

**Biokompatibilität eines
neuartigen Knochenklebstoffes
im Großtiermodell**

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

vorgelegt von
Janna Schraven
aus Köln

Gießen 2006

Aus der Klinik und Poliklinik für Unfallchirurgie
des Universitätsklinikums Gießen und Marburg GmbH
Standort Gießen

Direktor:
Univ. - Prof. Dr. Dr. R. Schnettler

Gutachter: Priv. - Doz. Dr. Ch. Heiß

Gutachter: Prof. Dr. H. Stürz

Tag der Disputation: 26.04.2007

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Kleber als Fügeverfahren	1
1.2	Historischer Rückblick	2
1.3	Anforderungen an den Kleber	6
1.4	Einsatzmöglichkeiten eines Knochenklebers	7
1.5	Anatomie der vorderen Extremität des Schafes	7
1.6	Struktur des Knochens	8
1.6.1	Makroskopischer Aufbau des Knochens	8
1.6.2	Einteilung nach mikroskopischer Organisationsform	9
1.6.3	Feingewebliche Strukturen des Knochengewebes	10
1.7	Frakturheilung	14
1.7.1	Direkte Frakturheilung	14
1.7.2	Indirekte Frakturheilung	15
1.8	Fragestellung und Zielsetzung der Arbeit	17
2	Material und Methoden	19
2.1	Versuchsmodell Schaf	19
2.2	Versuchstiere	20
2.3	Knochenkleber	21
2.3.1	Synthese und Eigenschaften	21
2.3.2	Degradation (Hydrolyse)	23
2.4	Versuchsplanung und Versuchsablauf	25
2.5	Narkose	28
2.6	Operationstechnik	29
2.6.1	Olecranondefektmodell (spongiöser Bereich)	29
2.6.2	Fraktursegmentmodell der Ulna (kortikaler Bereich)	32
2.7	Intraoperative und postoperative Komplikationen	35
2.8	Perfusion	35
2.9	Röntgendiagnostik	37
2.9.1	Durchführung der Röntgenuntersuchung	37
2.9.2	Dokumentation und Auswertung der Röntgenbilder	38
2.10	Herstellung histologischer Präparate mit Trenn-Dünnschliff-Technik	39
2.10.1	Vorbereitung der Proben für die Einbettung	39

2.10.2	Aufbereitung der Proben	39
2.10.3	Herstellung von Schliffpräparaten	40
2.10.4	Färbungen der unentkalkten Knochendünnschliffe	42
2.11	Feingewebliche Untersuchungen	42
2.11.1	Lichtmikroskopie	42
2.11.2	Semiquantitatives Bewertungssystem	43
2.11.3	Transmissionselektronenmikroskopie (TEM)	46
2.11.4	Spiralcomputertomographie	47
3	Ergebnisse	49
3.1	Röntgenuntersuchungen am Bohrlochdefektmodell (spongiöser Bereich)	49
3.2	Lichtmikroskopie	50
3.2.1	Ergebnisse am Olecranon (spongiöser Bereich)	50
3.2.2	Ergebnisse an der Ulna (kortikaler Bereich)	71
3.2.3	Ultrasemidünnschnitte (kortikaler Bereich)	79
3.3	Transmissionselektronenmikroskopie (spongiöser Bereich)	82
3.4	Semiquantitatives Bewertungssystem (spongiöser Bereich)	85
3.5	Spiralcomputertomographie (spongiöser Bereich)	88
4	Diskussion	94
5	Zusammenfassung	110
6	Summary	112
7	Literaturverzeichnis	113
8	Erklärung	119
9	Danksagung	120
10	Lebenslauf	121

1 Einleitung

1.1 Kleber als Fügeverfahren

In den letzten Jahrzehnten hat der Einsatz von Klebstoffen in der Industrie beim Verbinden unterschiedlicher Materialien zugenommen und bewährte Verfahren wie das Schrauben, Nieten, Nageln, Löten und Schweißen teilweise abgelöst.

In der Medizin, vor allem in der Chirurgie, haben sich Klebstoffe bis heute nicht durchsetzen können. Nach wie vor werden sowohl Frakturen mit Nägeln, Platten und Schrauben fixiert als auch die Weichteile mit Nähten und Klammern versorgt. Dabei würde ein Knochenkleber entscheidende Vorteile bieten.

Ein Klebstoff verbindet getrennte Materialien schnell und einfach. Er wirkt sich auf die gesamte Oberfläche aus und sichert somit im Unterschied zu Platten und Schrauben eine gleichmäßige flächenhafte Kraftverteilung. Darüber hinaus kann er gleichzeitig alle Materialunebenheiten ausgleichen und eine Schwingungsdämpfung bewirken [19].

Ein anderer wichtiger Vorteil ist die Verminderung bzw. Vermeidung von Stress und Gewebeschäden in der Knochenheilung bei der Verwendung von elastischem Kleber anstelle von metallischen Implantaten mit hoher Rigidität und Steifheit [65]. Schrauben, Nägel und Platten können zu Durchblutungsstörungen und Gewebeirritationen führen. Eine häufige Komplikation der Osteosynthesebehandlung stellt die Metallose dar.

Unter einer Metallose versteht man die lokalen Weichteil- und Knochenschädigungen in der Umgebung von metallischen Knochenimplantaten, wobei das Metall als Fremdkörper wirkt und eine unspezifische Entzündung auslöst [1]. Sie hat einen negativen Einfluss auf den Heilerfolg. In nahezu 5 % der Osteosynthesen tritt eine Metallose auf, die zu einer Lockerung der Implantate führen kann.

Des Weiteren muss herkömmliches Implantatmaterial durch einen „zusätzlichen“ operativen Eingriff entfernt werden. Damit steht der Patient ein zweites Mal vor allen Risiken und Gefahren dieser Operation. Ein möglicherweise erforderlich werdender stationärer Aufenthalt und der entstandene Arbeitsausfall, als auch die Operation zur Materialentfernung bedeuten zusätzliche Kosten für das Gesundheitswesen.

1.2 Historischer Rückblick

Die Klebstoffe können in zwei große Stoffklassen unterteilt werden. Zum einen gibt es die seit 1870 „synthetisch hergestellten körperfremden Klebstoffe“, zum anderen gibt es die vom Ursprung her „biologischen körpereigenen oder körperähnlichen Adhäsive“, die heutzutage auch synthetisch und industriell hergestellt werden (Tab. 1).

Biologische Klebstoffe	Gelatine-Resorcin-Aldehyd-Klebstoffe Protein-Aldehyd-Systeme Fibrinklebstoffe Klebstoffe auf Peptidbasis Resorbierbare Oligo- und Polyactone
Synthetische Klebstoffe	Epoxidharze Polyurethane (Alkyl-) Cyanoacrylate Polymethylmethacrylate= PMMA

Tab. 1 Übersicht der biologischen und synthetischen Klebstoffe.

Biologische Klebstoffe:

1772 wurde „Plaster of Paris“, der Gipsverband, eingeführt, der heutzutage immer noch als konservatives Mittel zur Knochenfrakturheilung eingesetzt wird [65]. 1931 stellte HENDRI [26] den ersten Knochenklebstoff, **Ossocol**, ein Proteingemisch aus Kollagen von Knochen und Bindegewebe, vor. Starke lokale und allgemeine Reaktionen verhinderten den weiteren Gebrauch [19, 63].

Der 1966 in den USA entwickelte **Gelatin-Resorcin-Aldehyd-Gewebeklebstoff** wurde experimentell und klinisch an der Haut, an Gefäßen und an parenchymatösen Organen eingesetzt. Eine aufwendige Zubereitung und eine histotoxische Reaktion sprachen gegen weitere Versuche [19]. Später wurde Formaldehyd durch die weniger toxischen Dialdehyde (Glutaraldehyd, Glyoxal) ersetzt und heutzutage vor allem bei der Rekonstruktion von Aortenklappen, bei der Behandlung von Aortendissektion [14], bei der Fixierung von Implantaten und Transplantaten sowie bei der blutdichten Abdichtung chirurgischer Nähte genannt.

In den **Protein-Aldehyd-Systemen** werden Proteine direkt als reaktive, vernetzbare Komponenten eingesetzt. Als Anwendungsbereich wird die Beschichtung bzw. Primärabdichtung künstlicher Gefäßprothesen diskutiert. Seit 1998 wird in Europa auch ein chirurgischer Klebstoff (**BioGlue®**) vertrieben, der zur Unterstützung der

konventionellen Technik (chirurgische Naht) bei der Behandlung von Aortendissektionen eingesetzt werden kann.

Seit Beginn der 70er Jahre werden **Fibrinklebstoffe** verwendet. Weil der Klebstoff aus körpereigenen Substanzen besteht, ist seine Verträglichkeit hervorragend, allerdings besteht ein geringes Risiko für die Übertragung von Viruserkrankungen, z.B. Hepatitis. Der Abbau des Fibrinklebstoffes geht in wenigen Tagen vonstatten, was besonders für die Haut und parenchymatöse Organe erfreulich ist, für den Knochen aber in vielen Fällen zu kurz sein könnte [19]. Heute werden Fibrinklebstoffe zur Unterstützung der chirurgischen Naht oder deren Einsparung in mechanisch gering belasteten Bereichen, z.B. dem Verschluss von Rissen an inneren Organen wie Milz oder Leber angewendet.

Klebstoffe auf Peptidbasis bieten sich als natürliche, im Organismus vorkommende Substanzen hinsichtlich ihrer Bioverträglichkeit und Bioabbaubarkeit für die Medizin an. 1991 synthetisierten RIMPLER et al. aushärtende Zweikomponenten-Klebstoffsysteme, sogenannte **Peptoplaste**, auf der Basis acrylierter bzw. methacrylierter Aminosäuren und Peptide [4]. Im Tierversuch zeigten diese Klebstoffe bei der Verklebung von kleineren Knochenfragmenten bezüglich der Klebefestigkeit und Verträglichkeit gute Ergebnisse, wiesen aber eine unvollständige Biodegradation auf [50].

Eine andere Entwicklungsrichtung orientierte sich an **marinen Organismen**. Marine Weichtiere und Würmer bilden Klebstoffe auf Proteinbasis, die im Meerwasser bei unterschiedlichen Temperaturen aushärten und erstaunliche Klebefestigkeiten auf verschiedenen Materialien aufweisen. Die modernen Methoden der Gentechnik könnten hier in nächster Zeit eine Alternative bieten.

Resorbierbare Oligo- und Polyactone haben in jüngster Zeit als Osteosynthese - Hilfsmittel (Pins, Schrauben, Platten) sowie als Trägermaterialien für Pharmaka wachsende Aufmerksamkeit erlangt. Eine freie terminale Hydroxylgruppe, die für Modifizierungen, unter anderem zur Einführung vernetzungsfähiger Gruppierungen, geeignet ist, ermöglicht die Herstellung von Klebstoffen auf Polyacton-Basis. Ein solcher Klebstoff wurde 1993 von der Firma Focal Inc. in den USA entwickelt. Die Aushärtung zu einem Hydrogel wird photochemisch durch UV-Bestrahlung vorgenommen. Seit 1998 wird das Produkt in Deutschland vertrieben und

hauptsächlich zum Verschluss von Luftleckagen nach Lungenoperationen verwendet [64].

Synthetische Klebstoffe:

Ende der 50er Jahre traten **Epoxidharze**, duroplastische Kunstharze, die durch Reaktion von Epichlorhydrin mit aromatischen Dihydroxiverbindungen entstehen [19] in den Vordergrund. Der Australier BLOCH scheiterte 1958 bei dem Versuch diaphysiale Frakturen an Vorderläufen von Schafen mit **Araldit**®, einem Kunststoffkleber aus Ethoxylinharzen, zu kleben aufgrund von auftretenden Infektionen und der zu fetthaltigen und feuchten Umgebung [5]. 1956-59 erzielte der Russe GOLOVIN gute Ergebnisse mit **Osteoplast**® an 32 Patienten mit frischen und pathologischen Frakturen und Pseudarthrosen [20, 21]. RIETZ [50] konnte 1964 beweisen, dass Epoxidharze weitere Schwächen wie eine geringe Resorption und knöcherne Durchbauung sowie hohe Polymerisationshitze und mangelnde Biokompatibilität aufweisen.

Bei dem 1959 aus den USA stammenden **Poly-Urethan-Hartschaum Ostamer**® waren neben der hohen Polymerisationstemperatur von 70°C [28; 49], dem Verlust der Adhäsion im Feuchten [19], den lokalen Wundheilungsstörungen [7], der fehlenden Resorption und der bindegeweblichen Abkapslung des Klebstoffs die Lockerung der Poly-Urethan-Knochenverbindung und Ostamerbrüchigkeit die Hauptgründe für ein Fehlschlagen des Ostamers [7; 49; 70]. Seit ca. 1981 dienen die Verbände aus der gleichen Substanz, der Poly-Urethanverbindung, als Gipsersatz, Baycast®, Neofrakt®.

1959 wurde durch Zufall die hohe Klebekraft von **Cyanoacrylaten**, die auch in feuchter Umgebung gut binden, von COOVER et al entdeckt [10]. Sie sind als Sekunden- und Sofortkleber in der Bevölkerung bekannt. Die Knochenklebeversuche mit Cyanoacrylaten waren meist erfolglos.

Wegen der hohen Gewebetoxizität der kurzen Alkylketten von **Biobond**®, ein Gemisch aus Ethylcyanoacrylaten, Polyisocyanaten und Nitril-Gummi [63], und der zeitweise diskutierten karzinogenen Wirkung, wurden Methylcyanoacrylate schließlich von den lebensmitteltechnischen und pharmazeutischen Behörden für den menschlichen Gebrauch verboten.

Weitere Studien mit **Bucrylaten**, Butyl- und Isobutylcyanoacrylaten zeigten eine eher benigne Gewebereaktion, aber da die Wirkstoffe bis zu vier Monate im Gewebe verblieben, stellten sie eine Barriere für die Kallusformation dar [63].

Cyacrin, Ethylcyanoacrylate wurden 1963 zunächst an Labortieren getestet, um dann wegen guter Bioadhäsion und Frakturheilung klinisch an offenen und geschlossenen diaphysären Frakturen, Rippen-, Phalangeal- und Metacarpalfrakturen getestet zu werden. TKACHENKO und RUTSKI [60] berichteten von durchgängiger Biodegradierbarkeit, guter Heilung und einer minimalen Gewebereaktion. 1972 entwickelte POLJAKOW [48] das Verfahren „Knochenschweißen“, bei dem ein Cyanoacrylat-Knochenmehlgemisch mit Ultraschall zur Sofortpolymerisation gebracht und in ein hartes Knochenkonglomerat verwandelt wurde. Cyanoacrylate und die Schweißmethode zeigten Schwächen wie hitzebedingte Osteonekrosen, hohe Infektionsraten, schwere lokale Toxizität, schlechte Resorption, fehlender Zusammenschluss und dislozierte Frakturenden [69].

Polymethylmethacrylate (=PMMA) sind seit 1930 in der Zahnmedizin vertreten. **Palacos**, ein deutsches Methylmethacrylatpräparat, ist ein schnellhärtender, thermoplastischer Polymerisationskunststoff. 1962 zeigte HULLINGER [29] an Gewebekulturen die gute Gewebeverträglichkeit des ausgehärteten Methacrylats, im Gegensatz zu der auf das Monomer zurückzuführende Zytotoxizität des noch flüssigen Gemisches. ZOLLINGER [71] fand in der Umgebung des Palacos weder einen Abbau noch reaktive Erscheinungen, wie die Bildung von Granulationsgewebe, vor. Späte Dislokationen und fehlende Klebung [9, 13] sprachen gegen ihren Gebrauch als Knochenklebstoff.

Bei der Auswertung der Literatur über adhäsiven Osteosynthesen waren widersprüchliche Aussagen über die Wirksamkeit und Gewebeverträglichkeit (=Histobiokompatibilität) der unterschiedlichen Klebstoffe zu finden. Aus dem historischen Rückblick ist ersichtlich, dass jeder Klebstoff, der nicht abgebaut wird und die Frakturfläche bedeckt, in einem nicht akzeptablen hohen Prozentsatz zu einer fehlenden Bindung (nonunion) führt. Nur die mit langen Alkylketten bestückten Cyanoacrylate, Fibrin und Polymethylmethacrylate scheinen gut vom Gewebe toleriert zu werden.

1.3 Anforderungen an den Kleber

Ein Knochenklebstoff könnte eine einfache und schnelle Methode darstellen, um Abriss- und Kleinfragmentfrakturen wieder zu fixieren. Um den Anforderungen in der Medizin gerecht zu werden, sollte der Klebstoff die in Tabelle 2 aufgeführten Kriterien erfüllen (Tab. 2). Knochenklebstoffe sind nur nützlich und verwendbar, wenn sie initial eine ausreichend starke Bindung für eine provisorische oder endgültige Fixation gewährleisten können [63], bis das Gewebe infolge einer physiologischen Heilung diese Funktion wieder selbst übernehmen kann.

Biohistokompatibilität	weder toxisch, karzinogen, teratogen noch embryotoxisch bioresorbierbar in einem definierten Zeitraum keine große Temperaturentwicklung während der Aushärtung
ausreichende Festigkeit	ausreichend elastisch, hohe Klebefestigkeit gutes Haftvermögen an feuchten, fettigen und spongiösen Oberflächen
einfache Handhabung	leichte Anwendung und Applizierbarkeit
weitere Eigenschaften	schnelle Aushärtung des Klebstoffes keine Volumenänderung sterilisierbar wirtschaftlich durchführbar

Tab. 2 Anforderungen an einen Knochenklebstoff.

Ziel eines jeden Eingriffs sollte die völlige Wiederherstellung der knöchernen Feinstruktur sein, welches die Grundlage einer langfristigen Stabilität gewährleistet. Der Knochenkleber muss deshalb vollständig abgebaut und mit vitalem Knochen ersetzt werden können. Eine Osteogenese sollte während der Präsenz des Knochenklebers möglich sein. Der Klebstoff muss ausreichend elastisch, viskös und zähflüssig sein, um von seinem Applikationsort nicht wegfließen zu können. Außerdem dürfen weder lokal- oder systemtoxische noch mutagene, karzinogene oder embryotoxische Nebenwirkungen nachweisbar sein. Der Kleber sollte leicht sterilisierbar sein und auch in feuchter Umgebung und an fettigen Oberflächen, wie spongiösem Knochen, fest haften. Bei der Applikation sollten keine größeren Temperaturen entstehen, um Wärmeschäden im Gewebe (Hitzenekrosen) zu vermeiden.

Eine einfache Anwendung und Umsetzung ist wünschenswert, damit jeder operativ-chirurgisch tätige Arzt ohne zusätzliche Schulung den Knochenkleber erfolgreich nutzen kann. Schließlich muss der Knochenkleber aus ökonomischer Sicht in seiner Herstellung und Aufbewahrung wirtschaftlich sein.

1.4 Einsatzmöglichkeiten eines Knochenklebers

Die Beobachtungen und die Ergebnisse, die in diesem Großtiermodell gewonnen wurden, sollen dazu beitragen, die Versorgung von Frakturen in Zukunft zu optimieren. Besonders bei Trümmerfrakturen in Verbindung mit einer Osteosynthese sowie zur Refixation von kleinen Fragmenten ohne zusätzliche osteosynthetische Maßnahmen könnten durch den neu entwickelten Knochenkleber verbesserte Knochenheilungen bewirkt werden. Vor allem die weniger stark belasteten und beanspruchten Knochen dürften für die Kleberanwendung von Interesse sein.

In anderen operativen Fachgebieten, wie der Mund-Kiefer-Gesichts-Chirurgie und der Neuro-Chirurgie, könnte bei der Versorgung der überwiegend filigranen Frakturen und Abrissfrakturen die Anwendung des Knochenklebers ebenso hilfreich sein.

Der Knochenkleber könnte darüber hinaus als Träger für Medikamente verwendet werden, wie z. B. die bekannten antibiotikahaltigen Knochenzemente. Dies setzt die Resorbierbarkeit und Biokompatibilität des Klebers gegenüber dem umliegenden Gewebe voraus. Bei der zementierten Verankerung von Implantaten kommen heutzutage antibiotikahaltige Knochenzemente, wie z.B. das mit **Gentamicin** versetzte **Refobacin-Palacos®**, zum Einsatz. Sowohl bei der Knochendefektbehandlung als auch in der Endoprothetik ist eine lokale antibiotische Behandlung sinnvoll, um bakterielle Infektionen zu verhindern, die zu ernststen Komplikationen führen können [38].

1.5 Anatomie der vorderen Extremität des Schafes

Das Skelett des Unterarms (Antebrachium) wird von zwei Knochen, der Speiche (Radius) und der Elle (Ulna), gebildet (Abb. 1). Die Ulna liegt dem Radius am proximalen Ende des Unterarms kaudal bis kaudolateral an und zieht bis zum distalen Ende auf die laterale Seitenfläche des Radius [36].



Abb. 1 Skelett des linken Unterarms eines Rindes (C Lateralansicht und D Medialansicht) [36].

Die Knochen des Unterarms sind phylogenetischen Entwicklungsvorgängen unterworfen. Bei den Vierfüßern kommt es zu einer Verbindung der Knochen mit Einschränkung bzw. Aufhebung ihrer Beweglichkeit unter gleichzeitig unterschiedlich starker Rückbildung des distalen Abschnittes der Ulna. Beim Schaf sind Ulna und Radius durch Verwachsung in Pronationsstellung fixiert [44].

1.6 Struktur des Knochens

1.6.1 Makroskopischer Aufbau des Knochens

Makroskopisch unterscheidet man am ausdifferenzierten Knochen zwei Schichten (Abb. 2). Die innere, **Substantia spongiosa**, besteht aus feinen Bälkchen oder Blättern, die sich in alle Richtungen verzweigen und so ein schwammartiges Netzwerk errichten, dessen Hohlräume von Knochenmark erfüllt sind. Die äußere, **Substantia corticalis** oder **compacta**, erscheint dagegen makroskopisch als dichte Masse ohne sichtbare Zwischenräume [18].

Bei den Röhrenknochen wie dem Femur oder auch der Ulna besteht der Schaft (=Diaphyse) aus Kompaktaknochen (=Kortikalis), der die Markhöhle als dickwandige Röhre umgibt. Die Enden der Röhrenknochen, die Epiphysen, als auch der Bereich

zwischen Diaphyse und Epiphyse (= Metaphyse) werden vorwiegend von Spongiosaknochen gebildet, der nur in der Peripherie von einer dünnen Schicht von Kortikalis umhüllt ist.

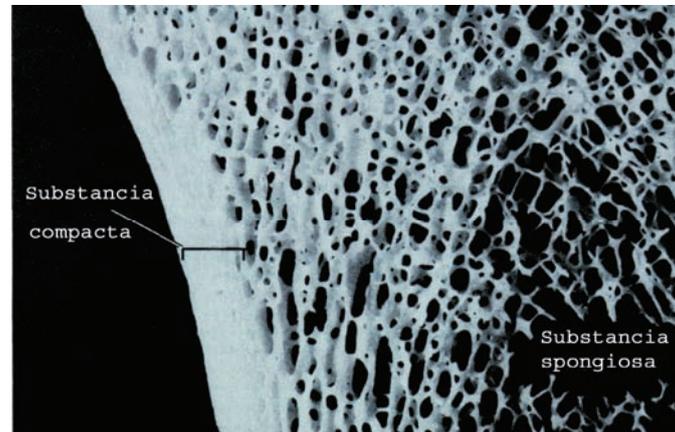


Abb. 2 Makroskopischer Aspekt eines Knochens. Auf einem Bild lassen sich Kompakta und Spongiosa unterscheiden (Mazerationspräparat einer Tibia) [15].

1.6.2 Einteilung nach mikroskopischer Organisationsform

Die Knochenneubildung unterliegt einem kontinuierlichen Reifeprozess. Ein neu entstandenes Faserknochenbälkchen ist noch ganz aufgelockert, unregelmäßig angeordnet und enthält viele Knochenzellen und schmale Osteoidbänder. Das Knochenbälkchen wird zunehmend dichter formiert und mineralisiert. Besitzt es weiterhin eine geflechtartige Struktur, wird es **Geflecht- oder Faserknochen** genannt. Die Geflechtknochenbälkchen sind in einem lockeren und zellreichen bindegewebigen Stroma eingebettet. Geflechtknochen findet man im embryonalen Skelett an vielen Orten. Beim erwachsenen Menschen kommt er nur noch an den Einstrahlungsstellen von Sehnen und Bändern, stellenweise in der knöchernen Labyrinthkapsel und im knöchernen äußeren Gehörgang [6] sowie bei rasch ablaufenden Reparaturprozessen vor. Dieses unreife Knochengewebe wird durch einen in mechanischer und biologischer Hinsicht höher differenzierten Knochen umgewandelt.

Osteoklasten lösen Knochengrundsubstanz heraus, sodass von Markgewebe und Gefäßen erfüllte, unregelmäßige Hohlräume entstehen. Wenn diese eine gewisse Größe erreicht haben, erscheinen Osteoblasten an ihrer Oberfläche, und die Lichtung wird durch neu gebildete, mehr oder weniger konzentrische

Knochenlamellen (sog. Schaltlamellen) bis auf einen zentral, oft auch etwas exzentrisch gelegenen Kanal allmählich wieder aufgefüllt (Abb.3). Solche Lamellensysteme, die man als Osteone bezeichnet, werden nun überall eingebaut, fertige Osteone jedoch auch wieder arrodirt [6].

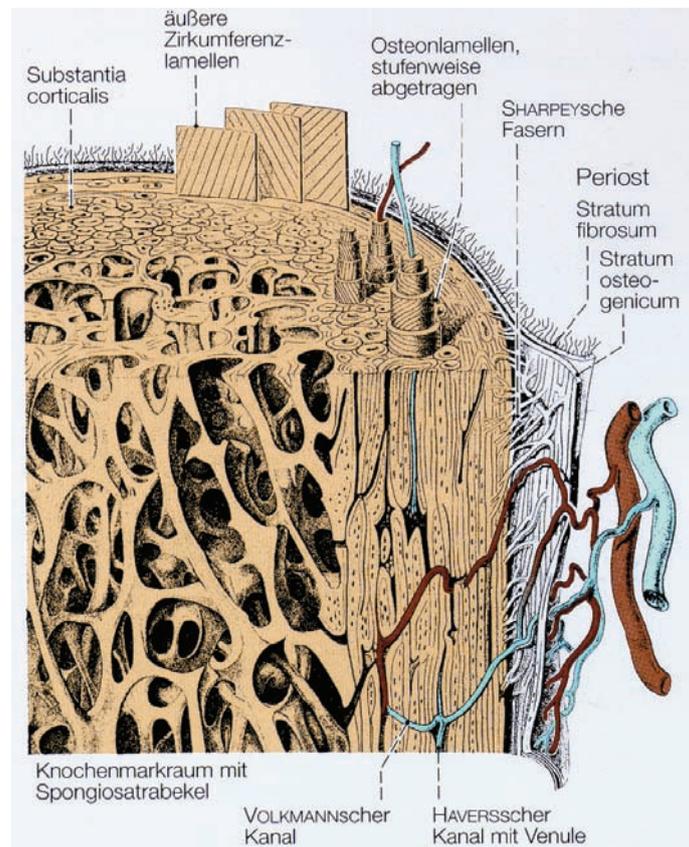


Abb. 3 Schema vom Aufbau eines Knochens. [3].

Die Gefäßversorgung des Knochens erfolgt vorwiegend vom Markraum, aber auch vom Periost aus. In der Längsachse der Röhrenknochen verlaufen die Gefäße im Zentrum der Osteone, in den **Haversschen Kanälen**. Zu anderen Osteonen weisen diese Kanäle Querverbindungen auf, die sogenannten **Volkmannschen Kanäle** [3].

1.6.3. Feingewebliche Strukturen des Knochengewebes

Beim Knochengewebe handelt es sich um ein mesenchymales Gewebe, in dem die Knochenzellen die Fähigkeit zur Proliferation und zur Differenzierung haben und beibehalten [1]. In der Abbildung 4 ist die mögliche Entwicklungsreihe der Zellen des Knochens dargestellt.

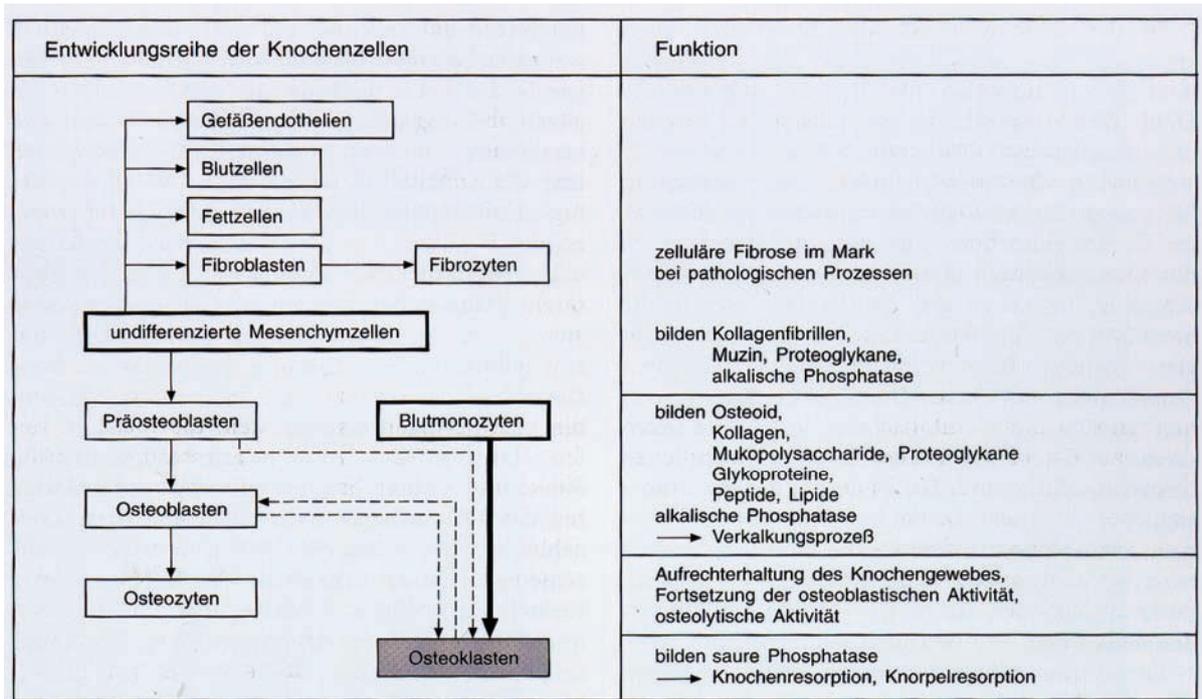


Abb. 4 Herkunft und Funktion der Knochenzellen [1].

Präosteoblasten oder **Osteoprogenitorzellen** sind die Stammzellen der Knochenzellen. Sie entstehen aus undifferenzierten Mesenchymzellen, die stets im Knochen vorhanden sind, und reifen zu **Osteoblasten**, den eigentlichen Knochenbildnern, aus.

Die **Osteoblasten** sind für die Synthese der organischen Bestandteile der Knochengrundsubstanz wie von Kollagen, Proteoglykanen und Glykoproteinen verantwortlich [32]. Osteoblasten liegen an der Oberfläche von Knochenbälkchen perlschnurartig einschichtig, manchmal auch mehrschichtig, dicht nebeneinander (Abb. 5) und stehen durch feine zytoplasmatische Fortsätze in Verbindung. Sie bilden neben Typ-I-Kollagen vor allem Osteoid, die neu gebildete, noch nicht verkalkte Knochengrundsubstanz. Das Osteoid wird an der basalen Seite gebildet und an der Knochenoberfläche abgelagert, um nach der konsekutiven Verkalkung zur Verbreiterung der jeweiligen Knochenstruktur zu führen. Daneben sezernieren Osteoblasten **alkalische Phosphatase**, mit der sie die primäre Mineralisation des Osteoids steuern. Nach Abschluss der Knochenbildung werden die meisten Osteoblasten in die Knochenmatrix eingemauert und werden zu **Osteozyten**, umgewandelt, andere gehen zugrunde und weitere werden offenbar wieder zu Vorläuferzellen.

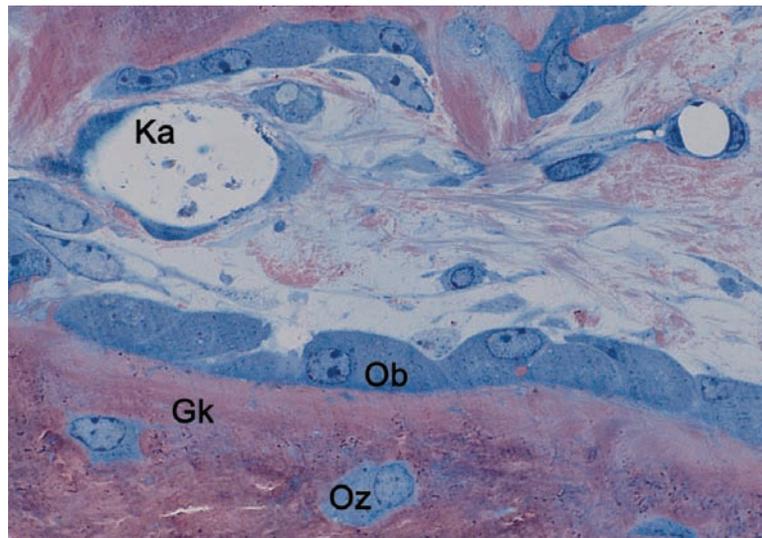


Abb. 5 Osteozyten (Oz) entstehen aus Osteoblasten (Ob) durch Einmuerung in die mineralisierte Matrix. Geflechtknochen (Gk), Kapillare (Ka). Semidünnschnitt der Ulna. Toluidinblau, Safranin, 100x, Laboratorium für experimentelle Unfallchirurgie, Universität Gießen.

Die **Osteozyten** als dominierender Zelltyp des reifen Knochens sind die eigentlichen Knochenzellen und dienen der Knochenerhaltung. Ein Osteozyt bezeichnet eine Zelle, die ringsherum mit Knochengrundsubstanz eingeschlossen ist. Reife Osteozyten liegen mit ihrem rundlichen oder länglichen Kern in kleinen knöchernen Höhlen, den **Lakunen**, in verkalkter Grundsubstanz, die durch feine filopodienartige Zytoplasmafortsätze in Verbindung stehen. Innerhalb des verkalkten Knochengewebes liegt somit ein synzytiales Zellsystem vor, in dem lebhafte Stoffwechsellauschvorgänge passieren und das die Vitalität des Knochengewebes kennzeichnet [1]. Leere Osteozytenlakunen sprechen dagegen für eine Nekrose [59]. Die flachen mandelförmigen Osteozyten behalten eine gewisse Stoffwechselaktivität bei. Es gibt 2 funktionell verschiedene Typen:

Die **osteolytischen Osteozyten** können in ihrer unmittelbaren Umgebung durch Osteozyten-Osteolysen die Interzellulärsubstanz auflösen und Knochenminerale resorbieren [18]. Die **osteoblastären Osteozyten** dienen der Erhaltung der vorhandenen Grundsubstanz. Diese Knochenzellen können offenbar Kalziumphosphat in ihrem Zytoplasma konzentrieren und später Kalzium und Phosphat zum Aufbau der interzellulären Substanz verwenden.

Wie in der Abbildung 4 dargestellt, ist die Herkunft der **Osteoklasten** nicht ganz geklärt. Wahrscheinlich leiten sie sich von den Blutmonozyten, dem monozytären

Makrophagensystem, ab [1] und entstehen durch Fusion von Monozyten oder Makrophagen („Präosteoklasten“) [18]. Osteoklasten sind knochen-zerstörende Zellen von sehr variabler Form und Größe (Abb. 6).

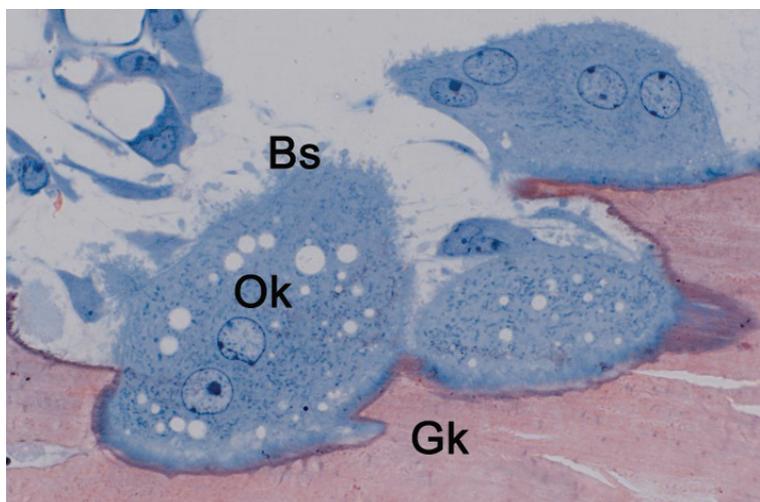


Abb. 6 Lichtmikroskopische Aufnahme eines Osteoklasten (Ok) mit Bürstensaum „ruffled border“ (Bs), Geflechtknochen (Gk), Semidünnschnitt der Ulna. Toluidinblau, Safranin, 100x, Laboratorium für experimentelle Unfallchirurgie, Universität Gießen.

Die Osteoklasten besitzen einen sehr großen azidophilen Zelleib, der 50 oder mehr Zellkerne enthalten kann, weshalb sie auch Riesenzellen genannt werden. Sie besitzen viele Verzweigungen, die unregelmäßig geformt und unterschiedlich dick sind [32]. Osteoklasten können sich amöboid fortbewegen und enthalten das Enzym **saure Phosphatase**. Osteoklasten spielen eine bedeutende Rolle bei der Knochenresorption, der genaue Mechanismus ist noch unbekannt. Sie sind meist in tiefen Howshipschen Lakunen anzutreffen, wo verkalkte Knochengrundsubstanz herausgelöst wurde. Die dem resorbierten Knochen zugewandte Zelloberfläche zeigt eine wie von einem Bürstensaum hervorgerufene unregelmäßige Querstreifung. Auf der Grundlage elektronenmikroskopischer Untersuchungen spricht man heute von einer „ruffled border“, denn die Zelloberfläche zeigt tiefe Einfaltungen und Ausstülpungen [18]. Osteoklasten bilden osteolytische Fermente, wodurch die Knochenresorption ermöglicht wird. Nach beendeter Resorption bleibt eine leere Lakune zurück, die histologisch eine abgelaufene Knochenresorption anzeigt. Dieser lakunären Resorption steht die glatte Resorption gegenüber. Bei dieser erfolgt ein schleicher Knochenabbau durch einkernige Zellen, die sich enzymhistochemisch durch den intrazytoplasmatischen Nachweis von **saurer Phosphatase** als

Osteoklasten identifizieren lassen. Hierbei werden die Knochenbälkchen gleichmäßig verschmälert, ohne dass sich Howshipsche Lakunen ausbilden [1].

1.7 Frakturheilung

Eine Fraktur ist eine vollständige oder unvollständige Kontinuitätstrennung eines Knochens, die durch eine direkte oder indirekte Gewalteinwirkung zustande kommt und mit Schmerzen und einem Funktionsverlust einhergeht [1].

Die Ursachen können eine **direkte Fraktur** sein, die durch adäquate Gewalteinwirkung von außen auf den Knochen entstanden ist, eine **pathologische** oder **Spontanfraktur** wegen eines krankhaft veränderten Knochens, wie z.B. bei Tumormetastasen, oder eine **Ermüdungsfraktur** nach lang andauernder mechanischer Überbeanspruchung des Knochens ohne eigentliches Unfallereignis. Um eine rasche und ungestörte Knochenheilung zu gewährleisten, müssen die Reposition, die Ruhigstellung sowie eine adäquate Blutversorgung gegeben sein.

1.7.1 Direkte Frakturheilung

Die **direkte Frakturheilung**, früher als **primäre Knochenbruchheilung** bezeichnet, wird bei unter Kompression stehenden Frakturrenden nach Plattenosteosynthese oder Fissuren beobachtet (Abb. 7).

