

Aus der Klinik für Unfallchirurgie, Orthopädie und Plastische Chirurgie

(Prof. Dr. med. W. Lehmann)

der Medizinischen Fakultät der Universität Göttingen

# **Vorbereitende Studien zu Methoden der Wachstumslenkung am Schafsmodell**

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Doktorgrades

der Medizinischen Fakultät der

Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt von

**Theresa Elisabeth Michel**

aus

Heidelberg

Göttingen 2023

Dekan: Prof. Dr. med. W. Brück

### **Betreuungsausschuss**

Betreuerin: Prof. Dr. med. A.-K. Hell

Ko-Betreuerin: Prof. Dr. med. F. Alves

### **Prüfungskommission**

Referentin: Prof. Dr. med. A.-K. Hell

Ko-Referentin: Prof. Dr. med. F. Alves

Promotor-Vertreter: Prof. Dr. mult. T. Meyer

Datum der mündlichen Prüfung: 03.08.2023

Hiermit erkläre ich, die Dissertation mit dem Titel „Vorbereitende Studien zu Methoden der Wachstumslenkung am Schafsmodell“ eigenständig angefertigt und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet zu haben.

Göttingen, den .....

(Theresa Elisabeth Michel)

Teile der Arbeit wurden veröffentlicht in:

Jäckle K, Lippross S, **Michel TE**, Kowallick JT, Dullin C, Lüders KA, Lorenz HM, Tsaknakis K, Hell AK (2022): A Preclinical Pilot Study on the Effects of Thermal Ablation on Lamb Growth Plates. *Children* 9, 878

# Inhaltsverzeichnis

<b>Abbildungsverzeichnis</b> .....	<b>III</b>
<b>Tabellenverzeichnis</b> .....	<b>V</b>
<b>Abkürzungsverzeichnis</b> .....	<b>VI</b>
<b>1 Einleitung</b> .....	<b>1</b>
1.1 Versuche am Schaf als Modelltier .....	1
1.1.1 Tibia als Modellknochen .....	2
1.1.2 Aktivität von Schafen .....	2
1.1.3 Ganganalyse von Schafen .....	3
1.2 Knochenneubildung und Funktionsweise der Knochenverlängerung .....	4
1.3 Aktuelle Implantate zur Beinverlängerung .....	5
1.3.1 Fixateur externe.....	5
1.3.2 Marknagel .....	6
1.3.3 Notwendigkeit eines neuen Implantats zur Knochendistraktion bei Kindern .....	7
1.3.4 Extramedullär fixierte intramedulläre Verlängerungsmethoden .....	7
1.4 Hemmung von Wachstumsfugen.....	8
1.5 Fragestellung und Zielsetzung der Arbeit.....	9
<b>2 Material und Methoden</b> .....	<b>11</b>
2.1 Versuchstiere .....	11
2.2 Aktivitätsprotokoll und Scoring der Schafe .....	12
2.3 Methoden der Extremitätenbelastungsmessungen .....	13
2.3.1 Klauendruckmessungen mit Sensoren in angepassten Schuhen .....	13
2.3.2 Walkway Gangstrecke und Berechnung tagesdurchschnittlicher Belastung .....	16
2.4 Statistische Methodik.....	18
2.5 Versuch zur extramedullären Knochenverlängerung mit einem Fixateur interne (MAGEC® Implantat).....	18
2.6 Versuch zur Thermoablation an Wachstumsfugen eines Leinelamms .....	22
2.6.1 MRT .....	23
2.6.2 Mikro-Computertomographie (μ-CT) .....	24
2.6.3 Histologie.....	26
<b>3 Ergebnisse</b> .....	<b>30</b>

3.6	Präoperative Anwendung des Scoring Sheets und Aktivitätsprotokolls.....	30
3.7	Klauendruckmessungen .....	32
3.7.1	Sensoren am Schuh ungeeignet für Klauendruckmessungen .....	32
3.7.2	Klauendruckmessungen mit Walkway Gangstrecke und Berechnung der tagesdurchschnittlichen Belastung .....	33
3.8	MAGEC®-Implantat: biomechanischer Test und Operation .....	38
3.9	Thermoablation.....	40
3.9.1	Erstellung histologischer Schnitte unter Einbeziehung der $\mu$ CT-Bildgebung .....	41
3.9.2	Treffsicherheit Wachstumsfuge.....	43
3.9.3	Volumen der in MRT- und $\mu$ CT-Bildern sichtbaren Läsionen .....	45
3.9.4	Histologie.....	49
<b>4</b>	<b>Diskussion.....</b>	<b>53</b>
4.1	Schaf als Modelltier und Klauendruckmessungen .....	53
4.2	Schafsknochen und MAGEC®-Implantat.....	58
4.3	Methodische Synergie von $\mu$ CT und Histologie.....	61
4.4	Thermoablation.....	63
4.5	Ausblick .....	65
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung .....</b>	<b>66</b>
<b>6</b>	<b>Anhang.....</b>	<b>68</b>
<b>7</b>	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>69</b>

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1.1 Zeichnung des linken Hinterbeins eines Schafs von lateral. ....	1
Abbildung 2.1 Versuchstiere und – bedingungen in der ZTE. ....	12
Abbildung 2.2 Material zur Klauendruckmessung. ....	14
Abbildung 2.3 Vorbereitungen zur Klauendruckmessung mit Schuhsensoren. ....	15
Abbildung 2.4 Beispielhafte Darstellung der Maximaldrücke je Klaue. ....	16
Abbildung 2.5 Material und Versuchsaufbau zur Klauendruckmessung mit Sensormatte. ....	17
Abbildung 2.6 Probeweise Befestigung des MAGEC®-Implantats an Kadaver eines Schafbeins. ...	19
Abbildung 2.7 Versuchsaufbau für biomechanischen Test des MAGEC®-Implantats. ....	19
Abbildung 2.8 Ablauf der Operation. ....	21
Abbildung 2.9 Ablauf der Thermoablation. ....	22
Abbildung 2.10 Material zur Thermoablation. ....	23
Abbildung 2.11 Distale Tibia hinten links nach der Thermoablation. ....	23
Abbildung 2.12 Sagittale MRT-Bilder des linken Knies. ....	24
Abbildung 2.13 Vergleich der drei $\mu$ CT-Aufnahmen. ....	25
Abbildung 2.14 Schritte der histologischen Einbettung. ....	27
Abbildung 3.1 Darstellung der im Liegen und Stehen verbrachten Zeit der Versuchstiere (n = 3). ...	31
Abbildung 3.2 Im Tagesverlauf gezählte Schrittzahl pro Stunde. ....	31
Abbildung 3.3 Darstellung der gemittelten Drücke je Klaue (Diagramm). ....	32
Abbildung 3.4 Graphische Darstellung einer Standphase von Schaf 3. ....	34
Abbildung 3.5 Graphische Darstellung zweier Gangzyklen von Schaf 3. ....	35
Abbildung 3.6 Graphische Darstellung eines Sprungs von Schaf 1. ....	37
Abbildung 3.7 Biomechanischer Test des MAGEC®-Implantats. ....	39
Abbildung 3.8 Postoperative Röntgenaufnahme des MAGEC®-Implantats an linker Tibia. ....	39
Abbildung 3.9 Postoperative Malrotation der linken Tibia. ....	40
Abbildung 3.10 $\mu$ CT-Bilder mit eingezeichneter, virtuell erstellter Schnittebene. ....	41
Abbildung 3.11 Prozess der Erstellung histologischer Schnitte. ....	42
Abbildung 3.12 Röntgenbilder nach Markierung der Wachstumsfuge mittels Elektrodenspitze. ....	43
Abbildung 3.13 $\mu$ CT-Bilder mit durch die Elektrodenspitze verursachten Läsionen. ....	44
Abbildung 3.14 $\mu$ CT-Bilder mit sichtbaren Läsionen. ....	44
Abbildung 3.15 MRT-Bilder mit sichtbaren Läsionen. ....	45
Abbildung 3.16 Volumen der mittels $\mu$ CT gemessenen Läsionen (n = 20). ....	46

---

Abbildung 3.17 Keine Abhängigkeit von Läsionsgröße in Bezug auf Treffsicherheit der Wachstumsfuge sichtbar. ....	47
Abbildung 3.18 Volumina der mittels MRT gemessenen Läsionen (n = 19).....	48
Abbildung 3.19 Zusammenhang zwischen den Volumina und der Entfernung zur Wachstumsfuge in MRT- und $\mu$ CT-Messungen. ....	48
Abbildung 3.20 Darstellung einer physiologischen Wachstumsfuge.....	49
Abbildung 3.21 Histologische Schnittbilder mit sichtbaren Läsionen. ....	50
Abbildung 3.22 Histologisches Bild der Läsion eines Einstichkanals, welcher nicht die Wachstumsfuge erreichte. ....	50
Abbildung 3.23 Histologische Schnitte mit sichtbaren Veränderungen der Wachstumsfuge.....	51
Abbildung 3.24 Histologische Bilder der Kontrollschnitte. ....	52
Abbildung 6.1 Score Sheet.....	68



## Tabellenverzeichnis

Tabelle 2.1 Parameter der $\mu$ CT-Aufnahmen des Systems QuantumFX (Perkin Elmer, Hamburg) .	24
Tabelle 3.1 Per analoger Waage und Sensormattenmessung ermitteltes Gewicht der Schafe [kg]....	33
Tabelle 3.2 Durchschnittliche Belastung der Beine im Stehen bezogen auf das Körpergewicht [%KG].....	34
Tabelle 3.3 Durchschnittliche Belastung der Hinterbeine im Laufen bezogen auf das Körpergewicht [%KG].....	36
Tabelle 3.4 Maximalbelastungen der Hinterbeine im Sprung bezogen auf das Körpergewicht [%KG].....	38

## Abkürzungsverzeichnis

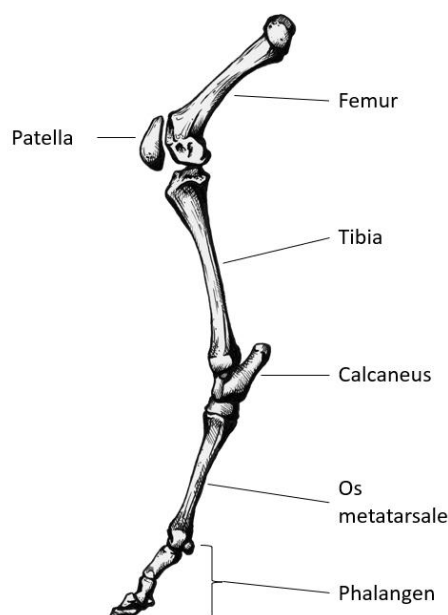
HE	Hämatoxylin-Eosin
LAVES	Niedersächsisches Landesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit
LH	Linkes Hinterbein
LV	Linkes Vorderbein
RH	Rechtes Hinterbein
RV	Rechtes Vorderbein
UMG	Universitätsmedizin Göttingen
ZTE	Zentrale Tiermedizinische Einrichtung
%KG	Prozent des Körpergewichts

# 1 Einleitung

## 1.1 Versuche am Schaf als Modelltier

Bevor Implantate am Menschen eingesetzt werden, muss ein aufwändiges Entwicklungs- und Prüfverfahren durchlaufen werden, welches üblicherweise biomechanische und *In-vivo*-Testungen am Tiermodell beinhaltet. Aufgrund anatomischer Besonderheiten eignen sich die Extremitäten des Schafes besonders gut für diese Untersuchungen.

Schafe machen einen geringen Anteil der zu wissenschaftlichen Zwecken genutzten Tierarten aus, auch bei der Forschung am muskuloskelettalen System (Verwendung von Versuchstieren im Jahr 2018). Die Wahl des Schafes als Modelltier ist in dieser präklinischen Studie zum einen in der relativ einfachen und kostengünstigen Haltung begründet (Newman et al. 1995; Sparks et al. 2020). Zum anderen sind Schafe groß genug, um menschliche Prothesen und Implantate zu testen (Newman et al. 1995). Der Schafsknochen ist des Weiteren gut mit dem menschlichen vergleichbar (Abbildung 1.1) und es sind die üblichen humanmedizinische Instrumente sowie Implantate nutzbar (Evans 2014). Auch das mechanische Belastungsprofil von Schafen ist gut beschrieben (Taylor et al. 2006).



**Abbildung 1.1** Zeichnung des linken Hinterbeins eines Schafs von lateral. Die Verwendung der Abbildung erfolgt mit freundlicher Genehmigung von Lukas Weig.

### 1.1.1 Tibia als Modellknochen

Schafsknochen haben grundsätzlich eine menschen-ähnliche Größe, Knochenmakrostruktur und hohe Übereinstimmungen in Bezug auf ihre organische und anorganische Struktur (Newman et al. 1995; Rehman et al. 1995; Sparks et al. 2020). Es bestehen Analogien in der Mineralzusammensetzung, was hilfreich ist, da Mineraldichte und Gehalt an Kallusgewebe als Faktoren zur Einschätzung der Knochenheilung dienen (Markel et al. 1991; Ravaglioli et al. 1996). Die Umbauprozesse und das Knochenheilungspotenzial des trabekulären Knochens unreifer Schafe sind außerdem mit dem wachsenden menschlichen Skelett vergleichbar (Chavassieux et al. 1997; Reichert et al. 2009; Sparks et al. 2020).

Ein Monat im Knochenalter des Schafes ist ins Verhältnis zu setzen mit einem Jahr im Alterungsprozess menschlicher Knochen (Nafei et al. 2000). Eine mehrmonatige Versuchszeit kann demnach den Verlauf der Knochenentwicklung eines Kindes in mehreren Jahren darstellen. Laut Schiborra (2006) ist eine eindeutige Alterskorrelation zwischen Menschen und Schafen schwierig, aufgrund der unterschiedlichen Entwicklung. Trotzdem kann aus histologischer Sicht ein 18 Wochen altes Schaf, dessen Wachstum im Alter von zwei Jahren seinen Abschluss findet, annäherungsweise mit einem Kind zwischen sechs und zehn Jahren verglichen werden.

Die Tibia des Schafes erweist sich für Versuche als geeignet durch eine vergleichbare tibiale Blutversorgung. Im Gegensatz zum Femur ist weniger Weichteilgewebe vorhanden, was den Knochen besser zugänglich macht für chirurgische Interventionen (Stützle et al. 1998; Reichert et al. 2009). Daneben ist die Kortikalis in Relation gesehen dicker, was für eine geringere Morbidität nach Schaffung eines diaphysären Defekts sorgt (Croker et al. 2016; Sparks et al. 2020). Etablierte Methoden zur Distractionsosteogenese wurden in früheren Studien auch am Modell der Schafstibia durchgeführt und qualifizieren diese als geeignetes Modell (Isaksson et al. 2007; Forriol et al. 2010; Sparks et al. 2020).

### 1.1.2 Aktivität von Schafen

Die Aktivität von Schafen und ihr Verhalten wurde hauptsächlich in natürlichen Umgebungen beobachtet. Dort zeigte sich, dass die Tiere bei Tageslicht über 83% der Zeit im Stehen verbringen und diese Zeit meist mit der Aufnahme von Futter verbracht wird (Mohammed et al. 2020). In der Studie von Mohammed et al. (2020) sind die Schafe bei Tageslicht in 79% der Zeit mit Weiden beschäftigt, in 8% mit Wiederkäuen und die restliche Zeit sind sie untätig. Bei guten Umweltbedingungen ist grundsätzlich ein vermehrtes

Autogrooming festzustellen (Bojkovski et al. 2014). Darunter versteht man der Körperpflege zuzuordnende Verhaltensweisen, wie sich Scheuern oder Beknabbern.

Neben beobachtbaren Routinen bei Schafen mit dauerhaftem Zugang zu Futter und Wasser konnten verschiedene Einflussfaktoren auf das Verhalten festgestellt werden (Lyons und Machen 2000). Bei diesen handelt es sich hauptsächlich um die Lufttemperatur und Ränge zwischen den Schafen (Bojkovski et al. 2014; Patkowski et al. 2019). Rangniedrigere Schafe haben bei kleineren Futter- und Liegeflächen eine verkürzte Liegezeit, weniger zur Herde synchrones Ruhen und eine gesteigerte Bewegung (Bøe et al. 2006). Besonders bei geringem Platz am Futtertrog zeigt sich vermehrt aggressives Verhalten und aufgrund des unterschiedlichen Zugangs zu Nahrung sind größere Variationen im individuellen Gewicht innerhalb einer Herde feststellbar (Silveira et al. 2018).

### 1.1.3 Ganganalyse von Schafen

Zur Gangbeobachtung von Tieren werden verschiedene Methoden beschrieben. Neben visueller Analyse und mit am Schaf befestigten Sensoren sind Geräte wie drucksensible Gangstrecken verbreitet (Agostinho et al. 2012; Hobbs-Chell et al. 2012). Die kinematisch erfassten Daten der Ganganalyse umfassen meist die Messungen der vertikalen Spitzenkraft, der Gangzykluszeit, der Schrittlänge und Geschwindigkeit sowie die prozentuale Verteilung des Körpergewichts auf die vier Gliedmaßen (Kim und Breur 2008; Agostinho et al. 2012). Liu et al. (2021) untersuchten darüber hinaus die Kräfte auf einzelnen Bereichen der Klaue, indem sie diese in vier Quadranten einteilten.

Messungen mit Sensormatten stellen eine nicht-invasive Möglichkeit dar, mehrere Gangzyklen eines Schafes aufzuzeichnen und dabei alle Klauen gleichzeitig zu analysieren (Kim und Breur 2008; Agostinho et al. 2012). Eine Analyse der Funktion und Nutzung von Gliedmaßen in gehendem Tempo entspricht einer erfahrungsgemäß guten Methodik. Bei schnellerem Fortbewegen werden geschwächte Gliedmaßen eher getragen als belastet (Kim und Breur 2008). Seebeck et al. zeigten, dass die Strategie der Gewichtsbelastung verletzter Schafe individuell, aber von Bedeutung ist, da die Gewichtsbelastung einen Einflussfaktor in der Phase der weichen Kallusbildung darstellte (Seebeck et al. 2005). In den Versuchen konnte außerdem ein prä- und postoperativer Unterschied operierter Hintergliedmaße mittels Ganganalyse festgestellt werden (Seebeck et al. 2005). Liu et al. (2021) sahen in der Ganganalyse ein „Potenzial zur Diagnostizierung von Erkrankungen des Bewegungsapparates der unteren Gliedmaßen von Vierbeinern“. Die Nützlichkeit der

Methode im klinischen Setting konnte darüber hinaus auch von anderen Autoren bewiesen werden (Oosterlinck et al. 2012).

## **1.2 Knochenneubildung und Funktionsweise der Knochenverlängerung**

Der reife Knochen des Menschen besteht aus sekundärem Lamellenknochen, welcher aus primärem Geflechtknochen hervorgeht. Die Knochenneubildung kann desmal oder chondral ablaufen. Bei der desmalen Ossifikation entsteht Geflechtknochen auf der Grundlage von mesenchymalem Bindegewebe. Wird vorher eine Struktur aus Knorpel geschaffen, spricht man von chondraler Ossifikation. Letzterer Vorgang ist bei den meisten Knochen vorherrschend (Aumüller et al. 2017).

