

Inaugural-Dissertation zur Erlangung der Doktorwürde
der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität

München

**Zunehmende Dehnung durch axiale Kompression
steigert die intramembranöse Knochenbildung
nach Kallusdistraktion**

von Julian Benedikt Schülke

aus Tübingen

München 2017

Aus dem Veterinärwissenschaftlichen Department
der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Lehrstuhl für Molekulare Tierzucht und Biotechnologie

Arbeit angefertigt unter der Leitung von Univ.-Prof. Dr. Eckhard Wolf

Angefertigt am
Institut für Unfallchirurgische Forschung und Biomechanik
der Universität Ulm

Mentor: Univ.-Prof. Dr. Anita Ignatius

Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians Universität München

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Reinhard K, Straubinger, PhD

Berichterstatter: Univ.-Prof. Dr. Eckhard Wolf

Korreferent/en: Priv.-Doz. Dr. Nadja Herbach

Tag der Promotion: 29.07.2017

Das Leben besteht in der Bewegung
und hat sein Wesen in ihr.

Arthur Schopenhauer

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	1
1.1	Einführung.....	1
1.2	Frakturheilung	2
1.2.1	Intramembranöse und chondrale Ossifikation.....	2
1.2.2	Primäre und sekundäre Frakturheilung.....	4
1.2.3	Zeitlicher Ablauf der Frakturheilung.....	6
1.3	Mechanobiologie im intakten Knochen	7
1.4	Mechanobiologie in der Frakturheilung.....	12
1.4.1	Interfragmentäre Bewegung und Dehnung.....	12
1.4.2	Distraktionsosteogenese	15
1.4.3	Interfragmentäre Bewegung ohne externe Stimulation	19
1.4.4	Interfragmentäre Bewegung durch externe Stimulation	22
1.5	Studienziel	23
2	Material und Methoden	25
2.1	Tierversuch	25
2.1.1	Schafe.....	26
2.1.2	Haltung und Fütterung.....	26
2.1.3	Studiendesign	27
2.1.4	Fixationskonstruktion.....	27
2.1.5	Prä-operative Vorbereitung	30
2.1.6	Operation	31
2.1.7	Post-operative Nachsorge	35
2.1.8	Distraktion und zyklische Kompression	35
2.1.9	Fluoreszenzfarbstoffinjektion.....	39
2.1.10	Tötung	40
2.2	Probenaufbereitung.....	40
2.2.1	Röntgen	41
2.2.2	Mikro-Computertomographie (μCT).....	42

2.2.3	Histologie	43
2.2.4	Fluoreszenzhistologie.....	47
2.2.5	Immunhistochemie	48
2.3	Statistik	50
3	Ergebnisse	51
3.1	Tierversuch	51
3.1.1	Operation und Nachsorge	51
3.1.2	Distraction und zyklische Kompression	51
3.2	Probenaufbereitung.....	52
3.2.1	Röntgen	53
3.2.2	Mikro-Computertomographie (μ CT).....	57
3.2.3	Histologie	66
3.2.4	Fluoreszenzhistologie.....	75
3.2.5	Immunhistochemie	76
4	Diskussion	79
4.1	Diskussion des Tiermodells.....	79
4.1.1	Schafe.....	79
4.1.2	Fixationskonstruktion.....	81
4.1.3	Probenaufbereitung.....	82
4.2	Diskussion der Ergebnisse	82
4.3	Limitationen.....	90
4.4	Schlussfolgerung.....	91
4.5	Ausblick.....	92
5	Zusammenfassung	94
6	Summary	96
7	Abbildungsverzeichnis	98
8	Tabellenverzeichnis	102
9	Literaturverzeichnis.....	103
	Danksagung	119

Abkürzungsverzeichnis

#	Nummer
Ø	Durchmesser
°C	Grad Celsius
ε	Dehnung
µA	Mikroampere
µCT	Mikro-Computertomograph
µm	Mikrometer
Abb.	Abbildung
ca.	circa
Ca	Calcium
Ca ₅ [OH](PO ₄) ₃	Strukturformel für Hydroxylapatit
cm	Zentimeter
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ERK	<i>engl.</i> Extracellular-signal regulated kinase
g	Gramm
H ₂ O ₂	Strukturformel für Wasserstoffperoxid
Hz	Hertz
IgG	Immunglobulin Gamma
kg	Kilogramm
kV	Kilovolt
m	Meter
MAPK	<i>engl.</i> Mitogen activated protein kinase
Max	Maximum
mg	Milligramm
min	Minuten
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mM	Millimol
MPa	Megapascal
mRNA	<i>engl.</i> Messenger ribonucleic acid
ms	Millisekunden
n	Anzahl
N	Newton
Nr.	Nummer
NaCl	Natrium-Chlorid
OP	Operation
p	Signifikanzniveau
pH	Maßeinheit für den Säure-/Basengehalt
PYK2	<i>engl.</i> Protein tyrosine kinase 2
SD	<i>engl.</i> Standard deviation
sec	Sekunden
T	Tage
TBS	<i>engl.</i> Tris-buffer saline
TTBS	<i>engl.</i> TBS und 0,1% Triton X-100
Wnt	<i>engl.</i> Wingless-type und Int-1-gene

1 Einleitung

1.1 Einführung

Knochenfrakturen zählen zu den häufigsten Verletzungen des Menschen. Jeder Zweite erleidet bis zum Alter von 65 Jahren eine traumatische Fraktur (Brinker and O'Connor 2004). Im Jahr 2013 traten in Deutschland ca. 840 000 Frakturen auf (Statistisches Bundesamt 2015). Von etwa 5,4 Millionen nicht tödlich Unfallverletzten in Deutschland im Jahr 2010 war jeder Fünfte Erwachsene von einer Fraktur betroffen (Gesundheitsberichterstattung des Bundes 2010).

Volkswirtschaftlich sind Ausfälle durch Frakturen von immenser Bedeutung durch z.T. erhebliche berufliche Einschränkungen der Betroffenen und lange Heilungszeiten. Allein die Kosten osteoporotisch bedingter Frakturen werden in Europa auf 32 Milliarden Euro pro Jahr geschätzt. Für die Vereinigten Staaten geht man von 20 Milliarden US-Dollar aus (International Osteoporosis Foundation). Burge und Kollegen prognostizieren in ihrer Studie für die Vereinigten Staaten im Jahr 2025 eine Frakturinzidenz von mehr als drei Millionen Fällen in der Population der über 50-jährigen und rechnen mit Kosten von über 25 Milliarden US-Dollar (Burge, Dawson-Hughes et al. 2007).

Trotz aller Fortschritte bei der Frakturversorgung in der modernen Medizin kommt es immer noch bei ca. 5-10 % der Patienten zu einer gestörten oder ausbleibenden Knochenheilung (Gaston and Simpson 2007, Einhorn and Gerstenfeld 2015). Von einer verzögerten Heilung spricht man, je nach Frakturtyp, bei einer Heilungsdauer von mehr als drei und bis zu sechs Monaten. Rüter und Mayr definierten eine *non-union* als einen Mangel an röntgenologischen Beweisen für eine Überbrückung sechs Monate nach Fraktur (Rüter and Mayr 1999).

Die Ätiologie von Pseudoarthrosen kann biologisch, infektiös oder mechanisch sein (Grechenig, Pfeifer et al. 2015). Die Blutversorgung im Frakturgebiet ist von entscheidender Bedeutung, da mit Zustrom und Abfluss für die Regeneration essentielle humorale Faktoren und Zellen angeliefert bzw. abgestorbenes Gewebe, Zelldebris und Metaboliten abtransportiert werden (Saran, Gemini Piperni et al. 2014). Eine Beeinträchtigung der Durchblutung führt zu avitalen bzw. atrophen Pseudoarthrosen. Neben einer kompromittierten Durchblutung sind offene Frakturen, eine lange Operationsdauer und eine unzureichende Immunkompetenz Gründe für infektiös bedingte Pseudoarthrosen (Grechenig, Pfeifer et al. 2015). In den vergangenen Jahren hat sich gezeigt, dass auch (chronisch) entzündliche Erkrankungen großen Einfluss auf die Regenerationsfähigkeit des Knochens nehmen. Eine verzögerte Heilung von Frakturen wurde bei schweren Allgemeinerkrankungen, wie Diabetes mellitus (Loder 1988) und rheumatoider Arthritis

(Stromqvist 1984) oder nach Polytrauma (Bhandari, Tornetta et al. 2003) beschrieben. Die mechanisch bedingte verzögerte Frakturheilung ist gekennzeichnet durch eine vermehrte Mobilität der Frakturfragmente aufgrund unzureichender Immobilisation, übermäßiger Belastung oder instabiler Osteosynthese und kann zur Entwicklung hypertropher Pseudoarthrosen führen (Ruter and Mayr 1999).

Als Teil chirurgischer Interventionen bei Heilungsverzögerungen hat die Distraktionsosteogenese ihren festen Platz in Orthopädie und Unfallchirurgie. Darüber hinaus findet sie auch bei kongenitalen Skelettalerkrankungen Anwendung. Komplikationen im Verlauf der Prozedur sind jedoch nicht selten. Die Herausforderung für Chirurgen und Wissenschaftler besteht darin, die Rate ausbleibender Heilung nach Fraktur und Distraktionsosteogenese weiter zu senken, die Heilungsdauer zu verkürzen, auf begleitende Risikofaktoren zu reagieren und diese zu minimieren. Die Schaffung geeigneter biomechanischer Bedingungen ist von herausragender Bedeutung für den Heilungsverlauf.

Ein besseres Verständnis mechanisch vorteilhafter Bedingungen könnte die Geometrie und Materialauswahl von Fixationssystemen entscheidend verbessern und die Zahl mechanisch bedingter Heilungsverzögerungen reduzieren. Die Erforschung der Grundlagen mechanischer Einflüsse auf die Knochenheilung zur Optimierung der Biomechanik in der Frakturheilung und Distraktionsosteogenese war das übergeordnete Ziel dieser Studie und ist Bestandteil der nachfolgenden Ausführungen.

1.2 Frakturheilung

Knochen haben im Vergleich zu anderen Organen eine hohe Regenerationsfähigkeit (McKibbin 1978, Kenwright and Goodship 1989). Für das Verständnis der Frakturheilung ist es sinnvoll, die grundlegenden Gesetzmäßigkeiten in der Ontogenese des Knochens und Skeletts zu kennen.

Man unterscheidet zwei Arten der Knochenbildung: i) Die intramembranöse oder desmale und ii) die chondrale Ossifikation. Beide Arten können neben den Abläufen in der (embryonalen) Morphogenese auch bei der Frakturheilung gefunden werden (Tuan 2004, Einhorn 2005).

1.2.1 Intramembranöse und chondrale Ossifikation

Die intramembranöse Ossifikation (Abb. 1.1 links) tritt embryonal bei der Bildung platter Knochen, wie beispielsweise den Schädelknochen, auf und ist Bestandteil sowohl primärer als sekundärer Frakturheilung. Sie ist gekennzeichnet durch Knochenbildung aus dem Kondensat mesenchymaler Stammzellen. Im Gegensatz zur chondralen Ossifikation erfolgt die Entwicklung von Knochenzellen direkt aus mesenchymalen Stammzellen (Percival and

Richtsmeier 2013). Aus mesenchymalen Stammzellen hervorgehende Osteoprogenitorzellen differenzieren über mehrere Stufen zu Osteoblasten aus. Sie scheiden kollagene Fasern und eine organische Matrix aus Mukoproteinen ab, das sogenannte Osteoid, woran sich weitere Osteoblasten anlagern (Iseki, Wilkie et al. 1997). Im Zuge der andauernden Produktion von Osteoid lösen sich die Osteoblastenverbände auf. Die verbleibenden Einzelzellen werden Osteozyten genannt. Die entstehenden Knochenzapfen verbinden sich und bilden Geflechtknochen aus (Kanczler and Oreffo 2008). Die Mineralisierung des kollagenen Gerüsts schreitet bereits voran, während die Proliferation der Stammzellen und die Expansion früher Osteoblasten noch anhält (Lana-Elola, Rice et al. 2007). Gefäßeinsprossungen in das lose mesenchymale Gewebe wurden zeitlich direkt vor der initialen Ossifikation beobachtet. Frühe Mineralisierungszonen im Knochen werden mit einer ausgeprägten Vaskularisierung assoziiert (Thompson, Owens et al. 1989).

Die chondrale Ossifikation (Abb. 1.1 rechts) verläuft über die Ausbildung eines knorpeligen Gerüsts. Man findet sie ontogenetisch bei der Entwicklung langer Röhrenknochen und im Heilungsverlauf der meisten Frakturen (Tuan 2004, Einhorn 2005). Nach einem Knochenbruch lagern sich aus Stammzellen entstehende Knorpelvorläuferzellen (Chondroblasten) im Frakturspalt ab. Die Zellen entwickeln sich im Zuge ihrer Differenzierung zu Chondrozyten und exprimieren Kollagen Typ II und später Proteoglykane, welche die Knorpelmatrix bilden. Sie hypertrophieren und bilden mikroskopisch sichtbare blasige Schollen, sobald sie das Stadium eines hypertrophen Chondrozyten erreicht haben. Die hypertrophen Chondrozyten scheiden Calcium ab und während Proteasen und Phosphatasen die organische Matrix abbauen, erfolgt die allmähliche Mineralisierung des Knorpels (Einhorn 2005). Die Degradation der chondralen Matrix erfolgt durch Matrixmetalloproteinasen (MMP). Es wurde gezeigt, dass MMP-9- und MMP-13-defiziente Mäuse eine vergrößerte Zone mit hypertrophen Chondrozyten und ein langsamere Frakturheilung infolge eines verzögerten Knorpelabbaus aufweisen (Vu, Shipley et al. 1998, Colnot, Thompson et al. 2003, Stickens, Behonick et al. 2004, Kosaki, Takaishi et al. 2007). In das durch mineralisierten Knorpel stabilisierte Gewebe können Gefäße sprießen und von perivaskulär wandern osteogene Zellen ein, während die Chondrozyten durch Apoptose zugrunde gehen. Allmählich wird der mineralisierte Knorpel durch Osteoklasten abgebaut und von den eingewanderten Osteoblasten durch Knochen ersetzt (Einhorn 2005).

Im Zuge der Forschung zur chondralen Ossifikation wurde auch die Hypothese einer Transdifferenzierung von Chondrozyten zu Osteoblasten entwickelt (Roach 1992). Demnach können bereits ausdifferenzierte Knorpelzellen pluripotente Stammzeleigenschaften reaktivieren. Der vormals hypertrophe Chondrozyt wandelt sich dieser Hypothese zufolge in einen knochenbildenden Osteoblasten um. Mit Hilfe genetischer Marker konnte dieser

Mechanismus sowohl in der Embryonalentwicklung (Park, Gebhardt et al. 2015) als auch in der Knochendefektheilung beobachtet werden (Bahney, Hu et al. 2014).

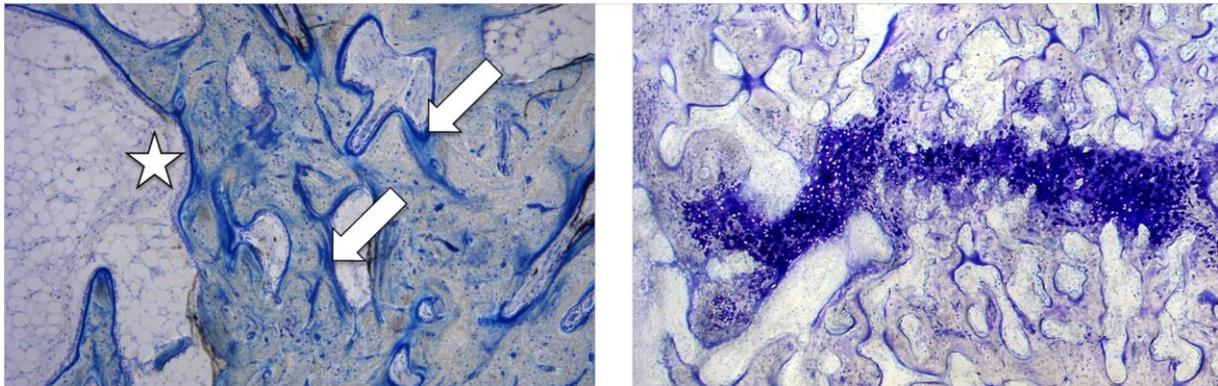


Abbildung 1.1 Knochenneubildung durch intramembranöse Ossifikation (links) im Schafsfemur mit Osteoblastensaum (Stern) und neugebildetem Osteoid (Pfeile). Knochenneubildung durch chondrale Ossifikation (rechts) im Schafsfemur. Violett eingefärbt ist ein Knorpelsaum mit hypertrophen Chondrozyten erkennbar. Paragon Färbung, 50-fache Vergrößerung. Modifiziert nach Reusch 2010 (links) und Claes, Reusch et al., 2011 (rechts).

1.2.2 Primäre und sekundäre Frakturheilung

Im Zusammenhang mit der Frakturheilung werden zwei Formen der Knochenneubildung unterschieden.

Die primäre Frakturheilung ist eine Knochenbildung *per primam intentionem*. Der Begriff geht vermutlich auf W. A. Lane in „The Operative Treatment of Fractures“ (1914) zurück und wird wiederum unterteilt in Kontaktheilung und Spaltheilung (Willenegger, Perren et al. 1971). Wichtigstes Merkmal einer primären Heilung ist eine Bildung von Knochen, die nicht entlang eines intermediären Stützgewebes erfolgt und damit ohne die Ausbildung eines Frakturkallus auskommt (Yamagishi and Yoshimura 1955). Bei der Kontaktheilung erfolgt eine osteonale Spaltüberbrückung. Zunächst überqueren knochenabbauende Zellen (Osteoklasten) den Spalt. Der beidseits des Spalts entstandene Bohrgang wird von knochenbildenden Zellen (Osteoblasten) aufgefüllt. Dabei wird der Spalt durch die Knochenzapfen der neugebildeten Osteone progressiv überbrückt (Willenegger, Perren et al. 1971). Die Kontaktheilung kann jedoch nur bei Läsionen unter 0,2 mm Breite erfolgen. Eine Spaltheilung dagegen ist für Spaltgrößen von 0,2-0,5 mm beschrieben. Hierbei kommt es zur Einwanderung von Gefäßkapillaren und durch nachfolgende Osteoblasten zur Auffüllung des Frakturspaltes mit Geflechtknochen. Im Anschluss wird dieser entsprechend der spezifischen Belastungsrichtung ausgerichtet und durch die Bildung neuer Osteone in den Bereichen der Kortikalis zu lamellärem Knochen umgebaut (Willenegger, Perren et al. 1971). Primäre Heilung kann nach chirurgischer Intervention nur bei anatomisch korrekter Reposition und hoher Konstruktionsstabilität der Osteosynthese entstehen (Schenk and Willenegger 1964).

Diese Stabilität tritt beispielsweise unter Verwendung von Kompressionsplatten auf. Unter natürlichen Bedingungen kommt eine primäre Heilung durch intramembranöse Ossifikation bei Fissuren und nicht dislozierten Ermüdungsbrüchen vor (Tami, Nasser et al. 2003).

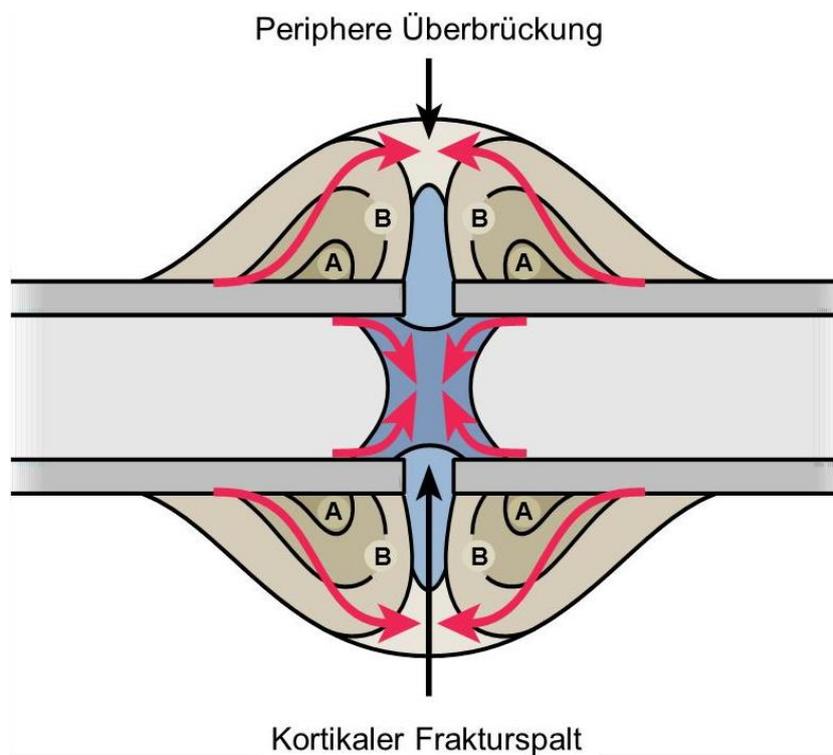


Abbildung 1.2 Schema des Kalluswachstums bei sekundärer Heilung einer diaphysären Fraktur. Frakturferne Knochenbildung durch intramembranöse Ossifikation (A). Chondrale Ossifikation nach Knorpelbildung in spaltnahen Zonen (B). Modifiziert nach (Claes 2006).

Die sekundäre Frakturheilung besteht aus zwei Komponenten von osteogenen Mechanismen; chondraler und intramembranöser Ossifikation (Goodship, Cunningham et al. 1998). Sie ist zunächst gekennzeichnet durch die Ausbildung eines intermediären Stützgewebes aus Granulationsgewebe und Knorpel, welches den Frakturspalt vorläufig stabilisiert. Dieses Mischgewebe wird als Kallus bezeichnet. In den durch Kallus stabilisierten Frakturspalt wachsen Gefäßkapillaren. Es wandern dann osteoblastäre Vorläuferzellen ein, die als ausdifferenzierte Osteoblasten entlang des Gerüsts und bereits bestehender knöcherner Strukturen Knorpel und Bindegewebe durch Knochen ersetzen (Willenegger, Perren et al. 1971). Daneben erfolgt bei einer typischen sekundären Heilung schon zu einem frühen Zeitpunkt eine erste Knochenneubildung endostal und periostal durch intramembranöse Ossifikation. Diese beginnt frakturlinienfern und schreitet entlang der Kallusränder fort, bis es am peripheren Rand des Kallus zur knöchernen Überbrückung kommt. Erst dann verläuft die Knochenbildungslinie in Richtung des Frakturspalts und füllt diesen nachfolgend knöchern aus (Claes 2006) (Abb. 1.2).

1.2.3 Zeitlicher Ablauf der Frakturheilung

In einem zeitlichen Kontext lassen sich mehrere Stadien der Frakturheilung unterscheiden. Die inflammatorische Phase steht zu Beginn einer Fraktur. Diese ist gekennzeichnet durch Gefäßrupturen und Hämatombildung, Nekrose der Knochenenden und Apoptose umgebender Zellen, Laktatbildung und pH-Abfall (Claes, Recknagel et al. 2012). Infolge dessen werden die zellulären und humoralen Systeme der Immunantwort aktiviert. Thrombozyten und Entzündungszellen des unspezifischen Immunsystems, wie neutrophile Granulozyten und Makrophagen, sowie die Zellen der adaptiven Immunantwort (B- und T-Zellen) wandern in die Frakturzone ein. Pro-inflammatorische Zytokine, wie Interleukine (IL-1, IL-6), Tumornekrosefaktor (TNF), Rezeptor Aktivator des NF- κ B-Ligands (RANKL) und der Monozytenkolonien-stimulierende Faktor (M-CSF-1) werden früh in der inflammatorischen Phase ausgeschüttet. Daneben sind Wachstumsfaktoren, wie Transforming growth factor beta (TGF- β) und Bone morphogenetic proteins (BMPs) zu finden. Mesenchymale Stammzellen und regulatorische T-Zellen dagegen scheinen anti-inflammatorische Effekte auf die Frakturzone zu besitzen und balancieren das Ausmaß der immunologischen Antwort. Zudem erfolgt früh in der inflammatorischen Phase die Sekretion von angiogenen Faktoren, wie Angiopoetin-1 und Vascular endothelial growth factor (VEGF), welche aufgrund der lokalen Hypoxie von Endothelzellen freigesetzt werden (Saran, Gemini Piperni et al. 2014). Mit dem Einsetzen der Neovaskularisation erfolgt die Bereitstellung weiterer Stammzellen, welche unter Einfluss von TGF- β proliferieren und unter Einfluss v.a. der BMPs differenzieren. BMP-2, -6 und -9 werden als die potentesten Faktoren für die Differenzierung zu Osteoblasten erachtet (Cheng, Jiang et al. 2003).

Die Phase der Reparation kann je nach Frakturlokalisation und Art der Stabilisierung verschiedene Ausprägungen annehmen (Claes, Recknagel et al. 2012). Bei einem Heilungsverlauf unter nicht rigider Fixation, wie er in der Regel stattfindet, wird aus dem Hämatom ein weicher Kallus. Dieser besteht aus Granulationsgewebe und Schollen von fibrösem Knorpel. In dieser Phase werden neben Fibrozyten vor allem Chondroblasten bzw. Chondrozyten gefunden. Nach Hypertrophie der Chondrozyten und mit der Mineralisierung der extrazellulären Matrix wandelt sich der weiche Kallus zum harten Kallus. In dieser mechanisch stabilisierten Umgebung treten vermehrt Angioblasten auf und Gefäße sprießen ein. Mit den Gefäßen assoziierte Perizyten stellen eine wichtige Quelle für Osteoprogenitorzellen dar, welche sich als Osteoblasten am knorpeligen Gerüst orientierend anlagern. Osteoklasten bauen den bestehenden Knorpel sukzessive ab. Mit der Bildung knochenspezifischer Kollagenfasern, extrazellulärer Matrix und nachfolgender Mineralisierung erfolgt die Verknöcherung des Kallus. Die eingebauten Osteoblasten wandeln sich zu Osteozyten. Zu diesem Zeitpunkt ist der Frakturspalt mit Geflechtknochen überbrückt. Erst danach kommt es zur knöchernen Heilung der Kortikalis.

Das *Remodelling* ist die Anpassung von Geflechtknochen entsprechend der lokalen Dehnungen (Abb. 1.3). In kortikalen Bereichen resultiert der Umbau des Geflechtknochens in lamellärem Knochen. Dies erfolgt erneut durch Osteoklasten, welche Knochen abbauen und durch Osteoblasten, die nach Bedarf neuen Knochen aufbauen. Nach kortikaler Überbrückung bildet sich der Kallus langsam zurück. Der Knochen bildet seine ursprüngliche Morphologie aus (Frost 1989, Claes, Recknagel et al. 2012).

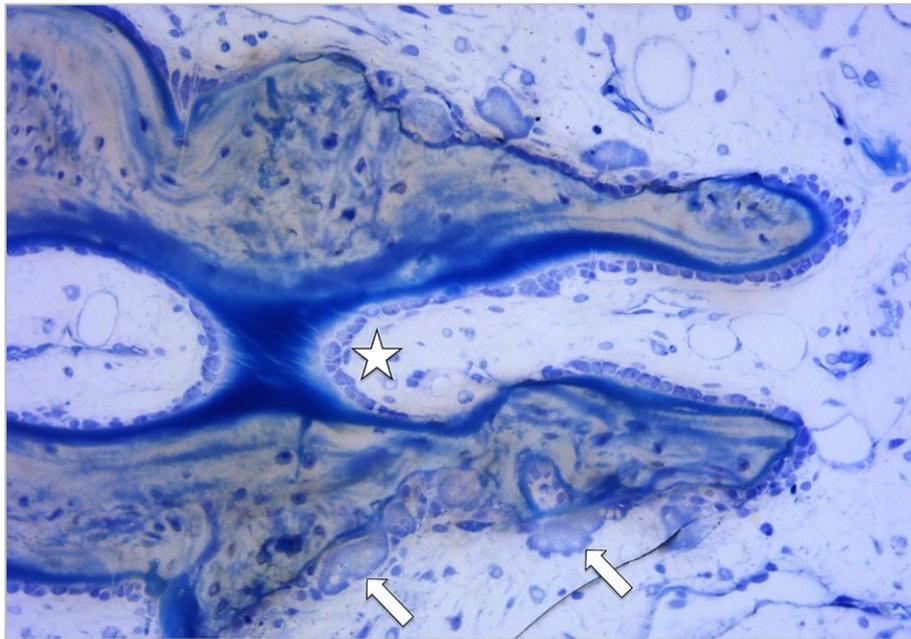


Abbildung 1.3 *Remodelling*-Vorgänge in der Metaphyse eines Schafsfemurs mit Osteoblastensaum (Stern) und Osteoklasten (Blockpfeile). Paragon-Färbung, 200-fache Vergrößerung. Modifiziert nach (Reusch 2010).

1.3 Mechanobiologie im intakten Knochen

Frühe wissenschaftliche Aussagen zum Zusammenhang zwischen der Belastung des Skeletts durch mechanischen Stress und deren Auswirkung auf die Ausrichtung der Knochentrabekel stammen aus „Das Gesetz der Transformation der Knochen“ (Julius Wolff 1892). Julius Wolff postulierte, dass sich die Geometrie des Knochens im Hinblick auf die spezifischen Belastungen und die Trajektorien mechanischer Reize hin verändert und sich so ein optimiertes Knochengerüst ausbildet. Dadurch passt sich der Knochen den spezifischen Belastungen an. Wolffs Erkenntnisse sind bis heute unter dem Begriff „Wolffsches Gesetz“ bekannt.

In verschiedenen Tiermodellen wurde eine Vielzahl an Studien hinsichtlich der funktionell-strukturellen Beziehung im Knochen durchgeführt. Die Reaktionen gesunden Knochens auf verstärkte mechanische Belastung wurden an Kaninchen, Ratten, Schweinen, Schafen, Hunden und am Truthahn studiert (Hert, Liskova et al. 1969, Hert, Liskova et al. 1971,

Churches, Howlett et al. 1979, Goodship, Lanyon et al. 1979, Churches and Howlett 1982, O'Connor, Lanyon et al. 1982, Rubin and Lanyon 1987, Turner, Forwood et al. 1994, Guldberg, Caldwell et al. 1997, Mosley, March et al. 1997, Moalli, Caldwell et al. 2000). Natürliche Tiermodelle, die den Einfluss zyklischer Belastung auf skelettale Knochen belegen, stellen beispielsweise Rennpferde und -hunde dar (Muir, Johnson et al. 1999, Tomlin, Lawes et al. 2000). Die signifikante Zunahme des Knochenvolumens und der Mineraldichte rührt von der intensiven Belastung regelmäßigen Trainings und von Renneinsätzen her (Abb. 1.4). Bei Rennhunden, die traditionell auf ovalen Bahnen immer im Gegenuhrzeigersinn laufen, kommt es dabei zu einer signifikanten Links-rechts-Asymmetrie der besonders belasteten Knochen in Tarsus und (Meta-) Carpus (Johnson, Skinner et al. 2001, Lipscomb, Lawes et al. 2001, Thompson, Cave et al. 2012). Das Zusammenspiel von Knochenresorption und Knochenneubildung mit veränderter Struktur aber gleicher Netto-Knochenmasse wird *adaptive remodelling* genannt.

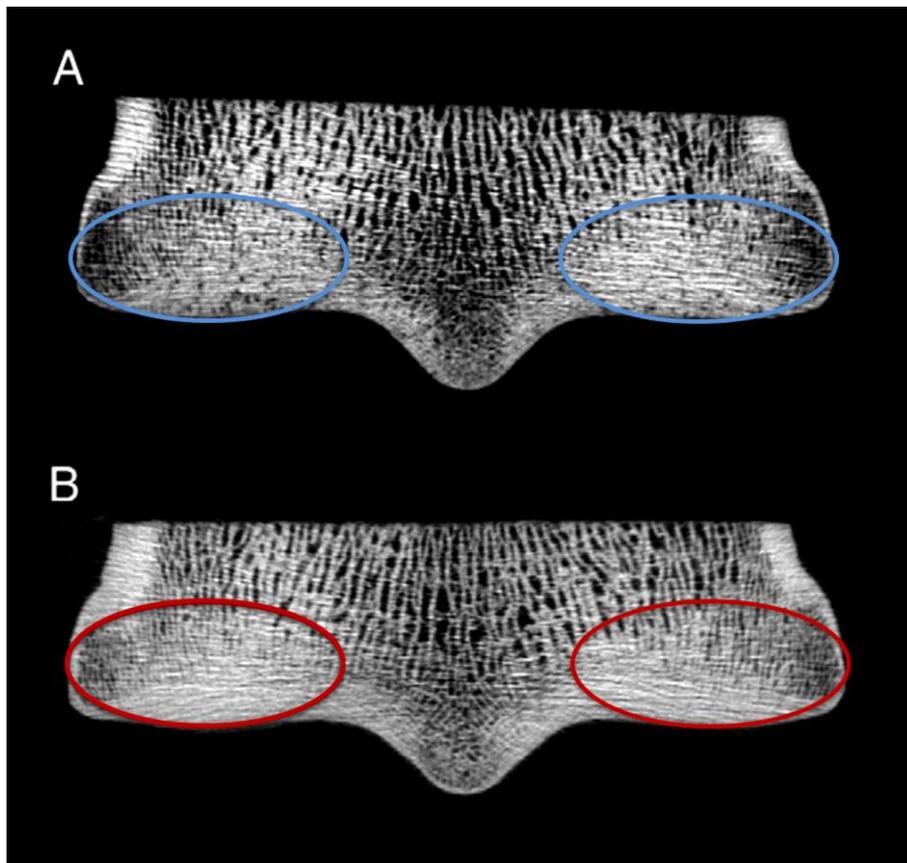


Abbildung 1.4 Distaler Metacarpus III von Rennpferden nach 9 Wochen Boxenruhe (A) und von einem Tier im Training (B). Auffällig ist die generalisierte Porosität im subchondralen Knochen des untrainierten (blau markiert) im Vergleich zur hohen Kochendichte des trainierten Pferdes (rot markiert). Modifiziert nach (Whitton, Trope et al. 2010).

Eine entscheidende Erkenntnis aus den tierexperimentellen Studien hinsichtlich osteoanaboler Vorgänge ist die Überlegenheit intermittierender oder zyklischer Belastung gegenüber statischer (Hert, Liskova et al. 1969, Hert, Liskova et al. 1971). Als Begründung für diese Beobachtung wird die Desensibilisierung von Knochenzellen auf mechanische Stimuli angenommen (Robling, Hinant et al. 2002). Die zyklische Belastung des Knochens bewirkt Veränderungen sowohl in der Geometrie des Gesamtknochens als auch eine lokalisierte Zunahme der Knochenmasse und des Mineralgehalts. Insbesondere bei höheren Dehnungswerten kommt es zu periostaler Knochenzubildung und einer Verdickung der Kortikalis (Mosley, March et al. 1997).

Mechanobiologische Vorgänge kontrollieren nicht nur den anabolen Metabolismus von Knochenzellen. Auch die Resorption des bestehenden Knochens ist mechanisch beeinflusst. Der Resorption von Knochen geht der Zelltod lokaler Osteozyten voraus. Unter mechanischen Gesichtspunkten ist ein Grund hierfür beispielsweise die ausbleibende Belastung des Knochens. Bei Endothelzellen z.B. vermutet man, dass ein Ausbleiben des *shear stress* und die folglich ausbleibende Zelldehnung in den programmierten Zelltod mündet (Hermann, Zeiher et al. 1997). Weiterhin geht man davon aus, dass die unter Belastung durch *fluid flow* ausgelöste Stickstoffoxid-Freisetzung die Apoptose von Osteozyten verhindert (Tan, Bakker et al. 2008). Der (programmierte) Zelltod kann aber auch bei einer Deformation des Zellgerüsts durch Mikrorisse infolge lokal zu hoher Belastung auftreten. Beide Vorgänge beeinflussen über noch wenig bekannte Mechanismen das RANKL/Osteoprotegerin-Verhältnis und damit die Osteoklastenaktivität, welche in erheblichem Maße über die Expression von RANKL reguliert wird (Papachroni, Karatzas et al. 2009). Die Auswirkungen einer mangelnden mechanischen Stimulation des Knochens werden unter den Bedingungen der Schwerelosigkeit im All oder auch bei länger dauernder Bettlägerigkeit sichtbar (Vico, Chappard et al. 1987, Zerwekh, Ruml et al. 1998, Vico, Collet et al. 2000, Lang, LeBlanc et al. 2004). Messbare Kennzeichen kataboler Vorgänge während Entlastung sind eine Abnahme der Knochenmasse, erhöhte Porosität, vergrößerte osteoklastäre Resorptionsflächen und ein Anstieg von Knochenresorptionsmarkern (Hydroxyprolin, Deoxypyridinolin, Kollagen Typ I N-Telopeptid und Kollagen Typ I Carboxylopeptid) in Serum und Harn (Zerwekh, Ruml et al. 1998). Infolge der Abstützung einer Fraktur durch Plattenkonstruktionen mit hoher Steifigkeit entsteht das Phänomen der *stress protection*. Die Lastaufnahme durch die Platte verursacht den Verlust mechanischer Dehnung im Knochen und kann eine lokale Resorption mit Knochenverlust unter der Platte verursachen (Uhthoff and Dubuc 1971, Willenegger, Perren et al. 1971, Claes 1989). Radiologisch finden sich dann Aufhellungszonen im Knochen und klinisch eine erhöhte Refrakturierungsinzidenz. Die Knochenresorption wird auf die unphysiologisch reduzierte

Lastaufnahme des Knochens zurückgeführt und unterstreicht die Bedeutung von Bewegung und Stimulation in moderater Stärke für den Knochenaufbau und -erhalt.

Auf molekularer Ebene beeinflusst mechanische Stimulation über die Aktivierung einer Vielzahl von Rezeptoren, Wachstumsfaktoren, Kinasen und Transkriptionsfaktoren die Proliferation und Differenzierung von Zellen. Diese Interaktion von Mechanik und Zellaktivität wird als Mechanotransduktion bezeichnet (Forwood and Turner 1995, Huang, Kamm et al. 2004).

Die Mechanotransduktion läuft über folgende Teilvorgänge ab: Die Stimulation der zellulären Sensoren durch mechanische Kräfte, die Umwandlung des mechanischen in ein biochemisches Signal, der interzelluläre Signaltransport und die Signalverarbeitung und Antwort der Zielzelle (Turner and Pavalko 1998). Die Mechanotransduktion ist nicht nur auf Knochenzellen beschränkt, sondern kann auch in den Endothelzellen von Gefäßen, Knorpel- oder Muskelzellen beobachtet werden, die der Anpassung an veränderte Belastungen durch mechanische Reize unterliegen (Aikawa, Nagai et al. 2002, Shyy and Chien 2002, Millward-Sadler and Salter 2004).

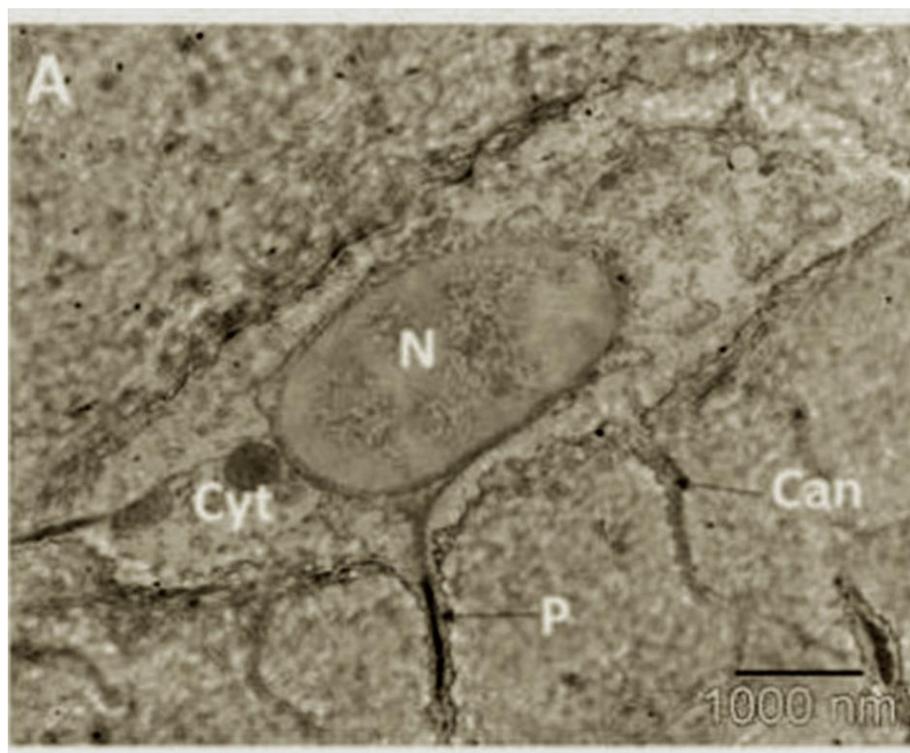


Abbildung 1.5 Transmissions-Elektronenmikroskopische Aufnahme eines Osteozyten mit dendritischen Fortsätzen (P) in die umgebenden Canaliculi (Can). Zudem markiert sind der Nukleus (N) und das Zytoplasma (Cyt). Modifiziert nach Thompson et al., 2012.

Im Knochen wird vor allem den Osteozyten die Fähigkeit zugesprochen mechanische Signale zu erkennen (Rubin, Judex et al. 2002). Osteozyten sind aufgrund ihrer Lage im Knochen und der weiten dreidimensionalen Verzweigung durch ihre Fortsätze prädestiniert, kleinste mechanische Signale aufzunehmen und zu verarbeiten (Lanyon 1993, Mi, Fritton et al. 2005) (Abb. 1.5). Als determinierenden Stimulus für Osteozyten vermuten viele Autoren den sogenannten *fluid flow* in der den Osteozyten umgebenden extrazellulären Flüssigkeit in den Canaliculi (Weinbaum, Cowin et al. 1994).

Als Rezeptoren, die mechanische Reize aufnehmen und verarbeiten werden Integrine (Katsumi, Naoe et al. 2005, Phillips, Almeida et al. 2008), transmembranöse Ca-Ionen-Kanäle (Garcia-Anoveros and Corey 1997), primäre Zilien (Malone, Anderson et al. 2007, Hoey, Kelly et al. 2011) und Komponenten des Zytoskeletts (Tanaka-Kamioka, Kamioka et al. 1998) genannt. Infolge einer Rezeptoraktivierung kommt es intrazellulär zur Phosphorylierung und Dephosphorylierung einer Vielzahl von Kinasen. Wichtige Enzyme dabei sind ERK, MAPK, PYK2 oder Serin/Threonin-spezifische Kinasen. Diese Schlüsselenzyme vermitteln die Signale der Zellumgebung zwischen den membran-gebundenen Rezeptoren und den Signalkaskaden, die mit der Aktivierung spezifischer Transkriptionsfaktoren im Zellkern genomische Aktivität induzieren und die Produktion von Matrixproteinen, Wachstumsfaktoren und Zytokinen bewirken (Liedert, Kreja et al. 2010). Typische Signalkaskaden der osteogenen Zellen sind der MAPK-ERK1/2-Signalweg (Hughes-Fulford 2004), der Wnt- β -catenin Signalweg (Baron and Kneissel 2013) oder die BMP-Signalwege (Farhadieh, Gianoutsos et al. 2004). Als sekundäre Botenstoffe in der Mechanotransduktion spielen Stickstoffoxid, Prostaglandin (PGE₂), Adenosintriphosphat (ATP) und Ca²⁺ eine wichtige Rolle bei der interzellulären Kommunikation zwischen Knochenzellen.

In vivo konnte an Ratten durch zyklische Kompression von Wirbelkörpern ein Anstieg der mRNA-Expression für die Matrixproteine Osteocalcin und Kollagen Typ I an der trabekulären Knochenoberfläche gezeigt werden (Lean, Jagger et al. 1995). In einer Studie zu *Remodelling*-Vorgängen der Ulna bei Ratten trat nach zyklischer Biegung ein Anstieg der Expression von Osteocalcin und des osteoblastären Transkriptionsfaktors Runx2 auf und korrelierte mit der periostalen Geflechtknochenneubildung. Die Höhe der Genexpression von Osteocalcin zeigte eine signifikante Korrelation zur Stärke der Biegung (Wohl, Towler et al. 2009).

Bei *In-vitro*-Versuchen zeigten neben Osteozyten auch Osteoblasten Mechanosensitivität. Es ist jedoch nicht bekannt, ob Osteoblasten auf die gleichen Mechanismen zurückgreifen wie Osteozyten (Kaspar, Seidl et al. 2000). Osteoblasten exprimieren bei Applikation zyklischer Kompression unter anderem signifikant mehr Osteocalcin und Runx2 im Vergleich zur Kontrollgruppe ohne Kompression und konnten durch zyklische Dehnung zu einer signifikant

erhöhten Proliferation und TGF- β -Produktion angeregt werden (Claes, Heigele et al. 1998, Rath, Nam et al. 2008). In beiden Studien waren die Effekte bei höheren Amplituden jedoch rückläufig. In einer Studie von Kaspar und Kollegen konnte gezeigt werden, dass humane Osteoblasten auf physiologische Stimulation hin mit Zellproliferation, steigender Matrixproduktion und einer Abnahme der Mineralisierungsaktivität reagieren (Kaspar, Seidl et al. 2000). Neben der Höhe der Dehnung scheint die Zellproliferation vor allem abhängig von der Anzahl zyklischer Dehnungen (Kaspar, Seidl et al. 2002).

Zusammengefasst weiß man heute, dass eine physiologische Belastung des Knochens lokal den Knochenumsatz durch Osteoklasten reduziert und leicht erhöhte Belastung anabole Effekte auf den Knochen ausübt. Die Apoptose von Osteozyten durch unphysiologisch niedrige oder sehr hohe Belastung dagegen fördert die Osteoklastenaktivität und damit den Knochenumsatz oder Knochenabbau.

1.4 Mechanobiologie in der Frakturheilung

1.4.1 Interfragmentäre Bewegung und Dehnung

In jeder Frakturzone wirken lokal unterschiedlich verschiedene Vektoren mechanischer Kräfte und erzeugen komplexe Deformationen des Gewebes in allen Raumachsen (Claes, Wolf et al. 2000). Je nach Frakturverlauf und Frakturgeometrie, muskulärer Aktivität am Knochen und Lastaufnahme sowie der Osteosynthesestabilität entsteht interfragmentäre Bewegung der Knochenfragmente zueinander (Claes, Recknagel et al. 2012). Es wird vermutet, dass die in vielfältigen Kombinationen auftretenden Torsions-, Biege- und Scherbewegungen, sowie axialer Zug und Druck sowohl zu Zelldehnung als auch Volumenänderung durch hydrostatischen Druck führen (Abb. 1.6). Die Dehnung berechnet sich näherungsweise aus dem Quotienten von interfragmentärer Bewegung und Frakturspaltbreite (Perren und Cordey, 1980). Die tatsächlichen Dehnungen sind jedoch komplex und inhomogen über das Heilungsgebiet verteilt (Claes and Heigele 1999). Hydrostatischer Druck ist definiert als Quotient aus der Kraft und der Fläche, auf der die Kraft wirkt. Die Zellverformung mesenchymaler Stammzellen im Knochenregenerat wird als ein entscheidender Faktor der Zelldifferenzierung angesehen (Pauwels 1960, Matsushita and Kurokawa 1998). Andere Modelle erachten die Bewegung der extrazellulären, interstitiellen Flüssigkeit entlang einer Zelle (*fluid flow*) als determinierenden Faktor (Prendergast, Huiskes et al. 1997, Lacroix and Prendergast 2002).

Im Zuge der Forschung zu den mechanischen Einflüssen auf die Knochenheilung wurde versucht, den Zusammenhang zwischen gebildetem Gewebe im Frakturspalt und mechanischer Stimulation zu ergründen. Die entwickelten Theorien werden als

Differenzierungshypothesen bezeichnet. Aus den gewonnenen Erkenntnissen sollten zum einen Rückschlüsse auf determinierende biomechanische Faktoren im Knochenmetabolismus und in der Frakturheilung gezogen werden. Zum anderen sollten die Hypothesen Aussagen zur optimalen Osteosynthesestabilität, zu geeigneten Fixationskonstruktionen und zum Mehrgegninn einer mechanischen Stimulation im Heilungsverlauf ermöglichen (Steiner, Claes et al. 2014). Überdies können die Differenzierungshypothesen heute in numerische Modelle zur Berechnung von Frakturbedingungen und Heilungsverläufen einfließen.