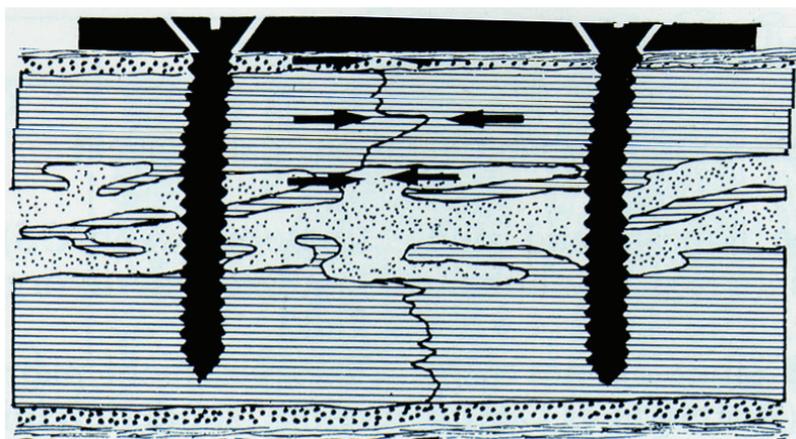


Abb. 7 Die Primäre Knochenbruchheilung unter Osteosynthese [37].

Diese Form bildet keinen Geflechtknochen aus, es kommt vielmehr zu einer direkten Überbrückung der gegenüberliegenden Frakturrenden. Es proliferieren in den Pfeilrichtungen junge Zellen des Periosts, der Haversschen Kanäle und des Endosts. Sie differenzieren sich in Osteoblasten, die neuen Knochen synthetisieren. Währenddessen entfernen die aktivierten oder in situ gebildeten Osteoklasten die Knochentrümmer. Diese primäre Regulation ist von keiner Kallusbildung begleitet und verläuft wie ein Knochenumbau [37].

1.7.2 Indirekte Frakturheilung

Die indirekte Frakturheilung findet man bei der konservativen Frakturbehandlung sowie bei der Stabilisation durch Marknagelosteosynthese und dem Fixateur externe. Hierbei ist charakteristisch, dass die Knochenneubildung nicht direkt, sondern über endostale und periostale Kallusbildung verläuft. Folgende Phasen werden nach der Verletzungsphase (Fraktur) durchlaufen (Abb. 8):

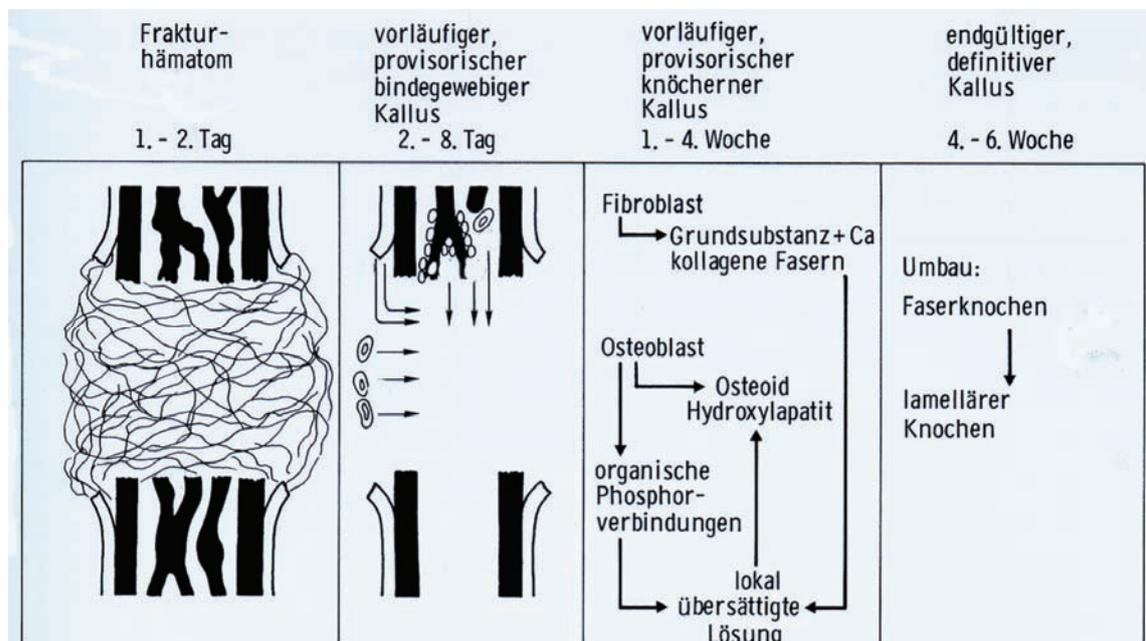


Abb. 8 Schema des zeitlichen Verlaufs der Frakturheilung [1].

Entzündungsphase: Bei der Fraktur kommt es zu Einrissen von osseären Blutgefäßen und zu einer Blutung im Frakturspalt. Es entwickelt sich zwischen den Frakturrenden ein Frakturhämatom mit lokaler Infiltration von Granulozyten, Mastzellen und Monozyten, die abgestorbenes Gewebe entfernen.

Am 2. Tag wandern Fibroblasten, Kapillaren und Osteoklasten, die die Knochenbruchstücke beseitigen, in das Blutgerinnsel und bilden junges Bindegewebe. Die oberflächlichen Periostzellen differenzieren sich in Chondroblasten und Chondrozyten, die einen faserknorpeligen Kallus produzieren (Abb. 9) [37].

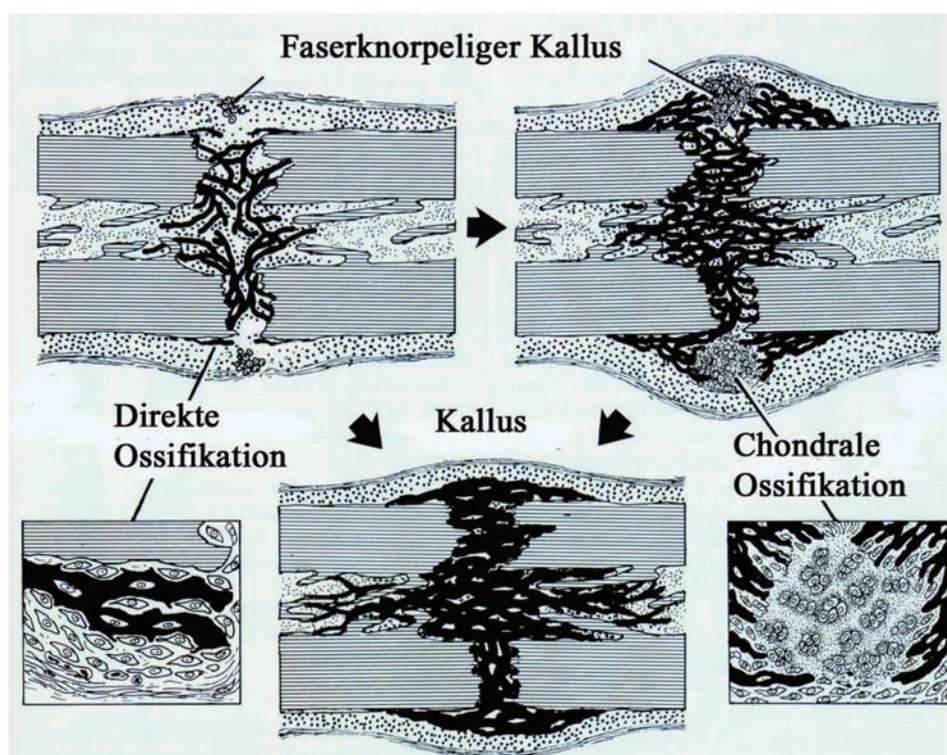


Abb. 9 Frakturheilung mittels der direkten Ossifikation und der chondralen Ossifikation [37].

Innerhalb einer Woche entsteht ein provisorischer bindegewebiger Kallus. Kallus ist die Bezeichnung für das sich verfestigende Gewebe, das sich aus dem Granulationsgewebe sowie vom Periost und Endost ausbildet. Wichtig für die spätere Zellinfiltration, Angiogenese und Zelldifferenzierung ist die Freisetzung von Wachstumsfaktoren und Zytokinen. Die Blutversorgung, die vor allem aus den periostalen Gefäßen stammt, steigt auf ein Vielfaches der normalen Durchblutung.

Granulationsphase: Ein provisorischer knöcherner Kallus entsteht in der 1. bis 4. Woche. Neben den lokal wirksamen Wachstumsfaktoren, die den Aufbau eines Granulationsgewebes steuern, sind auch die Kalzium-, Parathormon- und Vitamin-D-Stoffwechsel in den Reparationsvorgang einbezogen. Fibrozyten und Osteoblasten synthetisieren verstärkt Kollagen Typ I. Zusätzlich kommt es zur Ausschüttung von

Matrixproteinen (Osteocalcin, Osteogenin), die den Abbau nekrotischen Knochengewebes durch Osteoklasten und die Knochenneubildung durch Osteoblasten fördern, die nach dem Prinzip der direkten Ossifikation Knochenbälkchen bilden. Wenn der Kallus nicht allzu groß ist, kann die Knochenregulation damit beendet sein.

Sollten aber in diesem Stadium der Frakturheilung Schub- und Scherkräfte auf den Knochen einwirken und eine schlechte Immobilisation der Knochenfragmente andauern, vergrößert sich zum einen der Kallus und zum anderen kann im Kallus durch enchondrale Ossifikation Knorpelgewebe ausgebildet werden („Knorpelkallus“) [1]. Damit entsteht eine verzögerte Knochenspaltheilung bis hin zur Pseudarthrose.

Phase der Kallushärtung: Nach 4 bis 6 Wochen entwickelt sich der definitive Kallus. Der faserknorpelige Kallus wird nach den Prinzipien der chondralen Ossifikation entfernt, das heißt zuerst erodiert und dann durch einen Knochenkallus ersetzt. Dabei kommt es zu einer zunehmenden Mineralisation der Grundsubstanz. Der ausgebildete Geflechtknochen erfährt seine Orientierung in Richtung der Belastungsachse. Diese Phase dauert 3-4 Monate. Der Knochen erreicht dadurch seine Steifigkeit.

Remodellingphase (mehrere Monate): Der Geflechtknochen wird in Lamellenknochen umgewandelt. Die ursprüngliche Knochenstruktur von Kortikalis und Spongiosa wird wiederhergestellt. Dazu gehören auch die reguläre nutritive Versorgung sowie die Ausbildung eines durchgehenden Markraumes.

1.8 Fragestellung und Zielsetzung

Das Kleben von Fragmenten stellt eine zukunftsorientierte attraktive Alternative zur heutigen Osteosynthese in der experimentellen und klinischen Unfallchirurgie und Orthopädie dar. Derzeit gibt es keine aktuellen Studien, die sich mit dem Einsatz von Knochenklebern bei der Refixation von Fragmenten befassen. Im Rahmen dieses Projektes könnten sich neue Erkenntnisse für eine verbesserte Frakturversorgung ergeben. Die notwendigen Grundlagen für die Anwendung des Knochenklebers zur Optimierung der Behandlung von Frakturen sollen in dieser experimentellen Arbeit beschrieben und analysiert werden.

Dabei soll der Knochenkleber sowohl im metaphysären, also spongiösen Bereich des Olecranon am Großtier Schaf als auch im diaphysären, also cortikalen Bereich der Schafsulna untersucht und gegeneinander verglichen werden. Im Vordergrund steht dabei die Beurteilung der Biokompatibilität und der Degradation des neuartigen bioresorbierbaren Knochenklebers.

Folgende Aspekte sind hierfür am Großtiermodell des Schafes zu prüfen:

1. Überprüfung der Biokompatibilität und Degradation des Knochenklebers sowie der physiologischen Frakturheilung nach Kleberapplikation
2. Beurteilung der Knochenformation und Knochenresorption nach Applikation des Knochenklebers in dem Frakturspalt
3. Untersuchung der knöchernen Integration (Osteokonduktivität), der Bioaktivität und der Wiederherstellung der Knochenstruktur (vollständiges Bone Remodelling) unter Anwendung des neuartigen synthetisch hergestellten bioresorbierbaren Knochenklebers im spongiösen und corticalen Knochenareal
4. Analyse der Unterschiede der Grenzen (Interface) und des Zentrums zwischen Knochenlager und eingebrachtem Knochenkleber
5. Untersuchung der Zelltoxizität und Entzündungsreaktionen
6. Bewertung der Degradation (Hydrolyse) sowie des zellvermittelten Abbaus des Knochenklebers
7. Analyse der Knochenkleberdichte, der Oberfläche (bone bonding), der Festigkeit und der Struktur der Knochenneubildung durch histomorphometrische, densitometrische, licht- und transmissions-elektronenmikroskopische sowie spiralcomputertomographische Untersuchungen.

2 Material und Methoden

2.1 Versuchsmodell Schaf

Die vorliegende Versuchsreihe wurde am Schaf als Großtiermodell durchgeführt, da die Knochen der Vordergliedmaße des Schafes im Bereich des Olecranon und der Ulna in Größe, Form und Festigkeit mit denen des Menschen vergleichbar sind und das Schaf am ehesten reproduzierbare Rückschlüsse auf die bei der menschlichen Frakturheilung ablaufenden Regenerationsvorgänge zu ziehen erlaubt [68]. Trotzdem muss, wie bei anderen tierexperimentellen Untersuchungen, darauf hingewiesen werden, dass die Umbauprozesse beim Schaf zum Teil schneller ablaufen als beim Menschen [16], jedoch im Vergleich zum Kaninchen wesentlich langsamer. Somit können die Ergebnisse wie generell modell-unabhängig alle tierexperimentellen Ergebnisse nicht uneingeschränkt auf den Menschen übertragen werden. Die differente Knochenfeinstruktur und daran gebundene Unterschiede der Gefäßversorgung bedingen kein belegbar unterschiedliches Regenerationsverhalten zwischen Mensch und Schaf. Vorteilhaft ist beim Schaf die weitgehende übereinstimmende Reaktion der Versuchstiere auf die gesetzten experimentellen Schäden, die gegenüber dem Hund ein wesentlich homogeneres Bild bieten, welches die Interpretation erleichtert [68].

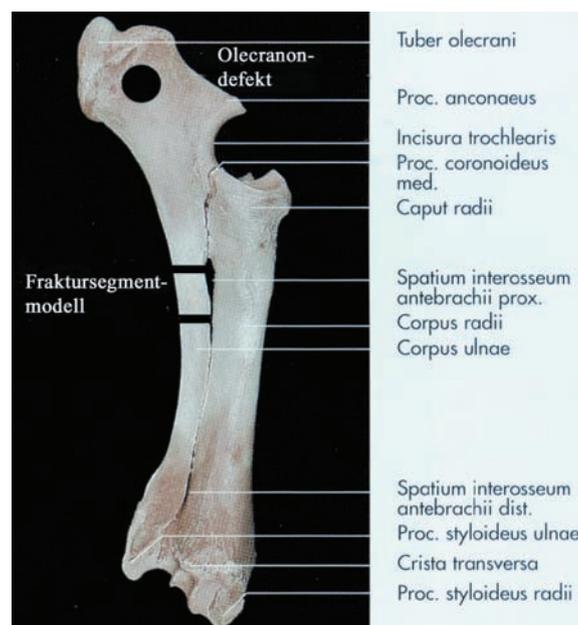


Abb. 10 Das Bohrlochmodell am Schafsolecranon und das Fraktursegmentmodell an der Schafsulna.

Im Rahmen dieses Projektes soll der Knochenkleber nach Applikation im Großtiermodell an zwei im Aufbau und Struktur unterschiedlichen Modellen, an dem metaphysären **spongiösen** Schafsolecranon und an der diaphysären **kortikalen** Schafsulna, getestet und verglichen werden (Abb. 10).

2.2 Versuchstiere

Die Versuche wurden an 49 weiblichen 5-8 jährigen gesunden Merinolandschafen mit einem durchschnittlichen Gewicht von 76,4 kg (60-102,5 kg) vorgenommen. Mit dem oben genannten Alter sind ein abgeschlossenes Wachstum und damit der Verschluss der Epiphysenfugen gesichert und die Nutzungsperiode beendet. Die Schafe wurden von der Schäferei Büchner in Erfurt ins Forschungszentrum für Medizintechnik und Biotechnologie e.V. (= FZMB) in Bad Langensalza, Thüringen, gebracht. Ein Tier musste während der Operationswoche durch ein Ersatztier ausgetauscht werden, da es bereits zu Beginn der Narkose verstorben war. Die Tiere wurden auf der Weide und im Stall im Herkunftsbestand gehalten. Ab Versuchsbeginn wurden die Tiere im Stall gehalten. Die Bestimmungen des Tierschutzgesetzes (§ 8a, Abs. 1 und 2 in der Fassung vom 25.03.1998, BGB 1.I.S., in Anwendung der ISO EN 10 993 für Medizinprodukte der Klasse 2) wurden, nach Genehmigung des Versuches mit der Antragsnummer 14 – 54/ 01 durch das Thüringer Landesamt für Lebensmittelsicherheit und Verbraucherschutz in Weimar im Oktober 2001, strikt beachtet und eingehalten.

Tierhaltung und Betreuung im Forschungszentrum für Medizintechnik und Biotechnologie

Praeoperativ wurden die Tiere in 2 Gruppen mit je 12 und 36 Tieren bei 10°Celsius Umgebungstemperatur im Stall und auf der Weide im Winterhalbjahr gehalten. Stroh, Heu, Quetschhafer und Wasser standen den Schafen ständig und ad libitum zur Verfügung. Die tägliche Kontrolle und wöchentliche tierärztliche Untersuchung musste eine Entwurmung und Ektoparasitenbehandlung im Bestand veranlassen. 5 Tiere mussten aufgrund klinischer Auffälligkeiten ausgetauscht werden. Praeoperativ erhielt jedes Tier 6–8 ml Langzeitpenicillin und 4 ml Flunixin–Meglumin intramuskulär. Postoperativ wurden die Tiere ebenfalls in die 2 Gruppen unterteilt und im Stall gehalten. Stroh, Heu, Quetschhafer und Futterrüben wurden morgens

und mittags ad libitum bereitgestellt, Wasser stand ebenfalls immer zur Verfügung. Täglich wurden die Tiere vom zuständigen Tierarzt untersucht.

2.3 Knochenkleber

2.3.1. Synthese und Eigenschaften

Adhäsivsysteme auf der Basis von Alkylen-bis(oligolactyl)methacrylaten bilden den Ausgangspunkt für die Entwicklung eines degradierbaren Polymers für das Kleben von Knochenfragmenten. Zwei Syntheseschritte müssen bei der Herstellung des Monomers Ethylenglycol-oligolactid-dimethacrylat (ELAMA) durchlaufen werden (Abb. 11):

- Zunächst reagieren ein Diol (Ethylenglycol) und zwei Hydroxycarbonsäuren (Milchsäure, eingesetzt in Form von Lactid) zusammen in einer Kondensationsreaktion zu einem Dimer.
- In dem zweiten Schritt entstehen die Monomere durch den Einbau von Methacrylsäure (MAS).

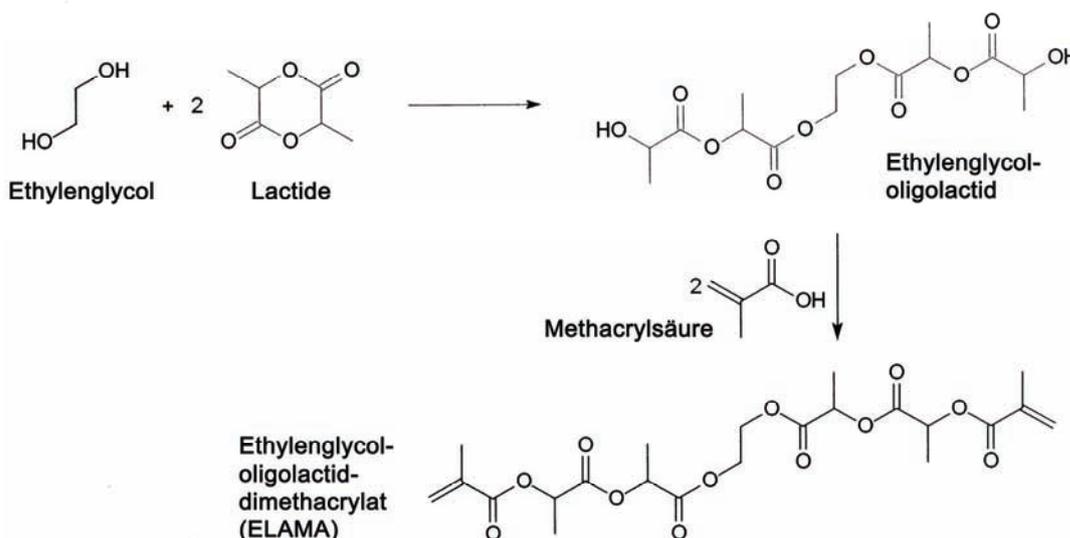


Abb. 11 Zweistufige Synthese des Monomers Ethylenglycol-oligolactid-dimethacrylat (ELAMA).

Durch Variationen der Alkoholkomponente und der Hydroxycarbonsäure können die Monomere modifiziert werden. Als hydrophiles Comonomer erhalten die Monomere synthesebedingt 1 Masse-% Methacrylsäure (MAS).

Um die Aushärte- und Abbaueigenschaften, wie z.B. die Abbaugeschwindigkeit zu verändern, können den oben beschriebenen Hauptmonomeren die nachfolgenden Comonomere zugefügt werden:

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

Im Gegensatz zu den durchgeführten Kleinterversuchen [24] wurde im vorgestellten Großversuch dem ELAMA kein Comonomer hinzugefügt, sondern lediglich das Hauptmonomer ELAMA untersucht.

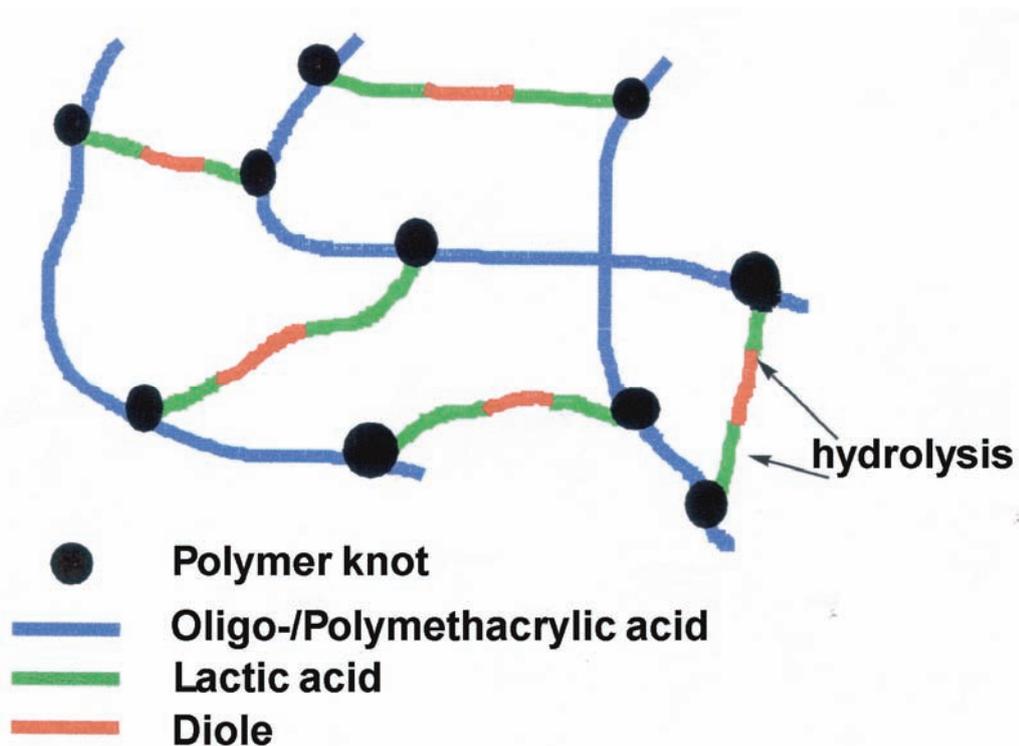


Abb. 12 Polymeres Netzwerk des Knochenklebers.

Die Kleberapplikation stellt ein Zwei-Komponenten-System dar:

1. Kleberkomponente: Monomer (ELAMA) und 2 Masse-% tert.-Butylperoxybenzoat als Polymerisationsbeschleuniger
2. Starterträgerkomponente: Starterkomponente ist eine 3 Masse-%ige Lösung von 9-Borabicyclononan (9-BBN) gelöst in einem Träger von Polyethylenglycol-400 (PEG-400) oder Ethylenglykol-oligolactid (ELA).

In einem Verhältnis Starterkomponente: Kleberkomponente = 1: 10 wurde der Kleber durch ein Zwei-Kammermischsystem (Charge) mit aufgesetztem Statikmischer appliziert.

Das ausgehärtete Polymer besteht aus:

- 65 Masse-% Milchsäure
- 25 Masse-% wasserlösliche Polymethacrylsäuren
- 10 Masse-% Ethylenglycol

Nach einer Minute beginnt die aus dem Statikmischer applizierte, pastöse Substanz auszuhärten. Die mechanische Festigkeit ist nach 5 Minuten erreicht, die komplette Aushärtung der Polymere benötigt ca. 24 Stunden. Hierbei entsteht ein polymeres Klebnetzwerk (Abb. 12).

2.3.2. Degradation (Hydrolyse)

Der ausgehärtete Knochenkleber wird durch die Hydrolyse der Esterbindung in seine Endprodukte Ethylenglycol, Milchsäure und Oligomere/ Polymere der Methacrylsäure aufgespaltet (Abb. 13).

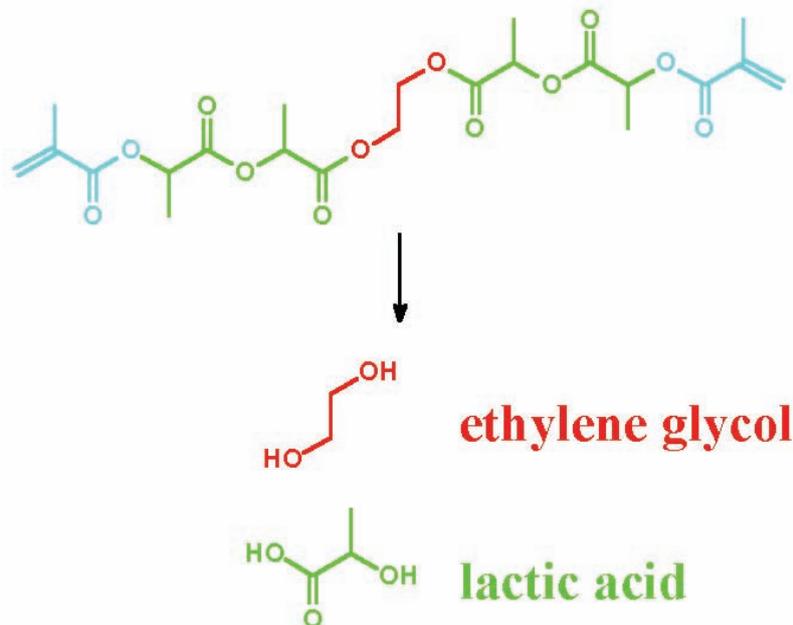


Abb. 13 Endprodukte der hydrolytischen Aufspaltung: (Ethylenglycol - rot, Milchsäure - grün, Methacrylat als Oligo-/Polymer- blau).

Ethylenglycol und Milchsäure werden über den Zitronensäurezyklus verstoffwechselt und als Kohlendioxid und Wasser ausgeschieden. Die Oligomere/ Polymere der

Methacrylsäure sind sehr wasserlöslich und können den Körper über die Niere verlassen, vorausgesetzt sie überschreiten nicht ein Molekulargewicht von ca. 8000 g/mol. Es kann davon ausgegangen werden, dass diese im Kleber vorhandenen Methacrylatoligomere durch stereometrische Hemmung während der Polymerisation ein solch hohes Gewicht nicht erreichen.

In vitro Abbauntersuchungen

Die Abbaueigenschaften des Knochenklebers wurden im Soerensen Puffer (pH= 7, 4) bei 37°C nach ISO 15814 (Implants for Surgery–Copolymers and based on polylactide–In vitro degradation testing) untersucht (Abb. 14).

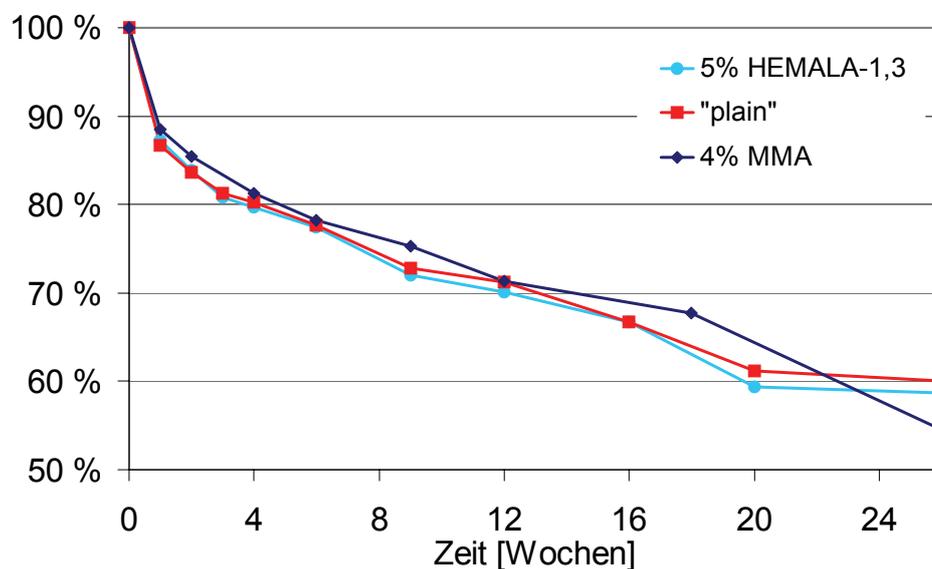


Abb. 14 Mittelwerte der Probenmasse der Polymerzylinder nach *in vitro* Degradation in Soerensen Puffer: 5% HEMALA-1,3 Heiss et al, 2003
 "Plain" vorliegende Studie
 4% MMA Heiss et al, 2003

Zunächst wurde der Polymerzylinder mit einem Durchmesser von 5 mm und einer Höhe von 10 mm für 24 Stunden ausgehärtet und dann in der Pufferlösung inkubiert. Durch Zugabe von 0,1 N KOH wurde der pH-Wert der Lösung, der wöchentlich überprüft wurde, konstant gehalten. Zu jedem Untersuchungszeitpunkt wurden sechs Proben entnommen, getrocknet und gewogen. Die Mittelwerte der Probenmasse sind in Abbildung 14 dargestellt. Alle drei Monomermischungen zeigten in ihrem Abbauverhalten *in vitro* keine wesentlichen Unterschiede. In der ersten Woche wurde für alle Monomermischungen ein Masseverlust um ca. 12 % festgestellt. Von der 2.

Woche bis zu der 26. Woche konnte ein nahezu linearer Masseverlust von ca. 3 % pro Woche beobachtet werden. Nach ca. 12 Wochen kam es zu einer verstärkten Wasseraufnahme in das Polymernetzwerk, das zu einem Aufquellen der zuvor äußerlich intakten Zylinder führte. Nach 24 Wochen Degradation *in vitro* hatten sich die verbliebenen Polymethacrylsäure-Ketten so aufgelöst, dass die Polymerpellets um 40 % der Probenmasse reduziert waren.

2.4 Versuchsplanung und Versuchsablauf

Versuchsprotokoll

Bohrlochdefektmodell am Olecranon

Bei 48 Tieren erfolgte im spongiösen Bereich des linken Olecranons mit dem Diamanthohlschleifsystem (DBCS) ein standardisierter Defekt mit einem Durchmesser von 8,45 mm und einer Tiefe von 15 mm.

Aufgrund der H₂O- innengeschülten DBCS- Schleifen kam es zu keinen Hitzenekrosen oder Mikrofrakturierungen, wie bei normalen Drillbohrern, die dann das histologische Bild der spongiösen Heilung in diesem Bereich verfälschen würden. Die Aufteilung der Tiere ist der Tabelle 3 zu entnehmen.

Euthanasiezeitpunkt	Gruppe 1 Klebergruppe	Gruppe 2 Kontrollgruppe (ohne Kleber)	Gruppe 3 Leerdekt	Gruppe 4 Defekt mit Kleber aufgefüllt
Gesamt: n = 48	Anzahl n = 18	Anzahl n = 15	Anzahl n = 9	Anzahl n = 6
21 Tage	6	5	3	2
42 Tage	6	5	3	2
84 Tage	6	5	3	2

Tab. 3 Einteilung der Gruppen für das spongiöse Modell nach Euthanasiezeitpunkten.

Das Olecranonmodell wurde ausschließlich für feingewebliche Untersuchungen benutzt.

Fraktursegmentmodell an der Ulna

Bei 48 Schafen wurde jeweils an der linken Ulna ein 2,0 cm langes Fraktursegment im kortikalen Bereich erzeugt. Es wurden 2 Hauptgruppen nach der Art der Refixation des Segmentes gebildet. Auch hier wurden die Versuchsgruppen nach den Tötungszeitpunkten (21, 42 und 84 Tage) weiter untergliedert (Tab. 4).

Euthanasiezeitpunkt	Gruppe 1 Klebergruppe		Gruppe 2 Kontrollgruppe (ohne Kleber)	
	Gesamt: n = 48	Anzahl n= 27		Anzahl n = 21
	n = 18	n = 9	n = 18	n = 3
21 Tage	6	3	6	1
42 Tage	6	3	6	1
84 Tage	6	3	6	1
	Biomechanik	Histologie	Biomechanik	Histologie
	danach:Histologie		danach:Histologie	

Tab. 4 Einteilung der Gruppen für das kortikale Modell nach Euthanasiezeitpunkten.

Das Fraktursegmentmodell an der Ulna stellte die Grundlage für die biomechanischen Verbundfestigkeitsmessungen dar. Zusätzlich ging es in die feingewebliche Auswertung mit ein und wurde als kortikales Fraktursegmentmodell mit dem spongiösen Bohrlochdefektmodell verglichen.

Von den 48 Versuchstieren wurden pro Tötungszeitpunkt 16 Tiere euthanasiert und die entnommenen Präparate aufgearbeitet. Davon perfundierten wir jeweils 4 Tiere (im gesamten Großtierversuch 12 Tiere) vor der Euthanasie. Pro Tötungszeitpunkt wählten wir für die Perfusion für das spongiöse Modell jeweils 2 Tiere aus der Klebergruppe, 1 Tier aus der Kontrollgruppe und 1 Tier aus der Gruppe, bei der der Defekt mit Kleber aufgefüllt worden war, aus. In Bezug auf das kortikale Modell teilten sich diese perfundierten Versuchstiere jeweils in 3 Tiere aus der Klebergruppe und 1 Tier aus der Kontrollgruppe auf.

Da die biomechanischen Messergebnisse durch die Perfusion beeinflusst und damit verfälscht werden können, benutzte man den perfundierten kortikalen Bereich der Ulna nicht für die Biomechanik. Von den 4 perfundierten Tieren standen sowohl der spongiöse Defekt (Olecranon) als auch der kortikale Defekt (Ulna) den feingeweblichen Untersuchungen direkt zur Verfügung (Abb. 15).

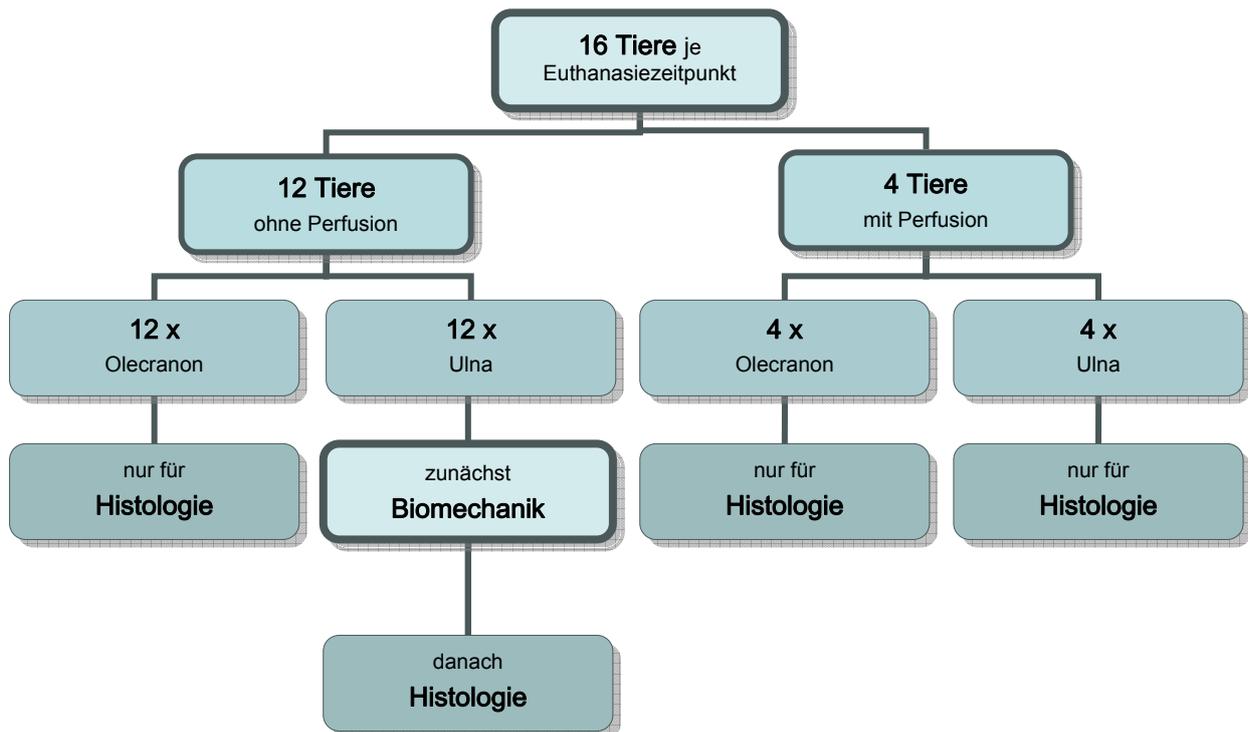


Abb. 15 Übersicht über die Olecranonzyylinder (spongiöser Bereich) und Ulnafraktursegmente (kortikaler Bereich) für die feingeweblichen Untersuchungen.

Von den 12 Versuchstieren pro Euthanasiezeitpunkt, die nicht perfundiert worden sind, wurden die 12 Olecranondefekte direkt für die Histologie weiterverarbeitet. Die 12 Ulnafrakturen wurden zunächst der biomechanischen Messung unterzogen. Nach der biomechanischen Messung, 4 Punkt-Biegung (Dissertation N.Schettler) wurde der noch intakte, distale Frakturspalt ebenfalls der histologischen Analyse hinzugefügt, um die Zahl der Tiere in den einzelnen Gruppen für die Auswertungen zu erhöhen.

Randomisierung

Um den statistischen Regeln entsprechend gleichmäßige Ausgangssituationen für die Versuchs- und Kontrolltiere zu schaffen und um systematische Fehler und Einflüsse für die statistische Auswertung auszuschalten, wurde die Randomisierung in Versuchs- und Kontrollgruppen erst intraoperativ vorgenommen. Vor Beginn der Versuchsreihe war eine Randomisierungsliste erstellt worden. Die jeweilige Zuordnung wurde durch das Losverfahren bestimmt.

Die Gruppengrößen entsprachen hierbei der Mindest- bzw. Minimalstprobenanzahl, um eine wissenschaftliche Aussage bezüglich der Heilung oder Nichtheilung von Knochendefekten mittels der verwendeten Substanz machen zu können.