Histologisch relevante Zellen für diese Prozesse sind Mesenchymzellen, welche sich zu Osteoblasten differenzieren können. Diese synthetisieren Osteoid, was die primäre Spongiosa bildet. Der dadurch entstandene Geflechtknochen wird zu Lamellenknochen umgebaut. Bei dem Prozess der chondralen Ossifikation differenzieren sich die Mesenchymzellen direkt zu Chondroblasten, welche das knorpelige Primordialskelett bilden. Diese Ossifikation kann peri- oder enchondral ablaufen. Unterstützt werden die genannten Prozesse dabei von einer Vielzahl von Faktoren wie Signalstoffen, welche in ihrem komplexen Zusammenspiel die Grundlage für die Differenzierungsschritte der Osteogenese bilden (Eerden et al. 2000; Wei et al. 2016; Runyan und Gabrick 2017; Lüllmann-Rauch und Asan 2019).

Im Rahmen des Remodelings werden die im menschlichen Körper vorhandenen Knochenstrukturen an ihre Beanspruchung angepasst. Diesen Vorgang macht man sich im Rahmen der Distractionsosteogenese zunutze. Anwendungsbereiche der Distractionsosteogenese sind unter anderem Frakturheilungsstörungen, Fehlbildungskorrekturen oder Verlängerungen der Extremitäten. Dabei wird eine Osteotomie gesetzt und beide Knochenanteile auseinandergezogen. An den zwei Knochenoberflächen, welche schrittweise voneinander entfernt werden, beginnen proinflammatorische Prozesse und die chondro- sowie osteogene Differenzierung wird angeregt. Histologische Untersuchungen von Kessler et al. (2005) zeigten, dass nach vier Wochen eine Laminierung der distrahierten Knochenbereiche festzustellen ist. Die Knochen trabekel lassen eine Ablagerung von Osteoid sowie eine Mineralisierung erkennen. Bei einem intermittierenden Verlängerungsansatz spielt die Form der desmalen Ossifikation

eine zentrale Rolle. Aufgrund der gerichteten Bewegungsreize in Form von Zugkraft kann somit schnell ein stabiler Kallus gebildet werden (Carter et al. 1998; Ehrnthaller 2008).

### **1.3 Aktuelle Implantate zur Beinverlängerung**

Einer angeborenen oder erworbenen Längendiskrepanz der Extremitäten kann bei Kindern mit einem Wachstumsstopp oder Methoden der Verlängerung begegnet werden. Gerade an der unteren Extremität sind gleich lange Beine und ein symmetrisches Gangbild u. a. für die Entwicklung einer geraden Wirbelsäule während des Wachstums von Bedeutung. Zur Verlängerung einzelner Extremitäten allgemein verwendete Methoden bei Kindern sind Nägel bzw. in jüngerer Zeit Platten zur Knochendistraktion (Endo et al. 2008; Tosun et al. 2016).

#### **1.3.1 Fixateur externe**

Der Fixateur externe stellt ein universell einsetzbares, auch zur Osteosynthese genutztes Verfahren dar. Dabei werden bei einem unilateralen Träger proximal und distal des Osteotomiespaltes Schanzschrauben am Knochen angebracht und mit einem außerhalb der Weichteile bleibenden Kraftträger verbunden. Der Knochenspalt kann so intermittierend über extern angebrachte Schrauben verlängert werden. Neben diesem klassischen Verfahren werden in der Achs- und Längskorrektur besonders Ringfixateure, sogenannte Hexapoden, eingesetzt. Hier werden über Streben und begleitende Computerrekonstruktionen komplexe Rekonstruktionen möglich (Koren et al. 2016; Horn et al. 2017). Als Beispiel ist hier der Taylor Spatial Frame (Keshet und Eidelman 2017) zu nennen, mit dem komplexe Korrekturen möglich sind. Als Vorteil dieser Verfahren sind die vergleichsweise geringen Auswirkungen auf das umgebende Weichteilgewebe zu nennen (Reichert et al. 2009; Ebraheim et al. 2017; Sparks et al. 2020).

Einschränkende Eigenschaften besitzt der Fixateur externe mit seinem sperrigen Rahmen auf die Bewegung der Patient\*innen. Damit ist nicht nur physiotherapeutischen Maßnahmen eine Grenze gesetzt, sondern auch den Patient\*innen und deren Teilnahme am zuvor geführten Leben (Szymczuk et al. 2019). Dies kann neben körperlichen Stigmata auch psychische Folgen haben und zu Depressionen führen (Cole et al. 2001; Dahl et al. 2020).

Komplikationen bei der Anwendung eines Fixateurs entstehen häufig aufgrund der schwierigen Hygiene und Pflege (Dahl et al. 2020). Besonders hervorzuheben sind hierbei die auftretenden Pin-Infektionen (Reichert et al. 2009; Szymczuk et al. 2019). Diese können zum einen den Heilungsprozess verlangsamen bzw. komplizieren und zu einer Lockerung

der Schrauben führen (Ebraheim et al. 2017; Sparks et al. 2020). Daneben sind Achsenabweichungen, Nerven- oder Gefäßverletzungen im Rahmen des Verlängerungsprozesses der Distractionsosteogenese möglich. Regenerationsprobleme in Form von verzögerter Konsolidierung oder Frakturen nach Abnahme des Rahmens führen oft zu wiederholt notwendigen Interventionen im Behandlungsverlauf (Green 1983; Paley 1990; Simpson und Kenwright 2000; Dahl et al. 2020). Anwendbar ist ein externer Fixateur auch schon bei kleinen Kindern, wobei besonders hier das Ergebnis bei Verlängerungen von Knochen ohne Deformitäten besser ist (Szymczuk et al. 2019).

### 1.3.2 Marknagel

Das Prinzip des Marknagels liegt in der internen Schienung von Röhrenknochen begründet. Die osteotomierten Knochenenden werden dabei intramedullär über einen Nagel verbunden. Die Knochenverlängerungen können mechanisch über einen Einrastemechanismus, mit Motor oder durch magnetische externe Steuerung erfolgen (Baumgart et al. 2006; Lee et al. 2014). Distractions- und Knochenheilungsrate sind dabei mit denen des Fixateurs vergleichbar (Szymczuk et al. 2019).

Der Nagel als zentraler Kraftträger zeigt eine höhere Toleranz der einwirkenden Kräfte und geringere Achsenabweichungen (Reichert et al. 2009). Ein höherer Bewegungsradius, geringere Schmerzbelastungen und damit weniger Einschränkungen im Alltag führten zu einer hohen Akzeptanz dieser Methode bei Patient\*innen (Cole et al. 2001; Iobst 2019; Szymczuk et al. 2019). Auch eine geringere Komplikationsrate ist anzuführen (Szymczuk et al. 2019).

Das Aufbohren des Knochens zur Schaffung eines intramedullären Kanals für den Nagel hat positive Effekte auf die Heilungsrate des Knochens (Porter et al. 2009; Haubruck et al. 2018). Damit verknüpft ist jedoch das Risiko einer iatrogenen knöchernen Erosion (Porter et al. 2009; Haubruck et al. 2018). Auch die durch die Bohrung entstehende gesteigerte intramedulläre Temperatur beeinträchtigt die kortikale Knochendurchblutung und kann zu Nekrosen und Veränderungen der endostalen Architektur führen (Ochsner et al. 1998; Reichert et al. 2009; Haubruck et al. 2018).

Die Verwendung eines Marknagels ist limitiert durch das Vorhandensein offener Wachstumsfugen und einen minimal notwendigen inneren Durchmesser des Röhrenknochens (Ochsner et al. 1998; Haubruck et al. 2018). Diese Form der Therapie bei Beinlängendifferenzen kann daher erst bei Kindern ab einem Alter von neun bis zehn Jahren Anwendung finden. Optimalerweise sollten Tibiaverlängerungen mit teleskopischem Nagel



an skelettreifen Patient\*innen durchgeführt werden, um zusätzliche Schädigungen der Wachstumsfugen zu vermeiden (Rozbruch et al. 2014; Szymczuk et al. 2019).

Der Verlängerungsprozess der Tibia mithilfe eines intramedullären Nagels wurde von Iobst im Jahr 2019 beschrieben. Dabei stellte er fest, dass im Vergleich zum Fixateur externe eine längere Latenzzeit sowie geringere Frequenz und Intervalle der Verlängerung notwendig seien (Iobst 2019). Anzumerken sind des Weiteren die im Vergleich zum Fixateur externe erhöhten Index-Implantat-Kosten. Aufgrund der seltener notwendigen Sekundäreingriffe sind die Gesamtkosten allerdings niedriger (Richardson et al. 2019).

### **1.3.3 Notwendigkeit eines neuen Implantats zur Knochendistraktion bei Kindern**

Unterschiedlich lange Beine sind ein häufiges Problem (Hellsing 1988; Brady et al. 2003). Ab einer gewissen Längendifferenz der Beine sind Auswirkungen für den kompletten Bewegungsapparat zu erwarten. Bei nicht ausreichender konservativer Behandlung sind chirurgische Korrekturen indiziert. Die bisher üblichen Methoden zur Durchführung einer Distraktionsosteogenese und deren Problematiken machen allerdings deutlich, dass es für Kinder unter zehn Jahren noch keine zufriedenstellende Lösung gibt (Paley 2015). Zur Wiederherstellung der korrekten Achs- und Längenverhältnisse bei Kindern mit Beinlängenunterschied und/oder Achsfehlstellungen ist eine möglichst komplikationsfreien, kosmetisch ansprechbare Alternativmethode erwünscht, mit der die im Krankenhaus verbrachte Zeit auf ein Minimum reduziert wird.

### **1.3.4 Extramedullär fixierte intramedulläre Verlängerungsmethoden**

Um die Wachstumsfugen bei kleineren Kindern zu schonen, aber den Magnetverlängerungsmechanismus intramedullärer Nägel zu nutzen, wurden von extern zu verlängernde magnetische Implantate (PRECICE®; NuVasive, Aliso Viejo, CA USA) extramedullär an Femur und Tibia mit getunnelter Weichteilabdeckung fixiert (Georgiadis et al. 2017; Iobst 2019). Diese Anwendung erfolgte im Rahmen eines *off-label use* (Dahl et al. 2020).

Obwohl mögliche Folgen der nicht dafür ausgelegten Platzierung des Implantats wie Muskeltrauma oder Blutungen bekannt waren, wurden die Implantate in der von Dahl et al. (2020) durchgeführten Studie gut toleriert. In der retrospektiven Studie wurden erfolgreich extramedulläre Verlängerungen des Femurs mit einem magnetisch gesteuerten intramedullären Nagel bei Kindern bis zu acht Jahren mit subjektiv guten Erfahrungen

durchgeführt. Anzumerken ist hierbei, dass keine standardisierten Skalen zur Messung des Schmerzes und der Zufriedenheit für einen adäquaten Vergleich angewandt wurden.

## 1.4 Hemmung von Wachstumsfugen

Das physiologische Längenwachstum menschlicher Röhrenknochen findet in den Epiphysenfugen statt. Die auch als Wachstumsfugen bezeichneten Bereiche sind zwischen Epi- und Diaphyse lokalisiert und beinhalten zahlreiche Knorpelzellen. Eine Proliferation dieser Chondrozyten mit anschließender Ossifikation führt zum Längenwachstum der Röhrenknochen (Hallett et al. 2019). Mit dem Schluss der Epiphysenfugen wird das Ende des Knochenwachstum markiert. Dieses Stadium wird je nach Röhrenknochen zu einem anderen Zeitpunkt erreicht und die Zeitspanne zur vollendeten Ossifikation kann unterschiedlich lang sein (Moss und Noback 1958). Ausgewachsen sind Menschen im Durchschnitt mit 15,5 (weiblich) bis 17,6 (männlich) Jahren (Tanner und Davies 1985). Einen Einfluss auf die Funktion der Wachstumsfugen und das Längenwachstum von Patient\*innen, vor allem in der Pubertät, haben zelluläre, parakrine und endokrine Faktoren (Shim 2015).

Die Epiphyseodese (von griechisch *epiphyesthai* – darauf wachsen und *desis* – binden) beschreibt ein chirurgisches Verfahren, bei dem es durch die Überbrückung oder Zerstörung der Wachstumsfuge zu einer Wachstumshemmung der betroffenen Fuge und damit des Knochens kommt. Die Epiphyseodese gilt als etablierte Methode zur Korrektur von Beinlängendifferenzen oder Beinachsendiformitäten. Um dieses Verfahren nutzen zu können, darf die Wachstumsfuge des Knochens demnach noch nicht verschlossen und es muss genügend Restwachstum vorhanden sein. Etablierte Methoden zur Feststellung des Status der Wachstumsfuge stellen Röntgenbilder, Wachstumskurven und Nomogramme dar (Fishman 1982; Gladbach et al. 2000). Mittlerweile wurden Methoden entwickelt und zur einfachen Anwendung beispielsweise als Apps bereitgestellt, mit denen eine Vorhersage der Gliedmaßendiskrepanzen bei Skelettreife möglich ist (Paley et al. 2000; Paley 2016; Birch et al. 2021).

Zu unterscheiden sind die temporären von den permanenten Methoden der Epiphysiodese. Erstere können bei Anwendung bis nach dem Wachstumsabschluss auch als permanent angesehen werden. Für eine primär temporäre Epiphyseodese sind Methoden wie Klammern, Schrauben oder modifizierte Formen einer Plattenosteosynthese verbreitet (Métaizeau et al. 1998; Gottliebsen et al. 2013; Hillebrand et al. 2020).

Zur permanenten Epiphyseodese wurde anfangs gerne die von Phemister eingeführte Technik verwendet. Dabei wird ein aus der Epiphyse entnommener, um 180° gedrehter, Knochenblock reimplantiert. Aufgrund ihres minimal-invasiven Verfahrens mit geringeren Komplikationsraten sind heutzutage aber vor allem perkutane Verfahren der Epiphyseodese verbreitet (Babu et al. 2014). Dazu zählt die Methode nach Canale, bei der eine perkutane Anbohrung und anschließende Auskürettierung der Epiphysenfuge vorgenommen wird (Canale und Christian 1990).

Durch Nutzung von Strom und Laser sind in letzter Zeit weitere Methoden hinzugekommen (Morein et al. 1978). Bei der Therapie von Knochen- und muskuloskelettalen Tumoren ist eine Radiofrequenz-Behandlung üblich (Rosenthal 2006). Im Rahmen dessen konnte unter Verwendung minimal-invasiver Technik mithilfe von Hochfrequenzstrom Gewebevolumen kontrolliert abgetragen werden, was zu einer thermalen Nekrose von Knochen führte (Corby et al. 2008). Die zur Nekrose führende Koagulation der Proteine im Knorpel kann nach Heisterkamp et al. schon bei einer Applikation von 50 – 60°C in einem Zeitrahmen von unter drei Minuten (min) erreicht werden (Heisterkamp et al. 1999).

Die erfolgreiche Anwendung dieser minimalinvasiven Technik mit dem Ziel der Epiphyseodese konnte an den Wachstumsfugen von Hasen, Schafen und Hunden gezeigt werden (Rosen et al. 1990; Widmann et al. 2010; Shiguetomi-Medina et al. 2014). Das weitere longitudinale Wachstum des Knochens wird durch die sich bildenden Knochenbrücken verhindert (Dodge et al. 2007). Rosen et al. (1990) wiesen fünf Wochen nach dem Eingriff eine Zerstörung der Architektur der Wachstumsfugen nach, welche eine verlässliche symmetrische und komplette Epiphyseodese bedeuteten.

## 1.5 Fragestellung und Zielsetzung der Arbeit

In der vorliegenden Arbeit wird die mögliche Anwendung zweier Methoden zur Beeinflussung des Wachstums am Schaf dargestellt. Zum einen steht dabei die Wachstumsverlängerung als Methode zum Ausgleich einer Beinlängendifferenz im Fokus. Die extramedulläre Anbringung eines stabförmigen Verlängerungsimplantats an der Tibia entspricht einem *off-label use*, welcher bei positiven Ergebnissen als alternative Behandlungsmöglichkeit für die Distractionsosteogenese bei betroffenen Kindern diskutiert werden kann.

Zum anderen soll die Durchführung einer Hemiepiphyseodese an Wachstumsfugen eines stillgeborenen Schafes dazu dienen, die durch die Hitzeablation entstehenden

Veränderungen des Gewebes zu untersuchen. Erste Versuche einer minimal-invasiven Methodik zur Wachstumshemmung oder Achsenlenkung für die später klinische Behandlung pädiatrischer Patient\*innen sind das Ziel dieser Pilotstudie. Dabei soll außerdem die Genauigkeit und Effizienz bei Erstellung histologischer Schnitte verbessert werden. Hierfür wurde ein Protokoll etabliert, das die aus den  $\mu$ CT gewonnenen Daten berücksichtigt. Mithilfe der dreidimensionalen Darstellung der  $\mu$ CT-Bilder wurden optimale Schnittebenen definiert und auf die eingebetteten Probenblöcke übertragen.

Grundsätzlich dienen die hier getätigten Versuche auch der weiteren Erforschung des Leineschafs als Versuchstier in orthopädischen Studien. Es sollen Daten erhoben werden zu dem Verhalten, der Aktivität und dem Gang klinisch unauffälliger Tiere. Die hier gewonnenen Informationen über gesunde Schafe können bei späteren Studien als Erfahrungswerte dienen. Des Weiteren sollen Werte wie die tagesdurchschnittliche Belastung pro Bein ermittelt werden, welche bei der Planung neuer Studien helfen und die Versuchsbedingungen noch besser an die Versuchstiere anpassbar machen.

## 2 Material und Methoden

Die vorliegenden Untersuchungen wurden im Rahmen des BMBF-Projektes „Extern steuerbares Plattenosteosynthesystem für Kinder“ (KiD Plate) (Nr.13GW0302B) durchgeführt.

### 2.1 Versuchstiere

Die Verwendung von Versuchstieren im Rahmen dieses Projektes wurde vom Niedersächsischen Amt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit (LAVES 33.9-42502-04-18/2791) genehmigt. Alle durchführenden Personen legten versuchsspezifische Sachkundenachweise vor. Die acht weiblichen Schafe der Rasse „Leineschaf“ wurden vom Universitätsversuchsgut Rellichausen (Waldstraße 5, 37586 Dassel) bezogen. Bereits 14 Tage vor der geplanten Operation wurden die Tiere in der Zentralen Tiermedizinischen Einrichtung (ZTE) der UMG eingestallt. Dadurch konnte eine Adaptation der Lämmer an die Umgebung und die betreuenden Tierpfleger\*innen stattfinden. Initial wurde der gesundheitliche Status aller Schafe durch die ausführliche Untersuchung einer Veterinärmedizinerin als unauffällig bestätigt.

Um mögliche Effekte von Konkurrenzverhalten und Kastrierung männlicher Schafe auf das Versuchsvorhaben zu umgehen, wurden für dieses Projekt ausschließlich weibliche Tiere verwendet. Die Rasse Leineschaf wurde aufgrund ihres regionalen Vorkommens und der zutraulichen Art für die Versuche gewählt, da eine hohe Compliance die Beobachtungen und Untersuchungen erleichtert.

