wissing H, Stürmer KM, Breidenstein G.
Die Wertigkeit verschiedener Versuchstiere für experimentelle Untersuchungen am Knochen.
H. Unfallheilkunde. 1990; 212:479-488.
152. Woodward SC, Herrman JB, Cameron JL, Brandes G, Pulaski EJ, Leonard F.
Histotoxicity of cyanoacrylate tissue adhesive in the rat.
Ann Surg. 1965 Jul;162:113-22.
153. Woodward, SC.
Physiological and biochemical evaluation of implanted polymers.
Ann. N.Y. Acad. Sci. 1968; 146:225.
154. Young JZ, Medawar PB.
Fibrin suture of peripheral nerves.
Lancet. 1940; 2:126.
155. Zollinger HU.
Experimentelle Erzeugung maligner Nierenkapseltumoren bei der Ratte durch Druckreize
(Plastic-Kapseln).
Schweiz. Z. allg. Path. 1952; 15:666.
156. Firma SKYSCAN, Kartuizersweg 3B, 2550 Kontich, Belgium. <http://www.skyscan.be/home.htm>.
[Stand 28.08.2005].

9 Abkürzungsverzeichnis

2D, 3D	Zweidimensional, Dreidimensional
Abb.	Abbildung
Alkal.	alkalisch
a.p.	anterior posterior (Strahlengang)
ASA	American Standard Association
Aufn.	Aufnahme
B	Bridging
BBN	Borabicyclononan
BG	Bindegewebe
BGF	Blutgefäß
BI	Blasige Areale
BMU	Bone Metabolic Unit
BPO	Dibenzoylperoxid
BRU	Bone Remodeling Unit
BSE	Back Scattered Electron
C°	Grad Celsius
CHMA	Cyclohexylmethacrylat
cm	Zentimeter
CT	Computertomograph
Cubic mm voxel	Volumen Element
DCS	Dynamische Kompressionsschraube
DDSA	Dodecenylsuccinic acid anhydride
DMP	Dimethylaminomethylphenol
ELA	Ethylenglykol-oligolactid
ELAMA	Ethylenglycol-oligolactid-dimethacrylat
EP	Eiweißpräzipitate
FG	Fettgewebe
Fib	Fibrin
FS	Frakturspalt
g	Gramm
GF	Gelenkfläche/Gelenkknorpel
GK	Geflechtknochen
h	Hour
H	Homogen blaue Areale
HA	Hydroxylapatit
HEMA	Hydroxyethylmethacrylat
HEMALA	Hydroxyethylmethacrylat-oligolactid
HK	Hyaliner Knorpel
i.v.	intravenös
i.m.	intramuskulär
ISO	International Standard Organisation
IZ	intertrabekuläre Zwischenräume
K-Draht, KD	Kirschner-Draht
kg	Kilogramm
KF	Knochenfragmente
KG	Körpergewicht
KI	Klebstoff/Knochenklebstoff
KNB	Knochenneubildung
KS	Knochensplitter
kV	Kilovolt
LK	Lagerknochen
LMK	Lamellenknochen
m	Molare
M	Makrophage
mAS	Milliampersekunden
MAS	Methacrylsäure
mg	Milligramm
MH	Markhöhle

min	Minute
MH	Markhöhle
MKR	Mehrkernige Riesenzellen
ml	Milliliter
mm	Millimeter
MMA	Methylmethacrylat
MNA	Methylnadic anhydride
MR	Markraum
Na	Natrium
NaCl	Natriumchlorid
nm	Nanometer
OB	Osteoblast
OBG	Osteotomiebegrenzung
OI	Osteoid
OP	Operationssaal
ORIF	open reduction and stable internal fixation
OS	Osteotomiespalt
OZ	Osteozyt
PEG	Polyethylenglycol
pH	Potentia Hydrogenii
PMMA	Polymethylmethacrylate
PP	Pseudopodien
REM	Resterelektronenmikroskop
RER	Raues endoplasmatisches Retikulum
RS	Randsaum
s.c.	Sub cutan
Tab.	Tabelle
TEM	Transmissionselektronenmikroskop
u.a.m.	und andere mehr
usw.	und so weiter
V	Vakuole
VK	Vorderes Kreuzband
µm	Micrometer
ZiKa	Zimmermannkaninchen
ZK	Zellkern