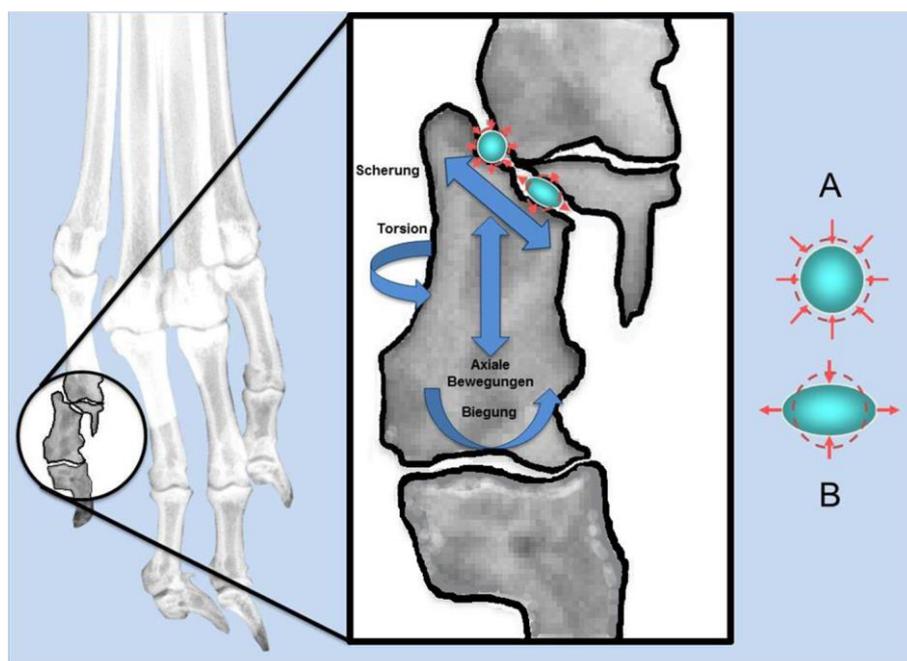


Abbildung 1.6 Schematische Darstellung einer epiphysären Schrägfraktur des mittleren Zehenknochens bei einem Hund. Mesenchymale Stammzellen im Frakturspalt erfahren bei interfragmentärer Bewegung volumetrische Änderung durch hydrostatischen Druck (A) und Konformationsänderung durch Dehnung (B).

Frühe Überlegungen dieser Art formulierte Wilhelm Roux in „Der züchtende Kampf der Theile oder die Theilausele im Organismus“ (Roux 1895). Darin stellte er einen Zusammenhang zwischen der Richtung eines mechanischen Reizes und der Ausbildung bestimmter Gewebearten her. Seiner Theorie nach wird Knochenbildung durch kompressive Kräfte stimuliert. Bei der Einwirkung von Zugkräften wird die Bildung fibrösen Gewebes vorhergesagt und Scherkräfte sollen die Produktion von Knorpel verursachen.

Friedrich Pauwels beschrieb in „Eine neue Theorie über den Einfluss mechanischer Reize auf die Differenzierung der Stützgewebe“ (Pauwels 1960) seine Beobachtungen zu einigen Fällen natürlich auftretender Knochenheilungen. Seine Hypothese besagt, dass eine volumetrische Veränderung der Zelle durch hydrostatischen Druck die Bildung hyalinen

Knorpels und sekundär durch chondrale Ossifikation die Entstehung von Knochen bewirkt. Dehnungen, die eine Zelldeformation ohne Volumenänderung zur Folge haben, lassen zunächst Bindegewebe und dann durch intramembranöse Ossifikation schließlich Knochen entstehen. Die Mischform der beiden Qualitäten der Verformung führt zur Bildung von Faserknorpel (Abb. 1.7). *In vitro* konnte mittlerweile bestätigt werden, dass zyklischer hydrostatischer Druck die Expression des Transkriptionsfaktors für Knorpelzellen Sox9 und des knorpelspezifischen Kollagen Typ II in mesenchymalen Stammzellen reguliert (Miyanishi, Trindade et al. 2006, Miyanishi, Trindade et al. 2006).

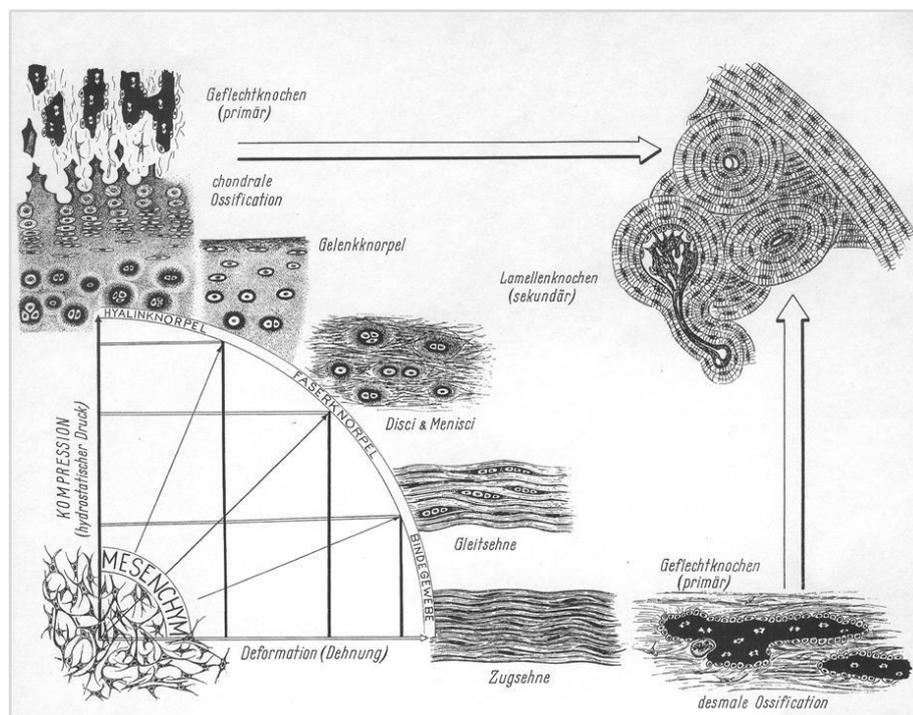


Abbildung 1.7 Qualitative Gewebedifferenzierungshypothese für mesenchymale Stammzellen im Frakturgebiet (Abszisse: Dehnung, Ordinate: hydrostatischer Druck) (Pauwels 1960).

Carter und Kollegen stellten statt einer rein qualitativen erstmals eine semi-quantitative Differenzierungshypothese auf: In Arealen geringer Dehnung soll intramembranöse Ossifikation stattfinden. Geringe bis moderate Zugdehnung und hydrostatische Spannung erlauben ebenfalls intramembranöse Ossifikation. Eine schlechte Durchblutung bewirkt Chondrogenese auch in ansonsten osteogener Umgebung und hydrostatische Kompression soll ebenfalls die Chondrogenese fördern. Große Zugdehnung schließlich induziert die Ausbildung fibrösen Gewebes und Faserknorpels (Carter, Blenman et al. 1988).

Unter Verwendung von Pauwels Hypothese zu Dehnung und hydrostatischem Druck in Zellen und mit Daten aus Osteotomieheilungsmodellen am Schaf entwickelten Claes und Heigele eine quantitative Differenzierungshypothese (Abb. 1.8) (Claes and Heigele 1999). Diese ermöglicht es, für bestimmte Werte von Dehnung und hydrostatischem Druck im

Frakturspalt eine Vorhersage über das daraus entstehende Gewebe zu treffen. Die Hypothese sagt für geringe Dehnung bis $\pm 5\%$ und hydrostatischen Druck bis $\pm 0,15$ MPa intramembranöse Knochenbildung voraus. Für Kompression in Form von hydrostatischem Druck unter $-0,15$ MPa und moderate Dehnung bis $\pm 15\%$ wird chondrale Ossifikation vorhergesagt und für alle Werte außerhalb dieser Grenzen geht man von der Bildung von Faserknorpel oder Bindegewebe aus.

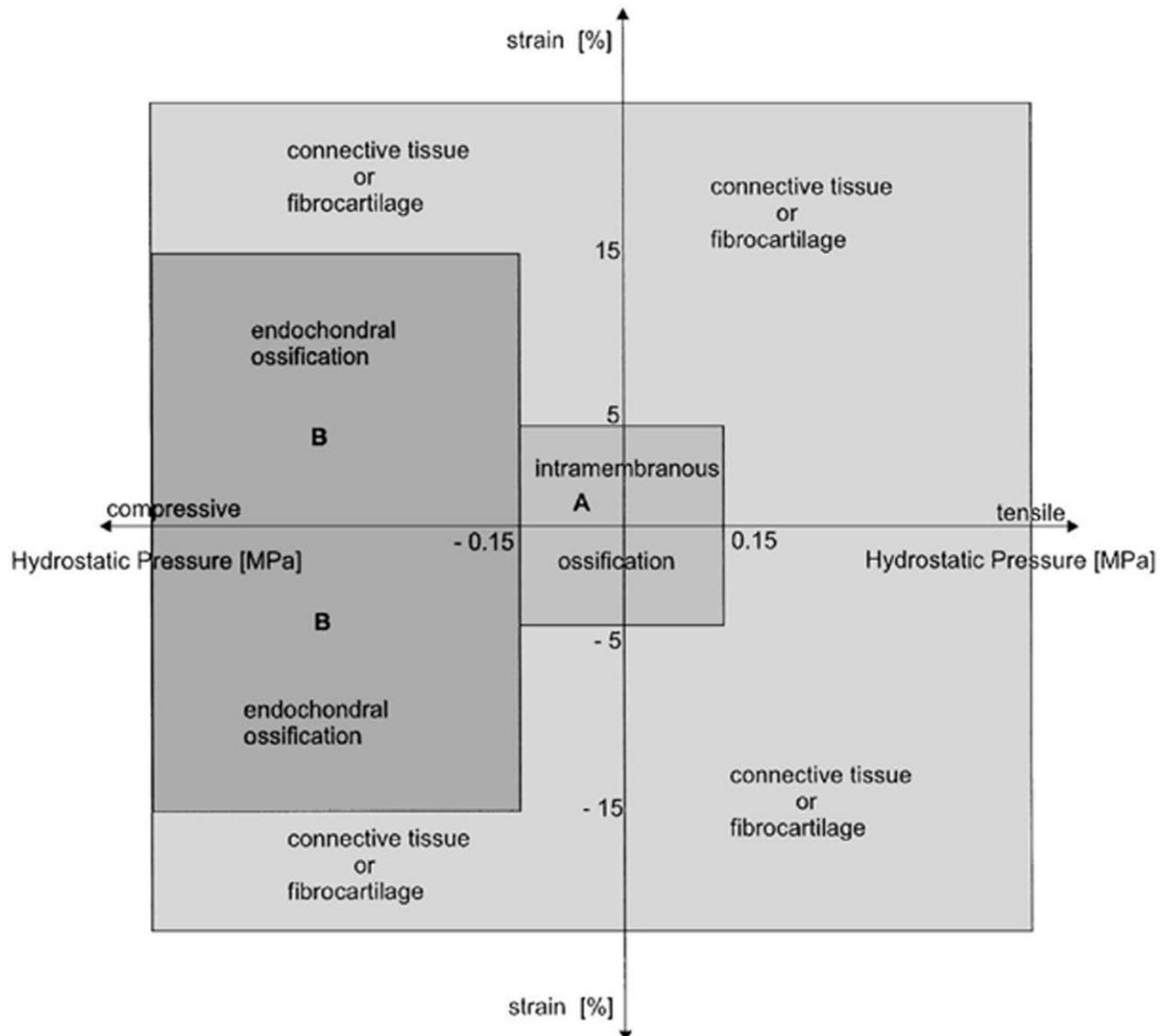


Abbildung 1.8 Quantitative Gewebedifferenzierungshypothese in Abhängigkeit von den im Frakturgebiet wirkenden Kräften (Abszisse: hydrostatischer Druck in MPa, Ordinate: Dehnung in Prozent) (Claes and Heigele 1999).

1.4.2 Distraktionsosteogenese

Die Distraktionsosteogenese ist eine Methode zur chirurgischen Therapie von Knochendefekten, bei der man sich mechanobiologische Reaktionen gezielt zunutze macht. Umgangssprachlich als Kallusdistraktion bezeichnet, ist sie seit den Anfängen des 20. Jahrhunderts bekannt. Ab 1951 verhalf Gawriil Ilizarov mit seiner Forschung der Methode

klinisch zum Durchbruch. Gleichzeitig förderte er das Verständnis für die Biologie der Knochenregeneration durch mechanische Stimuli (Jazrawi, Majeska et al. 1998). Anwendung findet die Kallusdistraktion in der Behandlung von kongenitalen oder post-traumatischen Knochendeformationen oder zur Schließung von großen Knochendefekten und zur Extremitätenverlängerung z.B. bei Amputationsstümpfen (Ilizarov 1989).

Bei der Kallusdistraktion wird ein durch Osteotomie in der Regel transversal geteilter Knochen mit einem externen Fixateur stabilisiert und der entstandene Spalt nach einer Latenzphase von fünf bis sieben Tagen über mehrere Tage in kleinen Inkrementen axial gedehnt. Die Kallusdistraktion macht sich die Zellreaktion auf Zugkräfte im interfragmentären Gewebe zunutze (sog. *tension-stress effect*) und ist in der Lage Knochenneubildung zu induzieren. Das zunächst gebildete fibröse Gewebe und die kollagenen Fasern richten sich entlang der Zugkräfte aus. Osteoprogenitorzellen und Osteoblasten lagern sich entlang des Gerüsts der fibrösen Interzone an und bilden Knochen (Percival and Richtsmeier 2013). Sogenannte Spikula, konisch geformte Knochenneubildungen, wachsen von den Fragmentenden aus in den Osteotomiespalt. Ausgangspunkt hierfür sind Gefäßsinus, die infolge der Neovaskularisation von beiden Fragmentenden aus im Spalt entstehen (Choi, Chung et al. 2002). Der Spalt der fibrösen Interzone wird nach Abschluss der Distraktion in einer Phase der Maturation durchbaut und füllt sich zunehmend mit mineralisiertem Knochen. Ilizarovs Empfehlungen sehen Distraktionschritte von 1 mm pro Tag vor (Ilizarov 1989). Die Verteilung der Distraktion auf mehrere kleine Teilschritte im Tagesverlauf oder kontinuierlicher Zug sind dabei vorteilhaft (Ilizarov 1990).

Ogleich die Kallusdistraktion ein in der Klinik gängiges Verfahren darstellt, treten auch Komplikationen auf, die mit beispielsweise über 30 % bei der Behandlung distaler Beindeformitäten eine nicht zu vernachlässigende Relevanz besitzen (Iacobellis, Berizzi et al. 2010, Novikov, Subramanyam et al. 2014). Verzögerte oder ausbleibende Knochenbildung und Überbrückung des generierten Spalts können weitere Morbiditäten nach sich ziehen (Amir 2009, Makhdom 2015). Vermehrte Pin-Trakt-Infektionen, persistierende Schmerzen und ein erhöhtes Risiko für Osteopenien sind beschrieben (Velazquez 1993, Garcia-Cimbrelo 1992, Eldridge 1991). Neben der Wahl der richtigen Protokollparameter während der Distraktion und Sicherstellung der Blutversorgung im Regenerationsgebiet, beschrieb Ilizarov die Fixationsstabilität der Konstruktion als entscheidend für den Erfolg der Kallusdistraktion. Den Grad der Fixationssteifigkeit beurteilte er als wichtigen Faktor für den Level osteogener Aktivität (Ilizarov 1989 Part I). Fixateure mit einer hohen Biegesteifigkeit förderten die Knochenbildung. In späteren Tierversuchen wurden positive Effekte durch Lastaufnahme oder eine kontrollierte Dynamisierung nach erfolgter Distraktion beschrieben. Moderate Axialbewegungen verbesserten den Heilungsverlauf im Vergleich zu Entlastung oder rigider Fixation (Kassis, Glorion et al. 1996,

Claes, Laule et al. 2000, Leung, Cheung et al. 2004). Beim sogenannten „Akkordeon-Manöver“ wurden zur Behandlung verzögerter Überbrückung oder einer *non-union* alternierend Distraktions- und Kompressionsschritte durchgeführt. Das Verfahren erzielte gute Erfolge, wenngleich Fallberichte zum großen Teil nur anekdotisch sind (Hatzokos 2011, Kawoosa 2003).

Die Knochenneubildung bei der Distraktionsosteogenese wird als Vorgang intramembranöser Ossifikation beschrieben (Aronson, Good et al. 1990, Delloye, Delefortrie et al. 1990). Zugdehnung durch Distraction induziert vermutlich intramembranöse Ossifikation und supprimiert möglicherweise die Bildung von Knorpel (Carter, Beaupre et al. 1998, Jazrawi, Majeska et al. 1998). Es gibt Studien, die von histologisch erkennbaren Knorpelschollen bzw. der Präsenz des Knorpelmarkers Kollagen Typ II im Distraktionsgebiet berichten (Kojimoto, Yasui et al. 1988, Radomisli, Moore et al. 2001). Es wird aber vermutet, dass die knorpeligen Anteile entweder mit lokaler Ischämie aufgrund einer großen Distraktionslänge zusammenhängen oder erst in der Maturationsphase nach Abschluss der Distraction entstehen, wenn kompressive Kräfte im Osteotomiespalt auftreten (Jazrawi, Majeska et al. 1998). Auch Ilizarov berichtete von Knorpelbildung und führte das Auftreten auf unzureichend stabile Fixateure zurück, deren Biege- und Scherbewegungen im Osteotomiespalt zu einer veränderten Gewebedifferenzierung und insuffizienter Knochenbildung führten (Ilizarov 1989).

Die laterale Kallusdistraction wurde als transversale Distraction ebenfalls von Ilizarov erfolgreich an Hundetibien durchgeführt und erweiterte ab Anfang der 1990-er Jahre das Spektrum der anfänglich noch auf lange Röhrenknochen beschränkten Methode der Distraktionsosteogenese. Sie findet Anwendung in der Gesichts- und Kieferchirurgie (Saulacic, Gandara-Vila et al. 2004). Eine mögliche Indikation für die laterale Kallusdistraction ist die Verbreiterung des Alveolarkamms vor Zahnersatzimplantation. Die Distraktionsosteogenese ist somit nicht allein auf lange Röhrenknochen beschränkt. Auch embryonal aus dem Neuroektoderm entwickelte Gesichtsknochen können durch Distraktionsreize neuen Knochen bilden. Problematisch an der lateralen Kallusdistraction ist jedoch die Notwendigkeit, den bestehenden Knochen sagittal zu durchtrennen, um über zwei knöcherne Flächen für die Distraction zu verfügen. Dieses Vorgehen ist hinsichtlich des operativen Verfahrens aufwendig und invasiv und schwächt den Knochen im Distraktionsgebiet. Außerdem neigt das ausgelöste Knochenfragment infolge mangelnder Anbindung an die Gefäße zur Sequestrierung (Amir, Becking et al. 2006). Claes und Kollegen gelang es erstmalig, eine laterale Kallusdistraction mit einem synthetischen osteokonduktiven Material durchzuführen (Abb. 1.9). Dabei wurde eine mit Hydroxylapatit beschichtete Titanplatte nach zehntägiger Latenzphase über zehn Tage in kleinen Schritten (zwei Mal täglich 0,266 mm) senkrecht zur Längsachse der Tibia vom Knochen weg distrahiert. Die Beschichtung mit

Hydroxylapatit ($\text{Ca}_5[\text{OH}](\text{PO}_4)_3$) stellte in Anlehnung an die konventionelle laterale Kallusdistraktion ein dem ausgelösten Knochenfragment vergleichbares osteokonduktives Gegenstück dar. Hydroxylapatit ist Grundsubstanz von Knochen und Zähnen aller Vertebraten und mit 40 % mengenmäßig wichtiger Bestandteil der mineralisierten Matrix im Knochen (Herzog and Federico 2007). Intra-operativ angelegte Markraumb Bohrungen im Distraktionsgebiet stellten die Blutversorgung des sich formierenden Knochens sicher. Auch hier orientierten sich die gebildeten Knochenspikula entlang der Zugrichtung durch Distraktion der Platte. Ohne invasive Osteotomie konnte so eine Knochenneubildung durch laterale Kallusdistraktion induziert werden (Claes, Veeseer et al. 2010).

Moderate Axialbewegungen nach Abschluss der Distraktion scheinen die Knochenneubildung zu fördern und können das Risiko von Heilungsverzögerungen verringern. Eine Anpassung der Fixationssteifigkeit oder die Applikation externer mechanischer Stimuli können auch in der klinischen Anwendung sinnvoll sein (Kenwright and Goodship 1989). Die optimale mechanische Umgebung für eine zügige Überbrückung des Spalts nach Distraktion kann mit dem Wissen aus bisherigen Studien jedoch nicht abschließend ermittelt werden. Zudem sind die Mechanismen der Gewebedifferenzierung während Distraktion und nachfolgender Maturation nicht vollständig bekannt. Um mechanisch bedingten Heilungsverzögerungen vorzubeugen oder problematische Heilungsverläufe zu überwinden ist es notwendig, den Einfluss zyklischer Bewegungen auf die Knochenbildung während der Maturationsphase zu erforschen. Da es nur wenige Daten zum Effekt zyklischer interfragmentärer Bewegung nach Distraktionsosteogene gibt, müssen bis dato auch Studien zu interfragmentärer Bewegung in der Frakturheilung heran gezogen werden.

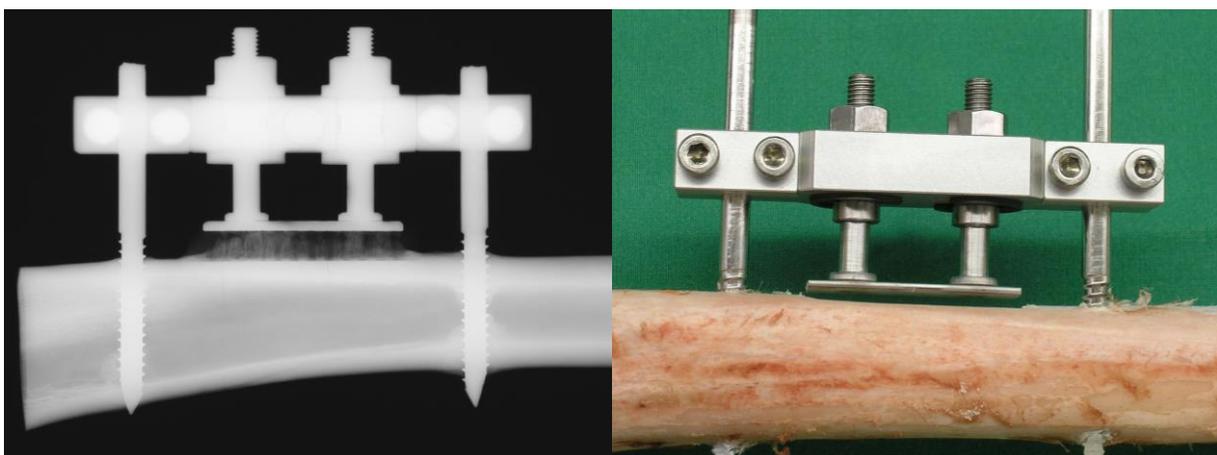


Abbildung 1.9 Röntgenaufnahme einer Schafstibia nach Explantation 70 Tage post-OP (links) und Distraktionsvorrichtung auf Schafstibia *in vitro* (rechts) (Claes, Veeseer et al. 2010).

1.4.3 Interfragmentäre Bewegung ohne externe Stimulation

Zyklische Mikrobewegungen und die daraus entstehende Gewebedehnung können eine heilungsfördernde Wirkung bei der Frakturheilung haben. Vor allem interfragmentäre Kompression durch Axialbewegungen wurden in diesem Zusammenhang als vorteilhaft beschrieben (Goodship 1992, Claes, Heigele et al. 1998). Studien zum Einfluss von Mikrobewegungen wurden in Tiermodellen neben Hunden und Kaninchen vor allem auch an Schafen durchgeführt (Aro, Kelly et al. 1990, Park, O'Connor et al. 1998, Martini, Fini et al. 2001, Duyck, Vandamme et al. 2006).

Gadomski und Kollegen untersuchten den grundsätzlichen Einfluss der Lastaufnahme auf den Heilungsverlauf am Metatarsus des Schafs nach Ostektomie (Gadomski, McGilvray et al. 2014). In ihrem Modell partieller Gravitationsaufhebung (0,25 g) durch einen transbiartikulären externen Fixateur konnten sie zeigen, dass das Ausbleiben zyklischer Mikrobewegung durch Entlastung des Metatarsus die Knochenformation im Frakturspalt signifikant senkt. Im Vergleich mit der Heilung unter normalen Gravitationsbedingungen war die Frakturheilung unter Entlastung deutlich reduziert. Zur Erforschung von Frakturheilung und Gewebedifferenzierung unter verschieden großer axialer Kompression wurden Osteotomien an Tibia und Metatarsus von Schafen mit externen Fixateuren stabilisiert, welche ein definiertes Maß an Bewegung zuließen. Claes und Kollegen verwendeten einen Ringfixateur zur Stabilisierung von Schafsmetatarsus-Osteotomien mit 2 mm Spalt. Eine axiale Beweglichkeit in der dynamisierten/flexiblen Gruppe erlaubte eine durchschnittliche Dehnung von 32 % während die stabiler fixierte Gruppe noch eine durchschnittliche Dehnung von 9 % aufwies. Die Ergebnisse nach 9 Wochen zeigten signifikant mehr Knochen und weniger fibrösen Knorpel in der Gruppe mit 9 % als in der Gruppe mit 32 % Dehnung (Claes, Eckert-Hubner et al. 2002). Eine Studie mit vergleichbaren Dehnungswerten, aber einer Metatarsus-Osteotomie mit 0,6 mm Spalt, führte bei den stabiler fixierten Tieren im Gegensatz zu dynamisiert versorgten Tieren zu vermehrt fibrösem Knorpel. Die Dynamisierung bewirkte zum gleichen Tötungszeitpunkt post-operativ ein signifikant größeres periostales Kallusvolumen. Schon ab der vierten Woche konnte anhand von Fluoreszenzmarkierungen histomorphometrisch eine signifikant stärkere Knochenbildung und Verringerung der interfragmentären Bewegung beobachtet werden. Die Heilung in der dynamisierten Gruppe war zum Versuchsende weiter fortgeschritten (Claes, Wilke et al. 1995). Auch in weiteren Studien mit Osteotomie des Schafsmetatarsus zeigten sich Unterschiede bei divergierender axialer Kompression (Augat, Margevicius et al. 1998, Claes, Heigele et al. 1998, Yamaji, Ando et al. 2001). Vier Wochen nach Osteotomie wurde die signifikant stärkste Knochenneubildung unter größeren Axialbewegungen in einem kleinen Spalt (2 mm) beobachtet. Ein großer Spalt (6 mm) mit gleichen Axialbewegungen dagegen führte zu weniger neuem Knochen, aber einer Zunahme an Bindegewebe (Yamaji, Ando et

al. 2001). Bei Augat, Claes und Kollegen war der Einfluss der interfragmentären Dehnung zumeist nicht signifikant und die Heilungskapazität vor allem von der Frakturspaltgröße (1, 2 oder 6 mm) abhängig. Je größer der Spalt, desto schlechter waren die mechanischen Eigenschaften des Kallus und es zeigte sich histologisch ein unvollständiger Heilungsprozess. Die Erhöhung der interfragmentären Dehnung von 7 % auf 31 % für 1 mm Spaltbreite bewirkte jedoch signifikante Veränderungen mit Zunahme fibrösen Knorpels und einer Abnahme der Menge an mineralisiertem Knorpel und Knochen. Ein metaphysäres Frakturheilungsmodell am Schaffemur mit 3 mm Spalt und definierter interfragmentärer Bewegung zeigte nach acht Wochen für initiale Dehnungen von < 5 % eine verzögerte Heilung und eine hauptsächlich intramembranöse Ossifikation. Bei Dehnungen zwischen 6 % und 20 % erfolgte die Ossifikation auch chondral und mit signifikant mehr neugebildetem Knochen, während Dehnungen zwischen 20 % und 40 % Areale mit fibrösem Knorpel aufwiesen (Claes, Reusch et al. 2011).

Die bisher durchgeführten tierexperimentellen Studien an Schafen konnten nachweisen, dass ein Einfluss interfragmentärer Kompression auf die Frakturheilung existiert. Gruppenunterschiede hinsichtlich der Amplitude zyklischer Kompression oder der resultierenden Dehnung führen zu Veränderungen der Knochenneubildung und der relativen Gewebsanteile. Der Erfolg der Frakturheilung ist darüber hinaus aber auch von anderen Faktoren abhängig. Beispielsweise kommt es bei größeren Frakturspalten unter denselben Dehnungsverhältnissen, die bei kleineren Spalten heilungsfördernd wären, zur Heilungsverzögerung oder ausbleibender Heilung kommt (Claes, Wolf et al. 2000, Yamaji, Ando et al. 2001). Die möglichen Vorteile der interfragmentären Kompression gelten in den gewählten Modellen deshalb nur für Frakturspalten unkritischer Größe. Bei Schafen scheint in Osteotomien mit unkritischen Spaltgrößen eine hauptsächlich oder ausschließlich intramembranöse Ossifikation bei weniger als 5-7 % Dehnung aufzutreten (Augat, Margevicius et al. 1998, Claes, Reusch et al. 2011). Höhere Dehnungswerte induzieren eine sekundäre Heilung mit Kallusbildung und können gleichzeitig eine stärkere Mineralisierung und beschleunigte Überbrückung bewirken. Bis zu knapp über 30 % Dehnung sind verbesserte Heilungsverläufe beschrieben (Goodship and Kenwright 1985, Claes, Wilke et al. 1995). Optimale Dehnungsverhältnisse für die Knochenneubildung sind jedoch bisher nicht genau definiert. Weiterhin bleibt fraglich, wo ein möglicherweise kritischer Wert für eine erfolgreiche Ossifikation liegt.

Neben den Großtiermodellen wurden in der jüngeren Vergangenheit insbesondere auch Ratten und Mäuse als Tiermodell in der Erforschung mechanobiologischer Vorgänge eingesetzt. Die Bestimmung der interfragmentären Bewegung ist im Kleintiermodell nur schwer durchführbar. Dennoch geben die stark unterschiedlichen Steifigkeiten der angewendeten Fixationstechniken Hinweise auf Gewebedifferenzierung und assoziierte

molekulare Mechanismen. Große interfragmentäre Bewegungen sind in Kleintiermodellen mit einer frühen und ausgeprägten Expression von Kollagen Typ II und der Bildung von Knorpel assoziiert, während stabil versorgte Frakturen eine beschleunigte Knochenformation und nur transiente Formation von Knorpel aufweisen (Hankemeier, Grassel et al. 2001, Le, Miclau et al. 2001, Thompson, Miclau et al. 2002, Mark, Nilsson et al. 2004). Andererseits gibt es auch in Kleintiermodellen Hinweise darauf, dass Dehnung Voraussetzung für die Knochenformation ist. An osteotomierten Rattenfemora mit normaler Heilung (1 mm Spalt) oder kritischer Heilung (5 mm Spalt) konnte anhand Voxel-basierter Finite Elemente Modelle gezeigt werden, dass die niedrigere Dehnung im großen Frakturspalt mit einer signifikanten Verringerung der Kallusbildung korrelierte. Dehnung über 0,7 % war nötig, um eine Knochenbildung zu induzieren. Diese Werte traten bei kritischer Heilung tief im Spalt auf und formten dort den Verschluss des Markraums durch intramembranöse Ossifikation (Mehta, Checa et al. 2012).

Limitiert werden Modelle ohne externe Stimulation durch die Tatsache, dass die Dehnung oft nur unzureichend definiert werden kann. Die tatsächliche Größe der interfragmentären Kompression ist von der Lastaufnahme des operierten Tieres abhängig und unterliegt den *feedback*-Mechanismen von Fragmentdislokation und Schmerzreiz.

Auch bei der Anwendung in der Klinik entscheidet die Steifigkeit von Osteosynthesystemen neben dem Gewicht des Patienten, der individuellen Schmerztoleranz und Aktivität mit darüber, wie viel interfragmentäre Kompression im Frakturspalt unter Lastaufnahme entsteht. Die Art der Heilung und der Heilungsverlauf werden somit durch die Osteosynthese direkt beeinflusst (Claes, Heigele et al. 1998). Lange Zeit galt die Priorität in Forschung und Klinik der Entwicklung von Osteosyntheseverfahren mit hoher Stabilität und genauer Rekonstruktion (Danis 1949, Bagby and Janes 1958, Muller 1965). Bei rigiden Osteosynthesen, beispielsweise durch winkelstabile Platten, drohen jedoch das Ausbleiben interfragmentärer Kompression als Stimulus für eine optimale Kallusbildung und sekundäre Knochenheilung (Egol, Kubiak et al. 2004) sowie eine verzögerte oder ausbleibende Überbrückung und Materialversagen (Sommer, Gautier et al. 2003, Button, Wolinsky et al. 2004). Bei Verwendung weniger rigider Fixationstechniken treten unter Lastaufnahme zyklische Mikrobewegungen im Frakturspalt auf. Das Wissen um die Bedeutung von interfragmentärer Kompression durch Mikrobewegungen in der Frakturheilung führt mittlerweile zu Bemühungen, Bedingungen für eine kontrollierte Dynamisierung von Fixationssystemen und damit mechanische Stimulation der Zellen in der Frakturzone zu schaffen (Bottlang, Lesser et al. 2010, Dobeles, Horn et al. 2010, Dailey, Daly et al. 2013, Plecko, Lagerpusch et al. 2013, Adams, Tanner et al. 2015)

1.4.4 Interfragmentäre Bewegung durch externe Stimulation

Um die interfragmentäre Bewegung im Heilungsverlauf besser definieren zu können, wurden Mitte der 1980-er Jahre erste Studien mit einer externen Applikation von Bewegung im Spalt osteotomierter Schafe durchgeführt (Goodship and Kenwright 1985). So wurde auch ein Rückgang der interfragmentären Bewegung, wie er bei passiven Systemen auftritt, vermieden.

Goodship und Kenwright verglichen 3 mm-Tibiaosteotomien an Schafen unter rigider Fixation und Fixation mit Applikation zyklischer Kompression (Goodship and Kenwright 1985). Bei den mit 1 mm Amplitude (33 % initiale Dehnung) stimulierten Tieren entwickelte sich gegenüber rigide fixierten Tieren ein größerer Kallus und eine signifikant höhere Torsionssteifigkeit 12 Wochen post-OP. Histologisch fanden sich zwar ähnliche Gewebetypen, jedoch unter Stimulation eine weiter fortgeschrittene Differenzierung des Kallus und komplette Überbrückung des Spalts. In einer weiterführenden Studie konnten die Autoren in einem vergleichbaren Versuchsaufbau signifikant höhere Knochenmineralisierungsraten im Heilungsgebiet bei 0,5 mm Bewegungsamplitude (ca. 17 % durchschnittliche Dehnung) gegenüber einer Bewegungsamplitude von 2 mm (ca. 67 % durchschnittliche Dehnung) erzielen (Kenwright and Goodship 1989). Bei Schafen mit uniformer Osteotomiespaltbreite von 3 mm konnte in vier Gruppen verschieden großer interfragmentärer Kompression (0-0,8 mm) mit steigender Bewegung eine signifikante Zunahme des Kallusvolumens verzeichnet werden. Die im Gruppenvergleich besten biomechanischen Eigenschaften und größte Kallusmineralisierung wurde bei 0,4 mm interfragmentärer Kompression (ca. 13 % durchschnittliche Dehnung) erzielt, ohne jedoch statistische Signifikanz zu erreichen (Wolf, Janousek et al. 1998).

Die Ergebnisse der Modelle mit externer Stimulation bestätigten, dass der Reiz zur Kallusbildung und die Gewebeverteilung im Frakturspalt zu großen Teilen mechanisch kontrolliert sind. Die externe Applikation von interfragmentärer Kompression kann die Gewebedifferenzierung ähnlich beeinflussen wie spontane Bewegungen und zu einer modifizierten Frakturheilung beitragen. Mehr noch als die Bewegung an sich scheint die Dehnung der Zellen den Stimulus für die Kallusbildung darzustellen, da die Kallusgröße nicht zwangsläufig mit der Größe der interfragmentären Bewegungen korreliert (Gardner, Hardy et al. 1997, Bishop, van Rhijn et al. 2006).

Eine spezifische Limitation im Versuchsdesign bei externer Stimulation liegt darin, dass zu späteren Zeitpunkten unter Umständen unnatürlich große Bewegungen im Frakturspalt vorliegen, die bei normalem Heilungsverlauf durch die zunehmende Konsolidierung nicht auftreten würden. Diese artifiziellen Bewegungen könnten zu Gewebeschädigungen führen und den Heilungsverlauf beeinflussen (Gardner, Evans et al. 1998). Allen bisher genannten Studien zu interfragmentärer Kompression ist gemein, dass die Gewebematuration zu

Veränderungen der Gewebematerialparameter und die knöchernen Überbrückung zu einem Rückgang der Spaltgröße führen. Dadurch unterliegen die Dehnungsverhältnisse im Heilungsgebiet einer dynamischen Änderung (Claes, Wilke et al. 1995). Nur die initialen Werte direkt post-operativ können theoretisch berechnet werden.

1.5 Studienziel

Das heutige Wissen aus Forschung und Klinik legt den positiven Einfluss interfragmentärer Kompression durch zyklische Axialbewegung auf die Frakturheilung und nach Distractionsosteogenese nahe. Die in den Kapiteln 1.4.2 bis 1.4.4 aufgeführten Studien zur Untersuchung interfragmentärer Kompression bei Schafen weisen hinsichtlich knochenbildungsfördernder Dehnungswerte ein heterogenes Bild auf, obwohl alle den Einfluss interfragmentärer Kompression untersuchten. Eine grobe Einteilung lässt zwei Gruppen erkennen. Die Ergebnisse in Ersterer zeigen eine verstärkte Knochenbildung bei Dehnung von bis zu ca. 10 %, während in der Gruppe der anderen Studien noch bei knapp über 30 % initialer Dehnung von einer Zunahme der Knochenbildung berichtet wird. Die Gründe für die Divergenz der Ergebnisse sind vermutlich auf spezifische Limitationen von Osteotomieheilungsmodellen zurückzuführen. Abgesehen von der Wahl der Spaltgröße führen Unterschiede in der Steifigkeit der Fixateure zu unkontrollierter Deformation des regenerierenden Gewebes durch Bewegung der Knochenfragmente zueinander. Je nach Steifigkeit des Fixationssystems entsteht durch Muskelaktivität und Lastaufnahme des Tieres Dehnung aus Torsion, Biegung, Zug, Druck und Scherung, die sich zeitlich und räumlich überlappt und eine komplexe Mischung mechanischer Stimuli auf Zellen im Heilungsgebiet ausübt. Da die Dehnung im Osteotomiespalt nicht hinreichend bestimmt werden kann, bleiben Korrelationen zu Knochenbildung und Gewebedifferenzierung problematisch. Rückschlüsse auf die Zell- und Gewebedifferenzierung durch interfragmentäre Kompression sind deshalb nur eingeschränkt zulässig. Eine abschließende Aussage zu den Bedingungen für eine optimale Knochenneubildung und den Mechanismen der Gewebedifferenzierung ist aus den Ergebnissen dieser Modelle nicht möglich.

Zur Ermittlung biomechanisch vorteilhafter Verhältnisse in der Maturationsphase nach Distractionsosteogenese und zur Überprüfung der existierenden Gewebedifferenzierungshypothesen muss es Ziel sein, isolierte mechanische Stimuli im Knochenheilungsgebiet zu applizieren. Mit der Implementierung der Methode zur lateralen Kallusdistraction an einer bewegten synthetischen Materialoberfläche (Claes, Veeseer et al. 2010) wurde die Grundlage dafür gelegt, ein Knochenregenerat *in vivo* zu erzeugen, welches frei von mechanischen Einflüssen durch Lastaufnahme oder Muskelzug ist. Nach diesem Vorbild bildete die in der vorliegenden Studie verwendete Fixationskonstruktion mit der

intakten Tibia einen bewegungsstabilen Rahmen und ermöglichte es, mit Hilfe eines mobilen, osteokonduktiven Implantats in Richtung und Größe definierte Bewegungen auf das Regenerat zu applizieren.

Das Ziel dieser Arbeit war es, in einem Tierversuch an Schafen Effekte zyklischer Kompression unterschiedlicher Amplitude nach Distractionsosteogenese auf die Knochenneubildung und Gewebedifferenzierung zu erforschen und dabei Limitationen von Osteotomieheilungsmodellen zu umgehen. Hierfür wurde nach erfolgter lateraler Kallusdistraction über eine bewegliche Titanplatte zyklische Kompression mit zwei unterschiedlichen Bewegungsamplituden appliziert, welche Bedingungen entweder kleiner oder moderater axialer interfragmentärer Kompression repräsentierten. Die Hypothese war, dass Dehnung durch die niedrigere Stimulationsamplitude (0,1 mm) Knochenneubildung durch intramembranöse Ossifikation induziert. Die größere Stimulationsamplitude (0,6 mm) hingegen sollte Dehnung generieren, welche zu einer chondralen Ossifikation führt. Als Grundlage für die Berechnung der Amplituden diente die für die Frakturheilung entwickelte quantitative Gewebedifferenzierungshypothese (Claes and Heigele 1999). Weiterhin wurde unter der größeren Stimulationsamplitude erwartet, dass im Versuchsverlauf durch kontinuierliche Mineralisierung und eine schrumpfende Weichteilschicht Dehnungswerte erreicht würden, die eine weitere Knochenneubildung verhinderten. Anhand der Ergebnisse sollten Erkenntnisse für geeignete Fixationskonstruktionen und verbesserte Protokolle der Distractionsosteogenese in der klinischen Anwendung gewonnen werden. Die zudem im Versuch generierten Daten zu Gewebematerialeigenschaften sollten in die Kalibrierung numerischer Modelle der Distractionsosteogenese einfließen.

2 Material und Methoden

Zur Untersuchung der gestellten Hypothesen wurde ein Tierversuch an Schafen durchgeführt. Operativ wurde ein bewegungsstabiler Rahmen medial in die Tibia verschraubt, ohne eine Osteotomie durchzuführen. Eine in der Fixationskonstruktion verankerte Titanplatte wurde direkt auf der Tibia angebracht. Post-operativ erfolgte motorgesteuert zunächst eine laterale Kallusdistraktion durch schrittweise Abduktion der Titanplatte und anschließend eine Stimulation von Zellen und Gewebe im entstandenen Spalt durch zyklische Kompression mit zwei unterschiedlichen Amplituden (Abb. 2.1). Das Gewebeverhalten während der Manipulationen wurde mit einem Kraftsensor aufgezeichnet und charakterisiert. Das im Spalt zwischen Kortex der Tibia und der Titanplatte befindliche Geweberegenerat wurde post-mortem radiologisch, histologisch und immunhistochemisch untersucht.

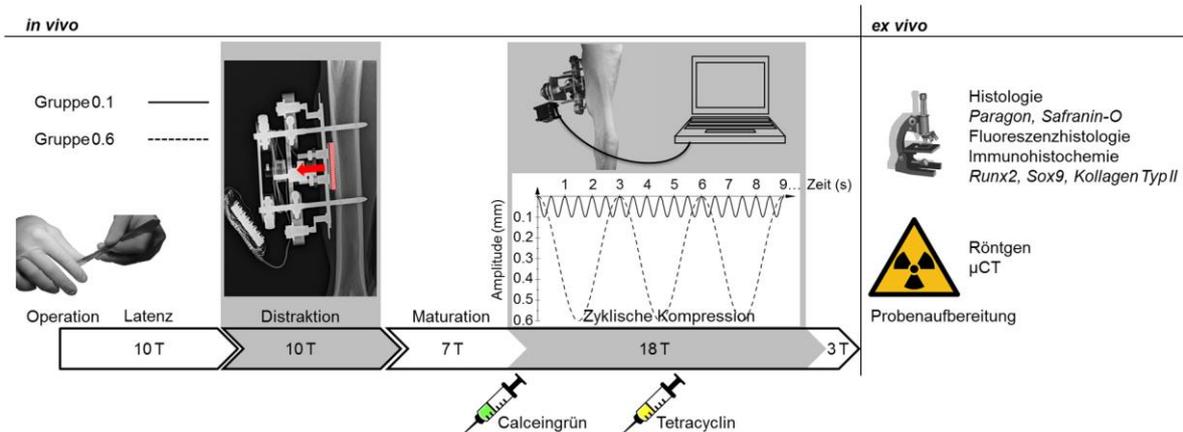


Abbildung 2.1 Übersicht des Tierversuchs (*in vivo*) und der Probenaufbereitung (*ex vivo*). Die post-operativen Manipulationen sind in den grau hinterlegten Arealen dargestellt. Nach zehn Tagen Distraktion (roter Pfeil) entstand zwischen Tibia und Titanplatte ein Spalt mit regenerierendem Gewebe (rot gestrichelte Zone in der Röntgenaufnahme). Sieben Tage nach Beginn der Maturation wurde das Geweberegenerat zyklischer Kompression mit zwei unterschiedlichen Bewegungsamplituden und Frequenzen ausgesetzt. An zwei Zeitpunkten (Beginn und Mitte der Phase zyklischer Kompression) wurden Fluoreszenzfarbstoffe injiziert. Die Probenaufbereitung beinhaltet radiologische, histologische und immunhistochemische Analysen.

2.1 Tierversuch

Der Tierversuch wurde am 05.05.2014 vom Regierungspräsidium Tübingen gemäß Tierschutzgesetz unter der Tierversuch-Nr. 1168 genehmigt.

Einer Änderungsanzeige zur Inklusion post-operativer Röntgenaufnahmen im Heilungsverlauf vom 26.08.2014 wurde am 03.09.2014 vom Regierungspräsidium Tübingen

zugestimmt. Einer weiteren Änderungsanzeige zu veränderten Zeiträumen hinsichtlich Maturations- und Stimulationsphase und einer Erhöhung der Gesamtzahl der genehmigten Tiere vom 23.01.2015 wurde am 27.01.2015 ebenfalls zugestimmt.

2.1.1 Schafe

Für den Tierversuch waren 45 Schafe genehmigt. Davon wurden im Rahmen dieser Dissertation 18 Schafe operiert. Sechs Tiere wurden als Vorversuchstiere operiert, im Hauptversuch waren es 12 Tiere. Davon wurden 11 Tiere zur Auswertung heran gezogen. Ein Tier wurde vom Versuch ausgeschlossen, da verstärkte Wundsekretion die Mechanik der Fixationskonstruktion blockierte. Die Schafe waren adulte, weibliche Merinoschafe. Die zur Auswertung herangezogenen Tiere hatten ein Körpergewicht von im Mittel 89 kg (8,18 kg SD). Sie stammten aus landwirtschaftlicher Produktion von einem Schäfer aus der Ulmer Umgebung (Rudi Feinauer, Lindenweg 1, 89183 Breitingen).

Nach Anlieferung wurden die Tiere einer klinischen Untersuchung unterzogen. Besonderes Augenmerk wurde dabei auf Erkrankungen oder Verletzungen des Bewegungsapparates und das Herz-Kreislauf-System gelegt. Die Standzeit bis zur Operation betrug mindestens sechs Wochen, um mit hinreichender Sicherheit einen sonographischen Trächtigausschluss durchführen zu können (Gonzales-Bulnes, Pallares et al. 2010). Die Tiere wurden kurz vor dem geplanten OP-Termin einem transabdominalen Ultraschall durch einen externen Nutztierpraktiker (Tierärztliche Praxis Dr. med. vet. Jakob Pfetsch, Drosselweg 2, 89188 Merklingen) unterzogen, der eine ungewollte Trächtigkeit der Versuchstiere ausschließen sollte. In der präoperativen Phase wurden durch Mitarbeiter des Tierforschungszentrums zudem repräsentative Kotproben entnommen, um einen möglichen Befall mit Endoparasiten nachzuweisen. Bei Bedarf wurden die Tiere mit einem Antiparasitikum (Cydectin®, Fort Dodge Veterinär GmbH) behandelt.