2.5 Narkose

Die Narkose erfolgte mit Diazepam, Ketamin, Xylazin und Isofluran. Als Prämedikation und Narkoseeinleitung wurde Diazepam, das durch seine schnelle Anflutung im Gehirn eine anterograde Amnesie herbeiführt, intravenös mit 0,025 ml Diazepam/kg/Körpergewicht verabreicht. Ketamin 10 % (INTERVET) als kurzwirkendes Anästhetikum mit starker analgetischer Wirkung und Xylazin 2 % (CEVA Tiergesundheit GmbH) mit analgetischer, sedativer und muskelrelaxierender Wirkung applizierten wir zusammen intravenös mit einer Mischspritze (Ketamin 5 mg/kg/Körpergewicht und Xylazin 0,05 mg/kg/Körpergewicht). Diese Kombination wurde gewählt, um die unerwünschten Nebenwirkungen der einzelnen Medikamente zu verringern und einen synergistischen Effekt in Hinsicht auf die Narkosetiefe und Narkosedauer zu erzielen. Mit der gut steuerbaren Inhalationsanästhesie mit dem ausgeprägt muskelrelaxierenden Isofluran 1,5 – 2 % in 100 % Sauerstoff (Isoflo®, ESSWX Tierarznei) konnte die Dauer der Anästhesie der Operationslänge angepasst werden. Die Narkosetiefe konnte durch das Überprüfen von Schmerzempfinden am Klauensaum und Schutzreflexen, wie Korneal- und Lidschlussreflex, getestet werden. Daneben setzte man das EKG, die Pulsoxymetrie und die Kapnometrie zur Überwachung ein. Nachinjektionen wurden (falls notwendig) mit Ketamin 10 % und Xylazin 2 % mit 0,013 ml/kg/Körpergewicht durchgeführt. Die durchschnittliche Narkosezeit betrug ca. 49 min.

2.6 Operationstechnik

2.6.1 Olecranonmodell (spongöser Bereich)

Um auf die Humanmedizin übertragbare Verhältnisse zu gewährleisten, war es notwendig, ein Modell für die Biokompatibilitätsüberprüfung sowie ein Frakturmodell für die biomechanischen Testungen und die Biokompatibilitätsprüfungen zu erstellen, welches in seiner Aussagekraft der operativen Versorgung und den ablaufenden biologischen Formations- und Resorptionsvorgängen des Knochens (Osteogenese) dem des Menschen im spongösen und kortikalen Bereich gleichzusetzen war.

Zunächst wurde der linke Vorderlauf der Schafe mit einer elektrischen Enthaarungsschere rasiert. Nachdem die Tiere narkotisiert und auf dem Operationstisch in Rechtsseitenlage gelagert worden waren, wurde der gesamte linke Vorderlauf mit jodhaltiger Desinfektionslösung (Betaisodonna-Lösung) abgewaschen. Die desinfizierte Extremität wurde anschließend mit Operationstüchern steril abgedeckt und ein 3-4 cm langer Hautschnitt über dem Olecranon gelegt. Nach Spalten des Caput laterale des Musculus tricipitis brachii und M. anconaeus erfolgte die Eröffnung des Periosts über dem Olecranon. (Abb. 16).

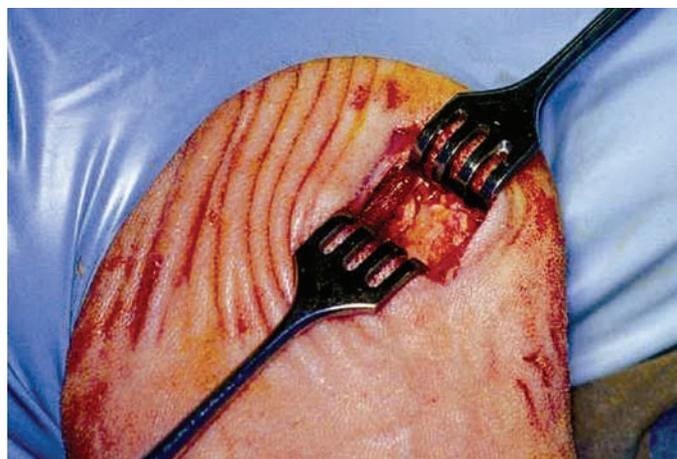


Abb. 16 Zugang zum Olecranon.

Nach Blutstillung erfolgte nun die Markierung des Bohrloches mit dem angeschliffenen Ende des Extraktors des Diamond-Bone-Cutting-Systems (DBC-System) am Olecranon. Anschließend erfolgte zusätzlich die Einkerbung des markierten Bohrlochzylinders am Übergang zum Lagerknochen mit einem kleinen, scharfen Knochenmeißel. Damit konnte die ursprüngliche anatomisch exakte Lage

des Zylinders im Defekt wieder hergestellt werden. Nachfolgend wurde mittels einer Diamanthohlfräse der Größe 9 (Außendurchmesser 8,45 mm, Innendurchmesser 7,35 mm) der spongiöse Knochen des Olecranon bis zur gewünschten Gegenkortikalis geschliffen und ein 8,45 x 15 mm großer Knochenzylinder entnommen (Abb. 17, Abb. 18).

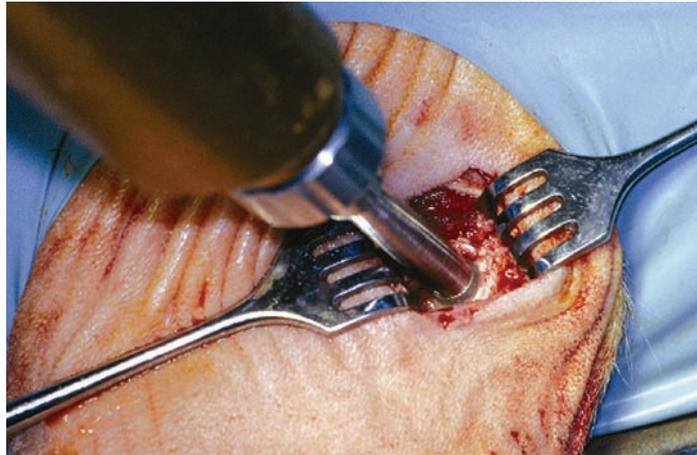


Abb. 17 Schleifen des 8,45 x 15 mm Defekts mit der DBC-Systems.

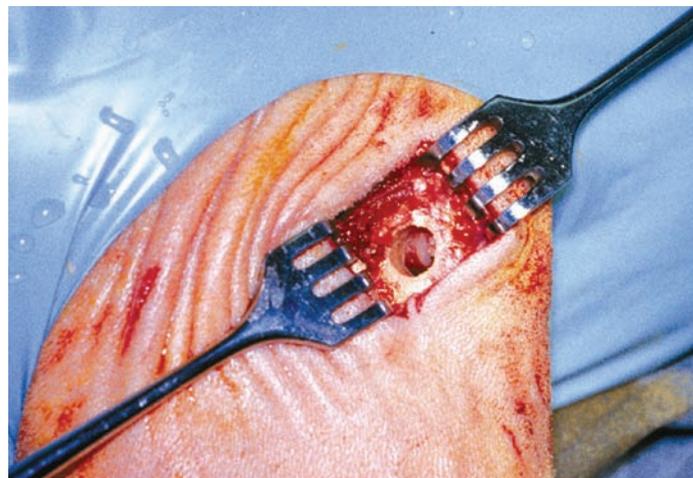


Abb. 18 Bohrlochdefekt im Zentrum des Olecranon nach Extraktion des Knochenzylinders.

Das DBCS (Diamond-Bone-Cutting-System, Firma BIOMET MERCK) wurde mit einer Trägerbohrmaschine (Synthes compact air drive CE 0123, Firma SYNTHES, Umkirch) angetrieben [27]. Die Fräse wurde von einem Aufsatz fixiert, der einen integrierten Spül-Kühlkanal zur andauernden Kühlung enthielt. In das Futter des Fräsenaufsatzes wurde die Diamanthohlfräse eingespannt und mittels einer physiologischen Kochsalzlösung (Natriumchlorid), die über das Infusionsbesteck und

den Spül-Kühlkanal in das Innere der Diamanthohlfräse geleitet wurde, gekühlt, um Hitzenekrosen zu vermeiden.

Die Defekttiefe wurde mit Hilfe der skalierten Außenseite der Fräse auf 15 mm bis zur Gegenkortikalis unter Schonung des Weichteilgewebes festgelegt. Nach dem Erreichen der vorgesehenen Bohrtiefe wurde die Fräse mit laufendem Diamantfräskopf aus dem Knochen herausgezogen und die Spülung beendet. Der Extraktor wurde nun mit dem Hammer bis zur Markierung in den Fräskanal vorgetrieben. Mit einer Drehung wurde der Knochenzylinder aus dem Knochenlager des Olecranon getrennt und extrahiert. Der 8,45 x 15 mm große Bohrlochdefekt wurde nun gespült und mit einer mit Natriumchlorid angefeuchteten Kompresse feucht gehalten. Dieses Vorgehen gewährleistete ein standardisiertes und reproduzierbares Olecranondefektmodell.

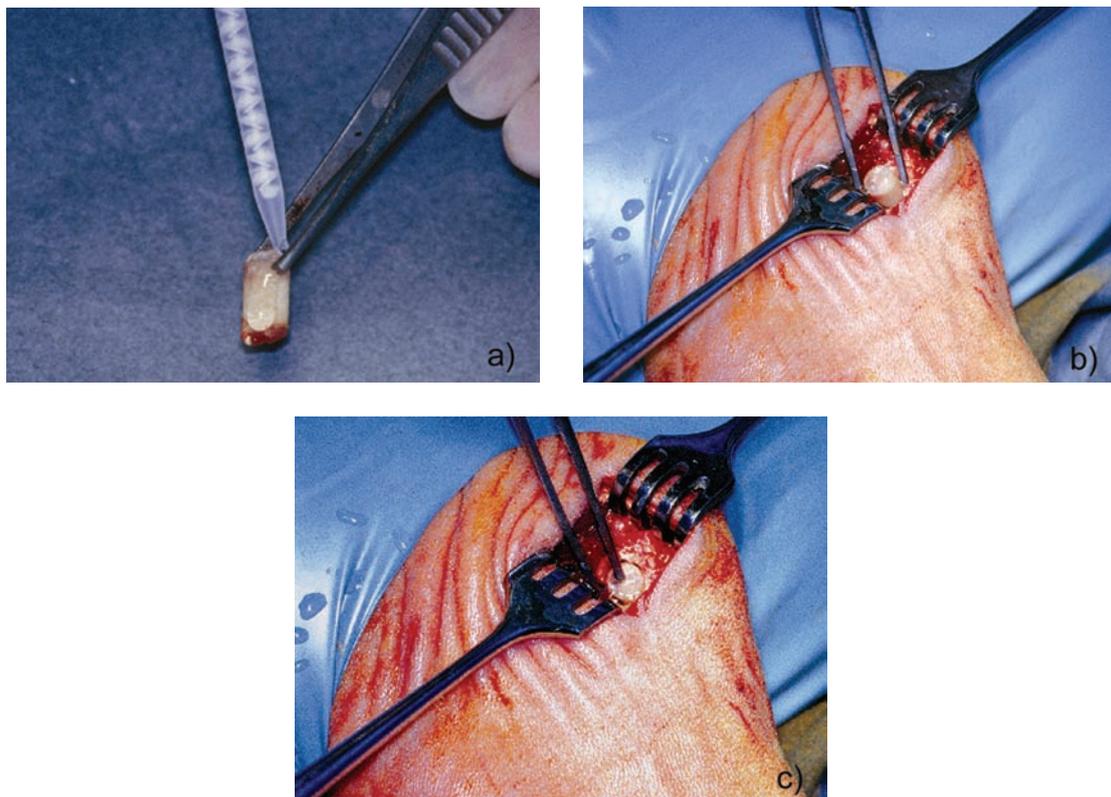


Abb. 19a) Gleichmäßige Applikation und Beschichtung des extrahierten spongiösen Knochenzylinders mit dem Knochenkleber.

19b+c) Reposition des mit Knochenkleber beschichteten Knochenzylinders in die korrekte anatomische Position im Knochenlager des Olecranon.

Die Applikation des Knochenklebers wurde durch ein Zwei-Kammermischsystem vorgenommen. Dabei wurde der flüssig-visköse Knochenkleber langsam und

gleichmäßig auf den extrahierten spongiösen Knochenzylinder aufgetragen (Abb. 19). Nach der Applikation des Knochenklebers musste innerhalb von 60 Sekunden die korrekte anatomische Position des Knochenzylinders im Knochenlager des Olecranon erfolgen. Grundvoraussetzung für dieses Manöver war die exakte Platzierung des Zylinders an der Markierung am Olecranon sowie am Zylinder. Nach Überschreiten dieser Zeitgrenze konnte eine Unwirksamkeit bezüglich der Festigkeit des Knochenklebers mit einer beginnenden Aushärtung beobachtet werden.

Bei missglückter oder nicht zufrieden stellender Platzierung wurde das Manöver frühzeitig abgebrochen und nach Abtragung der ausgehärteten Kleberreste am Knochenzylinder ein erneuter Platzierungsversuch gestartet. Wurde die korrekte Reposition (übereinstimmende Markierung) erzielt, musste nun bei jedem Tier (aus der Klebergruppe) nach erfolgter Kleberapplikation eine Ruhephase von 5 Minuten eingehalten werden. Im Vergleich hierzu wurde der Knochenzylinder in der Kontrollgruppe ohne Kleberapplikation in gleicher Art und Weise platziert, während in den anderen Gruppen der Bohrlochdefekt komplett mit Kleber aufgefüllt oder als Leerdefekt belassen wurde.

Der Operationssitus wurde nun gespült und die Muskulatur über dem Olecranon verschlossen. Die Hautnaht erfolgte in fortlaufender Technik mit einem resorbierbaren Faden aus Polyglactin (Vicryl, Firma ETHICON, Norderstedt). Abschließend wurde nach Desinfektion ein Pflastersprühverband (Nobecutan, Firma, ASTRA Chemicals, Norderstedt) aufgebracht.

2.6.2 Fraktursegmentmodell der Ulna (kortikaler Bereich)

Die Freilegung der Ulna erfolgte bei allen 48 Tieren über den lateralen Zugangsweg durch Längsspalten der Faszie und einen intermuskulären Zugang zwischen dem M. extensor carpi ulnaris und dem M. extensor digitalis lateralis. Im nächsten Operationsschritt wurde das Periost in Höhe des Spatium interosseum abgelöst, eine Segmentstrecke von exakt 2 cm ausgemessen und mit der oszillierenden Säge (Fa. SYNTHES, Umkirch) auf Höhe der distalen Begrenzung des Spatiums der erste Sägeschnitt gesetzt (Abb. 20).

Unter sorgfältiger Schonung der A. interossea wurde der proximale Sägeschnitt gesetzt und das 2 cm lange ulnare Knochensegment herausgetrennt. Der

Sägevorgang erfolgte unter sorgfältiger Kühlung mit physiologischer Natriumchloridlösung zur Vermeidung von Hitzenekrosen (Abb. 21).



Abb. 20 Markierung der Osteotomiezonen in Höhe des Spatium interosseum durch die oszillierende Säge für das Fraktursegmentmodell an der metaphysären Ulna.

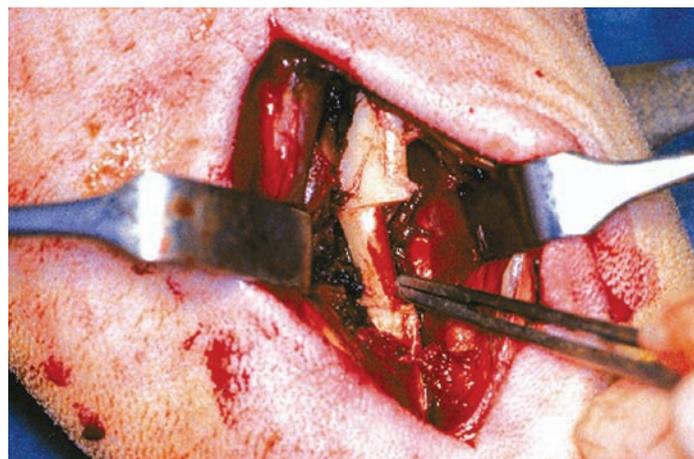


Abb. 21 Komplettiertes Knochensegment aus der metaphysären Ulna (2 cm großes Ulnasegment).

Das komplette 2 cm messende Ulnasegment wurde schließlich aus seinem anatomischen Verbund herausgelöst und der Knochenkleber auf die beiden Osteotomieenden langsam und gleichmäßig aufgetragen (Abb. 22). Danach erfolgte innerhalb von 60 Sekunden die anatomisch korrekte Reposition des Ulnasegmentes, wobei sorgfältig darauf geachtet werden musste, dass anschließend eine so genannte Fixationsphase von 5 Minuten eingehalten wurde (Abb. 23).

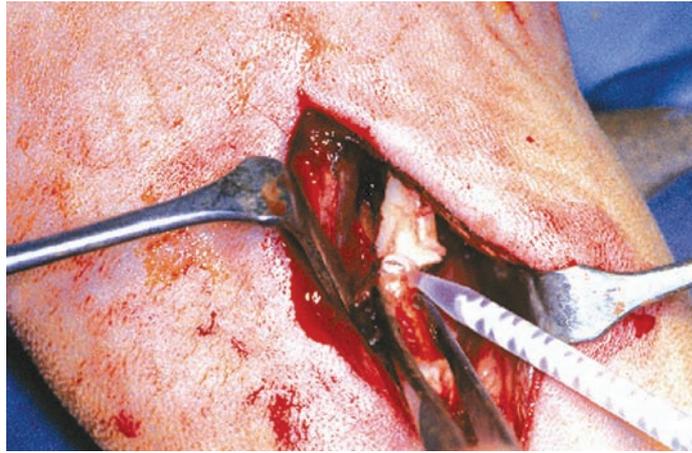


Abb. 22 Applikation des Knochenklebers durch ein Zwei-Kammermischsystem auf die Osteotomieenden des Ulnasegmentes.

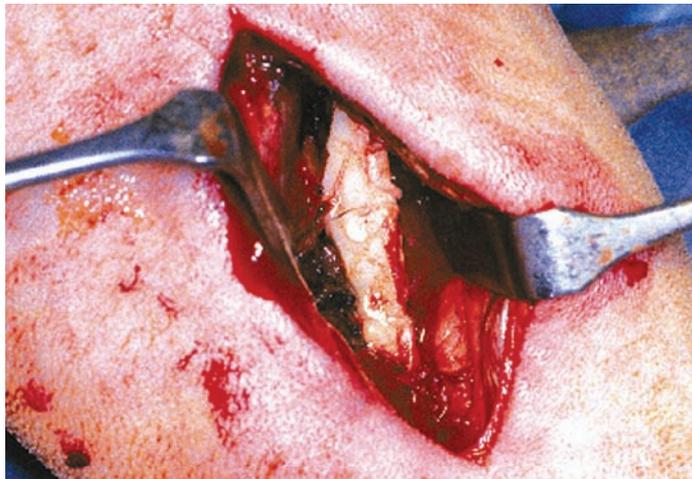


Abb. 23 Anatomische Reposition des Ulnasegmentes nach Kleberapplikation (Fixationsphase).

Nach diesem Zeitraum konnte eine vollständige Aushärtung sowie eine mechanische Festigkeit des Ulnasegmentes im Verbund festgestellt werden. Bei allen Tieren der Kontrollgruppe wurde das gleiche operative Vorgehen durchgeführt, wobei das Ulnasegment durch Periost und Muskeladaptation ohne Osteosynthese in anatomischer Position gehalten wurde.

Anschließend wurde der Operationssitus mehrfach gespült, die Muskulatur über der metaphysären Ulna adaptiert und die Haut in fortlaufender Technik mit einem resorbierbaren Faden aus Polyglactin (Vicryl ®, Fa. ETHICON, Norderstedt) verschlossen.

2.7 Intraoperative und postoperative Komplikationen

Ein Schaf wurde am 8. postoperativen Tag infolge einer Aspirationspneumonie, die während der langen Operationszeit mit intraoperativem Erbrechen entstanden war, unter Narkose, wie im Kapitel 2.5 beschrieben, intravenös mit 15 ml T61® ad us. vet. der Firma HOECHST (Hoechst AG, Frankfurt/ Main) euthanasiert. Bei einem weiteren Tier fiel massives Erbrechen unter der Narkose auf.

Während am Olecranonmodell nur bei 3 Tieren eine stärkere Blutung vorkam, entstand bei insgesamt 16 Tieren eine starke Blutung bei der Freipräparation der Ulna. Um im Operationsgebiet eine Übersicht zu bekommen und eine adäquate Blutstillung durchführen zu können, wurde am Oberarm eine Esmarch'sche Stauung angelegt. Durch diese kurzfristige Kompression ließ sich die Blutung gut stillen. Der Blutverlust konnte mit Hilfe von Natriumchloridlösungen ausgeglichen werden. Ein Tier verstarb bereits bei der Narkoseeinleitung aufgrund von Herz-Kreislauf-Versagen. Es wurde durch ein zusätzliches Tier ersetzt.

In der postoperativen Phase beobachtete und kontrollierte man täglich das Verhalten und das Aussehen der Tiere. Dabei wurden die Bewegungsaktivität, der Bewegungsablauf sowie die Futteraufnahme der Tiere aufmerksam überprüft. Der Heilungsverlauf der Operationsnarben unterlag ebenfalls einer täglichen Kontrolle. Es trat in 8 Fällen eine mittel- bis hochgradige Lahmheit auf, die mit dem nichtsteroidalen Antiphlogistikum Flunixin- Meglumin intramuskulär einmal bis mehrmals täglich behandelt wurde. Eine aseptische Fremdkörperreaktion mit Serombildungen konnte bei keinem Tier beobachtet werden, Infektionen traten im Operationsgebiet ebenfalls nicht auf.

2.8 Perfusion

Die Perfusion wurde bei jeweils 4 Tieren am 21., 42. und 84. Tag postoperativ durchgeführt. In Narkose erfolgte über einen axillären Zugang die sorgfältige Präparation der A. und V. brachialis, die proximal zur A. und V. subclavia hin ligiert wurden. Der zunächst frei um den distalen Anteil der Gefäße gelegte Faden diente später dem Einbinden beider Katheter nach Eröffnen der Gefäße (Abb. 24).

Der arterielle Katheter konnte über einen Luer-Adapter mit der Perfusionspumpe verbunden werden, der Silikonschlauch mit einem Innendurchmesser von

ca. 4-5 mm aus der V. brachialis endete in einem Sammelbehälter zur Aufnahme des venösen Blutes. Die vorgewärmten Lösungen von 37°C Körpertemperatur wurden mit der Perfusionspumpe Dispensette (Brand ®) in das Blutgefäßsystem in folgender Reihenfolge hineingegeben:

1. 2 Liter Ringerlösung, um das restliche Blut herauszuspülen.
2. 40 ml Rheomacrodex® 10 %, um die Blutgefäße für die anschließende Fixierung weit zu stellen.
3. Etwa 1- 2 Liter Karnovsky-Lösung, um die Knochenpräparate zu fixieren.

Vor der Gabe der Karnovsky-Lösung erfolgte die Euthanasie der perfundierten Schafe, wie bei den nicht perfundierten Schafen, mit 15 ml T61® ad us. vet. der Firma HOECHST (Hoechst AG, Frankfurt/ Main), einer Kombination aus Embutramid und Mebezoniumjodid, intravenös über die V. saphena. Die Kadaver brachte man in die nahe gelegte Tierkörperbeseitigungsanlage (SARIA Bio-Industries, 99189 Elxleben).

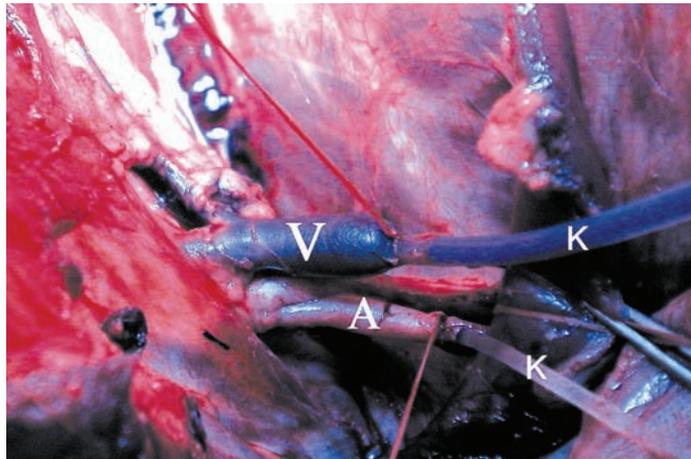


Abb. 24 Ligatur der A. und V. brachialis (A, V) und Fixation der Katheter (K).

Perfusionslösungen:

1. Ringerlösung:

Die Ringerlösung nach DAB (Deutsches Arzneibuch) enthält pro 100 ml: 8,6 g Natriumchlorid, 0,3 g Kaliumchlorid und 33 g Calciumchlorid.

Um eine Reaktion zwischen Intravasal- und Extravasalraum zu vermeiden, ist das Spülen der Gefäße mit einer isotonen Lösung notwendig.

2. Rheomacrodex® 10 % Infusionslösung:

1000 ml Lösung enthalten: 100 g Dextran 40 und 9 g Natriumchlorid.

Die Lösung besteht aus einem Plasmaexpander mit einer spezifischen Wirkung auf die Kapillardurchblutung. Dextran verhindert eine Verlegung der kleinsten Blutgefäße durch Erythrozyten und Thrombozytenaggregation. Natriumchlorid als hypertone Lösung ermöglicht der extravasalen Flüssigkeit in die Gefäße zu diffundieren und diese zu dilatieren.

3. Karnovsky-Lösung:

Zusammensetzung für 1000 ml: 460 ml Phosphatpuffer, 460 ml Paraformaldehyd und 80 ml Glutardialdehyd.

Die linken vorderen Gliedmaßen wurden nach der Perfusion an der Schulter exartikuliert, geröntgt und bis auf den Knochen freipräpariert. Das Olecranon mit dem Bohrlochdefekt und die Ulna mit dem Fraktursegment wurden voneinander getrennt und zu kleinen Knochenblöcken gesägt. Nach Perfusion und Exartikulation im Ellenbogen der betroffenen Gliedmaßen wurden das Olecranon mit dem Bohrlochdefekt sowie die Ulna mit dem Fraktursegment voneinander getrennt. Die entstandenen kleinen Knochenblöcke wurden zur optimalen Fixierung jeweils unmittelbar im Anschluss mit Hilfe des Exakt-Trenn- Schleifsystems (Fa. EXAKT) in ca. 2 mm dicke Scheiben in der Schnittebene abgesägt.

Der verbleibende Rest des Knochenblockes wurde für die lichtmikroskopischen Untersuchungen 4 Tage in 4 % Formalinlösung eingelegt und anschließend mit Phosphatpuffer gespült, um dann, wie in Kapitel 2.12.2 beschrieben, weiterzuverfahen. Zur Weiterverarbeitung für die Transmissionselektronenmikroskopie war es notwendig die Knochenscheiben in Yellow-Fix bzw. Paraformaldehyd zu konservieren.

2.9 Röntgendiagnostik

2.9.1 Durchführung der Röntgenuntersuchung

Die Röntgenaufnahmen der linken Vordergliedmaße mit Olecranon und Ulna wurden sowohl post operationem (nach 21, 42, 84 Tagen) als auch post mortem in zwei Ebenen, im anterior-posterioren und lateralen Strahlengang durchgeführt. Das

Röntgen direkt nach der Operation erfolgte in Narkose in einem dem Operationssaal angrenzenden Raum mit einem mobilen Röntgengerät:

Röntgengerät:	Typ: MEDINOS 100/60 C, F- Nr.: 291 955
Röntgenkassette:	Kodak x-Omatic LW Cassette, Lanex fine screen
Röntgenfilme:	grün-sensibilisierte Filme "Retina XOD Röntgenfilm" von Heiland
FFA (Film-Focus-Abstand):	50-80 cm
Röntgenwerte:	25/60-70 vd/ml

Nach der Euthanasie wurden die Vordergliedmaßen abgetrennt und noch vor der Präparation und Entfernung der Weichteile mit einem fest installierten Röntgengerät geröntgt:

Röntgengerät:	Blach Röntgen, Assamstadt, Typen-Nr.: N 982
Röntgenkassetten:	24x30, CAWO ABS Cassette, Blach Röntgen Assamstadt, 400 Empfindlichkeit
Röntgenfilme:	grün-sensibilisierte Filme „Retina XOD Röntgenfilm“ von Heiland
FFA:	70 cm
Röntgenwerte:	10/ 60, 12/ 60, 15/ 62 vd/ml, je nach Beingröße

2.9.2 Dokumentation und Auswertung der Röntgenbilder

Alle Röntgenbilder wurden mit einem Flachbrettscanner (EPSON Expression 1680 Pro) in hoher Auflösung und Qualitätsstufe eingescannt und weiter digital bearbeitet. Zur Fotodokumentation kamen folgende Kameras zum Einsatz:

- Digitalkamera (CANON Powershot Pro 70)
- Spiegelreflexkamera (MINOLTA Dynax 3xi mit 100 mm Macro und Ringblitz) mit Fotofilmen (KODAK Elitechrome 100) für Aufnahmen von Diapositiven. Zur Digitalisierung wurden die Diapositive mit dem POLAROID Sprintsan 4000 eingescannt.

2.10 Herstellung histologischer Präparate mit der Trenn-Dünnschliff-Technik

Sämtliche unentkalkte Knochenschliffe wurden im Labor für experimentelle Unfallchirurgie, Kerkraderstraße 9 in 35394 Giessen der Klinik und Poliklinik für Unfallchirurgie der Justus–Liebig-Universität Gießen, angefertigt.

2.10.1 Vorbereitung der Proben für die Einbettung

Um die Zahl der Tiere der einzelnen Gruppen für die Auswertung zu erhöhen, nahm man nach der biomechanischen Messung die Ulnafraktursegmente zu den bereits 12 perfundierten Tieren für die feingewebliche Beurteilung hinzu. Da bei der biomechanischen Messung die Ulna überwiegend im proximalen Frakturspalt gebrochen war, sägte man den noch intakten distalen Frakturspalt mit einer oszillierenden Säge zu einem Knochenblock zurecht.

Alle entnommenen Proben vom Olecranon und von der Ulna wurden für 4 Tage in 4%iger Formalinlösung fixiert und anschließend mit Phosphatpuffer gespült.

2.10.2 Aufbereitung der Proben

In einer aufsteigenden Alkoholreihe entwässerte man die Knochenscheiben bei 25°Celsius Raumtemperatur insgesamt 21 Tage lang. Anschließend erfolgte die Kunststoffinfiltration in 6 Stufen über einen Zeitraum von 24 Tagen. Die ersten drei Infiltrationsstufen bestanden aus ansteigenden Technovit-Konzentrationen, Technovit 7200® (Fa. KULZER, Friedrichsdorf), die letzten drei Stufen aus reinem Technovit, versetzt mit 1 % Benzoylperoxid (Fa. KULZER).

Die mit Technovit durchtränkten Knochenscheiben legte man in Einbettmulden und füllte diese mit Technovit 7200 auf. Die anschließende Polymerisation im Lichtpolymerisationsgerät (Fa. EXAKT) beinhaltete 2 Phasen:

1. Vorpolymerisation: 2 Stunden Gelblicht mit großem Lampenabstand zur langsamen Einleitung der Polymerisation, um Spannungsrisse zu vermeiden.
2. Endgültige Polymerisation: 4 Stunden Blaulicht.

Zur vollständigen Aushärtung ruhten die Proben über Nacht bei 50°Celsius in dem Wärmeschrank. Die Zeit der Entwässerung und Aushärtung betrug insgesamt 45 Tage.

2.10.3 Herstellung von Schliffpräparaten

Die unentkalkten Knochenschliffe wurden in der Trenn-Dünnschliff-Technik nach DONATH angefertigt [11]. Diese Methode erlaubte eine Herstellung dünner Schliffe zwischen 10 und 20 µm von nicht schneidbarem Gewebe. In den Abbildungen 25 und 26 sind die Schliffebenen für das spongiöse und das kortikale Modell abgebildet.

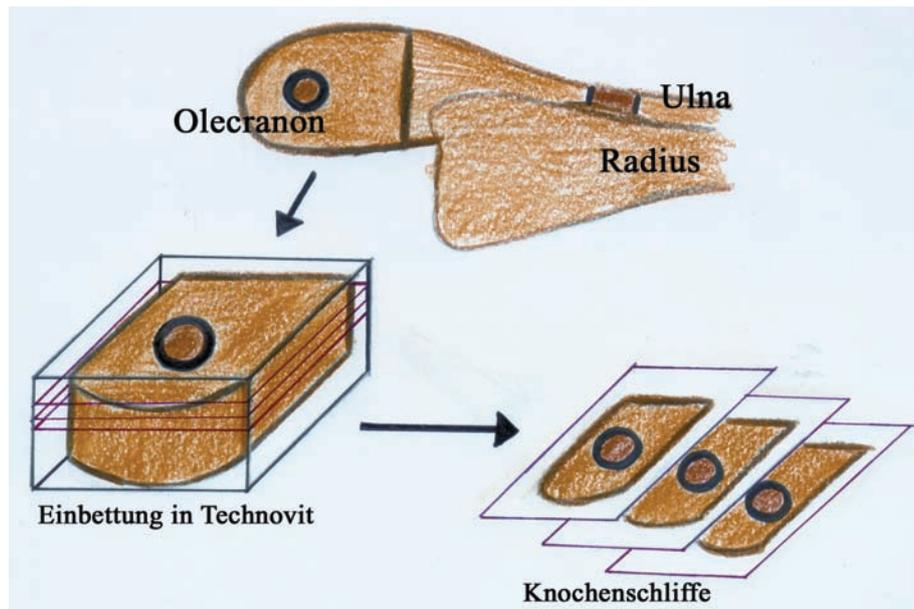


Abb. 25 Darstellung der Schliffebenen der histologischen Präparate am Olecranon (spongiöser Bereich).

Aus einem Knochenblock konnten jeweils 3-4 Knochenschliffe angefertigt werden. Nachdem man den polymerisierten Knochenblock soweit angeschliffen hatte, dass alle zu untersuchenden Gewebestandteile zu sehen waren, wurde der Block mit Technovit 4000 (Fa. KULZER) in der Exakt-Klebpresse aufgeblockt. Die zu untersuchende Fläche klebte man mit doppelseitigem Klebeband auf einen weiteren Objektträger. Die nicht zu untersuchende Fläche bestrich man mit Technovit 4000 und setzte sie in die Presse ein. Die Deckplatte mit dem vakuumgehaltenen Objektträger wurde vorsichtig zum Block abgesenkt und arretiert. Nach Polymerisation des Klebers entfernte man den Objektträger mit dem doppelseitigen Klebeband und setzte das Präparat in das Exakt-Mikroschleifsystem ein, um es planparallel anzuschleifen. Die Präparate schliff man mit Schleifpapier der Körnung 1200 an, bis alle Gewebestrukturen an der Oberfläche zu sehen waren.

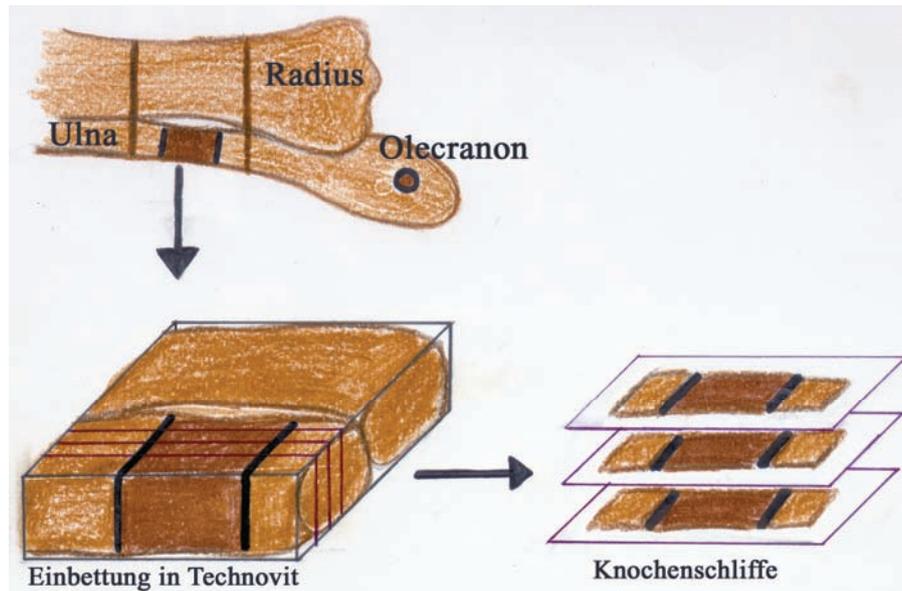


Abb. 26 Darstellung der Schlicfebenen der histologischen Präparate des Frakturmodells an der Ulna (kortikaler Bereich).

Nachdem der Knochenblock für 30 Minuten in dem Blockinfiltrationsgerät 539 (Fa. EXAKT) getrocknet wurde, klebte man einen planparallelen Objektträger mit Hilfe des Präzisionsklebers Technovit 7210 (Fa KULZER) in der Exakt-Präzisions-Klebpresse auf die angeschliffene Oberfläche. Nach der Photopolymerisierung unter Blaulicht für 10 Minuten konnten die Sägeschliffe mit dem Exakt-Trennschleifsystem angefertigt werden.

Das Exakt-Trennschleifsystem besteht aus einer Trenneinheit, die nach dem Prinzip einer Bandsäge arbeitet. Die Trennbänder bestanden aus 0,2 mm dickem Stahlband. Die Stirnseite des Stahlbandes war mit Diamantkörnern beschichtet, welche in diesem Fall eine Körnung von D 64 aufwies. Ein etwa 120 µm dicker Sägeschliff konnte abgetrennt werden. Der Schliff wurde in dem Exakt-Mikroschleifsystem auf 10-20 µm Dicke mit Schleifpapier der Körnung 1200 geschliffen. Abschließend erfolgte ein Polieren mit dem Silikonkarbidpapier mit der Körnung 4000, um Schleifspuren zu entfernen.

2.10.4 Färbungen der unentkalkten Knochendünnschliffe

Die 3-4 Knochenschliffe eines jeden Präparates ermöglichten neben der Toluidinblau-Färbung auch die Anfärbung mit van Gieson.

Toluidinblau-Färbung:

<i>Färbeergebnis:</i>	Mineralisierte Hartgewebematrix:	ungefärbt bis blassblau
	Knorpelmatrix:	metachromatisch bis rotviolett
	Verkalkte Knorpelmatrix:	dunkelblau
	Zellen und Weichteilgewebe:	metachromatisch bis rotviolett

Trichromfärbung nach van Gieson:

Die Gewebestrukturen werden in drei verschiedenen Farben dargestellt, damit erreicht man eine Differenzierung zwischen unterschiedlich dichtem Gewebe:

Kerne:	braun-schwarz
Bindegewebe und Knochen:	rot
Muskulatur, Zytoplasma und Osteoid:	gelb

Eindecken:

Nach der Färbung wurden die Schliffe mit Technovit 7200® VLC eingedeckt, um sie langfristig zu konservieren. Danach konnten sie mikroskopisch untersucht werden.

2.11 Feingewebliche Untersuchungen

2.11.1 Lichtmikroskopie

Zur histologischen Untersuchung und Auswertung der Schliffpräparate wurde das Großfeldforschungsmikroskop Axioplan 2 (Fa. ZEISS, Oberkochen) im Labor für experimentelle Unfallchirurgie verwendet. Der Objektisch war frei drehbar, Polarisationsfilter standen zur Verfügung. Das Mikroskop war mit Okularen Kpl W 10x/20, den Objektiven 2,5/0,08, Planopo 4/0,14, Planopo 10/0,32, Planopo 40/0,65 und einer 12 Volt Lichtquelle ausgestattet. Das Auflösungsvermögen, das den Abstand von zwei Struktureinheiten beschreibt, die gerade noch getrennt abgebildet werden können, betrug etwa 0,5 µm.

2.11.2 Semiquantitatives Bewertungssystem

In Anlehnung an die Scores von O´Driscoll und Salter [45], Pineda [48], Mankin [43], Fujimoto [17] und Siebert [55] wurden die Toluidinblau-gefärbten Zylinder-Präparate mit dem oben genannten Lichtmikroskop mit einer 2,5er, 10er, 20er und 40er Vergrößerung anhand eines eigenen entwickelten Scores analysiert (Tab. 5).