10 Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

- Abb. 1. Schematische Zeichnung eines Ausschnitts der Substantia compacta der Diaphyse eines Röhrenknochens.
- Abb. 2. Stoffwechselbedingte Umbauprozesse im Knochen (BMU/BRU).
- Abb. 3. Zweistufige Synthese zum verwendeten Monomer, ausgehend von Ethylenglykol, Lactid und Methacrylsäure.
- Abb. 4. Die Comonomere der beiden Serien MMA und HEMALA-1,3.
- Abb. 5. 2-Kammermischsystem zur Applikation des Knochenklebstoffes.
- Abb. 6. Polymeres Netzwerk des Knochenklebstoffes.
- Abb. 7. Degradationsprodukte des Knochenklebstoffes (blau - Methacrylat).
- Abb. 8. Hydrolyse-Stadien der Klebstoffzylinder.
- Abb. 9. Mittlere Probenmasse der Polymerzylinder nach Degradation in Soerensen Puffer.
- Abb. 10. Lagerung.
- Abb. 11. Lateraler Zugang.
- Abb. 12. Osteotomievorgang (Absetzen der lat Femurkondyle), Markierung der Osteotomie-richtung.
- Abb. 13. Komplettierte Osteotomie der lateralen Femurkondyle (Femurkondylenfraktur).
- Abb. 14. Klebstoffapplikation in den Osteotomiespalt - Anatomische Reposition der lateralen Femurkondyle mit der spitzen Repositionsklemme.
- Abb. 15. Fixation der lateralen Femurkondyle durch zwei 1mm starke parallel eingebrachte Kirschner-Drähte aus Titan.
- Abb. 16. Klebstoffapplikation in eine subcutan präparierte Tasche am Rücken eines Kaninchens.
- Abb. 17. 3,5 mm kanülierte Titan-Schraube (Zugschraube) mit kurzem Gewinde.
- Abb. 18. Fixationsergebnis in Serie 2 - kanülierte Titan-Schraube und K-Draht.
- Abb. 19. Einteilung der Schnittebenen - 9 Längsschnitte, 2 Querschnitte.
- Abb. 20. Auspolymerisierte TECHNOVIT® Knochenblöcke.
- Abb. 21. Klebstoffimplantation in Muskeltasche nach 7 Tagen. Vergrößerung 200 x.
- Abb. 22. Klebstoffimplantation in Muskeltasche nach 7 Tagen. Vergrößerung 50 x.
- Abb. 23. Klebstoffimplantation in Muskeltasche nach 7 Tagen. Vergrößerung 300 x.
- Abb. 24. Klebstoffimplantation in Muskeltasche nach 7 Tagen. Vergrößerung 200 x.
- Abb. 25. Röntgenbild Klebstoff 7 Tage - Tier 28, a. p. Aufnahme.
- Abb. 26. Röntgenbild Klebstoff 7 Tage - Tier 30, a. p. Aufnahme.
- Abb. 27. Röntgenbild Klebstoff 7 Tage - Tier 31 a. p. Aufnahme.
- Abb. 28. Röntgenbild Kontrolle 7 Tage - Tier 35, a. p. Aufnahme.
- Abb. 29. Röntgenbild Klebstoff 21 Tage - Tier 21, a. p. Aufnahme.
- Abb. 30. Röntgenbild Klebstoff 21 Tage - Tier 20, a. p. Aufnahme.
- Abb. 31. Röntgenbild Klebstoff 42 Tage - Tier 11, a. p. Aufnahme.
- Abb. 32. Röntgenbild Kontrolle 42 Tage - Tier 17, a. p. Aufnahme.
- Abb. 33. Röntgenbild Klebstoff 84 Tage - Tier 10, a. p. Aufnahme.
- Abb. 34. Röntgenbild Klebstoff 84 Tage - Tier 05, a. p. Aufnahme.
- Abb. 35. Röntgenbild Klebstoff 21 Tage - Tier 45, a. p. Aufnahme.
- Abb. 36. Röntgenbild Klebstoff 42 Tage - Tier 42, a. p. Aufnahme.
- Abb. 37. Micro-CT - 1. Serie, 7 Tage Klebstoffgruppe.
- Abb. 38. Micro-CT - 1. Serie, 7 Tage Kontrollgruppe.
- Abb. 39. Micro-CT - 1. Serie, 21 Tage Klebstoffgruppe.
- Abb. 40. Micro-CT - 1. Serie, 21 Tage Kontrollgruppe.
- Abb. 41. Micro-CT - 1. Serie, 21 Tage Kontrollgruppe.
- Abb. 42. Micro-CT - 1. Serie, 21 Tage Kontrollgruppe.
- Abb. 43. Micro-CT - 1. Serie, 42 Tage Klebstoffgruppe.
- Abb. 44. Micro-CT - 1. Serie, 42 Tage Kontrollgruppe.
- Abb. 45. Micro-CT - 1. Serie, 84 Tage Klebstoffgruppe.
- Abb. 46. Micro-CT - 1. Serie, 84 Tage Kontrollgruppe.
- Abb. 47. Micro-CT - 2. Serie, 21 Tage Klebstoff.
- Abb. 48. Micro-CT - 2. Serie, 42 Tage Klebstoff.
- Abb. 49. Durchlichtmikroskopie - 7 Tage Klebstoffgruppe.