2.1.2 Haltung und Fütterung

Die Tiere wurden nach Ankunft in Gruppen von sechs Tieren in Boxen mit Stroheinstreu gehalten. Die Fütterung bestand aus Heu ad libitum und einem pelletierten Krafffutter für Schafe/Ziegen (V5103-000, ssniff-Spezialdiäten GmbH). Die Boxen waren mit Selbsttränken ausgestattet. Es wurde ein Lichtprogramm mit Tag-/ Nacht-Rhythmus à zwölf Stunden angewandt.

Zur post-operativen Betreuung wurden die Tiere in Boxen mit 2 x 2,5 m jeweils zu zweit aufgestellt, um einen leichteres Handling zu gewährleisten. Die Boxen waren mit Gummimatten ausgelegt und die Einstreu bestand aus Sägespäne mit einer Strohaufgabe, was das Risiko eines Ausgleitens und von Verletzungen verringern sollte.

2.1.3 Studiendesign

Pro OP-Serie mit nachfolgender Distraction und Stimulation wurden an drei aufeinander folgenden Tagen jeweils zwei Schafe operiert. Aufgrund der aufwendigen und zeitintensiven post-operativen Nachsorge, wurden in einer OP-Serie jeweils nur sechs Tiere operiert. Die Versuchsdauer betrug 49 Tage einschließlich Operation und beinhaltete post-operativ 10 Tage Latenzphase, 10 Tage Distractionsphase, 7 Tage Eintritt in die Maturationsphase, 18 Tage Stimulationsphase und 3 Tage Pause vor der Tötung. Innerhalb einer OP-Serie erfolgte eine randomisierte Verteilung der Tiere auf die beiden Versuchsgruppen. Die Versuchsgruppe mit kleiner Amplitude wird nachfolgend als Gruppe 0.1 bezeichnet, die Versuchsgruppe mit der großen Amplitude als Gruppe 0.6.

2.1.4 Fixationskonstruktion

Die Anforderungen an die Fixationskonstruktion bestanden darin, (zyklische) Bewegungen mit hoher Präzision durch die Titanplatte auf das Geweberegnerat zu applizieren und möglichst genaue und damit valide Messdaten des Gewebematerialverhaltens *in vivo* zu generieren. Für die Erzeugung der Bewegungen musste ein Schrittmotor (*engl.* Stepper-Motor), für die Erfassung der auftretenden Kräfte an der Titanplatte ein Kraftsensor in das System integriert werden.

Die im Tierversuch verwendete Fixationskonstruktion wurde im Institut für Unfallchirurgische Forschung und Biomechanik, Ulm entwickelt (Abb. 2.2). Die Fertigung erfolgte in der wissenschaftlichen Werkstatt für Feinwerktechnik der Universität Ulm (WWF). Wie bereits in einer vorangegangenen Studie zur lateralen Kallusdistraction durch Claes und Kollegen (Claes, Veeseer et al. 2010) wurde eine mit Hydroxylapatit beschichtete Titanplatte (CelGen AG) mit einer Größe von 35 x 10 x 1,5 mm benutzt, um das Knochenwachstum zu induzieren. Die Titanplatte war mit mehreren Löchern versehen, welche die Einwanderung und den Durchtritt von Gefäßen erlaubten.

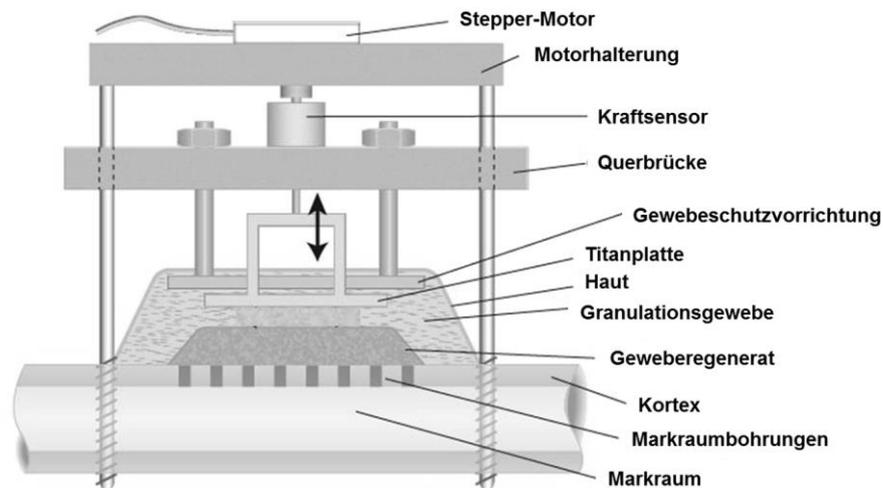


Abbildung 2.2 Zeichenentwurf der Fixationskonstruktion als Vorbild bei der Entwicklung. Neben den bereits bekannten Elementen (Schanz-Schrauben, Querbrücke, Titanplatte) aus der Studie von Claes und Kollegen (Claes, Veeseer et al. 2010) kamen die Gewebeschutzvorrichtung bzw. Hautplatte, der Kraftsensor und die Motorhalterung mit Stepper-Motor dazu.

Kernbestandteile der neuen Fixationskonstruktion waren eine Querbrücke aus Aluminium, und ein Verbindungsstück zwischen Titanplatte und Querbrücke mit einem inkorporierten Kraftsensor (8411-200, burster Präzisionsmesstechnik GmbH & Co KG), zudem eine zweiteilige Gewebeschutzvorrichtung aus rostfreiem Stahl (im Folgenden einheitlich als Hautplatte bezeichnet) (Abb. 2.3). Eine Schutzplatte, zwischen den Manipulationen über die Schanzschrauben gestülpt, sollte die empfindliche Mechanik und den Kraftsensor vor Beschädigung schützen (Abb. 2.4 links). Die Gesamtabmessungen der Fixationskonstruktion betragen inklusive Hautplatte ca. 12 x 6 x 3 cm bei einem Gewicht von 186 g.

Für die Applikation der Distractionsschritte und die zyklische Kompression wurde ein separater Aufbau aus Motorhalterung und Stepper-Motor (CanStack Linearaktuator, A-Drive Technology GmbH) verwendet, welcher nur temporär aufgesetzt und mit einer Schnellspannvorrichtung befestigt wurde (Abb. 2.4 rechts). Der Schaft des Stepper-Motors konnte über eine Aufnahme in der Querbrücke und das Verbindungsstück mit der Titanplatte verbunden werden. Die Titanplatte war mit Hilfe des Stepper-Motors senkrecht zur Knochenlängsachse beweglich und übertrug während Distraction und Stimulation definierte Bewegungen auf das Geweberegenerat (Abb. 2.5). Die temporäre Verbindung zwischen Schaft und Aufnahme wurde durch eine Stellschraube in Position gehalten. Die maximale applizierbare Kraft des Motors lag bei ca. 150 N. Zwischen Titanplatte und Stepper-Motor war im Verbindungsstück der Kraftsensor in die Fixationskonstruktion integriert. Dieser ermöglichte *in vivo* die Messung der aufgetragenen Kräfte an der Titanplatte. Der Kraftsensor

maß in einem Bereich von 0 bis 200 N mit einem relativen Fehler von weniger als $\pm 0,5\%$ (± 1 N). Die Hautplatte war über Schraubverbindungen mit der Querbrücke verbunden und konnte durch Schraubumdrehungen parallel zur Titanplatte bewegt werden. Durch das kontinuierliche Anheben von Haut und Unterhaut über das Titanplattenniveau sollte eine mechanische Beeinflussung sowie Fehler in den Messungen mit dem Kraftsensor zu jedem Messzeitpunkt verhindert werden.

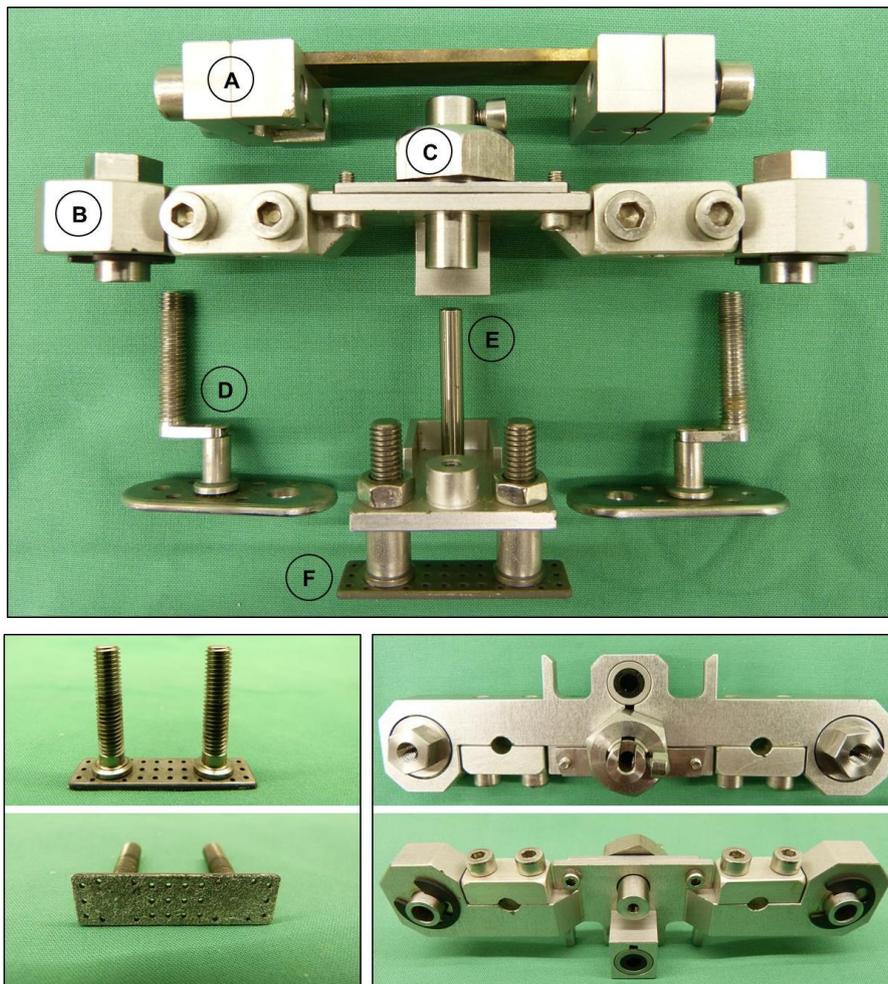


Abbildung 2.3 Die Fixationskonstruktion in Einzelteilen. Zu sehen sind die Schutzplatte (A), die Querbrücke (B) mit der Feststellmutter (C) (Detailansicht unten rechts), die Hautplatte (D) mit der korrespondierenden Hälfte gegenüber, das Verbindungsstück (E) und die Titanplatte (F) (Detailansicht unten links). Es fehlt der Kraftsensor im Verbindungsstück.

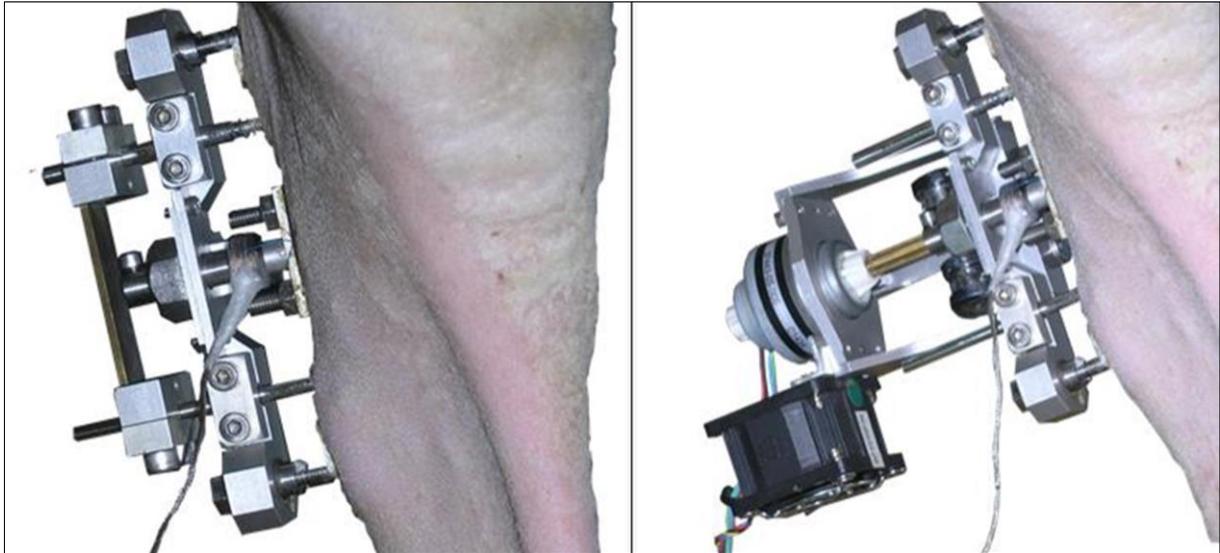


Abbildung 2.4 Fixationskonstruktion *in vivo* mit Schutzplatte (links) und mit dem temporär aufgesetzten Stepper-Motor (rechts) (kaudo-kraniale Aufsicht).

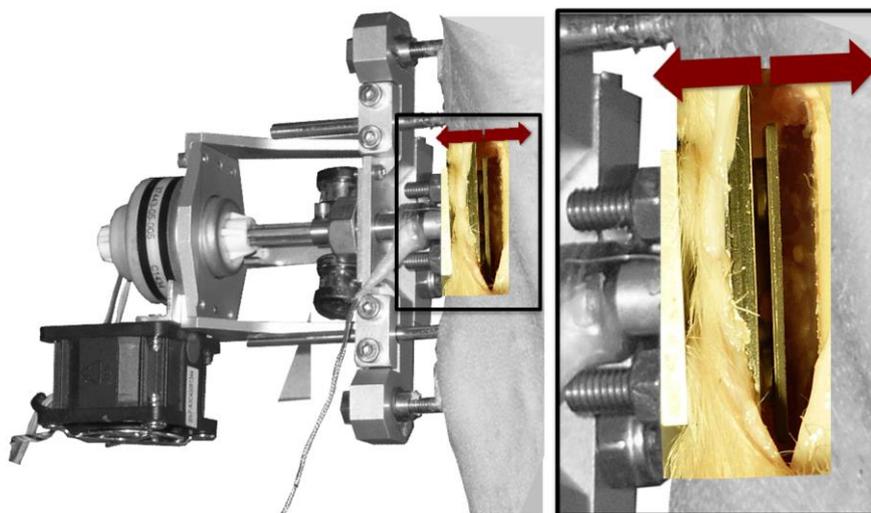


Abbildung 2.5 Detailansicht der Titanplatte *in vitro* mit Darstellung der Bewegungsrichtung (Blockpfeile) während der zyklischen Kompression (kaudo-kraniale Ansicht).

2.1.5 Prä-operative Vorbereitung

Die Tiere wurden vor dem geplanten Operationstermin für 48 Stunden gefastet. Der Zugang zur Selbsttränke blieb erhalten.

Prä-operativ erfolgte eine Sedation mit 0,2 mg/kg Körpergewicht (KG) Xylazin (Rompun® 2%, Bayer AG), intramuskulär in den *Musculus gluteofemoralis* verabreicht. Weiterhin erfolgte die Gabe eines Antibiotikums mit dem Wirkstoff Amoxicillintrihydrat (Veyxyl® LA

20%, Veyx-Pharma GmbH; 7 mg/kg KG) und zur Analgesie 4 mg/kg KG Carprofen (Rimadyl®, Pfizer Inc.) jeweils seitlich am Thorax subkutan injiziert.

Nach Wirkeintritt der Sedation wurden die Tiere in die OP-Vorbereitung verbracht. Hier wurde über das linke Ohr ein intravenöser Zugang mit Venenverweilkatheter (VasoVet 20G, B. Braun Melsungen AG) in der lateralen Ohrvene (*Vena auricularis lateralis*) gelegt und mit Leukoplast an der Ohrmuschel fixiert. Nach Kontrolle der Durchgängigkeit mit einer isotonischen NaCl-Lösung (Infusionslösung 0,9 %, Fresenius SE & Co. KGaA) erfolgte die Narkoseeinleitung mit 5 mg/kg KG Thiopental-Natrium (Thiopental Inresa 0,5 g, Inresa Arzneimittel GmbH). 10 ml wurden zunächst als Bolus verabreicht, die weitere Dosierung erfolgte nach Wirkung.

Mit Erreichen ausreichender Narkosetiefe, welche anhand der Lidschluss- und Schluckreflexe sowie einer nachlassenden Kieferspannung bestimmt wurde, erfolgte die Intubation mit einem Tracheotubus der Größe 12 und Anschluss an ein Inhalations-Narkosegerät (Sulla 808V, Drägerwerk AG & Co. KGaA). Der Tubus wurde im vorderen Abschnitt zuvor mit einer lokalanästhesierenden Salbe (Anesderm, Pierre Fabre Dermo Kosmetik) bestrichen. Zur besseren Befestigung und zum Schutz des Tubus wurde ein Beißschutz eingesetzt. Die Narkose wurde mit Isofluran (Forene®, Abbott Laboratories) zunächst bei 3-5 % und nach einigen Minuten bei ca. 2 % aufrecht erhalten. Zum Schutz vor Austrocknung wurde in beide Augen eine feuchtigkeitsspendende Salbe eingebracht (Vidisic® Dr. Gerhard Mann GmbH). Durch das Legen einer Pansensonde wurde ein Aufgasen des Pansens vermieden. Das rechte Hinterbein wurde großzügig geschoren, mit jodhaltiger Seifenlösung (Jodosept PVP, Vétoquinol GmbH) mehrfach gesäubert, mit Zellstoff abgetrocknet und mit 70 % Alkohol sprühdesinfiziert. Anschließend wurden die Tiere in den OP verbracht und in Rückenlage gelagert. Zur besseren Lagerung wurden die Vorderläufe und die linke Hintergliedmaße mit Gurten am OP-Tisch befestigt. Die OP-Stelle wurde abermals mit Alkohol desinfiziert und das Tier großflächig mit sterilen Tüchern abgedeckt. Die Klaue der rechten Hintergliedmaße wurde doppelt mit sterilen OP-Handschuhen (Micro-Touch® 8,5, Ansell) überstülpt und diese proximal über dem Tarsus mit sterilen Kompressen festgeknotet.

2.1.6 Operation

Der Hautschnitt von 10 cm Länge erfolgte mittig an der medialen Fläche der rechten Tibia ca. 2,5 cm proximal des distalen Endes der *Margo cranialis* und in proximo-distaler Richtung entlang der Diaphyse. Darauf erfolgte die Präparation der Unterhaut und Längsspaltung des distalen Abschnitts der *Fascia cruris* bis zur Freilegung des Knochens. Eine Schablone mit den Abmessungen der verbauten Teile wurde nachfolgend in das OP-Feld eingebracht und

auf der freigelegten Tibia mit dem proximalen Bohrloch 1 cm proximal des distalen Endes der *Margo cranialis* aufgesetzt. Die rechteckige Aussparung der Schablone entsprach den Abmessungen des Distraktionsfeldes. Mit einem Skalpell (Klinge #11, B.Braun Melsungen AG) wurde die Aussparung umschnitten und das Periost anschließend mit Hilfe eines Raspatoriums ab präpariert. Die Stelle der nachfolgenden Bohrlöcher wurde anhand der aufgelegten Schablone mit einem Gewebestift markiert.

Eine Bohrlehre mit zwei Bohrhülsen, in das OP-Feld eingebracht und anhand der Markierung durch das freigelegte Knochenfeld und den Gewebestift ausgerichtet, erlaubte standardisierte und parallele Bohrungen für die Schanz-Schrauben. Mit einem druckluftbetriebenen Bohrer mit 3,5 mm Durchmesser (Drill Bit Ø 3.5 mm, L 110/85 mm 310.350, Synthes) wurde unter ständiger Irrigation mit 0,9 % NaCl-Lösung (Plastipur® Fresenius SE & Co. KGaA) das proximale Loch durch beide Kortizes gebohrt. Im Anschluss wurde nach Messung der Bohrlochtiefe die erste von zwei Schanz-Schrauben (Schanz Screw Ø 5 mm L125/50 294.530, Synthes) mit 5 mm Durchmesser eingedreht. Nachfolgend wurde unter Führung der Bohrlehre distal im Bereich des Tibiaschaftes ein zweites Bohrloch mit 2,5 mm Durchmesser (Drill Bit Ø 2.5 mm, L 110/85 mm 310.250, Synthes) bikortikal gebohrt. Hier wurde eine zweite Schanz-Schraube (Schanz Screw Ø 4 mm L100/25 294.450, Synthes) mit 4 mm Durchmesser eingebracht. Die Umstellung auf eine Schanz-Schraube mit dünnerem Durchmesser wurde nötig, nachdem es bei mehreren Vorversuchstieren von der distalen Schraube ausgehend zu Frakturen der operierten Gliedmaße kam. Der Abstand zwischen den Bohröchern betrug 60 mm.

Über die Schanz-Schrauben wurde dann eine Fräslehre bündig an die Kortex angelegt (Abb. 2.5 obere Reihe, links). Unter Verwendung einer Stirnfräse (Ø 5 mm) und Führung durch die Fräslehre wurde in die Kortex eine Planfläche von 10 x 35 mm und ca. 0,5 mm Tiefe gefräst (Abb. 2.5 obere Reihe, rechts). Auch hier erfolgte eine ständige Irrigation. Bei Bedarf wurden Unebenheiten vorsichtig mit einem chirurgischen Meißel nachbearbeitet. Zur Entfernung von Knochenspänen wurde die Stelle nochmals ausgiebig gespült.

Nach Entfernung der Fräslehre wurden mithilfe einer weiteren Bohrlehre, unter ständiger Irrigation und mit einem Bohrer mit 1,1 mm Durchmesser (Drill Bit Ø 1.1 mm, L 60/35 mm 310.110, Synthes) 22 unikortikale Markraumborungen durchgeführt (Abb. 2.5 mittlere Reihe).

Nach Einbringen der beiden Hautplatten und Positionierung der Titanplatte auf der Planfläche konnte der Verschluss erfolgen. Die Titanplatte wurde für die Dauer des Wundverschlusses mit einer Klammer in Position gehalten. Die Unterhaut wurde mit Novosyn® 2-0 Einzelheften (B. Braun Melsungen AG), die Haut mit Resolon® 3-0 Einzelheften (Resorba Medical GmbH) adaptiert (Abb. 2.5 untere Reihe, links). Mit dem Aufsetzen und Feststellen des Rahmens an den Schanz-Schrauben erfolgte die

Komplettierung der Fixationskonstruktion (Abb. 2.5 untere Reihe, rechts). Nach Abscheren der überstehenden proximalen Schanz-Schraube mit einem chirurgischen Schneider wurden die Hautdurchtrittspforten mit in Octenisept® (Schülke & Mayr GmbH) getränkten Kompressen steril abgedeckt und das Bein mit einem Polsterverband aus Verbandwatte (Rolta®, Paul Hartmann AG), Mullbinde (Peha Crep E®, Paul Hartmann AG) und schmutzabweisendem Deckverband (Vetrap, WDT eG) versorgt.

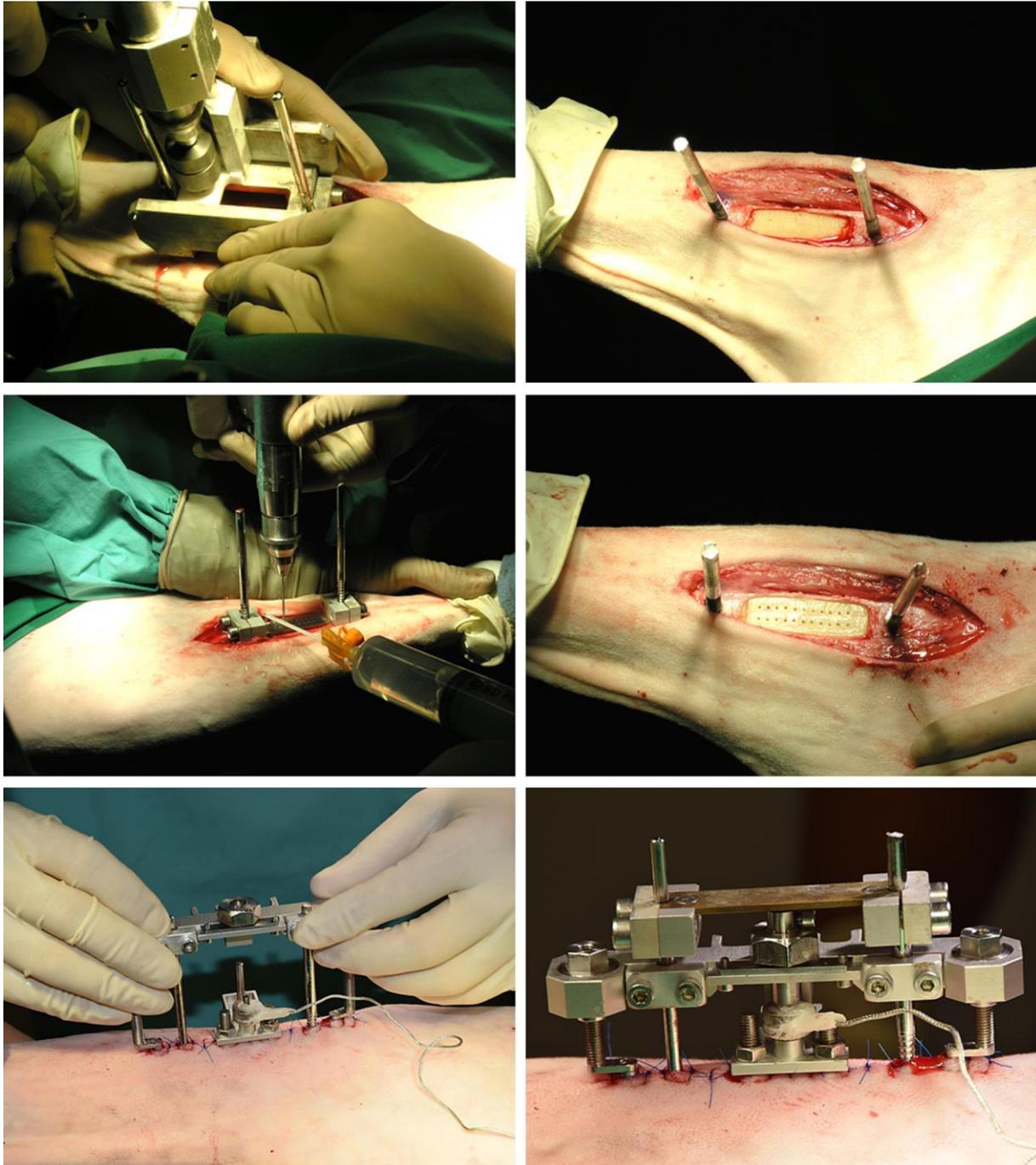


Abbildung 2.5 OP-Technik nach erfolgter Implantation der Schanz-Schrauben. Fräslehre mit aufgesetzter Stirnfräse zur Schaffung einer Planfläche (obere Reihe). Bohrlehre mit angesetztem Bohrer (1,1 mm) für die 22 Markraumb Bohrungen (mittlere Reihe). Ansicht nach Wundverschluss und nach Montage der Fixationskonstruktion (untere Reihe).

2.1.7 Post-operative Nachsorge

Nach Operationsende wurden die Tiere zum Aufwachen in die vorbereiteten Boxen gebracht. Bei nachlassender Narkosetiefe und mit Einsetzen des Schluckreflexes konnte extubiert und der Venenverweilkatheter entfernt werden. Bis zum Erreichen eines ausreichenden Bewusstseinsgrades, gekennzeichnet durch Brustlage und erste Fressversuche, blieben die Tiere unter Beobachtung.

Als post-operative Nachsorge wurde den Schafen für drei Tage einmal täglich 7 mg/kg KG Amoxicillintrihydrat subkutan und 4 mg/kg KG Carprofen subkutan verabreicht.

Neben der Überprüfung des Allgemeinbefindens und der rektalen Messung der Körpertemperatur erfolgte ein täglicher Verbandswechsel mit Säuberung der Hautdurchtrittsstellen und Desinfektion der Wunde mit Octenisept®. Bei normalem Wundheilungsverlauf gekennzeichnet durch den Rückgang von Rötung, Schwellung, Schmerzhaftigkeit und Sekretion konnte die Häufigkeit der Verbandswechsel nach ca. einer Woche reduziert werden.

2.1.8 Distraction und zyklische Kompression

Das post-operative Protokoll sah eine Kombination aus lateraler Kallusdistraction (Distractionosteogenese) und zyklischer Kompression mit mehreren, teils intermittierenden Ruhephasen vor.

Eine Latenzphase von zehn Tagen nach der Operation sollte das Hämatom zwischen Kortex und Titanplatte in einen distractionfähigen, weichen Kallus umwandeln. In der Literatur wurden für Kallusdistractionen an osteotomierten Knochen schon fünf bis sieben Tage als ausreichend erachtet oder das Verfahren sogar unter Auslassen der Latenzphase erfolgreich durchgeführt (Kojimoto, Yasui et al. 1988, Aronson and Shen 1994). Unter Berücksichtigung des hier verwendeten körperfremden Implantates hat sich für das Verfahren ein längerer Zeitraum bewährt (Claes, Veeseer et al. 2010). Dieser ermöglichte eine ausreichende Verbindung von Zellen, Fibrin und neugebildetem Gewebe mit der Titanplatte. Während der Latenzphase wurden, abgesehen von Wundkontrolle und Verbandwechsel (siehe 2.1.7), keine Manipulationen am Tier vorgenommen.

Die laterale Kallusdistraction begann an Tag 11 post-OP. In der zehntägigen Distractionphase wurde die Titanplatte zwei Mal pro Tag motorgesteuert um 0,275 mm (entsprechend 0,55 mm Distraction pro Tag) senkrecht zur Tibialängsachse vom Knochen abduziert. Die Gesamtlänge der Distraction belief sich auf 5,5 mm. Die Größe der einzelnen Distractionsschritte und die Gesamtlänge der Distraction folgten den Parametern der Studie zur lateralen Kallusdistraction mit einem osteokonduktiven Material, bei der das Verfahren erfolgreich implementiert wurde (Claes, Veeseer et al. 2010). Die Manipulationen wurden von

zwei Personen am stehenden Tier durchgeführt (Abb. 2.6 oben links). Das Schaf wurde von einer Person fixiert, während die zweite Person die Distraction bzw. zu späteren Zeitpunkten die zyklische Kompression durchführte. Das Tier wurde mit einem Halfterstrick am Boxengitter fixiert und längs gegen das Gitter gestellt. Dadurch wurden ein seitliches Ausbrechen und insgesamt übermäßige Bewegungen verhindert. Routinemäßig erfolgte nach Entfernung des Verbandes zunächst die visuelle Kontrolle der Hautdurchtrittsstellen auf Entzündungszeichen wie Rötung oder Schwellung und Ausfluss. Die separat beweglichen Hautplatten wurden vor einer Distraction nachjustiert, sodass sie geringfügig weiter entfernt vom Knochen waren als die Titanplatte. Die korrekte Verkabelung des Kraftsensors, das Aufsetzen des Stepper-Motors sowie die Bedienung der Software (Matlab, The Math Works, Inc.) zur Motorsteuerung wurden durch einen Ingenieur oder eine qualifizierte Hilfskraft vorgenommen. In Kürze beinhaltete dies: Einstöpseln des Kraftsensorkabels, dann Aufsetzen des Motoraufbaus und Klemmung an der Fixationskonstruktion. Nach Aktivierung der Motorsteuerung konnte der Schaft zur Übertragung der Bewegungen in der Höhe angepasst und durch Anziehen der Stellschraube mit der Titanplatte verbunden werden (Abb. 2.6 oben rechts). Durch Lösen der Feststellmutter wurde die Fixation der Titanplatte aufgehoben und die Bewegungsübertragung durch den Motor ermöglicht (Abb. 2.6 unten links). Zu diesem Zeitpunkt kontrollierte die Motorsteuerung die Einhaltung der korrekten Höhe der Titanplatte. Jede Distraction von 0,275 mm erfolgte komplett in einem Schritt mit vernachlässigbarer zeitlicher Verzögerung. Zur Ermittlung von Gewebematerialparametern im Verlauf der zehntägigen Distractionphase wurden die durch die Zugbewegung bei Distraction auftretenden Kräfte im Geweberegnerat ermittelt und als Kraft-Weg-Kurven aufgezeichnet. Das Augenmerk lag dabei auf der maximalen Kraft und dem nachfolgenden Kraftabfall durch Geweberelaxation. Vor jeder neuen Distraction wurde die verbliebene Kraft aus der vorangegangenen Distraction durch den Kraftsensor erfasst und aufgezeichnet. Mit diesem Wert und der Messung der initialen Relaxation bis mindestens 2 Minuten nach dem Distractionsvorgang konnte die Gesamtelaxation zwischen den Distractionsschritten interpoliert werden. Darüber hinaus konnten die akuten Auswirkungen einer Distraction auf das Geweberegnerat anhand von Kraft-Weg-Kurven aufgezeichnet werden. Die Messungen ergaben Hinweise auf die visko-elastischen Materialeigenschaften des Gewebes im Distractiongebiet. Nach Abschluss eines Distractionsvorgangs erfolgte in umgekehrtem Ablauf das Anziehen der Feststellmutter zur Fixierung der Titanplatte, bevor der Motor abgestellt und zusammen mit den Kabeln demontiert wurde. Regelmäßig wurde danach eine Säuberung der Hautdurchtrittsstellen mit in Octenisept® getränkten Kompressen vorgenommen. Den Tieren wurde nach jeder Manipulation ein neuer Verband mit Verbandwatte und Mullbinde angelegt (Abb. 2.6 unten rechts). Der Verband stellte eine Schmutzbarriere dar, welche vor allem in der frühen post-operativen Phase die Hautnaht und

die Durchtrittsstellen der Schanz-Schrauben und Hautplatte vor einer Keimbesiedelung und Wundinfektionen schützen sollte. Zudem konnte dadurch schmerzhaftes Scheuern oder Verletzungen v.a. im Bereich des Abdomens während der Liegephasen verhindert werden.

Die Maturationsphase nach Beendigung der Distraktionsphase repräsentierte den Beginn der Gewebereifung, in der die zunehmende Mineralisierung der knöchernen Zubildungen nach Distraction stattfand. In diesem Zeitraum blieben Manipulationen der Fixationskonstruktion und des distrahierten Gewebes aus. Normalerweise ist diese Phase zwei Mal so lang oder mehr als die eigentliche Distraktionsphase (Aronson and Shen 1994). Effekte durch die nachfolgende Applikation zyklischer Kompression sind an wenig maturiertem Gewebe mutmaßlich besser zu untersuchen. Für diese Studie wurde die Maturationsphase deshalb nach sieben Tagen durch die zyklische Kompression abgelöst.

Die zyklische Kompression begann an Tag 28 post-OP. Der Stepper-Motor wurde auch hierzu für die Dauer der Stimulation auf die Fixationskonstruktion geklemmt. Je nach Gruppe wurden durch die Titanplatte mit einer Amplitude von 0,1 mm (Gruppe 0.1) oder 0,6 mm (Gruppe 0.6) Druckbewegungen auf das Geweberegenerat appliziert. Die Bestimmung der Größe der Bewegungsamplitude war im Vorfeld mit den Parametern aus Claes und Heigeles quantitativer Differenzierungshypothese durch numerische Simulation der Knochenneubildung erfolgt (Claes and Heigele 1999). Für die kleine Amplitude wurden in der numerischen Simulation für die Versuchsdauer Dehnungen $< 5\%$, hydrostatischer Druck < 0.15 MPa und damit eine rein intramembranöse Ossifikation vorhergesagt. Für die größere Amplitude wurde zunächst eine Dehnung im Bereich einer prognostizierten chondralen Ossifikation angenommen. Im Laufe der zyklischen Kompression sollte durch Knochenneubildung und Verringerung der Weichgewebeschicht im Spalt eine für die Ossifikation kritische Dehnung von $> 16\%$ auftreten. Die Stimulation wurde an 18 aufeinanderfolgenden Tagen einmal täglich mit 120 Stimulationszyklen bei einer Frequenz von 2 Hz (Gruppe 0.1) bzw. 0,33 Hz (Gruppe 0.6) durchgeführt (Tabelle 2.1). Bereits 36 Zyklen mit Kompression eines intakten Knochens führen zu einer Zunahme der Mineraleichte und 50 Zyklen axialer Kompression in einem Osteotomiespalt führen zu einer verbesserten Heilung gegenüber Tieren mit rigide fixierten Osteotomien (Rubin and Lanyon 1987, Matsushita and Kurokawa 1998). Die Dauer der Stimulation betrug je nach Gruppe eine oder sechs Minuten. Die Unterschiede in Frequenz und Zeitdauer ergaben sich aus dem Bestreben, verlässliche Daten über die visko-elastischen Eigenschaften des Geweberegenerates während der zyklischen Kompression zu erlangen. In einem dynamischen Regime mit konstanter Dehnungsrate setzt sich die Dehnung aus der Summe plastischer und elastischer Dehnung zusammen. In einem statischen Regime hingegen wird nur die plastische Dehnung des Materials berücksichtigt. Da aufgrund der heterogenen Materialzusammensetzung des Geweberegenerates von plastischen und elastischen

Eigenschaften ausgegangen werden musste, wurde die Dehnungsrate bei den gewählten Amplituden konstant gehalten. Die 18 Tage andauernde zyklische Kompression sollte zusammen mit drei Tagen Pause vor der Tötung einen ausreichend langen Zeitraum für das Auftreten ausdifferenzierter Gewebe darstellen. Morphologische Unterschiede bei histologischer Beurteilung zwischen verschiedenen stabil versorgten Osteotomien wurden bei Schafen ab der dritten post-operativen Woche erkennbar (Schell, Epari et al. 2005). Die drei Tage Pause vor der Tötung sollten nachteilige Effekte durch eine Destruktion neugebildeten Knochens aufgrund der konstanten Bewegungsamplitude bei zunehmender Überbrückung des Spaltes reduzieren. In dieser Zeit sollte eine Regeneration zerstörter Knochen trabekel ermöglicht werden.

Tabelle 2.1 Unterschiede der Parameter Bewegungsamplitude, Dauer und Frequenz während der zyklischen Kompression zwischen den beiden Versuchsgruppen.

	Gruppe 0.1	Gruppe 0.6
Bewegungsamplitude	0,1 mm	0,6 mm
Dauer	1 min	6 min
Frequenz	2 Hz	0,33 Hz

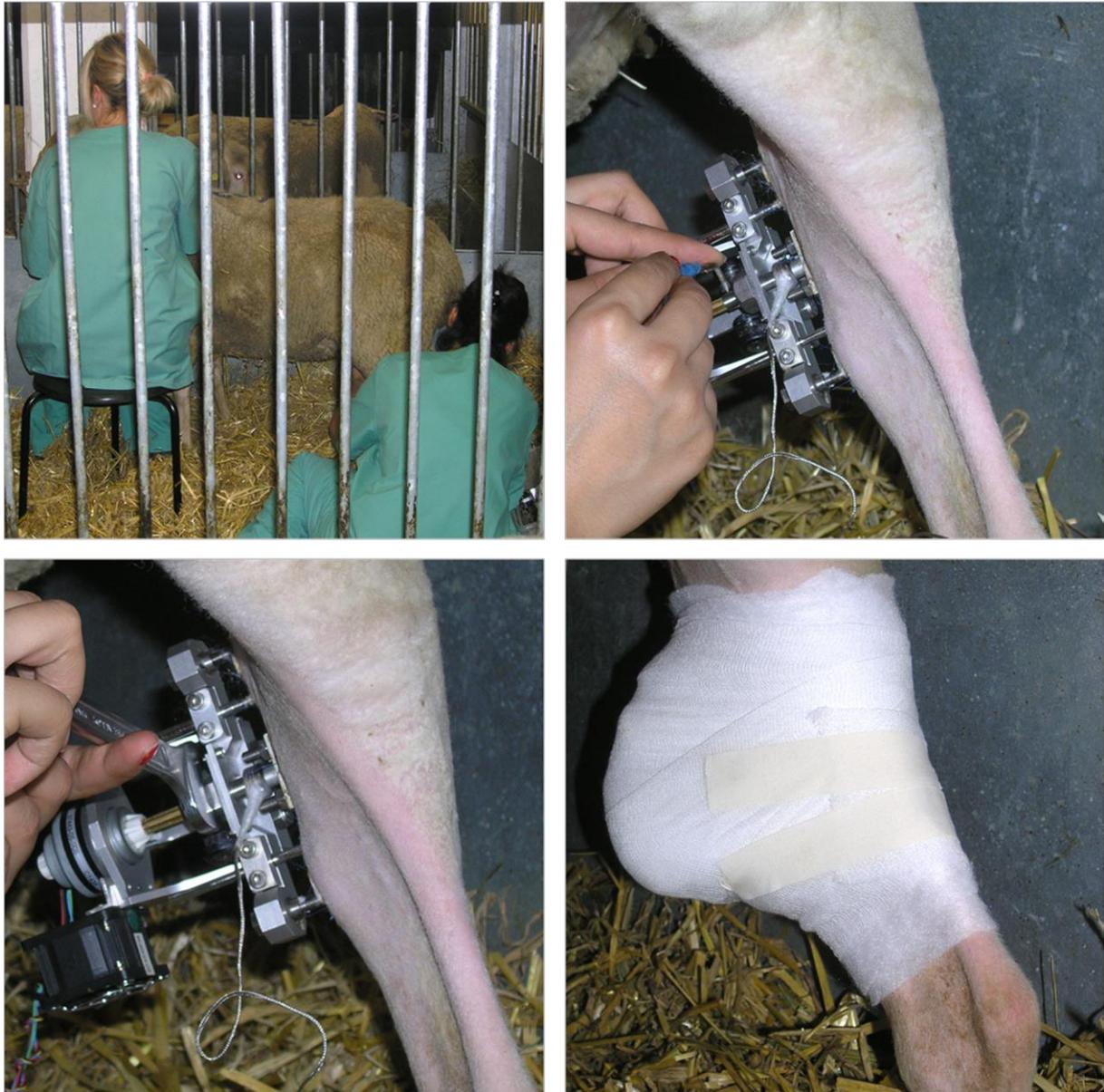


Abbildung 2.6 Illustration der Vorgehensweise während den Manipulationen (Distraction und mechanische Stimulation). Das Tier wurde stehend fixiert (oben links). Nach Entfernung des Verbandes und visueller Kontrolle erfolgten Verkabelung, Aufsetzen des Motors sowie Anpassung und Klemmung des Schaftes (oben rechts), anschließend das Lösen der Feststellmutter (unten links) und die Distraction oder zyklische Kompression. Nach Abschluss der Manipulation wurde ein neuer Verband angelegt (unten rechts).

2.1.9 Fluoreszenzfarbstoffinjektion

Fluoreszenzfarbstoffe können unter Licht spezifischer Wellenlängen in einen energetisch höheren Zustand versetzt werden. Beim Rückfall auf die niedrigere Energiestufe emittiert das Farbmolekül dann eine charakteristische Leuchtfarbe und kann als farbige Markierung unter dem Fluoreszenzmikroskop dargestellt werden. Die für diese Studie gewählten

Fluoreszenzfarbstoffe Calceingrün und Tetracyclin werden nach Injektion in neu mineralisiertes (knöchernes) Gewebe eingelagert und erlauben aufgrund unterschiedlicher Injektionszeitpunkte Hinweise auf die Knochenmineralisierung im zeitlichen Verlauf.

An Tag 24 post-OP wurden den Tieren 10 mg/kg Calceingrün intravenös in die *Vena auricularis lateralis* injiziert. Dies entspricht im Verlauf des Behandlungsprotokolls der Phase kurz vor Beginn der mechanischen Stimulation. An Tag 33 post-OP wurden den Tieren 25 mg/kg Oxytracyclinhydrochlorid (Ursocyclin®, Serumwerk Bernburg AG) erneut intravenös verabreicht. Da die Fluoreszenzfarbstoffe mit ca. vier Tagen Verzögerung eingelagert werden (Frost, Roth et al. 1961, Frost, Villanueva et al. 1961), sollten mit den gewählten Zeitpunkten Areale aktuell neu mineralisierten Gewebes zu Beginn und zur Mitte der Stimulationsphase ermittelt werden.

2.1.10 Tötung

Die Tötung der Tiere erfolgte an Tag 49 post-OP durch Betäubung mit Bolzenschuss und anschließendem Entbluten durch Eröffnung der *Aorta carotis communis*. Die Tötung wurde von einer Person mit der notwendigen Sachkunde durchgeführt.

2.2 Probenaufbereitung

Im Anschluss an die Tötung wurde jeweils die rechte Gliedmaße im *Articulatio coxae* abgetrennt und der weiteren Aufbereitung zugeführt.

Die Fixationskonstruktion wurde schrittweise demontiert und die Schanz-Schrauben heraus gedreht. Dazu wurde zunächst die Tibia knapp proximal und distal der Fixationskonstruktion abgesetzt und dann die Haut entlang der äußeren Abmessungen der Hautplatte umschnitten. Muskeln und anderes Weichgewebe wurden vorsichtig abpräpariert. Nach Lösen der Schraubverbindungen konnte die Fixationskonstruktion abgenommen werden. Die Titanplatte wurde mit Hilfe eines Skalpells vorsichtig vom Knochenregenerat abgetrennt und die Tibia mit einer Diamantbandsäge (EXAKT Advanced Technologies GmbH) durch zwei Transversalschnitte auf Höhe des proximalen und distalen Endes des Knochenregenerates gekürzt. Auf Höhe der ersten proximalen Lochreihe wurde ein weiterer Schnitt mit 1-2 mm Dicke vorgenommen, wodurch man eine Scheibe in Transversalebene erhielt. In weiteren Schritten erfolgte der Zuschnitt zunächst sagittal, um eine ebene Auflagefläche zu erhalten und dann entlang des kranialen und kaudalen Randes des Knochenregenerats. Schließlich wurde das verbleibende Präparat in Längsrichtung mittig zwischen den Lochreihen geteilt (Abb. 2.7). Die kraniale Hälfte wurde für die entkalkte Histologie mittels Paraffin und immunhistochemische Färbungen verwendet, die kaudale Hälfte für Röntgen, μ CT und zur

unentkalkten Histologie heran gezogen. Die Scheibe in Transversalebene wurde ebenfalls geröntgt und für die unentkalkte Histologie verwendet.

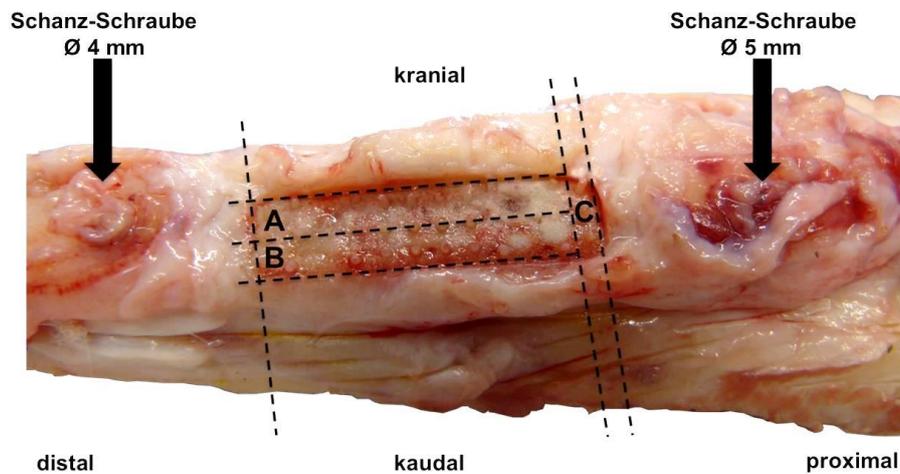


Abbildung 2.7 Schematische Darstellung der Sägeschnitte (gestrichelte Linien) zur Herstellung der Längsscheiben (A und B) und der Transversalscheibe (C) an der vorpräparierten Tibia nach Entfernung der Haut und Muskulatur (medio-laterale Aufsicht). Die Blockpfeile markieren die Eintrittsstellen der Schanz-Schrauben.