Die Tiere wurden als eine Gruppe in einem ca. 40 m<sup>2</sup> großen Raum auf planbefestigtem Boden mit Stroheinstreu gehalten. Der Hell-/Dunkelzyklus setzte sich aus 12h hell/12h dunkel zusammen und die Temperatur betrug 16 – 18°C bei einer Luftfeuchtigkeit von 40 – 60%. Die Wasserversorgung war sichergestellt und eine Fütterung erfolgte durch die im Versuchsgut Rellichausen übliche Mischung aus Kraftfutter, sowie Heu ad libitum. Bei Eintritt in die Studie waren die sieben weiblichen Lämmer ca. 4,5 Monate alt. Das Gewicht wurde nach Ankunft der Tiere in der ZTE gewogen und lag zwischen 25 kg und 35 kg. Eine individuelle ID auf der Ohrmarke stellte die eindeutige Identifizierung der Tiere sicher (Abbildung 2.1).

Auch die bei den Klauendruckmessungen verwendeten Tieren stammten vom Versuchsgut Rellichausen der Georg-August-Universität Göttingen (Waldstraße 5, 37586 Dassel) und die

Verwendung im Rahmen dieses Projektes wurde vom Niedersächsischen Amt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit genehmigt (LAVES, 33.9-42502-04-18/2791). Es handelte sich dabei um weibliche Mastlämmer und -schafe. Sie wurden unter den in Rellichausen üblichen Bedingungen gehalten und gemästet. Zum Zeitpunkt der Versuche waren zwei der acht Tiere anderthalb Jahre alt, die anderen sechs Schafe ein halbes Jahr alt. Das Gewicht betrug durchschnittlich 32,25 kg, wobei das leichteste Schaf 21 kg und das Schwerste 51 kg wog. Eine Identifizierung war durch die ID in der Ohrmarke gegeben (Abbildung 2.1b).

## 2.2 Aktivitätsprotokoll und Scoring der Schafe

Das Wohlbefinden der Schafe sollte nach der Operation täglich mithilfe eines Scoring Sheets überwacht werden. Dafür wurde bereits vor der Operation das Scoring mit jedem Schaf (Schaf 1 – 8) einmalig durchgeführt. Folgende Kriterien wurden dabei beobachtet: Aktivität, Gesichtsausdruck, Verhalten in Herde, Verhalten als Einzeltier, Verdauung und Ernährung, Atemfrequenz, Puls, Haarkleid, Körpertemperatur, Schleimhäute, Lymphknoten, individuelle Begebenheiten (Abbildung 2.1a,c).



**Abbildung 2.1 Versuchstiere und –bedingungen in der ZTE.** a) Schafstall mit Versuchstieren und Futtertrögen (\*); b) Ohrmarke zur Identifizierung der Schafe; c) Begutachtung der Mundschleimhaut eines Schafes im Rahmen des präoperativen Scorings.

Die Auswahl dieser Kriterien und Wertung der möglichen Befunde wurde in Zusammenarbeit mit den Veterinärmediziner\*innen der ZTE vorgenommen (Guesgen et al. 2016; Biernot 2017). Eine Orientierung zur Interpretation des Gesichtsausdrucks der Schafe bot auch die *Sheep Grimace Scale*, wie sie von Häger et al. (2017) beschrieben wurde. Bei einem

Score von einem Punkt sollte das betroffene Schaf und dessen Gesundheitszustand regelmäßig kontrolliert werden. Ab zwei Punkten war eine Vorstellung bei den Veterinärmediziner\*innen vorgesehen, sowie bei Bedarf eine angepasste antiinflammatorische, antibiotische und/oder Schmerztherapie.

Für die Erstellung des Aktivitätsprotokolls wurden drei Schafe für 24 Stunden beobachtet (Schaf 25, 29, 52). Eine farbige Markierung dieser drei Tiere zur besseren Erkennung während der Verhaltensobservationen erfolgte mittels eines Markierungssprays für Schafe (Hans Noack GmbH, Bielefeld). Die Aktivität dieser Schafe wurde bestimmt, indem das beobachtete Verhalten in drei Aktivitätszustände eingeteilt und die Werte daraus in halb- bis zweistündigen Intervallen gemessen wurden. Die Messungen fanden innerhalb eines Zeitraums von acht Tagen statt, sodass jede Tageszeit innerhalb von 24 Stunden einmal aufgenommen wurde. Dabei wurden einerseits die zurückgelegten Schritte gezählt. Andererseits fand eine Messung der im Liegen und Stehen verbrachten Zeit statt. Die Beobachtungen wurden tagsüber vor Ort vorgenommen. Mit ausreichend Abstand und ruhigem Verhalten der beobachtenden Person, konnten die Schafe so ungestört und ohne weitere Ablenkung ihrem normalen Rhythmus nachgehen.

Für die Beobachtungszeit während der Nacht wurden die mit einer Kamera (GoPro Hero 5, GoPro Inc., San Mateo, CA, USA) aufgenommenen Filmaufnahmen ausgewertet. Aufgrund der begrenzten Akkulaufzeit der Kamera und den notwendigen Pausen der Beobachterin waren die Zeitintervalle der Beobachtung nicht immer die geplanten zwei Stunden. Zur Analyse wurde die im Stehen und Laufen verbrachte Zeit in drei gewählten Zeiträumen (06:38 – 08:40Uhr, 08:40 – 20:00Uhr, 20:00 – 06:38Uhr) pro Schaf ausgewertet, die Schrittzahl in halb- bis zweistündigen Intervallen.

## **2.3 Methoden der Extremitätenbelastungsmessungen**

### **2.3.1 Klauendruckmessungen mit Sensoren in angepassten Schuhen**

Für die Klauendruckmessung wurden vier Sensoren (UngulaPress, Thorsis Technologies GmbH, Magdeburg) in einer empfindlichen Hülle mit jeweils einem Millimeter Gummi auf beiden Seiten des Sensors unter den Klauen des Schafes befestigt (Abbildung 2.2a). Gemessen wurde eines der Schafe dreimal, die anderen vier Schafe je einmal ( $n = 7$ ), bei einer durchschnittlichen Messzeit von 27 min (15 – 41 min). Zwei Module, die in der Halterung eines Gurtes am Rücken des Schafs angebracht waren, sammelten die Daten. Durch ihre WLAN-Verbindung mit der passenden Software an einem Computer, konnten

die Daten erfasst werden. Als zu messende Belastung wurde hierbei die Summe der Drücke über eine Zeit bzw. Dauer der Belastung in einem Zeitintervall festgelegt.

Zur Befestigung der Sensoren an der Klaue und optimalen Übertragung der Druckbelastungen auf die Sensoren, wurden Schuhe für die Klauen erstellt. Dazu wurden 3D-Klauenabdrücke von Schafen verwendet, welche als Vorlage für ein 3D-gedrucktes Modell (Movimento Orthopädie & Rehatechnik GmbH, Kassel) dienten. Anhand dessen konnte das Modell eines Schuhs angepasst, ein dreidimensionales Modell ausgemessen und dieses im 3D-Drucker gedruckt werden (Abbildung 2.2). Für eine Anpassung des Schuhs an die individuelle Form der Schafsklaue wurde das Zwei-Komponenten Silikon Impresil (Otto Bock HealthCare Deutschland GmbH, Duderstadt) verwendet. Mithilfe eines Stretch-Schlauchverbandes und Klebeband wurde das Sensorband entlang des Schafbeines befestigt (Abbildung 2.3f).



**Abbildung 2.2 Material zur Klauendruckmessung.** (a) 1 = Messschuhe, 2 = Drucksensor, 3 = WLAN-Modul, 4 = 3D-gedruckte Schafsklaue; b) zusammengesetzte Messvorrichtung auf Schaumstoffunterlage. Die Verwendung der Bilder erfolgt mit freundlicher Genehmigung von Movimento, Orthopädie-&Rehatechnik GmbH, Kassel.

Bei der Vorbereitung und Anlegung des Messsystems wurde folgendes Protokoll verfolgt: Zuerst wurden die Sensoren mit doppelseitigem Klebeband an die Messschuhe geklebt, für die Innen- und Außenklaue gab es je einen eigenen Schuh. Es wurde auf eine saubere Positionierung der Sensoren mittig unter dem Schuh ohne Überstand geachtet. Als Zweites wurde der Vorfallgurt am Schaf angelegt. Ein Vorfallgurt findet hauptsächlich Anwendung bei Tieren mit Gebärmuttervorfall und Bindegewebsschwäche. Aufgrund seines festen, ans Schaf anpassbaren Sitzes wurde er in dieser Arbeit für den Versuchsaufbau verwendet. Bei Bedarf erfolgte an dieser Stelle ein Schneiden des Hornschuhs, der äußersten Schicht der



Klaue. Im dritten Schritt wurde das Schaf in eine Steiß-Rückenlage – auch Schäferhaltung genannt – gebracht und es wurde ein Verband über die Beine gezogen zur Schonung der Haut und Verringerung der Scheueraktivität während des Messvorgangs (Abbildung 2.3a). Anschließend wurde das Impresil an der Schuhinnenseite aufgetragen und die angegebene Aushärtungszeit abgewartet (Abbildung 2.3b). Unter ausreichend Druck erfolgte dann die Anpressung des Schuhs an die Schafsklaue und eine Fixierung des Schuhs mit Gewebeklebeband am Horn der Klaue (Abbildung 2.3c). Das Sensorkabel wurde unter Zugentlastung angelegt und mithilfe eines zweiten Stretch-Schlauchverbandes flexibel am Hinterbein fixiert (Abbildung 2.3f). Es folgte die Verbindung der Sensorkabel mit den Akkus, welche in der vorgesehenen Halterung des Vorfallegurtes angebracht wurden. Abschließend wurden Sensorleitung und Gurt bei potenziell störenden Schlaufen mit Tierversand entlang des Schafkörpers befestigt. Teilweise wurde eine Lockerung des Vorfallegurtes am Hals notwendig, um ein Engegefühl zu vermeiden und die volle Beweglichkeit des Kopfes für das Schaf zu garantieren (Abbildung 2.3g).

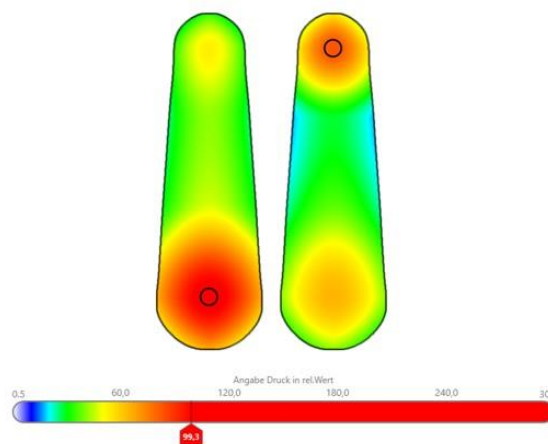


**Abbildung 2.3 Vorbereitungen zur Klauendruckmessung mit Schuhsensoren.** a) Schaf in Schäferhaltung mit Stretch-Schlauchverband zum Schutz von Bein und Fell an beiden Hinterbeinen; b) Messschuhe, am Rand mit Impresil ausgespritzt für einen formschlüssigen Halt des Schuhs an der Klaue; c) Andrücken des Messschuhs bis zur Aushärtung des Impresil; d) Mit Gewebeklebeband fixierte Messschuhe an Klaue; e) Verbundene WLAN-Module; f) Schaf von hinten mit an den Tibiae befestigten Sensorbändern, welche mit den am Haltegurt angebrachten WLAN-Modulen verbunden sind; g) Schaf mit Haltegurt und Sensoren an Hinterbeinen; h) Schaf mit Haltegurt im Liegen.

Für den ca. 30-minütigen Messvorgang verblieb das Schaf im Stall bei der Herde. Die Übertragung der Daten des Sensors konnte per WLAN synchron verfolgt werden. Zur besseren Interpretation fand eine zeitgleiche Dokumentation des Verhaltens und der Aktivität des gewählten Schafes statt. Bei ausreichender Bewegung des Tieres wurden

permanent die aktuellen Drücke in  $\text{N}/\text{cm}^2$  über die Zeit aufgezeichnet. Aus diesen konnten später die vorkommenden Spitzenbelastungen beim Laufen oder Springen, Aufstehen und Hinsetzen entnommen werden. Die Abnahme des Gurtes erfolgte unter Fixierung des Schafes im Stand. Bei Bedarf wurde abermals der Schäfersitz (Abbildung 2.3a) zur Demontage der Schuhe und Sensoren genutzt.

Die Darstellung der Messdaten erfolgt in einem Diagramm mit Darstellung der gemittelten Drücke aus den vier Messpunkten je Klaue. Die Messfrequenz betrug 30 Hz. Eine Ableitung und Visualisierung der lokalen Maximaldrücke war möglich (Abbildung 2.4).



**Abbildung 2.4 Beispielhafte Darstellung der Maximaldrücke je Klaue.** Die Verwendung der Abbildung erfolgt mit freundlicher Genehmigung von Movimento, Orthopädie-& Rehatechnik GmbH, Kassel.

### 2.3.2 Walkway Gangstrecke und Berechnung tagesdurchschnittlicher Belastung

Für die zweite Methode der Klauendruckmessung wurde die Walkway-Gangstrecke Typ evolution (WWG evo St.#3140, Savecomp Megascan GmbH, Hannover) im klassischen Design mit Steg verwendet. Zur Analyse der Daten wurde die passende Walkway Software (Savecomp Megascan GmbH, Hannover) genutzt. Diese ermöglichte die Ermittlung von Kräften, Druckverteilungen, sowie zeitlichen und räumlichen Gangparametern. Dafür verfügte das Messfeld mit einem Ausmaß von 294 cm x 45 cm über Kraftsensoren, welche mit einer Messfrequenz von 100 Hz abgefragt wurden und alle Belastungen aufzeichneten (Abbildung 2.5b und c). Die Auflösung betrug einen Messpunkt pro Zentimeter. Insgesamt waren 12.672 Sensorpunkte vorhanden.

Für die Messungen wurde mit Hilfe von Pferchgittern ein „Gehgang“ für die Schafe geschaffen. Dieser beinhaltete eine Grobspanplatte zur besseren Krafteinleitung sowie die

Sensormatte (Abbildung 2.5a). Als Referenz dienten die Messungen der Summe der Gewichtskräfte pro Klaue im Stehen, im Vergleich zu den auf der Waage gemessenem Gewichten der Schafe. Die Schafe wurden vom Schäfer festgehalten, bis sie der Reihe nach über die Matte laufen konnten. Die Schafe konnten im selbst gewählten Tempo den Gehgang durchschreiten. Somit konnten einige Aufzeichnung im Schrittempo, sowie Stehen und beim Springen gemacht werden.

Durch den Versuchsaufbau und die Messdatenerfassung ließen sich die betätigten Druckflächen den Gliedmaßen zuordnen. Diese wurden als „rechts vorne“ (RV), „links vorne“ (LV), „rechts hinten“ (RH) und „links hinten“ (LH) bezeichnet.



**Abbildung 2.5 Material und Versuchsaufbau zur Klauendruckmessung mit Sensormatte.** a) Walkway Gangstrecke innerhalb des mit Pferchgittern gelegten Treibgangs, rechts davon Laptop zur Datenerfassung; b) Sensorleitungen der einzelnen Messbereiche; c) Module zur Registrierung der elektrischen Signale und Weiterleitung an die USB-Module.

Die Daten aus der Verhaltensbeobachtung und den Klauendruckmessungen (2.3.1) wurden genutzt, um eine durchschnittliche Belastung der Hinterbeine an einem Tag zu berechnen. Dafür wurden die Durchschnittswerte folgender Parameter herangezogen:

- durchschnittliche Belastung am Tag ( $\bar{\text{Belastung}} / T$ )
- Zeit im Liegen [min] ( $t_{li}$ )
- Belastung im Liegen [Prozent des Körpergewichts (%KG)] ( $B_{li}$ )
- Zeit im Stehen [min] ( $t_{st}$ )
- Belastung im Stehen [%KG] ( $B_{st}$ )

- Zeit im Laufen [min](tla)
- Belastung beim Laufen [%KG](Bla)
- Minuten eines Tages [min](1440)

Hieraus entwickelte sich folgende Formel zur Erfassung der tagesdurchschnittlichen Belastung der Hinterbeine:

$$\text{ØBelastung} / T = ((tli * Bli) + (tst * Bst) + (tla * Bla)) / 1440$$

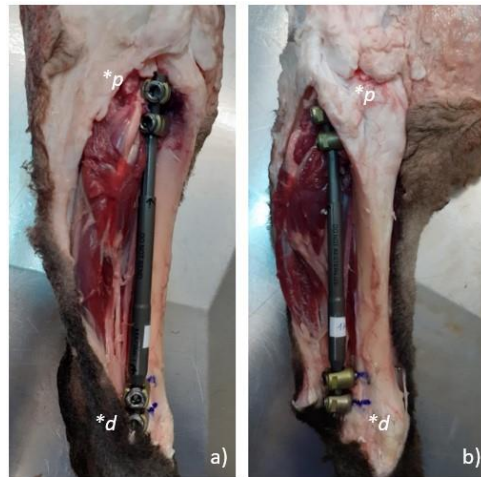
## 2.4 Statistische Methodik

Für die statistische Analyse wurde das Tabellenkalkulationsprogramm Excel (Microsoft Corporation, Redmond, WA, USA) verwendet. Die Volumina der  $\mu$ CT- und MRT-Läsionen und ihre Kontrollläsionen wurden in Excel mittels eines zweiseitigen t-Tests vom Typ zwei verglichen, das Signifikanzniveau wurde dabei auf  $p < 0,05$  festgelegt. Die Gangparameter der hinteren und teilweise auch vorderen Gliedmaßen wurden zusammengeführt und es wurden Mittelwert und Standardabweichung berechnet, sowie die Range (Minimalwert – Maximalwert) angegeben. Zur Erstellung von Graphen fand das Programm GraphPad (GraphPad Software, San Diego, CA, USA) Anwendung.

## 2.5 Versuch zur extramedullären Knochenverlängerung mit einem Fixateur interne (MAGEC® Implantat)

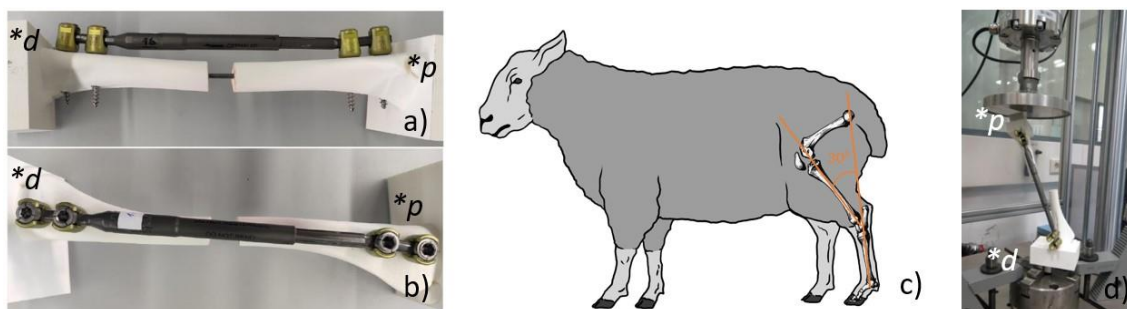
Ziel dieses Versuches war es – analog zur extramedullären Verlängerung mit einem intramedullären Kraftträger beim Kind als *off label use* (Dahl et al. 2020) – eine Verlängerung der Tibia beim Schaf mit einem ähnlichen Implantat, dem magnetisch zu steuernden MAGEC® (NuVasive, Aliso Viejo, USA) durchzuführen. Das hier verwendete Implantat der Firma NuVasive (MAGEC®, NuVasive, Aliso Viejo, USA) stammte aus einem/r Patient\*in, der/die dieses Implantat für die Stabilisierung der Wirbelsäule implantiert hatte. Es wurde nach ca. 2,5 Jahren explantiert, da die maximale Verlängerungsstrecke erreicht war. Das Implantat wies keine offensichtlichen Schäden auf. Das Implantat bestand aus einer Titanlegierung aus ca. >89% Titan, 6% Aluminium und 4% Vanadium (Yilgor et al. 2018). Das Implantatkonstrukt setzte sich zusammen aus einem 90 mm MAGEC® und vier Fixierschrauben (XIA, Stryker, Tuttlingen, Germany).