Kategorien	Score-Punkte
1. Größe des Knochenzylinders	
vollständig erhalten	2
teilweise reduziert	1
stark reduziert	0
2. Bonding: Apposition beider Kontaktflächen (Lagerknochen und Knochenzylinder)	
verknöchert, Faserknochen	4
verknöchert, Geflechtknochen	3
gegenüberliegende Ausläufer	2
Osteoid	1
keine	0
3. Knöcherne Überbrückung des Interface (Spalt zwischen Lagerknochen und Knochenzylinder)	
75 – 100%	4
50 – 75%	3
25 – 50%	2
0 – 25%	1
0%	0
4. Knochenneubildung im Lagerknochen	
a) zum Spalt hin angrenzend	
hohe	2
geringe	1
keine	0

b) im Spalt entfernten Gebiet	
hohe	2
geringe	1
keine	0
5. Knochenneubildung im Knochenzylinder	
a) zum Spalt hin angrenzend	
hohe	2
geringe	1
keine	0
b) im Spalt entfernten Gebiet	
hohe	2
geringe	1
keine	0
Score Gesamt	18

Tab. 5 Semiquantitatives Bewertungssystem (Score): Einwachsverhalten des spongiösen Knochenzylinders am Olecranon mit und ohne Kleberapplikation (Bohrlochmodell am Olecranon).

Dabei wurde die Gruppe von Präparaten, bei der die Reposition des Zylinders in das Bohrloch mit Knochenkleber erfolgte, mit der Gruppe von Präparaten verglichen, bei der die Reposition des Zylinders ohne Kleber erfolgte. Die Evaluation wurde in einer Blindstudie durchgeführt, sodass dem Betrachter der Euthanasiezeitpunkt und die Gruppe unbekannt waren. Da bei einigen Präparaten nur eine grobe Einschätzung gelang, kann dieser Score lediglich eine ungefähre Richtung vorgeben.

In 5 Kategorien konnte eine maximale Scorezahl von 18 erreicht werden. Es muss darauf hingewiesen werden, dass die Art der Auswertung subjektiv und demzufolge von dem Betrachter abhängig war.

Mit Hilfe einer zusätzlichen qualitativen Beschreibung aller histologischen Schnittpräparate konnte neben der oben beschriebenen semiquantitativen Auswertung eine objektive Bewertung auf Zellebene angeschlossen werden.

Die erste Kategorie des Scores beschreibt die Größe des Knochenzylinders. Dabei wurde eine Aussage über die quantitative Existenz des Implantates gemacht. Es wurden 2 Punkte vergeben, wenn der Knochenzylinder in seiner Größe nicht von seiner Ausgangsgröße abwich. Bei leichter Minderung bzw. bei starkem Rückgang des Zylinders wurden 1 bzw. 0 Punkte vergeben. Mit Hilfe des Computerprogramms Image Pro Plus (MEDIA CYBERNETICS, MD 20910 USA) wurde die Fläche des Knochenzylinders ermittelt und objektive Ergebnisse erzielt. Es wurde ein Kreis von der Größe des Bohrlochdefektes um den Knochenzylinder gelegt, die Spongiosa-Bälkchen rot angefärbt und die Fläche berechnet (Abb. 27).



Abb. 27 Flächenberechnung des Knochenzylinders mit dem Computerprogramm Image Pro Plus.

Die berechnete Fläche wurde mit der Fläche von den Spongiosabälkchen eines dem Bohrlochzylinder gleichgroßen Zylinders von einem intakten Knochenstück verglichen.

Die zweite Kategorie beschäftigt sich mit dem „Bonding“, der Apposition beider Kontaktflächen zwischen Lagerknochen und Knochenzylinder. Unter Bonding wird ein stoffschlüssiger An- und Einbau im Bereich des Knochens verstanden. Somit bezieht sich diese Kategorie auf die Qualität der Überbrückung des Interface, dem kleberhaltigen oder bindegewebigen Spalt zwischen Lagerknochen und Knochenzylinder. Im Laufe einer möglichen Überbrückung wurden verschiedene Stadien zwischen Faser- und Lamellenknochen durchlaufen. Zunächst wurde Osteoid gebildet, das einem Punkt entsprach. Danach kam es zu einem Annähern

von sich gegenüberliegenden Ausläufern neu gebildeten Geflechtknochens. Dafür wurden 2 Punkte vergeben. Wenn sich diese Ausläufer des Geflechtknochens berührten, konnten 3 Punkte erreicht werden. 4 Punkte erhielt ein Schliff, wenn sich der Geflechtknochen in Lamellenknochen umgewandelt hatte.

In der nächsten Kategorie wird die quantitative Überbrückung des Interface, dem Spalt zwischen Lagerknochen und dem Knochenzylinder, beschrieben. Eine vollständige Überbrückung des Spaltes war dann gegeben, wenn kein Kleber oder Bindegewebe mehr zu sehen war. Bei komplett darstellbarem Spalt ohne jegliche knöcherne Überbrückung erhielt das zu beurteilende histologische Schliffpräparat keinen Punkt. Zwischen diesen beiden Extremen gab es Abstufungen von 0-25%, 25-50% sowie 75-100%, wobei jeweils 1, 2, 3 oder 4 Punkte vergeben wurden. Die jeweilige Einschätzung und der erarbeitete Score erfolgte mit Hilfe des Pro Plus Computerprogramms. Da es keinen sicheren Hinweis gab ob der Kleber abgebaut war bzw. wo er sich befand ließ sich lediglich der gesamte Spalt (Interface) beurteilen.

In der letzten Kategorie wird die Knochenneubildung des Lagerknochens und des Knochenzylinders jeweils im Spalt nahen Gebiet und im Spalt entfernten Gebiet bewertet. Da in der Klebergruppe der Spalt zum Teil nicht ganz mit Kleber ausgefüllt war, bezog sich diese Bewertung nur auf den Abschnitt im Schliff, in dem Knochenkleber deutlich zu erkennen war. Die mit Bindegewebe ausgefüllten Spaltbereiche der Klebergruppe entsprachen der Kontrollgruppe und wurden in dieser Kategorie nicht berücksichtigt, da man nicht wissen konnte, ob in diesen Arealen von Anfang an kein Kleber war oder ob dieser schon abgebaut wurde. Wenn keine Osteogenese, weder Osteoidbildung noch Ausläufer von Geflechtknochen, zu erkennen war, erhielt der Schliff keinen Punkt. Im Spalt nahen Gebiet wurden die Geflechtknochenausläufer bewertet. Dabei wurde unter einer geringen und einer hohen Knochenneubildung differenziert, die durch 1 oder 2 Punkte honoriert wurden. Im Spalt entfernten Gebiet wurde ebenso verfahren.

2.11.3 Transmissionselektronenmikroskopie (TEM)

Die 2 mm dicken Knochenscheiben des Olecranon und der Ulna wurden in Yellow-Fix mit 0,1 M Na-Phosphatpuffer (pH: 7,3) für 24 Stunden bei - 4° Celsius fixiert. Nach gründlichem Spülen mit 0,1 M Na-Phosphatpuffer dehydrierte man die

Knochenscheiben in einer aufsteigenden Alkoholreihe. Anschließend wurden die Proben über Nacht bei 100 % Alkohol im Exsikkator dehydriert, um sie danach in Epon einzubetten.

Semidünnschnitte mit einer Dicken von ca. 1 μm stellte man mit dem Ultramicrotom Reichert-Ultracut (Fa. LEICA) her und färbte diese mit 1 % igem Toluidinblau und 1 % Borax an. Unter dem Lichtmikroskop suchte man jeweils den Frakturspalt und den angrenzenden Lagerknochen auf. Von den zu untersuchenden Stellen fertigten wir Ultradünnschnitte mit einer Dicke von 60-80 nm mit dem oben bereits erwähnten Ultramicrotom mit Diamantmessern an. Mit einer Uranylacetat- und Bleicitratlösung führten wir die Nachkontrastierung mittels des Ultrastainer-Reichert (Fa. LEICA) durch. Abschließend untersuchten wir die Ultradünnschnitte transmissionselektronenmikroskopisch an einem TEM-Gerät EM 109 (Fa. ZEISS, Oberkochen) bei 80 kV Beschleunigung bei unterschiedlicher Vergrößerung.

Die Untersuchungen hielten wir fotografisch auf Mittelformnegativfilmen mit nachfolgender Erstellung von Papierabzügen fest. Das Auflösungsvermögen von 0,2 - 0,3 μm erlaubte es, mit einer Vergrößerung bis zum 1.000.000 fachen bis in den Größenbereich der Makromoleküle vorzudringen. Die transmissionselektronenmikroskopischen Bilder (TEM-Bilder) wurden mit dem Flachbrettscanner (Scan Jet 4c Hewlett Packard) digitalisiert.

Von dem für die Elektronenmikroskopie fixierten und eingebetteten Gewebe liessen sich mit dem Ultramicrotom sogenannte *Semidünnschnitte* herstellen. Diese Schnitte waren 0,5-2 μm dick und konnten direkt gefärbt werden. Dies geschah mit basischen Farbstoffen, z.B. Toluidinblau. Die Semidünnschnitte erlaubten die Untersuchung von optimal fixierten Strukturen, insbesondere dünnen Schichten, auch im Lichtmikroskop. Außerdem konnte ein unmittelbar im Anschluss gewonnener Feinschnitt im Elektronenmikroskop untersucht werden.

2.11.4 Spiralcomputertomographie

In der konventionellen Licht- und Elektronenmikroskopie erhält man durch die Aufsicht auf dünne Schnittebenen nur eine zweidimensionale Darstellung. Da bestimmte Informationen zwischen den einzelnen Schnitten verloren gehen und bei der Präparation zerstört werden können, kann man nicht von diesen

zweidimensionalen Schnitten auf ein dreidimensionales Objekt schließen. Auch ein Röntgenbild ist nur ein Additionsbild, das heißt die Schwächungswerte aller im Strahlengang hintereinander liegenden Objektelemente addieren sich. Manche pathologische Veränderung kann daher nicht erkannt werden, wenn vor oder hinter ihr befindliche Objektelemente einen dichteren Schatten geben oder zu viele Konturen sich überschneiden. Außerdem enthält ein Additionsbild keine Informationen über die Tiefenlage und –ausdehnung eines schattengebenden Objektdetails [40]. Mit der Computertomographie können Transversalschnitte (Schichtaufnahmen) durch das durchstrahlte Objekt abgebildet werden. Bei der Spiraltechnik wird der Patient (hier die Knochenprobe) mit exakt definierter Geschwindigkeit durch das Messfeld geschoben, sodass insgesamt eine spiralförmige Bewegung resultiert. Aus den so gewonnenen Daten lässt sich ein lückenloses dreidimensionales Bild rekonstruieren.

Für die Auswertung des Olecranonmodells wurden zu jedem Beobachtungszeitpunkt je ein Olecranon eines Tieres aus der Klebergruppe, aus der Kontrollgruppe und aus der Gruppe, in der der Defekt mit Kleber aufgefüllt worden war, nach dem Zufallsprinzip ausgewählt. Das freipräparierte Olecranon wurde in toto in 4 %ige Formalinlösung eingelegt, eine spezielle Aufbereitung war nicht notwendig. Vor der weiteren Bearbeitung wurden die Proben der spiralcomputertomographischen Untersuchung mit dem Somatom Plus 4 Spiralcomputertomograph (Firma SIEMENS, München) in der Abteilung für diagnostische Radiologie, unter der Leitung von Prof. Dr. W. S. Rau in der Universitätsklinik in Gießen, unterzogen. Die zugrunde liegenden Schichtwerte (Slize) waren:

Berechnete Schichtdicke 2,0 mm, akquirierte Schichtdicke 0,5 mm, Abstand zwischen den einzelnen Schichten 1,0 mm. Gemessen wurde mit einer Stromstärke von 100 mAs und mit einer Spannung von 120 kV. Durch die aussagekräftige Spiralcomputertomographie wurden die aus der Mikroskopie und den Röntgenbildern erhobenen Aussagen über die Frakturheilung und die Neubildung spongiösen Knochens in dem Frakturspalt analysiert und ergänzt.

3 Ergebnisse

3.1 Röntgenuntersuchungen am Bohrlochmodell (spongiöser Bereich)

Kleber- und Kontrollgruppe nach 21 Tagen

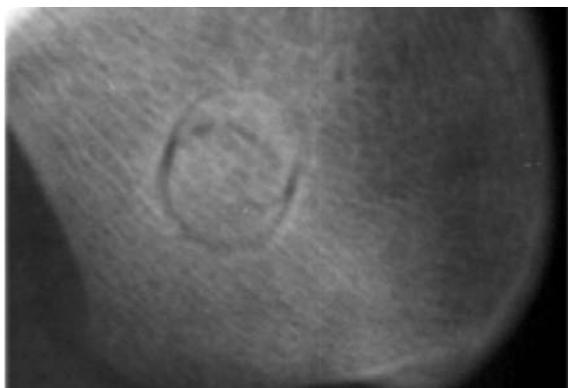


Abb. 28a Seitliche Aufnahme des Zylinders im Olecranon mit Kleber.

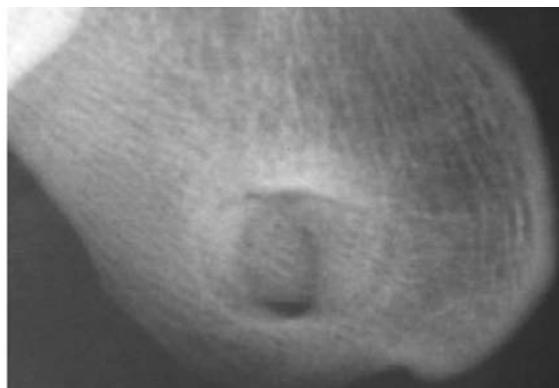


Abb. 28b Seitliche Aufnahme des Zylinders im Olecranon ohne Kleber.

Kleber- und Kontrollgruppe nach 42 Tagen

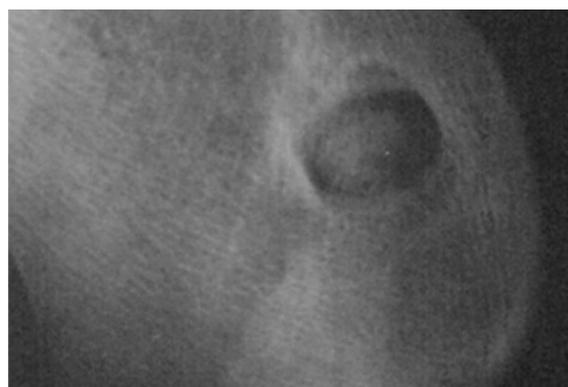


Abb. 29a Kleberapplikation. Der Zylinder ist teilweise resorbiert. Spalt zwischen Zylinder und Lagerknochen.



Abb. 29b Ohne Kleber kommt es ebenso zu einer teilweisen Resorption. Spalt zwischen Zylinder und Lagerknochen.

Kleber- und Kontrollgruppe nach 84 Tage

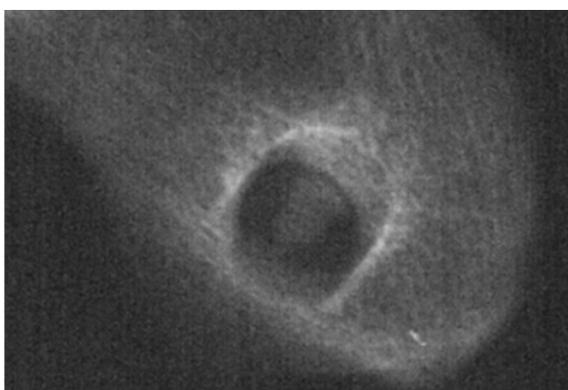


Abb. 30a Zylinder mit Kleber ist deutlich resorbiert mit breitem Spalt zum Lager.

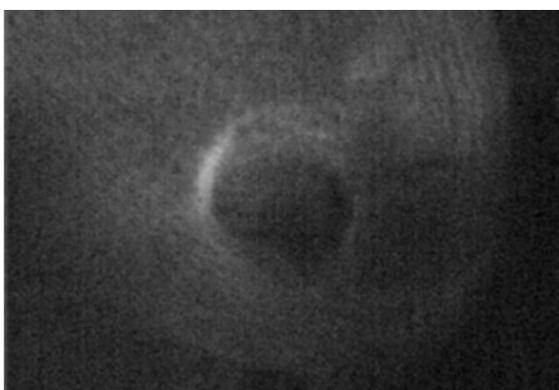


Abb. 30b Zylinder ohne Kleber ist fast vollständig resorbiert.

3.2 Lichtmikroskopie

3.2.1 Ergebnisse am Olecranon (spongiöser Bereich)

Klebergruppe nach 21 Tagen

In der Übersicht der Klebergruppe nach 21 Tagen ließ sich der Knochenzylinder bei jedem Präparat kreisförmig erkennen (Abb. 31). Ungleichmäßige Abstände zwischen Knochenzylinder (Transplantat) und Lagerknochen waren ursächlich auf eine nicht immer exakte Reposition zurückzuführen. Der Osteotomiespalt war bei keinem der Präparate vollständig mit Knochenkleber ausgefüllt.

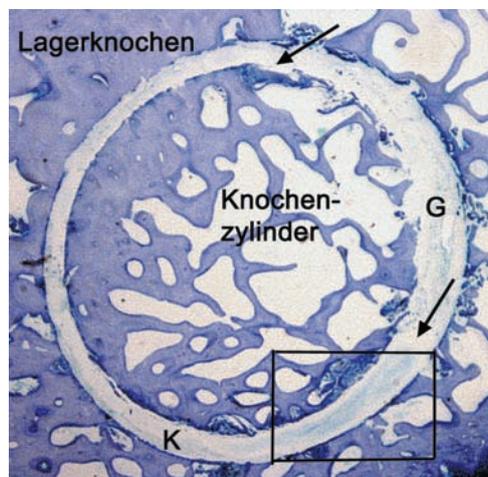


Abb. 31 Übersichtsaufnahme Kleber 21 Tage. Toluidinblaufärbung, Vergr. 4,8 x.

Es gab Kleberareale (K) im Spalt, die sich mit kleberfreien Arealen, ausgefüllt mit bindegewebigem Granulationsgewebe (G), abwechselten. In Abbildung 31 weisen die Pfeile (→) auf die Klebergrenzen hin. Bei der Beurteilung bzw. Betrachtung der Schliffe wurden die kleberfreien Areale in der Klebergruppe wie Abschnitte aus der Kontrollgruppe behandelt.

Durch die leicht bläuliche Anfärbung des Klebers konnte der Knochenkleber größtenteils gut erkannt werden. Die Intensität der Anfärbung des Klebers nahm von der Klebermitte zum Kleberrand hin ab. Daher wurde die Kondensorblende zur lichtmikroskopischen Klebererkennung hinzugezogen. Die Osteotomieränder von Lagerknochen (Lk) und Knochenzylinder (Kz) im Knochenkleberbereich erscheinen glatt (Abb. 32). Der Kleber grenzt an den Knochenzylinder und an den Lagerknochen. Es lassen sich Knochensplitter (Ks) -Knochenmehl vermischt mit Granulationsgewebe- finden, die eine unregelmäßige, schollige Struktur aufweisen.

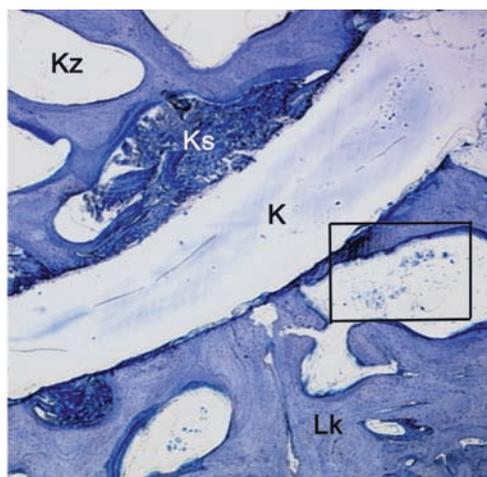


Abb. 32 Detailaufnahme nach 21 Tagen Kleberapplikation, Toluidinblaufärbung, Vergr. 25 x.

Im klebergefüllten Spalt (K) können keine Makrophagen und mehrkernigen Riesenzellen beobachtet werden. In dem angrenzenden Spongiosaraum (S) des Lagerknochens (Lk) lassen sich dagegen massenhaft ein- und mehrkernige Makrophagen und Riesenzellen finden (Abb. 33 und 34).

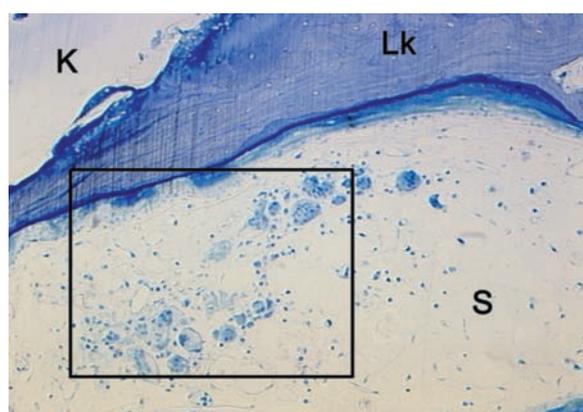


Abb. 33 Detailaufnahme nach 21 Tagen Kleberapplikation, Toluidinblaufärbung, Vergr. 100 x.

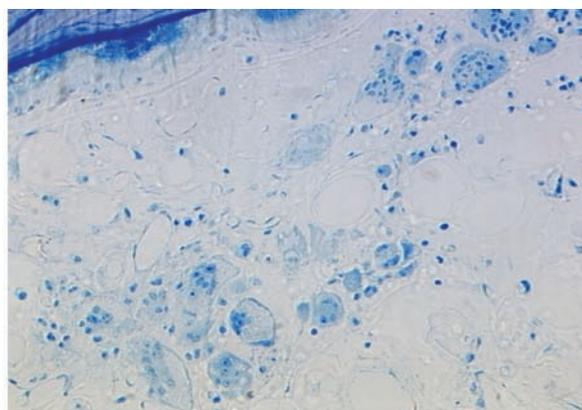


Abb. 34 Detailaufnahme nach 21 Tagen Kleberapplikation, Toluidinblaufärbung, Vergr. 200 x.

Im osteotomienahen Gebiet des Knochenzylinders findet man in einigen Präparaten einzelne Resorptionslakunen und Osteoklasten. Im Zentrum des Zylinders zeigt sich das Bild eines intakten Knochens mit Osteoblasten an den Spongiosatrabekeln. Ist der Spalt an einer Stelle sehr eng und kleberfrei, lassen sich am Zylinder Osteoidbildungen und einzelne neu gebildete Geflechtknochen trabekel zum Spalt hin beobachten.

An kleberfreien und sehr schmalen Osteotomiearealen lassen sich Geflechtknochenneubildungen auch im Lagerknochen erkennen. Außerdem kann man eine Knochenneubildung in Richtung Knochenkleber beobachten. Ehemalige Resorptionslakunen sind mit Osteoid und neu gebildetem Knochen aufgefüllt worden. Es zeigen sich intakte perlschnurartige Osteoblastensäume an den Knochen trabekeln.

Kontrollgruppe nach 21 Tagen

Wie bei der Klebergruppe wurde der Knochenzylinder (Kz) auch bei der Kontrollgruppe nicht immer zentral repositioniert. Daraus resultieren auch in dieser Gruppe Unterschiede in der Spaltweite der einzelnen Präparate, die bei der Auswertung berücksichtigt werden müssen (Abb. 35).

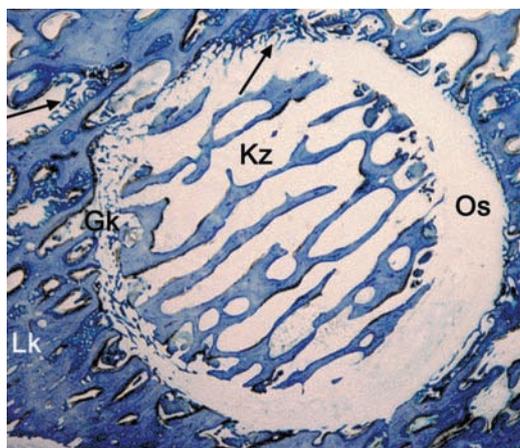


Abb. 35 Übersichtsaufnahme nach 21 Tagen (Kontrollgruppe), Toluidinblaufärbung, Vergr. 4,8 x.

Auf der einen Seite des Defektes sieht man einen sehr breiten mit Granulationsgewebe ausgefüllten Osteotomiespalt (Os), der keine Überbrückung oder eine Osteogenese von Geflechtknochen trabekeln aufweist. Auf der gegenüberliegenden Seite wird ein sehr schmaler Osteotomiespalt zwischen

Lagerknochen (Lk) und Knochenzylinder (Kz) mit Geflechtknochentrabekeln (Gk, →) überbrückt (Abb. 35, 36).

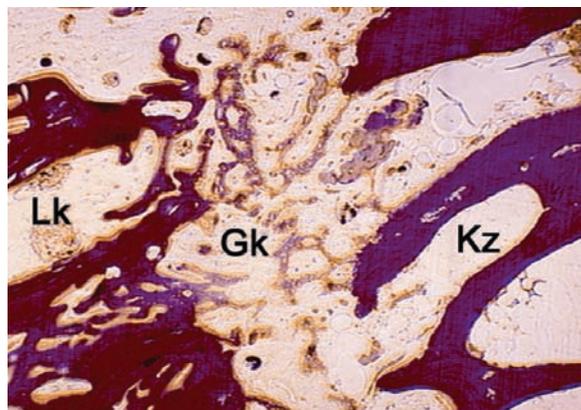


Abb. 36 Detailaufnahme nach 21 Tagen (Kontrollgruppe), Van Giesson, Vergr. 25 x.

Im Vergleich zu der Klebergruppe konnten ebenfalls liegende Knochensplitter in den Lakunen des Knochenzylinders gefunden werden.

In der höheren Vergrößerung sind die im Osteotomiespalt neugebildeten Geflechtknochentrabekel deutlich zu erkennen (Abb. 37).

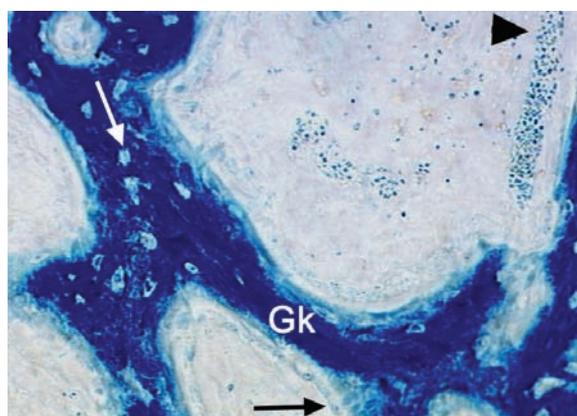


Abb. 37 Detailaufnahme nach 21 Tagen (Kontrollgruppe), Toluidinblaufärbung, Vergr. 200 x.

Es wurden Osteoidsäume und perlschnurartige Säume von Osteoblasten (→) an den Trabekeln des Geflechtknochens (Gk) beobachtet. Daneben zeigten sich eingemauerte Osteozyten (⇒) in den Trabekeln und Ansammlungen von Erythrozyten (▶).

Die Klebergruppe nach 21 Tagen Kleberapplikation liegt im Vergleich zu der Kontrollgruppe hinsichtlich der Osteogenese im Osteotomiespalt deutlich zurück. Wie die Kontrollgruppe zeigt, ist eine Durchbauung des Knochenspalts mit Geflechtknochen dann möglich, wenn die Spaltbreite unter 1 mm liegt.

Kleber: Auf allen Präparaten ist eine geringe Osteo(neo)genese (Bildung von Geflechtknochen) zu beobachten. Das Gesamtbild wird neben den Ansammlungen von Makrophagen im Spongiosaraum von glatten Osteotomierändern am Lagerknochen und am Knochenzylinder bestimmt.

Kontrolle: Es lässt sich eine ausgeprägte Osteogenese im Lagerknochen und am Knochenzylinder beobachten. Eine Spaltüberbrückung mit Geflechtknochen gelingt nur an den Arealen, an denen der Osteotomiespalt sehr schmal ist.

Defekt mit Knochenkleber nach 21 Tagen

Nach 21 Tagen Knochenkleberapplikation füllt der Knochenkleber den gesamten Defekt im Lagerknochen des Olecranon aus (Abb. 38). Es zeigen sich glatte Osteotomieränder zwischen dem Lagerknochen (Lk) und dem blau angefärbten Knochenkleber (K).

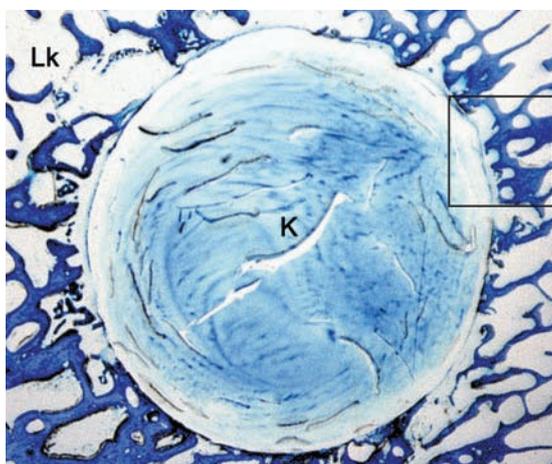


Abb. 38 Übersichtsaufnahme nach 21 Tagen Kleberapplikation, Toluidinblaufärbung, Vergr. 4,8 x.

Granulationsgewebe und eine Knochenneubildung an der Defektstelle (Defektrand) können nicht beobachtet werden (Abb. 39). Zwischen Lagerknochen (Lk) und Kleber (K) liegt immer ein schmaler Streifen von Granulationsgewebe (G). Die Knochen trabekel des Lagerknochens haben keinen direkten Kontakt zum Kleber (Abb. 40). Es kann neu gebildetes Osteoid (O) und eine Geflechtknochenneubildung

am Rande des intakten Lagerknochens beobachtet werden. Das an den Lagerknochen (Lk) angrenzende lockere Bindegewebe (LB) geht über in faserreiches Bindegewebe (FB) und umgibt den Kleber (K).

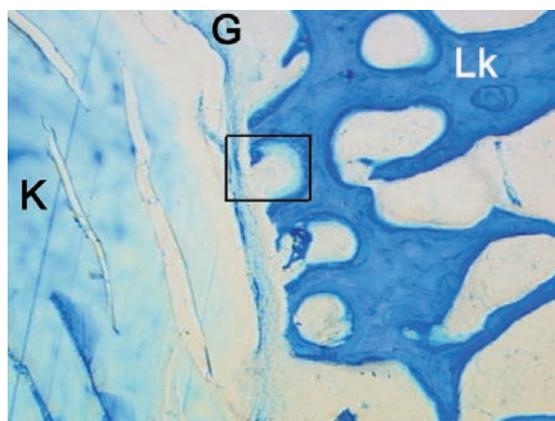


Abb. 39 Detailaufnahme nach 21 Tagen Kleberapplikation Toluidinblaufärbung, Vergr. 25 x.

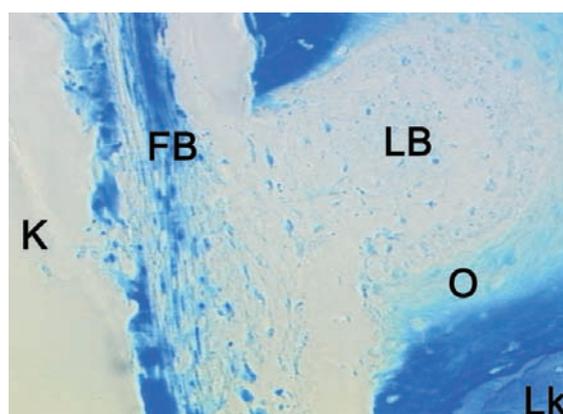


Abb. 40 Detailaufnahme nach 21 Tagen Kleberapplikation, Toluidinblaufärbung, Vergr. 200 x.

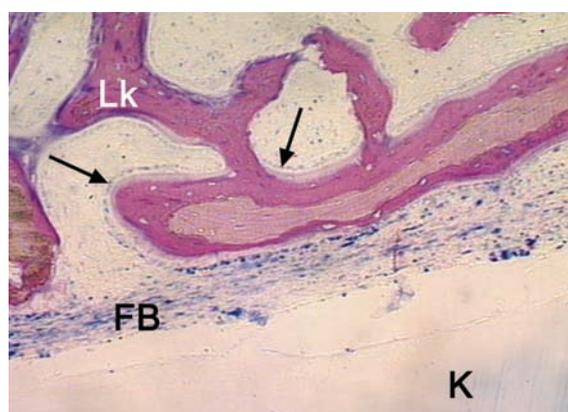


Abb. 41 Detailaufnahme der Interfaceregion nach 21 Tagen Knochenkleberapplikation. Levai Laczko, Vergr. 100 x.

Die Abbildung 41 zeigt die Interfaceregion diesmal in der Färbung nach Levai Laczko. Zwischen dem Knochenkleber (K) und dem angrenzenden Lagerknochen (Lk) befindet sich bei allen Präparaten dieser Gruppe in den Interfaceregionen faseriges Bindegewebe (FB). Der intakte Lagerknochen weist Osteoblastensäume auf (→).

Leerdeft nach 21 Tagen

In den Präparaten mit Leerdeft ist der Defekt nach 21 Tagen mit Granulationsgewebe ausgefüllt (Abb. 42). Neugebildete Geflechtknochen trabekel wachsen vom Lagerknochen (Lk) in den Leerdeft hinein (→). Dadurch sind die Osteotomieeränder des Lagerknochens des Olecranon unregelmäßig aufgeworfen.

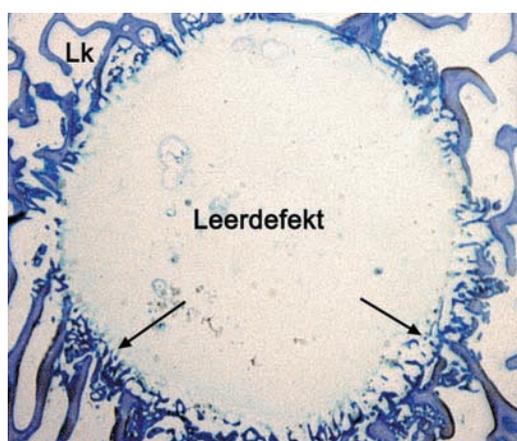


Abb. 42 Leerdeft nach 21 Tagen, Toluidinblaufärbung, Vergr. 4,8 x.

In der höheren Vergrößerung des Osteotomieerandes wird neben den durch den Osteotomievorgang entstandenen Knochensplittern überwiegend neu gebildeter Geflechtknochen sichtbar, der von dem Lagerknochen in radiärer Richtung in den Leerdeft wächst (Abb.43). Gleichmäßige Osteoidbildungen (▶), vereinzelte in der Grundsubstanz eingemauerte Osteozyten (⇒) und Osteoblastensäume (→) am Geflechtknochen sowie eine starke Vaskularisation (V) prägen das Bild dieser Präparate und sprechen für eine intakte Osteoneogenese. Direkt in der Nachbarschaft kann der schollige Verfall der Knochensplittter, ein nekrotischer Bezirk (N), beobachtet werden. Neben dem Verlust der Lamellenstruktur des Knochens lässt sich amorphes, meist eosinophiles Material und untergegangene Osteozyten erkennen.

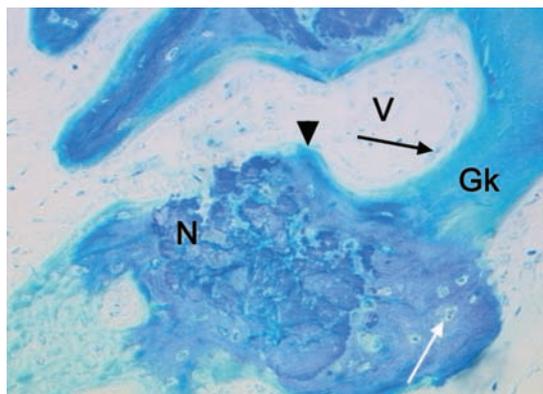


Abb. 43 Detailaufnahme des Osteotomierandes nach 21 Tagen (Leerdefekt), Toluidinblaufärbung, Vergr. 200 x.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass nach 21 Tagen der mit Kleber aufgefüllte Defekt im Vergleich zu dem Leerdefekt hinsichtlich der Osteogenese deutlich zurück liegt.

Defekt mit Kleber: Zwischen dem Lagerknochen des Olecranon und dem Knochenkleber, der den Defekt nach 21 Tagen vollständig ausfüllt, liegt ein schmaler Saum von Granulationsgewebe. Dieser Granulationssaum verhindert einen Kontakt zwischen Lagerknochen und Knochenkleber. Die Präparate zeigen glatte Osteotomieränder. Eine Knochenneubildung in Form von Knochen trabekeln oder Geflechtknochenbildung wird nicht beobachtet.

Leerdefekt: In den Präparaten mit Leerdefekt kann eine Knochenneubildung in Form von Geflechtknochen trabekeln, die radiär in das mit Granulationsgewebe ausgefüllte Defektlumen wachsen, beobachtet werden. Osteoblastensäume, eingemauerte Osteozyten und eine starke Vaskularisation weisen auf eine intakte Osteogenese hin.

Klebergruppe nach 42 Tagen

Die lichtmikroskopischen Gegebenheiten der Präparate nach 42 Tagen Knochenkleberapplikation gleichen weitgehend denen nach 21 Tagen. Wie schon bei den Kleberpräparaten nach 21 Tagen findet sich auch nach 42 Tagen eine unregelmäßige inhomogene Verteilung des Knochenklebers im Osteotomiespalt. Außerdem kann eine umschriebene Resorption des Knochenzylinders beobachtet werden (Abb. 44).

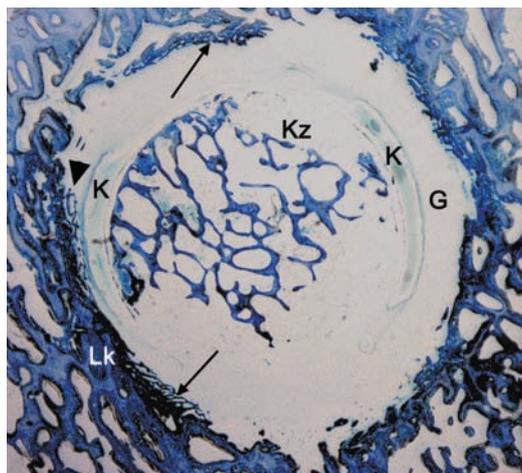


Abb. 44 Übersichtsaufnahme nach 42 Tagen Kleberapplikation. Toluidinblaufärbung, Vergr. 4,8 x.

Die Knochenzylinder (Kz) sind teilweise nicht zentral repositioniert worden. Zwischen dem Knochenkleber (K) und dem Lagerknochen (Lk) liegt auch nach 42 Tagen ein breiter homogener Streifen Granulationsgewebe (G). Nur an einigen wenigen Stellen stehen neu gebildeter Knochen und Knochenkleber in Kontakt zueinander (►). Im Lagerknochen und vom Lagerknochen zum Osteotomiespalt hin ist eine aktive Knochenneubildung zu beobachten (→).

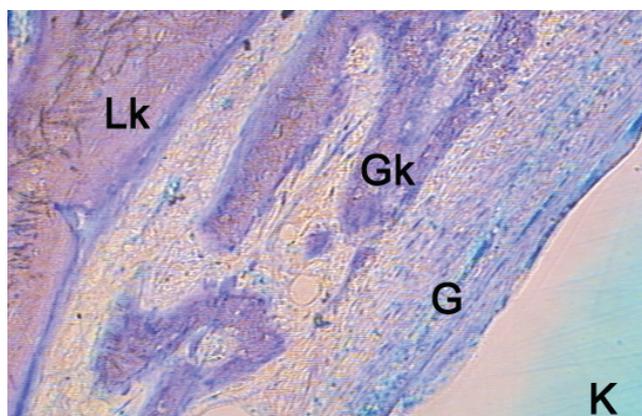


Abb. 45 Detailaufnahme der Interfaceregion nach 42 Tagen Kleberapplikation. Toluidinblaufärbung, Vergr. 100 x.

Bei einigen Präparaten wird der Osteotomiespalt im Bereich kleberfreier Areale mit neu gebildeten Geflechtknochen überbrückt. Wenn kein Kleber zu erkennen ist und der Spalt eine gewisse Breite nicht überschritten hat, finden sich am Lagerknochen (Lk) neu gebildete Geflechtknochen (Gk). Zwischen den Knochenstrahlen und dem Knochenkleber (K) liegt größtenteils ein dicker homogener Saum von faserreichem Bindegewebe (G, Abb. 45).