2.2.1 Röntgen

Vereinzelt wurden bei den Tieren im post-operativen Verlauf Röntgenaufnahmen mit einem portablen Röntgensystem (Ajex 140H, GeR - International) durchgeführt. Diese dienten vorrangig der Abklärung bei Verdacht auf Pintraktinfektionen und mögliche osteolytische Prozesse.

Post-mortem wurden jeweils vor Demontage der Fixationskonstruktion und nach Präparation und Zuschnitt Röntgenaufnahmen (MX-20, Faxitron Bioptics) der Geweberegenerationszone angefertigt. Zur Kontrolle der Spalthöhe zwischen Kortex und Titanplatte zu Versuchsende erfolgten Röntgenaufnahmen der abgesetzten Gliedmaße im kaudo-kranialen Strahlengang. Hierfür wurde die Fixationskonstruktion auf einen röntgendurchlässigen Aufbau geklemmt, sodass der Spalt mit standardisierter Projektion abgebildet werden konnte. Die Messung der Spalthöhe erfolgte im Bildverarbeitungsprogramm Adobe Photoshop (Adobe Systems Inc.) anhand einer bekannten Referenzgröße. Weitere repräsentative Röntgenaufnahmen *ex vivo* wurden von der Transversalscheibe und der für unentkalkte Schliffe vorgesehenen Längsscheibe angefertigt. Dabei wurde zur Darstellung der Knochenneubildung im Geweberegenerat mit folgender Einstellung belichtet: 25 kV, 19 sec.

2.2.2 Mikro-Computertomographie (μ CT)

Die Auswertung im μ CT diente der dreidimensionalen Erfassung knöcherner Strukturen im Geweberegnerat. Im μ CT können mineralisierte Bereiche nicht nur hochauflösend visualisiert sondern auch relevante Strukturparameter ermittelt und quantifiziert werden.

Gescannt wurden die frisch in Formalin fixierten Scheiben im μ CT (skyscan 1172, Bruker microCT) mit folgenden Einstellungen: Die gewählte *standard high*-Konfiguration gab eine Spannung von 100 kV bei 100 μ A und 2065 ms Belichtungszeit vor. Manuell wurde unter Durchleuchtung die Kamera so eingestellt, dass das Präparat gerade noch in seiner Gesamtheit abgebildet war und dann auf *Medium camera pixels* (2000 x 1048) gewechselt. Diese Einstellung entsprach einer Voxelgröße von ca. 15 μm^3 . Darüber hinaus wurde ein Aluminium/Kupfer-Filter aufgelegt. Das Präparat wurde möglichst waagrecht in Knet eingebettet, stehend fixiert und ohne Medium gescannt. Mit den gewählten Einstellungen betrug die Scanzeit jeweils ca. eine Stunde.

Nach Rekonstruktion des Datensatzes (NRecon, Bruker microCT) wurde das Bild in der dreidimensionalen Ansicht nochmals exakt waagrecht positioniert, um eine standardisierte Berechnung zu ermöglichen und ein *Volume of interest* (VOI) eingegrenzt. Mit der angepassten Ausrichtung wurde der Datensatz erneut rekonstruiert und als transaxialer Datensatz gespeichert.

Die Messungen der einzelnen Spikulahöhen wurden im Programm DataViewer (Bruker microCT) in der 3-D-Ansicht unter Darstellung der koronalen, sagittalen und transaxialen Ebene vorgenommen. Die Höhe wurde in der Lochmitte der einzelnen Markraumborungen von der Kortexebene aus vorgenommen und die maximale und mittlere Spikulahöhe für jedes Präparat bestimmt. Die Berechnung der Knochenstrukturparameter erfolgte mit einem gesonderten Analyseprogramm (CTAnalyser, Bruker micro-CT). Die unterste Schnittebene, welche zur Auswertung heran gezogen wurde (*bottom of selection*), war in der transaxialen Aufsicht als erster Schnitt im Regenerat ohne sichtbare, flächige Kortexanteile festgelegt. Die oberste Schnittebene (*top of selection*) wurde 3 mm oberhalb des *bottom of selection* angesetzt. Dies entsprach ca. 200 Schnitten. Die ROI beinhaltete die Länge der sieben mittleren Markraumborungen eines Präparates einschließlich jeweils der halben Strecke zu den benachbarten Bohrlöchern. Dies entsprach 21 mm in X-Achse. In Y-Achse wurde die doppelte Breite der Bohrlöcher, entsprechend 2,2 mm, mittig über der Bohrlochreihe angelegt. In Kombination mit den ausgewählten Schnitten in Z-Achse ergab sich ein standardisierter, quaderförmiger Raum (Abb. 2.9). In diesem Raum konnten die knöchernen Spikula, die aus den Bohrlöchern in den Spalt hinein wachsen, in ihrer Ausprägung beurteilt werden. Gleichzeitig wurden Effekte periostaler Reaktionen und von Scherbewegungen im Randbereich des Regenerates ausgegrenzt. Eine Beeinflussung der Ergebnisse durch ektopische Ossifikation aufgrund osteokonduktiver Eigenschaften der mit Hydroxylapatit

beschichteten Titanplatte wurde durch die Höhenbegrenzung von 3 mm eliminiert. Die untere Grauwertgrenze (*lower grey threshold*) wurde bei 50 festgesetzt. Die zur Auswertung herangezogenen Strukturparameter waren der relative Anteil von Knochen zum Gesamtgewebe (*bone volume per tissue volume* - BV/TV) in Prozent, die trabekuläre Dicke (*trabecular thickness* - Tb.Th.) in mm, die Trabekelanzahl (*trabecular number* - Tb.N.) als 1/mm und die Breite der Trabekelzwischenräume (*trabecular separation* - Tb.Sp.) in mm.

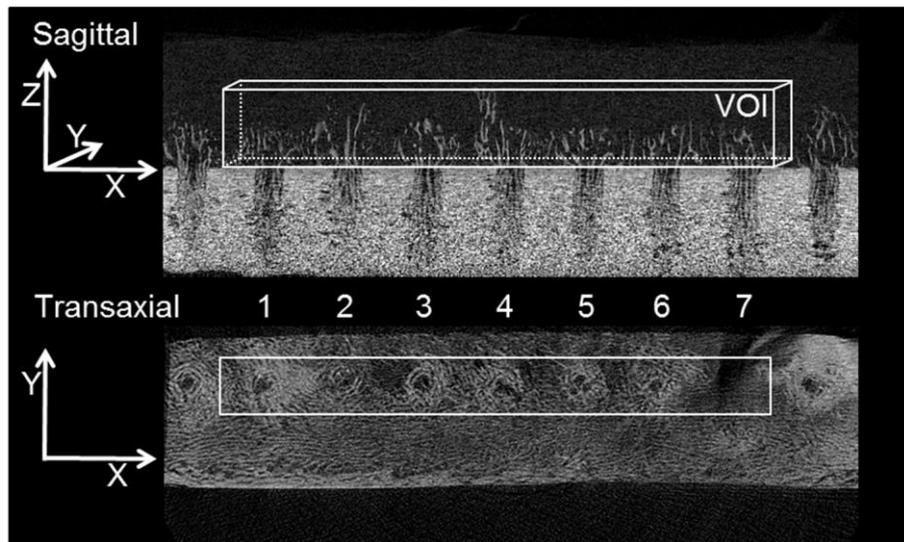


Abbildung 2.8 Eingrenzung der *Volume of interest* (VOI) zur Ermittlung der Strukturparameter aus den μ CT-Aufnahmen. Das VOI wird eingegrenzt anhand der sieben mittleren Bohrlöcher der Markraumborungen (X-Achse) und der doppelten Breite der Bohrlöcher (Y-Achse). Die Grundfläche erstreckt sich 3 mm in die Höhe (Z-Achse).

2.2.3 Histologie

Die histologischen und fluoreszenzhistologischen Untersuchungen wurden an unentkalkten Präparaten in der Trenn-Dünnschliff-Technik und weitergehende Histologie an entkalkten Paraffinschnitten vorgenommen. Die gewonnenen Geweberegenerate wurden nach dem Zuschnitt zur Fixierung in eine neutral gepufferte 4 % Formalinlösung (Otto Fischer GmbH & Co. KG) gegeben. Die Fixierung erfolgte unter ständiger Bewegung durch einen Schüttler über drei bis fünf Tage unter Lichtabschluss.

Die Herstellung der Trenn-Dünnschliff-Präparate begann nach der Fixierung mit der Entwässerung in einer aufsteigenden Alkoholreihe. Die Einbettung wurde dann in lichterhärtendem Einbettkunststoff aus Methacrylsäuremethylester (#4233.2, Carl Roth GmbH & Co. KG) vorgenommen. Nach Aushärtung der Kunststoffeinbettung wurden die Präparate vorgeschliffen und auf einen Objektträger geklebt. Vor der weiteren Verarbeitung wurde der Probenblock auf 200 μ m Dicke geschnitten. Daraufhin erfolgte das Schleifen der Proben bis zum Erreichen der angestrebten Schliffhöhe von ca. 70 μ m. Dazu

wurde unter wiederholter Kontrolle der Dicke ein Tischschleifgerät mit digitaler Wegsteuerung (EXAKT Advanced Technologies GmbH) verwendet. Die Schlitte wurden mit Paragon-Lösung (Waldeck GmbH) eingefärbt. Paragon ist eine Mischfärbung aus Toluidinblau und basischem Fuchsin. In Paragon-gefärbten Schlitten färbt sich Knochen je nach Mineralisierungsgrad ungefärbt-weiß bis rot-rosa an. Fibröses Gewebe, Bindegewebe, Gefäße und Osteoid zeigen sich (intensiv) blau bis violett gefärbt. Zellkerne und basophiles Zytoplasma sind tiefblau.

Für die Paraffinhistologie wurde das Geweberegenerat vor der Entkalkung der Proben unter fließendem Leitungswasser gewässert. Die Entkalkung erfolgte in einer EDTA-Lösung für ca. drei Monate bis zur Schneidbarkeit des Präparates. Zum Einbetten in Paraffin wurden die Geweberegenerate in einer aufsteigenden Alkoholreihe und Xylol wieder entwässert. Anschließend wurden sie in einer Form mit flüssigem Paraffin (Paraplast Plus®, #39502004, McCormick Scientific LLC.) eingegossen und ausgehärtet. Das Schneiden wurde an vorgekühlten Paraffinblöcken vorgenommen. Die Schnittdicke betrug 5-7 µm. Für das Anfärben der Paraffinschnitte wurde Safranin-O (Waldeck GmbH) verwendet. Die Mischfarbe aus Eisenhämatoxylin A+B und Echogrün markiert Areale mit Proteoglykaneinlagerung und wurde zur Bestimmung von Knorpelgewebe herangezogen.

Bei der qualitativen Beurteilung wurden die Dünnschliffe und Paraffinschnitte am Licht-Mikroskop (DMI6000B, Leica Microsystems GmbH) unter *brightfield*-Durchleuchtung bei verschiedenen Vergrößerungen (12,5x, 50x, 100x, 200x, 400x) morphologisch hinsichtlich Zelltypen, Entwicklungsstadium und Lokalisationen der Zellen im Präparat untersucht. Besonderes Augenmerk lag dabei auf Zellen im Bereich der Trabekel in den knöchernen Spikula sowie der Transitionszonen in das umgebende fibröse Gewebe. Die Beurteilung der Zellen sollte Auskunft über die Art der Ossifikation, Zellaktivität und Knochenbildungsfortschritt geben. Darüber hinaus wurden unter Polarisationslicht Aufnahmen der Dünnschliffe angefertigt, welche Aufschluss über Richtung, Verlauf und Bündelung kollagener Fasern liefern sollten.

Die einzelnen Strukturen wurden in den dargestellten Bildern einheitlich nach Dempster und Kollegen mit folgenden Abkürzungen gekennzeichnet: Knochen (B - *bone*), Knorpel (Ca - *cartilage*), Kortikalis (Ct - *cortex*), Fett (Fa - *fat*), fibröses Gewebe (Fb - *fibrous tissue*), kondensiertes Gewebe (Mc - *mesenchymal condensations*), Osteoid (O), Gefäße (V - *vessel*) (Dempster, Compston et al. 2013).

Die quantitative Beurteilung der histologischen Präparate diente der Erfassung unterschiedlich starken Auftretens vorgefundener Strukturen infolge entweder größerer oder kleiner Bewegungsamplitude und verschieden starker Dehnungen während der zyklischen

Kompression. Mit den histologischen Präparaten konnten in Abgrenzung zu radiologischen Methoden auch nicht mineralisierte Anteile im Regenerationsgebiet bestimmt werden. Insbesondere der Anteil fibrösen Gewebes, wie es bei Heilungsverzögerungen vorkommt (Schell, Epari et al. 2005), sowie die Durchblutungssituation, repräsentiert durch die Gefäßdichte, waren dabei von Interesse. Bei instabiler Osteosynthese kommt es zu einer Abnahme der Gefäßdichte (Lienau, Schell et al. 2005). Den formulierten Hypothesen zufolge wurde in der Gruppe 0.6 die Bildung von Knorpel erwartet.

Die histomorphometrische Auswertung zur quantitativen Beurteilung der Gewebeverteilung wurde an den Trenn-Dünnschliffpräparaten vorgenommen. Diese wurden unter *brightfield*-Durchleuchtung am Mikroskop (DMI6000B, Leica Microsystems GmbH) bei 100-facher Vergrößerung beurteilt. Dazu wurde ein Rasterokular mit 10 x 10 quadratischen Feldern verwendet (Abb. 2.9). Die Abmessungen des Rasters entsprachen bei der gewählten Vergrößerung 1 mm² *in realita*. Die zur Auswertung herangezogene *Region of interest* (ROI) war definiert als die Fläche aus der periostalseitigen Kortex oberhalb der mittleren vier Bohrlöcher eines Präparates (entsprechend 12 mm) und 3 mm in Höhe des Geweberegenerates (Abb. 2.10). Die Summe der Zählpunkte in der ROI betrug 3600. Mit der gewählten Anzahl an Zählpunkten konnte der erwartete prozentuale Anteil der untersuchten Gewebetypen mit einem Fehler von < 5 % bestimmt werden (Weibel 1963). Durch die Beschränkung auf zentral angeordnete Bereiche im Präparat sollten Effekte auf Gewebedifferenzierung und Knochenwachstum im Randbereich des Geweberegenerates eliminiert werden. Diese könnten aufgrund periostaler Reaktionen durch intra-operative Reizung oder ungewollte Scherbewegungen an den Außenabmessungen der Titanplatte entstehen. Die Unterteilung der Gewebetypen zur quantitativen Auswertung setzte sich folgendermaßen zusammen:

- Knochen
- Knorpel
- Fibröses Gewebe
- Fett
- Gefäße

Innerhalb der ROI wurden die Kreuzungspunkte des Rasters beurteilt und Knochen, Knorpel, Fett oder Gefäßen zugeordnet und gezählt. Die Bestimmung der Gewebezugehörigkeit erfolgte nach morphologischen Gesichtspunkten hinsichtlich (Matrix-) Farbe und Morphologie der Zellen. Als Knochen wurden Areale weißer bis rosa-roter Trabekel mit integrierten Osteozyten, sowie angrenzend dazu die tiefblau gefärbten Osteoid-Areale mit umgebenden Osteoblastensäumen definiert. Fettzellen waren große, ungefärbte Zellen mit kleinem, randständigem Zellkern. Als Gefäße wurden Hohlräume mit umgebenden Gefäßmuskelschichten respektive Gefäßmuskelanteile allein ohne Hohlraum erkannt.

Knorpel wurde in Arealen mit violetter Matrixfärbung und charakteristischen Schollen blasiger Zellen (hypertrophe Chondrozyten) erwartet. Alle übrigen Kreuzungspunkte, die nicht den obigen vier Geweben zugehörig waren, wurden als fibröses Gewebe bestimmt. Die Summe der Zählpunkte für jeden Gewebetyp aus der gesamten ROI wurde in Relation zur Gesamtzahl der Zählpunkte (3600) gesetzt und in Prozent der Gesamtzählpunkte ausgedrückt.

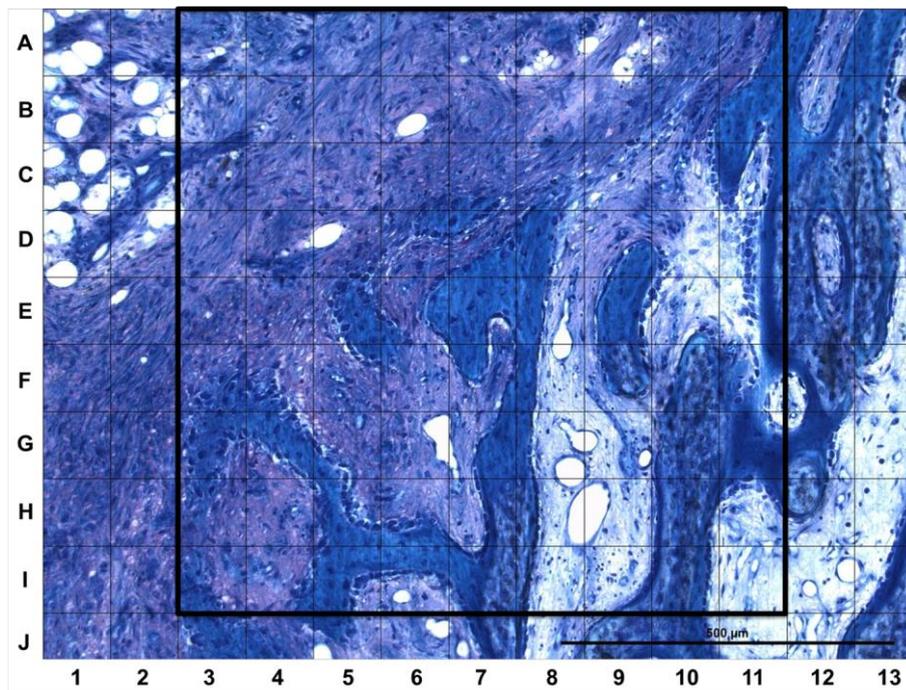


Abbildung 2.9 Ansicht der Rasterabmessung bei der zur Auswertung gewählten Vergrößerung. Jeder Kreuzungspunkt wurde einem von fünf Gewebetypen zugeordnet. Exemplarisch sind in A-D/1 des Koordinatensystems Fettzellen, in G-H/8-9 Anschnitte von Gefäßen, fibröses Gewebe im Bereich A-C/4-10, E-J/1-2, sowie Knochen und Osteoid in F-J/10, respektive G/11 zu finden. Paragon-Färbung, 100-fache Vergrößerung.

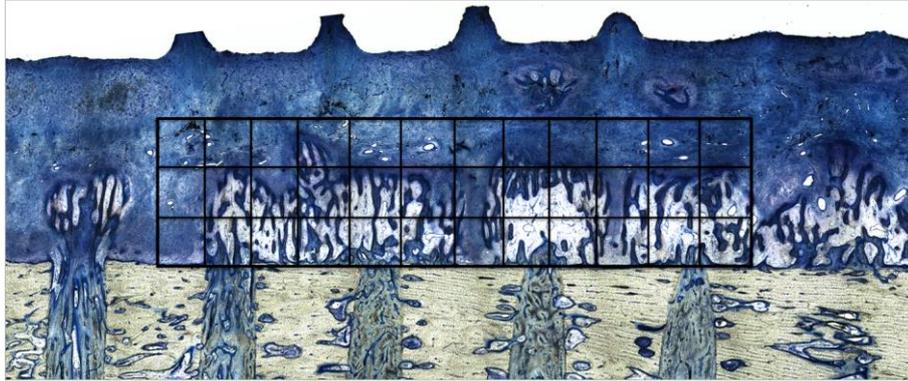


Abbildung 2.10 Darstellung der ROI bei der quantitativen Auswertung der Dünnschliffpräparate. Die schwarzen Linien markieren die Grenzen der ROI im Geweberegenerat und die 36 einzelnen Raster. Paragon-Färbung, 12,5-fache Vergrößerung, zusammengefügtes Bild.

2.2.4 Fluoreszenzhistologie

Die Auswertung der Fluoreszenzfärbungen wurde am Mikroskop (EL6000, Leica Microsystems GmbH) unter Fluoreszenzlicht mit folgenden Einstellungen vorgenommen: Gelbfilter (Exposition: 170 ms, Gain: 5,8, Intensität: 2), Grünfilter (Exposition: 30 ms, Gain: 4,2, Intensität: 3). Im Verarbeitungsprogramm Leica LAS AF wurden die Einzelbilder bei 50-facher Vergrößerung zusammengesetzt und die Bilder unter *brightfield*-, Gelb- und Grünfilter übereinandergelegt. Calceingrün stellte sich im Präparat als grün gefärbte Areale dar. Tetracyclin verursachte eine Gelbfärbung (Abb. 2.9). Das zusammengesetzte Bild wurde subjektiv hinsichtlich der Farbintensität, der angefärbten Fläche und Lokalisation der Fluoreszenzfarben im Präparat beurteilt. Zudem wurde exemplarisch die Höhe der jeweiligen Farbmarkierung im Geweberegenerat ausgehend von der Ebene der Kortexoberfläche ermittelt. Hierzu wurde das gescannte Präparat in einem Bildbearbeitungsprogramm (Adobe Photoshop, Adobe Systems Inc.) vermessen.

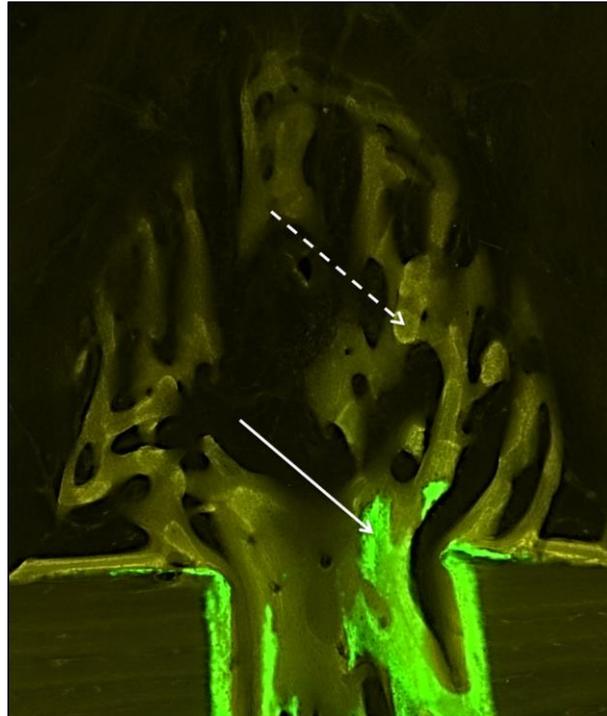


Abbildung 2.11 Beispiel der charakteristischen Grünfärbung des Fluoreszenzmarkers Calceingrün (Pfeil) und der Gelbfärbung durch Tetracyclin (gestrichelter Pfeil).

2.2.5 Immunhistochemie

Immunhistochemische Färbungen basieren auf der Bindung spezifischer Antikörper an gesuchten Antigenen in einem Gewebeschnitt und einer enzymatisch verursachten Färbung bzw. einem Farbumschlag an den Antigen-Antikörper-Komplexen zur Visualisierung der Bindungsstellen. Gehen die Antikörper auf die Produktion eines einzigen B-Lymphozyten zurück und richten sich dabei gegen ein einzelnes Antigenepitop auf der Zelloberfläche, spricht man von monoklonalen Antikörpern. Polyklonale Antikörper dagegen richten sich gegen verschiedene Antigenepitope.

In der vorliegenden Studie wurde Runx2, essentieller und spezifischer Transkriptionsfaktor osteogen determinierter Zellen, markiert (Papachroni, Karatzas et al. 2009). Weiterhin wurden Sox9 sowie Kollagen Typ II untersucht. Sox9 ist Indikator früher chondrogener Differenzierung und wird in Osteochondroprogenitorzellen exprimiert. Kollagen Typ II ist ein von chondrogenen Vorläuferzellen exprimiertes Matrixprotein (Lefebvre and Smits 2005). Mit den gesuchten Antigenen sollte die Differenzierung von Vorläuferzellen der osteogenen bzw. chondrogenen Linie zu einem frühen Zeitpunkt visualisiert werden, wenn Zellmorphologie und Matrix noch keine Hinweise lieferten. Weiterhin konnte anhand der Matrixproduktion die metabolische Aktivität der Zellen studiert werden. Für die Immunhistochemie wurden Paraffinschnitte mit 5 μm Schnittdicke verwendet. Als Primärantikörper wurde ein im Kaninchen synthetisierter monoklonaler Antikörper, anti-Runx2 (#8486, Cell Signaling

Technology) eingesetzt. Die anderen Primärantikörper anti-Sox9 (NBP2-24659, Novus Biologicals LLC) und anti-Kollagen Typ II (#600-401-104, Rockland Immunochemicals Inc.) waren ebenfalls im Kaninchen hergestellte polyklonale Antikörper (Tabelle 2.2).

Tabelle 2.2 Übersicht der verwendeten Primärantikörper bei der Immunhistochemie

	Hersteller und Bezeichnung	Wirtspezies	Klonierung	Bekannte Reaktivität
Runx2	Cell Signaling Technologies, RUNX2 (D1H7) Rabbit mAb #8486	Kaninchen	monoklonal	Mensch, Maus, Ratte, Primaten
Sox9	Novus Biologicals, NBP2-24659 Sox9 Antibody	Kaninchen	polyklonal	Mensch, Maus, Ratte, Hund, Katze, Ziege, Primaten
Kollagen Typ II	Rockland, Anti-Collagen Type II (RABBIT) Antibody - 600-401-104-0.1	Kaninchen	polyklonal	Mensch, Maus, Ratte, Rind, Schaf

Die Schnitte wurden zunächst für eine Stunde bei 37° C und dann noch 15 min bei 60° C im Wärmeschrank vorbereitet. Nach Deparaffinierung und Rehydrierung in Xylol und absteigender Alkoholreihe wurde mit Citratpuffer (10mM, pH 6,0) bzw. *Target Retrieval Solution* (DAKO Agilent Technologies) im Wasserbad bei 85°C für 20 min die Demaskierung der Antigenepitope vorgenommen. Endogene Peroxidaseaktivität wurde über 15 min mit 3% H₂O₂ in Methanol gestoppt. Die Blockierung unspezifischer Antikörperbindung erfolgte für 60 min mit 10 % Ziegen-Serum (#005-000-121, Jackson ImmunoResearch Inc.) in TBS (60,55 g TRIS + 88 g NaCl in 1 l Aqua dest., pH 7,6) bzw. TTBS (0,1 % Triton X-100 in TBS) bei 37° C. Der Primärantikörper wurde in einer Verdünnung von 1:100 in TTBS mit 1 % Ziegen-Serum bei 4° C über Nacht in einer Feuchtkammer inkubiert. Als Negativkontrolle diente Kaninchen-IgG in gleicher Stammlösung. Nach dreimaligem Waschen mit TBS erfolgte die Applikation des biotinylierten Sekundärantikörpers (#B2770, Life Technologies) 1:200 in TTBS + 1 % Ziegen-Serum für 30 min bei Raumtemperatur. Nach wiederholtem Waschen in TBS/TBST wurden die Präparate für weitere 30 min bei Raumtemperatur mit einem Avidin-Biotin-Komplex (Vectastain ABC Kit#PK-6200, Vector Laboratories) versetzt und nach Waschen mit dem Substrat Nova Red (Vector #SK-4800, Vector Laboratories) für 5-7 min inkubiert. Die Reaktion wurde mit destilliertem Wasser abgestoppt, die Gegenfärbung mit Hämatoxylin (#2C-306, Waldeck GmbH & Co. KG) 1/5 verdünnt vorgenommen. Nach

Wässern und Dehydrierung in aufsteigender Alkoholreihe konnten die Präparate in nichtwässrigem Medium (Vitro-Clud, #04-0001, R. Langenbrinck GmbH) fixiert werden.

Die gefärbten Schnitte wurden unter *brightfield*-Durchleuchtung am Mikroskop (DMI6000B) bei 12,5-, 50- und 100-facher Vergrößerung ausgewertet. Als Transkriptionsfaktoren sind Antigenfärbungen für Runx2 und Sox9 im positiven Fall immer im Zellkern zu sehen. Kollagen Typ II als Matrixprotein ist sowohl intrazellulär als auch extrazellulär zu beobachten. Die Färbung war mit dem gewählten Substrat als rot-braune Markierung zu erkennen.

2.3 Statistik

Die statistische Auswertung der quantitativen Daten aus μ CT und Histomorphometrie erfolgte mit der Statistik-Software GraphPad Prism (GraphPad Software, Inc). Die Einzeldaten einer jeden Versuchsgruppe wurden mit Hilfe des Shapiro-Wilk-Tests (<http://sdittami.altervista.org/shapirotest/ShapiroTest.html>) auf ihre Normalverteilung überprüft. Im Falle normalverteilter Daten wurden die einzelnen Parameter mit einem ungepaarten, doppelten *t*-Test unter Verwendung der Mittelwerte auf statistische Signifikanz überprüft. Bei nicht normalverteilten Daten wurde ein Mann-Whitney-U-Test mit Vergleich der Medianwerte angewendet. Der Signifikanzlevel wurde mit $\alpha = 0,05$ angesetzt. Zur Vermeidung einer α -Kumulation wurde die Statistik mit der Bonferroni-Holm-Korrektur angepasst.

3 Ergebnisse

3.1 Tierversuch

Im Vorversuch kam es bei zwei Tieren zu Frakturen der operierten Gliedmaße. Sie traten jeweils noch vor Beginn der Stimulationsphase auf. Die Tiere wurden entsprechend der Bestimmungen im Tierversuchsantrag euthanasiert. Die Präparation der frakturierten Gliedmaße ergab Hinweise darauf, dass die Frakturen bei beiden Tieren von der distalen Schanz-Schraube ausgingen. Daraufhin wurde im Hauptversuch distal auf dünnere Schanz-Schrauben mit 4 mm Durchmesser umgestellt.

Im Hauptversuch musste ein Tier aufgrund starker Wundsekretion, die zu einer Blockade der Mechanik führte, aus dem Versuch genommen werden. Zur Auswertung wurden 11 Tiere herangezogen, die sich folgendermaßen auf die Gruppen verteilten: Gruppe 0.1 mit $n = 5$ und Gruppe 0.6 mit $n = 6$. Aufgrund von Färbeartefakten, die bei der Herstellung der histologischen Präparate entstanden waren, konnten bei der histomorphometrischen Analyse lediglich $n = 4$ (Gruppe 0.1) und $n = 5$ (Gruppe 0.6) beurteilt werden.

3.1.1 Operation und Nachsorge

Die Operationen verliefen bei allen Tieren ohne besondere Zwischenfälle und die Tiere erholten sich gut. Bereits ca. eine Stunde nach Narkoseende erfolgten Aufstehversuche und die Tiere begannen zügig zu fressen. Die meisten Tiere zeigten in den ersten beiden Tagen post-OP eine geringgradige Lahmheit der operierten Gliedmaße. Alle Tiere waren drei Tage nach der Operation lahmheitsfrei.

Bis ca. zehn Tage nach der Operation kam es an den Hautdurchtrittsstellen zu einer meist geringgradigen blutig-serösen Sekretion, welche im Rahmen der routinemäßigen Reinigung der Hautdurchtrittsstellen entfernt wurde. Andauernde oder purulente Sekretion wurde nicht beobachtet und es kam zu keinen Schraubenlockerungen im Versuchszeitraum. Die Wundheilung verlief komplikationslos. Die Nähte verblieben bis Versuchsende *in situ*.

3.1.2 Distraction und zyklische Kompression

Die Manipulationen wurden nach sehr kurzer Gewöhnungsphase von ein bis zwei Tagen gut toleriert. Die Tiere zeigten weder bei Distaktions- noch bei Stimulationsvorgängen Zeichen von Schmerzen.

Bei zwei Tieren kam es im Laufe der Versuchsdauer zum Ausfall des Kraftsensors. Bei einem der beiden Tiere wurde unter Sedation mit 0,2 mg/kg KG Xylazin ein Austausch des Kraftsensors vorgenommen. Der Austausch erfolgte noch vor Beginn der Distraction.

3.2 Probenaufbereitung

Bei der Präparation der Gliedmaße fiel bei zwei Tieren ein Abknicken der distalen Schanz-Schraube an der Gewindebasis auf, das aber augenscheinlich keinen Einfluss auf die Bewegungsübertragung der Titanplatte genommen hatte. Die Schanz-Schrauben wiesen zu Versuchsende bei allen Tieren einen festen Sitz auf und zeigten keine Hinweise auf Lockerung. Die Hautnaht und die Hautdurchtrittsstellen waren reaktionslos, teilweise mit geringgradigen krustigen Auflagerungen. Im Bereich der Fixationskonstruktion zeigten sich subkutan mittelgradige bis zum Teil hochgradige Zubildungen eines derben, in Abschnitten mineralisierten Bindegewebes. Die Hautplatten waren von den Zubildungen fest umschlossen (Abb. 3.1). Das Bindegewebe wucherte bis an die Grenzen des Geweberegenerates und musste entlang der Grenzlinien scharf getrennt werden. Die Titanplatte war mit dem Geweberegenerat fest verbunden und konnte nur nach vorsichtiger Präparation mit dem Skalpell abgelöst werden. Die Geweberegenerate wiesen an ihrer Oberfläche noppenartige Erhebungen auf, welche mit den Löchern in der Titanplatte korrelierten und auf einen Durchtritt des neugebildeten Gewebes schließen ließen (Abb. 3.2). In manchen Präparaten, insbesondere der Gruppe 0.6, zeigten sich an der Oberfläche weißliche, korallenförmige und druckfeste Areale, die mineralisierte Bereiche direkt unter der Titanplatte darstellten (Abb. 3.2). Weiterhin konnten in manchen Präparaten Einblutungen im Regenerat beobachtet werden, die sowohl bei Manipulationen im Versuch als auch perimortal entstanden sein könnten.

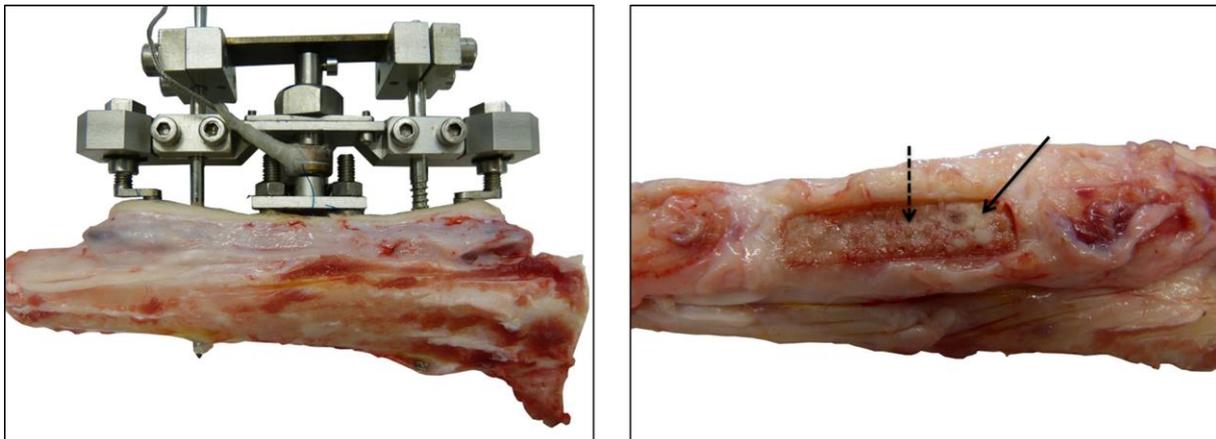


Abbildung 3.1 Teilpräparierte Gliedmaße ohne Haut und Muskulatur in kaudo-kranialer Aufsicht (links) und nach Demontage der Fixationskonstruktion in medio-lateraler Aufsicht (rechts). Zu sehen ist eine starke Bildung von Bindegewebe, welche die Hautplatte und das Geweberegenerat umschließt und bis an die Grenzen des Geweberegenerates heran reicht. An der Oberfläche des Geweberegenerates findet man weißliche, korallenförmige Areale mineralisierten Gewebes unter der Titanplatte (Pfeil) und noppenartige Erhebungen durch Gewebe in den Titanplattendurchtritten (gestrichelter Pfeil).

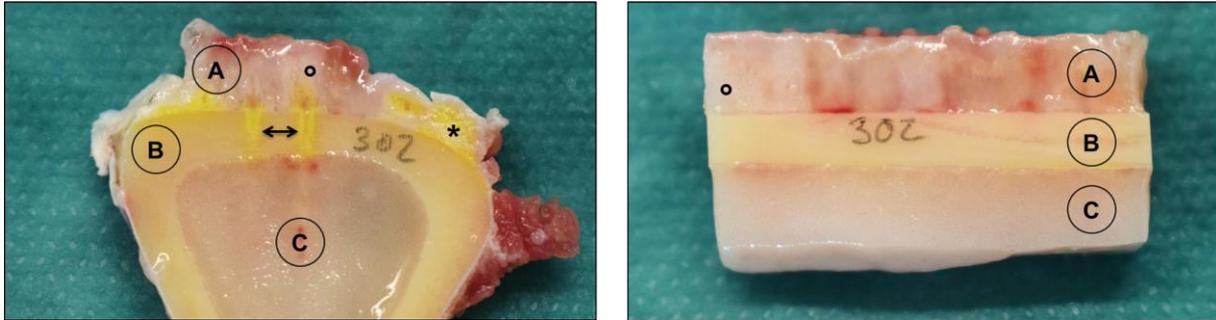


Abbildung 3.2 Transversale (links) und sagittale (rechts) Schnitte nach Abschluss der Präparation. Zu sehen sind das Geweberesgenerat im Anschnitt (A), die Kortex (B) und der Markraum (C). In der Kortex fallen die zwei Markraumborungen (Doppelpfeil) auf, welche sich infolge der Tetracyclin-Injektion bereits makroskopisch gelb anfärben. In Verlängerung der Bohrlöcher sind im Geweberesgenerat undeutlich die Spikula zu erkennen (°). Im Randbereich ist neu mineralisiertes Gewebe aufgrund periostaler Reaktion zu sehen (*).

3.2.1 Röntgen

Die röntgenologische Betrachtung *in vivo* lieferte bei den Tieren im Vorversuchsstadium bis zum Beginn der Stimulationsphase keine Hinweise auf beginnende Mineralisation im Spalt. Um die Schanz-Schrauben war im Bereich der Kortizes eine leichte Aufhellung zu beobachten, die jedoch nicht mit einer Lockerung der Schraube assoziiert war (Abb. 3.3). Die Aussagekraft hinsichtlich neugebildeten Knochens blieb *in vivo* aufgrund der schwierigen Projektion eingeschränkt. Im Hauptversuch wurden routinemäßige Röntgenuntersuchungen während des Tierversuchs daher unterlassen.

Die Messung der Spalthöhe mit Hilfe der standardisierten Faxitron-Aufnahmen ergab Spalthöhen zu Versuchsende von im Median 4,8 mm (Minimum 3,9 mm; Maximum 5,5 mm; unteres Quartil 4,4 mm; oberes Quartil 5,45 mm).

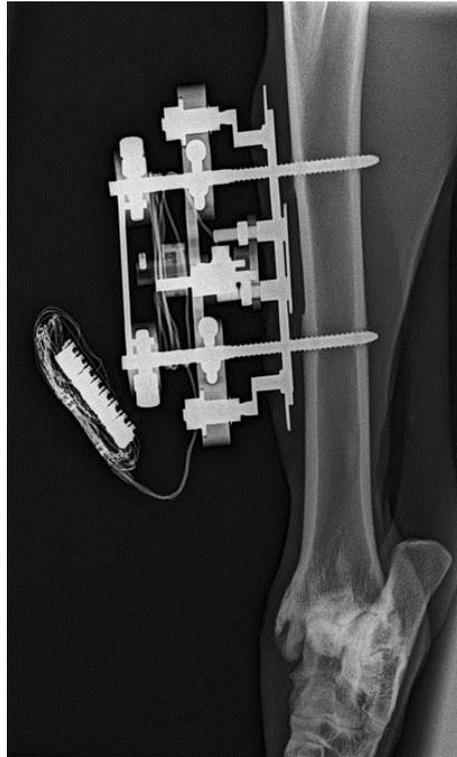


Abbildung 3.3 Röntgenaufnahme *in vivo* bei einem Vorversuchstier einen Tag vor Beginn der zyklischen Stimulation (56 kV, 1,2 mAs, oblique kaudo-kraniale Projektion). Zu diesem Zeitpunkt gab es radiologisch keine Hinweise auf eine beginnende Mineralisation. An der distalen Schanz-Schraube ist ipsi- und kontralateral der Fixationskonstruktion eine geringgradige Aufhellung im Bereich der Kortizes zu erkennen, die symptomlos blieb.

Die post-mortalen Röntgenaufnahmen zeigten bei Tieren der Gruppe 0.6 im Geweberegenerat deutlich vermehrte röntgendichte Anteile als in der Gruppe 0.1 (Abb. 3.4). Bei Gruppe 0.6 erstreckten sich mineralisierte Bereiche von der Kortex weit in das Geweberegenerat und erzielten bei einem Tier dieser Gruppe eine komplette Überbrückung des Spalts. Die mineralisierten Bereiche stellten neugebildeten Knochen in Form von Spikula dar. Die Spikula konnten in ihrer Lokalisation den Bohrlöchern der Markraumbohrungen zugeordnet werden und waren oberhalb und in Verlängerung dieser in den Spalt hineingewachsen. Insgesamt waren die Spikula bei Tieren mit größerer Amplitude gleichmäßiger über die gesamte Breite des Geweberegenerates verteilt als bei Tieren der kleinen Amplitude. Unter der größeren Amplitude hatten die knöchernen Spikula ein charakteristisches zapfenförmiges oder kegelförmiges Erscheinungsbild und waren zumeist an den Zugbewegungen der Distraction ausgerichtet. In basisnahen Bereichen waren die Spikula in der Regel miteinander verbunden, an der Spitze häufig deutlich voneinander abgrenzbar. In der Gruppe 0.1 zeigte sich ein heterogenes Erscheinungsbild mit Spikula geringerer Höhe als bei Gruppe 0.6 oder einem nahezu völligen Ausbleiben knöcherner

Neubildung. Diffuse, wellenförmige Schichten mineralisierten Gewebes, die der Kortex auflagen, waren in der Röntgenprojektion nicht eindeutig von Mineralisierung bzw. knöcherner Neubildung im Randbereich des Distraktionsfeldes abzugrenzen.

In allen Präparaten waren die röntgenologisch sichtbaren Knochenneubildungen morphologisch der Waben-Struktur von Geflechtknochen ähnlich. Die einzelnen Trabekel wiesen keine augenscheinliche Orientierung auf. Vereinzelt waren mineralisierte Bereiche der Titanplatte angrenzend am oberen Rand des Geweberegenerates zu sehen. Sie stellten isolierte knöcherne Neubildungen dar. Zudem konnten stark röntgendichte Flecken im Geweberegenerat erkannt werden, die als Abrieb der Hydroxylapatitbeschichtung interpretiert wurden.

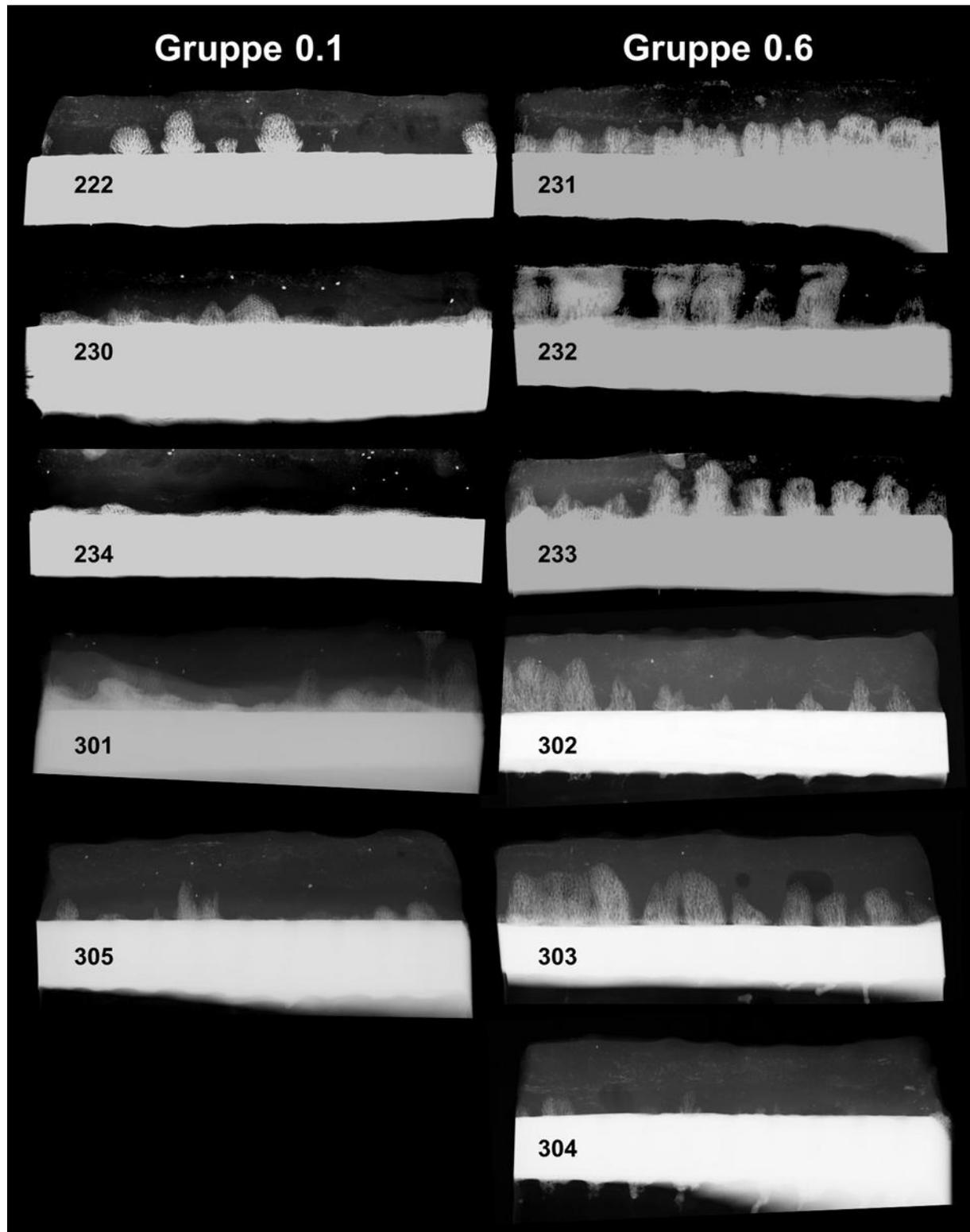


Abbildung 3.4 Aufstellung post-mortaler Faxitron-Röntgenaufnahmen der in die Auswertung genommenen Tiere. Die Tiere der Versuchsgruppe Gruppe 0.1 befinden sich in der linken Spalte, die Tiere der Versuchsgruppe Gruppe 0.6 in der rechten.

3.2.2 Mikro-Computertomographie (μ CT)

Die qualitative Beurteilung der μ CT-Scans unterstützte und ergänzte in morphologischer Hinsicht die Eindrücke der Röntgenaufnahmen. Dabei konnten mineralisierte Strukturen räumlich zugeordnet werden und einzelne Schnittebenen im Präparat dargestellt werden (Abb. 3.5 - 3.7).

Der Hauptteil neugebildeten Knochens erstreckte sich in einer Linie oberhalb der Bohrlochreihe, mit der höchsten Ausprägung zumeist in Verlängerung der Bohrlochachse. In Übereinstimmung mit den Röntgenaufnahmen zeigten sich deutliche Unterschiede in Anzahl, Höhe und Regelmäßigkeit der knöchernen Spikula zwischen den Versuchsgruppen. Die Präparate aus Gruppe 0.6 zeigten augenscheinlich mehr Knochen im Geweberegenerat als aus Gruppe 0.1. Auffällig waren zudem intra-individuelle Unterschiede bei der Verteilung und Höhe der Knochenspikula in den einzelnen Präparaten. Dabei war keine Regelmäßigkeit oder ein spezifisches Verteilungsmuster feststellbar. Die Spikula wiesen zentral über dem Bohrloch häufig einen Hof nicht-mineralisierter Bereiche auf. In Verlängerung der Bohrlochachse waren die Trabekel deutlicher in Zugrichtung der Kallusdistraction orientiert als in den peripheren Bereichen der Spikula.