Vor Durchführung der Operation am lebenden Schaf wurde ein Cad Lab durchgeführt, bei dem das Implantat und dessen Positionierung probeweise an einem Schafkadaver getestet wurde (Abbildung 2.6). Dabei wurde neben der anatomischen Verankerung auch die Bedeckung mit Weichteilgewebe überprüft. Die entsprechenden anatomischen Winkel, sowie Stabilität und Bruchfestigkeit des Implantats wurden darüber hinaus berücksichtigt (Abbildung 2.7c).



**Abbildung 2.6 Probeweise Befestigung des MAGEC®-Implantats an Kadaver eines Schafbeins.** a) laterale; b) anterior-posteriore Ansicht. \*p = proximal; \*d = distal; Abbildungen aus Jäckle et al. (2020).

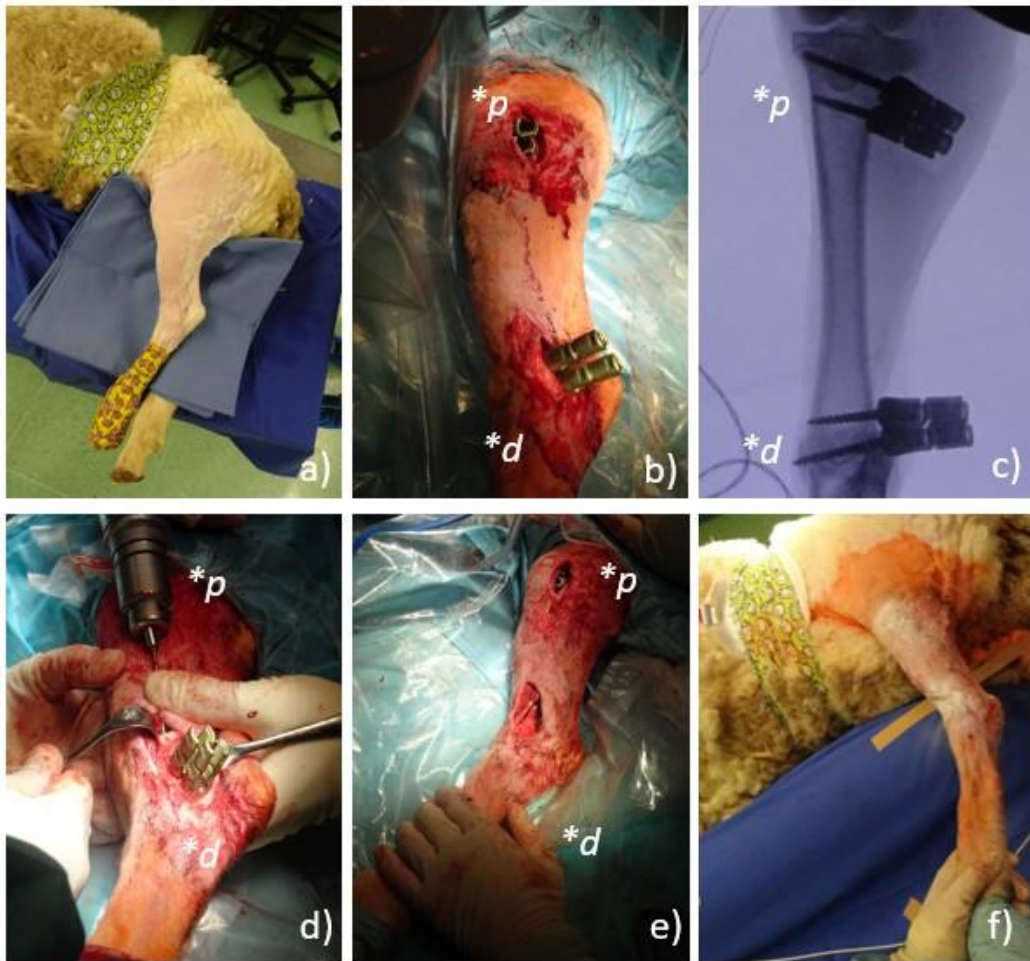
Im Anschluss erfolgte ein dynamischer Belastungstest des Implantats (Abbildung 2.7). Dieser wurde mit jeweils 100.000 Zyklen bei 100 N, 200 N, 300 N, 400 N und 500 N durchgeführt (Instron 8874, ÜWA 090000-0000-041).



**Abbildung 2.7 Versuchsaufbau für biomechanischen Test des MAGEC®-Implantats.** a), b) 3D-Modell einer Schafstibia mit intramedullärem K-Draht, XIA Schrauben und magnetischem Implantat; c) eingezeichneter Winkel der Tibia und des Implantats unter anatomischen Verhältnissen am stehenden Schaf. Verwendung der Abbildung mit freundlicher Genehmigung von Lukas Weig; d) eingespanntes Implantat während biomechanischem Belastungstest. \*p = proximal; \*d = distal. Bilder zum Teil publiziert in Jäckle et al. (2020).

Vor Beginn des ca. 90-minütigen operativen Eingriffs wurde auf eine zwölfstündige Nahrungskarenz des Schafes geachtet. Permanenter Zugang zu frischem Trinkwasser war gegeben. Es erfolgte eine Prämedikation mit 5 mg Midazolam/Schaf intravenös (i.v.) nach Legen eines Venenkatheters in die Vena cephalica antebrachii. Zur Einleitung wurden 4 – 6 mg/kg Propofol i.v. gegeben. Anschließend erfolgte die Intubation in Brustlage und das Legen einer Pansensonde. Die Narkose wurde erhalten mit 15 µg/kg/h Fentanyl und Isofluran 2,5 – 3%. Die Aufrechterhaltung des Flüssigkeitshaushaltes wurde durch balancierte Elektrolytlösung (Ringer-Lösung) in einem Volumen von 5 ml/kg/h sichergestellt. Das in Seitenlage positionierte Tier wurde am zu operierenden Hinterbein rasiert (Abbildung 2.8a), mehrfach desinfiziert und steril abgedeckt.

Initial wurde eine kleine tibiale Inzision zur dorsalen Anbringung zweier distaler Schrauben durchgeführt. Dies sorgte für eine optimale Weichteilabdeckung. Mithilfe eines weiteren Schnittes konnten weiter proximal zwei Schrauben platziert werden. Die zu setzenden Schrauben wurden jeweils mit 3,5 mm Bohrhülsen und 4,5 mm Schrauben mit bikortikaler Fixierung vorgebohrt (Abbildung 2.8b). Es erfolgte eine radiologische Kontrolle der korrekten Schraubenlage in zwei Ebenen (Abbildung 2.8c). Vor Einbau des Verlängerungsstabs wurde dessen Funktionalität überprüft. Es folgte eine Tunnelung des Weichteilgewebes. Die Bestimmung der optimalen Höhe der Osteotomie erfolgte durch Anlegen des Verlängerungsstabes am Schienbeinknochen. 2 cm proximal der distalen Schrauben wurde der Knochen osteotomiert mithilfe vorgebohrter 2 mm Löcher und querer Durchmeißelung des Knochens. Der Schutz des umgebenden Gewebes wurde dabei durch Zuhilfenahme von Homann-Haken gesichert. Die endgültige Einsetzung des MAGEC®-Stabs erfolgte nach Achsenstabilisierung mittels K-Draht (Abbildung 2.8d) und Funktionstestung in situ. Es zeigte sich eine gute Weichteildeckung (Abbildung 2.8e). Der Wundverschluss erfolgte mit resorbierbaren Intrakutannähten (Abbildung 2.8f). Zur postoperativen Analgesie wurden dem Schaf 0,01 mg/kg Buprenorphin intramuskulär (i.m.) und 4 mg/kg Carprofen subkutan (s.c.) verabreicht.



**Abbildung 2.8 Ablauf der Operation.** a) Seitlich gelagertes Schaf nach Rasur des linken Beins; b) Proximal und distal angebrachte Schrauben mit a.p. Röntgenkontrolle (c); d) Einbringung eines intramedullären K-Drahtes zur Achsenstabilisierung; e) Proximale und distale Schnitte mit guter Weichteildeckung bei eingebrachtem Implantat; f) linkes Bein nach Wundverschluss. \*p = proximal; \*d = distal; Bilder publiziert in Jäckle et al. (2020).

Eine Kontrolle der richtigen Lage des Implantats erfolgte mittels Röntgenbildes. Dafür wurde ein portables Röntgengerät (X-R Portable 20 BT lite, Examion Nord GmbH, Cloppenburg) verwendet und eine Röntgenaufnahme im anterior-posterioren und lateralen Strahlengang bei Spannungen von 60 kV und einer Strahlenmenge von 1,8 mAs durchgeführt. Anschließend erfolgte eine Ausleitung des Schafes aus der Narkose. Photographisch dokumentiert wurde die Operation mit einer digitalen Videokamera (DSC-HX80, Sony Corporation, Tokyo, Japan).

## 2.6 Versuch zur Thermoablation an Wachstumsfugen eines Leinelamms

Die Beine eines nach der Geburt verstorbenen Lamms wurden entnommen. Nach der Anfertigung von MRT und  $\mu$ CT-Bildern wurden sie bei  $-4^{\circ}\text{C}$  gelagert. Die Thermoablation fand am darauffolgenden Tag statt. Nach der Lagerung des ersten Beines in Seitenlage (Abbildung 2.9a) wurde ein Hautschnitt gemacht und das Gewebe freipräpariert bis zur Knochenfreilegung (Abbildung 2.9b). Ein besonderes Augenmerk lag dabei auf den Wachstumsfugen, welche durch eine dunklere Färbung makroskopisch sichtbar waren. An der lateralen Seite der Wachstumsfuge wurde mithilfe der Elektrodenspitze eine erste Markierung gesetzt (Abbildung 2.9c).



**Abbildung 2.9 Ablauf der Thermoablation.** a) Lagerung des linken Hinterbeins; b) Präparation bis zum Knochen; c) Markierung der Wachstumsfuge mittels Elektrodenspitze. \*p = proximal; \*d = distal.

Die Lageüberprüfung erfolgte durch Anfertigung von Röntgenbildern. Zur Verfügung stand dafür ein C-Bogen (Ziehm Vision RFS 3D, Ziehm Imaging GmbH, Nürnberg), welcher mit den Einstellungen von 44 kV, 60,5 mA, 18% Pulsweite, 12 Pulse/s,  $4,93 \text{ cGycm}^2$  verwendet wurde. Die entstandenen Aufnahmen dienten zur Sicherstellung der korrekten Markierung der Wachstumsfuge. Bei Bedarf wurde die Lage korrigiert und weitere Röntgenbilder angefertigt. Im Anschluss wurde die Elektrode an der markierten Stelle auf die Elektrodenspitze gesteckt.

Im nächsten Schritt wurde eine Erdungselektrode am distalen Ende der Extremität angebracht. Für die Dauer von einer Minute kam es nun zur punktuellen Anwendung von 80 Watt monopolarer Strom an der vorher markierten Stelle (ERBE Hochfrequenzchirurgiegerät ICC 350; ERBE monopolarer Elektrodengriff) (Abbildung 2.10a). Die Elektrodenspitze wurde dabei ca. einen halben Zentimeter tief eingeführt (Abbildung 2.10b).





**Abbildung 2.10 Material zur Thermoablation.** a) Hochfrequenzchirurgiegerät mit den gewählten Einstellungen; b) Elektrodenspitze. Der rote Pfeil markiert die Einkerbung bei 5 mm, bis zu der die Spitze in den Knochen eingeführt wurde.

Da die Manipulation der Wachstumsfuge an zwei Stellen geplant war, wurde im Anschluss eine zweite Stelle markiert, lateral der Ersten. Die Lage wurde wie zuvor überprüft und es erfolgte eine weitere punktuelle Ablation durch die Elektrodenspitze. Zum Schluss wurden die beiden Einstichstellen durch Anbringung eines mittigen Knotens markiert (Abbildung 2.11). Nach demselben Protokoll wurde an den Wachstumsfugen des distalen Radius links und rechts sowie dem distalen Femur, der proximalen und der distalen Tibia der Hinterbeine vorgegangen.



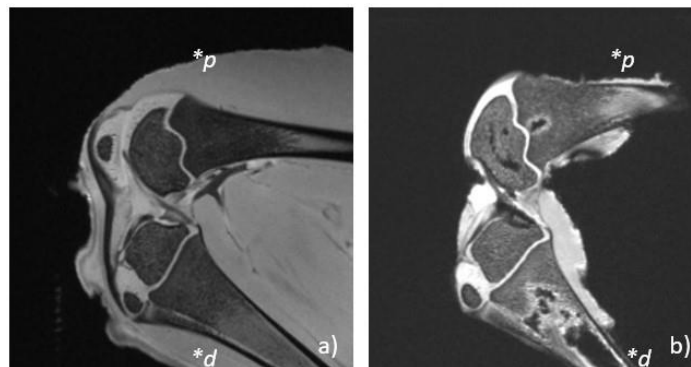
**Abbildung 2.11 Distale Tibia hinten links nach der Thermoablation.** Markierung der Einstichstelle (rote Pfeile) durch eine mittige Einzelknopfnah.

### 2.6.1 MRT

Je ein Tag vor und nach der Thermoablation wurden MRT-Bilder angefertigt. Die MRT-Bilder wurden an einem 3-Tesla MRT (Magnetom Skyra, Siemens, Erlangen) erstellt und benutzten eine 16-Kanal-Flex-Spule (Variety, Noras, Höchberg). Nach der Lagerung und Fixierung der Knochen wurden zuerst Übersichtssequenzen gefahren. Grundlage war ein standardisiertes Scanprotokoll für Hand/Ellenbogen am Kind.

Die Evaluation der Bilder beinhaltete T2- (TR 17,00 ms, TE 5,67 ms, 25° Flipwinkel) und PD-gewichtete 3D-Gradientenechosequenzen (TR 1100 ms, TE 39 ms). Die Schichtdicke

betrug 0,4 mm und der Distanzfaktor 20%. Die Quantifizierung der Läsionen nach der Thermoablation erfolgte mit dem Programm Syngo.via (Siemens Healthcare GmbH, Erlangen). Die sichtbaren Veränderungen der Gewebestrukturen wurden in PD- und T2-Gewichtung als *Volume of Interest* markiert, wodurch eine Berechnung des Volumens erfolgte. Dabei wurde zur Auswertung der Mittelwert zweier gemessener Werte ermittelt. Die Ausbreitung war hierbei in großem Umfang sichtbar, sowohl in der Wachstumsfuge als auch im Knochenmark (Abbildung 2.12).



**Abbildung 2.12** Sagittale MRT-Bilder des linken Knies in T2-Gewichtung: a) vor Thermoablation; b) nach Thermoablation, mit sichtbaren Veränderungen im Knochengewebe. \*p = proximal; \*d = distal.

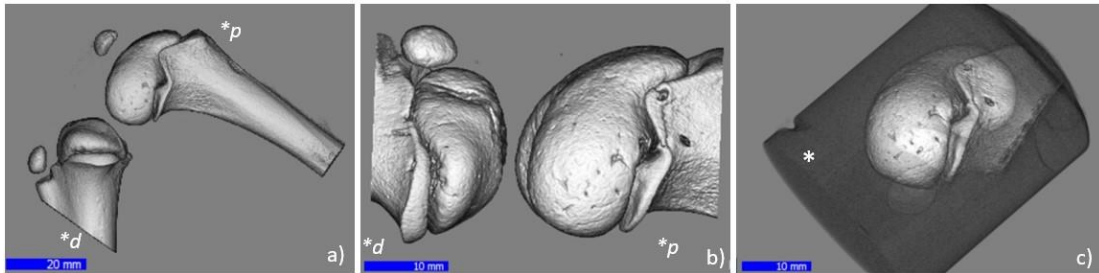
### 2.6.2 Mikro-Computertomographie ( $\mu$ -CT)

Vor und nach der Thermoablation sowie nach der Einbettung in Kunstharz wurden  $\mu$ CT-Aufnahmen an den Schafknochen im Bereich der Wachstumsfugen vorgenommen (Tabelle 2.1). Das dafür verwendete  $\mu$ CT System QuantumFX (Perkin Elmer, Hamburg) wurde mit den in Tabelle 2.1 aufgeführten Parametern genutzt. Die resultierenden Volumendatensätze wurden mit der 3D Rendering- und Analysesoftware Scry (v7.0, Kuchel & Sautter GbR, Bad Teinach-Zavelstein) analysiert.

**Tabelle 2.1** Parameter der  $\mu$ CT-Aufnahmen des Systems QuantumFX (Perkin Elmer, Hamburg).

	Vor Ablation	Nach Ablation	In Kunstharz
<b>Röhrenspannung [kV]</b>	90	90	90
<b>Röhrenstrom [<math>\mu</math>A]</b>	200	180	200
<b>Bildfeld [mm<sup>2</sup>]</b>	73x73	40x40	40x40
<b>Aufnahmezeit [min]</b>	2	2	2
<b>Auflösung [<math>\mu</math>m]</b>	~140	~80	~80

Zur Erstellung der  $\mu$ CT-Aufnahmen wurde das Knochenstück in eine Probenhalterung gelegt, fixiert und zentral im Scanschacht positioniert. Da die Auflösung in diesem System durch geometrische Vergrößerung erzielt wird, d.h. für eine hohe Auflösung muss die Röntgenröhre dicht an das Objekt gefahren werden, konnte präoperativ nicht die gleiche Auflösung von  $80\ \mu\text{m}$  erreicht werden, da das Volumen des Präparats zu groß war (Abbildung 2.13).



**Abbildung 2.13 Vergleich der drei  $\mu$ CT-Aufnahmen.** Hier am Beispiel des linken Femurs. a) vor Thermoablation; b) nach Thermoablation; c) nach Einbettung in Kunstharz (\*). \*p = proximal; \*d = distal.

Bei der quantitativen Auswertung der sichtbaren Läsionen wurde mit den Messinstrumenten der Analysesoftware gearbeitet. Das im Knochen mit der Elektrodenspitze veränderte Gewebe entsprach von seiner Form her einem Zylinder mit elliptischer Grundfläche. Diese Erkenntnis wurde genutzt, um das Volumen der sichtbaren Veränderung zu messen. Mit Bestimmung der Koordinaten eines Punktes an Grundfläche ( $p_1[x_1 \ y_1 \ z_1]$ ) und Spitze des Zylinders ( $p_2[x_2 \ y_2 \ z_2]$ ) konnte die Höhe (h) durch folgende Formel berechnet werden:

$$h = \sqrt{(x_1 - x_2)^2 + (y_1 - y_2)^2 + (z_1 - z_2)^2} * ps$$

Die Pixelgröße (ps) betrug hierbei 0,08 mm.