- Abb. 50. Durchlichtmikroskopie - 7 Tage Klebstoffgruppe.
- Abb. 51. Durchlichtmikroskopie - 7 Tage Klebstoffgruppe.
- Abb. 52. Durchlichtmikroskopie - 7 Tage Klebstoffgruppe.
- Abb. 53. Durchlichtmikroskopie - 7 Tage Klebstoffgruppe.
- Abb. 54. Durchlichtmikroskopie - 7 Tage Klebstoffgruppe.
- Abb. 55. Durchlichtmikroskopie - 7 Tage Kontrollgruppe.
- Abb. 56. Durchlichtmikroskopie - 21 Tage Klebstoffgruppe.
- Abb. 57. Durchlichtmikroskopie - 21 Tage Klebstoffgruppe.
- Abb. 58. Durchlichtmikroskopie - 21 Tage Klebstoffgruppe.
- Abb. 59. Durchlichtmikroskopie - 21 Tage Klebstoffgruppe.
- Abb. 60. Durchlichtmikroskopie - 21 Tage Klebstoffgruppe.
- Abb. 61. Durchlichtmikroskopie - 21 Tage Klebstoffgruppe.
- Abb. 62. Durchlichtmikroskopie - 21 Tage Klebstoffgruppe.
- Abb. 63. Durchlichtmikroskopie - 21 Tage Kontrollgruppe.
- Abb. 64. Durchlichtmikroskopie - 42 Tage Klebstoffgruppe.
- Abb. 65. Durchlichtmikroskopie - 42 Tage Klebstoffgruppe.
- Abb. 66. Durchlichtmikroskopie - 42 Tage Kontrollgruppe.
- Abb. 67. Durchlichtmikroskopie - 42 Tage Kontrollgruppe.
- Abb. 68. Durchlichtmikroskopie - 84 Tage Klebstoffgruppe.
- Abb. 69. Durchlichtmikroskopie - 84 Tage Kontrollgruppe.
- Abb. 70. Durchlichtmikroskopie - 84 Tage Kontrollgruppe.
- Abb. 71. Durchlichtmikroskopie - 2. Serie 21 Tage Klebstoff.
- Abb. 72. Durchlichtmikroskopie - 2. Serie 21 Tage Klebstoff.
- Abb. 73. Durchlichtmikroskopie - 2. Serie 42 Tage Klebstoff.
- Abb. 74. Durchlichtmikroskopie - 2. Serie 42 Tage Klebstoff.
- Abb. 75. Durchlichtmikroskopie - 2. Serie 42 Tage Klebstoff.
- Abb. 76. Durchlichtmikroskopie - 2. Serie 42 Tage Klebstoff.
- Abb. 77. Rasterelektronenmikroskopie - 7 Tage Kontrollgruppe.
- Abb. 78. Rasterelektronenmikroskopie - 21 Tage Klebstoffgruppe.
- Abb. 79. Rasterelektronenmikroskopie - 42 Tage Klebstoffgruppe.
- Abb. 80. Rasterelektronenmikroskopie - 84 Tage Klebstoffgruppe.
- Abb. 81. Rasterelektronenmikroskopie - 84 Tage Klebstoffgruppe.
- Abb. 82. Transmissionselektronenmikroskopie - Knochenklebstoff.
- Abb. 83. Transmissionselektronenmikroskopie - Knochenklebstoff.
- Abb. 84. Transmissionselektronenmikroskopie - Makrophage.
- Abb. 85. Transmissionselektronenmikroskopie - Makrophage.
- Abb. 86. Transmissionselektronenmikroskopie - Makrophage (Vergrößerung aus Abb. 85).
- Abb. 87. Transmissionselektronenmikroskopie - Mehrkernige Riesenzelle.
- Abb. 88. Transmissionselektronenmikroskopie - Klebstoff-Knochengrenze.