Die Bohrlöcher der Markraumborungen waren überwiegend mit Knochen aufgefüllt. Das Ausmaß der knöchernen Neubildung in den Bohrlöchern schien mit der Menge neugebildeten Knochens im Geweberegenerat positiv zu korrelieren. In den Präparaten der Gruppe 0.6 war häufig eine nahezu vollständige Mineralisierung der Bohrlöcher zu beobachten. Der Knochen in den Bohrlöchern war senkrecht zu den Lamellen der Kortex in Verlängerung der Titanplattenbewegung ausgerichtet und mit Hohlräumen durchsetzt. Die kortikalen Anteile unterhalb des Geweberegenerates waren teilweise porös, insbesondere in direkter Nachbarschaft zu den Bohrlöchern und in endostal-nahen Bereichen. In peripheren Abschnitten der Präparate zeigte sich starke, zum Teil wuchernde knöcherne Neubildung, die ins Geweberegenerat hineinragte. In kortexfernen Arealen des Geweberegenerates nahe der Titanplatte war vereinzelt ektopische Knochenneubildung zu erkennen.

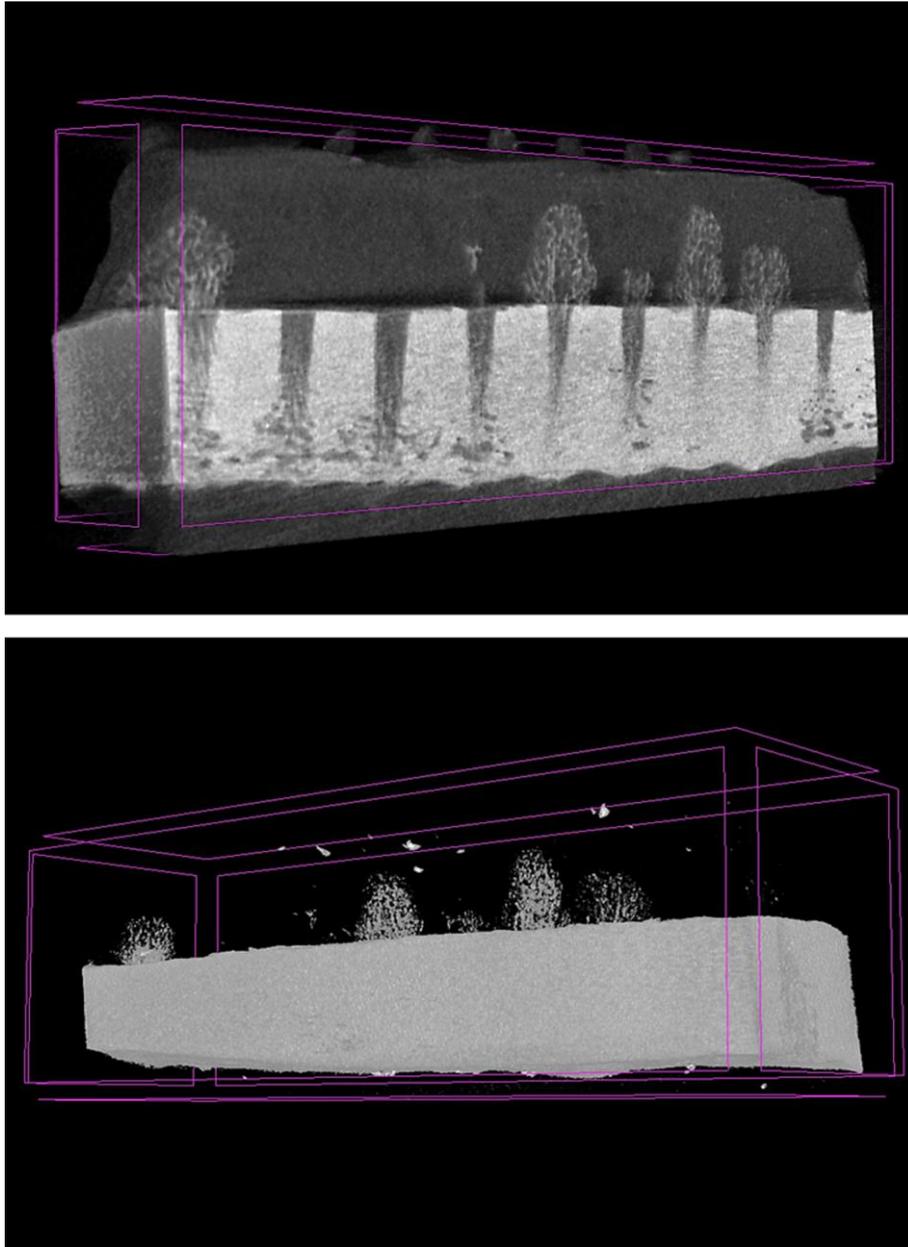


Abbildung 3.5 Darstellungen eines typischen Präparates der Gruppe 0.1 unter Verwendung verschiedener Grauwertschwellen bei der 3-D-Rekonstruktion.

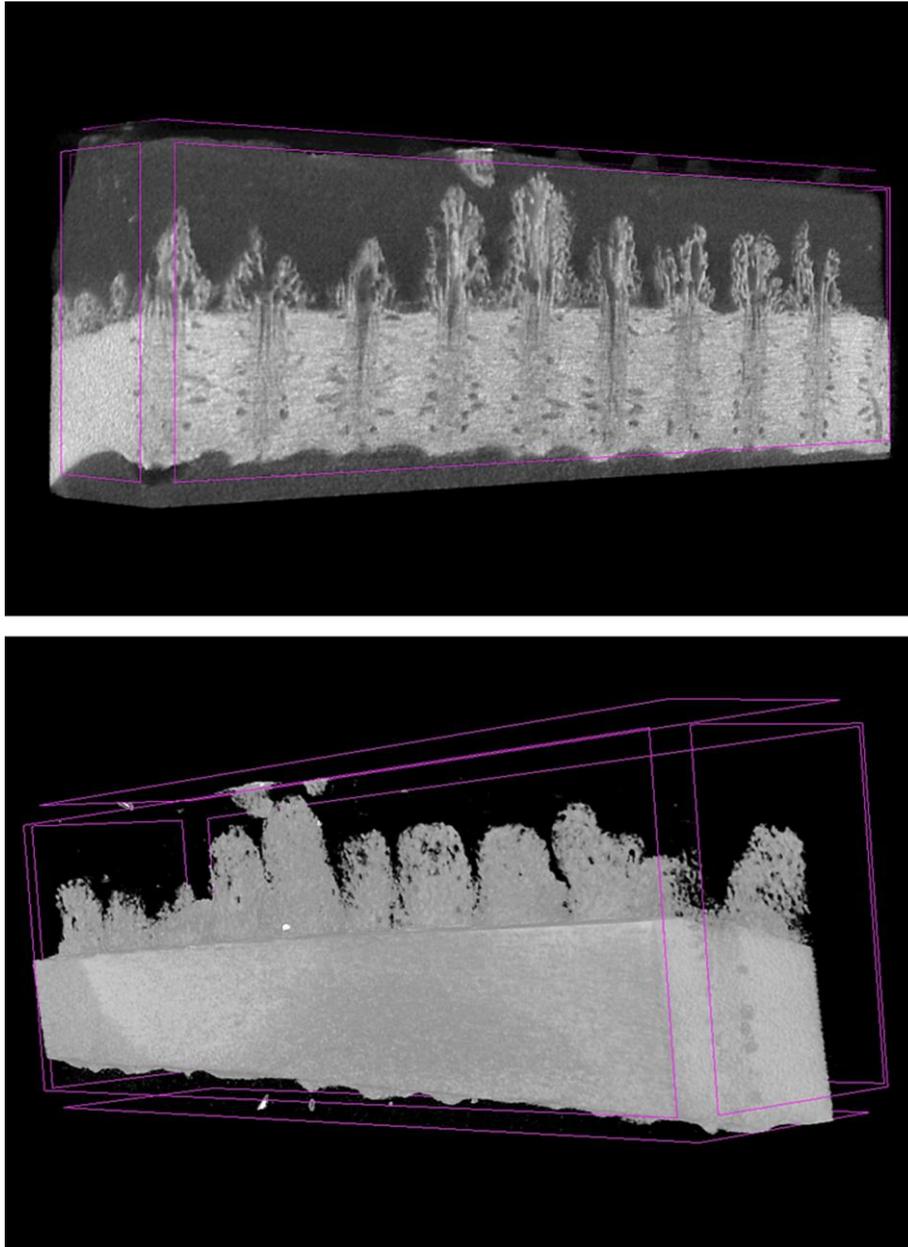


Abbildung 3.6 Darstellungen eines typischen Präparates der Gruppe 0.6 unter Verwendung verschiedener Grauwertschwellen bei der 3-D-Rekonstruktion.

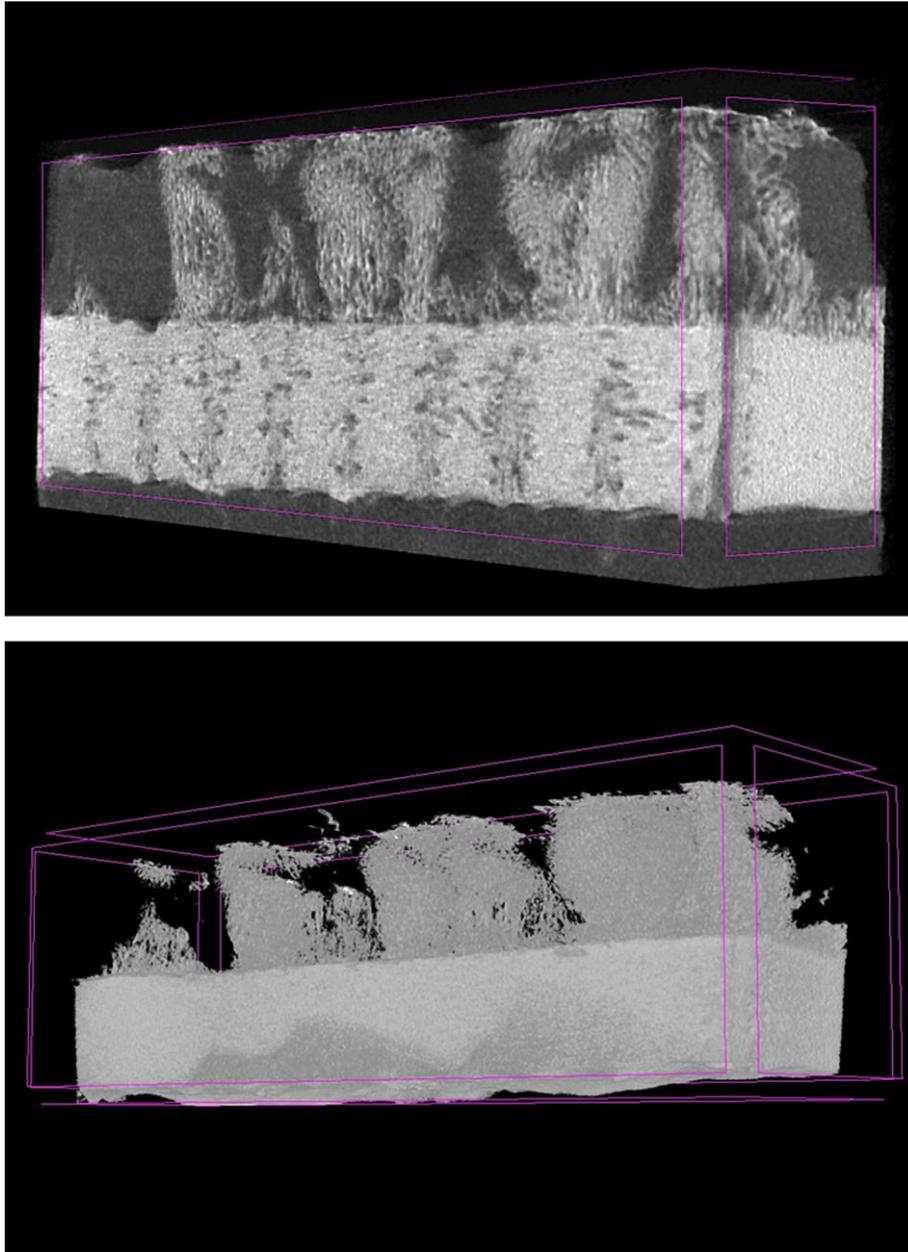


Abbildung 3.7 Darstellungen eines Präparates der Gruppe 0.6 mit vollständiger Überbrückung des Spalts unter Verwendung verschiedener Grauwertschwellen bei der 3-D-Rekonstruktion.

Die quantitative Auswertung der μ CT-Daten bestätigte den Eindruck der adspektorischen Beurteilung und zeigte deutliche Unterschiede bei nahezu allen untersuchten Knochenstrukturparametern (Tabelle 3.1). Das relative Knochenvolumen (BV/TV) war signifikant unterschiedlich zwischen den beiden Versuchsgruppen und unter größerer Amplitude ungefähr vierfach höher als unter Applikation der kleinen Amplitude ($p = 0,03$) (Abb. 3.8).

Auch die trabekuläre Dicke (Tb.Th.) ergab mit einer Steigerung von über 60 % signifikant höhere Werte in der Gruppe 0.6 ($p = 0,006$) (Abb. 3.9).

Die mittlere Trabekelanzahl (Tb.N.) war unter größerer Amplitude mehr als doppelt so groß als unter kleiner Amplitude. Nach Bonferroni-Holm post-hoc Test waren die Unterschiede zwischen Gruppe 0.1 und Gruppe 0.6 jedoch nicht mehr signifikant (Abb. 3.10).

Lediglich die Trabekelzwischenräume (Tb.Sp.) zeigten keine maßgeblichen Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen (Abb. 3.11).

Tabelle 3.1 Auflistung der individuellen Einzeldaten aus den Knochenstrukturparameter-Messungen im μ CT. Angegeben sind zudem der Mittelwert (MW) und die Standardabweichung (SD) für beide Versuchsgruppen.

Gruppe 0.1							MW	SD
BV/TV in %	2,7	2,2	3,9	7,7	9,5		5,2	3,2
Tb.Th. in mm	0,06	0,06	0,05	0,07	0,09		0,06	0,02
Tb.N. in 1/mm	0,46	0,39	0,85	1,09	1,09		0,78	0,34
Tb.Sp. in mm	0,71	0,50	0,19	0,54	0,17		0,42	0,23
Gruppe 0.6							MW	SD
BV/TV in %	13,2	37,5	17,0	27,7	17,8	3,4	19,4	11,8
Tb.Th. in mm	0,08	0,13	0,12	0,10	0,09	0,10	0,10	0,02
Tb.N. in 1/mm	1,58	2,80	1,47	2,87	1,88	0,35	1,82	0,94
Tb.Sp. in mm	0,29	0,25	0,42	0,11	0,45	0,32	0,31	0,12

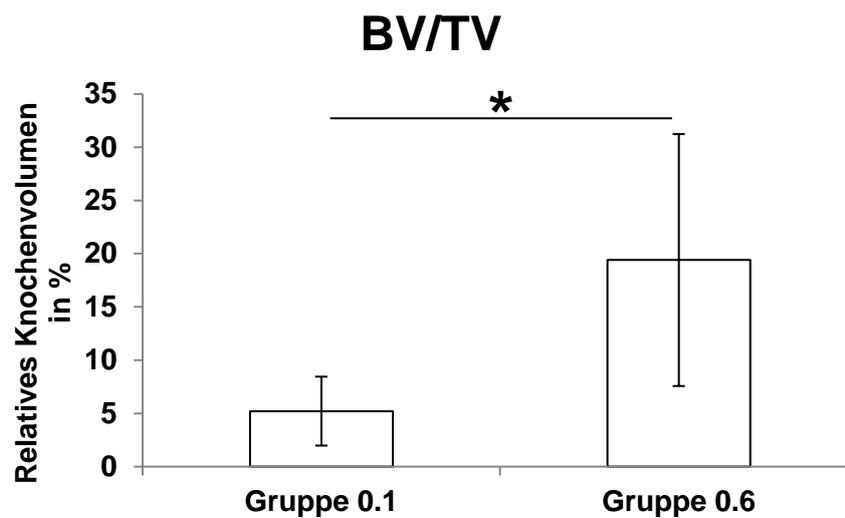


Abbildung 3.8 Graphische Darstellung der Unterschiede beim relativen Knochenvolumen (BV/TV) zwischen kleiner Amplitude (Gruppe 0.1) und großer Amplitude (Gruppe 0.6) als Mittelwert mit Standardabweichung ($*p < 0,05$).

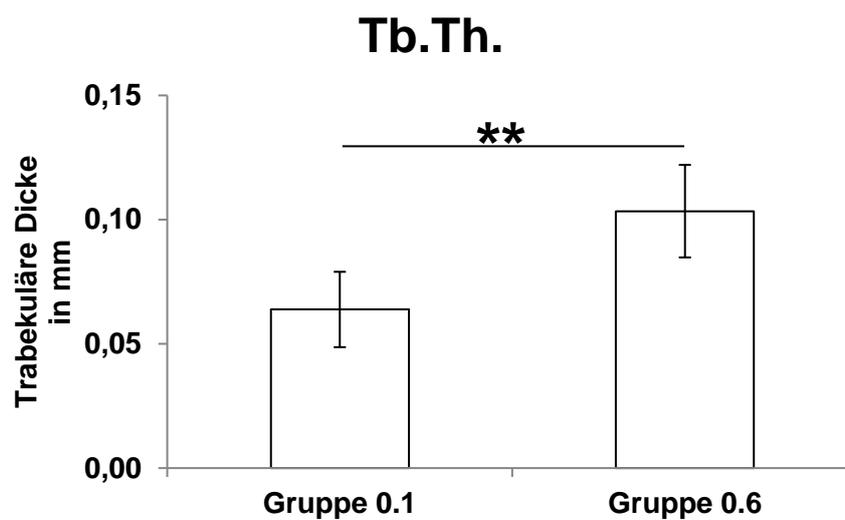


Abbildung 3.9 Graphische Darstellung der Unterschiede bei der trabekulären Dicke (Tb. Th.) zwischen kleiner Amplitude (Gruppe 0.1) und großer Amplitude (Gruppe 0.6) als Mittelwert mit Standardabweichung ($**p < 0,01$).

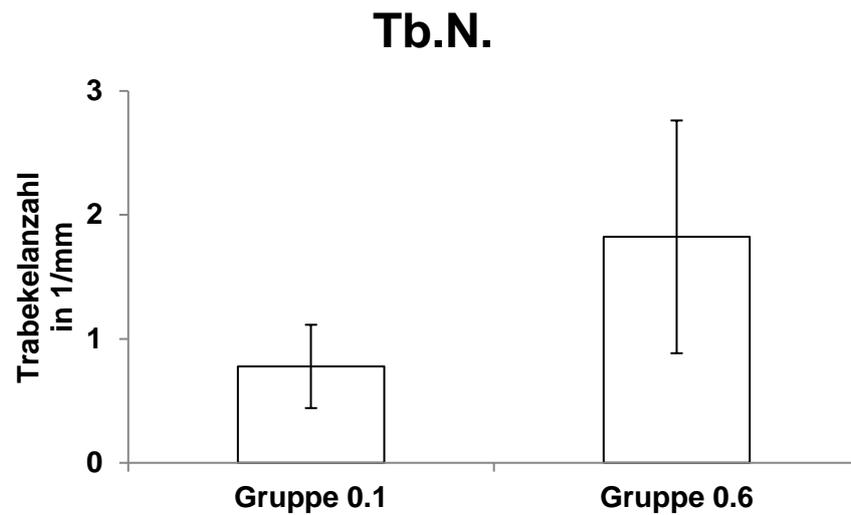


Abbildung 3.10 Graphische Darstellung der Unterschiede bei der Trabekelanzahl (Tb.N.) zwischen kleiner Amplitude (Gruppe 0.1) und großer Amplitude (Gruppe 0.6) als Mittelwert mit Standardabweichung.

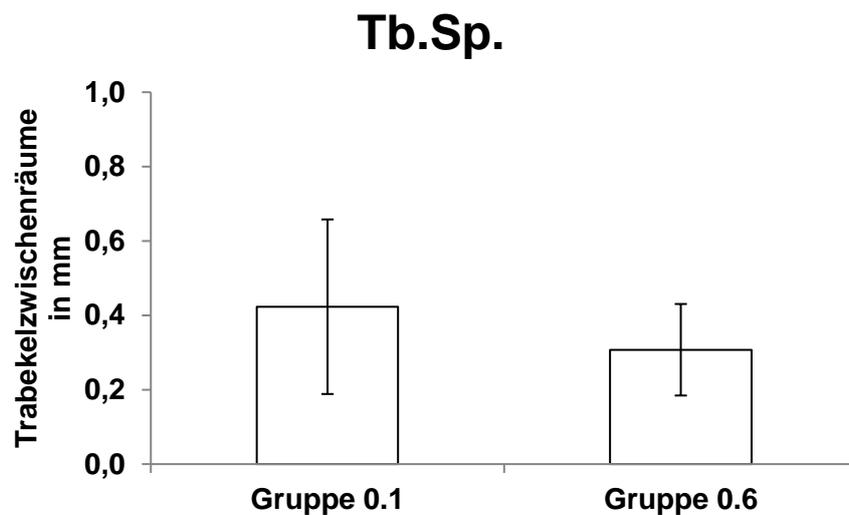


Abbildung 3.11 Graphische Darstellung der Unterschiede bei den Trabekelzwischenräumen (Tb.Sp.) zwischen kleiner Amplitude (Gruppe 0.1) und großer Amplitude (Gruppe 0.6) als Mittelwert mit Standardabweichung.

Die Messungen der Spikulahöhen über den Bohrlöchern vervollständigte die Analyse der Knochenstrukturparameter. Die mittlere Spikulahöhe war bei Gruppe 0.6 mit im Mittel 2,6 mm signifikant höher als bei Gruppe 0.1 (1,1 mm) ($p = 0,02$) (Abb. 3.12, Tabelle 3.2).

Der Durchschnitt aus den jeweils höchsten Spikula (Max) eines jeden Präparates war bei Gruppe 0.6 (3,6 mm) 184 % größer als bei Gruppe 0.1 (1,9 mm) (Tabelle 3.2).

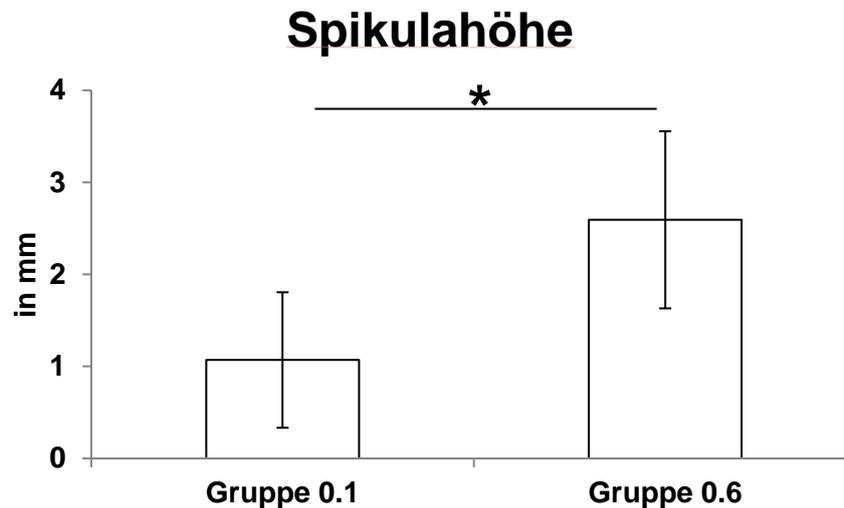


Abbildung 3.12 Graphische Darstellung der Unterschiede bei den mittleren Spikulahöhen zwischen kleiner Amplitude (Gruppe 0.1) und großer Amplitude (Gruppe 0.6) als Mittelwert mit Standardabweichung ($*p < 0,05$).

Die Dehnung in der schmalen werdenden Weichteilschicht zwischen Knochenspikula und Titanplatte stieg bei gleichbleibender Stimulationsamplitude individuell stark an. Anhand der Daten der individuellen Spalthöhe (siehe 3.2.1) und den Messungen der Spikulahöhen wurde für jedes Tier die Dehnung über der mittleren und maximalen Spikulahöhe (ϵ Mittel und ϵ Max) berechnet (Tabelle 3.2). In Gruppe 0.1 blieb die mittlere und maximale Dehnung über den Spikula zu Versuchsende bis auf eine Ausnahme bei $< 5\%$. Die mittlere Dehnung in Gruppe 0.6 rangierte mit einer Ausnahme in einem Bereich von 14% bis 43% . Die maximale Dehnung in Gruppe 0.6 war zum Teil bedeutend höher bis infinite.

Tabelle 3.2 Auflistung der individuellen Spalthöhen zu Versuchsende und der Spikulahöhen-Messungen im μ CT (in mm). Darunter die resultierenden Dehnungen (ϵ) (in %) über der individuellen mittleren Spikulumhöhe und über der individuellen maximalen Spikulumhöhe (in mm).

Spalthöhen bei Gruppe 0.1	3,9	4,4	4,8	5,5	5,5	
Spikulahöhen über den Bohrlöchern						
1			0,1	3,2	0,5	
2	1,5	0,3	0,3	1,4	0,9	
3	2,4	0,6	0,3	1,4	2,6	
4	1,1		0,2	0,8	0,3	
5	2,7	0,5	0,2	3,0		
6	1,7	0,5	0,5	2,1	0,4	
7				1,0	0,8	
Mittlere Spikulumhöhe	1,9	0,5	0,3	1,9	0,9	
Mittlere Dehnung ϵ	5,0	2,6	2,2	2,7	2,2	
Maximale Spikulumhöhe	2,7	0,6	0,5	3,2	2,6	
Maximale Dehnung ϵ	8,5	2,6	2,3	4,4	3,5	

Spalthöhen bei Gruppe 0.6	4,5	4,4	4,1	5,5	5,4	5,3
Spikulahöhen über den Bohrlöchern						
1	2,9		1,9	4,0	3,9	
2	2,5	4,4	1,9	2,9	4,4	0,7
3	2,3	2,8	3,3	2,2	3,0	1,8
4	2,2	4,2	3,8	1,4	3,8	
5	1,9	4,3	2,6		2,2	0,7
6	1,7	4,1	2,6	1,4	3,1	
7	1,7	4,1	2,4	2,6	2,4	
Mittlere Spikulumhöhe	2,2	4,0	2,7	2,4	3,3	1,1
Mittlere Dehnung ϵ	25,5	150,0	42,9	19,5	28,6	14,3
Maximale Spikulumhöhe	2,9	4,4	3,8	4,0	4,4	1,8
Maximale Dehnung ϵ	38,2	-	193,6	39,5	60,6	17,3

3.2.3 Histologie

Die qualitative Analyse der histologischen Schliffe in einer Schnittebene durch die Bohrlöcher ergab für beide Versuchsgruppen ein charakteristisches Bild, welches in der Qualität der Gewebebildung und dem Modus der Ossifikation keine Unterschiede aufwies.

Bei der Betrachtung der Dünnschliffe mit 12,5-facher Vergrößerung waren über den Bohrlöchern gewundene Trabekel neugebildeten Knochens zu erkennen, welche verschiedene Stadien der Maturation aufwiesen und im Verbund ein Spikulum bildeten (Abb. 3.13). Farbabstufungen der Trabekel von dunkel violett und schwarz-blau über hellere Blautöne bis hin zu annähernd farblos grau-gelben Arealen zeigten die Entwicklungsschritte der Osteogenese auf Gewebeebene. An den Randbereichen der Trabekel waren Osteoidauflagerungen zu sehen. In fließenden Übergängen waren zum Zentrum der einzelnen Trabekel Aufhellungen der Blaufärbung zu erkennen, welche auf eine zunehmende Mineralisation hindeuteten. Teilweise war die Aufhellung in den Trabekeln so weit vorangeschritten, dass die charakteristische Graufärbung die (annähernd) vollständige Maturation des Knochens vermuten ließ.

Zwischen den Trabekeln waren mit zunehmender Nähe zum Bohrlocheingang helle bis ungefärbte Areale zu sehen, die auf ein medulläres Gewebe, vergleichbar mit Knochenmarkstroma, schließen ließen. Dieses Fettmark war durchsetzt mit Anschnitten von Gefäßen in allen Ebenen und Richtungen und unterschiedlicher Größe.

In einer relativ konstant breiten Zone von 500-1000 µm um die äußeren Trabekel der Knochenspikula zeigte sich eine charakteristische Matrixfärbung, die in Übergangsbereichen zwischen Knochen und fibrösem Gewebe zu finden war und sich in abgeschwächter Form bis zwischen die äußeren Trabekel fortsetzte (Abb. 3.13). Diese Zone zeichnete sich durch eine große Anzahl Fibroblasten-ähnlicher Zellen aus, grenzte sich aber von fibrösem Gewebe durch eine rötlich bis hell violette Matrixfärbung sowie eng und einheitlich ausgerichtete Kollagenfasern ab. Neben der Farbe waren es die Intensität der Färbung und die geordneten, kompakten Fasern entlang der Spikulagrenzen, die den Begriff eines kondensierten Gewebes nahe legten (Abb. 3.14). Der Begriff steht in Anlehnung an die Beschreibung und Darstellung der *mesenchymal condensations*, eine mit pro-angiogenen Faktoren ausgestattete Zone, in die zunächst Gefäße einwachsen und in der sekundär Ossifikationskerne entstehen. Das kondensierte Gewebe war den fibrösen Anteilen im Präparat ähnlich.

Die verbleibenden Areale des Geweberegenerates wurden von einem zellreichen und vaskularisierten fibrösen Gewebe gebildet. Die Fasern waren überwiegend richtungslos und diffus angeordnet. Lediglich in Verlängerung der Titanplattendurchtritte konnten zuweilen longitudinal ausgerichtete Faserbündel ausgemacht werden.

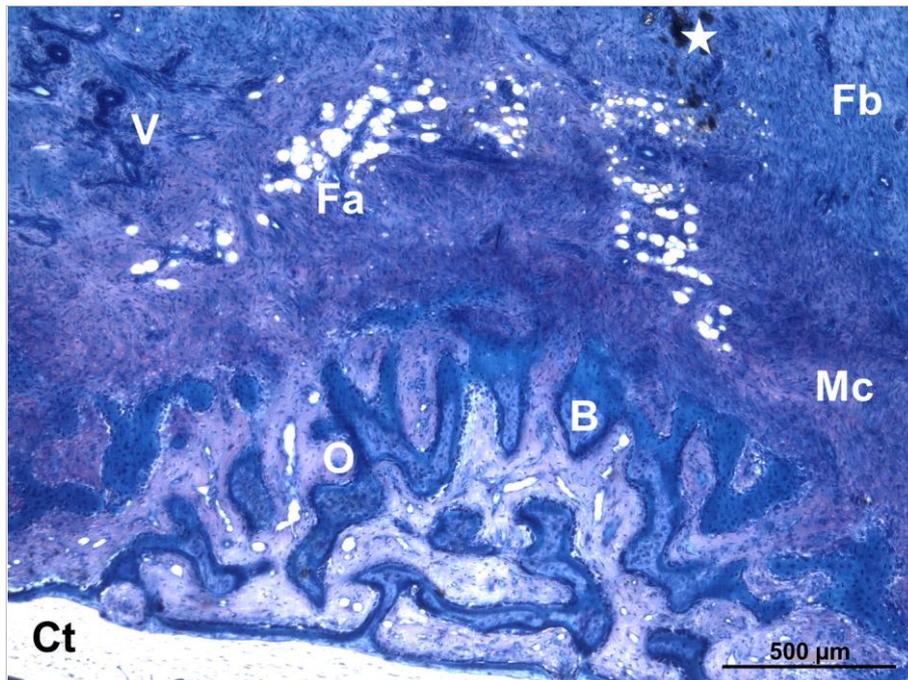


Abbildung 3.13 Typische Erscheinung eines Spikulums. Zu sehen sind über der Kortex (Ct) Trabekel neugebildeten Knochens (B) mit umgebendem Osteoidsaum (O), darüber das kondensierte Gewebe (Mc) und Areale mit Fettzellen (Fa). Im fibrösen Gewebe (Fb) sind Gefäße (V) und Plattenabrieb (Stern) zu erkennen. Paragon-Färbung, 50-fache Vergrößerung.

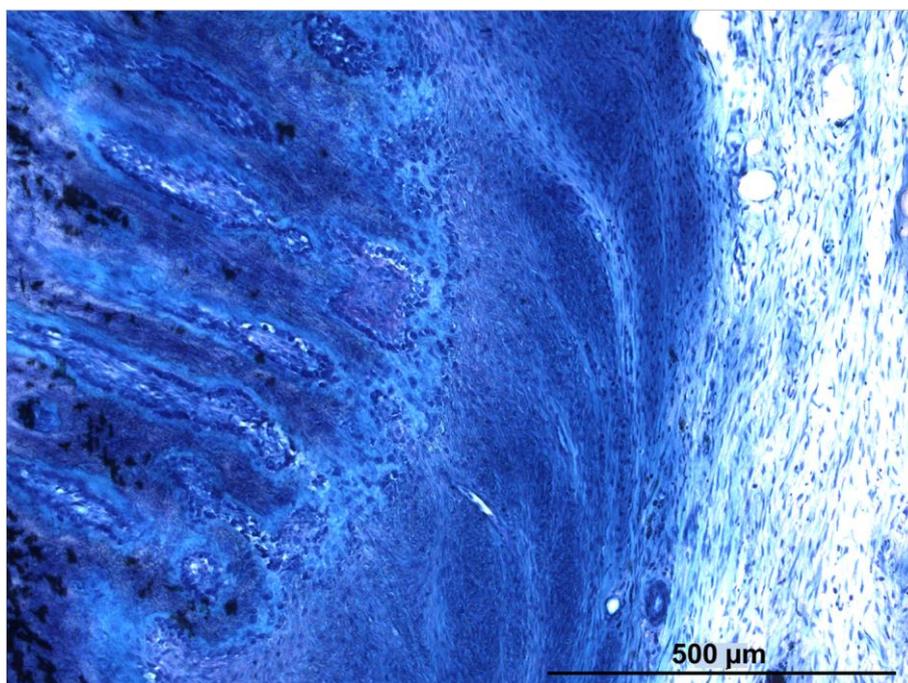


Abbildung 3.14 Knöcherner Trabekel im Randbereich eines Spikulums (links im Bild), Übergang zu kondensiertem Gewebe mit senkrecht gerichteter Faserstruktur (mittleres Drittel) und fibrösem Gewebe (rechts im Bild). Paragon-Färbung, 100-fache Vergrößerung.

Über manchen Spikula waren in der Zone kondensierten Gewebes zudem Inseln mit Fettzellen zu beobachten. Ein spezifisches Verteilungsmuster war dabei nicht zu erkennen. Die Anschnitte der Gefäße waren unregelmäßig, zeigten eine diffuse Verteilung und richtungslose Verläufe (Abb. 3.13 und 3.15-3.16).

In Gruppe 0.1 war die Knochenneubildung häufig niedrig und ragte nur wenig in das Geweberegenerat hinein. In einigen Fällen ließen sie die typische Zapfen- oder Kegelform eines Spikulums vermissen (Abb. 3.15). In Gruppe 0.6 waren die Spikula typisch geformt und deren Spitzen weit über der kortikalen Ebene im Geweberegenerat zu sehen (Abb. 3.16). Abgesehen von der Höhe und Form der knöchernen Spikula waren die Unterschiede zwischen Gruppe 0.1 und Gruppe 0.6 gering. Die Bohrlöcher der Markraumborungen waren mit Knochen aufgefüllt, der senkrecht zu den Lamellen des umgebenden kortikalen Knochens und in Zugrichtung der Kallusdistraction ausgerichtet war. Der Knochen in den Bohrlöchern war durchsetzt mit Anschnitten von Gefäßen in verschiedenen Ebenen. Alle Gefäße waren parallel zum Knochen innerhalb der Bohrlöcher orientiert. Der Knochen in den Bohrlöchern war tendenziell stärker maturiert, als die knöchernen Trabekel im Geweberegenerat. Der Füllungsgrad der Bohrlöcher mit neugebildetem Knochen schien mit der Größe und Ausprägung der Knochen-spikula im Geweberegenerat in Zusammenhang zu stehen. In der Bohrlochwand und angrenzenden Bereichen waren Einziehungen zu sehen, die poröse Bereiche in der Kortex darstellten (Abb. 3.15 und 3.16). Endostal waren heterogen geformte Areale mit neugebildetem Geflecht-knochen zu erkennen.



Abbildung 3.15 Repräsentatives histologisches Trenn-Dünnschliff-Präparat eines Versuchstieres der Gruppe 0.1. Die Spikula erreichen von der kortikalen Oberfläche ausgehend nur eine geringe Höhe. Paragon-Färbung, 12,5-fache Vergrößerung, zusammengefügtes Bild.

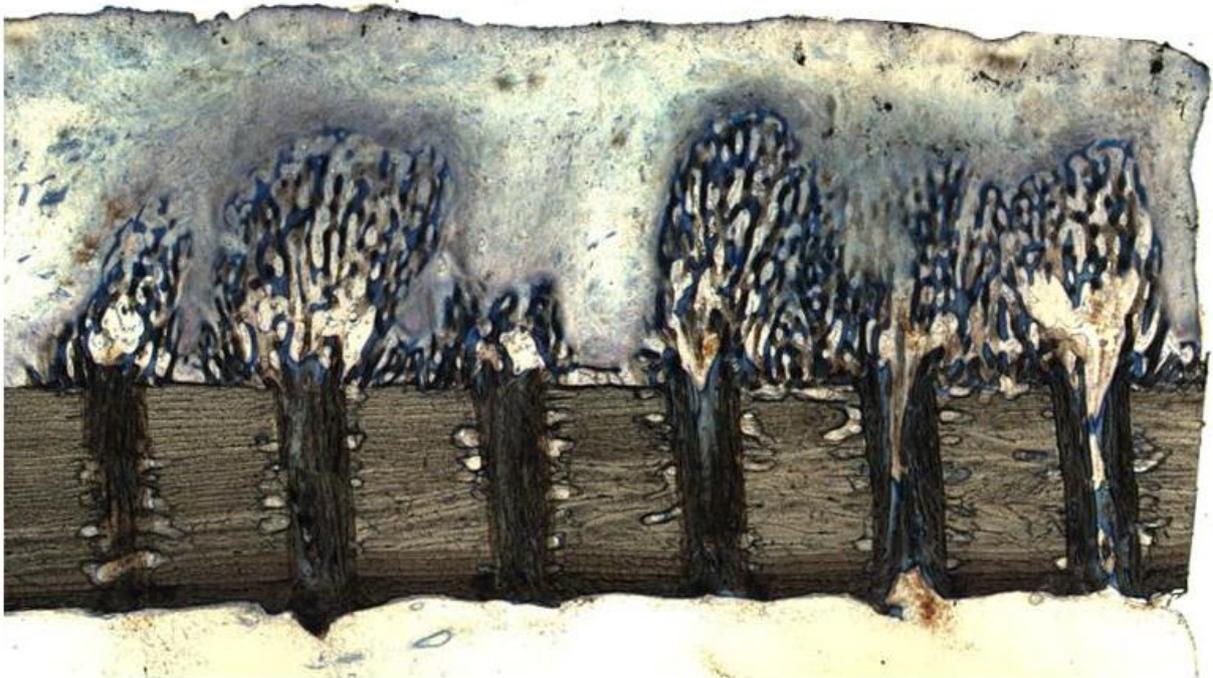


Abbildung 3.16 Repräsentatives histologisches Trenn-Dünnschliff-Präparat eines Versuchstieres der Gruppe 0.6. Die typisch geformten Spikula ragen von der kortikalen Oberfläche weit in das Geweberegnerat. Paragon-Färbung, 12,5-fache Vergrößerung, zusammengefügtes Bild.

Bei stärkerer Vergrößerung waren im Geweberegenerat Osteoblastensäume zu erkennen, die, teilweise mehrreihig oder in Haufen, den knöchernen Trabekeln angrenzten und der Osteoidschicht auflagern. In der Gruppe 0.6 traten im Vergleich zu Gruppe 0.1 gehäuft dicht gepackte Osteoblastenverbände auf (Abb. 3.17).

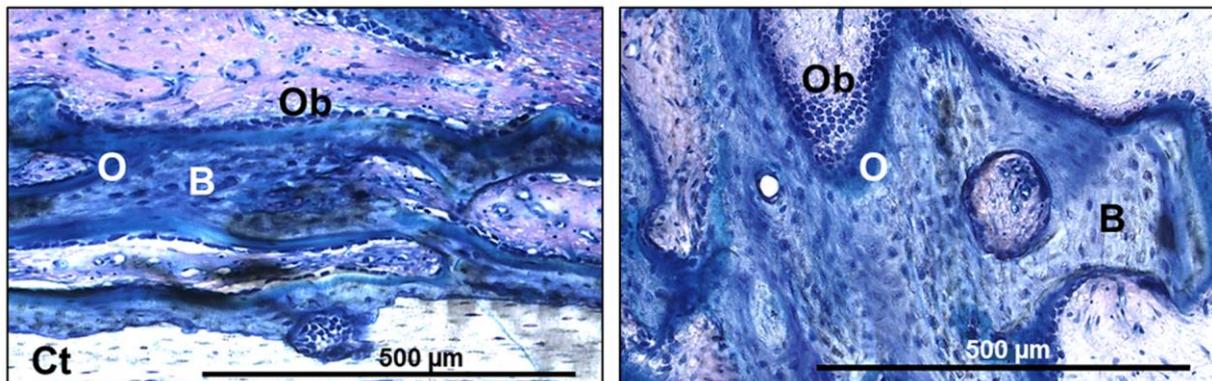


Abbildung 3.17 Auftreten der Osteoblasten im Gruppenvergleich. In Gruppe 0.1 säumen Osteoblasten (Ob) den neugebildeten Knochen (B) und Osteoid (O) einreihig (links). In Gruppe 0.6 waren Osteoblastenverbände in Haufen zu sehen (rechts). Paragon-Färbung, 100-fache Vergrößerung.

Die Osteoblasten waren aufgrund starker metabolischer Aktivität intensiv basophil gefärbt und anhand ihrer Morphologie verschiedenen Maturationsstadien zuzuordnen. Kleine rundliche Zellen waren in Osteoblastenpopulationen am weitesten entfernt von Osteoid lokalisiert und repräsentierten frühe Osteoblasten. In kubischer Form waren die Osteoblasten am größten. Zellgröße und Zunahme metabolischer Aktivität kubischer Osteoblasten korrelierten mit der Lokalisation im Bereich neugebildeten Osteoids (Abb. 3.18). In direkter Nachbarschaft zu den Osteoblastenverbänden wurden länglich-abgeplattete Zellen mit kleinem Zellkern und gebläht wirkendem, hellem Zytoplasma beobachtet. Diese Fibroblasten-ähnlichen Zellen stellten vermutlich Präosteoblasten dar. Sie waren vor allem im kondensierten Gewebe zu finden (Abb. 3.19).

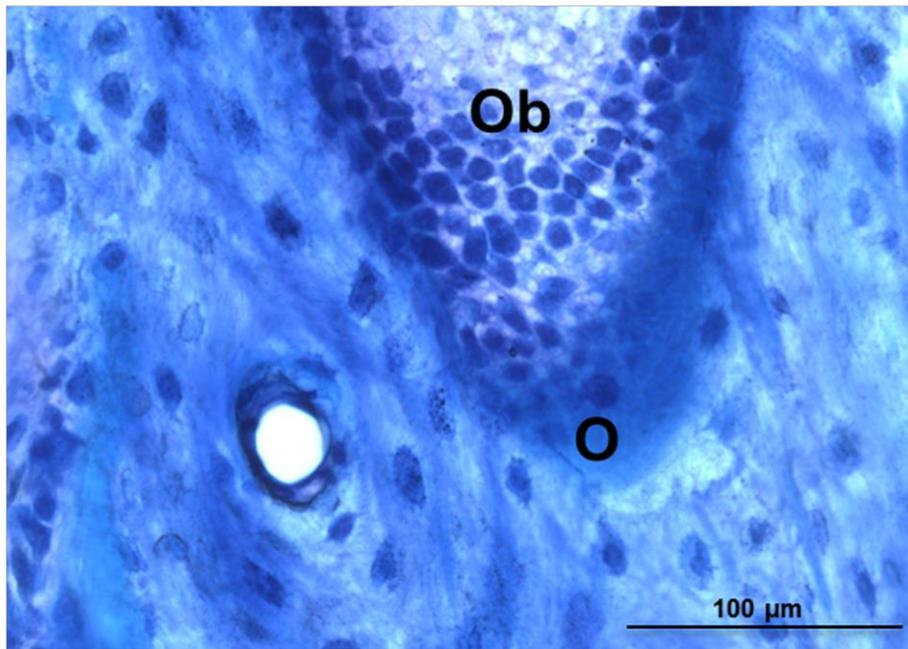


Abbildung 3.18 Osteoblastenpopulation verschiedener Maturationsstadien (Ob). Größe und Maturation nehmen zum Osteoidsaum zu. Im Osteoidsaum (O) erfolgt die Umwandlung zum Osteozyt. Osteozyten bestimmen den übrigen Bildausschnitt. Im Quadranten links unten ist ein Gefäß angeschnitten. Paragon-Färbung, 400-fache Vergrößerung.

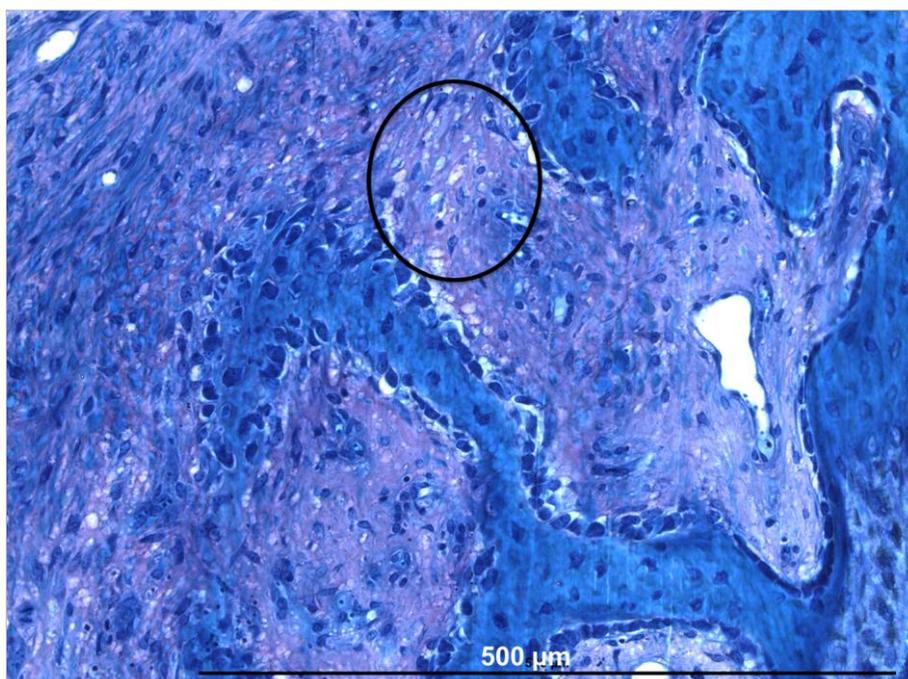


Abbildung 3.19 Ansicht Fibroblasten-ähnlicher Zellen zwischen den Trabekeln sich neu formierenden Knochens (Kreis). Paragon-Färbung, 200-fache Vergrößerung

An wenigen Stellen im Geweberegenerat waren in den Trabekeln Osteoklasten in mehr oder weniger deutlich ausgeprägten Einziehungen (Howship-Lakunen) zu finden (Abb. 3.20). In den Bohrlöchern der Markraumborungen waren vermehrt Lakunen mit Osteoklasten anzutreffen. In keinem Trenn-Dünnschliff-Präparat waren terminal differenzierte Chondrozyten (Hypertrophe Chondrozyten) oder eine knorpeltypische Matrixfärbung zu erkennen. Es gab keine Hinweise auf eine Anhäufung von Entzündungszellen.

Im Präparat eines Tieres der Gruppe 0.6 war die Zelldichte bei vollständiger Überbrückung auch direkt unter der Titanplatte unverändert hoch. In diesem Bereich überwog die Anzahl an Präosteoblasten deutlich. Es waren nur wenige Osteozyten und kaum Osteoblasten zu sehen. Es gab trotz der hohen Drücke keine Hinweise auf Fissuren.