Für die Berechnung der ellipsenförmigen Grundform wurden an je drei Positionen längs der Zentrallinie des Zylinders die große und kleine Hauptachse (a und b) der ellipsenförmigen Fläche vermessen und deren Mittelwert ( $\bar{a}$  und  $\bar{b}$ ) errechnet. Das Gesamtvolumen (V) des Zylinders ergab sich dann aus:

$$V = \pi \bar{a} \bar{b} h$$

Des Weiteren wurde der minimale und maximale Abstand der sichtbaren Läsion zur Wachstumsfuge vermessen.

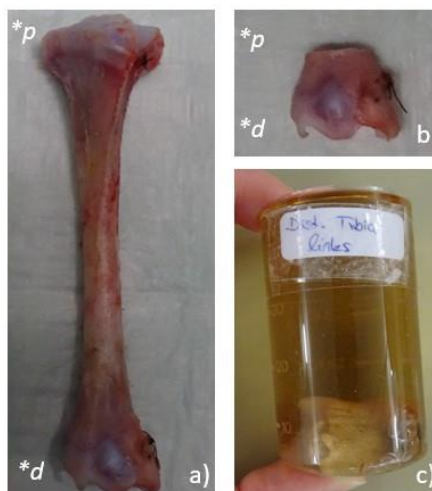
### 2.6.3 Histologie

Zur Erstellung der histologischen Proben wurde ein für die Einbettung von Rattenknochen vorhandenes Protokoll an die Schafsknochen angepasst und verfolgt. Im ersten Schritt wurden dabei die relevanten Knochenabschnitte präpariert. Anschließend erfolgte die Einbettung in Technovit® (Technovit® 9100; Heraeus Kulzer GmbH; Wehrheim). Danach wurden die optimalen Schnittebenen ermittelt und markiert. Dafür wurde die Einbindung der erstellten  $\mu$ CT-Bilder in den Prozess etabliert. Die darauffolgende Schneidung der eingebetteten Technovit®-Blöcke erfolgte in Sicherheitsabstand zu den eingezeichneten Ebenen. Aus diesen scheibenförmigen Abschnitten wurden im nächsten Schritt die histologischen Schnitte mittels Lasermikrotom (TissueSurgeon 2D, LLS ROWIAK LaserLabSolutions, Hannover) erstellt. Zum Schluss erfolgten die Färbung und mikroskopische Begutachtung der Schnitte.

#### 2.6.3.1 Einbettung der Knochenstücke

Die von den Gliedmaßen abgetrennten Knochenstücke wurden von der Haut befreit. Alle Gelenke wurden exartikuliert und die Weichteile entfernt (Abbildung 2.14a). Die relevanten Knochenabschnitte wurden in der Länge gekürzt, sodass die Wachstumsfugen von einem ca. zwei Zentimeter messenden Rand umgeben waren (Abbildung 2.14b).

Die für die Histologie vorhergesehenen Proben wurden nach der Präparation in einer 4%igen Formaldehydlösung für sieben Tage fixiert. Anschließend wurden im einwöchigen Takt die Lösungen ausgetauscht, sodass die formalinfixierten Präparate in folgender Reihenfolge entwässert und fixiert wurden: 70% Ethanol, 80% Ethanol, Ethanol absolut, Xylol, Xylol und Basislösung, Basislösung, Präinfiltration, Infiltration. Als Einbettmedium wurde ein Kunststoffeinbettssystem auf Methyl-Methacrylate(MMA)-Basis (Technovit® 9100; Heraeus Kulzer GmbH; Wehrheim) verwendet (Abbildung 2.14c). Nach Aushärtung in einem Kühlfach bei  $-20^{\circ}\text{C}$  wurden von den Technovit®-Blöcken  $\mu$ CT Aufnahmen gemacht. Wie diese Bilder zur Erstellung von histologischen Schnitten an der gewünschten Stelle beitragen, wird im Ergebnisteil weiter ausgeführt.



**Abbildung 2.14 Schritte der histologischen Einbettung.** Dargestellt an linker Tibia des Leinlamms: a) exartikulierter und von Haut befreiter Tibiaknochen; b) Knochenstück mit distaler Wachstumsfuge; c) in Technovit® 9100 eingebetteter Block. \*p = proximal; \*d = distal.

Das für die endgültigen Schnedungen verwendete Lasermikrotom basiert auf der Fokussierung eines Femtosekundenlasers durch den Objektträger in eine definierte Tiefe in die Probe. Dabei entsteht eine lokale Schockwelle, die zu einem Riss im Material führt. Durch Abrastern des gesamten Querschnittes der aufgeklebten Probe kann dann ein vollständiges Auftrennen erreicht werden. Der erzielte Schnitt verbleibt somit auf dem Objektträger und das Restmaterial kann nach erneutem Polieren weiter geschnitten werden. Da der Laserfokus elliptisch ist besitzt der erzielte Schnitt eine gewisse Oberflächenrauheit und muss daher vor der histologischen Färbung poliert werden.

Es wurden je drei aufeinanderfolgende Schnitte an einer ausgewählten Ebene erstellt. Wenn möglich, wurden an einem Block alle zwei bis vier Läsionen angeschnitten. Des Weiteren erfolgte ein Kontrollschnitt, in einem Zentimeter Entfernung zu einer der geschnittenen Ebenen. Die Schnittdicke wurde mit einer Digital-Messschraube (293-821-30, Mitutoyo Deutschland GmbH, Neuss) kontrolliert und bei Bedarf mit einer Trenn-Schleifmaschine (Trenn-Schleifsystem 400, Exakt, Micra Grinding Systems, Oklahoma City, USA), geschliffen. Vor dem Färben wurden alle Schnitte für fünf Minuten poliert (Trenn-Schleifsystem 400, Exakt, Micra Grinding Systems, Oklahoma City, USA).

#### 2.6.3.2 Färbungen

Einer der drei pro Läsion angefertigten Schnitte wurde als Übersichtsfärbung mit Hämatoxylin-Eosin (HE) gefärbt. Das dafür verwendete Protokoll stammte von der Firma LLS ROWIAK (Hannover).

### Bewässerung

- 2x30 min in Mix aus 1:1 Methylmetacrylate (MMA)/Xylene (MMA, Merck KGaA, Darmstadt; Xylene, Carl Roth GmbH + Co. KG; Karlsruhe)
- 5 min in 99% Ethanol (Carl Roth GmbH + Co. KG; Karlsruhe)
- 5 min in 75% Ethanol (Carl Roth GmbH + Co. KG; Karlsruhe)
- 5 min in 60% Ethanol (Carl Roth GmbH + Co. KG; Karlsruhe)
- 5 min in demineralisiertem Wasser

### Färbung

- 60 min in Mayer's Hematoxylin (Carl Roth GmbH + Co. KG; Karlsruhe)
- 10 min unter laufendem Leitungswasser
- 10 min in Eosin-Phloxine-Lösung, in 2-Propanol (Morphisto GmbH, Offenbach am Main)

### Entwässerung

- 30 Sekunden (s) in: 75% Ethanol (Carl Roth GmbH + Co. KG; Karlsruhe)
- 2 min in 99% Ethanol (Carl Roth GmbH + Co. KG; Karlsruhe)
- 1 min in Xylene (Carl Roth GmbH + Co. KG; Karlsruhe)

### Einbettung

- Histokitt II (Carl Roth GmbH + Co. KG; Karlsruhe, Germany)

Für alle weiteren Schnitte wurden die Lösungen *Sanderson-Rapid-Stain* und *Van-Gieson-Counterstain* nach Protokoll von LLS ROWIAK genutzt. Dabei wurde die *Sanderson-Rapid-(Bone)-Stain(SRS)*-Lösung (Dorn & Hart Microedge Inc.; Alabama, USA) in einem Wasserbad auf 60°C erhitzt. Ein bis drei Tropfen wurden per Pipette auf das Präparat gegeben, sodass der Schnitt vollkommen bedeckt war. Nach 20 min wurde die SRS-Lösung mit demineralisiertem Wasser abgewaschen und abgetrocknet. Anschließend wurde der Schnitt für 45 s mit Van-Gieson-Lösung (Carl Roth GmbH + Co. KG; Karlsruhe) bedeckt und wie im vorigen Schritt abgewaschen und getrocknet. Der Objektträger wurde in Xylen (Carl Roth GmbH + Co. KG; Karlsruhe) getunkt und mittels Histokitt II (Carl Roth GmbH + Co. KG; Karlsruhe) und Deckgläschen (Menzel GmbH, Braunschweig) eingedeckt.

Die histologischen Schnitte wurden gemustert, wobei die Wachstumsfugen, sowie die sichtbaren Läsionen und das umgebende Gewebe im Fokus standen. Musterung und Fotografie der histologischen Bilder erfolgte bei 0,63- bis 5-facher Vergrößerungen am Leica

---

MZ75 (Leica Mikrosysteme Vertrieb GmbH, Wetzlar). Bei bis zu 40-fachen Vergrößerungen wurde das Mikroskop Leitz DMRXE (Leica Mikrosysteme Vertrieb GmbH, Wetzlar) genutzt. In beiden Fällen erfolgte die Verwendung des Computerprogramms LAS V4.7 (Leica Application Suite Software, Leica Mikrosysteme Vertrieb GmbH, Wetzlar).

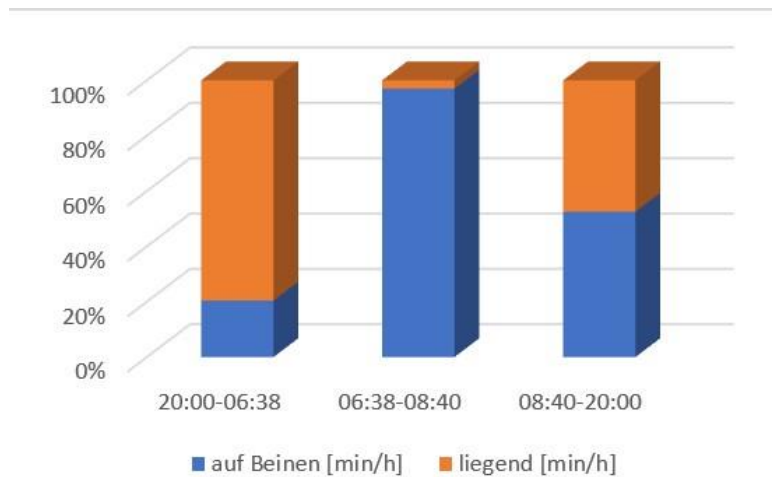
### 3 Ergebnisse

#### 3.6 Präoperative Anwendung des Scoring Sheets und Aktivitätsprotokolls

Für die Beurteilung des Wohlergehens der Versuchstiere wurde ein Scoring Sheet erstellt, welches den grundsätzlichen gesundheitlichen Zustand und die Wundheilung abfragte und ggf. Handlungen initiieren sollte. Das Scoring Sheet mit den nicht auf die Wundheilung bezogenen Kriterien konnte nur einmalig angewendet werden. Es diente der Gewöhnung an den Ablauf sowie der Erfassung des Zustandes vor Operation. Der einwandfreie Gesundheitszustand der Schafe ( $n = 8$ ) vor der Operation konnte bestätigt werden. Keines der Schafe zeigte dabei Auffälligkeiten, abgesehen von der anfänglichen Diarrhoe der Versuchstiere, welcher nach zweimaliger Wurmkur effektiv begegnet werden konnte. Der durchschnittlich gemessene Puls der acht Schafe betrug  $104 \pm 27$  ( $72 - 156$ ) Schläge pro Minute [Normwert  $100 - 116/\text{min}$  (Deinhofer und Stöger 2019)]. Die Atemfrequenz lag im Mittel bei  $123 \pm 44$  ( $68 - 200$ ) Atemzügen pro Minute [Normwert  $20 - 40/\text{min}$  (Deinhofer und Stöger 2019)] und die gemessene Temperatur bei  $39,85 \pm 0,65$  ( $39,1 - 41,2$ ) Grad Celsius [Normwert  $38,5 - 40,0^\circ\text{C}$  (Deinhofer und Stöger 2019)]. Die gemessenen Werte der Atemfrequenz und Temperatur einiger Schafe lagen über den Normwerten. Dies ist durch den Stress der Tiere in der neuen Umgebung und durch die beim Einfangen entstandene Aufregung vor der Messung zu erklären. Ein Versuchsschaf musste nach der Operation euthanasiert werden, bevor eine weitere Anwendung des Scoring Sheets stattfinden konnte.

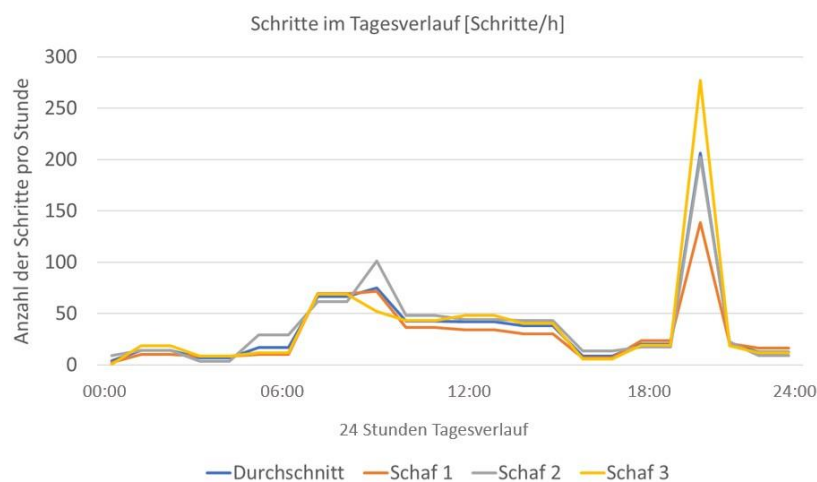
Die Analyse der Aktivität der Schafe ( $n = 3$ ) zeigte einen konstanten Tagesrhythmus. Alle Schafe waren besonders in den Morgenstunden zwischen 6:38 und 8:40 Uhr aktiv und verbrachten 95% der Zeit auf den Beinen, während dies in der Nacht (20 bis 6:38 Uhr) nur 20% war (Abbildung 3.1). Die maximale Aktivitätszeit korrelierte mit der Fütterung durch die Tierpfleger\*innen. Die nächtlichen Bewegungen der Schafe bestanden hauptsächlich aus dem Aufsuchen von und Niederlegen an einem neuen Schlafplatz im Stall. Tagsüber waren die Aktivitäten davon geprägt, einen guten Platz an den Futtertrögen zu bekommen.





**Abbildung 3.1 Darstellung der im Liegen und Stehen verbrachten Zeit der Versuchstiere (n = 3).** Durchschnittliche Zeit (in min/h) der Versuchstiere, die im Liegen (orange) oder auf den Beinen (blau) im Stall verbracht wurde, aufgeteilt in drei Zeitfenster im Laufe von 24h.

Eine weitere Analyse der Aktivität der beobachteten Schafe (n = 3) wurde durch die Zählung der Schritte möglich. Dabei wurde eine höhere stündliche Schrittzahl zu Zeiten der Fütterung am Morgen und Abend beobachtet (Abbildung 3.2). Die vielen Schritte pro Stunde entstanden durch das Umherlaufen im Stall und Wechseln des Ortes, an dem sie sich niederlegten. Auch Verhaltensweisen, die dem Autogrooming zuzuordnen sind, wie Schrubben am Zaun oder der Wand des Stalls, waren Ursachen für die Bewegung der Tiere. Besonders viele aufeinanderfolgende Schritte in kurzem Zeitraum konnten bei Auseinandersetzungen mit anderen Tieren beobachtet werden. So zeigten sich Spitzenwerte von 277 Schritten pro Stunde bei einem der Schafe (Nummer 3). Der Durchschnittswert im abendlichen Intervall betrug 206 Schritte pro Stunde (n = 3).

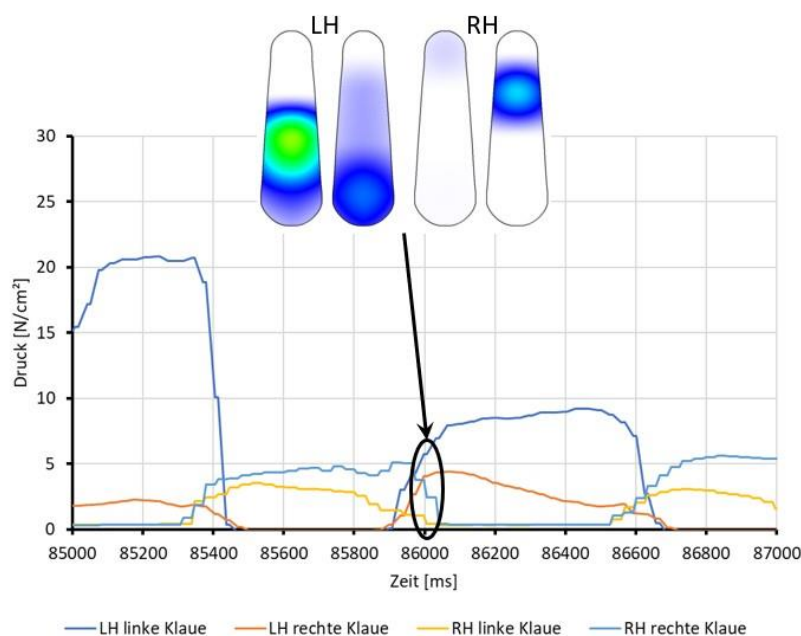


**Abbildung 3.2 Im Tagesverlauf gezählte Schrittzahl pro Stunde.** Bei den Versuchstieren (n = 3) zeigte sich eine Tagesdynamik u. a. aufgrund der morgend- und abendlichen Fütterungen.

## 3.7 Klauendruckmessungen

### 3.7.1 Sensoren am Schuh ungeeignet für Klauendruckmessungen

Neben den Aktivitätszeiten und der Anzahl der Schritte, war besonders die einzelne Klauenbelastung von Interesse, um zu ermitteln, wie viel Belastung ein Implantat aushalten müsste. Anhand der vier Sensoren pro Klaue, wurden Druckmuster und ihre Verteilung über die Zeit aufgezeichnet und anschließend gemessenen Drücke ( $\text{N}/\text{cm}^2$ ) und deren Verteilung farbkodiert angezeigt. Blau stand dabei für niedrigere, rot für höhere Drücke (Abbildung 3.3). In den ersten Messungen zeigte sich eine stärkere Belastung der äußeren Klaue eines jeden Hinterbeines.



**Abbildung 3.3 Darstellung der gemittelten Drücke je Klaue (Diagramm).** Aufgrund der unterschiedlich kalibrierten Sensoren stellen die Drücke nur Relativ- und keine Absolutwerte dar, weshalb keine Rückschlüsse auf den realen Druck möglich sind. RH = rechtes Hinterbein; LH = linkes Hinterbein.

Allerdings zeigte sich, dass in zwei Fällen die Sensoren und in einem die Schuhe ( $n = 16$ ) nicht die ganze Messzeit über wie gewünscht an den Klauen hafteten, weshalb drei der sieben Messungen frühzeitig abgebrochen werden mussten. Dies konnte durch die Verlängerung der Andruckzeit nach Ausspritzung der Schuhe mit Impresil und Kontrolle der Befestigung der Sensoren sowie der lockeren, spannungsfreien Fixierung der Sensorkabel verbessert werden. Bei der weiteren Auswertung der Sensordaten musste festgestellt werden, dass mit dieser Messmethode lediglich einzelne Belastungsszenarien abgebildet werden konnten. Eine

Aussage über die reale Belastung war nicht möglich, da die Sensoren keine vergleichbaren und reproduzierbaren absoluten sowie relativen Daten liefern konnten. Da dies eine obligate Voraussetzung für den Vergleich und die Bewertung der Belastung zwischen den Gliedmaßen darstellte, war diese Methode zur Klauendruckmessung nicht geeignet. Um die realen Belastungen und somit auch die Absolutwerte zu bestimmen, wurde daher im Folgeversuch zur Druckbelastung der Klauen bzw. der Schafextremitäten eine Sensormatte verwendet.