Neben den zum Teil resorbierten Knochenzylindern sind die Knochenzylinder (Kz) von ca. 33 % der Präparate der Klebergruppe nach 42 Tagen noch vollständig wie in Abbildung 46 erhalten.

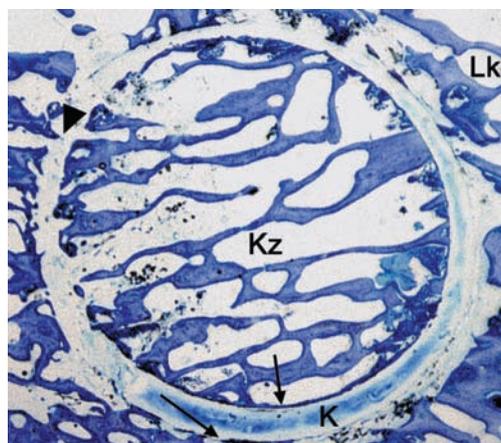


Abb. 46 Übersichtsaufnahme nach 42 Tagen Kleberapplikation. Toluidinblaufärbung, Vergr. 4,8 x.

Es fällt auf, dass die Knochenränder (Osteotomieeränder) in klebergefüllten Abschnitten plan sind (→), während sie an den Osteotomiebereichen, die mit Granulationsgewebe ausgefüllt sind, unregelmäßig erscheinen (▶).

Kontrollgruppe nach 42 Tagen

Bei den Präparaten der Kontrollgruppe nach 42 Tagen sind die reimplantierten Knochenzylinder (Kz), wie in der Klebergruppe, zu ca. 70 % resorbiert (Abb. 47a).

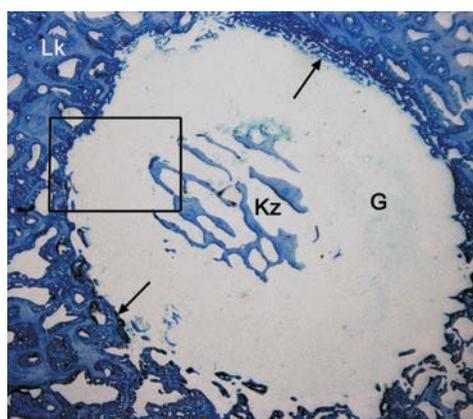


Abb. 47a

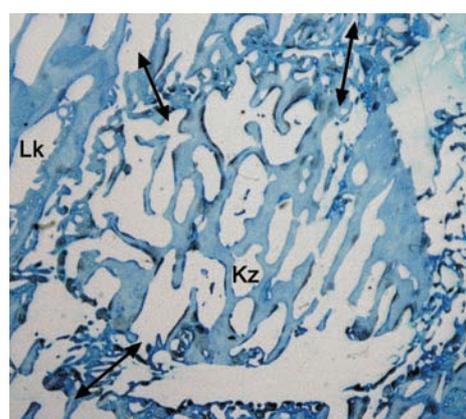


Abb.47b

Abb. 47a, b Übersichtsaufnahmen nach 42 Tagen (Kontrollgruppe). Toluidinblaufärbung, Vergr. 4,8 x.

Der Osteotomiespalt ist durch die Degradation des Knochenzylinders sehr groß geworden und mit Granulationsgewebe (G) ausgefüllt. In ca. 30 % sind die Knochenzylinder (Kz) nach 42 Tagen fast vollständig erhalten und an mehreren Stellen durch eine überbrückende Geflechtknochenneubildung mit dem Lagerknochen (Lk) verbunden (\leftrightarrow , Abb. 47b). Die ursprüngliche Form eines Zylinders ist nicht mehr deutlich zu erkennen. Bei den resorbierten Zylindern zeigt sich fast ausschließlich in den spaltnahen Randbereichen des Knochenzylinders und des Lagerknochens eine sehr aktive Knochenneubildung (\rightarrow , 47a).

Vor allem an den Arealen, an denen der Osteotomiespalt sehr schmal ist, kann man eine ausgeprägte Osteoneogenese erkennen (\rightarrow , Abb. 48 a, b). In den von dem Osteotomiespalt weiter entfernten Bereichen lässt sich kaum eine Osteoneogenese beobachten

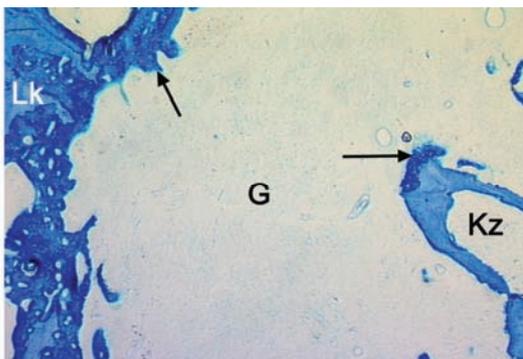


Abb. 48a

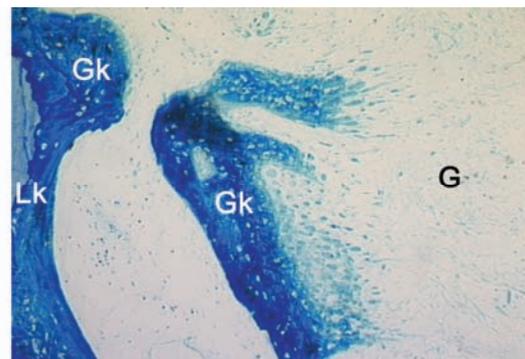


Abb. 48b

Abb. 48a, b Detailaufnahmen des Osteotomiespaltes nach 42 Tagen (Kontrollgruppe). Lagerknochen (Lk) Geflechtknochen (Gk), Knochenzylinder (Kz), Granulationsgewebe (G), Toluidinblaufärbung, Vergr. 25 x, 200 x.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass die Kontrollgruppe nach 42 Tagen hinsichtlich der Osteogenese wie nach 21 Tagen weiterhin deutlich vor der Klebergruppe liegt. In der Kleber- und in der Kontrollgruppe gibt es Präparate, bei denen der Knochenzylinder nach 42 Tagen deutlich resorbiert worden ist (Klebergruppe ca. 66 %, Kontrollgruppe ca. 70 %). Andere Präparate beider Gruppen zeigen im Vergleich dazu vollständig erhaltene Knochenzylinder.

Kleber: Wie schon nach 21 Tagen wird der Osteotomiespalt auch nach 42 Tagen nicht überbrückt, wenn sich der Knochenkleber im Osteotomiespalt befindet. Allerdings kann der Osteotomiespalt an kleberfreien Stellen zwischen dem Knochenzylinder und dem Lagerknochen überbrückt werden, wenn der Spalt eine Breite von 1 mm nicht überschreitet. Ist der Spalt weiter, so ist das in diesen Fällen durch die Resorption der Zylindertransplantate geschehen. Nach 42 Tagen erkennt man eine stärkere Ausprägung des homogenen Saums aus Granulationsgewebe als nach 21 Tagen. Es findet sich keine Veränderung der bereits nach 21 Tagen überwiegend glatten Osteotomieränder.

Kontrolle: Sowohl im Lagerknochen als auch im Knochenzylinder erkennt man nach 42 Tagen weiterhin - wie nach 21 Tagen - eine ausgeprägte aktive Osteogenese. Dies zeigt sich auch, wenn der Knochenzylinder teilweise resorbiert wurde (Abb. 48a, b).

Defekt mit Knochenkleber nach 42 Tagen

Auch nach 42 Tagen Knochenkleberapplikation füllt der Knochenkleber (K) den Defekt vollständig aus (Abb. 49).

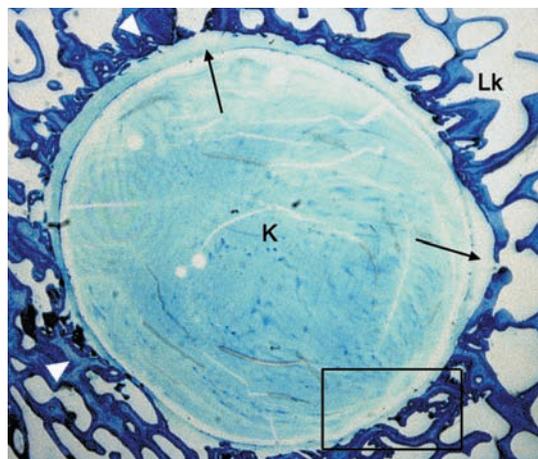


Abb. 49 Übersichtsaufnahme nach 42 Tagen Kleberapplikation. Toluidinblaufärbung, Vergr. 4,8 x.

Resorptionszonen, Hydrolysen oder Degradationen des Knochenklebers sind auch nach 42 Tagen nicht zu beobachten. Man erkennt wiederum einen breiten, homogenen Streifen von Granulationsgewebe, der zwischen dem Knochenkleber (K) und dem Lagerknochen (Lk) liegt (→, Abb.49). Am Rand des Lagerknochens am

Übergang zum Bindegewebsstreifen zeigen sich die Knochentrabekel verdickt (▷, Abb.49). Eine aktive Osteogenese kann an diesen Trabekeln beobachtet werden.

In den höheren Ausschnittsvergrößerungen der Interfaceregion sieht man deutlich, dass die neu gebildeten Knochentrabekel parallel zu dem Kleber und nicht in Richtung des Klebers wachsen (Abb. 50, 51). Es entsteht dadurch der Eindruck von dicken Knochenbälkchen.

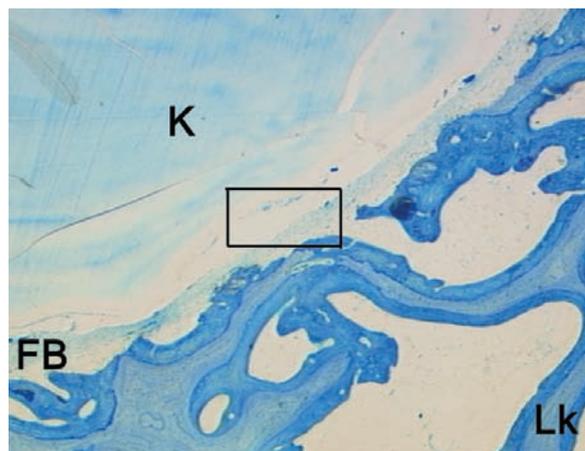


Abb. 50 Detailaufnahme des Interfaces nach 42 Tagen Kleberapplikation. Toluidinblaufärbung, Vergr. 25 x.

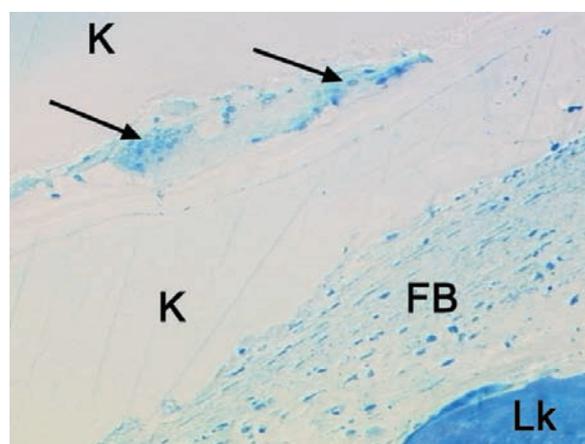


Abb. 51 Detailaufnahme der Interfaceregion nach 42 Tagen Kleberapplikation. Toluidinblaufärbung, Vergr. 200 x.

Man erkennt weiterhin den breiten Granulationssaum aus faserreichem Bindegewebe (FB, Abb. 50, 52). Zwischen dem Lagerknochen (Lk) und dem Knochenkleber (K) bzw. den Kleberabschnitten liegen mehrkernige Riesenzellen und Makrophagen (→, Abb. 51).

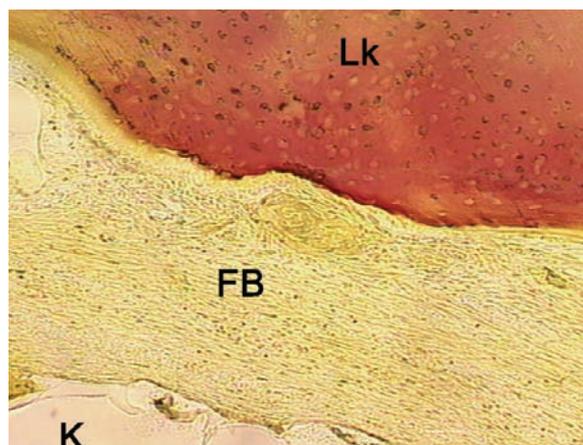


Abb. 52 Ausschnitt aus dem Interface. Van Gieson, Vergr. 200 x.

Die Abbildung 52 zeigt ein mit Van Gieson angefärbtes Präparat. Diese Färbung differenziert unterschiedlich dichte Strukturen. Lockeres Bindegewebe und Knochen (Lagerknochen (Lk)) werden rot, Muskulatur, Cytoplasma und faseriges Bindegewebe (FB) gelb angefärbt.

Leerdekt nach 42 Tagen

In den Präparaten des Leerdefts nach 42 Tagen zeigt sich eine zunehmende Steigerung der Osteogenese am Lagerknochen (Lk) im Vergleich zu der 21-Tagegruppe. Die Knochenneubildung ist deutlich weiter vorangeschritten (→, Abb. 53).

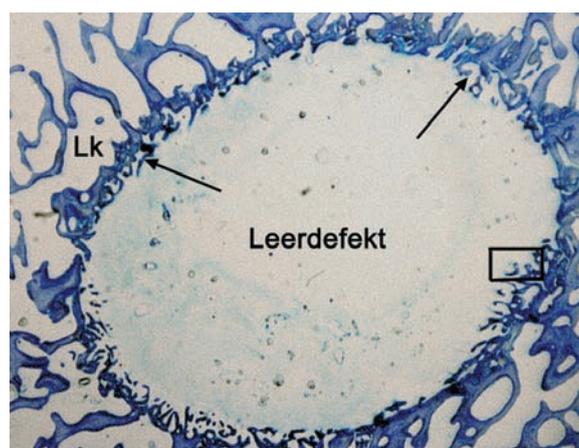


Abb. 53 Übersichtsaufnahme nach 42 Tagen (Leerdeft). Toluidinblaufärbung, Vergr. 4,8 x.

Die zunehmende Anzahl der neu gebildeten Geflechtknochen trabekel, die in Dichte und Durchmesser größer sind als nach 21 Tagen, sind ein Ausdruck für die hier

wesentlich stärker ausgeprägte Osteogenese. Dadurch erscheint der Osteotomieband des Lagerknochens unregelmäßig aufgeworfen. Ebenso kann bei der Osteoblastenbildung eine hohe Aktivität gefunden werden.

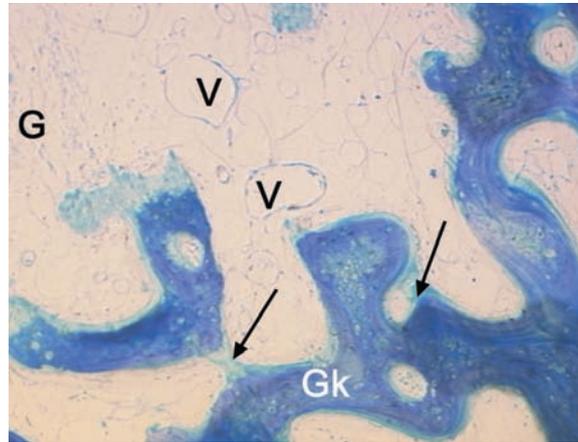


Abb. 54 Detailaufnahme nach 42 Tagen (Leerdekt). Toluidinblaufärbung, Vergr. 100 x.

In den höheren Vergrößerungen aller Präparate erkennt man, dass der Leerdekt mit reich vaskularisiertem Granulationsgewebe ausgefüllt ist (G, V, Abb. 54). Das von Osteoblasten gebildete Osteoid (→) verbindet die Geflechtknochenstrabekel (Gk) miteinander, die zusammen eine netzartige Struktur ergeben.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass der mit Kleber aufgefüllte Defekt im Vergleich zu dem Leerdekt hinsichtlich der Osteogenese auch nach 42 Tagen weiterhin deutlich zurück liegt.

Defekt mit Kleber: Der mit Kleber aufgefüllte Defekt zeigt nach 42 Tagen gegenüber der Gruppe nach 21 Tagen keine nennenswerte Änderung. Der breite Granulationssaum um den Kleber besteht immer noch und kapselt diesen ab. Durch den Kleber entsteht ein „Platzmangel“ für den neu gebildeten Lagerknochen. Die Knochenneubildung des Lagerknochens kann sich in Richtung Kleber nicht frei entfalten, sodass die Knochenstrabekel zum Defekt hin dick und vergrößert sind.

Leerdekt: Der Leerdekt zeigt gegenüber der 21-Tagegruppe eine deutlich ausgeprägtere Knochenneubildung mit einer stärkeren Osteoidbildung und Osteoblastenaktivität.

Klebergruppe nach 84 Tagen

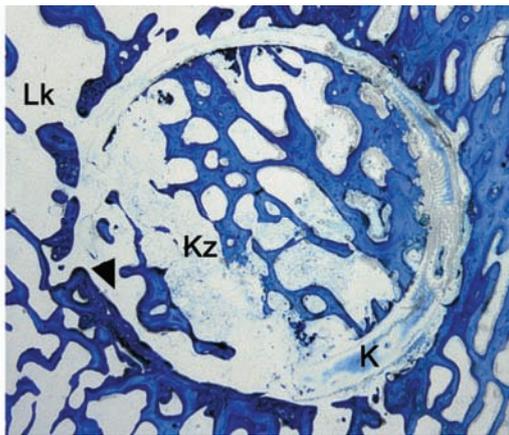


Abb. 55a

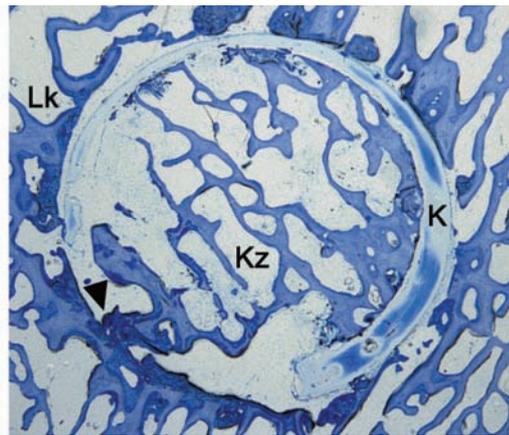


Abb. 55b

Abb. 55a, b Übersichtsaufnahmen eines Präparates nach 84 Tagen Kleberapplikation. Verschiedene Schnittebenen. Toluidinblaufärbung, Vergr. 4,8 x.

Nach 84 Tagen gleichen die lichtmikroskopischen Beobachtungen weitgehend denen nach 21 und 42 Tagen (Abb.55). An den kleberfreien mit Granulationsgewebe gefüllten Arealen kann der Spalt, sofern eine Breite von 1 mm nicht überschritten wird, überbrückt werden. Nach 84 Tagen überbrückt - im Unterschied zu den Präparaten nach 21 und 42 Tagen - nicht mehr nur Geflechtknochen sondern auch Lamellenknochen den Osteotomiespalt, so dass nach 84 Tagen eine Umwandlung von Geflechtknochen in Lamellenknochen stattgefunden hat.

Die Abbildungen 55a und 55b zeigen Übersichtsaufnahmen eines Präparates in verschiedenen Schnittebenen. Vergleicht man diese Aufnahmen miteinander, so stellt man fest, dass in Abbildung 55b die kleberfreien Areale des Spaltes mit Lamellenknochen knöchern durchbaut worden sind, während in Abbildung 55a an der gleichen Stelle in einer anderen Schnittebene zwischen dem Lagerknochen (Lk) und dem Knochenzylinder (Kz) weiterhin der Spalt mit Granulationsgewebe ausgefüllt ist (►). Des Weiteren ist in der Schnittebene von Abbildung 55b trotz Überbrückung des Osteotomiespalts deutlich mehr Knochenkleber (K) zuerkennen als in der Schnittebene von Abbildung 55a.

Die Osteoneogenese, die auf den Trabekeln des randständigen Lagerknochens stattfindet, ist nach 84 Tagen immer noch nicht abgeschlossen. Die Umwandlung von Geflechtknochen zu Lamellenknochen ist noch nicht beendet. Viele Makrophagen und mehrkernige Riesenzellen sind am Interface anzutreffen.

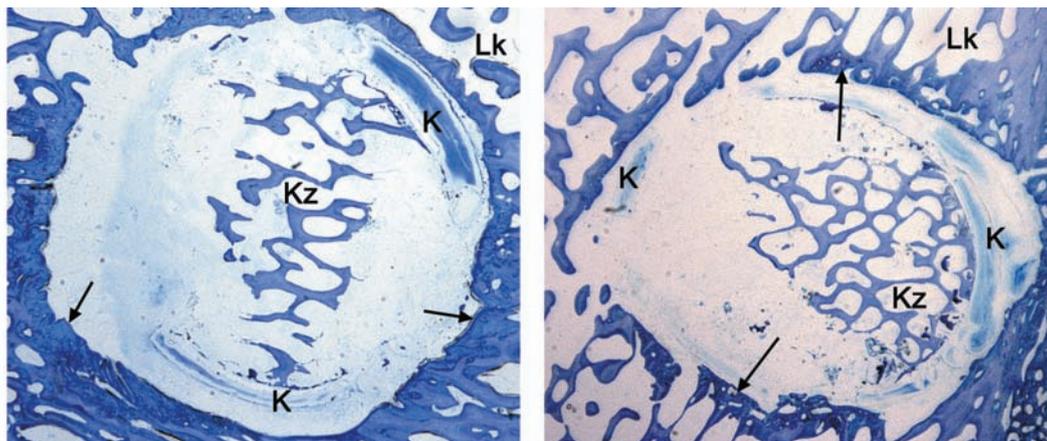


Abb. 56a

Abb. 56b

Abb. 56a, b Übersichtsaufnahmen nach 84 Tagen Kleberapplikation, Knochenzylinder (Kz), Knochenkleber (K), Lagerknochen (Lk). Toluidinblaufärbung, Vergr. 4,8 x.

In der Klebergruppe gibt es neben den Präparaten mit überwiegend intakten Knochenzylindern (ca. 33 %) und knöcherner Überbrückung des Knochenspaltes vor allem Präparate, deren Knochenzylinder (Kz) deutlich sichtbar resorbiert worden waren (Abb. 56). Eine Knochenneubildung in Richtung auf den Knochenkleber kann nicht registriert werden (→).

Kontrollgruppe nach 84 Tagen

Im Gegensatz zur Klebergruppe wird in der Kontrollgruppe nach 84 Tagen der Osteotomiespalt an mehreren Stellen mit Lamellenknochen überbrückt (Abb. 57).

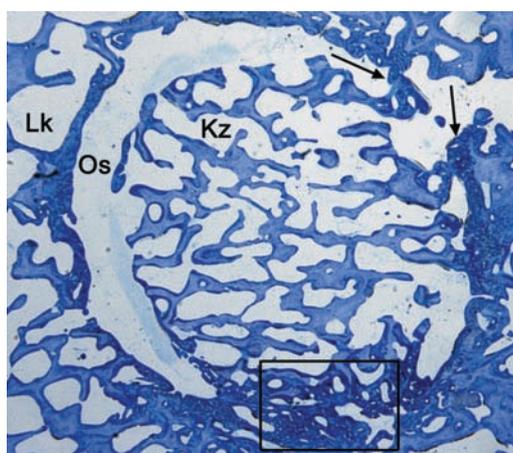


Abb. 57 Übersichtsaufnahme nach 84 Tagen (Kontrollgruppe). Toluidinblaufärbung, Vergr. 4,8 x.

Eine Überbrückung zwischen Knochenzylinder (Kz) und Lagerknochen (Lk) findet statt, wenn der Osteotomiespalt (Os) eine Breite von 0,1 mm nicht überschreitet (→, Abb. 57).

Bei den höheren Vergrößerungen erkennt man in der durchbauten Zone den neu gebildeten Lamellenknochen (Abb. 58). Die eingezeichneten schwarzen Linien lassen den ehemaligen Osteotomiespalt (Interface) vermuten. Höhere Vergrößerungen zeigen eine intakte Osteoneogenese (Abb. 59).

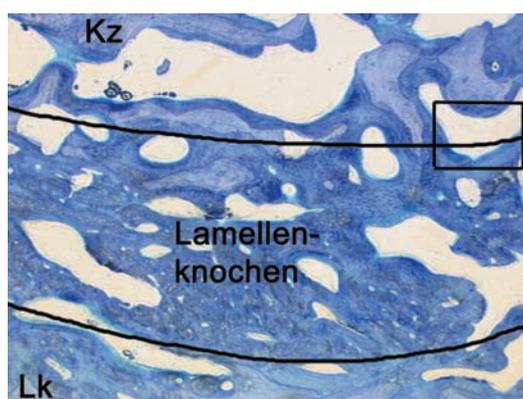


Abb. 58 Detailaufnahme nach 84 Tagen (Kontrollgruppe). Toluidinblaufärbung, Vergr. 25 x.

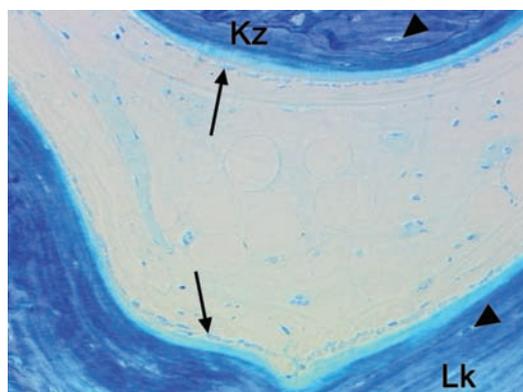


Abb. 59 Detailaufnahme nach 84 Tagen (Kontrollgruppe). Toluidinblaufärbung, Vergr. 200 x.

Im intakten Lamellenknochen (Lk) und Knochenzylinder (Kz) können in Grundsubstanz eingemauerte Osteozyten (►) um einen Spongiosazwischenraum beobachtet werden. Zum Lumen hin schließt sich Osteoid an, das von einem perlschnurartigen Osteoblastensaum (→) begleitet wird.

Wie in der Klebergruppe gibt es auch in der Kontrollgruppe Präparate, die ebenfalls resorbierte Knochenzylinder in ca. 60 % aufweisen (Abb. 60a, b). Neben dem reduzierten Knochenzylinder (Kz) wird Knochen neu vom Lagerknochen (Lk) aus gebildet (▶). Die Überbrückung zwischen dem Lagerknochen und dem Knochenzylinder (Kz) besteht aus Lamellenknochen (↔).

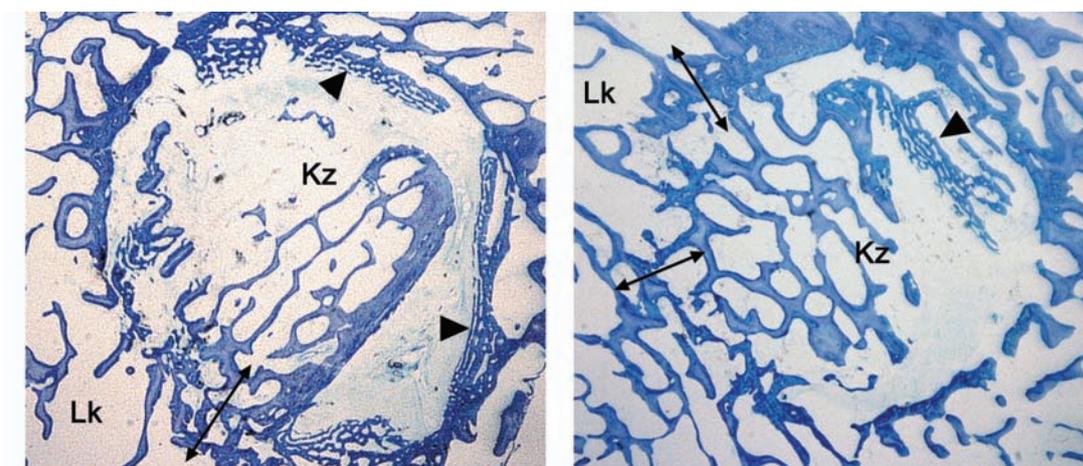


Abb. 60a

Abb. 60b

Abb. 60a, b Übersichtsaufnahmen nach 84 Tagen (Kontrollgruppe). Toluidinblaufärbung, Vergr. 4,8 x.

Der Unterschied zur Klebergruppe zeigt sich darin, dass in der Kontrollgruppe neben der Resorption des Knochenzylinders eine starke Osteoneogenese im Spaltgebiet mit neu gebildetem Geflechtknochen, teilweise auch Lamellenknochen, zu finden ist.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass sich nach 84 Tagen in der Kontrollgruppe eine wesentlich ausgeprägtere Überbrückung des Osteotomiespaltes durch eine Osteoneogenese erkennen lässt als in der Klebergruppe. In beiden Gruppen gibt es Präparate, in denen der Knochenzylinder resorbiert wurde (in der Klebergruppe ca. 66 %, in der Kontrollgruppe ca. 60 %). Allerdings präsentiert sich die Osteoneogenese in der Kontrollgruppe prägnanter als in der Klebergruppe. In beiden Gruppen ist die Osteoneogenese nach 84 Tagen immer noch nicht abgeschlossen. Eine Aktivität der Osteoblasten ist auch zu diesem Zeitpunkt zu erkennen.

Kleber: Wie in der 21- und 42-Tagegruppe können kleberfreie Areale des Osteotomiespalts problemlos überbrückt werden. Dies geschieht durch Geflechtknochen, zum Teil auch durch Lamellenknochen. In den kleberhaltigen Arealen sind die Osteotomieränder immer noch glatt. Neben einer geringen Aktivität der Osteoblasten und damit geringer Knochenneubildung ist der Granulationssaum um den Kleber nach insgesamt 84 Tagen breiter geworden.

Kontrolle: Wie in der 21- und 42-Tagegruppe kann der Osteotomiespalt nach 84 Tagen, wenn er eine gewisse Breite nicht überschritten hat, überbrückt werden. In der Kontrollgruppe wie auch in der Klebergruppe steht der Lagerknochen über neu gebildeten Geflechtknochen nach 84 Tagen mit dem Knochenzylinder in Kontakt.

Defekt mit Knochenkleber nach 84 Tagen

In der Übersichtsaufnahme in Abbildung 61 füllt der Kleber den Defekt nach 84 Tagen immer noch homogen und kompakt aus wie in der 21- oder 42-Tagegruppe. Es sind keine Resorptionszonen am Kleber (K) oder am Lagerknochen (Lk) zu erkennen. Die Ränder des Lagerknochens sind weiterhin glatt. Zwischen dem Knochenkleber und dem Lagerknochen befindet sich immer noch ein Saum von faserreichem Bindegewebe (→), der den Lagerknochen von dem Knochenkleber trennt. Eine auf den Knochenkleber hinführende Knochenneubildung ist nicht zu erkennen. Jedoch ist eine Osteoneogenese im Lagerknochen (Lk) parallel zum Kleber (K) zu erkennen (▷, Abb. 61).

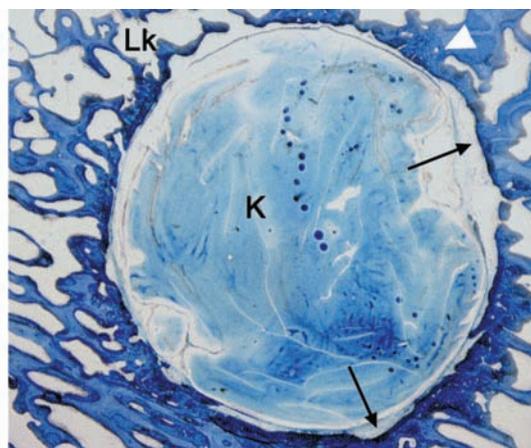


Abb. 61 Übersichtsaufnahme des Kleberdefektes nach 84 Tagen. Toluidinblaufärbung, Vergr. 4,8 x.

Leerdefekt nach 84 Tagen

Im Gegensatz zu dem mit Kleber aufgefüllten Defekt sind nach 84 Tagen von allen Seiten neue Geflechtknochen trabekel vom Lagerknochen (Lk) in das Lumen des Leerdefektes hineingewachsen (→, Abb. 62). Eine deutliche Zunahme der neu gebildeten Knochen trabekel gegenüber den Leerdefekten der 21- und 42-Tagegruppe ist zu erkennen. Des Weiteren findet zu diesem Zeitpunkt eine Umwandlung von Geflechtknochen in Lamellenknochen statt.

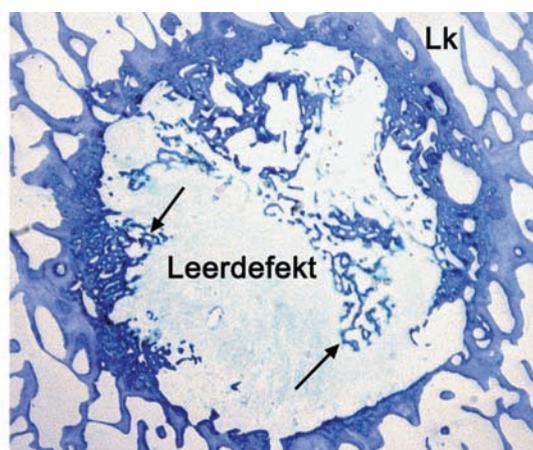


Abb. 62 Übersichtsaufnahme nach 84 Tagen (Leerdefekt). Toluidinblaufärbung, Vergr. 4,8 x.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass der mit Kleber aufgefüllte Defekt im Vergleich zu dem Leerdefekt hinsichtlich der Osteogenese auch nach 84 Tagen weiterhin deutlich zurück liegt.

Defekt mit Kleber: Der Defekt ist immer noch vollständig mit Knochenkleber ausgefüllt. Eine Kleberresorption bzw. Degradation ist nicht zu erkennen. Der Knochenkleber wird immer noch wie in der 21- und 42-Tagegruppe mit einem Granulationssaum umgeben und trennt somit den Kleber vom Lagerknochen.

Leerdefekt: Nach 84 Tagen ist die Knochenneubildung im Lumen des Leerdefektes deutlich ausgeprägter als in der 21- und 42-Tagegruppe. Von allen Seiten des Lagerknochens wächst neu gebildeter Knochen in den Leerdefekt hinein.

3.2.2 Ergebnisse an der Ulna (kortikaler Bereich)

Zur lichtmikroskopischen Auswertung der Ulna standen jeweils 4 Präparate zur Verfügung, bei denen pro Tötungszeitpunkt eine Perfusion durchgeführt wurde. Bei den Präparaten, die zunächst für die biomechanischen Messungen verwendet worden sind, wurde zusätzlich eine lichtmikroskopische Analyse durchgeführt. Diese Präparate wiesen wegen der biomechanischen 4-Punkt-Biegung nur noch einen intakten Osteotomiespalt auf. Der Kleber war auf fast allen Präparaten kaum angefärbt und nur in Konglomeraten unterschiedlicher Größe zu finden. Um den Kleber trotzdem für den Betrachter sichtbar machen zu können, bediente man sich, wie schon bei dem Olecranondefektmodell, der Anwendung der Kondensorblende. Da bei einigen Präparaten nur am Rand und nicht im Frakturspalt Kleber zu finden war, wurden diese Präparate nicht für die Beurteilung und Auswertung herangezogen. War in einem Osteotomiespalt kein Kleber zu finden, so musste dieser Spalt wie ein Präparat aus der Kontrollgruppe bewertet werden.

Klebergruppe nach 21 Tagen

Die Abbildung 63 zeigt eine Übersichtsaufnahme eines geklebten Ulna-Präparates nach 21 Tagen. In dieser Vergrößerung scheinen beide Osteotomiespalten von glatten Osteotomieränder begrenzt zu sein (→). Auf der anterioren Seite des Osteotomiespalt es lässt sich Knochenneubildung als periostaler Kallus beobachten. Auf der posterioren Seite befinden sich dagegen größere Kleberansammlungen (K).



Abb. 63 Übersichtsaufnahme des Osteotomiesegmentes der Ulna nach 21 Tagen Kleberapplikation. Toluidinblaufärbung, Vergr. 4,0 x.

Erst in der höheren Vergrößerung lassen sich in beiden Osteotomiespalten mehrere kleinere in Granulationsgewebe eingebettete Klebervakuolen erkennen (K, Abb. 64). Neben den glatten Frakturrändern fallen mehrere Resorptionszonen am Ulnarsegment (Us) auf. Eine Knochenneubildung oder eine Aktivität von Osteoblasten kann im Osteotomiespalt (Os), an den Rändern des Osteotomiesegmentes (Us) und als Kallusbildung (Ka) beobachtet werden.

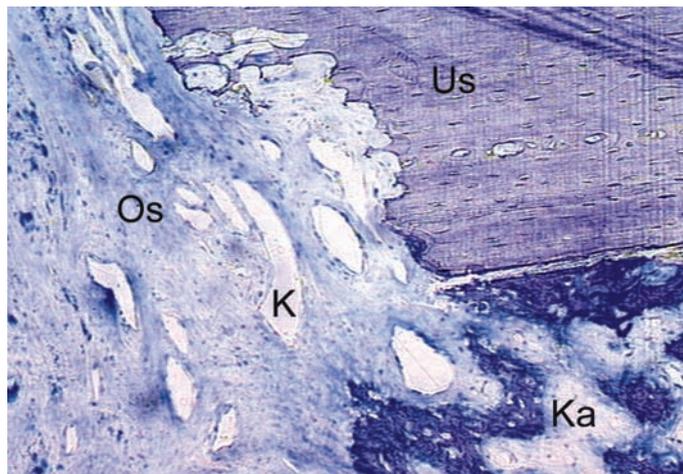


Abb. 64 Detailaufnahme des Osteotomiespaltes nach 21 Tagen Kleberapplikation. Toluidinblaufärbung, Vergr. 100x.

Kontrollgruppe nach 21 Tagen

Auch in der Kontrollgruppe lassen sich vereinzelte Resorptionszonen an der Ulna (U) nach 21 Tagen beobachten (Abb. 65). Zum einen lassen sich Resorptionszonen mit Osteoklasten außerhalb des Osteotomiespaltes (→, Abb. 65b), zum anderen an den Osteotomieändern (→, Abb. 65c) erkennen. In der Übersicht sieht man, dass in dem Osteotomiespalt (Os) ein Frakturhämatom aus Fibrin, Knochenmehl und Erythrozyten entstanden ist und die Osteotomieänder glatt sind (►, Abb. 65a).

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass im Osteotomiespalt der Ulna nach 21 Tagen bei allen Präparaten der Kleber- und der Kontrollgruppe nur eine geringe Knochenneubildung beobachtet wurde. Einige Präparate der Kleber- und der Kontrollgruppe zeigen eine Kallusbildung in den lateralen Arealen des Osteotomiespaltes. In beiden Gruppen lassen sich Resorptionszonen mit Osteoklasten an den Knochenfragmenten beobachten.

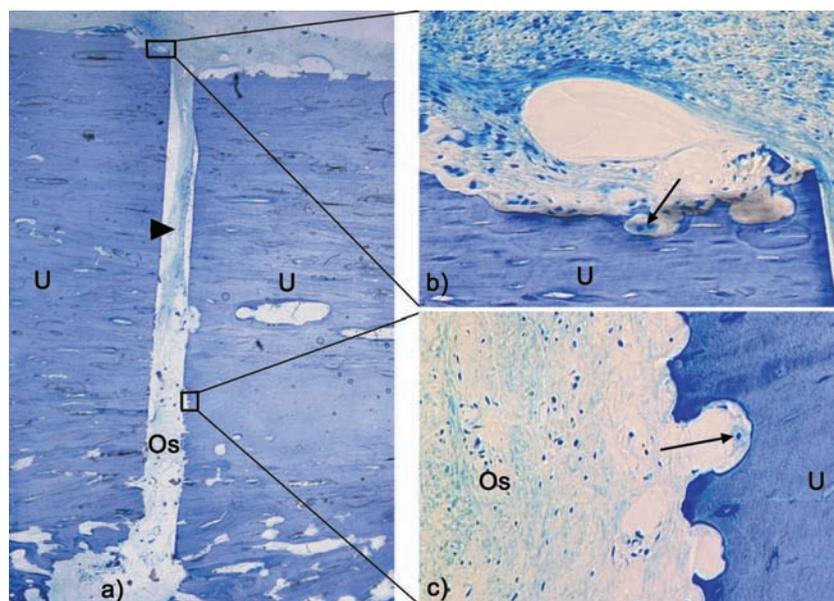


Abb. 65a, b, c Übersicht- und Detailaufnahmen des Osteotomiespaltes nach 21 Tagen (Kontrolle), Ulna (U). Toluidinblaufärbung, Vergr. 4,8 x, 100 x.