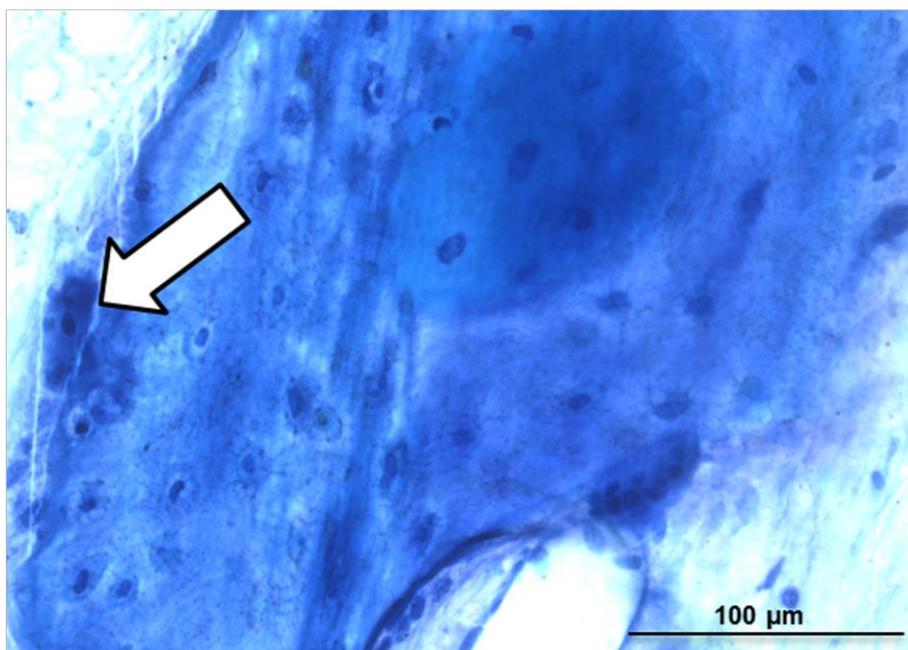


Abbildung 3.20 Osteozyten in einem knöchernen Trabekel. Am linken Bildrand ist ein Osteoklast (Blockpfeil) erkennbar. Paragon-Färbung, 400-fache Vergrößerung.

Unter Polarisationslicht waren entlang der äußeren Spikulabegrenzungen kompakte und gerichtete Faserbündel erkennbar. Die Bereiche mit Faserbündeln korrelierten stark mit den Arealen, die im *brightfield*-Modus als kondensiertes Gewebe bestimmt wurden (Abb. 3.21).

Die Safranin-O-gefärbten Paraffinschnitte blieben negativ für Proteoglykane und ergaben keine Hinweise auf eine knorpelige Matrix oder Chondrozyten (Abb. 3.22).

Qualitative Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen waren hinsichtlich Gewebe und Zellen nicht zu sehen. Sämtliche Strukturen wurden in den Präparaten beider Versuchsgruppen vorgefunden. Insgesamt ergab sich im Geweberegenerat das Bild einer metabolisch hochgradig aktiven Struktur. Zellzahl und Zellmorphologie der an der Knochenneubildung beteiligten Osteoblasten und Osteozyten deuteten auf eine hochgradige

Proliferation und translationale Aktivität hin. Die im Bereich der Knochenneubildung sichtbaren Zellen wiesen auf eine intramembranöse Knochenbildung hin. Eine chondrale Ossifikation konnte aufgrund des Fehlens von Knorpel und hypertrophen Chondrozyten nicht nachgewiesen werden.

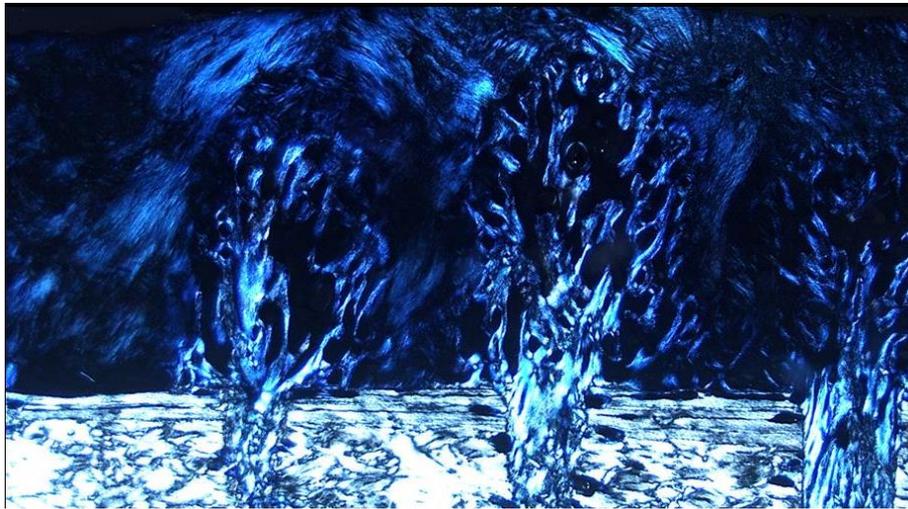


Abbildung 3.21 Verlauf kompakter Faserbündel entlang der Randbereiche der Spikula. Polarisations-Mikroskop, 12,5-fache Vergrößerung, zusammengefügtes Bild.

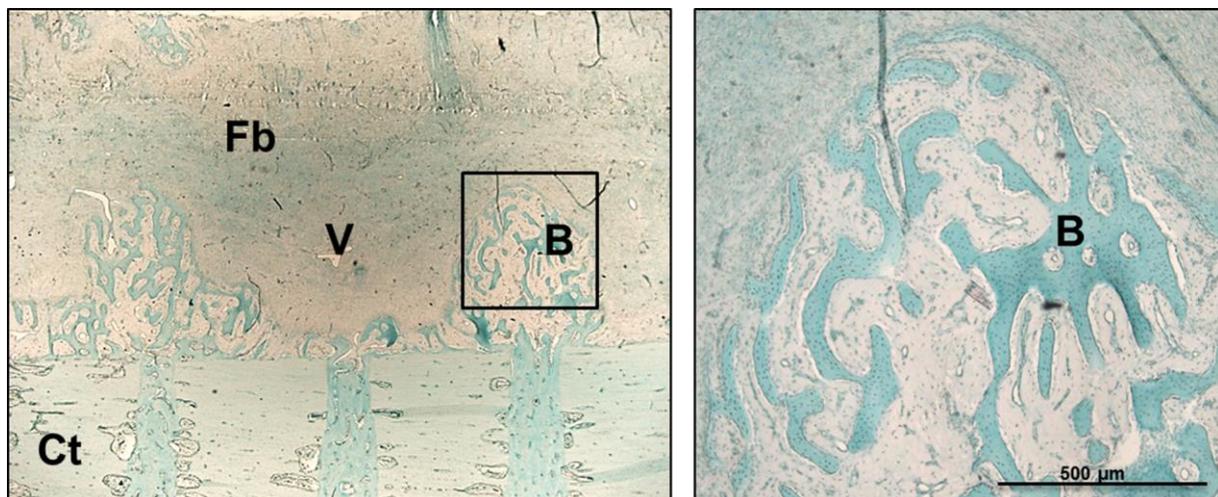


Abbildung 3.22 Safranin-O-gefärbter Paraffinschnitt eines Tieres der Gruppe 0.6. Proteoglykane sind weder im neugebildeten Knochen (B) oder kortikalen Bereichen (Ct) noch im fibrösen Gewebe (Fb) zu erkennen. Safranin-O-Färbung, 12,5-/50-fache Vergrößerung.

Mit der quantitativen Auswertung der Trenn-Dünnschliff-Präparate konnten im Gegensatz zur radiologischen Auswertung auch schwach mineralisierte Bereiche und Osteoidablagerungen sowie anderes Weichgewebe beurteilt werden.

Die Werte für das relative Knochenvolumen unterschieden sich geringfügig von denen der μ CT-Strukturparameter-Auswertung. In Übereinstimmung mit den radiologischen Untersuchungen waren aber ebenfalls deutliche Unterschiede des relativen Knochenvolumens zwischen den Versuchsgruppen zu erkennen. Gruppe 0.1 wies mit 9,5 % nur knapp ein Drittel des relativen Knochenvolumens der Tiere in Gruppe 0.6 auf (29,4 %). Der Gruppen-Unterschied blieb aufgrund des großen *ranges* in Gruppe 0.6 jedoch unter Signifikanzlevel. Die Differenz zwischen den prozentualen Werten aus μ CT- und Histomorphometrie-Analyse in Gruppe 0.1 war ungefähr doppelt so groß wie die Differenz in Gruppe 0.6, was auf eine größere Menge wenig maturierten Knochens unter kleiner Amplitude schließen ließ.

Fibröses Gewebe wurde mit 85,1 % in Gruppe 0.1 und 65,8 % in Gruppe 0.6 gefunden. Fettzellen waren mit im Median 0 % in der Gruppe 0.6 nicht aufzufinden. In Gruppe 0.1 dagegen waren es mit 1,2 % signifikant mehr als in Gruppe 0.6 ($p = 0,008$), wenn auch auf niedrigem Niveau. Die relative Gefäßdichte wies mit 4,5 % (Gruppe 0.1) und 4,8 % (Gruppe 0.6) keine relevanten Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen auf (Abb. 3.23).

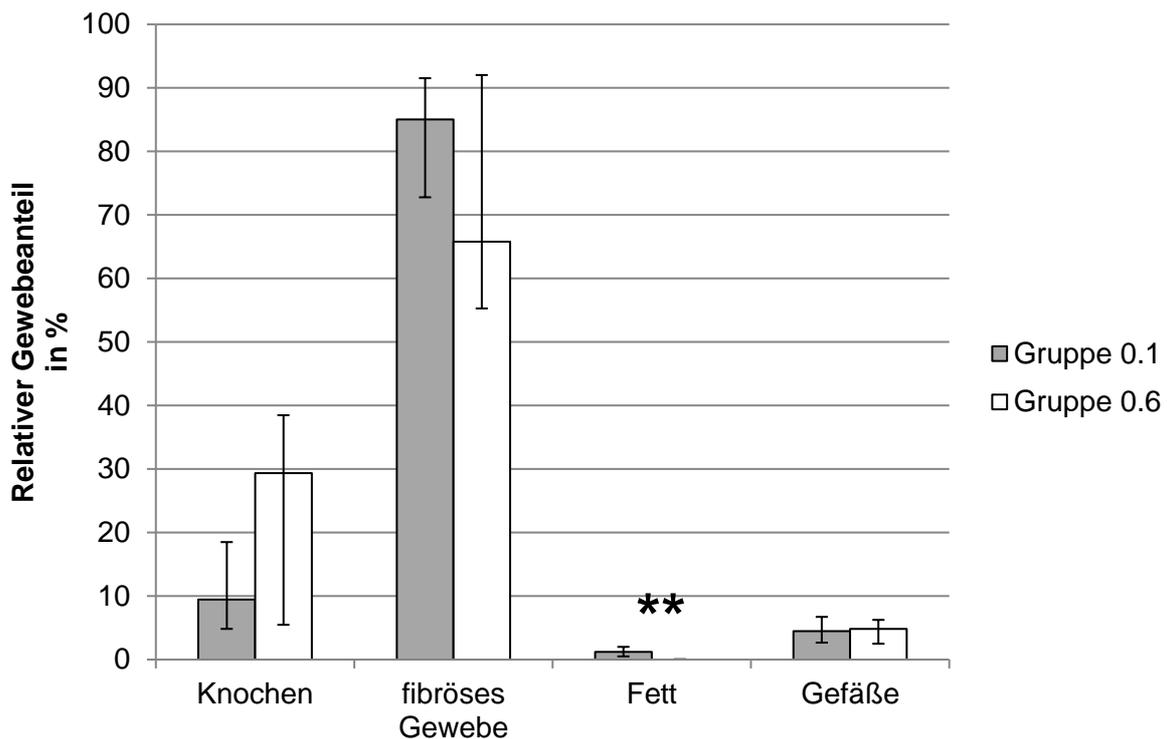


Abbildung 3.23 Graphische Darstellung der relativen Anteile untersuchter Gewebetypen. Der relative Anteil an Fettzellen ist signifikant unterschiedlich zwischen Gruppe 0.1 und Gruppe 0.6 (** $p < 0,01$). Werte in Prozent als Median und *range*.

3.2.4 Fluoreszenzhistologie

Die fluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen zeigten bei den Tieren der Gruppe 0.1 grüne Markierungen des Calceingrün-Farbstoffs in den Bohrlöchern der Markraumborungen und in Arealen endostal neugebildeten Knochens. Vereinzelt fanden sich grüne Farbbereiche, die knapp (max. 0,6 mm) über den kortikalen Rand der Markraumborung hinaus ragten (Abb. 3.24). Die Mineralisierungsaktivität in Gruppe 0.1 zu Beginn der Stimulationsphase beschränkte sich vornehmlich auf kortikale und endostale Bereiche. Gelbfärbungen durch die Tetracyclin-Injektion fanden sich benachbart zu Calceingrün-Markierungen, in der Kortex und in den knöchernen Trabekeln der Spikula. Tetracyclin-gefärbte Bereiche verteilten sich über die gesamte Ausdehnung der Spikula. In den Spikula war die Gelbfärbung schwach mit nur wenigen klar abgrenzbaren Banden. Zum avisierten Zeitpunkt nach der Hälfte der Stimulationsphase war die Mineralisierungsaktivität gering und zeigte im Kontext Übereinstimmung mit der radiologischen und histomorphometrischen Auswertung. Kortikal waren vereinzelt deutlich definierte Banden zu erkennen.

In der Gruppe 0.6 waren Calceingrün-gefärbte Bereiche analog zu Gruppe 0.1. Die Calceingrün-Markierung war vor allem in den Bohrlöchern und endostal zu sehen. In

Abgrenzung zu Gruppe 0.1 waren jedoch grün gefärbte Trabekel von den Bohrlöchern ausgehend teilweise mit einigem Abstand zur Kortex im Geweberegnerat zu finden. Maximal betrug die durchgängige Färbung eines solchen Trabekels 2 mm (Abb. 3.24). Dies ließ auf eine größere Mineralisierungsaktivität im Geweberegnerat zu Beginn der Stimulationsphase schließen. Die Farbintensität der Tetracyclin-Färbung in Gruppe 0.6 wirkte generell stärker als in Präparaten der Gruppe 0.1 (Abb. 3.24). In den Spikula waren im Gegensatz zu Gruppe 0.1 vermehrt distinkte Banden abgrenzbar. Diese waren bis zur vollständigen Höhe der Spikula vorhanden. Die räumliche Ausprägung und Intensität der Fluoreszenzmarkierungen in Gruppe 0.6 deuteten auf eine größere Mineralisierungsaktivität unter großer Bewegungsamplitude schon in der ersten Hälfte des Stimulationszeitraums hin.

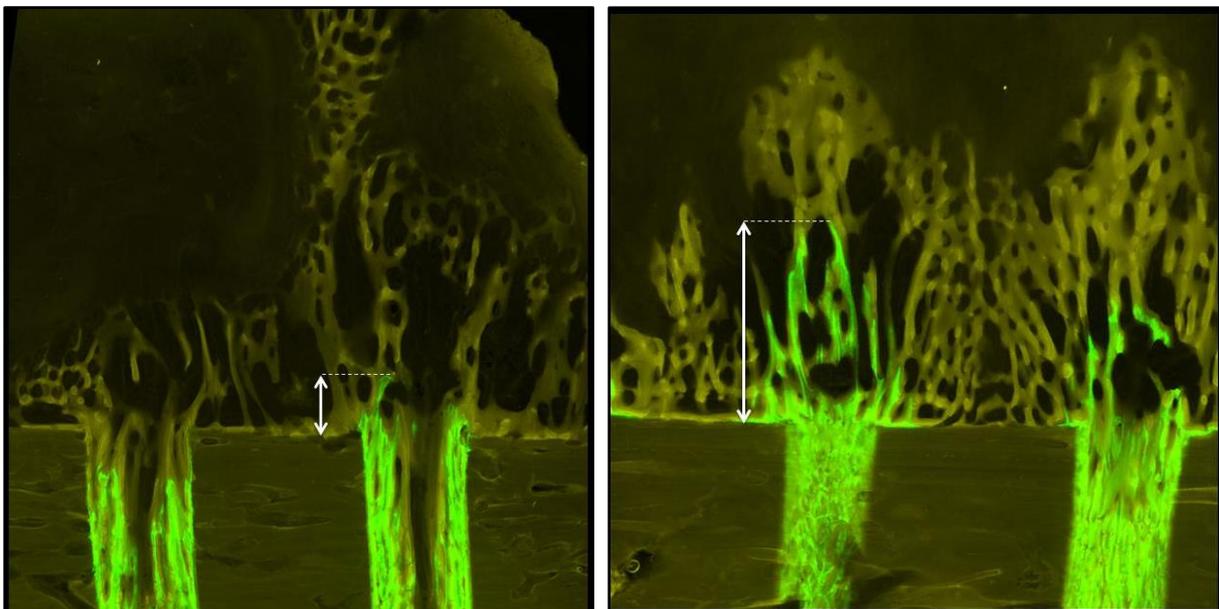


Abbildung 3.24 Bildausschnitte der Präparate mit der höchsten durchgängigen Färbung mit Calceingrün in der Gruppe 0.1 (links) und Gruppe 0.6 (rechts). Die gestrichelte Linie markiert den höchsten Punkt der Färbung. Die Pfeile markieren die gemessene Länge ausgehend von der Ebene der Kortexoberfläche. Trenn-Dünnschliff-Präparate, 12,5-fache Vergrößerung.

3.2.5 Immunhistochemie

Die Analyse der immunhistochemischen Färbungen ergab für keinen der gewählten Antikörper qualitative Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen.

Runx2-Antigenfärbung wurde vor allem in Zellen im Bereich der knochenbildenden Spikula und in angrenzenden Arealen gefunden (Abb. 3.25 obere Reihe). Besonders intensiv stellte sich die rot-braun bis dunkel braune Färbung in Osteoblasten dar. In der den peripheren Trabekeln angrenzenden Schicht des kondensierten Gewebes waren zum Teil deutlich, zum Teil diffus gefärbte Zellen zu erkennen, die morphologisch Fibroblasten ähnlich waren.

Wenige Osteozyten wiesen eine schwache Farbgebung auf. In der mittleren Zone fibrösen Gewebes waren keine eindeutig positiven Zellen zu finden. In geringer Entfernung zur Auflagefläche der Titanplatte waren wieder vermehrt Fibroblasten-ähnliche Zellen mit Runx2-Positivität. Die Anzahl Runx2-positiver Zellen im Geweberegenerat schien mit der Ausprägung des Spikulawachstums in Zusammenhang zu stehen. In Präparaten der Gruppe 0.6 waren um die Spikula auch in kortexferneren Bereichen und insgesamt vermehrt Runx2-gefärbte Zellen im Geweberegenerat zu erkennen.

Sox9-positive Zellen waren zumeist in einer Schicht direkt unter der ehemaligen Titanplattenauflagefläche zu beobachten (Abb. 3.25 mittlere Reihe). Diese Zellen waren im fibrösen Gewebe eingebettet und stellten sich morphologisch als Fibroblasten-ähnliche Vorläuferzellen dar. Vereinzelt und ohne erkennbares Verteilungsmuster waren undeutlich bis schwach Sox9-gefärbte Zellen im kondensierten Gewebe, den neugebildeten Trabekeln angrenzend, sichtbar.

Kollagen Typ II-positiv zeigten sich Matrixareale zwischen den Trabekeln der Spikula und in einem Saum entlang der äußeren Spikulabegrenzungen (Abb. 3.25 untere Reihe). In Gruppe 0.6 waren diese Areale entsprechend der Oberfläche neugebildeter Knochen trabekel weiter ausgedehnt als in Gruppe 0.1. Wenige Zellen im Umfeld der neugebildeten Trabekel wiesen Vesikel mit Kollagen Typ II-positiver Färbung auf. Sox9- und Kollagen Typ II-positive Färbungen wiesen in beiden Gruppen auf ein frühes Differenzierungsstadium von Chondrozyten hin, ohne das Stadium terminal differenzierter hypertropher Chondrozyten zu erreichen.

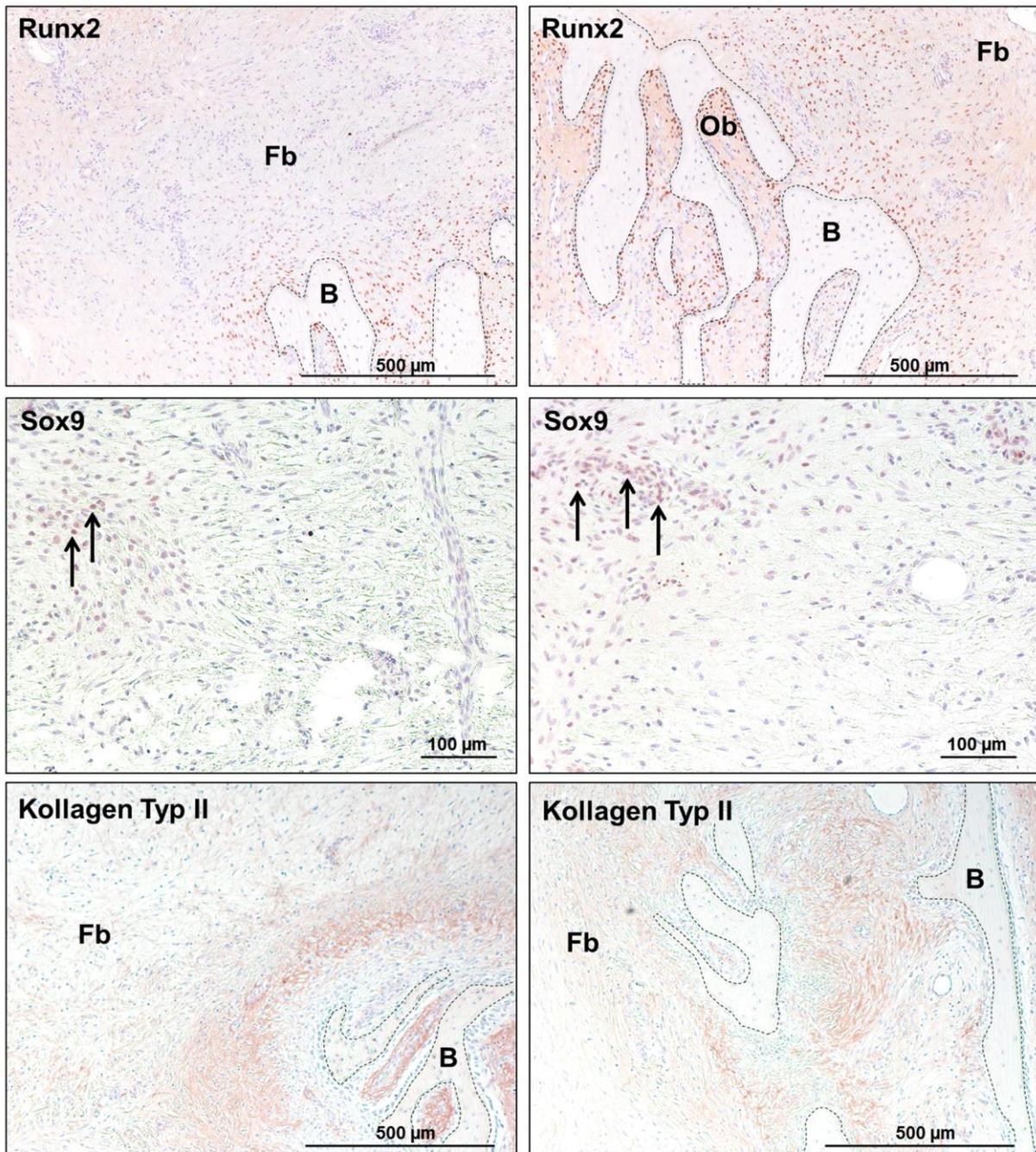


Abbildung 3.25 Immunhistochemische Schnitte repräsentativ für Gruppe 0.1 (links) und Gruppe 0.6 (rechts). Eine intensive rot-braune Färbung weist auf Runx2-positive Fibroblasten-ähnliche Vorläuferzellen und Osteoblasten (Ob) hin. Fibroblasten-ähnliche Vorläuferzellen in einer der Titanplatte direkt angrenzenden Zone zeigen vermehrt eine positive Färbung für Sox9 (Pfeile). Kollagen Typ II-positive Areale sind als rot-braune Färbung in der kollagenen Matrix um die neugebildeten Knochentrabekel (B) zu erkennen, nicht jedoch im entfernten fibrösen Gewebe (Fb).

4 Diskussion

Die Distractionsosteogenese als integraler Bestandteil orthopädischer Chirurgie und die richtigen Strategien sowohl bei der Operation als auch dem anschließenden Behandlungsprotokoll stellen aufgrund der Häufigkeit von Komplikationen und dem Auftreten verzögerter oder sogar ausbleibender Heilungsverläufe ein wichtiges Themenfeld in der Klinik und medizinischen Forschung dar. Die Reduktion der Komplikationsraten birgt sowohl sozio-ökonomisch als auch für die individuell Betroffenen hohe Relevanz und stellt eine große Herausforderung dar. Die mechanischen Einflüsse spielen eine wichtige Rolle für den Erfolg der Heilung und werden intensiv erforscht.

In dieser Studie zum Einfluss zyklischer, axialer Kompression nach vorangegangener lateraler Kallusdistraction zeigte sich, dass Dehnung durch eine größere Bewegungsamplitude ein stärkeres Knochenwachstum induziert als Dehnung unter kleiner Bewegungsamplitude. Im Gegensatz zu anderen Modellen der Distractionsosteogenese und entgegen der auf die Frakturheilung bezogenen Gewebedifferenzierungshypothese kam es in dieser Studie auch unter moderater Kompression, repräsentiert durch die größere Bewegungsamplitude, zu keiner chondralen Ossifikation. Die Art der Gewebedifferenzierung blieb von den gewählten Bewegungsamplituden unbeeinflusst.

4.1 Diskussion des Tiermodells

4.1.1 Schafe

Erkenntnisse aus über 100 Jahren Orthopädie und Unfallchirurgie in der Klinik werden in der Forschung durch *In vitro*-Versuche an Zellkulturen und Präparaten sowie durch Tierversuche ergänzt. Auch wenn Tierversuche mittlerweile gesellschaftlich kritisch betrachtet werden und ihre Berechtigung immer wieder angezweifelt wird, sind sie nach wie vor bei vielen Fragestellungen alternativlos. *In vitro*-Modelle sind hinsichtlich der Fähigkeit, die komplexen Vorgänge *in vivo* nach zu stellen, limitiert (Muschler, Raut et al. 2010). Trotz der Anstrengungen zur Reduktion von Tierversuchen in der biomedizinischen Forschung bleiben *In vivo*-Studien an Tieren derzeit unabdingbar und ein vollständiger Ersatz durch entsprechende Alternativverfahren ein langfristiges Ziel (Martini, Fini et al. 2001).

Großtiermodelle, wie Hunde, Schweine, Ziegen und Schafe, sind im Gegensatz zu Kleintiermodellen (Maus, Ratte, Kaninchen) bei vielen Fragestellungen besser für die orthopädische Forschung geeignet, insbesondere in Studien zu Biophysik und Mechanobiologie (Muschler, Raut et al. 2010). Sie bilden die Größenverhältnisse des

Menschen besser ab und haben eine zum Menschen eher vergleichbare Knochenstruktur, welche im Gegensatz zu Nagern nicht fortwährendem Wachstum unterliegt.

Das Schaf stellt ein in der (orthopädischen) Forschung häufig genutztes Großtiermodell dar. Es eignet sich als Tiermodell in der Frakturforschung neben oben genannter Vorteile überdies aufgrund zum Menschen ähnlicher Knochenbiologie (Martini, Fini et al. 2001, Muschler, Raut et al. 2010). Die Dynamik der Knochenregeneration von Schaf und Mensch wird als sehr ähnlich beschrieben (Schneider 1989). Aufgrund zum Menschen vergleichbarer Knochenbildungsraten werden Zellkulturen primärer Osteoblasten aus Schafen beispielsweise als geeignet für *In vitro*-Untersuchungen zu humanen Skeletterkrankungen bezeichnet (Martini, Fini et al. 2001, Torricelli, Fini et al. 2003). Gerade als Alternative zum früher häufig verwendeten Hund hat das Schaf als Großtiermodell in der orthopädischen Forschung an Bedeutung gewonnen, da es sich im Gegensatz zu Schweinen oder Hunden durch einfaches Handling auszeichnet (Madaj-Sterba 1994). Seit 1970 gab es eine moderate Zunahme der Zahl an Schafen in orthopädischen Tierversuchen. Nach Abzug der Studien mit Verwendung von Ratten und Mäusen lag der Anteil von Schafen an der Gesamtzahl orthopädischer Tierversuche in den Jahren 1990-2001 bei 9-12 % je nach Teilforschungsbereich (Osteoporose, Osteoarthritis, Distractionsosteogenese, Frakturen). Von den zu orthopädischen Fragestellungen verwendeten Schafen entfielen im gleichen Zeitraum 23 % auf Frakturstudien und 9 % auf Distractionsosteogenesestudien (Martini, Fini et al. 2001). Naturgemäß bleiben Unterschiede zum Menschen u.a. bei Knochendichte und dem Alter, in dem die größte Knochenmasse erreicht wird (Muschler, Raut et al. 2010). Eine direkte Translation von Erkenntnissen aus Versuchen an Schafen auf die Humanmedizin oder Inter-Spezies-Vergleiche zwischen Tierversuchen ist deshalb kontrovers. Zannettino und Kollegen beobachteten beispielsweise Unterschiede beim Knochenbildungspotential zwischen humanen und ovinen MSCs *in vivo* (Zannettino, Paton et al. 2010). Checa und Kollegen verweisen auf signifikante Unterschiede in der mechanobiologischen Regulation der Frakturheilung zwischen Ratte und Schaf, welche beim Abgleich von *In vivo*-Daten beider Spezies mit *In silico*-Modellen auftraten. Fraglich ist, ob die Unterschiede auf der Zellaktivität, Materialeigenschaften im neugebildeten Gewebe oder der zellulären Mechanosensitivität beruhen (Checa, Prendergast et al. 2011).

Die in dieser Studie ermittelten Zahlenwerte erheben nicht den Anspruch auf eine exakte Translation hin zur klinischen Anwendung, sondern erlangen ihre Aussagekraft im Vergleich der beiden Versuchsgruppen untereinander und können nur als Richtwerte bei der Übertragung in die Humanmedizin dienen.

4.1.2 Fixationskonstruktion

Das von Claes und Kollegen etablierte Modell zur Induktion einer Knochenneubildung durch laterale Distraction mit einer osteokonduktiven Titanplatte wurde in dieser Studie erfolgreich modifiziert (Claes, Veeseer et al. 2010). Die Veränderungen der Fixationskonstruktion zur Vorgänger-Studie ermöglichten neben der motorgesteuerten Distraction auch die Applikation zyklischer Axialbewegungen und die Untersuchung visko-elastischer Gewebeeigenschaften mittels Kraftsensor. Durch das bewegungsstabile System der gewählten Fixationskonstruktion konnte sichergestellt werden, dass die auf das Geweberegenerat applizierten Stimuli ausschließlich Axialbewegungen waren, während in den stimulationsfreien Phasen keine Bewegung zugelassen wurde. Die Operationsmethode und das post-operative Protokoll hinsichtlich der Dauer von Latenz- und Distractionphase sowie den Distractioninkrementen wurden von Claes und Kollegen übernommen (Claes, Veeseer et al. 2010). Die damals etablierten Parameter hatten eine zuverlässige Knochenneubildung im Distractionsspalt hervorgebracht. Das in der vorliegenden Studie veränderte Protokoll nach Distraction wurde im Laufe des Vorversuchszeitraums entwickelt, wobei sich die Dauer der einzelnen Phasen als geeignet für die Bestimmung unterschiedlicher Effekte durch die mechanische Umgebung erwies. Eine Kontrolle ohne zyklische Kompression im Versuchszeitraum war im Tierversuchsvorhaben nicht berücksichtigt und konnte aufgrund der beschränkten Anzahl an Tieren nicht inkludiert werden, sodass ein Vergleich nur zwischen zwei Gruppen divergierender zyklischer Kompression möglich war.

Einschränkungen bei der Verwendung der Fixationskonstruktion zeigten sich in Ausfällen während des Vorversuchs. Zwei Frakturen der operierten Gliedmaße, vermutlich ausgehend von der distalen Schanz-Schraube, legten den Schluss nahe, dass der zunächst gewählte Schrauben-Durchmesser von 5 mm zu dick war. Nach der Umstellung auf Schanz-Schrauben mit 4 mm Durchmesser traten keine Frakturen mehr auf. Es kann vermutet werden, dass einzelne große Belastungen der Knochen z.B. durch Sprünge der Schafe zu großen Spannungen am Schrauben-Knochenübergang geführt haben und damit die beobachteten Frakturen verursachten. Mehrere Schanz-Schrauben mit 4 mm Durchmesser zeigten bei der Präparation ein Abknicken im Bereich der Gewindebasis. Beobachtungen und Aufzeichnungen des Kraftsensors während den Manipulationen lassen darauf schließen, dass das Abknicken der 4 mm Schanz-Schrauben zu keinen Veränderungen bei der Plattenbewegung führte.

Abweichungen von der avisierten Spalthöhe wurden bei einigen Tieren anhand der post-mortalen Faxitron-Röntgenaufnahmen erkannt und auf vielfach wiederholte Klemmung der Titanplatte nach jeder Manipulation zurückgeführt. Beim Anziehen der Feststellmutter übte die Klemmvorrichtung Druck auf das Verbindungsstück aus, welcher zu einer Höhenabnahme der Platte im Hundertstel Millimeterbereich führte. Ohne

Kontrollmechanismen der Spalthöhe *in vivo* und eine regelmäßige Nachjustierung der Spalthöhe summierte sich die Höhenabnahme zu maximal 1,6 mm. Die Höhenabnahme konnte in der zweiten OP-Serie mit Einführung verbesserter Kontrollmechanismen erkannt und nach jeder Manipulation korrigiert werden. Die elf Tiere, welche in die Auswertung des Hauptversuchs gelangten, wiesen zu Versuchsende eine Spalthöhe mit im Median 4,8 mm (Min 3,9 mm; Max 5,5 mm; unteres Quartil 4,4 mm; oberes Quartil 5,45 mm) auf. Im Hinblick auf die Amplituden der applizierten Kompression während der zyklischen Stimulation erschienen die Abweichungen bei den Spalthöhen als akzeptabel. Die mittlere und maximale Dehnung zu Versuchsende wurde für jedes Tier individuell anhand der applizierten Bewegungsamplitude und der verbliebenen Weichteilschicht zwischen Spikulaspitze und der gemessenen Spalthöhe berechnet.

4.1.3 Probenaufbereitung

Im Zuge der Auswertungen wurde der untere *threshold* des Grauwertes bei der μ CT-Analyse nach den Vorversuchen mit dem Wert 50 festgelegt, was ca. 20 % des oberen *thresholds* entspricht. Diese Festsetzung bedeutete, dass schwächer mineralisierte Bereiche der Spikula im Geweberegenerat nicht erkannt wurden. Eine Herabsetzung des *thresholds* war nicht möglich, da Artefakte wie Hydroxylapatit-Partikel oder Bildrauschen zu verfälschten Ergebnissen bei der Bestimmung der Knochenstrukturparameter geführt hätten. Schwach mineralisierte Bereiche wurden jedoch bei der histomorphometrischen Auswertung berücksichtigt.

Die Herstellung der unentkalkten Dünnschliffe erlaubte lediglich ein Präparat pro Tier. Dadurch war die unentkalkte Histologie zum einen auf eine Färbetechnik (Paragon) beschränkt. Zum anderen erfolgte die qualitative und quantitative Auswertung an nur einer Schnittebene. Diese war so gewählt, dass der Bereich zentral über den Bohrlöchern der Markraumborungen evaluiert werden konnte. Damit konnte die Ebene mit der mutmaßlich größten Aussagekraft zur Knochenneubildung ausgewertet werden.

4.2 Diskussion der Ergebnisse

Ogleich die Knochenneubildung durch Distraktionsosteogenese als Vorgang intramembranöser Ossifikation erachtet wird, gibt es viele Studien, insbesondere zur Kallusdistraktion an den Gliedmaßen, die von Knorpelbildung und vom Auftreten chondraler Ossifikation im osteotomierten Spalt sprechen (Jazrawi, Majeska et al. 1998). Die Knorpelbildung nach Distraktionsosteogenese wird u.a. auf kompressive Kräfte unter Lastaufnahme in der Maturationsphase zurückgeführt (Jazrawi, Majeska et al. 1998).

Basierend auf der Gewebedifferenzierungshypothese zur Frakturheilung wurde erwartet, dass unter Applikation der größeren Stimulationsamplitude während der Maturationsphase eine Knochenneubildung durch chondrale Ossifikation zu beobachten sein würde (Claes and Heigele 1999). Dies konnte in der durchgeführten Studie nicht bestätigt werden. In keiner der beiden Versuchsgruppen wurden Hinweise auf terminal differenzierte Knorpelzellen oder eine chondrale Ossifikation gefunden. Entgegen der formulierten Hypothese führte auch die größere Amplitude zyklischer Kompression in Gruppe 0.6 zu einer intramembranösen Ossifikation. Das Auftreten von Sox9-positiven Zellen und Kollagen Typ II könnte zur Beschreibung einer „transchondroiden Ossifikation“, einer direkten Knochenneubildung aus Knorpelvorläuferzellen, passen (Yasui, Sato et al. 1997). Eine verstärkte Expression von Sox9 und Kollagen Typ II in neugebildetem Knochen und angrenzenden Weichteilstrukturen wurde in einem Modell periostaler Distraktionsosteogenese beobachtet, ohne dass es zu einer chondralen Knochenbildung kam (Saulacic, Nakahara et al. 2016). In der hier vorgestellten Studie ergaben sich keine Hinweise hinsichtlich mechanisch induzierter Unterschiede bei der Gewebedifferenzierung. In beiden Versuchsgruppen offenbarte sich das als typisch beschriebene Bild bei der Distraktionsosteogenese mit einer intramembranösen Ossifikation in und um neugebildete knöcherne Trabekel, einer der *primary mineralization front* entsprechenden Zone kondensierten Gewebes um die Spikula und einer fibrösen Interzone mit Abstand zur kortikalen Oberfläche (Aronson, Good et al. 1990) (Abb. 3.13 und 3.14).

Die zwischen beiden Versuchsgruppen unterschiedlichen Amplituden der zyklischen Kompression modifizierten die durchschnittliche Rate der Knochenneubildung nach erfolgter Distraktion und bewirkten signifikante Unterschiede zu Versuchsende. Die meisten Knochenstrukturparameter zeigten höhere Werte bei Tieren, die während der zyklischen Stimulation die größere Bewegungsamplitude erfahren hatten. Sowohl das relative Knochenvolumen, als auch die Trabekeldicke und die mittlere Spikulahöhe waren bei Gruppe 0.6 signifikant größer (Abb. 3.8, 3.9 und 3.12). Zudem waren die Trabekelanzahl und die individuell höchsten Spikula unter der größeren Bewegungsamplitude deutlich höher. Anzahl und Verteilung von Zellen, die positiv für den Transkriptionsfaktor osteogener Differenzierung Runx2 waren, deuteten auf eine unbeeinträchtigte osteogene Aktivität im Regenerationsgebiet unter hoher Dehnung hin.

Die erzielten Ergebnisse zum positiven Einfluss moderater Kompression auf die Knochenneubildung stimmen mit Aussagen aus anderen Distraktionsosteogenesemodellen überein. In einer Studie am Metatarsus von Schafen konnte durch eine Dynamisierung nach erfolgter Distraktion die osteogene Aktivität unter zyklischer Kompression ebenfalls gesteigert werden (Claes, Laule et al. 2000). Die größere Bewegungsamplitude (0,5 mm)

fürte zu einer verbesserten Mineralisation und schnelleren Überbrückung des Spalts im Vergleich zu einer Bewegungsamplitude von 0,18 mm. In anderen Studien an Ziegen und Kaninchen konnte durch Lastaufnahme oder Applikation zyklischer Kompression während der Maturationsphase ebenfalls eine bessere Überbrückung als unter rigider Fixation erzielt werden (Kassis, Glorion et al. 1996, Leung, Cheung et al. 2004). Ähnliche Erkenntnisse sind auch aus Studien an Schafen zur Frakturheilung bekannt, in denen zyklische, axiale Kompression mit moderater Amplitude zu einer höheren Kallusmineralisierung und Überbrückung des Spalts führte (Kenwright and Goodship 1989, Claes, Wilke et al. 1995). Moderate Kompression führt zu einer höheren Aktivität osteogener Zellen, wie *in vitro* an Osteoblasten gezeigt werden konnte (Rath, Nam et al. 2008). Die Zunahme der Knochenmasse unter mechanischer Belastung im intakten Knochen ist ebenfalls bekannt und wurde *in vivo* u.a. im kortikalen und im subchondralen, trabekulären Knochen beschrieben, wenn dieser erhöhten Druckbelastungen ausgesetzt wurde (Rubin and Lanyon 1987, Whitton, Trope et al. 2010). Es gibt zudem Hinweise darauf, dass die Aktivität von Osteoblasten und Osteozyten positiv mit der Stärke der Belastung korreliert. Auf molekularer Ebene wurde in einem Modell zur Untersuchung von Ermüdungsbrüchen bei Ratten ein Anstieg der Expression osteogener Marker unter steigender Belastung beschrieben (Wohl, Towler et al. 2009). Es bleibt aus den Ergebnissen der vorliegenden Studie offen, ob die Zunahme der Knochenneubildung explizit auf eine höhere Dehnung durch Kompression zurückzuführen ist oder ob generell höhere Werte axialer Dehnung die Ossifikation fördern. Robling und Kollegen beobachteten, dass Druckbelastung die Expression von Sclerostin, Inhibitor der Knochenformation, in Osteozyten um 80 % unterdrückt. Unter Distraction betrug die Verringerung der Sclerostin-Expression nur 20 % (Robling, Niziolek et al. 2008). Dies spricht für ein größeres osteogenes Potential von Kompression in bereits differenzierten Knochenzellen.

Gruppenunterschiede im Mineralisierungsverhalten könnten auf ein dynamisches Verhalten der Knochenneubildung bei zyklischer Belastung in der Maturationsphase hinweisen. Unterschiede im relativen Knochenvolumen (BV/TV) zwischen den Versuchsgruppen stellten sich sowohl bei der quantitativ histologischen als auch radiologischen Analyse deutlich dar. Die histomorphometrisch erhobenen Werte waren uniform höher als die μ CT-Daten. Dies ist auf die Inklusion wenig mineralisierter Knochenanteile und Osteoid in der histologischen Auswertung zurückzuführen. Die Differenz zwischen den Analysemethoden war jedoch innerhalb der Gruppe 0.1 ungefähr doppelt so groß wie innerhalb der Gruppe 0.6, was für einen höheren Anteil wenig maturierten Knochens und eine langsamere Mineralisation unter kleiner Amplitude spricht. Yamaji und Kollegen konnten in ihrer Frakturheilungsstudie mit Fluoreszenzmarkierungen zeigen, dass interfragmentäre Kompression mit 0,7 mm eine im Vergleich zu 0,3 mm signifikant höhere Mineralisation vier Wochen post-OP bewirkt. Dieser

Unterschied war acht Wochen post-OP nicht mehr erkennbar (Yamaji, Ando et al. 2001). Auch in der vorliegenden Studie wiesen die Fluoreszenzmarkierungen auf ein unterschiedliches Mineralisierungsverhalten zwischen den Versuchsgruppen hin. Bis zum Beginn der zyklischen Kompression war das post-operative Protokoll identisch. Die Fluoreszenzmarkierungen mit Calceingrün, welche den Mineralisierungszustand zu diesem Zeitpunkt abbilden sollten, zeigten aber dennoch deutliche Differenzen. Die Calceingrün-Injektion in Gruppe 0.1 erzeugte zum Zeitpunkt des avisierten Stimulationsbeginns Färbungen fast ausschließlich endostal und in den Löchern der Markraumb Bohrungen, während in der Gruppe 0.6 grüne Säulen von den Bohrlöchern ausgehend bis weit in das Geweberegenerat zu finden waren. Möglicherweise wurde die Mineralisierung des Gewebes mit Einsetzen des Stimulus größerer Dehnung erheblich beschleunigt, sodass der noch zirkulierend verbliebene Farbstoff um den Zeitraum des Stimulationsbeginns in diesen Arealen eingelagert wurde. Gelbfärbungen durch die Tetracyclin-Injektion waren in beiden Gruppen zumeist diffus über die knöchernen Trabekel verteilt und nur vereinzelt als deutlich definierte Banden zu erkennen. Die Färbung wirkte in Gruppe 0.6 jedoch insgesamt intensiver und vereinzelt deutliche Banden auch in peripheren Bereichen der Spikula lassen vermuten, dass eine Mineralisierung kortexferner Trabekel schon zur Hälfte der Stimulation erfolgte und die Ossifikationsfront schon Mitte der Stimulationsphase die endgültige Höhe erreicht hatte.

Zu beachten ist die Tatsache, dass die Knochenneubildung in beiden Versuchsgruppen sowohl bei der mittleren als auch der maximalen Spikulahöhe hinter Vergleichswerten im verwandten Modell zurück blieb (Claes, Veerer et al. 2010). Unter Annahme eines linearen Spikulawachstums ohne zyklische Kompression nach Kallusdistraktion hätte die durchschnittliche Spikulahöhe zu Versuchsende ca. 2,9 mm betragen müssen (Claes, Veerer et al. 2010). Sie lag in der vorliegenden Studie jedoch bei ca. 1,1 mm (Gruppe 0.1) und ca. 2,5 mm (Gruppe 0.6) (Abb. 3.12). Da eine Steigerung der Dehnung durch zyklische Kompression im vorliegenden Tierversuch zu einer stärkeren Knochenneubildung führte, in der anderen Studie hingegen unter rigider Fixation nach Kallusdistraktion eine vergleichsweise bessere Heilung erfolgte, liegen die Gründe für die Unterschiede zwischen beiden Studien mit großer Wahrscheinlichkeit nicht in der mechanischen Umgebung. Möglich ist, dass die Abweichungen auf den gewählten Schaf-Rassen beruhen. In einem Feldversuch an zwei autochthonen Schafrassen zeigten sich signifikante Unterschiede der skelettalen Entwicklung unter gleichen Haltungsbedingungen und überdies Unterschiede der Sensitivität auf veränderte körperliche Belastung durch die Geländestruktur der Weiden (Willems, Leiber et al. 2013). Abweichend von den im vorliegenden Versuch verwendeten Merino-Schafen wurden in der Studie von Claes und Kollegen Bergschafe eingesetzt. Auch das Alter der

Tiere oder saisonale Unterschiede im Knochenmetabolismus können eine Rolle gespielt haben (Arens, Sigrist et al. 2007, Strube, Sentuerk et al. 2008).

Im Gegensatz zu den Ergebnissen der hier vorliegenden Studie wurde moderate interfragmentäre Bewegung durch axiale Kompression sowohl in Studien zur Distraktionsosteogenese als auch zur Frakturheilung mit dem Auftreten chondraler Ossifikation und mit Knorpelbildung assoziiert (Claes, Wilke et al. 1995, Claes, Laule et al. 2000). Auch wenn einige Sox9-positive Zellen und Kollagen Typ II im Geweberegenerat erkannt wurden, waren keine terminal differenzierten Chondrozyten oder eine knorpeltypische Proteoglykanbildung zu finden, die auf eine chondrale Ossifikation hinweisen würden. Die Sox9- und Kollagen Typ II-Expression in Vorläuferzellen endet mit dem Erreichen eines prähypertrophen Chondrozytenstadiums (Lefebvre and Smits 2005). Die räumliche Überschneidung Sox9-positiver mit Runx2-positiven Zellen spricht für Vorläuferzellen, die als bipotente Osteochondroprogenitorzellen bezeichnet werden (Nakashima and de Crombrughe 2003). Es gibt drei Erklärungsansätze für die hier vorgefundene intramembranöse Ossifikation und die Beobachtung chondraler Knochenneubildung in anderen Studien, die den Einfluss axialer Kompression auf Kallusdistraktion und Frakturheilung untersuchten. Sowohl i) der Einfluss multimodaler Deformation im Osteotomiespalt und ii) die Vaskularisation der Regenerationszone als auch iii) die Induktion osteogener Zelldifferenzierung durch Zugdehnung während der Distraktionsphase könnten für die beobachteten Unterschiede verantwortlich sein. Vermutlich ist die osteogene Zelldifferenzierung auf eine Kombination mechanischer und biologischer Einflüsse und deren Wechselwirkungen zurückzuführen.