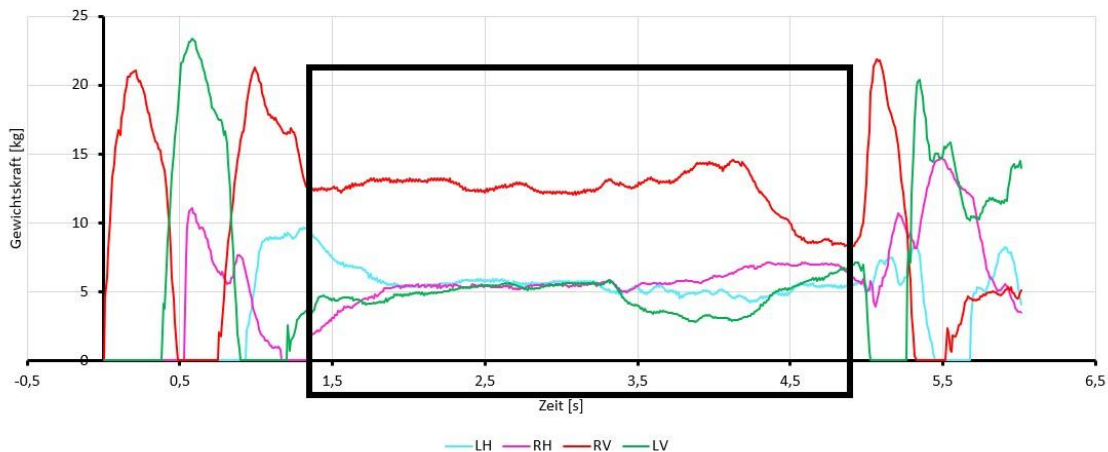
### 3.7.2 Klauendruckmessungen mit Walkway Gangstrecke und Berechnung der tagesdurchschnittlichen Belastung

Die Walkway Gangstrecke ermöglichte eine zeitgleiche Messung aller vier Beine, ohne dass zwischen der inneren und äußeren Klaue differenziert wurde. Die Validierung des Messsystems erfolgte anhand von drei Messungen bei drei stehenden Schafen (Schafe 1, 2, 3). Die Summe der per Sensormatte gemessenen Einzelkräfte entsprach dabei approximativ dem mit der analogen Waage gemessenen Gewicht in kg (Tabelle 3.1). Damit wurde die Genauigkeit der Sensoren validiert und die Walkway Gangstrecke konnte für die folgenden Messungen verwendet werden.

**Tabelle 3.1 Per analoger Waage und Sensormattenmessung ermitteltes Gewicht der Schafe [kg].**

	<b>M ± SD</b>	<b>Range</b>	<b>Analoge Waage</b>
<b>Schaf 1</b>	27,25 ± 0,46	26,57 – 28,3	28
<b>Schaf 2</b>	18,95 ± 0,68	17,74 – 20,37	21
<b>Schaf 3</b>	28,94 ± 0,23	28,39 – 29,53	29

Zur Abbildung der Belastungen der Schafsklauen wurden die gemessenen Werte in drei Stadien ausgewertet. Im Stehen konnten die Belastungen bei drei Schafen gemessen werden. Die Messung der Standphase eines Schafes (Nummer 3) ist in Abbildung 3.4 zu sehen. Auf der x-Achse ist die Zeit über sechs Sekunden dargestellt, wobei der Zeitraum, in dem das Schaf stillstand, nur ca. dreieinhalb Sekunden betrug. Auf der y-Achse ist die Gewichtskraft in Kilogramm ablesbar. In dieser Standphase des 29 kg wiegenden Schafes wurde das rechte Vorderbein mit ca. 12,5 kg am stärksten belastet, während die anderen drei Beine gleichmäßiger mit ca. 5 kg belastet wurden.



**Abbildung 3.4 Graphische Darstellung einer Standphase von Schaf 3.** Markierung des analysierten Abschnittes mit schwarzem Kasten. RH = rechtes Hinterbein; LH = linkes Hinterbein; RV = rechtes Vorderbein; LV = linkes Vorderbein.

Für eine Vergleichbarkeit der gemessenen Werte wurden die Kräfte in Prozent des Körpergewichts (%KG) der jeweiligen Schafe (n = 3) angegeben (Tabelle 3.2). Insgesamt wurde das rechte Vorderbein durchschnittlich mit 30,85%KG belastet. Das linke Vorderbein zeigte eine Belastung von 22,74%KG, wobei eine hohe Standardabweichung für die stark individuellen Werte der einzelnen Messungen spricht. Die Hinterbeine wurden mit 20,56%KG und 20,69%KG durchschnittlich etwa gleich stark belastet.

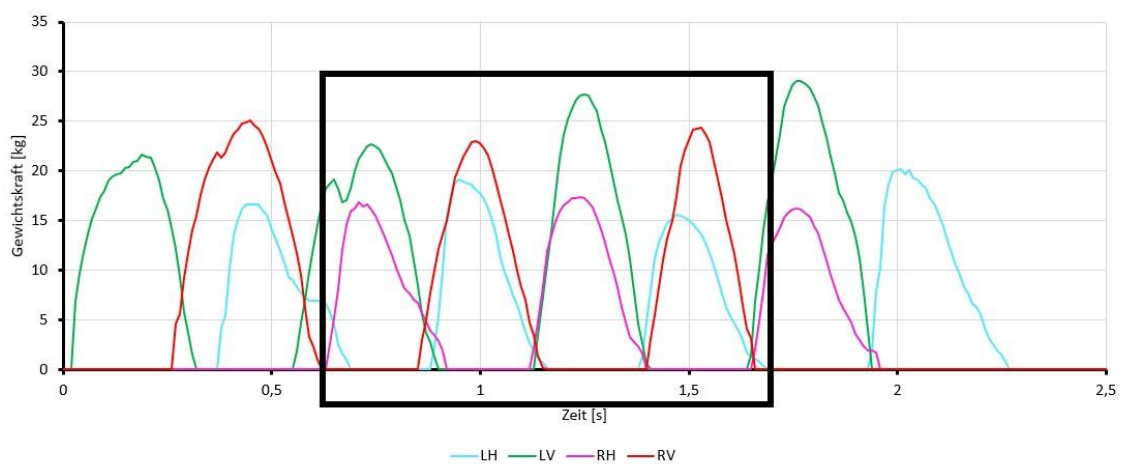
**Tabelle 3.2 Durchschnittliche Belastung der Beine im Stehen bezogen auf das Körpergewicht [%KG].**

RH = rechtes Hinterbein; LH = linkes Hinterbein; RV = rechtes Vorderbein; LV = linkes Vorderbein.

	Schaf 1	Schaf 2	Schaf 3	Durchschnitt
	M ± SD	M ± SD	M ± SD	M ± SD
<b>RH</b>	28,15 ± 4,28	14,9 ± 2,35	19,02 ± 2,35	20,69 ± 5,54
<b>LH</b>	17,29 ± 7,47	25,2 ± 8,53	19,18 ± 8,53	20,56 ± 3,38
<b>RV</b>	19,32 ± 9,66	30,84 ± 1,99	42,28 ± 1,99	30,82 ± 9,37
<b>LV</b>	32,51 ± 8,45	19,34 ± 6,04	16,37 ± 6,04	22,74 ± 17,74

Eine gleichmäßige Belastung der Hinterbeine zeigte sich auch bei den Messungen der Schafe im Laufen. Während den Messungen konnten die Tiere in ihrem eigenen Tempo über die

Sensormatte laufen und es wurden alle komplett aufgenommenen Schrittzyklen ausgewertet. In Abbildung 3.5 ist die Zeit in Sekunden gegen die gemessene Gewichtskraft in kg aufgetragen. In der graphischen Darstellung, in der zur Übersichtlichkeit alle vier Beine dargestellt wurden, zeigte sich das gleichmäßige Gangbild, bei dem jeweils das rechte Vorder- und linke Hinterbein oder das linke Vorder- und rechte Hinterbein gemeinsam auftraten. Die Beine wurden dabei abwechselnd für 0,3 s belastet. In dem hier gezeigten Beispiel lastete auf den Vorderbeinen jeweils mehr Gewicht. In den Spitzenwerten des 29 kg wiegenden Schafs war dabei ein Unterschied von bis 3 bis 13 kg zu sehen.



**Abbildung 3.5 Graphische Darstellung zweier Gangzyklen von Schaf 3.** Auswertung der Kräfte auf den Hinterbeinen bei zwei Schritten (schwarzer Kasten). RH = rechtes Hinterbein; LH = linkes Hinterbein; RV = rechtes Vorderbein; LV = linkes Vorderbein.

Die Auswertung der durchschnittlich gemessenen Gewichtskräfte im Laufen beschränkte sich in dieser Arbeit auf die Hinterbeine, da dies die relevantesten Daten für die Übertragung auf ein Tibia-Implantat waren. Die insgesamt bis zu acht auswertbaren Schritten pro Schaf zeigten eine gleichmäßige Verteilung des Gewichts auf die Hinterbeine (Tabelle 3.3). Das rechte Hinterbein wurde durchschnittlich mit 37,59%KG und das linke Hinterbein mit 35,25%KG belastet. Das ist ein über 10% höherer Wert des prozentualen Körpergewichts im Vergleich zu den gemessenen Daten der Hinterbeine in der Standphase.

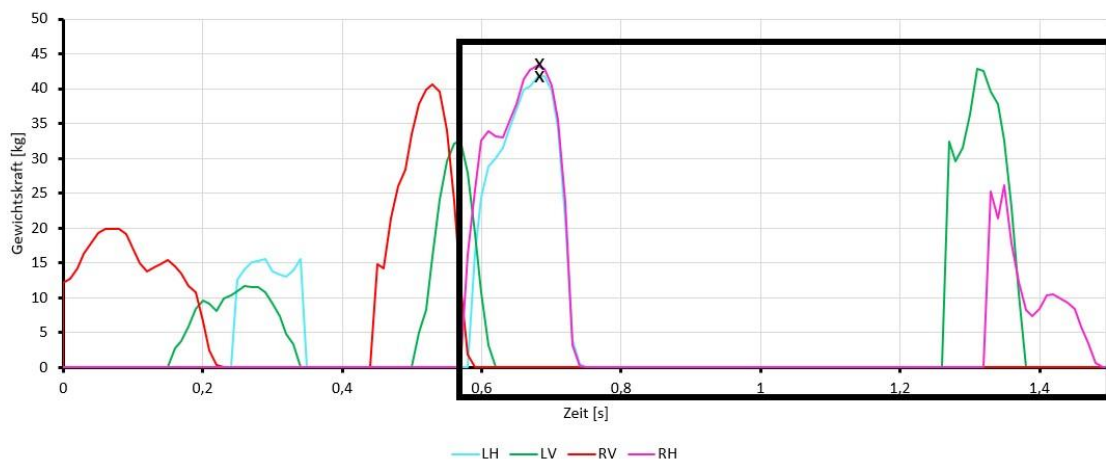
**Tabelle 3.3 Durchschnittliche Belastung der Hinterbeine im Laufen bezogen auf das Körpergewicht [%KG].**

RH = rechtes Hinterbein; LH = linkes Hinterbein.

		Schaf 1	Schaf 2	Schaf 3	Schaf 4	Schaf 5
<b>Schritt 1</b>	<b>RH</b>	55,83	34,83	37,36	37,5	37,24
	<b>LH</b>	47,02	37,04	31,49	44,37	21,94
<b>Schritt 2</b>	<b>RH</b>	47,13	36,17	29,08	38,16	41,11
	<b>LH</b>	38,99	39,41	31,89	32,4	37,5
<b>Schritt 3</b>	<b>RH</b>	34,54	49,51	38,24	41,47	
	<b>LH</b>	41,36	41,8	37,1	43,32	
<b>Schritt 4</b>	<b>RH</b>	31,94	32,98	32,65	34,37	
	<b>LH</b>	37,22	42,15	30,5	5,54	
<b>Schritt 5</b>	<b>RH</b>	42,96		24,48		
	<b>LH</b>	50,94		28,69		
<b>Schritt 6</b>	<b>RH</b>	30,51		37,19		
	<b>LH</b>	45,66		33,39		
<b>Schritt 7</b>	<b>RH</b>			29,61		
	<b>LH</b>			28,12		
<b>Schritt 8</b>	<b>RH</b>			27,8		
	<b>LH</b>			30,81		
<b>M ± SD</b>	<b>RH</b>	40,48 ± 9,07	38,37 ± 6,53	32,05 ± 4,79	37,87 ± 2,52	
	<b>LH</b>	43,53 ± 4,77	40,1 ± 2,06	31,5 ± 2,65	31,41 ± 15,66	
<b>Durchschnitt M ± SD</b>	<b>RH</b>	<b>37,59 ± 2,91</b>				
	<b>LH</b>	<b>35,25 ± 5,51</b>				

Noch höhere Belastungen wurden bei Erfassung der Maximalbelastungen der Hinterbeine im Sprung sichtbar. Exemplarisch wurde ein Sprung von Schaf 1 in Abbildung 3.6

dargestellt. Nach kurzen, aber starken Belastungen der Vorderbeine wurde das Gewicht auf die Hinterbeine verlagert. Die gemessene Gewichtskraft steigerte sich dabei bei diesem 28 kg schweren Schaf auf ein Maximum von ca. 42 kg pro Hinterbein. Die anschließende abrupte Entlastung der Hinterbeine stellte den Absprung dar. Auf der x-Achse ließ sich eine Flugzeit von ca. einer halben Sekunde ablesen. Nach dem Sprung landete das Schaf in diesem Fall auf dem linken Vorder- und rechten Hinterbein. Die komplette Landung konnte meist nicht aufgezeichnet werden, da die Schafe gegen Ende der Matte hochsprangen und die Beine nicht immer alle auf dem Messbereich der Sensormatte landeten.



**Abbildung 3.6 Graphische Darstellung eines Sprungs von Schaf 1.** Der schwarze Rahmen markiert den analysierten Zeitraum mit Auswertung der Maximalbelastung der Hinterbeine (x). RH = rechtes Hinterbein; LH = linkes Hinterbein; RV = rechtes Vorderbein; LV = linkes Vorderbein.

Während sich in diesem Beispiel beim Absprung eine gleichmäßige Verteilung der Kräfte auf die Hinterbeine zeigte, wurden bei Betrachtung aller gemessener Werte einzelne Tendenzen zur stärkeren Belastung eines Hinterbeines deutlich (Tabelle 3.4). Die maximal gemessene Differenz betrug dabei 31,07%KG. Die insgesamt maximal auf einem Hinterbein lastende Gewichtskraft betrug 149,29%KG. In den Durchschnittswerten zeigte sich eine mittlere Belastung des rechten Hinterbeins von 95,46%KG, während das linke Hinterbein durchschnittlich mit 108%KG stärker belastet wurde.

**Tabelle 3.4 Maximalbelastungen der Hinterbeine im Sprung bezogen auf das Körpergewicht [%KG].**

RH = rechtes Hinterbein; LH = linkes Hinterbein.

		Schaf 1	Schaf 2	Schaf 3	Schaf 4	Schaf 5	Durchschnitt
<b>Sprung 1</b>	<b>RH</b>	72,75	105,61	135,31	71,1	114,6	
	<b>LH</b>	75,34	94,5	125,62	80,61	83,53	
<b>Sprung 2</b>	<b>RH</b>		77,36	85,41	80,51	106,65	
	<b>LH</b>		83,82	76,69	88,71	114,96	
<b>Sprung 3</b>	<b>RH</b>		102,93		66,61	100,86	
	<b>LH</b>		137,57		94,54	114,53	
<b>Sprung 4</b>	<b>RH</b>		154,64		88,41		
	<b>LH</b>		149,29		92,85		
<b>Mittelwert ± SD</b>	<b>RH</b>		110,13 ± 27,96		76,66 ± 5,79	107,38 ± 5,64	95,46 ± 17,02
	<b>LH</b>		116,29 ± 23,23		89,18 ± 4,95	104,34 ± 14,72	108,26 ± 27,65

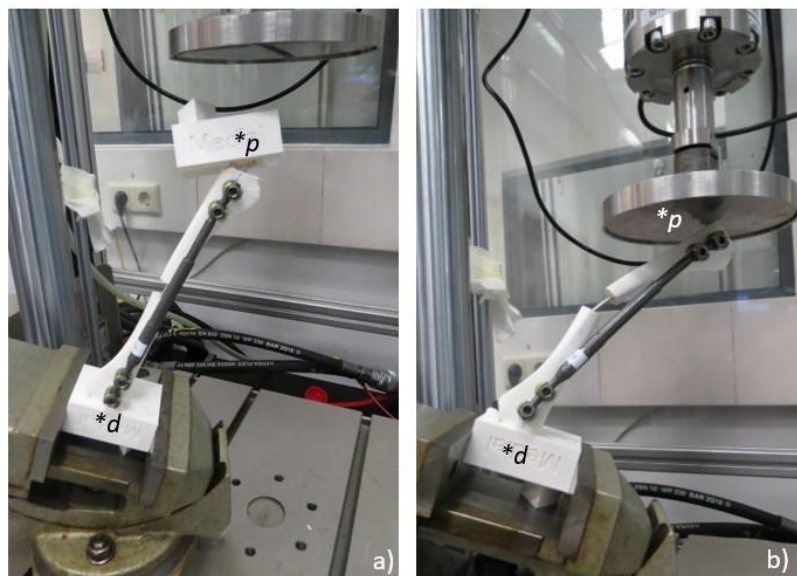
Die Daten aus der Verhaltensbeobachtung und den Klauendruckmessungen wurden synergistisch genutzt, um eine durchschnittliche Belastung der Hinterbeine an einem Tag zu berechnen. Aus der durchschnittlichen Belastung im Liegen (808,2 min\*0%KG), Stehen (625,5 min\*6,65%KG) und Laufen (6,1 min\*11,75%KG) bei einem durchschnittlichen Gewicht von 32,35 kg resultierte auf den Tag berechnet (1440 min) eine Belastung des Hinterbeins von 2,94 kg/min.

### **3.8 MAGEC®-Implantat: biomechanischer Test und Operation**

Die ermittelte dauerhafte Belastung der Hinterbeine des Schafes waren zum Zeitpunkt der Operation mit dem MAGEC®-Implantat noch nicht bekannt. Um eine grundsätzliche Stabilität des Implantats zu gewährleisten, wurde dieses präoperativ einer biomechanischen, dynamischen Belastungstestung unterzogen. Hierbei wurden jeweils 100.000 Zyklen bei 100 N, 200 N, 300 N, 400 N und 500 N durchgeführt. Bei Kräften von 100 N bis 400 N konnten keine Veränderungen oder Beeinträchtigungen des MAGEC®-Implantats

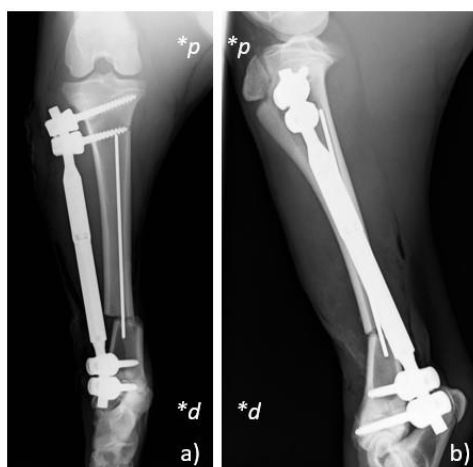


festgestellt werden (Abbildung 3.7a). Bei 500 N wurde allerdings eine plastische Verformung des K-Drahts im 3D-gedruckten Modell der Schafstibia sichtbar (Abbildung 3.7b).