- Tab. 1: Einteilung der Adhäsive in synthetische und biologische Stoffklassen.
- Tab. 2: Ergebnisse der Knochenklebung mit Ostamer von 1960-1961.
- Tab. 3: Versuchsprotokoll - Gruppeneinteilung.
- Tab. 4: Semiquantitativer Score zur Osteotomiebeurteilung.
- Tab. 5: 1.Serie, 7 Tage Röntgen-Score.
- Tab. 6: 1.Serie, 21 Tage Röntgen-Score.
- Tab. 7: 1.Serie, 42 Tage Röntgen-Score.
- Tab. 8: 1.Serie, 84 Tage Röntgen-Score.
- Tab. 9: 2.Serie, 21 Tage Röntgen-Score.
- Tab. 10: 2.Serie, 42 Tage Röntgen-Score.
- Tab. 11: Röntgen-Score, Durchschnittsergebnisse 1. Serie.
- Tab. 12: Röntgen-Score, Durchschnittsergebnisse 2. Serie.

Danksagung

Ich bedanke mich sehr herzlich bei Herrn Univ.-Prof. Dr. Dr. med. Reinhard Schnettler (Direktor der Klinik und Poliklinik für Unfallchirurgie des Universitätsklinikums Gießen) für die Überlassung des Themas dieser Arbeit, die Betreuung als Doktorvater und die Nutzung des Labors für experimentelle Unfallchirurgie.

Bei Dr. med. Christian Heiß möchte ich mich für die sehr gute und intensive Betreuung bedanken. Mit Dr. Heiß als Betreuer entstand ein intensives und freundschaftliches Arbeitsverhältnis und eine Unterstützung, wie sie wahrscheinlich bei nur wenigen Doktoranden zu finden ist. Gerade durch seine Ratschläge, die immer vorhandene Ansprechmöglichkeit und die gemeinsamen Diskussionen konnte diese umfangreiche Arbeit vollendet werden.

Mein weiterer Dank gilt dem Laborteam des „Labors für experimentelle Unfallchirurgie“ der Klinik und Poliklinik für Unfallchirurgie des Universitätsklinikums Gießen. Besonders Frau M. Cassens, Frau A. Hild und Frau PD Dr. med. vet. S. Wenisch.

Vielen Dank auch an die Firma BIOMET Deutschland (Darmstadt und Berlin) für die Zusammenarbeit bei diesem Projekt sowie die fortwährende Unterstützung über den gesamten Zeitraum.

Ich möchte mich weiterhin bei Herrn Prof. Dr. med. Donath für die Einführung in die histologische Osteologie und die gemeinsame Durchsicht der Präparate bedanken.

Ich danke Herrn Univ.-Prof. Dr. Rau (Direktor der Abteilung für diagnostische Radiologie der Justus-Liebig-Universität Gießen) sowie Herrn Dirk Lommel, mit deren Unterstützung die Durchführung der 2D, 3D-Micro-CT Aufnahmen ermöglicht wurde.

Zuletzt ein großer Dank an meine Eltern und meine Freundin Christine für die Unterstützung während der gesamten Arbeit und der Hilfe bei den Korrekturen.

Lebenslauf

PERSÖNLICHE DATEN

Name	Niels Eric Hahn
Geburtsdatum	04. Oktober 1976
Geburtsort	Lich

SCHULBILDUNG

Grundschule Fernwald	1983 – 1987
Pestalozzischule Gießen	1987 – 1989
Gymnasium Liebigschule Gießen	
Abschluss: Abitur	1989 – 1996

ERSATZDIENST

Ersatzdienst als Rettungssanitäter	Juli 1996 – September 1997
------------------------------------	----------------------------

AKADEMISCHE AUSBILDUNG

Immatrikulation an der Justus-Liebig-Universität Gießen im Fach Humanmedizin	Oktober 1997
Ärztliche Vorprüfung	16.09.1999
1. Abschnitt der ärztlichen Prüfung	20.09.2000
2. Abschnitt der ärztlichen Prüfung	09.04.2003
3. Abschnitt der ärztlichen Prüfung	18.05.2004

BERUFLICHE WEITERBILDUNG

Assistenzarzt, Abteilung für Innere Medizin Chefarzt - Dr. med. Jochen Meier Bürgerhospital Friedberg	seit 01.07.2004
Fachkunde Rettungsdienst	01.07.2005
Zusatzbezeichnung Notfallmedizin	28.11.2005