Der Erfolg der Knochenheilung wird schon seit langem mit dem Grad der Fixationsstabilität der Osteosynthese assoziiert (Sarmiento, Mullis et al. 1980). Dies gilt für die Frakturheilung ebenso wie für die Distraktionsosteogenese. Im hier vorliegenden Modell wurde das Geweberegenerat im Zuge der zyklischen Stimulation nach Kallusdistraktion ausschließlich kontrolliert axialer Kompression ausgesetzt. Eine Deformation des Gewebes in anderer Richtung wurde durch die rigide Verbindung des Fixationssystems zur intakten Tibia verhindert. In den bisher durchgeführten Osteotomieheilungsmodellen muss davon ausgegangen werden, dass anders gerichtete Bewegung, wie Scherung und Biegung nicht komplett verhindert wurden. Das Auftreten interfragmentärer Bewegung ist u.a. stark abhängig von der Geometrie und Steifigkeit der Fixationskonstruktion. Unkontrollierte Deformation durch Lastaufnahme und Muskelzug entsteht zwangsläufig im Osteotomiespalt, da spaltüberbrückende Fixationssysteme nicht unbegrenzt steif sein können. Auch wenn in Experimenten eine ausschließlich axiale Bewegung angestrebt wird, muss mit dem Auftreten von Biege- und Scherbewegung gerechnet werden. Biomechanische Studien zur Steifigkeit

verschiedener Hybridfixationssysteme *in vitro* zeigten, dass Scherbewegung zwischen den Knochenfragmenten selbst unter rein axialer Kompression auftritt (Yang, Nayagam et al. 2003). Darüber hinaus konnte nachgewiesen werden, dass es bei der Verwendung von axial dynamischen Fixationssystemen durch Rotationsinstabilität im Teleskop-Mechanismus zu Scherdehnung kommt. Das Ausmaß der Scherdehnung nimmt bei stärkerer Dynamisierung zu, da es unter Lastaufnahme zu einer Verringerung der Spaltgröße kommt (Gardner, Hardy et al. 1996). Aus der Klinik ist bekannt, dass bei Patienten mit Korrekturosteotomie und Versorgung mit Ilizarov-Ringfixateur Scherbewegung im Allgemeinen axiale Kompressionsbewegung unter Lastaufnahme übertrifft (Duda, Sollmann et al. 2002). In der Frakturheilung wird insbesondere Scherdehnung als Hauptfaktor für die Induktion von Knorpelbildung erachtet (Morgan, Salisbury Palomares et al. 2010). Die Expression von Kollagen Typ II in der den Trabekeln angrenzenden Matrix in der vorliegenden Studie könnte ein Hinweis auf eine lokalisierte Gewebescherung sein, wenn das Gewebe unter zyklischer Kompression an der Trabekeloberfläche entlang gepresst wurde. Scherdehnung wird zumeist als hinderlich für eine erfolgreiche Frakturheilung und aus biomechanischer Sicht als limitierender Faktor für die Knochenneubildung befunden (Augat, Burger et al. 2003, Schell, Thompson et al. 2008). Nachteilige Auswirkungen auf die Frakturheilung durch Scherung wurden schon von Yamagishi und Yoshimura postuliert (Yamagishi and Yoshimura 1955). Fixationen, die gezielt Scherung zuließen, zeigten bei Schafen eine signifikant verzögerte Heilung diaphysärer Osteotomien im Vergleich zur Heilung unter ähnlich großer Axialbewegung (Augat, Burger et al. 2003). Sowohl Biegung, Scherung als auch die Kombination beider Bewegungen führte in Ratten zur Bildung von Knorpel, der im Gegensatz zur rigide fixierten Kontrolle eine knöcherne Überbrückung zu Versuchsende verhinderte (Cullinane, Salisbury et al. 2003). In den von Ilizarov durchgeführten Studien zur Distractionsosteogenese wurde die Reduktion der Fixationssteifigkeit als ein Grund für das Auftreten chondraler Ossifikation und Heilungsverzögerungen im Verlauf bezeichnet (Ilizarov 1989). In einer retrospektiven Studie zur Distractionsosteogenese bei Hunden heilten die *oblique* belasteten Tibiadefekte deutlich langsamer als die axial belasteten Radiusdefekte (Tuohy, Marcellin-Little et al. 2014).

Das Auftreten chondraler Ossifikation und die Bildung von Knorpel in Studien zur Kallusdistraction mit Osteotomie könnten im Unterschied zur vorliegenden Studie auf eine insuffiziente Vaskularisation des Regenerationsgebietes zurückzuführen sein. Eine ausreichende Blutversorgung ist Grundvoraussetzung für eine intramembranöse Ossifikation, während chondrale Ossifikation auch unter hypoxischen Bedingungen stattfinden kann (Percival and Richtsmeier 2013). Eine insuffiziente Durchblutung wird auch bei der Frakturheilung mit einer vermehrten Knorpelbildung in Verbindung gebracht (Carter, Beaupre et al. 1998). *In vitro* konnte gezeigt werden, dass lokale Hypoxie eine osteogene

Differenzierung durch Unterdrückung der Runx2-Expression verhindert (Wang, Li et al. 2012). Die Markraumb Bohrungen im vorliegenden Modell erlaubten die Neovaskularisation des Geweberegenerates durch das Einsprießen von Gefäßen aus dem Markraum. Histologisch konnte eine sehr gute Gefäßdichte festgestellt werden. Die ermittelten Werte fügten sich gut in die Ergebnisse einer Studie nach Distractionsosteogenese an Ratten (Donneys, Tchanque-Fossuo et al. 2012). Zwischen den Versuchsgruppen in der vorliegenden Studie gab es keine Unterschiede bei der Gefäßdichte im Geweberegenerat. Dies lässt darauf schließen, dass die größere Stimulationsamplitude keinen nachteiligen Effekt auf die Gefäßbildung hatte. *In vitro* wurde gezeigt, dass zyklische Belastung die Sauerstoffverfügbarkeit von Zellen im Hämatom erhöht und Effekte der mechanischen Umgebung auf die Ossifikation bei Abwesenheit vaskulärer Wachstumsfaktoren ausbleiben (Witt, Duda et al. 2014, Jiang, Wang et al. 2016). Ohne die Markraumb Bohrungen war die Ossifikation nach Kallusdistraction gegenüber den Tieren mit Markraumanbindung signifikant reduziert (Claes, Veeseer et al. 2010). In anderen Studien zur Distractionsosteogenese schien chondrale Ossifikation im Gegensatz zu gefäßschonenderen Techniken wie Kortikotomien vor allem in Modellen mit kompletter Osteotomie aufzutreten (Ilizarov 1989). Nach Kortikotomie in Hundetibien überbrückte der Distractionsspalt durch intramembranöse Ossifikation, obgleich Hinweise auf insuffiziente biomechanische Eigenschaften des externen Fixateurs das Auftreten von Scher- und Biegebewegung vermuten ließen (Aronson, Harrison et al. 1989). In der Frakturheilungsforschung konnten bei gleichem Osteosyntheseverfahren Unterschiede hinsichtlich der Gewebedifferenzierung zwischen geschlossener Fraktur und Osteotomie festgestellt werden (Park, O'Connor et al. 1999). Im Gegensatz zur Osteotomie war eine vorrangig intramembranöse Ossifikation bei der geschlossenen Frakturheilung zu beobachten. Zusammenfassend scheint eine chondrogene Differenzierung entweder in primär hypoxischen Arealen (z.B. bei Weichteilschädigung) oder sekundär durch eine Störung der Neovaskularisation (z.B. durch Instabilität der Fixation) aufzutreten. In Frakturheilungsstudien konnte gezeigt werden, dass eine zunehmende Instabilität der Osteosynthese mit einer abnehmenden Vaskularisation verbunden ist (Lienau, Schell et al. 2005). Frierson und Kollegen assoziierten die Bildung von Faserknorpel nach Distractionsosteogenese mit entweder einer Lockerung der Bohrdrähte oder einer ausbleibenden Neovaskularisation (Frierson, Ibrahim et al. 1994).

Schließlich könnte die Induktion osteogener Zelldifferenzierung durch die während der Distractionphase auftretende Zugdehnung für das Ausbleiben chondraler Ossifikation verantwortlich sein. Die Mechanismen der Gewebedifferenzierung bei der Distractionsosteogenese sind in dieser Hinsicht von denen bei der Frakturheilung abgrenzen. Die Annahme, dass die größere Stimulationsamplitude eine chondrale Ossifikation und die kleinere eine intramembranöse Knochenneubildung induzieren würde, basierte auf der

Gewebedifferenzierungshypothese für die Frakturheilung. Darin wird vermutet, dass niedrige Dehnungswerte eine intramembranöse Ossifikation induzieren während Dehnung zwischen 5-15 % in Kombination mit hydrostatischem Druck $> 0,15$ MPa eine chondrale Ossifikation fördern (Claes and Heigele 1999). Die zyklische Kompression größerer Amplitude in Gruppe 0.6 verursachte Dehnung, die schon zu Beginn der zyklischen Stimulation über 10 % lag und mit zunehmender Überbrückung im Versuchsverlauf deutlich höhere Werte erreichte. Für die Knochenneubildung bei der Kallusdistraktion scheinen jedoch modifizierte Gesetzmäßigkeiten zu gelten. Der Hauptgrund für diesen Unterschied ist vermutlich, dass Zugdehnung während der Distraktionsphase die osteogene Differenzierung von Zellen im Regenerationsgebiet induziert. *In vitro* konnte gezeigt werden, dass Zug osteogen assoziierte Gene in mesenchymalen Stammzellen reguliert, während Kompression zur Expression chondrozytärer Gene führt (Haudenschild, Hsieh et al. 2009). Der Einfluss von Zugdehnung auf die Zelldifferenzierung ist zudem anhaltend. Dies zeigen Studien zur Untersuchung der Effekte isolierter lateraler Kallusdistraktion, wobei weitere Deformation des Gewebes nach abgeschlossener Distraktion unterblieb. In Biopsien aus humanen Geweberegeneraten wurde eine verstärkte Runx2-Expression und in Präparaten aus Schafen eine rein intramembranöse Ossifikation beobachtet (Amir, Jovanovic et al. 2007, Claes, Veese et al. 2010). Selbst bei Ausbleiben weiterer mechanischer Stimuli hielt die Knochenneubildung für mindestens 50 Tage nach Distraktion an (Claes, Veese et al. 2010). Die knöcherne Überbrückung des Spalts nach Kallusdistraktion dauert ungefähr doppelt so lang wie die Distraktion selbst (Ilizarov 1989). *Tension-stress* durch die Distraktion könnte den in unserer Studie applizierten Stimulus durch zyklische Kompression überlagert und dadurch die osteogene gegenüber der chondrogenen Zelldifferenzierung bevorteilt haben. Eine ähnliche Beobachtung wurde in der Vergangenheit bei Anwendung der „Akkordeon-Technik“ gemacht, bei welcher der Knochenspalt abwechselnd gestreckt und wieder komprimiert wird. Die Applikation einzelner Stimuli durch Zug wurde u.a. im Tierversuch an Schafen als potentiell förderlich für die Knochenneubildung beschrieben (Claes, Augat et al. 2008). Wenngleich die Anzahl zyklischer Deformation des Gewebes durch Lastaufnahme der Tiere die Zahl der einzelnen Zugstimuli bei weitem übertraf, konnte eine gesteigerte Knochenneubildungsrate und im Verhältnis weniger Knorpel gegenüber der konstant stabilisierten Kontrollgruppe beobachtet werden. Die oben genannten Studien zeigen, dass Zugdehnung im Regenerationsgebiet die zelluläre Differenzierung in die osteogene Linie triggert und legen nahe, dass sie die Differenzierung von Chondrozyten durch zyklische Kompression zumindest teilweise unterdrücken kann. Das Ausbleiben einer terminalen chondrogenen Differenzierung und der Bildung von Knorpel, sowie die intensive Runx2-Färbung und Verteilung positiver Zellen in Gruppe 0.6 stützen diese Vermutung.

Fraglich bleibt, ob deutlich höhere Druckdehnung eine intramembranöse Knochenneubildung verhindert. Es kann spekuliert werden, dass in gut vaskularisiertem Gewebe die intramembranöse Knochenneubildung unter steigender zyklischer Belastung zunimmt. Dies gilt, so lang eine Beschädigung der Gewebestruktur ausbleibt, welche die Gefäßanbindung beeinträchtigt. Über den höchsten Knochenspikula traten in Gruppe 0.6 Dehnungswerte auf, welche weit über bisher als kritisch propagierten Werten für die Ossifikation lagen (Tabelle 3.2). Selbst bei nahezu vollständiger Überbrückung des Spalts waren osteogen differenzierte Zellen über den Spikulahöhen zahlreich vertreten und zeigten metabolische Aktivität. Die Prinzipien der Mechanobiologie im intakten Knochen stützen diese Hypothese. Unter hochgradiger aber subfrakturierender zyklischer Belastung des Skeletts durch Training und Rennen kommt es bei Rennhunden in den Arealen der höchsten Dehnung lokalisiert zu einer signifikanten Steigerung der Knochenmineralisierung durch Modellierungsvorgänge, welche intramembranös ablaufen (Johnson, Muir et al. 2000).

4.3 Limitationen

Limitiert wird die Aussagekraft dieser Studie hinsichtlich expliziter Effekte zyklischer Kompression auf die Knochenneubildung durch die im Protokoll festgesetzte Kallusdistraktion. Zur Untersuchung vorteilhafter Steifigkeiten bzw. einer Dynamisierung nach Distraktionsosteogenese war sie obligater Bestandteil dieses Tierversuchs. Wechselwirkungen oder kumulative Effekte der mechanischen Stimuli durch *tension-stress* und zyklische Kompression sind aus den Ergebnissen dieses Versuches nicht kalkulierbar. Der Einfluss zyklischer Kompression unterschiedlicher Bewegungsamplitude muss im Kontext dieser Limitation gesehen werden. Die signifikanten Unterschiede bei der Knochenneubildung zwischen den beiden Versuchsgruppen lassen aber auf einen Einfluss unterschiedlich starker Kompressionsamplituden auch nach erfolgter Distraktion schließen.

In einigen Fällen wurden angrenzend zur Titanplatte isolierte Inseln neugebildeten Knochens gefunden (Abb. 3.4). Dies unterstreicht zum einen die stark osteokonduktiven Eigenschaften der Ummantelung mit Hydroxylapatit. Zum anderen wirft es die Frage auf, ob neben den mechanischen Einflüssen bei der beobachteten Knochenformation auch biologisch induzierte Knochenneubildung auftrat. Hydroxylapatit wird als Implantat mit und ohne Mikrobewegungen stark osteokonduktive Eigenschaften zugeschrieben (Soballe 1993, Soballe, Hansen et al. 1993). Dagegen zeigten Claes und Kollegen in ihrer Studie, dass die Kontrolltiere, die keine kontinuierliche Distraktion erhalten hatten, sondern bereits intraoperativ mit der endgültigen Spalthöhe ausgestattet wurden, ein signifikant geringeres Knochenwachstum aufwiesen (Claes, Veeseer et al. 2010). Die osteokonduktiven Eigenschaften scheinen demnach vor allem in Synergie mit einem mechanischen Stimulus

zu wirken. Um dennoch mögliche Einflüsse einer isolierten Knochenneubildung auszuschließen, wurden ROI/VOI bei der Untersuchung der Knochenstrukturparameter in der Höhe mit 3 mm über der Kortexfläche begrenzt. Die Knochenneubildung in den kaudokranielen und proximo-distalen Randbereichen des Geweberegenerates wurde als stressinduzierte periostale Reaktion, wie sie beispielsweise bei Ermüdungsbrüchen auftritt, interpretiert (Uthoff and Jaworski 1985). Sie könnte im Zuge intra-operativer Reizung des Periostes oder bei den post-operativen Manipulationen entstanden sein. Auf das Periost wirkende Zugdehnung wird osteogene Effekte zugeschrieben und findet als periostale Distraktionsosteogenese beispielsweise Anwendung in der Gesichtschirurgie (Ochareon and Herring 2011, Saulacic, Nakahara et al. 2016). Durch die Begrenzung der ROI/VOI auf zentrale Bereiche im Geweberegenerat konnte die periostale Reaktion bei der Auswertung ausgeschlossen werden.

Im Zuge der Präparation wurde das Geweberegenerat noch vor den radiologischen Untersuchungen mittig geteilt, um den für die späteren immunhistochemischen Untersuchungen vorgesehenen Anteil schnellstmöglich nach der Tötung in Formalin zu fixieren. Dadurch stand für die Auswertung von Röntgen und μ CT jeweils nur eine Bohrlochreihe zur Verfügung. Diese Tatsache könnte den Informationsgehalt und die Aussagekraft der Knochenstrukturparametermessungen eingeschränkt haben. Bezüglich der mechanischen Umgebung ist zwischen kranialer und kaudaler Bohrlochreihe aber von keinen systematischen Unterschieden auszugehen. Durch die Lokalisation des Geweberegenerates ohne direkte Nähe zu größeren Weichteilarealen ist auch eine biologisch bzw. vaskularisationsbedingt systematisch unterschiedliche Knochenneubildung nicht wahrscheinlich. Aus diesem Grund sind intraindividuelle Unterschiede zwischen kranialer und kaudaler Bohrlochreihe bei der Knochenneubildung zufällig und der Einfluss auf die Ergebnisse vernachlässigbar.

4.4 Schlussfolgerung

In der hier vorgestellten Studie bewirkten die Kombination aus Distraktion mittels eines osteokonduktiv wirksamen Implantates und die ausreichende Vaskularisation durch die Markraumb Bohrungen die osteogene Differenzierung der Zellen im Geweberegenerat und induzierten eine intramembranöse Ossifikation. Durch Vermeidung von Scherbewegung war die intramembranöse Ossifikation auch während der anschließenden Maturation des Gewebes unbeeinträchtigt und eine chondrale Ossifikation blieb aus. Dehnung durch moderate Kompression des Geweberegenerates steigerte die Knochenneubildung. Die Anzahl und Verteilung Runx2-positiver Zellen wiesen auf eine andauernde osteogene

Differenzierung zu Versuchsende hin, die von der hohen Dehnung in der schmalen Weichteilschicht nicht negativ beeinflusst wurde.

Im Hinblick auf das Studienziel zur Untersuchung des Einflusses zyklischer Kompression unterschiedlicher Bewegungsamplitude auf die Knochenneubildung nach Kallusdistraction können folgende Aussagen getroffen werden:

- i) Die Gewebedifferenzierung nach Kallusdistraction folgt möglicherweise nicht den gleichen Prinzipien wie bei der Frakturheilung.
- ii) Bei Applikation moderater axialer Kompression nach Kallusdistraction bleibt die erwartete chondrale Ossifikation aus, wenn andere Bewegung, wie z.B. durch Biegung oder Scherung, vermieden werden kann und die Blutversorgung sichergestellt ist.
- iii) Zyklische Kompression moderater Amplitude steigert die unter Zugdehnung und ausreichender Vaskularisation eingeleitete intramembranöse Ossifikation gegenüber kleinerer Amplitude.

4.5 Ausblick

Mit dieser Studie wurde ein Tiermodell etabliert, welches in leichter Abwandlung des hier verwendeten Versuchsprotokolls großes Potential für zukünftige *in vivo*-Untersuchungen auch zur Mechanobiologie der Frakturheilung besitzt.

Bei Unterlassung der Kallusdistraction und einer stattdessen einmaligen Spaltbildung nach vorheriger Latenz, könnten Bedingungen geschaffen werden, welche die Situation nach Fraktur oder Osteotomie sehr gut abbilden. Der Raum zwischen gefräster Kortex auf der einen und der osteokonduktiven Titanplatte auf der anderen Seite repräsentiert einen Frakturspalt. Einblutungen und Blutkoagula aus den Markraumböhrungen und dem umgebenden Unterhautgewebe schaffen Bedingungen eines Frakturhämatoms. Die Fixationskonstruktion mit dem aufsetzbaren Motor könnte für die Testung unterschiedlicher Protokolle zyklischer Stimulation genutzt werden und dabei als Modell für den Einfluss von interfragmentären Bewegungen in der Frakturheilung dienen. Dieses Modell würde es ermöglichen, den Einfluss exakt kontrollierter Bewegungen in Druck- oder Zugrichtung ohne Überlagerung durch dreidimensionale Verformung zu untersuchen. Valide Korrelationen zwischen Bewegungsrichtung/ -amplitude und der Knochenneubildung nach Fraktur könnten dadurch möglich werden. Limitationen durch dreidimensionale Deformation des Spalts nach Osteotomie werden vermieden. Zudem bietet dieses Tiermodell den Vorteil, dass die

Operation im Vergleich zu Osteotomien wenig invasiv ist und damit die Belastung der Versuchstiere reduziert werden kann. Im Sinne des Tierschutzes und dem Gebot des *refinement* als Teil des 3-R-Prinzips (*reduction, replacement, refinement*) könnte dieses Verfahren eine sinnvolle Weiterentwicklung darstellen.

5 Zusammenfassung

Die mechanische Umgebung ist ein Hauptfaktor für Heilungsverzögerungen bei knöchernen Defekten und wurde in der vorliegenden Studie mit Augenmerk auf das Verfahren der Distractionsosteogenese untersucht. Dehnung aufgrund moderater axialer Kompression beeinflusst den Heilungsverlauf und kann die Knochenneubildung unterstützen. Obwohl die Distractionsosteogenese in Reinform als Prozess intramembranöser Ossifikation beschrieben wird, wurde in vielen Tierversuchen auch Knorpelbildung und chondrale Ossifikation beobachtet. Dies wurde unter anderem auf Druckbelastung unter Lastaufnahme der Tiere zurückgeführt. Valide Korrelationen zwischen auftretender Dehnung und dem Heilungsverlauf sowie der mechanisch induzierten Zelldifferenzierung sind problematisch, da das Gewebe im Spalt osteotomierter Knochen komplexer Deformation ausgesetzt ist. Das Ziel dieser Studie war es, Effekte rein zyklischer Kompression auf die Knochenbildung und Gewebedifferenzierung nach Distractionsosteogenese zu untersuchen und dabei Limitationen von Osteotomiemodellen zu umgehen. Mit Hilfe eines neu entwickelten Modells zur lateralen Kallusdistraction konnte in der durchgeführten Studie der Einfluss rein axialer Kompression auf die Ossifikation nach erfolgter Kallusdistraction an Schafen untersucht werden.

Operativ wurde die rechte Tibia mit medialem Zugang freigelegt. In standardisierter Weise wurden zwei Schanz-Schrauben bikortikal verankert. Nach Fenestration des Periosts zwischen den Schrauben, wurde in diesem Bereich eine Planfläche in die Kortex gefräst und anschließend mittels 22 Bohrungen eine Verbindung zum Markraum hergestellt. Anschließend wurde eine Titanplatte mit osteokonduktiver Beschichtung auf der vorbereiteten Fläche platziert. Nach Wundverschluss erfolgte das Anbringen eines Fixationssystems an die Schrauben mit Verbindung zur Titanplatte. Das Fixationssystem erlaubte eine schrittweise Abduktion der Titanplatte von der Kortex und im Anschluss die Applikation präziser zyklischer Kompression des während der Distractionsphase entstandenen Spalts. Die motorgesteuerten Bewegungen erzeugten Dehnung, welche je nach Bewegungsamplitude entweder eine intramembranöse Ossifikation oder eine chondrale Ossifikation induzieren sollte. Sieben Wochen nach der Operation wurden die Tiere getötet und die gewonnenen Präparate mit μ CT, histologischen und immunhistochemischen Analysen auf die Menge neugebildeten Knochens sowie die Art der Ossifikation untersucht. Entgegen der formulierten Hypothese, war auch nach Applikation der größeren Bewegungsamplitude keine chondrale Ossifikation zu beobachten. Stattdessen wurde eine im Vergleich zur kleinen Amplitude gesteigerte intramembranöse Ossifikation vorgefunden. Das relative Knochenvolumen, die trabekuläre Dicke des neugebildeten Knochens sowie die

mittlere Höhe der konisch geformten Knochenspikula zeigten signifikante Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen.

Eine gesteigerte Knochenneubildung durch moderate zyklische Kompression des regenerierenden Gewebes steht in Übereinstimmung mit anderen Studien zu Distractionsosteogenese und Frakturheilung. Andererseits wird höhere Dehnung in Osteotomiemodellen stark mit der Bildung von Knorpel assoziiert. Es gibt drei Erklärungsansätze für die Unterschiede zum hier vorgestellten Modell. Zunächst konnte in der vorliegenden Studie das Auftreten von Scherbewegung verhindert werden, welche mit Knorpelbildung und Heilungsverzögerung in Verbindung gebracht wird. Dies ist in Osteotomiemodellen nur schwer möglich. Weiterhin konnte durch die Markraumborungen eine ausreichende Vaskularisation des Geweberegenerates sichergestellt werden, was Grundvoraussetzung für eine intramembranöse Ossifikation ist. Die größere Bewegungsamplitude hatte keinen nachteiligen Effekt auf die Gefäßdichte. Osteotomien hingegen stören die lokale Blutversorgung beträchtlich. Schließlich gibt es Hinweise darauf, dass die während der Distraction applizierte Zugdehnung eine osteogene Zelldifferenzierung triggert, welche auch in der Maturationsphase anhält und möglicherweise eine terminale chondrogene Differenzierung unterdrückt.

Aus den Erkenntnissen der vorliegenden Studie leitet sich für die klinische Anwendung der Distractionsosteogenese ab, dass moderate axiale Kompression die unter *tension-stress* eingeleitete intramembranöse Ossifikation fördern kann, wenn Scherbewegung minimiert und ein gefäßschonendes Operationsverfahren angewendet wird.

6 Summary

Intramembranous bone formation after callus distraction is augmented by increasing axial compressive strain

The mechanical environment is a primary factor for delay in bone defect healing and, on the matter of distraction osteogenesis, subject of investigation. Strain resulting from moderate axial compression modifies the course of healing and can improve ossification. Although described as a process of intramembranous ossification, cartilage apposition is observed regularly in distraction osteogenesis and linked to compressive forces. Valid correlations between strain and healing success as well as cellular differentiation are scarce due to complex deformation in the fracture gap of osteotomy models. The aim of this study was to investigate the effects of pure cyclic compression on bone formation and tissue differentiation after distraction osteogenesis while avoiding drawbacks of osteotomy models, e.g. complex deformation. By means of a unique model of lateral callus distraction, we investigated the effects of pure axial compression on ossification during callus maturation in sheep.

Surgery was performed on the right tibia with a medial approach. Two Schanz screws were inserted bicortically in a standardized manner. After resection of the periosteum, a flat plane was milled into the cortex and 22 holes drilled into the medullary cavity within. A titanium plate coated with an osteoconductive material was placed on the prepared surface. After skin closure, a distraction device incorporating the mobile titanium plate was mounted to the Schanz screws on the intact tibia and allowed precise cyclic compression of the regenerate tissue following lateral callus distraction. Motor controlled movements induced strains hypothesized to promote intramembranous ossification or endochondral ossification, respectively. Seven weeks postoperatively the animals were euthanized and the specimens investigated for quantity of bone formation and mode of ossification using μ CT and histology as well as immunohistochemistry.

Contrary to the hypothesis, the larger amplitude induced no endochondral ossification even under higher compressive strain and instead, led to enhanced intramembranous bone formation compared to the lower stimulation amplitude. Fractional bone volume, trabecular thickness as well as the mean spicule height of newly formed bone exhibited significant differences between experimental groups.

Increased osteogenic activity under moderate cyclic compression is in accordance with other studies. Yet, higher strains are associated with cartilaginous differentiation in osteotomy models. There are three reasons explaining this discrepancy. Firstly, avoiding shear movements in the current model separates it from osteotomy models. Secondly, neovascularization was undeterred even under the larger compression amplitude while full

osteotomy models interfere with local blood supply. Lastly, tensile strain stimuli inducing osseous differentiation of cells during the distraction phase persist during the maturation phase and may suppress chondrogenic differentiation.

In clinical application of distraction osteogenesis, moderate cyclic compression enhances intramembranous ossification providing shear strain is minimized and a vascularity preserving surgery technique is warranted.

7 Abbildungsverzeichnis

- Abbildung 1.1 Knochenneubildung durch intramembranöse Ossifikation (links) im Schaffsfemur mit Osteoblastensaum (Stern) und neugebildetem Osteoid (Pfeile). Knochenneubildung durch chondrale Ossifikation (rechts) im Schaffsfemur. Violett eingefärbt ist ein Knorpelsaum mit hypertrophen Chondrozyten erkennbar. Paragon Färbung, 50-fache Vergrößerung. Modifiziert nach Reusch 2010 (links) und Claes, Reusch et al., 2011 (rechts).
..... 4
- Abbildung 1.2 Schema des Kalluswachstums bei sekundärer Heilung einer diaphysären Fraktur. Frakturferne Knochenbildung durch intramembranöse Ossifikation (A). Chondrale Ossifikation nach Knorpelbildung in spaltnahen Zonen (B). Modifiziert nach (Claes 2006). .. 5
- Abbildung 1.3 *Remodelling*-Vorgänge in der Metaphyse eines Schaffsfemurs mit Osteoblastensaum (Stern) und Osteoklasten (Blockpfeile). Paragon-Färbung, 200-fache Vergrößerung. Modifiziert nach (Reusch 2010). 7
- Abbildung 1.4 Distaler Metacarpus III von Rennpferden nach 9 Wochen Boxenruhe (A) und von einem Tier im Training (B). Auffällig ist die generalisierte Porosität im subchondralen Knochen des untrainierten (blau markiert) im Vergleich zur hohen Kochendichte des trainierten Pferdes (rot markiert). Modifiziert nach (Whitton, Trope et al. 2010). 8
- Abbildung 1.5 Transmissions-Elektronenmikroskopische Aufnahme eines Osteozyten mit dendritischen Fortsätzen (P) in die umgebenden Canaliculi (Can). Zudem markiert sind der Nukleus (N) und das Zytoplasma (Cyt). Modifiziert nach Thompson et al., 2012. 10
- Abbildung 1.6 Schematische Darstellung einer epiphysären Schrägfraktur des mittleren Zehenknochens bei einem Hund. Mesenchymale Stammzellen im Frakturspalt erfahren bei interfragmentärer Bewegung volumetrische Änderung durch hydrostatischen Druck (A) und Konformationsänderung durch Dehnung (B). 13
- Abbildung 1.7 Qualitative Gewebedifferenzierungshypothese für mesenchymale Stammzellen im Frakturgebiet (Abszisse: Dehnung, Ordinate: hydrostatischer Druck) (Pauwels 1960). 14
- Abbildung 1.8 Quantitative Gewebedifferenzierungshypothese in Abhängigkeit von den im Frakturgebiet wirkenden Kräften (Abszisse: hydrostatischer Druck in MPa, Ordinate: Dehnung in Prozent) (Claes and Heigele 1999)..... 15
- Abbildung 1.9 Röntgenaufnahme einer Schafstibia nach Explantation 70 Tage post-OP (links) und Distraktionsvorrichtung auf Schafstibia *in vitro* (rechts) (Claes, Veeseer et al. 2010). 18
- Abbildung 2.1 Übersicht des Tierversuchs (*in vivo*) und der Probenaufbereitung (*ex vivo*). Die post-operativen Manipulationen sind in den grau hinterlegten Arealen dargestellt. Nach zehn Tagen Distraktion (roter Pfeil) entstand zwischen Tibia und Titanplatte ein Spalt mit regenerierendem Gewebe (rot gestrichelte Zone in der Röntgenaufnahme). Sieben Tage nach Beginn der Maturation wurde das Geweberegnerat zyklischer Kompression mit zwei unterschiedlichen Bewegungsamplituden und Frequenzen ausgesetzt. An zwei Zeitpunkten (Beginn und Mitte der Phase zyklischer Kompression) wurden Fluoreszenzfarbstoffe injiziert. Die Probenaufbereitung beinhaltete radiologische, histologische und immunhistochemische Analysen. 25

- Abbildung 2.2 Zeichenentwurf der Fixationskonstruktion als Vorbild bei der Entwicklung. Neben den bereits bekannten Elementen (Schanz-Schrauben, Querbrücke, Titanplatte) aus der Studie von Claes und Kollegen (Claes, Veese et al. 2010) kamen die Gewebeschutzvorrichtung bzw. Hautplatte, der Kraftsensor und die Motorhalterung mit Stepper-Motor dazu..... 28
- Abbildung 2.3 Die Fixationskonstruktion in Einzelteilen. Zu sehen sind die Schutzplatte (A), die Querbrücke (B) mit der Feststellmutter (C) (Detailansicht unten rechts), die Hautplatte (D) mit der korrespondierenden Hälfte gegenüber, das Verbindungsstück (E) und die Titanplatte (F) (Detailansicht unten links). Es fehlt der Kraftsensor im Verbindungsstück. 29
- Abbildung 2.4 Fixationskonstruktion *in vivo* mit Schutzplatte (links) und mit dem temporär aufgesetzten Stepper-Motor (rechts) (kaudo-kraniale Aufsicht). 30
- Abbildung 2.5 Detailansicht der Titanplatte *in vitro* mit Darstellung der Bewegungsrichtung (Blockpfeile) während der zyklischen Kompression (kaudo-kraniale Ansicht). 30
- Abbildung 2.6 Illustration der Vorgehensweise während den Manipulationen (Distraktion und mechanische Stimulation). Das Tier wurde stehend fixiert (oben links). Nach Entfernung des Verbandes und visueller Kontrolle erfolgten Verkabelung, Aufsetzen des Motors sowie Anpassung und Klemmung des Schaftes (oben rechts), anschließend das Lösen der Feststellmutter (unten links) und die Distraktion oder zyklische Kompression. Nach Abschluss der Manipulation wurde ein neuer Verband angelegt (unten rechts). 39
- Abbildung 2.7 Schematische Darstellung der Sägeschnitte (gestrichelte Linien) zur Herstellung der Längsscheiben (A und B) und der Transversalscheibe (C) an der vorpräparierten Tibia nach Entfernung der Haut und Muskulatur (medio-laterale Aufsicht). Die Blockpfeile markieren die Eintrittsstellen der Schanz-Schrauben. 41
- Abbildung 2.8 Eingrenzung der *Volume of interest* (VOI) zur Ermittlung der Strukturparameter aus den μ CT-Aufnahmen. Das VOI wird eingegrenzt anhand der sieben mittleren Bohrlöcher der Markraumborungen (X-Achse) und der doppelten Breite der Bohrlöcher (Y-Achse). Die Grundfläche erstreckt sich 3 mm in die Höhe (Z-Achse). 43
- Abbildung 2.9 Ansicht der Rasterabmessung bei der zur Auswertung gewählten Vergrößerung. Jeder Kreuzungspunkt wurde einem von fünf Gewebetypen zugeordnet. Exemplarisch sind in A-D/1 des Koordinatensystems Fettzellen, in G-H/8-9 Anschnitte von Gefäßen, fibröses Gewebe im Bereich A-C/4-10, E-J/1-2, sowie Knochen und Osteoid in F-J/10, respektive G/11 zu finden. Paragon-Färbung, 100-fache Vergrößerung. 46
- Abbildung 2.10 Darstellung der ROI bei der quantitativen Auswertung der Dünnschliffpräparate. Die schwarzen Linien markieren die Grenzen der ROI im Geweberegenerat und die 36 einzelnen Raster. Paragon-Färbung, 12,5-fache Vergrößerung, zusammengefügtes Bild. 47
- Abbildung 2.11 Beispiel der charakteristischen Grünfärbung des Fluoreszenzmarkers Calcein grün (Pfeil) und der Gelbfärbung durch Tetracyclin (gestrichelter Pfeil). 48
- Abbildung 3.1 Teilpräparierte Gliedmaße ohne Haut und Muskulatur in kaudo-kraniale Aufsicht (links) und nach Demontage der Fixationskonstruktion in medio-laterale Aufsicht (rechts). Zu sehen ist eine starke Bildung von Bindegewebe, welche die Hautplatte und das Geweberegenerat umschließt und bis an die Grenzen des Geweberegenerates heran reicht. An der Oberfläche des Geweberegenerates findet man weißliche, korallenförmige Areale mineralisierten Gewebes unter der Titanplatte (Pfeil) und noppenartige Erhebungen durch Gewebe in den Titanplattendurchtritten (gestrichelter Pfeil). 52

- Abbildung 3.2 Transversale (links) und sagittale (rechts) Schnitte nach Abschluss der Präparation. Zu sehen sind das Geweberegenerat im Anschnitt (A), die Kortex (B) und der Markraum (C). In der Kortex fallen die zwei Markraumb Bohrungen (Doppelpfeil) auf, welche sich infolge der Tetracyclin-Injektion bereits makroskopisch gelb anfärben. In Verlängerung der Bohrlöcher sind im Geweberegenerat undeutlich die Spikula zu erkennen (*). Im Randbereich ist neu mineralisiertes Gewebe aufgrund periostaler Reaktion zu sehen (*). .. 53
- Abbildung 3.3 Röntgenaufnahme *in vivo* bei einem Vorversuchstier einen Tag vor Beginn der zyklischen Stimulation (56 kV, 1,2 mAs, oblique kaudo-kraniale Projektion). Zu diesem Zeitpunkt gab es radiologisch keine Hinweise auf eine beginnende Mineralisation. An der distalen Schanz-Schraube ist ipsi- und kontralateral der Fixationskonstruktion eine geringgradige Aufhellung im Bereich der Kortizes zu erkennen, die symptomlos blieb. 54
- Abbildung 3.4 Aufstellung post-mortaler Faxitron-Röntgenaufnahmen der in die Auswertung genommenen Tiere. Die Tiere der Versuchsgruppe Gruppe 0.1 befinden sich in der linken Spalte, die Tiere der Versuchsgruppe Gruppe 0.6 in der rechten. 56
- Abbildung 3.5 Darstellungen eines typischen Präparates der Gruppe 0.1 unter Verwendung verschiedener Grauwertschwellen bei der 3-D-Rekonstruktion..... 58
- Abbildung 3.6 Darstellungen eines typischen Präparates der Gruppe 0.6 unter Verwendung verschiedener Grauwertschwellen bei der 3-D-Rekonstruktion..... 59
- Abbildung 3.7 Darstellungen eines Präparates der Gruppe 0.6 mit vollständiger Überbrückung des Spalts unter Verwendung verschiedener Grauwertschwellen bei der 3-D-Rekonstruktion. 60
- Abbildung 3.8 Graphische Darstellung der Unterschiede beim relativen Knochenvolumen (BV/TV) zwischen kleiner Amplitude (Gruppe 0.1) und großer Amplitude (Gruppe 0.6) als Mittelwert mit Standardabweichung ($*p < 0,05$). 62
- Abbildung 3.9 Graphische Darstellung der Unterschiede bei der trabekulären Dicke (Tb. Th.) zwischen kleiner Amplitude (Gruppe 0.1) und großer Amplitude (Gruppe 0.6) als Mittelwert mit Standardabweichung ($**p < 0,01$). 62
- Abbildung 3.10 Graphische Darstellung der Unterschiede bei der Trabekelanzahl (Tb.N.) zwischen kleiner Amplitude (Gruppe 0.1) und großer Amplitude (Gruppe 0.6) als Mittelwert mit Standardabweichung. 63
- Abbildung 3.11 Graphische Darstellung der Unterschiede bei den Trabekelzwischenräumen (Tb.Sp.) zwischen kleiner Amplitude (Gruppe 0.1) und großer Amplitude (Gruppe 0.6) als Mittelwert mit Standardabweichung. 63
- Abbildung 3.12 Graphische Darstellung der Unterschiede bei den mittleren Spikulahöhen zwischen kleiner Amplitude (Gruppe 0.1) und großer Amplitude (Gruppe 0.6) als Mittelwert mit Standardabweichung ($*p < 0,05$). 64
- Abbildung 3.13 Typische Erscheinung eines Spikulums. Zu sehen sind über der Kortex (Ct) Trabekel neugebildeten Knochens (B) mit umgebendem Osteoidsaum (O), darüber das kondensierte Gewebe (Mc) und Areale mit Fettzellen (Fa). Im fibrösen Gewebe (Fb) sind Gefäße (V) und Plattenabrieb (Stern) zu erkennen. Paragon-Färbung, 50-fache Vergrößerung. 67
- Abbildung 3.14 Knöcherne Trabekel im Randbereich eines Spikulums (links im Bild), Übergang zu kondensiertem Gewebe mit senkrecht gerichteter Faserstruktur (mittleres Drittel) und fibrösem Gewebe (rechts im Bild). Paragon-Färbung, 100-fache Vergrößerung.67

- Abbildung 3.15 Repräsentatives histologisches Trenn-Dünnschliff-Präparat eines Versuchstieres der Gruppe 0.1. Die Spikula erreichen von der kortikalen Oberfläche ausgehend nur eine geringe Höhe. Paragon-Färbung, 12,5-fache Vergrößerung, zusammengefügtes Bild. 69
- Abbildung 3.16 Repräsentatives histologisches Trenn-Dünnschliff-Präparat eines Versuchstieres der Gruppe 0.6. Die typisch geformten Spikula ragen von der kortikalen Oberfläche weit in das Geweberegnerat. Paragon-Färbung, 12,5-fache Vergrößerung, zusammengefügtes Bild. 69
- Abbildung 3.17 Auftreten der Osteoblasten im Gruppenvergleich. In Gruppe 0.1 säumen Osteoblasten (Ob) den neugebildeten Knochen (B) und Osteoid (O) einreihig (links). In Gruppe 0.6 waren Osteoblastenverbände in Haufen zu sehen (rechts). Paragon-Färbung, 100-fache Vergrößerung. 70
- Abbildung 3.18 Osteoblastenpopulation verschiedener Maturationsstadien (Ob). Größe und Maturation nehmen zum Osteoidsaum zu. Im Osteoidsaum (O) erfolgt die Umwandlung zum Osteozyt. Osteozyten bestimmen den übrigen Bildausschnitt. Im Quadranten links unten ist ein Gefäß angeschnitten. Paragon-Färbung, 400-fache Vergrößerung. 71
- Abbildung 3.19 Ansicht Fibroblasten-ähnlicher Zellen zwischen den Trabekeln sich neu formierenden Knochens (Kreis). Paragon-Färbung, 200-fache Vergrößerung 71
- Abbildung 3.20 Osteozyten in einem knöchernen Trabekel. Am linken Bildrand ist ein Osteoklast (Blockpfeil) erkennbar. Paragon-Färbung, 400-fache Vergrößerung 72
- Abbildung 3.21 Verlauf kompakter Faserbündel entlang der Randbereiche der Spikula. Polarisations-Mikroskop, 12,5-fache Vergrößerung, zusammengefügtes Bild. 73
- Abbildung 3.22 Safranin-O-gefärbter Paraffinschnitt eines Tieres der Gruppe 0.6. Proteoglykane sind weder im neugebildeten Knochen (B) oder kortikalen Bereichen (Ct) noch im fibrösen Gewebe (Fb) zu erkennen. Safranin-O-Färbung, 12,5-/50-fache Vergrößerung. 73
- Abbildung 3.23 Graphische Darstellung der relativen Anteile untersuchter Gewebetypen. Der relative Anteil an Fettzellen ist signifikant unterschiedlich zwischen Gruppe 0.1 und Gruppe 0.6 (** $p < 0,01$). Werte in Prozent als Median und *range*. 75
- Abbildung 3.24 Bildausschnitte der Präparate mit der höchsten durchgängigen Färbung mit Calcein grün in der Gruppe 0.1 (links) und Gruppe 0.6 (rechts). Die gestrichelte Linie markiert den höchsten Punkt der Färbung. Die Pfeile markieren die gemessene Länge ausgehend von der Ebene der Kortexoberfläche. Trenn-Dünnschliff-Präparate, 12,5-fache Vergrößerung. 76
- Abbildung 3.25 Immunhistochemische Schnitte repräsentativ für Gruppe 0.1 (links) und Gruppe 0.6 (rechts). Eine intensive rot-braune Färbung weist auf Runx2-positive Fibroblasten-ähnliche Vorläuferzellen und Osteoblasten (Ob) hin. Fibroblasten-ähnliche Vorläuferzellen in einer der Titanplatte direkt angrenzenden Zone zeigen vermehrt eine positive Färbung für Sox9 (Pfeile). Kollagen Typ II-positive Areale sind als rot-braun Färbung in der kollagenen Matrix um die neugebildeten Knochentrabekel (B) zu erkennen, nicht jedoch im entfernteren fibrösen Gewebe (Fb). 78

8 Tabellenverzeichnis

Tabelle 2.1 Unterschiede der Parameter Bewegungsamplitude, Dauer und Frequenz während der zyklischen Kompression zwischen den beiden Versuchsgruppen.....	38
Tabelle 2.2 Übersicht der verwendeten Primärantikörper bei der Immunhistochemie	49
Tabelle 3.1 Auflistung der individuellen Einzeldaten aus den Knochenstrukturparameter-Messungen im μ CT. Angegeben sind zudem der Mittelwert (MW) und die Standardabweichung (SD) für beide Versuchsgruppen.	61
Tabelle 3.2 Auflistung der individuellen Spalthöhen zu Versuchsende und der Spikulahöhen-Messungen im μ CT (in mm). Darunter die resultierenden Dehnungen (ϵ) (in %) über der individuellen mittleren Spikulumhöhe und über der individuellen maximalen Spikulumhöhe (in mm).....	65

Erklärung: Die Ergebnisse und Abbildungen aus der Studie der vorliegenden Dissertationsschrift wurden in Teilen unter dem Titel „Intramembranous bone formation after callus distraction is augmented by increasing axial compressive strain“ im Journal of Orthopaedic Research (© Orthopaedic Research Society) zur Veröffentlichung eingereicht.

9 Literaturverzeichnis

Adams, J. D., Jr., S. L. Tanner and K. J. Jeray (2015). "Far cortical locking screws in distal femur fractures." *Orthopedics* 38(3): e153-156.

Aikawa, R., T. Nagai, S. Kudoh, Y. Zou, M. Tanaka, M. Tamura, H. Akazawa, H. Takano, R. Nagai and I. Komuro (2002). "Integrins play a critical role in mechanical stress-induced p38 MAPK activation." *Hypertension* 39(2): 233-238.

Amir, L. R., A. G. Becking, A. Jovanovic, F. B. Perdijk, V. Everts and A. L. Bronckers (2006). "Formation of new bone during vertical distraction osteogenesis of the human mandible is related to the presence of blood vessels." *Clin Oral Implants Res* 17(4): 410-416.

Amir, L. R., A. Jovanovic, F. B. Perdijk, S. Toyosawa, V. Everts and A. L. Bronckers (2007). "Immunolocalization of sibling and RUNX2 proteins during vertical distraction osteogenesis in the human mandible." *J Histochem Cytochem* 55(11): 1095-1104.

Arens, D., I. Sigrist, M. Alini, P. Schawalder, E. Schneider and M. Egermann (2007). "Seasonal changes in bone metabolism in sheep." *Vet J* 174(3): 585-591.

Aro, H. T., P. J. Kelly, D. G. Lewallen and E. Y. S. Chao (1990). "The Effects of Physiological Dynamic Compression on Bone Healing under External Fixation." *Clinical Orthopaedics and Related Research*(256): 260-273.

Aronson, J., B. Good, C. Stewart, B. Harrison and J. Harp (1990). "Preliminary Studies of Mineralization during Distraction Osteogenesis." *Clinical Orthopaedics and Related Research*(250): 43-49.

Aronson, J., B. Good, C. Stewart, B. Harrison and J. Harp (1990). "Preliminary studies of mineralization during distraction osteogenesis." *Clin Orthop Relat Res*(250): 43-49.

Aronson, J., B. H. Harrison, C. L. Stewart and J. H. Harp (1989). "The Histology of Distraction Osteogenesis Using Different External Fixators." *Clinical Orthopaedics and Related Research*(241): 106-116.