**Abbildung 3.7 Biomechanischer Test des MAGEC®-Implantats.** a) eingespanntes Implantat während biomechanischer Belastungstestung mit 100 bis 400 Newton (N); b) Achsabweichung der Knochenfragmente und Verbiegung des intramedullären K-Drahts bei 500 N. \*p = proximal; \*d = distal.

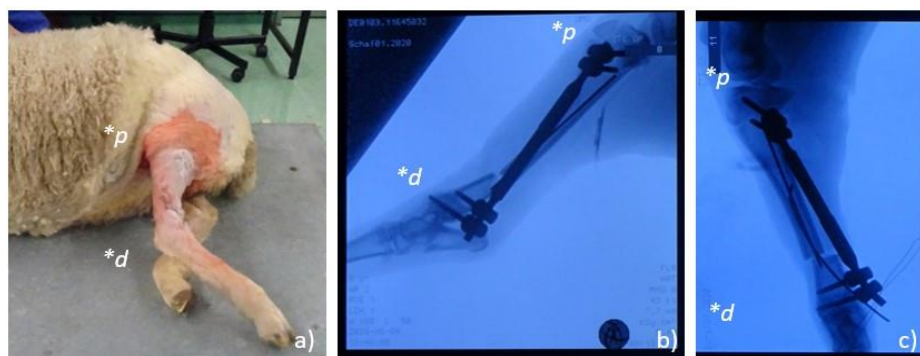
Die Operation mit Anbringung des Implantats verlief ohne Komplikationen. In den postoperativ angefertigten Röntgenbildern sah man das Implantat wie gewünscht am Knochen befestigt (Abbildung 3.8).



**Abbildung 3.8 Postoperative Röntgenaufnahme des MAGEC®-Implantats an linker Tibia.**

a) anterior-posteriore Aufnahme; b) laterale Aufnahme. \*p = proximal; \*d = distal; Bilder zum Teil publiziert in Jäckle et al. (2020).

Als das Schaf nach Erwachen aus der Narkose erstmals versuchte aufzustehen, konnte das operierte Bein der entstehenden Rotationsbelastung postoperativ nicht standhalten und dislozierte (Abbildung 3.9a). Das Tier wurde umgehend wieder in Narkose versetzt. Bei der radiologischen Kontrolluntersuchung waren weder Anzeichen eines Implantat- noch Knochenbruchs bzw. Implantatlockerungen festzustellen. Eine Rotation des Implantats war jedoch deutlich sichtbar, weshalb eine visuelle Inspektion vorgenommen wurde. Dabei konnte keine Defekte oder nicht befestigten Metallteile gefunden werden (Abbildung 3.9b). Sicherheitshalber wurde das Implantat ausgetauscht, die distale Verankerung mit neuen Schrauben gesichert und ein weiterer K-Draht intramedullär zur Stabilisierung eingebracht (Abbildung 3.9c). Bei manueller Überprüfung der Stabilität auf Rotationskräfte konnte keine Instabilität festgestellt werden. Nach Beendigung der Narkose konnte das Schaf jedoch weiterhin nicht die Extremität belasten und musste geopfert werden. Als Ursache des Scheiterns des Versuches muss die – anders als beim Menschen – stark vorhandene Rotationskraft auf den Knochen diskutiert werden. Eine sorgfältige Analyse von Knochen und Implantaten nach Exitus des Schafes erbrachten keine neuen Erkenntnisse.



**Abbildung 3.9** Postoperative Malrotation der linken Tibia. Sichtbar am Tier nach erstmaligem Aufstehen (a); Im Röntgenbild vor (b) und während (c) der chirurgischen Revision mit Metallaustausch und einem weiteren K-Draht zur zusätzlichen Stabilisierung.

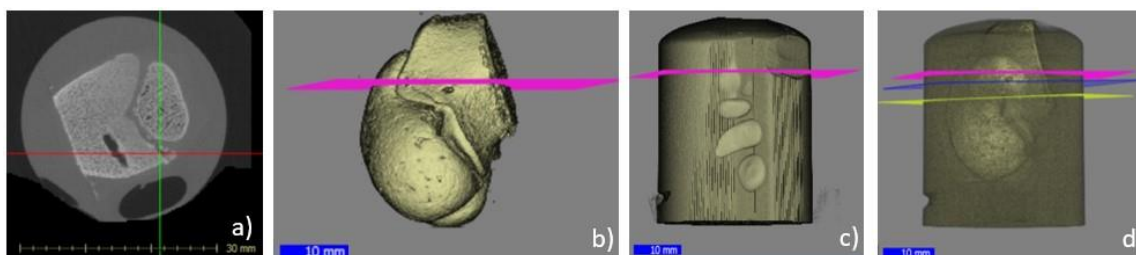
### 3.9 Thermoablation

Für die Studie zur Thermoablation der Wachstumsfuge konnten konventionelle radiologische Aufnahmen,  $\mu$ CT- und MRT Daten sowie histologische Schnitte ausgewertet und verglichen werden. Die Auswertung der MRT und  $\mu$ CT-Daten zeigte, dass durch die Thermoablation Läsionen im Knochen und der Wachstumsfuge hervorgerufen wurden, die in der Bildgebung und den histologischen Schnitten sichtbar waren. Anhand der Bilder konnte außerdem ausgewertet werden, wie oft die Wachstumsfuge mit der Elektrodenspitze

oder einer durch das Ausmaß der Hitze entstandenen Läsion getroffen wurde und welches Volumen die Läsionen einnahmen.

### 3.9.1 Erstellung histologischer Schnitte unter Einbeziehung der $\mu$ CT-Bildgebung

Für die Erstellung histologischer Schnitte der zur Thermoablation verwendeten Knochen, wurden nach der Einbettung primär  $\mu$ CT-Aufnahmen erstellt. Bei Durchschau der Schnittbilder des aus drei Ebenen gescannten Knochenstücks konnte man das später als histologischen Schnitt gewünschte Bild ermitteln. Dies charakterisierte sich durch den besten Anschnitt der zu zeigenden Läsion, des die Wachstumsfuge berührenden Anteils der gesetzten Läsion. Anhand der dreidimensionalen Darstellung der  $\mu$ CT-Bilder ließen sich virtuell Ebenen definieren, welche diese gewünschte Schnitteben markierten (Abbildung 3.10). Unter Berücksichtigung der Materialverluste beim Schneiden wurde die virtuelle Ebene jeweils mit einem Sicherheitsabstand von 0,5 mm gewählt.

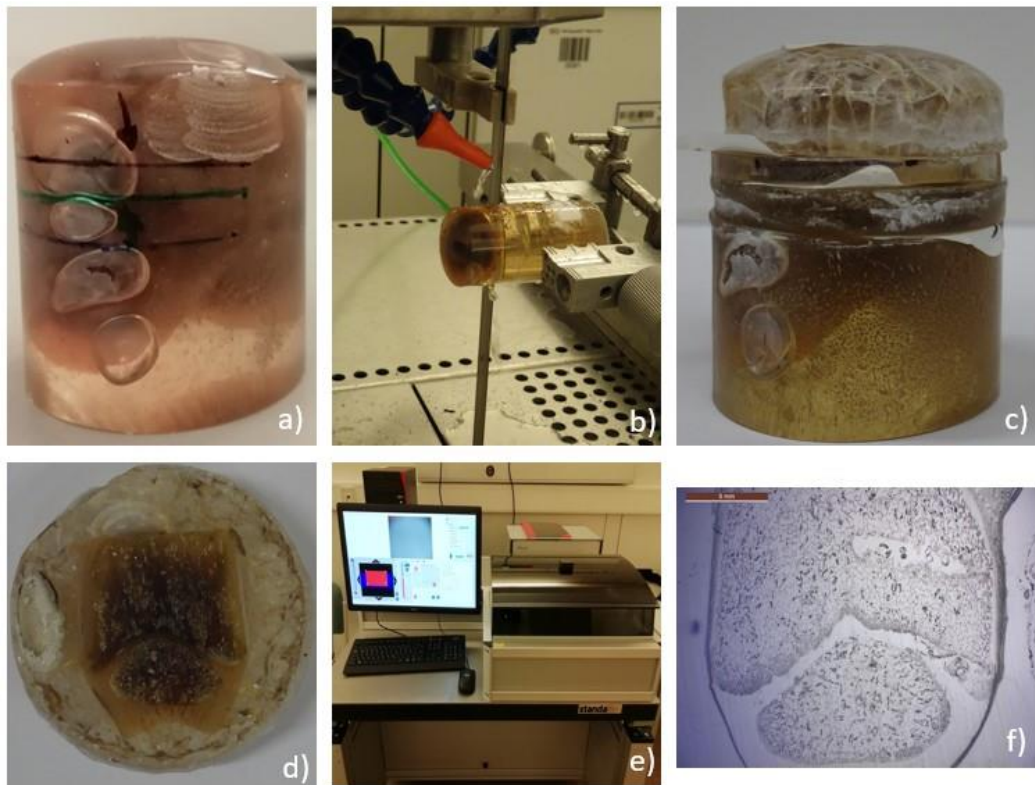


**Abbildung 3.10  $\mu$ CT-Bilder mit eingezeichneter, virtuell erstellter Schnittebene.** a) Schnittbild des linken Femurs in angedachter Schnittebene mit zwei sichtbaren Läsionen; b) angedachte Schnittebene am 3D-Bild der  $\mu$ CT-Aufnahme dargestellt; c) Schnittebene im Technovit®-Block; d) weitere Schnittebenen in Technovit®-Block. Maßstableiste 10 mm (b,c,d) und 30 mm (a).

Um diese Ebenen von der virtuellen Darstellung auf den Technovit®-Block mit dem Präparat zu übertragen, wurden an dem eingebetteten Block markante Stellen, wie Luftblasen genutzt. Außerdem waren vor der Anfertigung der Bilder oberflächliche Markierungen in Form von Linien und Kreuzen mit einem DREMEL Stylus Lithium-Ionen (DREMEL Europe, Bosch Power Tools B.V., Breda, Niederlande) in den eingebetteten Block gesetzt worden. Es erfolgte eine Abmessung der Strecken zwischen der virtuell gelegten Ebene und den Markierungen in dem zur Darstellung der  $\mu$ CT-Bilder verwendeten Programm. Mit den so gewonnen Informationen konnten die virtuell geplanten Schnittebenen mit Folienstiften auf den Technovit®-Blöcken markiert werden (Abbildung 3.11). Es bestätigte sich, dass die Stellen anhand der Markierungen wiedergefunden werden konnten und das vorherige

Anfertigen der  $\mu$ CT-Bilder und die Übertragung auf den Block, um die gewünschte Stelle zu schneiden, erfolgreich war.

Anschließend wurden die Präparate mit einem wassergekühlten Trennschleifsystem (Cut grinder, Walter Messner GmbH, Hamburg) entlang der markierten Ebenen aufgetrennt. Diese Schnittflächen wurden per Hand geschliffen und poliert (Schleifpapier P400, P1000 und P4000) und mittels Klebstoffes (LLS-Glue No.1, LLS ROWIAK LaserLabSolutions, Hannover) auf einem Objektträger (Histobond® Supa Mega Slides, Electron Microscopy Sciences, Hatfield, PA, USA) befestigt. Im Lasermikrotom (TissueSurgeon 2D, LLS ROWIAK LaserLabSolutions, Hannover) konnte davon jeweils ein Schnitt mit einer durchschnittlichen Dicke von 40  $\mu$ m gewonnen und per Hand von dem Block abgeklopft werden (Abbildung 3.11).



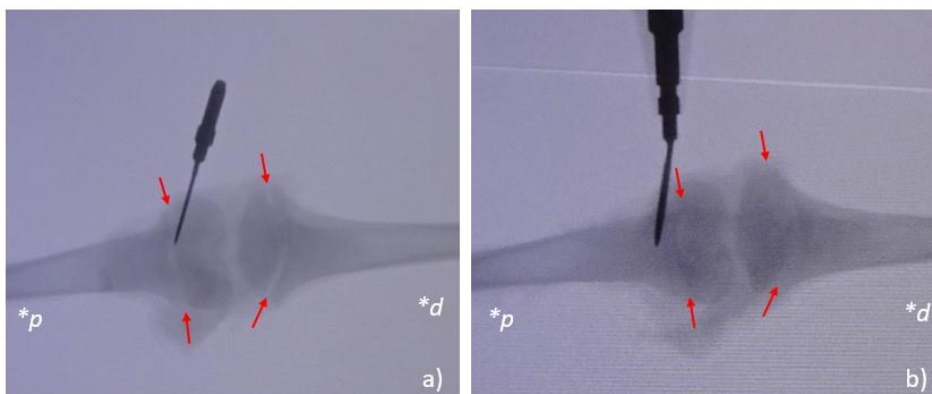
**Abbildung 3.11 Prozess der Erstellung histologischer Schnitte.** a) per Hand markierte Ebenen auf Technovit®-Block; b) Block zum Schneiden des Präparates in Diamant-Trenneinheit; c) an drei Ebenen durchtrennter Block, weiße Zettel zur Beschriftung der einzelnen Scheiben; d) Schnittfläche der eingezeichneten Ebene mit zwei Läsionen; e) verwendetes Lasermikrotom; f) histologischer Schnitt nach Polierung unterm Mikroskop bei 0,63-facher Vergrößerung. Maßstableiste 5 mm (f).

Die hiermit etablierte Methode zur Erstellung möglichst optimaler histologischer Schnitte lässt sich in Zukunft auch auf andere Bereiche anwenden. In der vorliegenden Studie wurde

sie genutzt, um die entstandenen Veränderungen in der Wachstumsfuge darzustellen. Denkbar ist allerdings auch die Verwendung zur Darstellung der Kallusbildung von Knochen nach Verlängerung durch ein Implantat wie beispielweise dem oben beschriebenen.

### 3.9.2 Treffsicherheit Wachstumsfuge

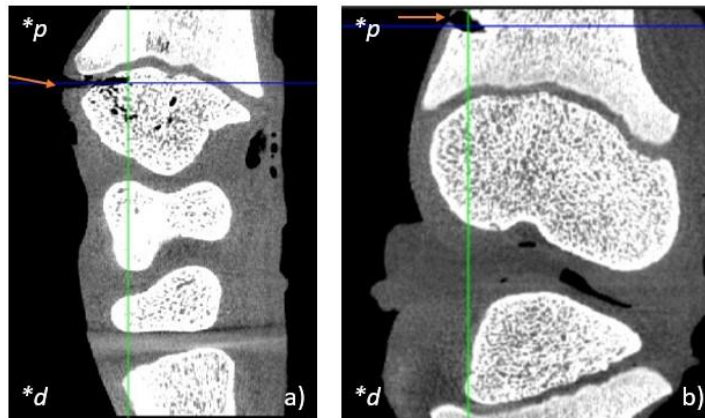
Die postoperative Bildgebung diente u. a. dazu zu bestimmen, ob die Wachstumsfuge mit der Elektrodenspitze getroffen wurde. Bei Anfertigung der Röntgenbilder intraoperativ sah es bei allen 16 Läsionen, die zur Thermoablation genutzt wurden, so aus, als ob die Wachstumsfuge getroffen wurde. Bei vier weiteren Einstichen war dies nach Beurteilung der Röntgenbilder nicht der Fall (Abbildung 3.12). Diese Einstiche wurden als Kontrollläsionen genutzt. Demnach wurden nach makroskopischer Begutachtung des Knochens beim Einstechen in 100%, nach Röntgenkontrolle in 80% der Einstiche die Wachstumsfuge getroffen.



**Abbildung 3.12 Röntgenbilder nach Markierung der Wachstumsfuge mittels Elektrodenspitze.**

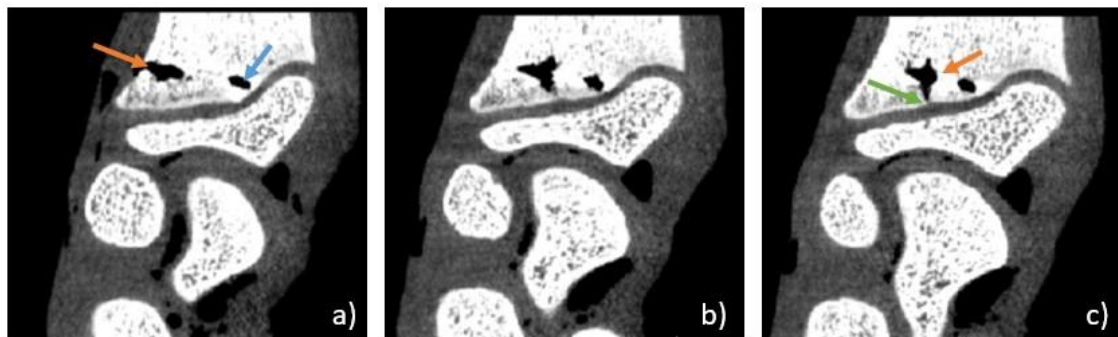
Wachstumsfuge (rote Pfeile) des linken Femurs. a) getroffen; b) nicht getroffen. Wachstumsfuge hier weniger eindeutig sichtbar; \*p = proximal; \*d = distal.

Bei Auswertung der  $\mu$ CT-Bilder zeigten sich in 12 von 16 (75%) der ablatierten Stellen Veränderungen in dem Bereich der Epiphysenfuge, die durch den Elektrodeneinstich verursacht wurden (Abbildung 3.13). Auch bei drei von vier der Stellen, an denen keine Hitze appliziert wurde, waren durch die Elektrodenspitze verursachte Läsionen in der Wachstumsfuge sichtbar (75%).



**Abbildung 3.13** µCT-Bilder mit durch die Elektrodenspitze verursachten Läsionen (orangene Pfeile). a) Wachstumsfuge getroffen (distaler Radius links, Läsion 2); b) Wachstumsfuge nicht getroffen (distales Femur rechts, Läsion 1). \*p = proximal; \*d = distal.

Die von der Läsion ausgehenden sichtbaren Gewebeveränderungen reichten bei zwei der vier Läsionen, bei denen die Elektrodenspitze die Wachstumsfuge nicht direkt getroffen hat (50%), bis zur Wachstumsfuge (Abbildung 3.14). Der vermessene mittlere Abstand der nicht getroffenen Läsionen von der Wachstumsfuge betrug  $2,73 \pm 1,49$  mm (0,89 – 4,69 mm).