Kleber: In der Klebergruppe wird Kallus nur an den Stellen vorgefunden, wo kein Kleber zu finden ist und somit Platz für eine Kallusbildung ist. Der Osteotomiespalt ist mit dem Kleber oder mit dem Frakturhämatom ausgefüllt. Neben glatten Osteotomieränder sind vereinzelte Resorptionszonen zu beobachten.

Kontrolle: In der Kontrollgruppe können nach 21 Tagen glatte Osteotomieränder neben dem Frakturhämatom beobachtet werden. Vereinzelte Resorptionszonen mit Osteoklasten sind auch hier an den Osteotomierändern zu erkennen.

Klebergruppe nach 42 Tagen

Bei der Betrachtung der Präparate nach 42 Tagen Kleberapplikation ist der Osteotomiespalt bei allen Präparaten immer noch gut erkennbar. In Abbildung 66 befindet sich der Knochenkleber (K) sowohl im Osteotomiespalt (Os) als auch außerhalb des Osteotomiespaltes auf der posterioren Seite der Ulna (U). An dieser Stelle kann keine Kallusbildung beobachtet werden. Im vollständig klebergefüllten Osteotomiespalt sind die Osteotomieränder glatt und es ist keine Knochenneubildung in Form von Geflechtknochen zu erkennen. Ein Kallus wird sowohl außerhalb des Osteotomiespaltes auf der anterioren kleberfreien Seite der Ulna als auch im angrenzenden kleberfreien Osteotomiespalt gefunden.

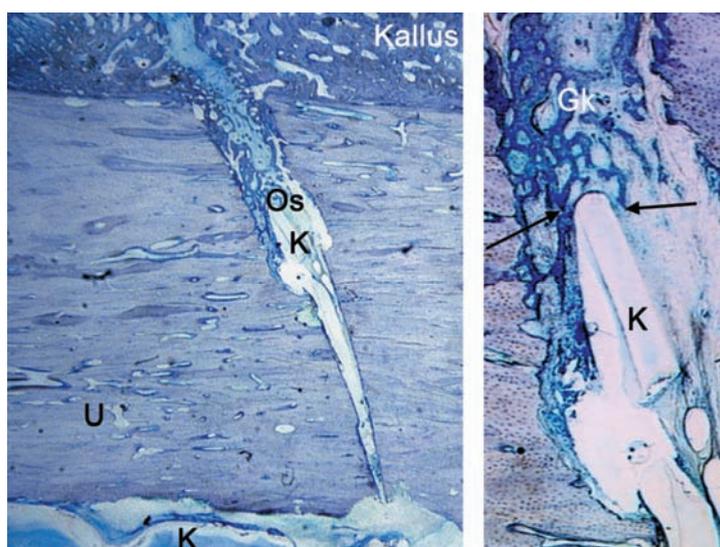


Abb. 66a

Abb. 66b

Abb. 66a, b Übersichts- und Detailaufnahme des Osteotomiespalts nach 42 Tagen Kleberapplikation. Toluidinblaufärbung, Vergr. 6,4 x, 25 x.

Der Osteotomiespalt kann an den kleberfreien Arealen und am Rande des Knochenklebers mit Geflechtknochen trabekeln überbrückt werden. Die Geflechtknochen trabekel liegen topographisch sehr nahe an dem Knochenkleber (K, →, Abb. 66, 67). Die Geflechtknochen trabekel (Gk) wachsen auf den Knochenkleber zu und stehen in direktem Kontakt zum Kleber. Das dichte, faserreiche Granulationsgewebe (G) ist bemerkenswert reich kapillarisiert. Es zeigt sich ein mit Geflechtknochen durchbauter bzw. überbrückter Osteotomiespalt.

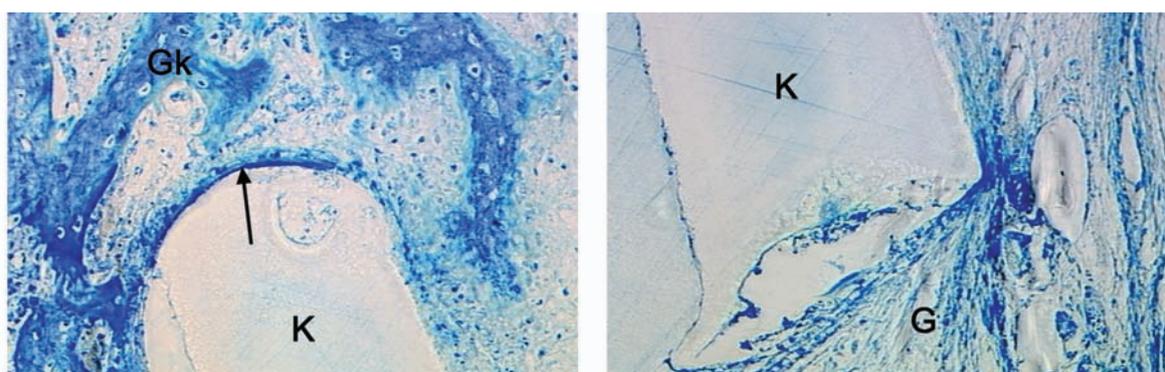


Abb. 67a

Abb. 67b

Abb. 67a, b Detailaufnahmen des Osteotomiespaltes nach 42 Tagen Kleberapplikation. Toluidinblaufärbung, Vergr. 200 x.

Im Osteotomiespalt sind nur wenig Klebervakuolen zu erkennen. In keinem der Präparate sind mit der einfachen Lichtmikroskopie Resorptionsvorgänge oder

Degradationen des Knochenklebers durch Makrophagen oder mehrkernige Riesenzellen zu erkennen.

Kontrollgruppe nach 42 Tagen

Nach 42 Tagen ist in der Kontrollgruppe an der anterioren und posterioren Seite des Osteotomiespalt eine ausgeprägte Kallusbildung zu erkennen (Abb. 68). Der Osteotomiespalt (Os) ist weiterhin deutlich sichtbar. Dieser ist teilweise mit Geflechtknochen überbrückt. Das überbrückte Teilstück des Osteotomiespalt besteht überwiegend aus einem dichten Netz aus Geflechtknochenbälkchen. In der höheren Ausschnittsvergrößerung kann man erkennen, dass an den äußeren Randstellen des Frakturspalt faserknorpeliger Kallus (Fk, Abb. 68b) entstanden ist, der von Geflechtknochenbälkchen umgeben wird. Außerdem erkennt man, dass an manchen Stellen zwischen Ulna (U) und Ulnasegment (Us) ein provisorisch organisiertes bindegewebiges Knochengüst entstanden ist. An Geflechtknochenstrabekeln sind perlschnurartig aufgereihte Osteoblasten (Osteoblastenlayer) zu erkennen (→, 68c).

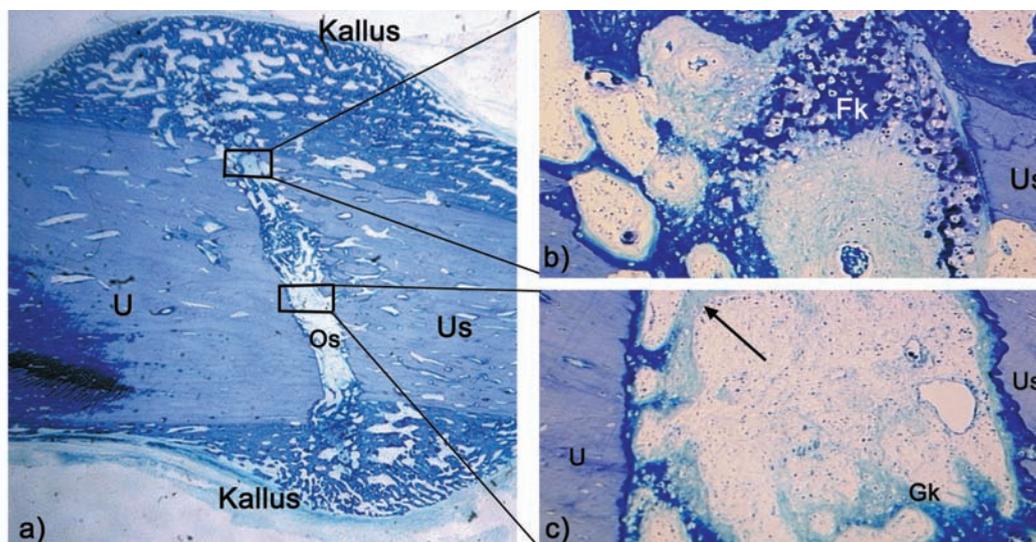


Abb. 68a, b, c Übersicht- und Detailaufnahmen des Osteotomiespalt (Os) nach 42 Tagen (Kontrollgruppe). Toluidinblaufärbung, Vergr. 4,8 x, 100 x.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass sich nach 42 Tagen im Osteotomiespalt sowohl in der Kleber- als auch in der Kontrollgruppe eine Kallusbildung zeigt. Im Vergleich zu der 21-Tagegruppe konnte dagegen eine

Kallusbildung in den lateralen Arealen des Osteotomiespalt beobachtet werden. Die Kontrollgruppe liegt in Bezug auf die knöcherne Durchbauung des Osteotomiespalt vor der Klebergruppe.

Kleber: Ist der Frakturspalt mit Knochenkleber gefüllt, so ist dieses Areal nicht mit Geflechtknochen durchbaut. Allerdings stehen die Knochenbälkchen topographisch mit dem Knochenkleber in direktem Kontakt. Im Gegensatz zum spöngiösem Modell bildet sich zwischen Kleber und neu gebildeten Knochen kein breiter Saum von faserreichem Bindegewebe. Resorptionsvorgänge am Knochenkleber-Interface können nicht beobachtet werden.

Kontrolle: Stellenweise wird der Osteotomiespalt mit Geflechtknochen durchbaut. An anderen Stellen befindet sich ein bindegewebiger Kallus als Vorläufer zum Geflechtknochen.

Klebergruppe nach 84 Tagen

84 Tage nach der Kleberapplikation ist der Osteotomiespalt weiterhin deutlich zu erkennen (Abb. 69).

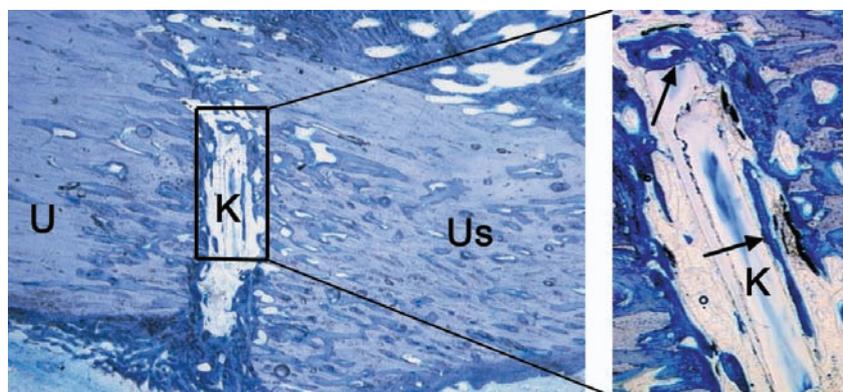


Abb. 69a

Abb. 69b

Abb. 69a, b Übersicht- und Detailaufnahmen des Osteotomiespalt nach 84 Tagen Kleberapplikation. Toluidinblaufärbung, Vergr. 6, 4 x, 25 x.

Zwischen Ulna (U) und Ulnasegment (Us) ist der Osteotomiespalt teilweise mit Geflechtknochen ausgefüllt. Eine Umwandlung von Geflechtknochen in Lamellenknochen ist zu beobachten. Nur in dem Bereich des Osteotomiespalt, in dem der Knochenkleber (K) weiterhin zu sehen ist, hat keine Überbrückung stattgefunden. Bei einer 200 fachen Vergrößerung grenzt der schon teilweise in

Lamellenknochen umgewandelte Knochen direkt an den Knochenkleber (Abb. 70, 71). Der Osteoblastensaum (→) und die eingemauerten Osteozyten (▷) weisen auf ein intaktes und vitales Knochengewebe hin. Auf der anderen Seite des Knochenkleberkonglomerats liegt lockeres Granulationsgewebe zwischen dem Knochen und dem Knochenkleber (K).

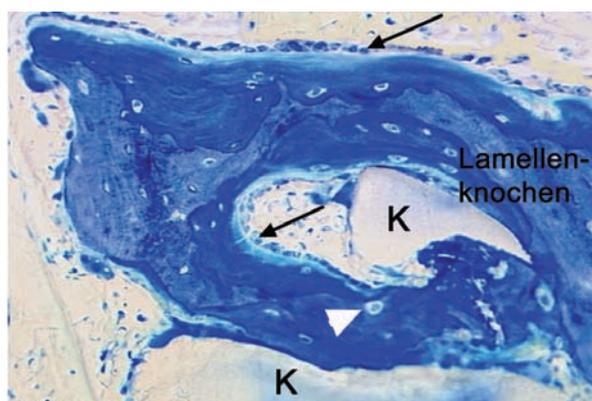


Abb. 70 Detailaufnahme des Osteotomiespalt es nach 84 Tagen Kleberapplikation. Toluidinblaufärbung, Vergr. 200 x.

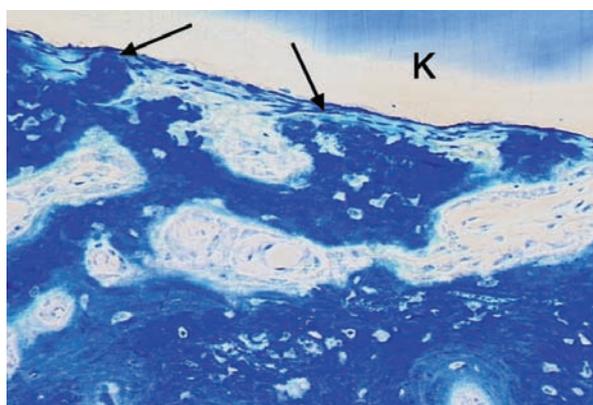


Abb. 71 Detailaufnahme des Osteotomiespalt es nach 84 Tagen Kleberapplikation. Toluidinblaufärbung, Vergr. 200 x.

Der umgebende Knochen wird nicht- wie im spongiösen Modell beobachtet- durch faseriges Bindegewebe von dem Knochenkleber abgegrenzt (→, Abb. 71).

Allerdings kann man auch das im spongiösen Modell prägende Bild in dem kortikalen Osteotomiespalt beobachten. Zwischen dem Knochenkleber und dem neugebildeten Knochen liegt dichtes faserreiches Bindegewebe, das zum Knochen hin in lockeres Bindegewebe übergeht.

Kontrollgruppe nach 84 Tagen

In der Kontrollgruppe ist der Osteotomiespalt nach 84 Tagen mit teilweise bereits in Lamellenknochen umgewandelten Geflechtknochen durchbaut (Abb. 72). An die Ulna (U) und am Ulnasegment (Us) schließen sich im Osteotomiespalt (Os) neue Knochentrabekeln mit intaktem Osteoblastensaum an (→, Abb. 72b).

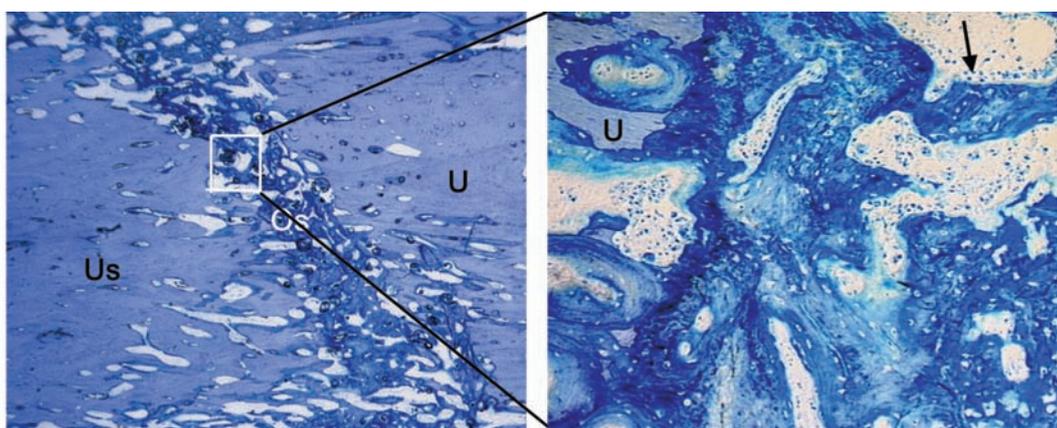


Abb. 72a

Abb. 72b

Abb. 72a, b Übersicht- und Detailaufnahmen des Osteotomiespalt nach 84 Tagen (Kontrollgruppe). Toluidinblaufärbung, Vergr. 6,4 x, 100 x.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass die knöcherne Durchbauung (Überbrückung) des Osteotomiespalt in der Kontrollgruppe nach 84 Tagen weiter fortgeschritten ist als in der Klebergruppe. Gegenüber den Ergebnissen der 42-Tagegruppe beobachtet man in der Kleber- und Kontrollgruppe nach 84 Tagen eine stärkere Osteogenese. In beiden Gruppen sind die Osteogenese und die physiologische Frakturheilung nach 84 Tagen noch nicht abgeschlossen.

Kleber: Wie nach 42 Tagen wird der Osteotomiespalt nach 84 Tagen an den kleberfreien Stellen knöchern durchbaut. An den Kleberarealen wird der Kleber von neugebildetem Knochen umrahmt. Dieser steht im direkten Kontakt zum Knochenkleber. Stellenweise liegt faseriges Bindegewebe zwischen dem Knochenkleber und dem Knochen, wie es überwiegend im spongiösen Modell vorgefunden worden ist. Mehrkernige Riesenzellen liegen um den Knochenkleber herum.

Kontrolle: Der Osteotomiespalt ist im Vergleich zu der 42-Tagegruppe nach 84 Tagen überwiegend knöchern durchbaut. Teilweise ist der Geflechtknochen bereits in Lamellenknochen umgewandelt worden.

3.2.3 Ultrasemidünnschnitte (kortikaler Bereich)

Anhand der nachfolgend ausgewählten Semidünnschnitte wird auf die zellulären Prozesse nach der Knochenkleberapplikation im Ulnasegmentmodell eingegangen.

Klebergruppe nach 21 Tagen

In der Übersichtsaufnahme der Klebergruppe nach 21 Tagen Knochenkleberapplikation (K) kann man zwischen den Osteotomieenden der Ulna (U, Us) Granulationsgewebe (G) erkennen (Abb. 73).

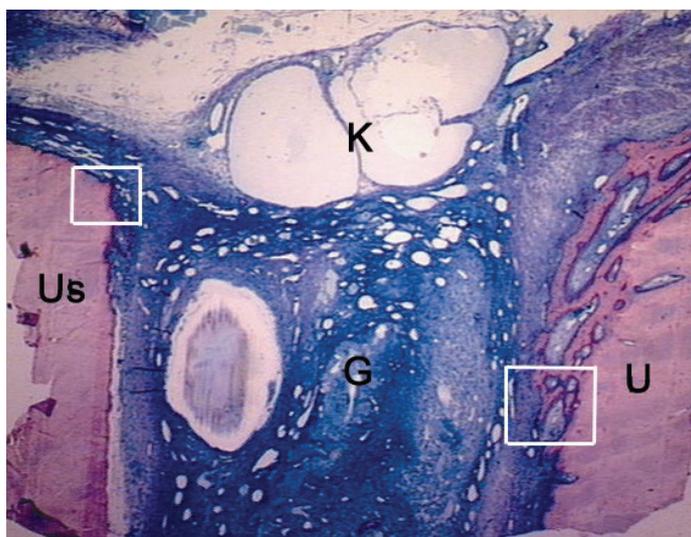


Abb. 73 Übersichtsaufnahme des Osteotomiespalt es nach 21 Tagen Kleberapplikation. Toluidinblaufärbung, Vergr. 25 x.

Größere Knochenklebervakuolen (K) lassen sich in dieser Vergrößerung nur außerhalb des Osteotomiespalt es beobachten. Die Abbildungen 74 und 75 zeigen jeweils die höheren Ausschnittsvergrößerungen aus Abbildung 73. In Abbildung 74 schließt sich dem Ulnasegment (Us) zellreiches mit Osteoblasten und Progenitorzellen durchsetztes Granulationsgewebe (zG) an, welches dann in faserreiches Bindegewebe (fG) übergeht. In diesen Bereichen ist kein Knochenkleber zu finden. Dem faserreichen Bindegewebe schließt sich eine Zone an, in der

Klebervakuolen (K) in Ansammlungen von mehrkernigen Riesenzellen zu finden sind.

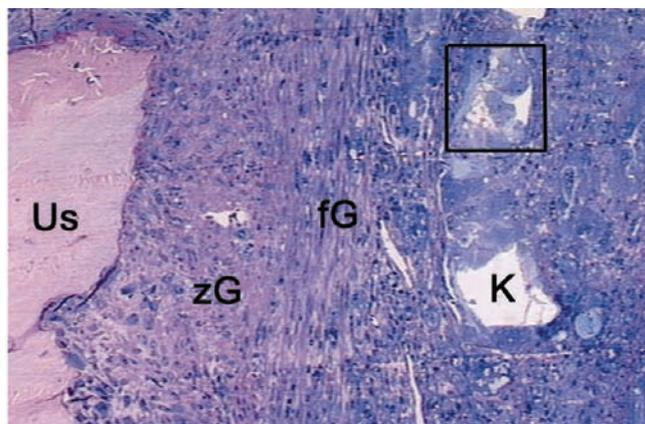


Abb. 74 Detailaufnahme des Osteotomiespaltes nach 21 Tagen Kleberapplikation. Toluidinblaufärbung, Vergr. 100 x.

In Abbildung 75 lassen sich Osteoidsäume an dem Rand der Ulna (U) erkennen (→). Danach schließt sich dichtes, reich kapillarisiertes Granulationsgewebe (G) an, das faserreich und zellreich ist und indem einzelne Klebervakuolen (K) eingebettet sind.

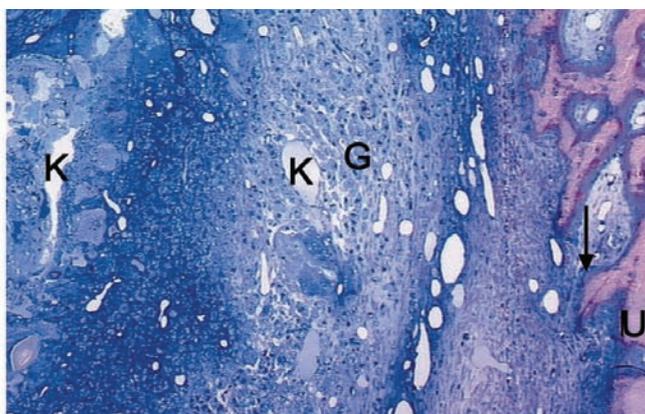


Abb. 75 Detailaufnahme des Osteotomiespaltes nach 21 Tagen Kleberapplikation. Toluidinblaufärbung, Vergr. 100 x.

In der 400 fachen Vergrößerung des Rechteckes aus Abbildung 74 sieht man, dass bereits nach 21 Tagen mehrkernige Riesenzellen mit dem Kleber (K) in Kontakt stehen (Abb. 76a, 76b). In Abbildung 76b wurde eine Riesenzelle mit weißer Linie umrandet. In den mehrkernigen Riesenzellen sind intrazelluläre Einschlüsse (E) bzw. Vakuolen zu erkennen. Diese hellen, wenig elektronendichten Strukturen gleichen in der Morphologie und Struktur dem Kleber. Das angrenzende Gewebe zeichnet sich durch Granulationsgewebe aus.

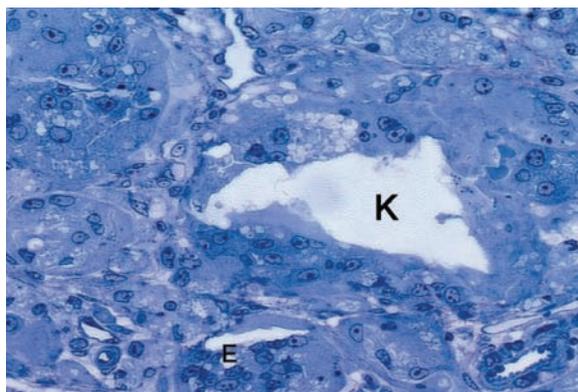


Abb. 76a

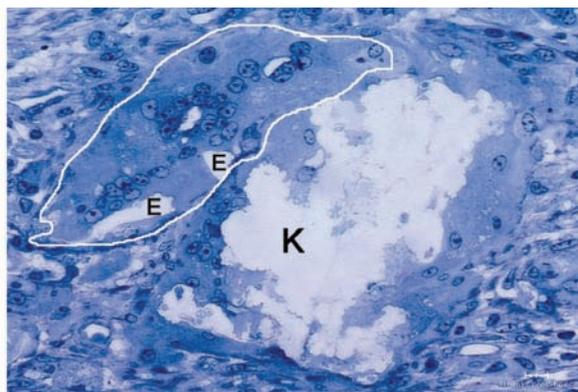


Abb. 76b

Abb. 76a, b Detailaufnahme nach 21 Tagen Kleberapplikation. Toluidinblaufärbung, Vergr. 400 x.

Klebergruppe nach 42 Tagen

Bei der Betrachtung der Präparate aus der 42-Tagegruppe mit Knochenkleberapplikation zeigt sich an den Osteotomierändern der Ulnasegmente eine ausgeprägte Osteoneogenese (Abb. 77).

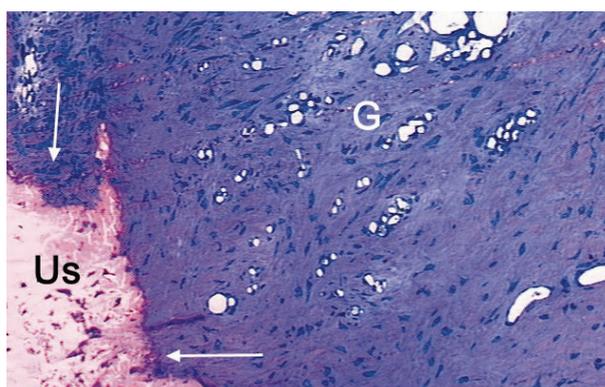


Abb. 77 Detailaufnahme des Osteotomiespaltes nach 42 Tagen Kleberapplikation. Toluidinblaufärbung, Vergr. 100 x.

Am Osteotomierand des Ulnasegmentes (Us) wandelt sich der zunächst gebildete provisorische Bindegewebskallus in Geflechtknochen trabekel um (→). Granulationsgewebe (G) und einzelne Klebervakuolen füllen den Osteotomiespalt nach 42 Tagen aus.

Klebergruppe nach 84 Tagen

In der Klebergruppe nach 84 Tagen Knochenkleberapplikation zeigt sich die Bildung von Geflechtknochen trabekeln in Richtung zum Knochenkleber (Abb. 78). Die

Geflechtknochen trabekel (Gk) stehen im direkten Kontakt zum Knochenkleber (K, →). Das umgebende Gewebe ist reich kapillarisiert. Zwischen dem Kleber und dem umgebenden Knochen bzw. Granulationsgewebe besteht ein artifizierlicher Spaltraum (aS), der durch die Fixierung entstanden ist. Es existiert kein breiter Bindegewebssaum zwischen dem Kleber und dem Knochenbälkchen, wie es im spongiösen Olecranonmodell größtenteils zu beobachten ist.

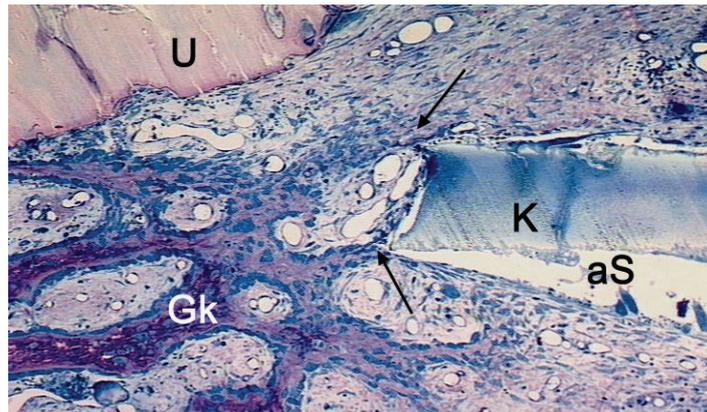


Abb. 78 Detailaufnahme des Osteotomiespaltes nach 84 Tagen Kleberapplikation. Toluidinblaufärbung, Vergr. 100 x.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass bereits nach 21 Tagen mehrkernige Riesenzellen mit dem Knochenkleber in Kontakt stehen und sie intrazelluläre Einschlüsse aufweisen, die in der Morphologie und Struktur dem Knochenkleber gleichen. Nach 42 Tagen zeigt sich an den Osteotomierändern eine Osteoneogenese mit Osteoidbildung, Osteoblastensäumen und bereits einzelnen Geflechtknochen trabekeln. Die neugebildeten Geflechtknochen trabekeln bilden sich in direkter Nähe zum Knochenkleber aus. Zwischen dem neugebildeten Knochen und dem Knochenkleber liegt kein bindegewebiger Saum, wie im spongiösem Olecranonmodell zu beobachten ist.

3.3 Transmissionselektronenmikroskopie (spongiöser Bereich)

Anhand von ausgewählten Bildern, die für jeden Zeitpunkt (nach 21, 42, 84 Tagen) und für jede Gruppe kennzeichnend und repräsentativ sind, wurden nachfolgend die ultrastrukturellen Vorgänge anhand der transmissionselektronenmikroskopischen Untersuchungen des Olecranons beschrieben und analysiert.

Die Ergebnisse, die in der nachfolgenden Abbildung 79 aus der 42-Tage-Klebergruppe im Olecranonmodell dargestellt werden, lassen sich auch bei allen anderen Beobachtungszeitpunkten aufzeigen.

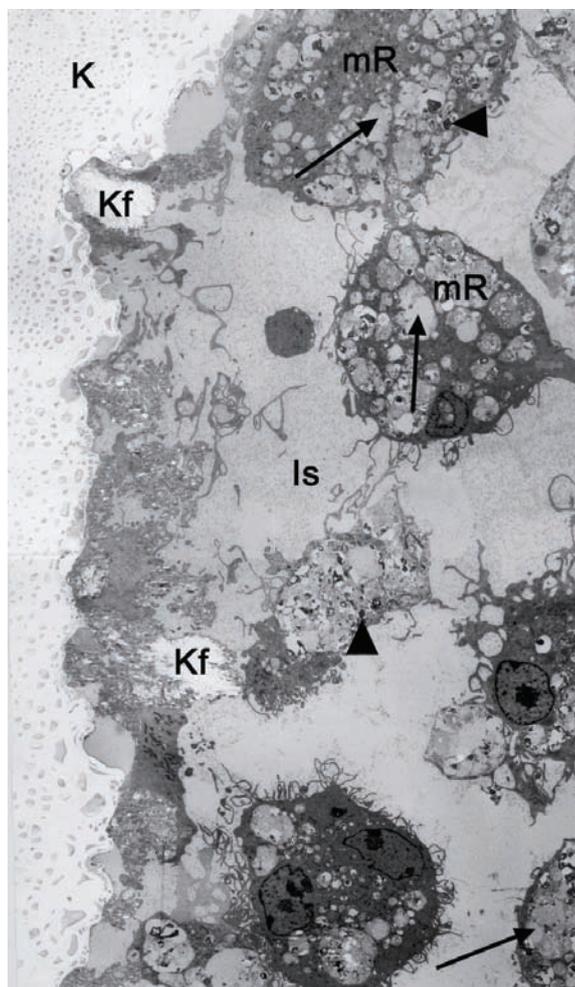


Abb. 79 Ultrastruktur der Interfaceregion nach 42 Tagen Kleberapplikation. Vergr. 3118 x.

Der Knochenkleber ist mit einer Substanz durchmischt, die in ihrer elektronenmikroskopischen Struktur der Interzellularflüssigkeit gleicht. Der Kleber grenzt an die ödematöse Interzellulärsubstanz (Is), in der mehrkernige Riesenzellen (mR) eingebettet sind. Dabei grenzen die mehrkernigen Riesenzellen nicht direkt an das Interface (Knochen-Kleber-Grenze), sondern liegen deutlich unterhalb des Interface. Innerhalb der rund geformten, mehrkernigen Riesenzellen fallen Einschlüsse unterschiedlicher Elektronendichten auf. Elektronendichte Einschlüsse deuten auf Knochenfragmente hin (▶), während helle Bereiche wegen ihrer strukturellen Übereinstimmung auf die interzelluläre Flüssigkeit hinweisen (→). Es

lassen sich keine zum Knochenkleber strukturgleichen Einschlüsse in den mehrkernigen Riesenzellen erkennen. An der Grenze zum Interface können einzelne Kleberfragmente (Kf) als helle, wenig elektronendichte und unregelmäßige Strukturen beobachtet werden.

Auf der nächsten für alle Beobachtungszeitpunkte repräsentativen Abbildung 80, 84 Tage nach der Kleberapplikation, liegen mehrkernige Riesenzellen (mR) direkt am Interface zwischen dem Kleber (K) und der Interzellulärsubstanz (Is).



Abb. 80 Ultrastruktur der Interfaceregion nach 84 Tagen Kleberapplikation. Vergr. 4544 x.

Diese mehrkernigen Riesenzellen zeigen einige Unterschiede in Form und Lage zu den mehrkernigen Riesenzellen, die in der Tiefe des Gewebes zu beobachten sind. Sie besitzen abgeflachte und lang gestreckte Zellkörper und keinerlei Einschlüsse. Diese mehrkernigen Riesenzellen stellen polarisierte Zellen dar, weil sie auf der basalen Seite einen Mikrovilli-Saum zeigen (\rightarrow), während sie auf der apikalen Seite in dieser Vergrößerung glatt erscheinen (\blacktriangleright).

In höheren Vergrößerungen der Interfaceregion lässt sich eine mäßig elektronendichte Schicht zwischen der Zellmembran (Plasmalemm) und dem Knochenkleber beobachten (\leftrightarrow , Abb. 81).

Kleine Invaginationen der Zellmembran sind zu erkennen (\blacktriangleright). Es handelt sich hierbei um Exozytosevesikel. Mittels Exozytose wird der Inhalt der Vesikel auf das Plasmalemm gebracht. Der Vesikelinhalt gleicht in der Elektronendichte und in der Morphologie der dem Plasmalemm aufliegenden Schicht.

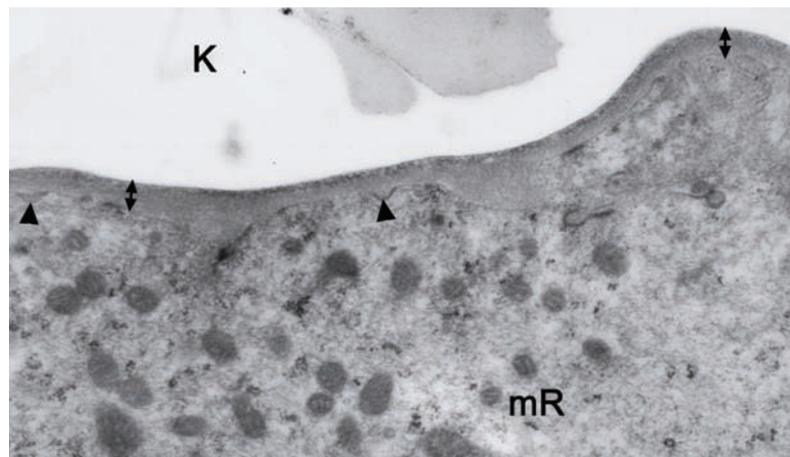


Abb. 81 Ultrastruktur der Interfaceregion nach 84 Tagen Kleberapplikation. Vergr. 31280 x.

Zusammenfassend kann man festhalten, dass im spongiösen Modell mehrkernige Riesenzellen entweder am oder unterhalb des Interface zu finden sind. Die in der Interzellulärsubstanz liegenden mehrkernigen Riesenzellen weisen Einschlüsse auf, die in der Elektronendichte und in der Struktur den Knochenfragmenten und der Interzellulärsubstanz gleichen, nicht aber dem Knochenkleber. Die an den Knochenkleber angrenzenden, mehrkernigen Riesenzellen weisen dagegen keine Einschlüsse auf. Allerdings zeigen sie kleine Invaginationen in der Zellmembran, deren Inhalt in der Elektronendichte und in der Struktur der dem Plasmalemm aufliegenden Schicht gleicht.

3.4 Semiquantitatives Bewertungssystem (spongiöser Bereich)

Die folgende Tabelle 6 zeigt die durchschnittlich erreichte Anzahl von Punkten, die bei der kritischen Durchsicht der Präparate der Kleber- und der Kontrollgruppe für die fünf in der Tabelle genannten Kategorien vergeben worden sind. Die maximale

Punktzahl von 18 wurde dabei weder in der Kleber- noch in der Kontrollgruppe erreicht.

Kategorie	Score-Punkte	Beobachtungszeitpunkt/Gruppe					
		21d/ Kleber	21d/ Kontr.	42d/ Kleber	42d/ Kontr.	84d/ Kleber	84d/ Kontr.
1. Größe des Knochenzylinders	2	1,66	2,00	1,33	1,00	1,00	1,40
2. Bonding: Apposition beider Kontaktflächen	4	0,33	1,60	0,83	1,80	1,66	3,20
3. Knöcherne Überbrückung des Interfaces	4	0,16	0,40	0,33	0,80	0,33	1,00
4. Knochenneubildung im Lagerknochen	4	1,66	3,00	1,66	3,60	1,33	1,80
5. Knochenneubildung im Knochenzylinder	4	0,00	0,60	0,16	1,60	0,83	2,00
Gesamtscore	18	3,83	7,60	4,33	8,80	5,16	9,40

Tab. 6 Ergebnisse des semiquantitativen Scores des spongiösen Olecranonmodells. Durchschnittlich erreichte Punktzahl der Kleber- und Kontrollgruppe nach 21, 42 und 84 Tagen. Maximal erreichbare Score-Punkte sind 18.

Vergleicht man die Gesamtscores der Kleber- mit der Kontrollgruppe, so fällt auf, dass zu jedem Beobachtungszeitpunkt der Gesamtscore in der Kontrollgruppe fast doppelt so groß ist wie in der Klebergruppe.

Betrachtet man den Gesamtscore nur innerhalb der Kleber- bzw. der Kontrollgruppe, so findet man jeweils einen mit dem Beobachtungszeitraum korrelierenden ansteigenden Verlauf des Gesamtscores. Außerdem fällt auf, dass in beiden Gruppen zu allen Beobachtungszeitpunkten die maximale Anzahl der Score-Punkte von 18 weit unterschritten wurde. Gerade einmal die Hälfte- und damit die höchste Anzahl- der Score-Punkte mit 9,40 konnte nach 84 Tagen an die Kontrollgruppe vergeben werden. Im Folgenden werden die Ergebnisse der einzelnen Kategorien nacheinander besprochen. In der ersten Kategorie, der Größe des Knochenzylinders, nimmt der Knochenzylinder in der Klebergruppe kontinuierlich nach 21, 42 und 84 Tagen in seiner durchschnittlichen Größe ab. In der Kontrollgruppe ist dagegen die Größe des Knochenzylinders nach 21 Tagen noch vollständig erhalten. Erst nach 42 Tagen zeigt sich hier eine Abnahme der Knochenzylindergröße um etwa die Hälfte.

Nach 84 Tagen ist eine weniger starke Reduktion des Knochenzylinders als nach 42 Tagen zu beobachten.

In der zweiten Kategorie, dem Bonding (Apposition beider Kontaktflächen), zeigt sich in beiden Gruppen, dass die Qualität der Überbrückung des Osteotomiespalt mit dem Beobachtungszeitraum zunimmt. In der Kontrollgruppe wurde der Osteotomiespalt mit verknöchertem Geflechtknochen und teilweise mit verknöchertem Faserknochen nach 84 Tagen überbrückt. Die Klebergruppe dagegen ist nach 84 Tagen mit 1,66 Punkten auf demselben Niveau, wie die Kontrollgruppe mit 1,60 Punkten bereits nach 21 Tagen war.