Aronson, J. and X. Shen (1994). "Experimental healing of distraction osteogenesis comparing metaphyseal with diaphyseal sites." *Clin Orthop Relat Res*(301): 25-30.

Augat, P., J. Burger, S. Schorlemmer, T. Henke, M. Peraus and L. Claes (2003). "Shear movement at the fracture site delays healing in a diaphyseal fracture model." *J Orthop Res* 21(6): 1011-1017.

Augat, P., J. Burger, S. Schorlemmer, T. Henke, M. Peraus and L. Claes (2003). "Shear movement at the fracture site delays healing in a diaphyseal fracture model." *Journal of Orthopaedic Research* 21(6): 1011-1017.

- Augat, P., K. Margevicius, J. Simon, S. Wolf, G. Suger and L. Claes (1998). "Local tissue properties in bone healing: Influence of size and stability of the osteotomy gap." *Journal of Orthopaedic Research* 16(4): 475-481.
- Augat, P., K. Margevicius, J. Simon, S. Wolf, G. Suger and L. Claes (1998). "Local tissue properties in bone healing: influence of size and stability of the osteotomy gap." *J Orthop Res* 16(4): 475-481.
- Bagby, G. W. and J. M. Janes (1958). "The effect of compression on the rate of fracture healing using a special plate." *Am J Surg* 95(5): 761-771.
- Bahney, C. S., D. P. Hu, A. J. Taylor, F. Ferro, H. M. Britz, B. Hallgrimsson, B. Johnstone, T. Miclau and R. S. Marcucio (2014). "Stem cell-derived endochondral cartilage stimulates bone healing by tissue transformation." *J Bone Miner Res* 29(5): 1269-1282.
- Baron, R. and M. Kneissel (2013). "WNT signaling in bone homeostasis and disease: from human mutations to treatments." *Nat Med* 19(2): 179-192.
- Bhandari, M., P. Tornetta, 3rd, S. Sprague, S. Najibi, B. Petrisor, L. Griffith and G. H. Guyatt (2003). "Predictors of reoperation following operative management of fractures of the tibial shaft." *J Orthop Trauma* 17(5): 353-361.
- Bishop, N. E., M. van Rhijn, I. Tami, R. Corveleijn, E. Schneider and K. Ito (2006). "Shear does not necessarily inhibit bone healing." *Clin Orthop Relat Res* 443: 307-314.
- Bottlang, M., M. Lesser, J. Koerber, J. Doornink, B. von Rechenberg, P. Augat, D. C. Fitzpatrick, S. M. Madey and J. L. Marsh (2010). "Far cortical locking can improve healing of fractures stabilized with locking plates." *J Bone Joint Surg Am* 92(7): 1652-1660.
- Brinker, M. R. and D. P. O'connor (2004). "The incidence of fractures and dislocations referred for orthopaedic services in a capitated population." *Journal of Bone and Joint Surgery-American Volume* 86A(2): 290-297.
- Burge, R., B. Dawson-Hughes, D. H. Solomon, J. B. Wong, A. King and A. Tosteson (2007). "Incidence and economic burden of osteoporosis-related fractures in the United States, 2005-2025." *Journal of Bone and Mineral Research* 22(3): 465-475.
- Button, G., P. Wolinsky and D. Hak (2004). "Failure of less invasive stabilization system plates in the distal femur: a report of four cases." *J Orthop Trauma* 18(8): 565-570.
- Carter, D. R., G. S. Beaupre, N. J. Giori and J. A. Helms (1998). "Mechanobiology of skeletal regeneration." *Clin Orthop Relat Res*(355 Suppl): S41-55.
- Carter, D. R., P. R. Blenman and G. S. Beaupre (1988). "Correlations between mechanical stress history and tissue differentiation in initial fracture healing." *J Orthop Res* 6(5): 736-748.
- Checa, S., P. J. Prendergast and G. N. Duda (2011). "Inter-species investigation of the mechano-regulation of bone healing: Comparison of secondary bone healing in sheep and rat." *Journal of Biomechanics* 44(7): 1237-1245.

-
- Cheng, H., W. Jiang, F. M. Phillips, R. C. Haydon, Y. Peng, L. Zhou, H. H. Luu, N. An, B. Breyer, P. Vanichakarn, J. P. Szatkowski, J. Y. Park and T. C. He (2003). "Osteogenic activity of the fourteen types of human bone morphogenetic proteins (BMPs)." *J Bone Joint Surg Am* 85-A(8): 1544-1552.
- Choi, I. H., C. Y. Chung, T. J. Cho and W. J. Yoo (2002). "Angiogenesis and mineralization during distraction osteogenesis." *J Korean Med Sci* 17(4): 435-447.
- Churches, A. E. and C. R. Howlett (1982). "Functional adaptation of bone in response to sinusoidally varying controlled compressive loading of the ovine metacarpus." *Clin Orthop Relat Res*(168): 265-280.
- Churches, A. E., C. R. Howlett, K. J. Waldron and G. W. Ward (1979). "The response of living bone to controlled time-varying loading: method and preliminary results." *J Biomech* 12(1): 35-45.
- Claes, L. (1989). "The mechanical and morphological properties of bone beneath internal fixation plates of differing rigidity." *J Orthop Res* 7(2): 170-177.
- Claes, L. (2006). "Biologie und Biomechanik der Osteosynthese und Frakturheilung." *Orthopädie und Unfallchirurgie up2date* 1(4): 329-346.
- Claes, L. (2006). Biomechanics of fracture healing 5th World Congress of Biomechanics, 15th Congress of the European Society of Biomechanics, Munich.
- Claes, L., P. Augat, S. Schorlemmer, C. Konrads, A. Ignatius and C. Ehrnthaller (2008). "Temporary distraction and compression of a diaphyseal osteotomy accelerates bone healing." *J Orthop Res* 26(6): 772-777.
- Claes, L., K. Eckert-Hubner and P. Augat (2002). "The effect of mechanical stability on local vascularization and tissue differentiation in callus healing." *Journal of Orthopaedic Research* 20(5): 1099-1105.
- Claes, L., J. Laule, K. Wenger, G. Suger, U. Liener and L. Kinzl (2000). "The influence of stiffness of the fixator on maturation of callus after segmental transport." *J Bone Joint Surg Br* 82(1): 142-148.
- Claes, L., S. Recknagel and A. Ignatius (2012). "Fracture healing under healthy and inflammatory conditions." *Nat Rev Rheumatol* 8(3): 133-143.
- Claes, L., M. Reusch, M. Gockelmann, M. Ohnmacht, T. Wehner, M. Amling, F. T. Beil and A. Ignatius (2011). "Metaphyseal Fracture Healing follows Similar Biomechanical Rules as Diaphyseal Healing." *Journal of Orthopaedic Research* 29(3): 425-432.
- Claes, L., M. Reusch, M. Göckelmann, M. Ohnmacht, T. Wehner, M. Amling, F. T. Beil and A. Ignatius (2011). "Metaphyseal fracture healing follows similar biomechanical rules as diaphyseal healing." *J Orthop Res* 29(3): 425-432.

- Claes, L., A. Veeseer, M. Göckelmann, D. Horvath, L. Dürselen and A. Ignatius (2010). "A novel method for lateral callus distraction and its importance for the mechano-biology of bone formation." *Bone* 47(4): 712-717.
- Claes, L., S. Wolf and P. Augat (2000). "Mechanische Einflüsse auf die Callusheilung [Mechanical modification of callus healing]." *Chirurg* 71(9): 989-994.
- Claes, L. E. and C. A. Heigele (1999). "Magnitudes of local stress and strain along bony surfaces predict the course and type of fracture healing." *J Biomech* 32(3): 255-266.
- Claes, L. E. and C. A. Heigele (1999). "Magnitudes of local stress and strain along bony surfaces predict the course and type of fracture healing." *Journal of Biomechanics* 32(3): 255-266.
- Claes, L. E., C. A. Heigele, C. Neidlinger-Wilke, D. Kaspar, W. Seidl, K. J. Margevicius and P. Augat (1998). "Effects of mechanical factors on the fracture healing process." *Clin Orthop*(355 Suppl): S132-147.
- Claes, L. E., C. A. Heigele, C. Neidlinger-Wilke, D. Kaspar, W. Seidl, K. J. Margevicius and P. Augat (1998). "Effects of mechanical factors on the fracture healing process." *Clinical Orthopaedics and Related Research*(355): S132-S147.
- Claes, L. E., H. J. Wilke, P. Augat, S. Rubenacker and K. J. Margevicius (1995). "Effect of Dynamization on Gap Healing of Diaphyseal Fractures under External Fixation." *Clinical Biomechanics* 10(5): 227-234.
- Claes, L. E., H. J. Wilke, P. Augat, S. Rübeneracker and K. J. Margevicius (1995). "Effect of dynamization on gap healing of diaphyseal fractures under external fixation." *Clin Biomech (Bristol, Avon)* 10(5): 227-234.
- Colnot, C., Z. Thompson, T. Miclau, Z. Werb and J. A. Helms (2003). "Altered fracture repair in the absence of MMP9." *Development* 130(17): 4123-4133.
- Cullinane, D. M., K. T. Salisbury, Y. Alkhiary, S. Eisenberg, L. Gerstenfeld and T. A. Einhorn (2003). "Effects of the local mechanical environment on vertebrate tissue differentiation during repair: does repair recapitulate development?" *J Exp Biol* 206(Pt 14): 2459-2471.
- Dailey, H. L., C. J. Daly, J. G. Galbraith, M. Cronin and J. A. Harty (2013). "The Flexible Axial Stimulation (FAST) intramedullary nail provides interfragmentary micromotion and enhanced torsional stability." *Clin Biomech (Bristol, Avon)* 28(5): 579-585.
- Danis, A. (1949). "[Not Available]." *Acta Chir Belg* 15(2): 114-117.
- Delloye, C., G. Delefortrie, L. Coutelier and A. Vincent (1990). "Bone regenerate formation in cortical bone during distraction lengthening. An experimental study." *Clin Orthop Relat Res*(250): 34-42.
- Dempster, D. W., J. E. Compston, M. K. Drezner, F. H. Glorieux, J. A. Kanis, H. Malluche, P. J. Meunier, S. M. Ott, R. R. Recker and A. M. Parfitt (2013). "Standardized nomenclature,

symbols, and units for bone histomorphometry: a 2012 update of the report of the ASBMR Histomorphometry Nomenclature Committee." *J Bone Miner Res* 28(1): 2-17.

Dobele, S., C. Horn, S. Eichhorn, A. Buchholtz, A. Lenich, R. Burgkart, A. K. Nussler, M. Lucke, D. Andermatt, R. Koch and U. Stockle (2010). "The dynamic locking screw (DLS) can increase interfragmentary motion on the near cortex of locked plating constructs by reducing the axial stiffness." *Langenbecks Arch Surg* 395(4): 421-428.

Donneys, A., C. N. Tchanque-Fossuo, A. S. Farberg, S. S. Deshpande and S. R. Buchman (2012). "Bone regeneration in distraction osteogenesis demonstrates significantly increased vascularity in comparison to fracture repair in the mandible." *J Craniofac Surg* 23(1): 328-332.

Duda, G. N., M. Sollmann, S. Sporrer, J. E. Hoffmann, J. P. Kassi, C. Khodadadyan and M. Raschke (2002). "Interfragmentary motion in tibial osteotomies stabilized with ring fixators." *Clin Orthop Relat Res*(396): 163-172.

Duyck, J., K. Vandamme, L. Geris, H. Van Oosterwyck, M. De Cooman, J. Vandersloten, R. Puers and I. Naert (2006). "The influence of micro-motion on the tissue differentiation around immediately loaded cylindrical turned titanium implants." *Arch Oral Biol* 51(1): 1-9.

Egol, K. A., E. N. Kubiak, E. Fulkerson, F. J. Kummer and K. J. Koval (2004). "Biomechanics of locked plates and screws." *J Orthop Trauma* 18(8): 488-493.

Einhorn, T. A. (2005). "The science of fracture healing." *J Orthop Trauma* 19(10 Suppl): S4-6.

Einhorn, T. A. and L. C. Gerstenfeld (2015). "Fracture healing: mechanisms and interventions." *Nat Rev Rheumatol* 11(1): 45-54.

Farhadieh, R. D., M. P. Gianoutsos, Y. Yu and W. R. Walsh (2004). "The role of bone morphogenetic proteins BMP-2 and BMP-4 and their related postreceptor signaling system (Smads) in distraction osteogenesis of the mandible." *J Craniofac Surg* 15(5): 714-718.

Forwood, M. R. and C. H. Turner (1995). "Skeletal adaptations to mechanical usage: results from tibial loading studies in rats." *Bone* 17(4 Suppl): 197S-205S.

Frierson, M., K. Ibrahim, M. Boles, H. Bote and T. Ganey (1994). "Distraction Osteogenesis - a Comparison of Corticotomy Techniques." *Clinical Orthopaedics and Related Research*(301): 19-24.

Frost, H. M. (1989). "The biology of fracture healing. An overview for clinicians. Part I." *Clin Orthop Relat Res*(248): 283-293.

Frost, H. M., H. Roth, A. R. Villanueva and S. Stanisavljevic (1961). "Experimental multiband tetracycline measurement of lamellar osteoblastic activity." *Henry Ford Hosp Med Bull* 9: 312-329.

Frost, H. M., A. R. Villanueva, H. Roth and S. Stanisavljevic (1961). "Tetracycline bone labeling." *J New Drugs* 1: 206-216.

Gadomski, B. C., K. C. McGilvray, J. T. Easley, R. H. Palmer, B. G. Santoni and C. M. Puttlitz (2014). "Partial gravity unloading inhibits bone healing responses in a large animal model." *Journal of Biomechanics* 47(12): 2836-2842.

Garcia-Anoveros, J. and D. P. Corey (1997). "The molecules of mechanosensation." *Annu Rev Neurosci* 20: 567-594.

Gardner, T. N., M. Evans and H. Simpson (1998). "Temporal variation of applied inter fragmentary displacement at a bone fracture in harmony with maturation of the fracture callus." *Med Eng Phys* 20(6): 480-484.

Gardner, T. N., J. Hardy, M. Evans and J. Kenwright (1997). "Temporal changes in dynamic inter fragmentary motion and callus formation in fractures." *J Biomech* 30(4): 315-321.

Gardner, T. N., J. R. Hardy, M. Evans, J. B. Richardson and J. Kenwright (1996). "The static and dynamic behaviour of tibial fractures due to unlocking external fixators." *Clin Biomech (Bristol, Avon)* 11(8): 425-430.

Gaston, M. S. and A. H. R. W. Simpson (2007). "Inhibition of fracture healing." *Journal of Bone and Joint Surgery-British Volume* 89B(12): 1553-1560.

Gonzales-Bulnes, A., P. Pallares and M. I. Vazquez (2010). "Ultrasonographic imaging in small ruminant reproduction." *Reprod. Dom. Anim.* 45 (Suppl. 2): 9-20.

Goodship, A. E. (1992). "Mechanical stimulus to bone." *Ann Rheum Dis* 51(1): 4-6.

Goodship, A. E., J. L. Cunningham and J. Kenwright (1998). "Strain rate and timing of stimulation in mechanical modulation of fracture healing." *Clin Orthop Relat Res*(355 Suppl): S105-115.

Goodship, A. E. and J. Kenwright (1985). "The Influence of Induced Micromovement Upon the Healing of Experimental Tibial Fractures." *Journal of Bone and Joint Surgery-British Volume* 67(4): 650-655.

Goodship, A. E. and J. Kenwright (1985). "The influence of induced micromovement upon the healing of experimental tibial fractures." *J Bone Joint Surg Br* 67(4): 650-655.

Goodship, A. E., L. E. Lanyon and H. McFie (1979). "Functional adaptation of bone to increased stress. An experimental study." *J Bone Joint Surg Am* 61(4): 539-546.

Grechenig, S., C. Pfeifer, W. Krutsch, F. Hilber, M. Nerlich and A. Berner (2015). "[Complication management for failed bone fracture healing: pseudarthrosis]." *Chirurg*.

Guldberg, R. E., N. J. Caldwell, X. E. Guo, R. W. Goulet, S. J. Hollister and S. A. Goldstein (1997). "Mechanical stimulation of tissue repair in the hydraulic bone chamber." *J Bone Miner Res* 12(8): 1295-1302.

Hankemeier, S., S. Grassel, G. Plenz, H. U. Spiegel, P. Bruckner and A. Probst (2001). "Alteration of fracture stability influences chondrogenesis, osteogenesis and immigration of macrophages." *Journal of Orthopaedic Research* 19(4): 531-538.

Haudenschild, A. K., A. H. Hsieh, S. Kapila and J. C. Lotz (2009). "Pressure and distortion regulate human mesenchymal stem cell gene expression." *Ann Biomed Eng* 37(3): 492-502.

Hermann, C., A. M. Zeiher and S. Dimmeler (1997). "Shear stress inhibits H₂O₂-induced apoptosis of human endothelial cells by modulation of the glutathione redox cycle and nitric oxide synthase." *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 17(12): 3588-3592.

Hert, J., M. Liskova and J. Landa (1971). "Reaction of bone to mechanical stimuli. 1. Continuous and intermittent loading of tibia in rabbit." *Folia Morphol (Praha)* 19(3): 290-300.

Hert, J., M. Liskova and B. Landrgot (1969). "Influence of the long-term, continuous bending on the bone. An experimental study on the tibia of the rabbit." *Folia Morphol (Praha)* 17(4): 389-399.

Herzog, W. and S. Federico (2007). *Articular Cartilage*. Chichester Wiley.

Hoey, D. A., D. J. Kelly and C. R. Jacobs (2011). "A role for the primary cilium in paracrine signaling between mechanically stimulated osteocytes and mesenchymal stem cells." *Biochem Biophys Res Commun* 412(1): 182-187.

<http://sdittami.altervista.org/shapirotest/ShapiroTest.html>.

Huang, H., R. D. Kamm and R. T. Lee (2004). "Cell mechanics and mechanotransduction: pathways, probes, and physiology." *Am J Physiol Cell Physiol* 287(1): C1-11.

Hughes-Fulford, M. (2004). "Signal transduction and mechanical stress." *Sci STKE* 2004(249): RE12.

Iacobellis, C., A. Berizzi and R. Aldegheri (2010). "Bone transport using the Ilizarov method: a review of complications in 100 consecutive cases." *Strategies Trauma Limb Reconstr* 5(1): 17-22.

Ilizarov, G. A. (1989). "The tension-stress effect on the genesis and growth of tissues. Part I. The influence of stability of fixation and soft-tissue preservation." *Clin Orthop Relat Res*(238): 249-281.

Ilizarov, G. A. (1989). "The tension-stress effect on the genesis and growth of tissues: Part II. The influence of the rate and frequency of distraction." *Clin Orthop Relat Res*(239): 263-285.

Ilizarov, G. A. (1990). "Clinical application of the tension-stress effect for limb lengthening." *Clin Orthop Relat Res*(250): 8-26.

Iseki, S., A. O. Wilkie, J. K. Heath, T. Ishimaru, K. Eto and G. M. Morriss-Kay (1997). "Fgfr2 and osteopontin domains in the developing skull vault are mutually exclusive and can be altered by locally applied FGF2." *Development* 124(17): 3375-3384.

Jazrawi, L. M., R. J. Majeska, M. L. Klein, E. Kagel, L. Stromberg and T. A. Einhorn (1998). "Bone and cartilage formation in an experimental model of distraction osteogenesis." *J Orthop Trauma* 12(2): 111-116.

Jiang, Y., Y. Wang and G. Tang (2016). "Cyclic tensile strain promotes the osteogenic differentiation of a bone marrow stromal cell and vascular endothelial cell co-culture system." *Arch Biochem Biophys* 607: 37-43.

Johnson, K. A., P. Muir, R. G. Nicoll and J. K. Roush (2000). "Asymmetric adaptive modeling of central tarsal bones in racing greyhounds." *Bone* 27(2): 257-263.

Johnson, K. A., G. A. Skinner and P. Muir (2001). "Site-specific adaptive remodeling of Greyhound metacarpal cortical bone subjected to asymmetrical cyclic loading." *Am J Vet Res* 62(5): 787-793.

Kanczler, J. M. and R. O. Oreffo (2008). "Osteogenesis and angiogenesis: the potential for engineering bone." *Eur Cell Mater* 15: 100-114.

Kaspar, D., W. Seidl, C. Neidlinger-Wilke, A. Beck, L. Claes and A. Ignatius (2002). "Proliferation of human-derived osteoblast-like cells depends on the cycle number and frequency of uniaxial strain." *J Biomech* 35(7): 873-880.

Kaspar, D., W. Seidl, C. Neidlinger-Wilke, A. Ignatius and L. Claes (2000). "Dynamic cell stretching increases human osteoblast proliferation and C1CP synthesis but decreases osteocalcin synthesis and alkaline phosphatase activity." *J Biomech* 33(1): 45-51.

Kassis, B., C. Glorion, W. Tabib, O. Blanchard and J. C. Pouliquen (1996). "Callus response to micromovement after elongation in the rabbit." *J Pediatr Orthop* 16(4): 480-483.

Katsumi, A., T. Naoe, T. Matsushita, K. Kaibuchi and M. A. Schwartz (2005). "Integrin activation and matrix binding mediate cellular responses to mechanical stretch." *J Biol Chem* 280(17): 16546-16549.

Kenwright, J. and A. E. Goodship (1989). "Controlled Mechanical Stimulation in the Treatment of Tibial Fractures." *Clinical Orthopaedics and Related Research*(241): 36-47.

Kenwright, J. and A. E. Goodship (1989). "Controlled mechanical stimulation in the treatment of tibial fractures." *Clin Orthop Relat Res*(241): 36-47.

Kojimoto, H., N. Yasui, T. Goto, S. Matsuda and Y. Shimomura (1988). "Bone lengthening in rabbits by callus distraction. The role of periosteum and endosteum." *J Bone Joint Surg Br* 70(4): 543-549.

Kosaki, N., H. Takaishi, S. Kamekura, T. Kimura, Y. Okada, L. Minqi, N. Amizuka, U. I. Chung, K. Nakamura, H. Kawaguchi, Y. Toyama and J. D'Armiento (2007). "Impaired bone fracture healing in matrix metalloproteinase-13 deficient mice." *Biochem Biophys Res Commun* 354(4): 846-851.

- Lacroix, D. and P. J. Prendergast (2002). "A mechano-regulation model for tissue differentiation during fracture healing: analysis of gap size and loading." *J Biomech* 35(9): 1163-1171.
- Lana-Elola, E., R. Rice, A. E. Grigoriadis and D. P. Rice (2007). "Cell fate specification during calvarial bone and suture development." *Dev Biol* 311(2): 335-346.
- Lang, T., A. LeBlanc, H. Evans, Y. Lu, H. Genant and A. Yu (2004). "Cortical and trabecular bone mineral loss from the spine and hip in long-duration spaceflight." *J Bone Miner Res* 19(6): 1006-1012.
- Lanyon, L. E. (1993). "Osteocytes, strain detection, bone modeling and remodeling." *Calcif Tissue Int* 53 Suppl 1: S102-106; discussion S106-107.
- Le, A. X., T. Miclau, D. Hu and J. A. Helms (2001). "Molecular aspects of healing in stabilized and non-stabilized fractures." *J Orthop Res* 19(1): 78-84.
- Lean, J. M., C. J. Jagger, T. J. Chambers and J. W. Chow (1995). "Increased insulin-like growth factor I mRNA expression in rat osteocytes in response to mechanical stimulation." *Am J Physiol* 268(2 Pt 1): E318-327.
- Lefebvre, V. and P. Smits (2005). "Transcriptional control of chondrocyte fate and differentiation." *Birth Defects Res C Embryo Today* 75(3): 200-212.
- Leung, K. S., W. H. Cheung, H. Y. Yeung, K. M. Lee and K. P. Fung (2004). "Effect of weightbearing on bone formation during distraction osteogenesis." *Clin Orthop Relat Res*(419): 251-257.
- Liedert, A., L. Kreja, L. Wagner, C. Neidlinger-Wilke, R. Ebert, F. Jakob and A. Ignatius (2010). "Signaltransduktionswege der Mechanotransduktion in Knochenzellen." *Osteologie* 19(3): 240-244.
- Lienau, J., H. Schell, G. N. Duda, P. Seebeck, S. Muchow and H. J. Bail (2005). "Initial vascularization and tissue differentiation are influenced by fixation stability." *J Orthop Res* 23(3): 639-645.
- Lipscomb, V. J., T. J. Lawes, A. E. Goodship and P. Muir (2001). "Asymmetric densitometric and mechanical adaptation of the left fifth metacarpal bone in racing greyhounds." *Vet Rec* 148(10): 308-311.
- Loder, R. T. (1988). "The influence of diabetes mellitus on the healing of closed fractures." *Clin Orthop Relat Res*(232): 210-216.
- Malone, A. M., C. T. Anderson, P. Tummala, R. Y. Kwon, T. R. Johnston, T. Stearns and C. R. Jacobs (2007). "Primary cilia mediate mechanosensing in bone cells by a calcium-independent mechanism." *Proc Natl Acad Sci U S A* 104(33): 13325-13330.

- Mark, H., A. Nilsson, U. Nannmark and B. Rydevik (2004). "Effects of fracture fixation stability on ossification in healing fractures." *Clinical Orthopaedics and Related Research*(419): 245-250.
- Martini, L., M. Fini, G. Giavaresi and R. Giardino (2001). "Sheep model in orthopedic research: a literature review." *Comp Med* 51(4): 292-299.
- Martini, L., M. Fini, G. Giavaresi and R. Giardino (2001). "Sheep model in orthopedic research: A literature review." *Comparative Medicine* 51(4): 292-299.
- Matsushita, T. and T. Kurokawa (1998). "Comparison of cyclic compression, cyclic distraction and rigid fixation - Bone healing in rabbits." *Acta Orthopaedica Scandinavica* 69(1): 95-98.
- Matsushita, T. and T. Kurokawa (1998). "Comparison of cyclic compression, cyclic distraction and rigid fixation. Bone healing in rabbits." *Acta Orthop Scand* 69(1): 95-98.
- McKibbin, B. (1978). "The biology of fracture healing in long bones." *J Bone Joint Surg Br* 60-B(2): 150-162.
- Mehta, M., S. Checa, J. Lienau, D. Hutmacher and G. N. Duda (2012). "In vivo tracking of segmental bone defect healing reveals that callus patterning is related to early mechanical stimuli." *Eur Cell Mater* 24: 358-371; discussion 371.
- Mi, L. Y., S. P. Fritton, M. Basu and S. C. Cowin (2005). "Analysis of avian bone response to mechanical loading-Part one: Distribution of bone fluid shear stress induced by bending and axial loading." *Biomech Model Mechanobiol* 4(2-3): 118-131.
- Millward-Sadler, S. J. and D. M. Salter (2004). "Integrin-dependent signal cascades in chondrocyte mechanotransduction." *Ann Biomed Eng* 32(3): 435-446.
- Miyaniishi, K., M. C. Trindade, D. P. Lindsey, G. S. Beaupre, D. R. Carter, S. B. Goodman, D. J. Schurman and R. L. Smith (2006). "Dose- and time-dependent effects of cyclic hydrostatic pressure on transforming growth factor-beta3-induced chondrogenesis by adult human mesenchymal stem cells in vitro." *Tissue Eng* 12(8): 2253-2262.
- Miyaniishi, K., M. C. Trindade, D. P. Lindsey, G. S. Beaupre, D. R. Carter, S. B. Goodman, D. J. Schurman and R. L. Smith (2006). "Effects of hydrostatic pressure and transforming growth factor-beta 3 on adult human mesenchymal stem cell chondrogenesis in vitro." *Tissue Eng* 12(6): 1419-1428.
- Moalli, M. R., N. J. Caldwell, P. V. Patil and S. A. Goldstein (2000). "An in vivo model for investigations of mechanical signal transduction in trabecular bone." *J Bone Miner Res* 15(7): 1346-1353.
- Morgan, E. F., K. T. Salisbury Palomares, R. E. Gleason, D. L. Bellin, K. B. Chien, G. U. Unnikrishnan and P. L. Leong (2010). "Correlations between local strains and tissue phenotypes in an experimental model of skeletal healing." *J Biomech* 43(12): 2418-2424.

-
- Mosley, J. R., B. M. March, J. Lynch and L. E. Lanyon (1997). "Strain magnitude related changes in whole bone architecture in growing rats." *Bone* 20(3): 191-198.
- Muir, P., K. A. Johnson and C. P. Ruau-Mason (1999). "In vivo matrix microdamage in a naturally occurring canine fatigue fracture." *Bone* 25(5): 571-576.
- Muller, M. E. (1965). "Treatment of nonunions by compression." *Clin Orthop Relat Res* 43: 83-92.
- Muschler, G. F., V. P. Raut, T. E. Patterson, J. C. Wenke and J. O. Hollinger (2010). "The design and use of animal models for translational research in bone tissue engineering and regenerative medicine." *Tissue Eng Part B Rev* 16(1): 123-145.
- Nakashima, K. and B. de Crombrughe (2003). "Transcriptional mechanisms in osteoblast differentiation and bone formation." *Trends Genet* 19(8): 458-466.
- Novikov, K. I., K. N. Subramanyam, S. O. Muradisinov, O. S. Novikova and E. S. Kolesnikova (2014). "Cosmetic lower limb lengthening by Ilizarov apparatus: what are the risks?" *Clin Orthop Relat Res* 472(11): 3549-3556.
- O'Connor, J. A., L. E. Lanyon and H. MacFie (1982). "The influence of strain rate on adaptive bone remodelling." *J Biomech* 15(10): 767-781.
- Ochareon, P. and S. W. Herring (2011). "Cell replication in craniofacial periosteum: appositional vs. resorptive sites." *J Anat* 218(3): 285-297.
- Papachroni, K. K., D. N. Karatzas, K. A. Papavassiliou, E. K. Basdra and A. G. Papavassiliou (2009). "Mechanotransduction in osteoblast regulation and bone disease." *Trends Mol Med* 15(5): 208-216.
- Park, J., M. Gebhardt, S. Golovchenko, F. P. Branguli, T. Hattori, C. Hartmann, X. Zhou, B. deCrombrughe, M. Stock, H. Schneider and K. von der Mark (2015). "Dual pathways to endochondral osteoblasts: a novel chondrocyte-derived osteoprogenitor cell identified in hypertrophic cartilage." *Biol Open*.
- Park, S. H., K. O'Connor, H. McKellop and A. Sarmiento (1998). "The influence of active shear or compressive motion on fracture-healing." *J Bone Joint Surg Am* 80(6): 868-878.
- Park, S. H., K. O'Connor, R. Sung, H. McKellop and A. Sarmiento (1999). "Comparison of healing process in open osteotomy model and closed fracture model." *J Orthop Trauma* 13(2): 114-120.
- Pauwels, F. (1960). "[A new theory on the influence of mechanical stimuli on the differentiation of supporting tissue. The tenth contribution to the functional anatomy and causal morphology of the supporting structure]." *Z Anat Entwicklungsgesch* 121: 478-515.
- Percival, C. J. and J. T. Richtsmeier (2013). "Angiogenesis and intramembranous osteogenesis." *Dev Dyn* 242(8): 909-922.

Phillips, J. A., E. A. Almeida, E. L. Hill, J. I. Aguirre, M. F. Rivera, I. Nachbandi, T. J. Wronski, M. C. van der Meulen and R. K. Globus (2008). "Role for beta1 integrins in cortical osteocytes during acute musculoskeletal disuse." *Matrix Biol* 27(7): 609-618.

Plecko, M., N. Lagerpusch, D. Andermatt, R. Frigg, R. Koch, M. Sidler, P. Kronen, K. Klein, K. Nuss, A. Burki, S. J. Ferguson, U. Stoeckle, J. A. Auer and B. von Rechenberg (2013). "The dynamisation of locking plate osteosynthesis by means of dynamic locking screws (DLS)-an experimental study in sheep." *Injury* 44(10): 1346-1357.

Prendergast, P. J., R. Huiskes and K. Soballe (1997). "ESB Research Award 1996. Biophysical stimuli on cells during tissue differentiation at implant interfaces." *J Biomech* 30(6): 539-548.

Radomisli, T. E., D. C. Moore, H. J. Barrach, H. S. Keeping and M. G. Ehrlich (2001). "Weight-bearing alters the expression of collagen types I and II, BMP 2/4 and osteocalcin in the early stages of distraction osteogenesis." *J Orthop Res* 19(6): 1049-1056.

Rath, B., J. Nam, T. J. Knobloch, J. J. Lannutti and S. Agarwal (2008). "Compressive forces induce osteogenic gene expression in calvarial osteoblasts." *J Biomech* 41(5): 1095-1103.

Reusch, M. (2010). Entwicklung und biomechanische Charakterisierung eines metaphysären Frakturheilungsmodells am Großtier Inaug.-Dissertation, LMU.

Roach, H. I. (1992). "Trans-differentiation of hypertrophic chondrocytes into cells capable of producing a mineralized bone matrix." *Bone Miner* 19(1): 1-20.

Robling, A. G., F. M. Hinant, D. B. Burr and C. H. Turner (2002). "Improved bone structure and strength after long-term mechanical loading is greatest if loading is separated into short bouts." *J Bone Miner Res* 17(8): 1545-1554.

Robling, A. G., P. J. Niziolek, L. A. Baldrige, K. W. Condon, M. R. Allen, I. Alam, S. M. Mantila, J. Gluhak-Heinrich, T. M. Bellido, S. E. Harris and C. H. Turner (2008). "Mechanical stimulation of bone in vivo reduces osteocyte expression of Sost/sclerostin." *J Biol Chem* 283(9): 5866-5875.

Rubin, C., S. Judex and M. Hadjiargyrou (2002). "Skeletal adaptation to mechanical stimuli in the absence of formation or resorption of bone." *J Musculoskelet Neuronal Interact* 2(3): 264-267.

Rubin, C. T. and L. E. Lanyon (1987). "Kappa Delta Award paper. Osteoregulatory nature of mechanical stimuli: function as a determinant for adaptive remodeling in bone." *J Orthop Res* 5(2): 300-310.

Ruter, A. and E. Mayr (1999). "[Pseudarthrosis]." *Chirurg* 70(11): 1239-1245.

Saran, U., S. Gemini Piperni and S. Chatterjee (2014). "Role of angiogenesis in bone repair." *Arch Biochem Biophys* 561: 109-117.

Sarmiento, A., D. L. Mullis, L. L. Latta, R. R. Tarr and R. Alvarez (1980). "A quantitative comparative analysis of fracture healing under the influence of compression plating vs. closed weight-bearing treatment." *Clin Orthop Relat Res*(149): 232-239.

Saulacic, N., P. Gandara-Vila, M. Somoza-Martin and A. Garcia-Garcia (2004). "Distraction osteogenesis of the alveolar ridge: a review of the literature." *Med Oral* 9(4): 321-327.

Saulacic, N., K. Nakahara, T. Iizuka, M. Haga-Tsujimura, W. Hofstetter and P. Scolozzi (2016). "Comparison of two protocols of periosteal distraction osteogenesis in a rabbit calvaria model." *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 104(6): 1121-1131.

Schell, H., D. R. Epari, J. P. Kassi, H. Bragulla, H. J. Bail and G. N. Duda (2005). "The course of bone healing is influenced by the initial shear fixation stability." *J Orthop Res* 23(5): 1022-1028.

Schell, H., M. S. Thompson, H. J. Bail, J. E. Hoffmann, A. Schill, G. N. Duda and J. Lienau (2008). "Mechanical induction of critically delayed bone healing in sheep: radiological and biomechanical results." *J Biomech* 41(14): 3066-3072.

Schenk, R. and H. Willenegger (1964). "[on the Histology of Primary Bone Healing]." *Langenbecks Arch Klin Chir Ver Dtsch Z Chir* 308: 440-452.

Schneider, W. (1989). Die Bedeutung der osteogenetischen Potenz des Rippenperiostes für die Revitalisierung von Spongiosa oder kortikospongiosen Knochenfragmenten im Vergleich zur osteogenetischen Potenz des in situ belassenen Rippenperiostes, des neurovaskulär gestielten und des freien, mikrovaskulären Rippenperiosttransplantates. *Habil.-Schrift MHH*.

Shyy, J. Y. and S. Chien (2002). "Role of integrins in endothelial mechanosensing of shear stress." *Circ Res* 91(9): 769-775.

Soballe, K. (1993). "Hydroxyapatite ceramic coating for bone implant fixation. Mechanical and histological studies in dogs." *Acta Orthop Scand Suppl* 255: 1-58.

Soballe, K., E. S. Hansen, H. Brockstedt-Rasmussen and C. Bunger (1993). "Hydroxyapatite coating converts fibrous tissue to bone around loaded implants." *J Bone Joint Surg Br* 75(2): 270-278.

Sommer, C., E. Gautier, M. Muller, D. L. Helfet and M. Wagner (2003). "First clinical results of the Locking Compression Plate (LCP)." *Injury* 34 Suppl 2: B43-54.

Steiner, M., L. Claes, A. Ignatius, U. Simon and T. Wehner (2014). "Numerical Simulation of Callus Healing for Optimization of Fracture Fixation Stiffness." *PLoS One* 9(7): e101370.

Stickens, D., D. J. Behonick, N. Ortega, B. Heyer, B. Hartenstein, Y. Yu, A. J. Fosang, M. Schorpp-Kistner, P. Angel and Z. Werb (2004). "Altered endochondral bone development in matrix metalloproteinase 13-deficient mice." *Development* 131(23): 5883-5895.

Stromqvist, B. (1984). "Hip fracture in rheumatoid arthritis." *Acta Orthop Scand* 55(6): 624-628.

-
- Strube, P., U. Sentuerk, T. Riha, K. Kaspar, M. Mueller, G. Kasper, G. Matziolis, G. N. Duda and C. Perka (2008). "Influence of age and mechanical stability on bone defect healing: age reverses mechanical effects." *Bone* 42(4): 758-764.
- Tami, A. E., P. Nasser, M. B. Schaffler and M. L. Knothe Tate (2003). "Noninvasive fatigue fracture model of the rat ulna." *J Orthop Res* 21(6): 1018-1024.
- Tan, S. D., A. D. Bakker, C. M. Semeins, A. M. Kuijpers-Jagtman and J. Klein-Nulend (2008). "Inhibition of osteocyte apoptosis by fluid flow is mediated by nitric oxide." *Biochem Biophys Res Commun* 369(4): 1150-1154.
- Tanaka-Kamioka, K., H. Kamioka, H. Ris and S. S. Lim (1998). "Osteocyte shape is dependent on actin filaments and osteocyte processes are unique actin-rich projections." *J Bone Miner Res* 13(10): 1555-1568.
- Thompson, D. J., N. J. Cave, J. P. Bridges, K. Reuvers, M. C. Owen and E. C. Firth (2012). "Bone volume and regional density of the central tarsal bone detected using computed tomography in a cross-sectional study of adult racing greyhounds." *N Z Vet J* 60(5): 278-284.
- Thompson, T. J., P. D. Owens and D. J. Wilson (1989). "Intramembranous osteogenesis and angiogenesis in the chick embryo." *J Anat* 166: 55-65.
- Thompson, Z., T. Miclau, D. Hu and J. A. Helms (2002). "A model for intramembranous ossification during fracture healing." *J Orthop Res* 20(5): 1091-1098.
- Tomlin, J. L., T. J. Lawes, G. W. Blunn, A. E. Goodship and P. Muir (2000). "Fractographic examination of racing greyhound central (navicular) tarsal bone failure surfaces using scanning electron microscopy." *Calcif Tissue Int* 67(3): 260-266.
- Torricelli, P., M. Fini, G. Giavaresi, V. Borsari, A. Carpi, A. Nicolini and R. Giardino (2003). "Comparative interspecies investigation on osteoblast cultures: data on cell viability and synthetic activity." *Biomed Pharmacother* 57(1): 57-62.
- Tuan, R. S. (2004). "Biology of developmental and regenerative skeletogenesis." *Clin Orthop Relat Res*(427 Suppl): S105-117.
- Tuohy, J. L., D. J. Marcellin-Little and E. H. Griffith (2014). "Durations of bone consolidation and external fixation after distraction osteogenesis in dogs." *Vet Surg* 43(8): 903-911.
- Turner, C. H., M. R. Forwood and M. W. Otter (1994). "Mechanotransduction in bone: do bone cells act as sensors of fluid flow?" *FASEB J* 8(11): 875-878.
- Turner, C. H. and F. M. Pavalko (1998). "Mechanotransduction and functional response of the skeleton to physical stress: the mechanisms and mechanics of bone adaptation." *J Orthop Sci* 3(6): 346-355.
- Uthoff, H. K. and F. L. Dubuc (1971). "Bone structure changes in the dog under rigid internal fixation." *Clin Orthop Relat Res* 81: 165-170.

- Uthoff, H. K. and Z. F. G. Jaworski (1985). "Periosteal Stress-Induced Reactions Resembling Stress-Fractures - a Radiologic and Histologic-Study in Dogs." *Clinical Orthopaedics and Related Research*(199): 284-291.
- Vico, L., D. Chappard, C. Alexandre, S. Palle, P. Minaire, G. Riffat, B. Morukov and S. Rakhmanov (1987). "Effects of a 120 day period of bed-rest on bone mass and bone cell activities in man: attempts at countermeasure." *Bone Miner* 2(5): 383-394.
- Vico, L., P. Collet, A. Guignandon, M. H. Lafage-Proust, T. Thomas, M. Rehaillia and C. Alexandre (2000). "Effects of long-term microgravity exposure on cancellous and cortical weight-bearing bones of cosmonauts." *Lancet* 355(9215): 1607-1611.
- Vu, T. H., J. M. Shipley, G. Bergers, J. E. Berger, J. A. Helms, D. Hanahan, S. D. Shapiro, R. M. Senior and Z. Werb (1998). "MMP-9/gelatinase B is a key regulator of growth plate angiogenesis and apoptosis of hypertrophic chondrocytes." *Cell* 93(3): 411-422.
- Wang, Y., J. Li, Y. Wang, L. Lei, C. Jiang, S. An, Y. Zhan, Q. Cheng, Z. Zhao, J. Wang and L. Jiang (2012). "Effects of hypoxia on osteogenic differentiation of rat bone marrow mesenchymal stem cells." *Mol Cell Biochem* 362(1-2): 25-33.
- Weibel, E. R. (1963). "Principles and methods for the morphometric study of the lung and other organs." *Lab Invest* 12: 131-155.
- Weinbaum, S., S. C. Cowin and Y. Zeng (1994). "A model for the excitation of osteocytes by mechanical loading-induced bone fluid shear stresses." *J Biomech* 27(3): 339-360.
- Whitton, R. C., G. D. Trope, A. Ghasem-Zadeh, G. A. Anderson, T. D. Parkin, E. J. Mackie and E. Seeman (2010). "Third metacarpal condylar fatigue fractures in equine athletes occur within previously modelled subchondral bone." *Bone* 47(4): 826-831.
- Willems, H., F. Leiber, M. Kohler, M. Kreuzer and A. Liesegang (2013). "Altitude, pasture type, and sheep breed affect bone metabolism and serum 25-hydroxyvitamin D in grazing lambs." *J Appl Physiol* (1985) 114(10): 1441-1450.
- Willenegger, H., S. M. Perren and R. Schenk (1971). "[Primary and secondary healing of bone fractures]." *Chirurg* 42(6): 241-252.
- Witt, F., G. N. Duda, C. Bergmann and A. Petersen (2014). "Cyclic mechanical loading enables solute transport and oxygen supply in bone healing: an in vitro investigation." *Tissue Eng Part A* 20(3-4): 486-493.
- Wohl, G. R., D. A. Towler and M. J. Silva (2009). "Stress fracture healing: fatigue loading of the rat ulna induces upregulation in expression of osteogenic and angiogenic genes that mimic the intramembranous portion of fracture repair." *Bone* 44(2): 320-330.
- Wolf, S., A. Janousek, J. Pfeil, W. Veith, F. Haas, G. Duda and L. Claes (1998). "The effects of external mechanical stimulation on the healing of diaphyseal osteotomies fixed by flexible external fixation." *Clinical Biomechanics* 13(4-5): 359-364.

Yamagishi, M. and Y. Yoshimura (1955). "The biomechanics of fracture healing." *J Bone Joint Surg Am* 37-A(5): 1035-1068.

Yamaji, T., K. Ando, S. Wolf, P. Augat and L. Claes (2001). "The Effect of Micromovement on Callus Formation." *J Orthop Sci* 6(6): 571-575.

Yang, L., S. Nayagam and M. Saleh (2003). "Stiffness characteristics and inter-fragmentary displacements with different hybrid external fixators." *Clin Biomech (Bristol, Avon)* 18(2): 166-172.

Yasui, N., M. Sato, T. Ochi, T. Kimura, H. Kawahata, Y. Kitamura and S. Nomura (1997). "Three modes of ossification during distraction osteogenesis in the rat." *J Bone Joint Surg Br* 79(5): 824-830.

Zannettino, A. C., S. Paton, S. Itescu and S. Gronthos (2010). "Comparative assessment of the osteoconductive properties of different biomaterials in vivo seeded with human or ovine mesenchymal stem/stromal cells." *Tissue Eng Part A* 16(12): 3579-3587.

Zerwekh, J. E., L. A. Ruml, F. Gottschalk and C. Y. Pak (1998). "The effects of twelve weeks of bed rest on bone histology, biochemical markers of bone turnover, and calcium homeostasis in eleven normal subjects." *J Bone Miner Res* 13(10): 1594-1601.

Danksagung

Mein großer Dank gilt Herrn Prof. Eckhard Wolf als Doktorvater der vorliegenden Dissertationsschrift. Weiterhin gilt mein Dank Herrn Prof. Lutz Claes in seiner Rolle als Projektleiter, für konstruktive Diskussionen im Rahmen der Projektbesprechungen und seine Korrekturen der Entwürfe. Mein Dank gilt auch Frau Prof. Anita Ignatius für die gewährte Möglichkeit zur Doktorarbeit am Institut für Unfallchirurgische Forschung und Biomechanik und ihre Mentorenschaft.

Großen Dank möchte ich Nick Meyers aussprechen, mit dem ich drei Jahre lang an der Studie gearbeitet habe und Freud und Leid teilte. Nach unzähligen Wochenenden und Feiertagen im Stall, einer rapide gestiegenen Frustrationstoleranz und so manch grauem Haar mehr als zu Beginn kann ich nur sagen: Thanks for hangin´ on, dude!

Unendlicher Dank gilt Sandra Reitmaier, die mich in unserer gemeinsamen Zeit am Institut bedingungslos unterstützte, die mir immer wieder Mut zusprach, mit der die Arbeit immer- ob gerade stressig, skurril oder traurig- auch riesigen Spaß machte und von der ich sehr viel lernen konnte. Ihr Weggang riss eine Lücke in der Arbeit, die nicht mehr zu schließen war. Vielen Dank für die tolle Zeit während und außerhalb der Arbeit!

Mein großer Dank gilt Svenja Klose für ihre OP-Assistenz und die Mithilfe im Stall. Großen Dank auch an Uschi Maile, Marion Tomo, Stefanie Schroth und Chérise Grieser für ihre zuverlässige Hilfe in allen Belangen der Studie und vor allem Rat und Tat bei der Herstellung der histologischen und immunhistochemischen Präparate. Mein Dank gilt auch Maria Bosello für ihren Einsatz im Stall, wenn ich mir mal ein Wochenende freinehmen wollte.

Ein herzliches Dankeschön an die Tierpfleger des Tierforschungszentrums Oberberghof, Ricco Richter, Hermann Klassen und Kurt Steinhauer, für die Fütterung und Pflege der Schafe und riesigen Dank an Wilhelm Gebel, den größten Schäfer von Lehr, der immer zur Stelle war, wenn Not am Mann war. Danke, Wilhelm, für jeden Spruch, für all die „Cinos“ auf der Terrasse und für die lustigen Tage und Abende in und mit der Molke!

Schließlich möchte ich mich bei meinen Eltern und meiner Familie bedanken, die mir all das, was ich heute erreicht habe, ermöglichten, die mich begleiteten auf meinem Weg und mir immer den Rücken stärkten. Vielen Dank auch meinen „Münchener Freunden“, Doro, David, Stefan und Anna, für tröstende und aufmunternde Worte. Last but not least, den allergrößten Dank an meine liebe Freundin Susi. Du bist genau zur rechten Zeit gekommen und hast mich die letzten Monate Arbeit überstehen lassen!