In der dritten Kategorie, der knöchernen Überbrückung des Osteotomiespalt zwischen dem Lagerknochen und dem Knochenzylinder, nimmt in der Kleber- und in der Kontrollgruppe die prozentuelle Überbrückung mit steigendem Beobachtungszeitpunkt zu. Allerdings findet eine Überbrückung in beiden Gruppen durchschnittlich nur in einem Ausmaß von bis zu 25 % des Osteotomiespalt statt. Aus der Tabelle lässt sich erkennen, dass die Klebergruppe erst nach 84 Tagen mit 0,33 Punkten das Niveau erreicht, das die Kontrollgruppe mit 0,40 Punkten bereits nach 21 Tagen erlangt hat.

In der nächsten Kategorie, der Knochenneubildung im Lagerknochen, zeigt sich in der Kleber- und in der Kontrollgruppe, dass die Knochenneubildung im Zeitraum von 21 bis 42 Tagen fast konstant bleibt bzw. geringfügig zunimmt. Nach 84 Tagen ist die Knochenneubildung in beiden Gruppen deutlich geringer, in der Kontrollgruppe mit 1,80 Punkten sogar um die Hälfte weniger stark, als nach 21 und 42 Tagen mit bis zu 3,60 Punkten. Vergleicht man die beiden Gruppen miteinander, so fällt auf, dass in der Kontrollgruppe die Knochenneubildung nach 21 bzw. 42 Tagen mit 3,00 bzw. 3,60 Punkten fast doppelt so stark ist wie in der Klebergruppe mit jeweils 1,66 Punkten. Nach 84 Tagen haben sich die Knochenneubildungsraten der beiden Gruppen nahezu angenähert.

In Tabelle 6 ist für die Kategorien vier und fünf, Knochenneubildung im Lagerknochen und Knochenneubildung im Knochenzylinder, die Knochenneubildung in spaltnahem und in spaltfernem Gebiet zusammengefasst worden. In der Kontrollgruppe ist die Knochenneubildung im Lagerknochen zu jedem Beobachtungszeitpunkt in der Spaltnähe deutlich stärker ausgeprägt als im

spaltfernen Bereich. In der Klebergruppe zeigt sich nach 21 und 42 Tagen eine stärkere Knochenneubildung im spaltfernen Lagerknochen. Nach 84 Tagen ändert sich das Bild. Die Knochenneubildung im spaltnahen Gebiet ist schwächer als im spaltfernen Gebiet.

In der fünften Kategorie ist die Knochenneubildung im Knochenzylinder insgesamt weniger intensiv als im Lagerknochen. Hier kommt es sowohl in der Kleber- als auch in der Kontrollgruppe mit Zunahme des Beobachtungszeitpunkts zu einer Steigerung der Osteoneogenese, wobei die Knochenneubildung der Klebergruppe deutlich schwächer ist als die der Kontrollgruppe. In der Kontrollgruppe zeigt sich das gleiche Bild wie in der vierten Kategorie. Zu jedem Beobachtungszeitpunkt ist die Osteoneogenese im spaltnahen Gebiet des Knochenzylinders intensiver als im spaltfernen Gebiet.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass in allen Kategorien die Klebergruppe schlechtere Ergebnisse aufweist als die Kontrollgruppe. Tabelle 6 unterstreicht quantitativ die lichtmikroskopischen und transmissionselektronenmikroskopischen Ergebnisse des spongiösen Modells am Olecranon. Die Kontrollgruppe besitzt aber auch Schwächen, denn die von ihr nach 84 Tagen erreichte Punktzahl von 9,40 entspricht in etwa nur der Hälfte der möglichen erreichbaren 18 Punkte.

3.5. Spiralcomputertomographie (spongiöser Bereich)

Die Spiralcomputertomographie wurde als ergänzende Untersuchung ausschließlich für das Olecranondefektmodell durchgeführt. Die Präparate wurden nach dem Zufallsprinzip ausgewählt, und sind daher nicht repräsentativ für das Präparatekollektiv. Sie unterstreichen die bereits durch die Histologie gewonnenen Erkenntnisse. Die Computertomographie ermöglicht die gesamte Ausdehnung des Defektes zu beurteilen und knöcherne Überbrückungen, die in der Lichtmikroskopie wegen der begrenzten Aussagekraft der 2-dimensionalen Darstellung nicht zu sehen waren, zu erkennen. Die folgenden Abbildungen zeigen eine Auswahl von Schichtbildern der durch Zufall ausgewählten Präparate.

Klebergruppe nach 21 Tagen

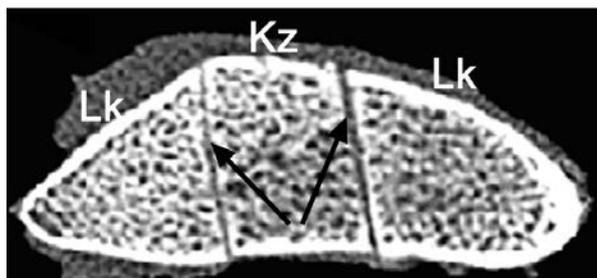


Abb. 82 Längsschnitt durch das Olecranon nach 21 Tagen Kleberapplikation. Zwischen Lagerknochen (Lk) und Knochenzylinder (Kz) ist ein Osteotomiespalt (→) zu erkennen. Der Knochenzylinder ist optimal repositioniert.

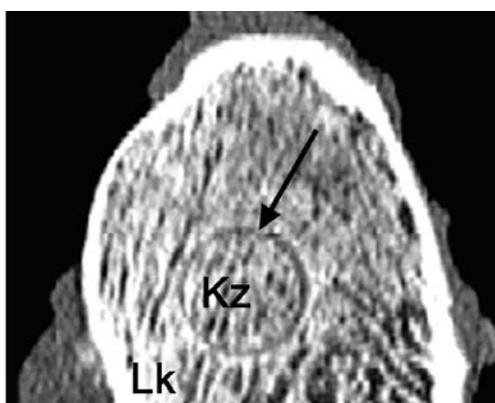


Abb. 83 Querschnitt durch das Olecranon nach 21 Tagen Kleberapplikation. Lagerknochen (Lk), Knochenzylinder (Kz), Osteotomiespalt (→).

Kontrollgruppe nach 21 Tagen

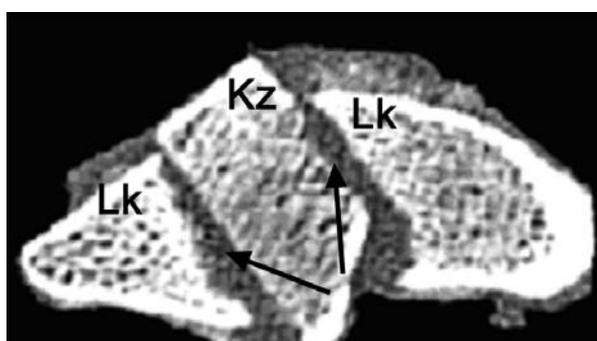


Abb. 84 Längsschnitt durch das Olecranon nach 21 Tagen (Kontrollgruppe). Schlechte Reposition des Knochen-zylinders. Zwischen Lagerknochen (Lk) und Knochenzylinder (Kz) ist der Osteotomiespalt (→) verschieden weit.



Abb. 85 Querschnitt durch das Olecranon nach 21 Tagen (Kontrollgruppe). Der Osteotomiespalt (→) zwischen Lagerknochen (Lk) und Knochenzylinder (Kz) ist verschieden weit.

Klebergruppe nach 42 Tagen

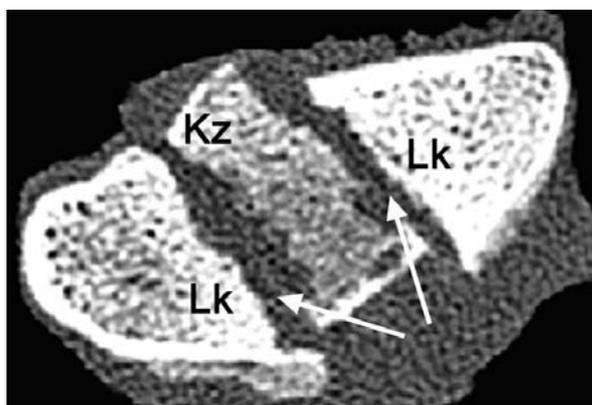


Abb. 86 Längsschnitt durch das Olecranon nach 42 Tagen Kleberapplikation. Der Osteotomiespalt ist weiterhin zwischen Lagerknochen (Lk) und Knochenzylinder (Kz) deutlich zu sehen (→).

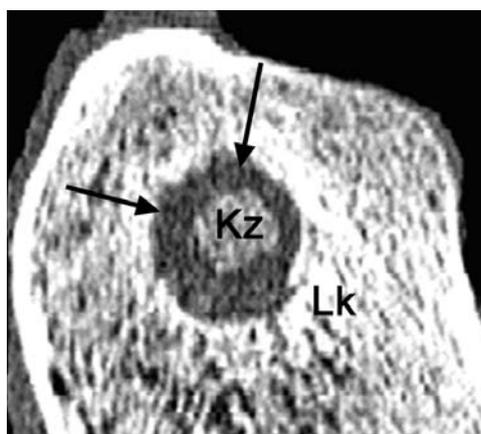


Abb. 87 Querschnitt durch das Olecranon nach 42 Tagen Kleberapplikation. Zwischen Knochenzylinder (Kz) und Lagerknochen (Lk) lässt sich ein sehr breiter Osteotomiespalt erkennen, der durch die erkennbare Resorption des Zylinders bedingt ist.

Kontrollgruppe nach 42 Tagen

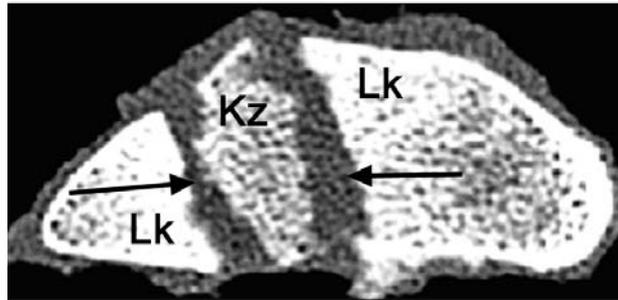


Abb. 88 Längsschnitt durch das Olecranon nach 42 Tagen (Kontrollgruppe). Der Osteotomiespalt zwischen Lagerknochen (Lk) und Knochenzylinder (Kz) ist durch die Zylinderresorption unterschiedlich weit (→).

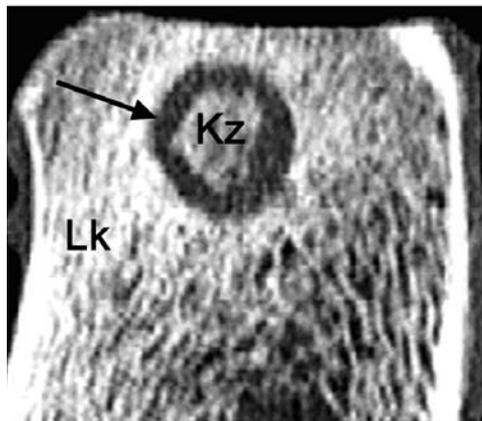


Abb. 89 Querschnitt durch das Olecranon nach 42 Tagen (Kontrollgruppe). Zwischen Lagerknochen (Lk) und Knochenzylinder (Kz) zeigen sich deutlich unterschiedliche Weiten des Osteotomiespalts (→), die durch die Resorption des Zylinders entstanden sind.

Klebergruppe nach 84 Tagen

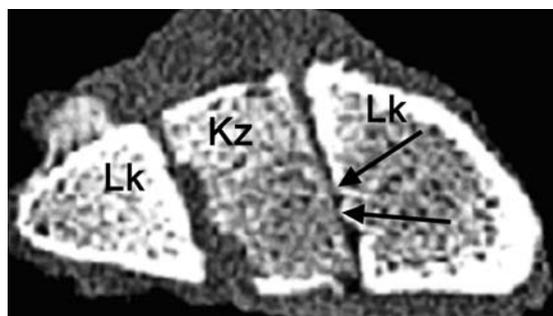


Abb. 90 Längsschnitt durch das Olecranon nach 84 Tagen Kleberapplikation. Zwischen Lagerknochen (Lk) und Knochenzylinder (Kz) besteht immer noch ein weiter Osteotomiespalt. Der Knochenzylinder ist minimal resorbiert worden. Einige Kontakte (Bridging) sind zwischen Knochenzylinder und Lagerknochen erkennbar (→).

Kontrollgruppe nach 84 Tagen

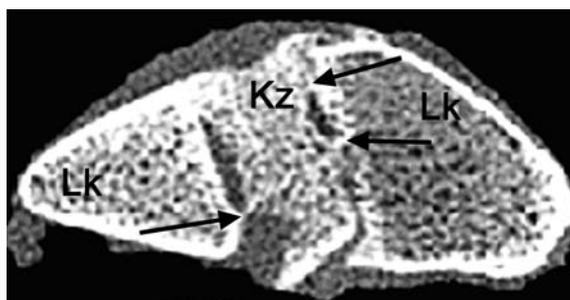


Abb. 91 Längsschnitt durch das Olecranon nach 84 Tagen (Kontrollgruppe). Zwischen Lagerknochen (Lk) und Knochenzylinder (Kz) gibt es zahlreiche knöcherne Kontakte (Bridging) (→). Areale mit weitem Osteotomiespalt sind ebenfalls erkennbar.

Defekt mit Kleber nach 42 und 84 Tagen

Die folgenden beiden Abbildungen 92 und 93 stehen repräsentativ für alle Beobachtungszeitpunkte, da sich keine Unterschiede zwischen den Euthanasiezeitpunkten in den computertomographischen Untersuchungen erkennen ließen.

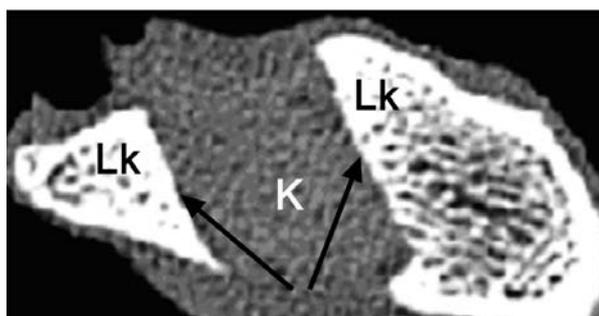


Abb. 92 Längsschnitt durch das Olecranon nach 84 Tagen Kleberapplikation, der Defekt ist vollständig mit Kleber (K) ausgefüllt. Keine Osteogenese am Lagerknochen (Lk) oder Defektmittelpunkt erkennbar. Die Osteotomieeränder sind glatt (→).

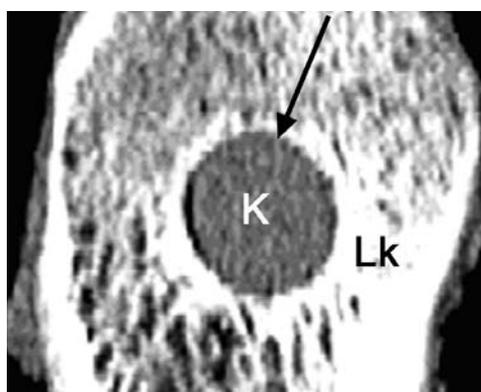


Abb. 93 Querschnitt durch das Olecranon nach 42 Tagen Kleberapplikation, der Defekt ist vollständig mit Kleber (K) aufgefüllt. Die Osteotomieeränder des Lagerknochens (Lk) sind glatt (→).

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass der Knochenkleber auf den Aufnahmen nicht von dem umliegenden Weichgewebe zu differenzieren ist. Die Aufnahmen zeigen:

- Der Osteotomiespalt ist überwiegend unterschiedlich weit.
- Nach 42 Tagen sind die Knochenzylinder in der Kleber- und in der Kontrollgruppe teilweise resorbiert (Klebergruppe in ca. 66%, Kontrollgruppe in ca. 70%). Es gibt keine knöchernen Verbindungen zwischen dem Lagerknochen und dem Knochenzylinder.
- Nach 84 Tagen zeigen sich zahlreiche knöcherne Überbrückungen in der Kontrollgruppe, während es in der Klebergruppe nur zwei Kontaktstellen zwischen Lagerknochen und Knochenzylinder gibt.
- Nach 42 und 84 Tagen zeigt der mit Knochenkleber aufgefüllte Defekt keine Osteoneogenese an dem Osteotomiespalt. Der Defekt ist immer noch vollständig mit Knochenkleber aufgefüllt.

Da nur Stichproben der mikrocomputertomographischen Untersuchung unterzogen worden sind, können die oben gezeigten Aufnahmen die lichtmikroskopischen und transmissionselektronenmikroskopischen Ergebnisse nur ergänzen und in ihrer Aussage untermauern helfen.

4 Diskussion

Das Ziel der vorliegenden tierexperimentellen Untersuchung war es - unter den Gesichtspunkten der Voraussetzungen und Anforderungen an einen Knochenkleber - den neuartigen bioresorbierbaren Knochenkleber kritisch zu prüfen. Vor allem die Biokompatibilität und die Degradation des Knochenklebers sowie die physiologische Frakturheilung nach Kleberapplikation wurden im Detail überprüft. Dabei konnte die knöcherne Integration, die Bioaktivität und die Wiederherstellung der Knochenstruktur unter Anwendung des Knochenklebers am Bohrlochdefekt- und Segmentmodell des Schafsolecranons und der Schafsulna untersucht werden. Beurteilt wurden darüber hinaus die Knochenformation und die Knochenresorption nach Applikation des Knochenklebers in den Osteotomiespalt. Dabei wurde besonders auf die Zelltoxizität und die Entzündungsreaktionen nach Kleberapplikation geachtet. Die oben genannten Aspekte wurden mittels licht- und transmissionselektronenmikroskopischen, radiologischen sowie computertomographischen Untersuchungen geprüft.

Biokompatibilität wird definiert als die Fähigkeit eines Materials, eine angemessene Gewebsreaktion des Empfängers bei spezifischer Applikation zu erzeugen [66]. Die Biokompatibilität beinhaltet in einem Zellkulturverfahren folgende Grundbegriffe: Zellmigration, Zelladhärenz, Zellproliferation, Zellwachstum, Zelldifferenzierung, Toxizität, Kanzerogenität, Mutagenität und metabolische Leistung, die in Zellkulturen z. B. durch die Bildung von extrazellulärer Matrix ausgedrückt werden können.

An alle Materialien, die im Menschen verwendet werden oder mit ihm in unmittelbarem Kontakt stehen, müssen strenge Kriterien gestellt werden. Die Biokompatibilität von Materialien hängt zum einen von ihren physio-chemischen Eigenschaften ab und zum anderen auch von ihrem biologischen Verhalten. Dabei ist es unausweichlich, dass zusätzliche Untersuchungen durchgeführt werden müssen, die den biomechanischen Aspekt als wichtigen Bestandteil erfassen. Im Rahmen dieser tierexperimentellen Untersuchungen wurden die biomechanischen Untersuchungen am Osteotomiesegmentmodell im kortikalen Bereich der Schafsulna gesondert erarbeitet.

Als **biokompatibel** wird ein Material bezeichnet, welches weder toxische noch kanzerogene oder mutagene Wirkung zeigt. Es darf zu keiner Sensibilisierung kommen und es soll im Falle einer Implantation für Zellen adhäsiv bleiben [34].

Geht von einem Material keine schädigende Wirkung aus und erfüllt es die oben genannten Kriterien in idealer Weise, dann spricht man von **bioinert** [25]. Zwischen dem Implantatwerkstoff und dem ihn umgebenden Gewebe kommt es bei direktem Kontakt zu keinerlei chemischer Reaktion (Kontaktosteogenese).

Biotolerant werden Materialien genannt, die als Reaktion auf ihre geringere Biokompatibilität meist bindegewebig vom eigentlichen Knochengewebe getrennt werden ohne toxisch zu wirken [33], wie z. B. PMMA für die Anwendung von Hüftgelenksendoprothesen. Es kommt lediglich zu einer sogenannten Distanzosteogenese. Die Dicke dieser Bindegewebsschicht sowie deren Zusammensetzung sind von der Art des Werkstoffes abhängig [62].

Bioaktive Materialien haben die Eigenschaft, dass der Knochen mit ihnen eine direkte chemische Verbindung eingehen kann (Verbundosteogenese) [41]. Sie sind den körpereigenen Substanzen chemisch sehr ähnlich und können so in ein Gewebe integriert werden [61]. Außerdem sollen sie Gewebeneubildungen induzieren können [46].

Die Antwort des umliegenden Gewebes auf die Implantation eines Biomaterials ist weitgehend von der Art und Menge der von dem Implantatstoff in seine physiologische Umgebung freigesetzten Bestandteile und damit weitgehend von der chemischen und physikalischen Beschaffenheit seiner Oberfläche abhängig [41].

Hinsichtlich des hier zur Anwendung gekommenen Klebstoffes wurden anderweitig umfangreiche experimentelle, laborchemische Untersuchungen bezüglich der Mutagenität und Kanzerogenität – die beide ausgeschlossen werden konnten – durchgeführt. Neben der körpereigenen Substanz Milchsäure und dem im menschlichen Körper zu findenden Ethylenglykol ist Polymethylmethacrylat (PMMA) bzw. Methylmethacrylat (MMA) bereits 1960 von CHARNLEY in dem menschlichen Organismus als Palacos-Knochenzement implantiert worden [8].

In den Serien 1 und 2 der Kleinterversuche am Kaninchen wurde bereits eine Prüfung der Biokompatibilität dieses Klebers durchgeführt. Gegenüber dem im Großtierversuch verwendeten Knochenkleber wurde in den Kleinterversuchen dem

in Kapitel 2.3 beschriebenen Hauptmonomeren jedoch verschiedene Comonomere zugesetzt. In Serie 1 wurde dem Knochenkleber eine gute Biokompatibilität, Degradation und Osteointegration zugeschrieben. In Serie 2 zeigte sich der Knochenkleber biotolerant. Eine Osteointegration wurde nur in den kleberfreien Bereichen beobachtet.

4.1 Diskussion der Methode

Wie in Kapitel 2.1 (Versuchsmodell Schaf) bereits beschrieben wurde, kommen die Größenverhältnisse der Schafsknochen denen der menschlichen Knochen sehr nahe. Die Haltungskosten beim Schaf stehen in einem günstigen Zusammenhang zu der erwarteten Aussagekraft der Ergebnisse [39]. Das Schaf erlaubt am ehesten reproduzierbare Rückschlüsse auf die bei der menschlichen Frakturheilung ablaufenden Regenerationsvorgänge zu ziehen [68], auch wenn der Knochenstoffwechsel beim Schaf insgesamt schneller abläuft als beim Menschen [56]. Nach den Serien 1 und 2 der Knochenkleberversuche an dem Kleintiermodell Kaninchen erscheint das Schaf für das Großtiermodell nach den oben genannten Kriterien am besten geeignet.

Spongiöses Bohrlochdefektmodell

Bis heute wurde eine Vielzahl von Modellen zur Erforschung von Knochenersatzmaterialien und Knochenklebern in der Literatur beschrieben. Obwohl es sich hierbei um einen neuartigen bioresorbierbaren Knochenkleber und nicht um einen Knochenersatzstoff handelt, werden die angewandten Modelle aus der Literatur miteinander verglichen.

In dem hier gewählten spongiösen Modell wurde ein Bohrlochdefekt mit einem Durchmesser von 8,35 mm am Schafsolecranon gesetzt. Der Knochenzylinder wurde mit oder ohne Knochenkleber repositioniert, sodass eine Spaltbreite von ca. 0,9 mm entstand. Ein experimentell erzeugter Bohrlochdefekt ist gekennzeichnet durch eine exakte Einpassung, eine relative Ruhe des Implantatlagers sowie durch eine fehlende mechanische Belastung [67]. Durch den „Presssitz“, d. h. durch ein so genaues Einpassen und Einpressen, dass mit einer über einige Wochen anhaltenden mechanischen Ruhe im Implantatbett gerechnet werden kann, werden Formschluss

und Primärstabilität herbeigeführt [51]. Da im vorgestellten Modell Raum für die Applikation des Knochenklebers gewährleistet werden musste, wurde ein genaues Anpassen im Sinne eines Presssitzes nicht angestrebt. Zwischen dem Bohrloch und dem Knochenzylinder lag daher eine Spaltbreite von 0,9 mm vor, bedingt durch das DBC-System mit der Fräse, die einen Außendurchmesser von 8,35 mm und einen Innendurchmesser von 7,45 mm besitzt. In dieser Studie wird die Klebergruppe als mehr oder weniger stabiles Defektmodell - vorausgesetzt es wurde ausreichend Kleber in den Defektspalt appliziert und somit für einen festen Sitz des Knochenzylinders gesorgt - mit der Kontrollgruppe als ein instabiles Defektmodell - hervorgerufen durch den Spielraum zwischen dem Knochenzylinder und dem Lagerknochen - verglichen. Stabile Defektmodelle, wie „Press-fit-Implantate“, zeigen stets gleichartige Verankerungen. Instabile Defektmodelle haben den Nachteil sowohl die spontane Knochenneubildung zu hemmen als auch die instabilitätsbedingte Reizkallusbildung zu fördern und damit das Versuchsergebnis hinsichtlich der knöchernen Integration zu verfälschen [54]. Wie in der lichtmikroskopischen Auswertung zu erkennen war, befinden sich im Frakturspalt unterschiedliche Mengen an Knochenkleber, was zu unterschiedlichen Stabilitätsstadien geführt haben könnte. Allerdings kann man anhand der zu erkennenden Knochenklebermenge keine Rückschlüsse auf die Stabilität zwischen dem Knochenzylinder und dem Lagerknochen machen. Damit nimmt das Modell der Klebergruppe eine Sonderstellung ein, da man es nicht eindeutig als stabiles oder instabiles Defektmodell einordnen kann.

Darüber hinaus ist die Problematik der in vielen tierexperimentellen Studien benutzten Bohrlochmodelle, sei es im Bereich der Tibiakortikalis oder in der metaphysären Spongiosa, zu berücksichtigen. Das häufig benutzte Bohrlochmodell lässt nach Erachten von SCHNETTLER und DINGELDEIN (1997) eine Standardisierung aufgrund der Operationstechnik nur bedingt zu, da ein Drillbohrer als spanabhebendes Verfahren zur Traumatisierung des Defekts führt, es hierbei zu Hitznekrosen und Mikrotraumatisierungen kommen kann und man demzufolge in der Regel keine reproduzierbaren Ergebnisse erhält [54]. Deshalb ist es schwer, die durch einen Drillbohrer entstandenen Bohrlochdefekte mit dem hier vorliegenden Modell, das mit dem DBC-System erzeugt wurde, zu vergleichen.

Bedenken und Befürchtungen über Operationstraumen, wie Hitzenekrosen und Weichgewebeschäden, die durch das DBC-System bedingt sein könnten, wurden durch Draenert widerlegt. Das Instrumentarium des „diamond bone cutting system“ (DBCS) besteht aus Diamanthohlschleifinstrumenten, die von innen gespült werden, und die dazu in der Größe passenden Extraktoren. Die Entwicklung der Diamanthohlschleifen geht auf die Arbeitsgemeinschaft für Osteosynthese (AO) zurück und basiert auf experimentellen Untersuchungen zur Knochenheilung [12, 27]. Somit konnte ein nicht geschädigter, vitaler, repositionierbarer Knochenzylinder geschaffen werden. Der Defektrand und der Biopsiezylinder sind in gleichem Maße vollständig intakt, sie sind wie „geschliffen“. Weichgewebe kann mit diamantbesetzten Hohlschleifen nicht getrennt werden:

Sie können das ausweichende Weichteilgewebe nicht fassen und verletzen es aus diesem Grund auch nicht. Die hohe Präzision und die Reproduzierbarkeit des Defektes lassen dieses Modell für das Studium der Defektheilung und der Wirkung von Pharmazeutika auf die Knochenheilung geeignet erscheinen [12].

Kortikales Segmentmodell

In dem zweiten hier vorgestellten kortikalen Modell wurde an der Ulna des Schafes ein 2 cm langes Segment erzeugt. Bei der Schafsulna handelt es sich um einen rudimentären Knochen lateral des vollbelasteten Schafsradius. In diesem Modell können nicht nur die Qualität und die Quantität der im Beobachtungszeitraum erfolgten Knochenneubildung und Knochenkleberresorption erfasst werden, sondern auch gleichzeitig die mechanische Wirksamkeit der Knochenneubildung nach der Knochenkleberapplikation, wie sie in der Promotionsarbeit von N. Schettler untersucht wurde. Der Vorteil des hier gewählten Modells an der Schafsulna ist die Nutzung der Präparate sowohl für die histologischen Auswertungen als auch für die biomechanischen Messungen. Für die histologischen Auswertungen und Analysen stand nach der biomechanischen Prüfung der jeweils nichtgebrochene intakte Osteotomiespalt zur Verfügung. Die durch die biomechanische Messung verursachten Gewebeveränderungen ließen eine nachfolgende Beurteilung der histologischen Präparate uneingeschränkt zu. Damit konnte verhindert werden, dass zusätzliche Tiere für die histologische Auswertung bzw. biomechanische Prüfung im kortikalen Bereich operiert werden mussten. Zusätzlich wird durch die zeitlich

nacheinander durchgeführten histologischen und biomechanischen Auswertungen an denselben Präparaten erreicht, dass Rückschlüsse bzw. Korrelationen dieser Beobachtungen untereinander gemacht werden können.

Zusammenfassend ist festzustellen, dass das gewählte spongiöse und kortikale Modell trotz der oben genannten Kritik für die in der Zielsetzung aufgezeigten Problem- und Fragestellungen geeignet erscheint.

Die Operationen wurden von zwei Operationsteams durchgeführt. Daher sind Unterschiede bei den Operationen anzunehmen. So kam es zu Abweichungen zwischen den Operateuren, aber auch zu Abweichungen bei jedem einzelnen Operateur bezüglich

- der Menge des Knochenklebers, die im spongiösen und im kortikalen Modell verwendet worden war,
- der Reposition des Knochenzylinders in das Bohrloch trotz vorheriger Markierung,
- der Größe des Segmentes an der Ulna,
- der Nachapplikation von Knochenkleber, nachdem das Knochenstück bereits in Position war.

Da man aber auch in der Klinik mit verschiedenen Operateuren rechnen muss, müssen diese Unterschiede und Abweichungen bei der Knochenkleberherstellung einkalkuliert werden. Denn eine leichte Anwendung des Knochenklebers soll für den Operateur ohne zusätzliche Lehrgänge durchführbar und reproduzierbar sein.

4.2 Diskussion der Ergebnisse

Spongiöses Bohrlochdefektmodell

Die histologischen Untersuchungen des **spongiösen Modells** in der Kleber- und in der Kontrollgruppe nach **21 Tagen** zeigen das Bild einer frischen Fraktur mit einem Frakturhämatom, Knochenbruchstücken und der Einwanderung von Granulationsgewebe. Während die Kontrollgruppe beweist, dass eine Durchbauung des Osteotomiespaltes schon nach 21 Tagen möglich ist, weisen die an die Kleberareale angrenzenden Osteotomieränder in der Klebergruppe glatte Ränder und keinerlei

Anzeichen einer Osteogenese auf. Durch die transmissionselektronenmikroskopischen Untersuchungen steht fest, dass der Kleber nach 21 Tagen nicht resorbiert worden ist.

Es ist zu klären, wie und wodurch der Knochenkleber einer Osteogenese entgegenwirkt. Der Knochenkleber scheint eine mechanische Barriere darzustellen und durch seine Anwesenheit keinen Raum für eine Knochenneubildung zuzulassen. Toxische oder andere schädigende Wirkungen sind nicht zu erkennen. Der in Klebernähe liegende Knochen wirkt intakt, so dass der Knochenkleber mit dem umgebenden Knochengewebe kompatibel zu sein scheint. Die mehrkernigen Riesenzellen können den Knochenkleber nicht abbauen, obwohl sie teilweise direkt an diesem liegen. Vielleicht erhalten die mehrkernigen Riesenzellen kein Signal für eine Phagozytose des Knochenklebers. Oder aber es wird dem Organismus signalisiert, dass er sich vor dem Knochenkleber schützen soll. Dies zeigt sich nach 21 Tagen vor allem in dem mit Knochenkleber aufgefüllten Defekt. Zwischen dem Knochenkleber und dem Lagerknochen liegt ein bindegewebiger Saum. Der Kleber wird also bindegewebig abgeschieden und vom eigentlichen Knochengewebe getrennt ohne dabei toxisch zu wirken. Der Knochenkleber ist damit als **biotolerant** zu bezeichnen; es entsteht eine **Distanzosteogenese**.

Bei den histologischen Untersuchungen der Präparate nach **42 Tagen** wurden in der Kleber- und in der Kontrollgruppe stark reduzierte und resorbierte Knochenzylinder neben vollständig erhaltenen Knochenzylindern beobachtet.

Weder Kapillaren noch mehrkernige Riesenzellen können die massive homogene Schicht des Knochenklebers durchbrechen oder angreifen. Dadurch ist der Knochenzylinder von dem Lagerknochen isoliert und kann von diesem nicht mehr mit Nährstoffen versorgt werden. Jeder von der arteriellen oder venösen Gefäßversorgung abgetrennte Knochen stirbt ab [2, 30]. Dies konnte man anhand der reduzierten Knochenzylinder an einigen Kleberpräparaten erkennen.

Neben dem Knochenkleber ist auch die Spaltbreite ein entscheidender Faktor, der über das Einwachsverhalten des Knochenzylinders in den Lagerknochen entscheidet. Wird der Knochenzylinder optimal repositioniert liegt eine Spaltbreite von 0,9 mm vor, bedingt durch das DBC-System mit der Fräse, die einen Außendurchmesser von 8,35 mm und einen Innendurchmesser von 7,45 mm besitzt.

Die lichtmikroskopischen Schliffe haben gezeigt, dass, bis auf einzelne Ausnahmen, kaum eine optimale Reposition erreicht wurde. Die dadurch entstandenen Differenzen in der Spaltbreite variierten erheblich von der Spaltbreite von 0,9 mm. Von der Lage des in das Bohrloch zurückgesetzten Knochenzylinders hängt es ab, ob es zu einer Überbrückung zwischen dem Lagerknochen und dem Knochenzylinder kommt. Wenn der Zylinder zurückgesetzt wurde, konnte der Osteotomiespalt an einigen Stellen sehr schmal sein, also kleiner als 0,9 mm, oder die Osteotomieränder berührten sich sogar. Somit konnte es zu einer Überbrückung kommen. In manchen Präparaten ist der Spalt so groß, dass es zu keiner Überbrückung bzw. zu keinem Kontakt zwischen den Osteotomierändern gekommen ist. Der Knochenzylinder konnte nicht durch neueinsprießende Kapillaren versorgt werden und ist daher resorbiert und deutlich reduziert worden.

Wie aus experimentellen Untersuchungen an Hüftpfannen [23], stabil fixierten Frakturspalten [52] und aus der Heilung von Kortikalisdefekten [31, 53] bekannt ist, spielt die Spaltbreite eine maßgebliche Rolle bei der Überbrückung von Defekten sowohl im spongiosen wie auch im kortikalen Bereich. So können Distanzen von mehr als 1 mm durch Knochenneubildung nicht mehr mit einem Sprung überbrückt werden (osteologic jumping distance [23]). Damit vermindert sich auch die Chance, dass der Knochenzylinder innerhalb kürzester Zeit vom Knochenanbau erreicht wird. Da in der vorliegenden Untersuchung die Spaltgröße stark von der optimalen Größe von 0,9 mm sowohl zum Positiven, also geringer, als auch zum Negativen, also größer, variiert, liegen unterschiedliche Bedingungen für die Überbrückung des Defektspaltes vor.

Nach 42 Tagen kommt es in der Kleber- und in der Kontrollgruppe zu Überbrückungen des Osteotomiespaltes. Allerdings ist nur in den kleberfreien Arealen eine Überbrückung zwischen dem Lagerknochen und dem Knochenzylinder zu beobachten.

Für den knöchernen Durchbau spielen die Präsenz und der Durchmesser der interporösen Verbindungen eine entscheidende Rolle. Bei einem nicht resorbierbaren Material, wie sich der Knochenkleber in unserem spongiosen Defektmodell darstellt, werden diese Kriterien tatsächlich zu begrenzenden Faktoren [35]. Da der Osteotomiespalt bei keinem Präparat vollständig mit Knochenkleber ausgefüllt ist,

können die kleberfreien Stellen mit neuem, vitalem Knochen überbrückt werden, über den der Knochenzylinder wieder an die lebenswichtige Versorgung angeschlossen wird und somit weiter besteht. Anhand der histologischen Untersuchungen sieht man, dass der Knochenkleber nach 42 Tagen nicht von mehrkernigen Riesenzellen oder anderen Zellen phagozytiert wird. Wenn der Knochenkleber resorbiert würde, so müssten entsprechend Resorptionszonen und Abbauvorgänge an den Kleberkonglomeraten zu finden sein.

Man kann daraus schließen, dass an den Stellen, an denen eine Überbrückung zwischen dem Lagerknochen und dem Knochenzylinder stattgefunden hat, keine oder nur geringe Anteile an Knochenkleber existiert haben. Deshalb muss man in der Klebergruppe die kleberfreien Areale des Osteotomiespaltes, die durch den neugebildeten Knochen überbrückt worden sind, wie Areale der Kontrollgruppe bewerten und darf diese nicht als einen Erfolg bei der Kleberapplikation verbuchen.

Zusammenfassend ist festzustellen, dass eine Überbrückung des Osteotomiespaltes zwischen dem Lagerknochen und dem Knochenzylinder durch die Anwesenheit des Knochenklebers und durch die Größe der Spaltbreite verhindert werden kann. Die Versorgung des Knochenzylinders mit Nährstoffen über Kapillaren kann somit in der Kleber- und in der Kontrollgruppe behindert werden und zu einer Resorption des Knochenzylinders führen. Ein stark reduzierter Knochenzylinder ist somit kein Knochenkleberspezifisches Merkmal. Außerdem scheint es, dass in den kleberfreien Arealen der Klebergruppe, in denen eine Überbrückung zwischen dem Lagerknochen und dem Knochenzylinder stattgefunden hat, zu keinem Zeitpunkt Knochenkleber gewesen ist.

Nach **84 Tagen** in der Kontrollgruppe und an den kleberfreien Arealen in der Klebergruppe bestehen die knöchernen Überbrückungen zwischen dem Lagerknochen und dem Knochenzylinder aus Geflechtknochen, der teilweise in Lamellenknochen umgewandelt worden ist. Die Osteogenese ist noch nicht abgeschlossen. Im Beobachtungszeitraum von insgesamt 84 Tagen (= 3 Monate) konnte keine Phagozytose oder Resorption des Knochenklebers im spongiösen Bohrlochdefektmodell durch Makrophagen oder mehrkernigen Riesenzellen in den transmissionselektronenmikroskopischen oder lichtmikroskopischen Untersuchungen entdeckt werden.

Obwohl es sich in meiner Arbeit nicht um einen Knochenersatzstoff handelt, treffen die im Bezug auf Knochenersatzstoffe gemachten Aussagen auch auf den vorliegenden Knochenkleber zu. Entscheidend für den Erfolg einer knöchernen Durchbauung ist schließlich die Resorbierbarkeit oder Phagozytose der Knochenersatzstoffe. Das Ausmaß der Substitution bestimmt, wie gut das angebotene Material in das Knochengewebe integriert wird. Die Schlüsselrolle spielt dabei die Resorbierbarkeit. Dabei ist es wichtig, dass diese Resorptionsvorgänge bereits in den ersten 2 postoperativen Monaten in Gang kommen, d. h. in der Periode, in der die durch den Eingriff ausgelöste Aktivierung der Knochenbildung am intensivsten ist. Eine zu leichte Resorbierbarkeit wird in der Umbauphase die Integrität des Leitgerüsts gefährden, eine schlechte Resorbierbarkeit bedeutet die Persistenz des eingebrachten Materials und beeinträchtigt den Aufbau einer kontinuierlichen Knochenstruktur [51]. In der vorliegenden Untersuchung konnte in der Kontrollgruppe nach 84 Tagen beobachtet werden, dass bei einigen Präparaten der Knochenzylinder weitgehend mit dem Lagerknochen zusammengewachsen war. Nach randschlüssiger Implantation von autogener Spongiosa zeigte sich auch bei MANDELKOW 1990 eine weitgehende Überbrückung des Defektes [42].

Die lichtmikroskopischen Ergebnisse am spongiösen Modell lassen den Schluss zu, dass es auch bei einer Verlängerung der Beobachtungszeit zu keiner Resorption des Knochenklebers sowie zu keinem Ersatz des Knochenklebers durch neugebildeten Knochen gekommen wäre.

Nach einem Beobachtungszeitraum von 21 Tagen sieht man deutlich, dass durch den Reiz der Defektsetzung eine starke lokale Aktivierung der Knochenneubildung stattfindet. Nach 42 bzw. 84 Tagen geht diese Reaktion des Lagerknochens deutlich zurück. Außerdem lässt sich zu Beginn des Beobachtungszeitraums nur eine geringe Osteoklasten-Tätigkeit feststellen. Unsere Beobachtungen unterstützen die folgenden von SCHENK gemachten Aussagen. Jede Traumatisierung des Knochengewebes, sei es durch eine Defektsetzung, eine Fraktur oder durch das Einbringen von Implantaten oder Transplantaten, löst eine lokale Aktivierung der Knochenbildung aus. Diese wird im Gegensatz zu den Umbauvorgängen nicht von einer osteoklastischen Resorptionsphase eingeleitet. Sie setzt bereits nach Stunden,

spätestens nach Tagen ein und weist während der ersten 2 Monate ihre höchste Intensität auf [51].

In den Präparaten mit dem mit **Knochenkleber aufgefüllten Defekt** konnte man zu jedem Beobachtungszeitpunkt sehen, dass der umgebende Lagerknochen zur Formation von neuem Knochengewebe bereit war. Durch die fehlende Resorption und den damit zusammenhängenden Platzmangel konnte ein Knochenaufbau nicht durchgeführt werden. Infolge der ausbleibenden Resorption kommt es im Verlauf der Untersuchung zu einer relativ hohen Volumendichte des Verbunds aus Prüfkörper und neugebildeter Spongiosa [22]. Das kann erklären, dass in der lichtmikroskopischen Betrachtung der Präparate des mit Knochenkleber ausgefüllten Defektes die Knochen trabekel des Lagerknochens in Anzahl und Durchmesser erhöht waren.

Befindet sich an einer Stelle sehr viel Knochenkleber, wird besonders deutlich, dass der Knochenkleber nicht abgebaut wird. Es kommt zu einer **benignen Fremdkörperreaktion**, die in dessen Abkapselung mündet. Wenn das Implantatmaterial vom Organismus nicht aufgelöst werden kann, wird es in der Regel durch eine Bindegewebsschicht abgekapselt. Die Dicke dieser Schicht ist von der Höhe der Reaktivität des Implantates und dessen Relativbewegung zum umliegenden Gewebe abhängig. Reaktionen, wie das Absterben einzelner Zellen oder auch ganzer Zellverbände, werden nicht beobachtet, so dass der Knochenkleber nicht toxisch zu sein scheint. Da der Knochenkleber meist vom eigentlichen Knochengewebe durch eine Bindegewebsschicht getrennt wird ohne toxisch zu wirken, kann man ihn als **biotolerant** bezeichnen.

Bei den **Leerdefekten** zeigte sich mit zunehmendem Beobachtungszeitraum eine Zunahme der Trabekelbildung. Nach 84 Tagen kam es fast zu einer Überbrückung des Defektes. 1990 setzten MANDELKOW et al. in ihrer Arbeit über die Knochenneubildung nach der Implantation von verschiedenen Hydroxylapatitkeramiken Bohrlochdefekte mit 6 mm Durchmesser an der Schafstibia. Bei ihrer Leerbohrung zeigte sich nach 6 Wochen, wie in der hier vorliegenden Untersuchung, dass neuer Geflechtknochen vom Bohrlochrand in das Lumen einspross ohne eine Defektüberbrückung zu erreichen [42]. In der vorliegenden Untersuchung nimmt im

Leerdefekt mit steigendem Beobachtungszeitpunkt das Ausmaß des neugebildeten Knochens zu und damit die Größe des Lumens ab.

In dem Bohrlochmodell der Schafstibia als Kleindefektmodell mit 6-mm-Bohrlochdefekten von STÜTZLE et al. 1997 zeigten die Leerdefekte die spontane Regenerationsfähigkeit des Lagerknochens auf. In keinem Fall war es hier innerhalb von 6 Wochen zu einer Überbrückung gekommen, wohl aber zu einer Knochenneubildung an dem Defektrand [58]. Diese Beobachtung stimmt auch mit den hier durchgeführten Untersuchungen an den größeren Leerdefekten von 8,35 mm Durchmesser überein.

In den **Transmissionselektronischen Untersuchungen (TEM)** des spongiösen Bohrlochmodells erkennt man zu jedem Beobachtungszeitpunkt lang gestreckte, an den Knochenkleber angrenzende, mehrkernige Riesenzellen. Unter bestimmten Umständen, z. B. bei andauernder Stimulierung, können sich Makrophagen zu epitheloiden Zellen umwandeln, die in einer geschlossenen Formation zusammenliegen. Die epitheloiden Zellen können verschmelzen und große Zellen mit 100 oder mehr Kernen bilden, die als Fremdkörperriesenzellen bezeichnet werden [32]. Auf dem Plasmalemm der an den Knochenkleber angrenzenden mehrkernigen Riesenzellen erkennt man eine mäßig elektronendichte Schicht. Mittels Exozytose wird der Inhalt von Vesikeln, die im endoplasmatischen Retikulum gebildet werden, auf das Plasmalemm gebracht. Der Vesikelinhalt gleicht in der Elektronendichte und in der Struktur der dem Plasmalemm aufliegenden Schicht. Dies weist darauf hin, dass die Schicht ein Produkt der mehrkernigen Riesenzellen zu sein scheint. Somit gleichen die mehrkernigen Riesenzellen in ihrer Form, Aufbau und durch die Produktion dieser Schutzschicht (surface code) den Epithelzellen. Die Epithelzellen produzieren eine Schutzschicht, die Glykokalyx. Es handelt sich um einen unterschiedlich breiten Saum an der Oberfläche der Zelle, der im Wesentlichen von den Oligosaccharidseitenketten der Glykolipide und Glykoproteine der Zellmembran gebildet wird. Stets wird die Glykokalyx von den Zellen selbst gebildet und ständig regeneriert [33], wie auch die mehrkernigen Riesenzellen auf den TEM-Bildern diese Eigenschaft bestätigen. Die Glykokalyx sorgt dafür, dass sich gleichartige Zellen erkennen, sodass sie sich zu Verbänden zusammenschließen können, von denen eine Antigen-(Fremdkörper-) Wirkung ausgeht. Epithelzellen sind hinsichtlich ihrer

Oberfläche polar gebaut. Auch bei den mehrkernigen Riesenzellen kann man diese Polarität beobachten. Hier lässt sich auf der basalen, dem Knochenkleber abgewandten Seite ein Mikrovillisaum erkennen, während die apikale, dem Knochenkleber zugewandte Seite glatt erscheint.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass sich der Organismus mit der Anordnung der Fremdkörperriesenzellen entlang des Knochenklebers zu schützen versucht. Die mehrkernigen Riesenzellen verschließen sich gegenüber dem Knochenkleber zusätzlich mit einer Schicht, die der Glykokalix der Epithelzellen ähnelt. Somit kann man diese Reaktion auf den Knochenkleber als eine benigne Fremdkörperreaktion verstehen.

Für den **semiquantitativen Score** des spongiösen Bohrlochmodells wurde das Computerprogramm Image Pro Plus herangezogen, mit dem der Knochenzuwachs bzw. der Knochenschwund an dem Lagerknochen und dem Knochenzylinder gemessen wurde. Einige Defizite des Computerprogramms sind während dessen Anwendung für die vorliegende Auswertung aufgefallen. Bei der Berechnung der Zylindergröße wurden die einzelnen Farbpixel der Knochenbälkchen der mit Toluidinblau angefärbten Präparate rot angefärbt und deren Fläche ausgerechnet. Dabei kam es vor, bedingt durch die Toluidinblaufärbung, dass durch die ähnliche bläuliche Anfärbung der Knochenbälkchen und des Knochenklebers einige Farbpixel des Knochenklebers auch rot eingefärbt wurden und somit in die Berechnung des Knochenzylinders miteingegangen sind. Dies konnte nicht verhindert werden, da, wenn man auf diese Farbpixel, die sich auch im Knochenzylinder wiederfinden ließen, verzichtet hätte, die Fläche des Knochenzylinders dadurch kleiner ausgefallen wäre.

Des Weiteren konnte nicht berücksichtigt werden, dass in den Präparaten die Knochen trabekel der Knochenzylinder in ihrer Anzahl und ihrer Dicke teilweise stark variierten. Das bedeutet, dass die Fläche eines vollständig erhaltenen Knochenzylinders der Fläche eines zur Hälfte reduzierten Knochenzylinders entsprechen konnte. Bei einem solchen Präparat war der Knochenzylinder zwar zur Hälfte reduziert, da aber die Knochen trabekel sehr dicht und dick waren, war auch die Fläche größer als bei einem mit dünnmaschigen Knochen trabekeln ausgestatteten Knochenzylinder.

Da nicht alle Präparate so senkrecht geschnitten worden sind, dass man bei der Aufsicht auf das Präparat den Knochenzylinder als Kreis erkennt, gibt es viele Präparate, die einen in der Aufsicht ovalen Knochenzylinder aufweisen. Somit ergab sich das Problem, dass man keinen einheitlichen Kreis über den Knochenzylinder legen konnte, um die Zylinderfläche zu bestimmen. Deshalb musste teilweise ein individueller Kreis gelegt werden, dessen Fläche aber immer gleich groß blieb.

Die anderen Kategorien des Scores wurden subjektiv von dem Betrachter bewertet. Das bedeutet, dass jeder andere Betrachter eine vielleicht andere Bewertung vorgenommen hätte. Da aber jeweils derselbe Betrachter die Wertungen abgegeben hat, ist der Fehler bzw. die Abweichung immer gleich groß.

Die Schwächen des Computerprogramms und die individuelle subjektive Betrachtung und Bewertung des Autors bei der Erstellung des semiquantitativen Scores zeigen deutlich, dass der Score vorsichtig interpretiert werden muss und demnach nur eine grobe Tendenz vorgibt. Aus diesem Grund wurde auf eine statistische Auswertung des Scores verzichtet. Zusammenfassend lässt sich ausführen, dass der Score die Ergebnisse, die sich in den histologischen Untersuchungen ergeben haben, quantitativ aufzeichnet.

Kortikales Segmentmodell

In dem kortikalen Segmentmodell der Ulna zeigt sich nach **21 Tagen** in der Kleber- und in der Kontrollgruppe das Bild einer frischen Fraktur mit Fragmenten, Einsprossung von Granulationsgewebe und einer beginnenden Kallusbildung. In beiden Gruppen lassen sich Resorptionszonen an den Knochenfragmenten finden. In der Klebergruppe wurde der Frakturkallus nur an den kleberfreien Stellen beobachtet. Dies lässt den Schluss zu, dass trotz der Anwesenheit des Knochenklebers im Osteotomiespalt eine gewisse Instabilität in der Klebergruppe vorherrscht, wie sie auch in der Kontrollgruppe angetroffen wird, und es in beiden Gruppen zu einer „indirekten Knochenheilung“ kommt. Jeder Verletzungsreiz des Knochens löst einen Heilungsreiz aus. Die Bewegung der Fragmente gegeneinander und die damit zusammenhängende Dehnung des interfragmentären Gewebes scheint der entscheidende Triggermechanismus für die Heilung zu sein. Nur bei absoluter Ruhe im Frakturspalt tritt eine Kunstform der Knochenheilung auf, die „direkte Knochenheilung“ [57]. Befindet sich der Knochenkleber an einer Stelle im

Spalt, so wurde der Kallusreiz an dieser Stelle unterdrückt. Ob es von der lokalen Stabilität oder von dem physio-chemischen Milieu, das von dem Knochenkleber ausgeht, abhängt oder durch die Anwesenheit des Knochenklebers und die damit verbundene mechanische Barriere, konnte durch die lichtmikroskopischen Untersuchungen nicht geklärt werden.

Nach **42 Tagen** lassen sich eine fortschreitende Kallusbildung und damit eine teilweise Überbrückung des Frakturspaltes sowohl in der Kontrollgruppe als auch in den kleberfreien Arealen der Klebergruppe feststellen. Mit der Lichtmikroskopie konnten keine Resorptionsvorgänge am Knochenkleber aufgedeckt werden. In der Klebergruppe konnte nach 84 Tagen beobachtet werden, dass sich der neugebildete Knochen dem Knochenkleber sehr stark angenähert hat. Bei direktem Kontakt zwischen dem Knochen und dem Knochenkleber kam es zu keinen pathologischen Reaktionen, die z.B. mit Nekrosen oder Fremdkörperreaktionen einhergehen. Der Knochenkleber kann somit als **bioinert** bezeichnet werden, da von ihm weder toxische noch andere schädigende Wirkungen auszugehen scheinen und die Voraussetzungen der **Kompatibilität** gegeben sind. Es entsteht eine **Kontaktosteogenese**.

Daneben finden sich einige Bereiche im Osteotomiespalt des kortikalen Modells, die denen des spongiösen Modells ähneln. Faseriges Bindegewebe trennt den Knochenkleber von dem umliegenden Knochen. Der Knochenkleber zeigt sich hier als **biotolerant** und wird bindegewebig vom eigentlichen Knochengewebe getrennt. Es entsteht eine **Distanzosteogenese**, wie sie schon im spongiösen Modell beobachtet wurde.

In den Semidünnschnitten der Ulna erkennt man deutlich, dass mehrkernige Riesenzellen sich in unmittelbarer Nähe zu dem Knochenkleber befinden und bereits nach 21 Tagen intrazelluläre Einschlüsse aufweisen. Diese hellen und wenig elektronendichten Einschlüsse gleichen in der Elektronendichte und Struktur dem Knochenkleber. Daraus kann man folgern, dass der Knochenkleber von den mehrkernigen Riesenzellen bereits nach 21 Tagen phagozytiert worden ist. Der Knochenkleber wird phagozytiert und degradiert und nicht, wie im spongiösen Modell und an einigen wenigen Arealen des kortikalen Modells, bindegewebig, als Distanzosteogenese, abgetrennt.

Zusammenfassend ist festzuhalten, dass das Gewebe im kortikalen Modell gegenüber dem Kleber überwiegend im Sinne einer Kontaktosteogenese reagiert. Daneben kann selten eine Distanzosteogenese beobachtet werden, wie sie im spongiösen Modell vorherrscht. Warum der Knochenkleber im kortikalen Modell phagozytiert und degradiert wird und im spongiösen Modell nicht, konnte durch die vorliegenden Untersuchungen nicht geklärt werden. Möglicherweise liegt es an der kortikalen Knochenstruktur, die sich von der spongiösen Knochenstruktur deutlich unterscheidet. Die Substantia spongiosa besteht aus einem schwammartigen Netzwerk aus feinen Bälkchen, deren Hohlräume mit Knochenmark ausgefüllt sind. Die Substantia corticalis erscheint dagegen als dichte Masse ohne sichtbare Zwischenräume [18]. Eventuell ist das spongiöse Lager gegenüber körperfremden Materialien sensibler und reagiert dadurch mit einer Distanzosteogenese. Es könnte aber auch mit der Menge des im Osteotomiespalt applizierten Knochenklebers in Verbindung gebracht werden. Im kortikalen Modell beobachtet man insgesamt weniger Knochenkleber im Osteotomiespalt als im spongiösem Defektmodell. Interessanter Weise konnte der Knochen bei weniger Kleber im Osteosynthespalt diesen in den "kleberfreien" Arealen mühelos überbrücken. An den Arealen mit Knochenkleber kommt es zu keiner Überbrückung. Daher müsste ein netz- oder schwammartiger (poröser) Knochenkleber entwickelt werden, der neugebildeten Knochen durch kleine Zwischenräume wachsen ließe und somit nicht, wie der hier vorgestellte Knochenkleber, als Barriere fungiert. Auch müsste seine Resorptionsfähigkeit im spongiösen Lager verbessert werden, dass er so lang wie nötig und so kurz wie möglich den Defektspace ausfüllt, damit nicht die oben bereits genannten Probleme auftreten.

Insgesamt zeigte die Applikation des neuartigen Knochenklebers im kortikalen Bereich deutlich bessere Ergebnisse als die Anwendung im spongiösen Lager. Der Grund für die unterschiedliche Reaktion des Knochens auf die Applikation des Knochenklebers im spongiösen Defektmodell, bei dem der Knochenkleber nicht resorbiert wird, und im kortikalen Defektmodell, bei dem offensichtlich eine frühzeitige Resorption und Degradation des Knochenklebers stattfindet, kann mit Hilfe dieser experimentellen Untersuchung nicht geklärt werden.

5 Zusammenfassung

Das Ziel der vorliegenden tierexperimentellen Arbeit war einen neuentwickelten Knochenkleber in einem standardisierten spongiösen Bohrlochdefekt- und in einem kortikalen Osteotomiemodell am Schaf auf dessen Biokompatibilität zu prüfen. Zur Analyse der Frakturheilung, der knöchernen Integration und der Biokompatibilität des Klebers wurden die radiologischen Untersuchungen durch histologische und transmissionselektronenmikroskopische ergänzt.

Der Knochenkleber basiert auf einer Alkylen-bis(oligolactoyl)methacrylat-Verbindung. Aus dem Monomer Ethylenglycol-oligolactid-dimethacrylat (ELAMA) entsteht der Kleber durch Polymerisation zu hochverzweigten hydrolysierbaren Netzwerken. Bei insgesamt 48 Schafen wurden ein Bohrlochdefekt am Olecranon und ein Osteotomiesegment an der Ulna gesetzt. Anschließend wurden Knochenzylinder und Knochensegment mit oder ohne Kleber refixiert. Beim Bohrlochdefektmodell wurden die Tiere in 4 Gruppen unterteilt (Kontrolle, Kleber, Leerdefekt, Defekt mit Kleber); beim Osteotomiemodell wurden die Tiere in 2 Gruppen eingeteilt (Kontrolle, Kleber). Die Tiere wurden über einen Zeitraum von 21, 42 und 84 Tagen nachbeobachtet.

Im spongiösen Defektmodell ist der Knochenkleber als biotolerant zu bezeichnen. Er stellt eine Barriere für die Knochenneubildung dar und wird bindegewebig eingeschleitet. Es entsteht eine Distanzosteogenese.

Die Osteointegration ist nur in den kleberfreien Bereichen des Osteotomiespaltess erkennbar. An den mit Knochenkleber ausgefüllten Arealen des Osteotomiespaltess kommt es zu keiner Zellmigration (Osteoblasten) in den Osteotomiespalt.

Im spongiösen Modell erscheinen die Osteotomieränder (Interfaceregion) in den mit Kleber ausgefüllten Spaltarealen glatt. An den kleberfreien Stellen sind die Osteotomieränder durch Knocheneinsprossung unregelmäßig aufgeworfen.

Es lassen sich weder Degradation noch Abbauvorgänge am Knochenkleber beobachten. Die mehrkernigen Riesenzellen produzieren eine der Glykokalix von Endothelzellen ähnliche Substanz als Schutzschicht gegenüber dem Knochenkleber und kapseln damit den Knochenkleber von dem umliegenden Knochengewebe ab. Es wird keine Verminderung der Kleberdichte im Osteotomiespalt beobachtet.

Im kortikalen Osteotomiemodell ist der Knochenkleber eher als bioinert zu bezeichnen. Bei einem direkten Kontakt zwischen dem Knochen und dem Knochenkleber kommt es zu keiner Reaktion. Es entsteht eine Kontaktosteogenese. Daneben wird auch die Distanzosteogenese, wie im spongiösen Modell, beobachtet. Daher kann man dem Kleber im kortikalen Bereich eine Mischung aus biotoleranten und bioinerten Eigenschaften zuschreiben.

Es scheint eine intakte Osteointegration an den Osteotomiearealen, die mit Kleberkonglomeraten ausgefüllt sind, zu bestehen. Im Osteotomiespalt kommt es zu einer Zellmigration von Osteoblasten, die vitalen Knochen produzieren, der direkt in Kontakt zu den Kleberkonglomeraten steht.

Im kortikalen Modell sind die Interfaceregionen durch eine gleichmäßige Knocheneinsprossung nicht plan. Der Knochenkleber wird durch mehrkernige Riesenzellen abgebaut.

In beiden Osteotomiemodellen lassen sich Resorptionszonen am Knochen erkennen. Dabei können keine Unterschiede zwischen der Kleber- und der Kontrollgruppe festgestellt werden. Eine vollständige Wiederherstellung der Knochenstruktur ist in beiden Osteotomiemodellen nach 84 Tagen nicht erreicht und die Osteogenese noch nicht abgeschlossen.

In beiden Osteotomiemodellen zeigen sich weder akute noch chronische Entzündungsreaktionen oder Zelltoxizitäten. Die vorhandenen Makrophagen und mehrkernigen Riesenzellen deuten auf eine benigne Fremdkörperreaktion hin, welche im kortikalen Osteotomiemodell von einem Kleberabbau gefolgt wird.

Durch die vorliegende experimentelle Untersuchung konnte kein konkretes Einsatzgebiet herausgearbeitet werden. Die guten Ergebnisse im kortikalen Bereich lassen eine Anwendung bei kleinen kortikalen Fragmenten in Betracht kommen. Die negativen Ergebnisse im spongiösen Bereich raten von einer Anwendung des Knochenklebers ab. Bei dem derzeitigen Stand der Erkenntnisse ist eine humane Anwendung abzulehnen. So bleiben die unter 1.4 beschriebenen Einsatzgebiete weiterhin erstrebenswert, jedoch zum jetzigen Zeitpunkt noch nicht realisierbar.

6 Summary

The aim of this experimental study was to investigate a new form of bone adhesive in a standardized spongy cylinder hole and in a cortical osteotomy model in sheep. The fracture healing after glue application, the resorption and the bone integration of the glue was analysed by histological and radiological examinations.

The new bone glue is based on alkylen-bis(oligolactoyl)methacrylates. From the monomer ethyleneglycol-oligolactid-dimethacrylat (ELAMA) arise the glue by polymerizing into high branched, hydrolysable networks. 48 sheep were operated by drilling a hole in the olecranon and by placing an artificial fracture in the ulna. The bone cylinder/ fragment were refixed with or without bone glue. At the cylinder hole model the animals were separated into 4 groups (control, glue, vacuum defect, hole filled with glue); at the osteotomy model the animals were divided into two groups (control, glue). The animals were observed over a period of 21, 42 and 84 days.

The analysis of the spongy cylinder hole model showed that the osteogenesis of the fracture gap in the control group left behind the group with bone glue at every investigation moment. The control group proved that the fracture gap can be bridged by new bone formation after 21 days, if the gap fracture is not broader than 1 mm. At the spongy model any resorptions or decompositions of the bone glue were not found. Multinucleated giant cells secrete a layer at the interface to the bone glue, which seem to be like the glykokalyx. Consequently the bone glue was enclosed with connective tissue.

In the cortical osteotomy model the bone glue was in direct contact with new bone trabeculas. Multinucleated giant cells were found, which were in contact to the bone glue. These giant cells showed intracellular vesicles, which were like the bone glue with regards to morphology and structure.

Altogether the application of the bone glue showed better results in the cortical model than in the spongy model. In the spongy model not occurs any resorption, while in the cortical model resorptions and degradations of the bone glue early take place. The reason of this different reaction to the application of the bone glue could not be solved and therefore remain open for further investigations and speculations.

7 Literaturverzeichnis

1. Adler CP.
Diagnostik makroskopischer, histologischer Knochenkrankheiten und radiologischer Strukturveränderungen des Skeletts.
Springer. 1998; 6-25.
2. Axhausen G, Bergmann E.
Die Ernährungsunterbrechungen am Knochen.
In: Lubarsch O, Henke F, Rössle R, (Hrsg) Handbuch der speziellen pathologischen Anatomie und Histologie. Bd. 9, III. Knochen und Gelenke.
Springer, Berlin.1937.
3. Benninghof, Drenckhahn.
Anatomie: Bd.1. Makroskopische Anatomie, Histologie, Embryologie, Zellbiologie.
Urban& Fischer Verlag, München Jena. 2003; 145-159.
4. Berndt H-O, Rimpler M, Adhäsion.1991; 35, 23-27.
5. Bloch B.
Bonding of Fractures by Plastic Adhesives.
J. Bone Jt.Surg. 1958; 40, 804-812.
6. Bucher O, Wartenberg H.
Cytologie, Histologie und mikroskopische Anatomie des Menschen.
Verlag Hans Huber. 1997; 12-18.
7. Buchner H.
Erfahrungen mit Polyurethanschaum(Ostamer) bei der Behandlung von Knochenbrüchen.
Klin. Med, Wien. 1961; 16, 264-288.
8. Charnley J
Surgery of the hip joint,
Brit. medJ. 1960; 1,821.
9. Charnley J.
The healing of human fractures in contact with self-curing acrylic cement.
Clin. Orthop. 1966; 47, 157.
10. Coover HW, Joyner FB, Shearer NH, Wicker TH.
Chemistry and performance of cyanoacrylate adhesives.
Soc. Plastics Engrs. J. 1959; 15, 413.
11. Donath K.
Die Trenn-Dünnschliff-Technik zur Herstellung histologischer Präparate von nicht schneidbaren Geweben und Materialien.
Exakt-Kulzer-Druckschrift, Norderstadt. 1989.
12. Draenert K, Draenert Y.
Ein neues Verfahren für die Knochenbiopsie und die Knorpel-Knochen-Transplantation.
Sandorama. 1987; 2: 31-38.
13. Enis JE, McCollough NC, Cooper JS.
Effects of methylmethacrylate in osteosynthesis.
Clin. Orthop. 1974; 105, 283.

14. Ennker J.
Gewebelebstoffe in der Thorax- und Kardiovaskularchirurgie.
Steinkopff Verlag, Darmstadt. 1994.
15. Fawcett DW.
A textbook of histology, Bloom and Fawcett.
Chapman&Hall. 1986; 194-229.
16. Frankenburg EP, Goldstein SA, Arbor A, Bauer TW, Harris SA, Poser RD.
Biomechanical and histological evaluation of a calcium phosphate cement.
J Bone Surg. 1998; 80-A: 1112- 1124.
17. Fujimoto E, Ochi M, Kato Y, Mochizuki Y, Sumen Y, Ikuta Y.
Beneficial effect of basic fibroblast growth factor on the repair of full-thickness defects in rabbit articular cartilage.
Arch Orthop Trauma Surg. 1999; 119: 139- 145.
18. Geneser F.
Histologie von F. Geneser, dtsh Ausgabe bearb W.Schwerdtfeger.
Deutscher Ärzte-Verlag Köln GmbH. 1990; 216-237.
19. Giebel G, Rimpler M.
Klebungen am Skelettsystem: Klebstoffe, 50 Jahre Hilfsstoffe für den Chirurgen Teil 1.
Biomed.Techn. 1981; 26, 35-40.
20. Golovin GV.
Frakturfixierung mit Kunststoff.
Vestn. Khir. Grekov. 1956; 77, 125.
21. Golovin GV.
Klinische Anwendung von „Osteoplast“ zur Frakturfixierung.
Vestn. Khir. Grekov. 1959; 83, 45.
22. Günther KP, Scharf HP, Pesch HJ, Puhl W.
Einwachsverhalten von Knochenersatzstoffe.
Orthopäde. 1998; 27:105-117.
23. Harris WJ, White RE, McCarthy JC, Walker PS, Weinberg EH.
Bony ingrowth fixation of the acetabular component in canine hip joint arthroplasty.
Clin Orthop. 1983; 176: 7-11.
24. Heiss C, Hahn N, Pokinskyj P, Wenisch S, Stahl JP, Meyer C, Schnettler R,
Eigenschaften und Degradation eines neuartigen bioresorbierbaren Knochenklebers - Properties and Degradation of a New Bioresorbable Bone Glue.
Biomed Technik. 2004, 49 (6): 163-169.
25. Hench L L, Wilson J.
Surface-active biomaterials.
Science. 1984; 226: 630-636.
26. Hendri A.
Ein neues Prinzip der Osteosynthese.
Arch. Klein. Chir. 1931; 167, 145-146.
27. Horas U, Schnettler R.
Knorpeldefekte am Kniegelenk und autogene osteochondrale Zylindertransplantation.
Operat Orthop Traumatol 2002, 3.

28. Hoyt W.
Diskussionsbeitrag.
J.Bone Jt. Surgt. 1969; 42-A(5),878.
29. Hullinger L.
Untersuchungen über die Wirkung von Kunstharzen („Palacos“ und „Ostamer“) in Gewebekulturen.
Arch.orthop.Unfall-Chir. 1962; 54, 504-512.
30. James J, Seijn-Myagkaya GL.
Death of osteocytes. Electron microscopy after in vitro ischaemia.
J Bone Joint Surg [Br]. 1986; 68: 620-624.
31. Johner R.
Zur Knochenheilung in Abhängigkeit von der Defektgröße.
Helv Chir Acta. 1972; 39: 409-411.
32. Junqueira LC, Carneiro J.
übersetzt, überarbeitet und ergänzt von Schiebler TH.
Knochen und Knochenverbindungen in Histologie: Zytologie, Histologie und mikroskopische Anatomie des Menschen unter Berücksichtigung der Histophysiologie.
Sprinter. 1996; 190-217.
33. Kamen P.
Attachment of human oral fibroblasts to a granular polymeric implant for hard tissue replacement.
Journal of oral Implantology. 1989; (15) 1: 583-591.
34. Kawahara H.
Biological requirements for biomaterials.
Implantologist. 1985; 3 (2), 41-49.
35. Klawitter JJ, Bagwell JG, Weinstein AM, Sauer BW, Pruitt JR.
An evaluation of bone growth into porous high density polyethylene.
J Biomes Mater Res. 1976; 10: 311.
36. König HE, Liebich HG.
Anatomie der Haussäugetiere: Lehrbuch und Farbatlas für Studium und Praxis, Band I Bewegungsapparat.
Schattauer, Stuttgart. 1999; 140-143.
37. Krstić RV.
Die Gewebe des Menschen und der Säugetiere: ein Atlas zum Studium für Mediziner u. Biologen.
Springer, Heidelberg. 1988.
38. Kühn K-D.
Knochenzemente für die Endoprothetik.
Springer-Verlag, Berlin. 2001; 157 ff.
39. Lippuner K, Vogel R, Tepic S, Rahn B A, Cordey J, Perren S M.
Effect of animal species and age on plate-induced vascular damage in cortical bone.
Arch Orthop Traumatic Surg III. 1992; 78-84.
40. Lissner J, Fink U.
Radiologie I. Enke, Stuttgart. 1992; 95-96.

41. Lomb M.
Die humane Knochenmarkszellkultur-ein sensitives Modell zur Bio-kompatibilitätstestung von Implantatmaterialien. Verlag Görlich&Weiershäuser GmbH, Marburg. 1999; Band 466.
42. Mandelkow HK, Hallfeldt KKJ, Kessler SB, Gayk M, Siebeck M, Schweiberer L.
Knochenneubildung nach Implantation verschiedener Hydroxylapatitkeramiken.
Unfallchirurg. 1990; 93: 376-379.
43. Mankin HJ, Dorfman H, Lippiello L, Zarins A.
Biochemical and metabolic abnormalities in articular cartilage from osteo-arthritic human hips.
J Bone Joint Surg. 1971; 53-A: 523- 537.
44. Nickel R, Schummer A, Seiferle E.
Knochenlehre, Osteologia, Lehrbuch der Anatomie der Haustiere, Band I Bewegungsapparat.
Hrsg.: Frewein. Parey, Berlin. 2001; 74.
45. O`Driscoll SW, Keeley FW, Salter RB.
Durability of regenerated articular cartilage produced by free autogenous periosteal grafts in major full- thickness defects in joint surfaces under influence of continuous passive motion.
J Bone Joint Surg. 1988; 70-A: 595-606.
46. Osborn JF.
Implantwerkstoff Hydroxylapatit- Grundlagen und klinische Anwendung.
Quintessenz-Verlag. 1985; 127-140.
47. Pineda S, Pollack A, Stevenson S, Goldberg V, Caplan A.
A semiquantitative scale for histologic grading of articular cartilage repair.
Acta Anat. 1992; 143: 335- 340.
48. Poljakov VA.
Resultate und Ausblicke der Anwendung des Ultraschallverfahrens in der Traumatologie.
Unfallmedizinische Tagung der Landesverbände der gewerblichen Berufsgenossenschaften. 1972; 16, 85-91.
49. Rietz KA.
Polymer Osteosynthesis.
Acta Chir. Scand. 1964; 128, 349-401.
50. Rimpler M.
In: Swissbonding 94, 8. Internationales Symposium „Leistungsfähigkeit der modernen Klebtechnik“, Rapperswil Tagungsband 1994, 161-175.
51. Schenk R K.
Zur Problematik der Knochenersatzstoffe: Histophysiologie des Knochenumbaus und der Substitution von Knochenersatzstoffen.
Unfallheilkunde. 1991; 216: 23-35.
52. Schenk R, Willenegger H.
Histologie der primären Knochenheilung.
Langenbecks Arch Chir. 1964; 308: 440-452.

53. Schenk R, Willenegger H.
Zur Histologie der primären Knochenheilung. Modifikation und Grenzen der Spaltheilung in Abhängigkeit von der Defektgröße.
Unfallheilkunde. 1977; 80: 155-160.
54. Schnettler R, Dingeldein E.
Untersuchungen zur knöchernen Integration einer Hydroxylapatitkeramik (HAK) (Endobon) und bFGF im Vergleich zu autogenen Spongiosazylindern. Knochenersatzmaterialien und Wachstumsfaktoren. In: Schnettler R, Markgraf E. Georg Thieme Verlag. 1997; 31-42.
55. Siebert CH, Miltner O, Schneider U, Wahner T, Koch S, Niedhart C.
Einheilungsverhalten von osteochondralen Transplantaten-
Tierexperimentelle Untersuchungen an einem Schafmodell.
Z Orthop. 2001; 139: 382- 386.
56. Simmons DJ.
Comparative physiology of bone.
In: The biochemistry and physiology of bone, Bourne G H (Hrsg.) Academic Press, London. 1976; 445-516.
57. Stürmer KM.
Pathophysiologie der gestörten Knochenheilung.
Orthopäde. 1996; 25: 386-393.
58. Stützle H, Hallfeldt K, Keßler S, Schweiberer L.
Experimentelle und klinische Ergebnisse mit teildemineralisierter Knochenmatrix.
Knochenersatzmaterialien und Wachstumsfaktoren. In: Schnettler R, Markgraf Eberhard (Hrsg.) Georg Thieme Verlag Stuttgart. 1997; 85-89.
59. Thomas C.
Histopathologie, Lehrbuch u. Atlas zur allgemeinen u. speziellen Pathologie, Schattauer Stuttgart, New York. 2001; 367-68.
60. Tkachenko SS, Rutski VV.
Osteosynthesis with synthetic methylmethacrylate and cyanoacrylate adhesives (A review of the domestic and foreign literature).
Vestn.Khir. 1969; 103, 135.
61. Ulreich JB, Chvapil M.
A quantitative microassay for in vitro toxicity testing of biomaterials.
Biomed Mat Res. 1981; 913-922.
62. Von Recum A, Opitz H, Wu E.
Collagen types I und III at the implant/tissue interface.
J Biomed mater Res. 1993; 27: 757.
63. Weber SC, Chapman MW.
Adhesives in Orthopaedic Surgery: A Review of the Literatur and In Vitro Bonding Strengths of Bone-bonding Agents.
Clin. Orthop.and Rel Research. 1984: 191, 249-261.
64. Wenz R, Nies B.
DE 196 46 782, 1996.
65. Wenz R.
First results with a bioresorbable bone glue.
Biomaterials in Surgery.edited by GHIM Walenkamp.
Thieme Verlag, Stuttgart. 1998.

-
66. Williams DF.
Consensus and definitions in biomaterials Implant Materials in Biofunction,
de Putter C, de Lange GL, de Groot K and Lee AJC Advances in
Biomaterials.
Elsevier Science Publishers BV. 1988; 8: 11-16.
67. Wippermann BW.
Der Einfluß von „Fibroblast Growth Factor“ und autologen Knochenmark auf
die Einheilung einer Hydroxylapatit–Keramik in einen diaphysären
Segmentdefekt.
Habilitationsschrift, Med. Hochschule Hannover. 1993.
68. Wissing H, Stürmer KM, Breidenstein G.
Die Wertigkeit verschiedener Versuchstierspecies für experimentelle
Untersuchungen am Knochen.
Probst J (Hrsg) Hefte Unfallheilkd. 1990; 212: 479-488.
69. Zachariasiewicz I.
Repair of surgically produced defects in articular cartilage by means of grafts
fixed by tissue adhesives.
Pol.Tyg. LEk. 1975; 30, 1843.
70. Zingg W.
Zur Frakturbehandlung mit Knochenleim.
Schweiz. Med. WSchr. 1969; 36, 1016-1017.
71. Zollinger HU.
Experimentelle Erzeugung maligner Nierenkapseltumoren bei der Ratte
durch Druckreiz (Plastic-Kapseln).
Schweiz. Z. allg. Path. 1952; 15, 666.

8 Erklärung

Ich erkläre:

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

9 Danksagung

Herrn Prof. Dr. Dr. R. Schnettler danke ich für die Überlassung des Themas und für die Förderung meiner Promotion.

Ein großer Dank geht an Herrn Priv.- Doz. Dr. C. Heiß, der mir durch seine intensive Betreuung und seine Beratung bei der Planung, Durchführung und Interpretation dieser Arbeit sehr geholfen hat.

Frau Priv.- Doz. Dr. S. Wenisch danke ich für die Interpretation der laborchemischen Untersuchungen.

Bei Frau A. Hild bedanke ich mich für die freundliche Unterstützung, die zahlreichen Anregungen und die Hilfe im Labor.

Frau M. Cassens danke ich ganz besonders für ihre Betreuung und große Hilfsbereitschaft im Labor und den gerne von mir benutzten komfortablen Fahrservice.

Ein weiterer Dank gilt der Firma BIOMET Deutschland GmbH für die gute Zusammenarbeit.

Von Herzen danke ich Herrn N. Hahn, der mir bei der Literaturbeschaffung und mit wertvollen Tipps zur Seite stand.

Ich bedanke mich bei meiner Schwester Frau Dr. B. Schraven, die sich als Co-Leserin durch die Arbeit gebissen hat.

Ich bedanke mich ganz herzlich bei meinen Eltern, Frau A. Schraven und Herrn Dr. G. Schraven, dass sie mich immer wieder zum Weitermachen ermutigt haben und fest hinter mir stehen.

Zum Schluss bedanke ich mich bei allen, die sich als „Retter in der Not“ angesprochen fühlen und mich mit viel Geduld durch Höhen und Tiefen begleitet haben.

10 Lebenslauf

Name: Janna Irina Daniela Schraven

Geburtsdatum: 10. März 1978

Geburtsort: Köln

Schulbildung: 1984-1988 Katholische Grundschule Eichelstraße in Bensberg
1988-1994 Albertus-Magnus-Gymnasium in Bensberg
1994-1995 Auslandsjahr in dem Internat Gordenstoun, Elgin, Schottland
1995-1997 Albertus-Magnus-Gymnasium in Bensberg
4. Juni 1997 Abitur

Studium: 1997-2005 Studium der Humanmedizin an der Justus-Liebig-Universität in Gießen
10.2000-07.2001 Auslandjahr mit Erasmus/Sokrates an der medizinischen Fakultät in Granada, Spanien
SS 2003 Promotionssemester
Ärztliche Vorprüfung: 16. September 1999
1. Staatsexamen: 20. September 2000
2. Staatsexamen: 16. April 2004
3. Staatsexamen: 3. Mai 2005

Seit September 2005 Assistenzärztin für Innere Medizin im Regionalspital Wattwil, Spitalregion Fürstenland-Toggenburg, St. Gallen, Schweiz