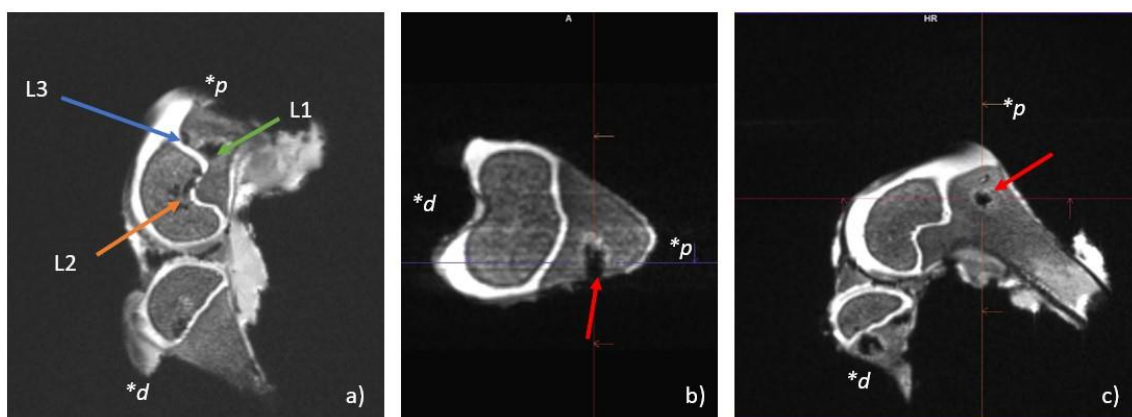


**Abbildung 3.14** µCT-Bilder mit sichtbaren Läsionen. Aufnahmen der distalen Tibia rechts: a) Läsion 1 (blauer Pfeil) und Läsion 2 (orangener Pfeil); b) Weiterverfolgung Läsion 2; c) die durch die applizierte Hitze verursachte Läsion erstreckt sich bis in Richtung Wachstumsfuge (grüner Pfeil). Läsion der Elektrodenspitze weiterführend in Richtung des orangenen Pfeils.

Zusammenfassend ließ sich feststellen, dass nach Beurteilung der µCT-Bilder 87,5% (14/16) der thermoablatierten Läsionen einen Effekt auf die Wachstumsfuge zeigten. In 75% wurde dabei die Fuge direkt mit der Elektrodenspitze getroffen. Bei den Kontrollläsionen zeigten 75% durch Einstich mit der Elektrodenspitze eine Veränderung des Gewebes in der Wachstumsfuge. Veränderungen im Knorpel der Wachstumsfuge war allerdings nicht bei

allen Läsionen sichtbar, teilweise zeigten sich die Veränderungen nur im epi- und metaphysären Knochengewebe.

Die Auswertung der MRT-Bilder mit der Fragestellung nach der Treffsicherheit der Wachstumsfuge erfolgte weniger differenziert im Vergleich zur Betrachtung der  $\mu$ CT-Bilder. Hier waren die Läsionen im Gewebe nicht immer klar der Elektrodenspitze zuzuordnen. Vielmehr konnten grundsätzliche Gewebeveränderungen als Ganzes wahrgenommen werden. Solche Gewebeveränderungen waren in 15 von 16 Fällen der zur Thermoablation genutzten Einstichstellen zu sehen (93,75%). Bei den Kontrollläsionen waren nur drei von vier im MRT einzeln sichtbar. Diese hatten immer die Wachstumsfuge getroffen (100%). Insgesamt hatten demnach 18 der auswertbaren 19 Einstiche mit der Elektrodenspitze eine Veränderung in der Wachstumsfuge hervorgerufen (94,74%) (Abbildung 3.15). Der mittlere Abstand der nicht getroffenen Läsion von der Wachstumsfuge betrug 4,35 mm.



**Abbildung 3.15** MRT-Bilder mit sichtbaren Läsionen in T2-Gewichtung: a) sagittales Schnittbild mit drei Läsionen, die die Wachstumsfuge getroffen hatten (distales Femur links). Läsion (roter Pfeil) in coronarer (b) und sagittaler (c) Schnittebene sichtbar, welche die Wachstumsfuge nicht berührte (distales Femur rechts).

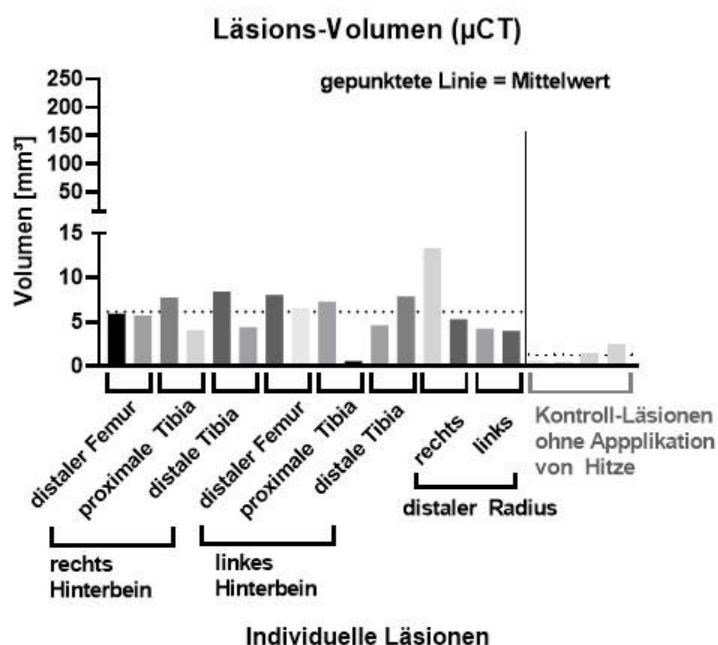
\*p = proximal; \*d = distal.

### 3.9.3 Volumen der in MRT- und $\mu$ CT-Bildern sichtbaren Läsionen

Die Messung der Volumina der Läsionen konnte mit den Messtools der Computerprogramme Syngo.via für die MRT-Bilder und Scry für die  $\mu$ CT-Bilder durchgeführt werden. Das Ausmaß der sichtbaren Läsionen war erwartungsgemäß sehr unterschiedlich in beiden Bildgebungsformen. Auf den  $\mu$ CT-Bildern war hauptsächlich die im Knochen oder Knorpel entstandene Läsion der Elektrodenspitze sichtbar und für Messungen zu verwenden. Es erfolgte daher eine alleinige Messung dieser zylinderförmigen

Läsion und rechnerische Ermittlung des Volumens. Im MRT konnten auch Läsionen der Wachstumsfuge erfasst werden.

Es zeigte sich ein signifikanter Größenunterschied ( $p < 0,01$ ) zwischen den Volumina der Thermoablation ( $n = 16$ ) und der Kontrollläsionen ( $n = 4$ ) im  $\mu$ CT. Während die hitzeablatierten Läsionen ein durchschnittliches Volumen von  $6,14 \pm 2,71 \text{ mm}^3$  ( $0,55 - 13,35 \text{ mm}^3$ ) hatten, war das bei den Kontrollvolumen gemessene Volumen im Schnitt nur  $1,31 \pm 0,82 \text{ mm}^3$  ( $0,5 - 2,56 \text{ mm}^3$ ) groß (Abbildung 3.16). Der gemessene mittlere Abstand zur Wachstumsfuge betrug bei den Läsionen im Durchschnitt  $1,12 \pm 1,04 \text{ mm}$  ( $0 - 4,69 \text{ mm}$ ) und bei den Kontrollläsionen  $2,39 \pm 1,94 \text{ mm}$  ( $0,24 - 4,36 \text{ mm}$ ).

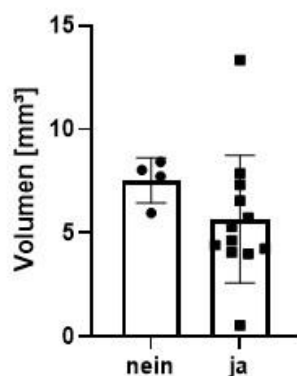


**Abbildung 3.16** Volumen der mittels  $\mu$ CT gemessenen Läsionen ( $n = 20$ ). Die Lage der Läsionen ist an der x-Achse, das Volumen der Läsionen [ $\text{mm}^3$ ] an der y-Achse aufgetragen. Die gepunktete Linie zeigt den Durchschnittswert. Auf der rechten Seite Darstellung der Kontrollläsionen ( $n = 4$ ) in hellen Grautönen. Zwischen den Läsionen und Kontrollläsionen konnte ein signifikanter Größenunterschied festgestellt werden ( $p < 0,01$ ).

Bei Auswertung der  $\mu$ CT-Daten konnte außerdem festgestellt werden, dass das Volumen der Läsionen unabhängig davon war, ob die Wachstumsfuge getroffen wurde oder nicht. Eine Erklärung für die Variabilität war nicht festzustellen (Abbildung 3.17).



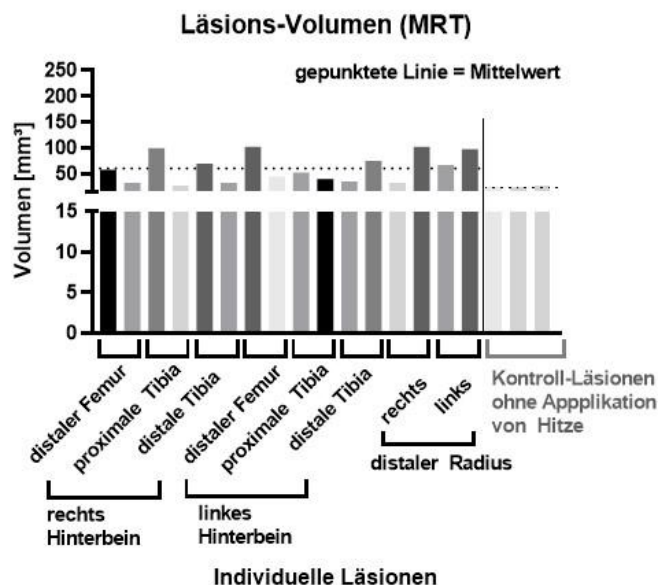
### Läsions-Volumen ( $\mu$ CT) Wachstumsfuge getroffen vs. nicht getroffen



**Abbildung 3.17 Keine Abhängigkeit von Läsionsgröße in Bezug auf Treffsicherheit der Wachstumsfuge sichtbar.** Auf der y-Achse sind die im  $\mu$ CT gemessenen Volumen aufgetragen [mm<sup>3</sup>], auf der x-Achse, ob die Wachstumsfuge mit der Elektrodenspitze direkt getroffen wurde oder nicht.

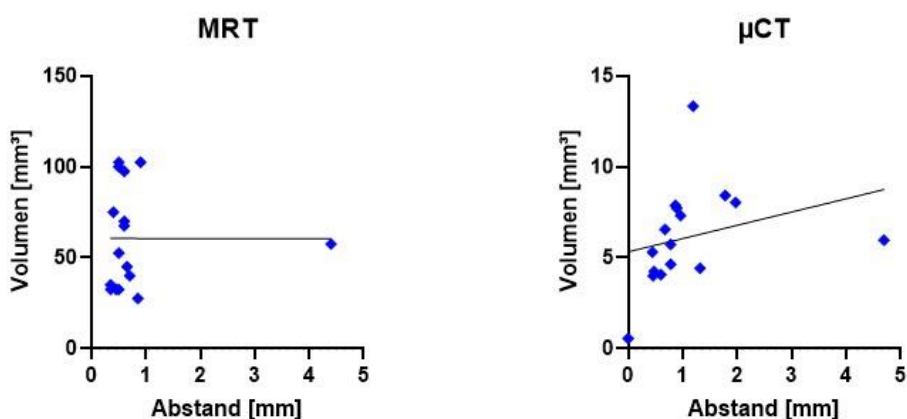
Auf den MRT-Bildern war die zylinderförmige Läsion der Elektrodenspitze nicht immer eindeutig erkennbar. Es fanden sich grundsätzlich größere Gewebeeränderung rund um die Einstichstelle der Elektrodenspitze, welche sich teilweise auf das angrenzende Knochengewebe ausweiteten. Eine direkte Korrelation der gemessenen Volumina in MRT und  $\mu$ CT-Bildern war daher nicht möglich.

Die im MRT gemessenen Volumina hatten bei den Kontrollläsionen ( $n = 3$ ) ein durchschnittliches Volumen von  $25,83 \pm 1,18 \text{ mm}^3$  ( $25 - 27,5 \text{ mm}^3$ ), während die hitzeapplizierten Läsionen ( $n = 16$ ) im Durchschnitt signifikant größeres Volumen ( $p < 0,05$ ) von  $60,63 \pm 26,96 \text{ mm}^3$  ( $27,5 - 102,5 \text{ mm}^3$ ) umfassten (Abbildung 3.18). Der gemessene mittlere Abstand zur Wachstumsfuge betrug bei den Läsionen im Durchschnitt  $0,8 \pm 0,94 \text{ mm}$  ( $0,35 - 4,4 \text{ mm}$ ) und bei den Kontrollläsionen  $0,55 \pm 0,31 \text{ mm}$  ( $0,2 - 0,95 \text{ mm}$ ).



**Abbildung 3.18** Volumina der mittels MRT gemessenen Läsionen (n = 19). Die Lage der Läsionen ist an der x-Achse, das Volumen der Läsionen [mm<sup>3</sup>] an der y-Achse aufgetragen. Die gepunktete Linie zeigt den Durchschnittswert. Auf der rechten Seite sind die Kontrollläsionen zu sehen (n = 3). Zwischen den Läsionen und Kontrollläsionen konnte ein signifikanter Größenunterschied festgestellt werden (p<0,05).

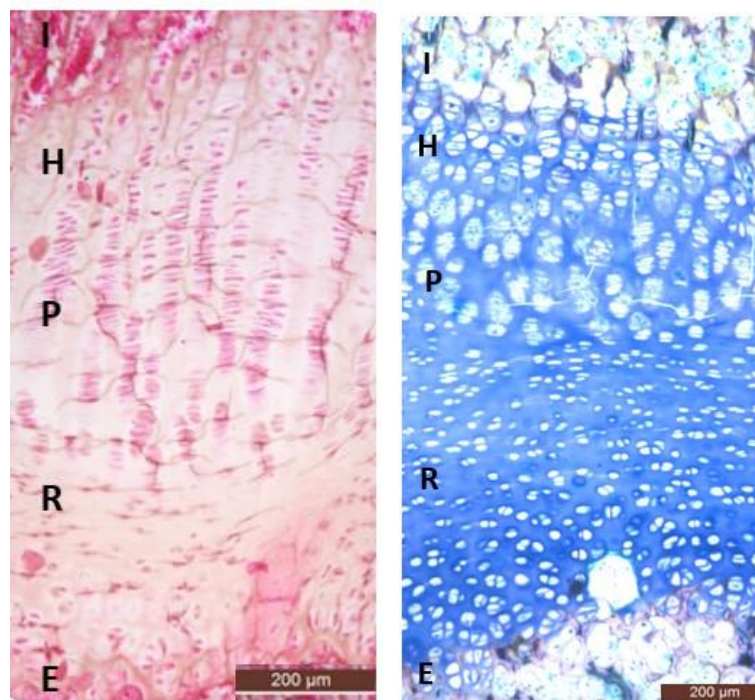
Eine Korrelation zwischen dem mittleren Abstand der Elektrodenspitze zur Wachstumsfuge und dem gemessenen Läsionsvolumen zeigte sich weder zu den  $\mu$ CT- noch zu den MRT-Daten (Abbildung 3.19).



**Abbildung 3.19** Zusammenhang zwischen den Volumina und der Entfernung zur Wachstumsfuge in MRT- und  $\mu$ CT-Messungen. Es besteht keine Korrelation zwischen dem gemessenen Volumen in  $\mu$ CT/MRT [mm<sup>3</sup>], hier auf der y-Achse, und der mittleren Distanz des Einstichkanals zur Wachstumsfuge [mm], hier auf der x-Achse aufgetragen.

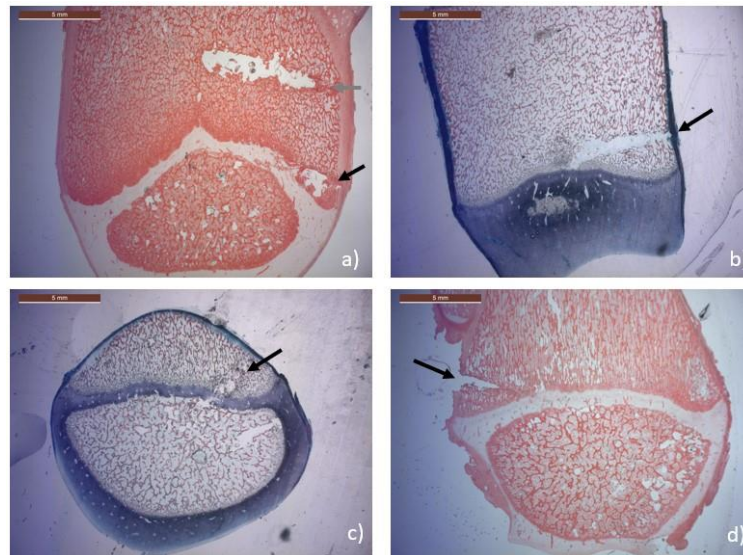
### 3.9.4 Histologie

Die Erstellung histologischer Schnitt der zur Thermoablation verwendeten Knochen fand unter anderem zur Etablierung der Methodik in Kombination mit den Färbungen nach dem Protokoll von LLS ROWIAK statt. Dabei zeigte sich, dass diese Herangehensweise geeignet war zur Darstellung einer physiologischen Wachstumsfuge. Die einzelnen Zonen mit undifferenzierten Chondrozytenvorläuferzellen, sowie proliferierenden, hypertrophen und apoptotischen hypertrophen Chondrozyten ließen sich gut darstellen (Abbildung 3.20).



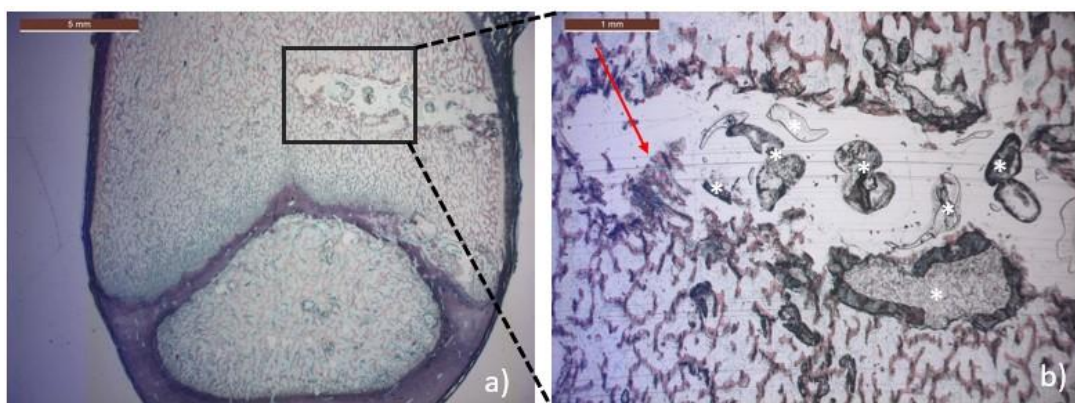
**Abbildung 3.20 Darstellung einer physiologischen Wachstumsfuge.** Wachstumsfuge in Hämatoxylin-Eosin-Färbung (links) und *Sanderson-Rapid-Stain* und *Van-Gieson-Counterstain* (rechts). Unterteilung der Wachstumsfuge in: E = epiphyseale Seite der Wachstumsfuge; R = Reservezone; P = Proliferationszone; H = Hypertrophe Zone; I = Invasive Zone. Maßstabsleiste 200 µm.

Durch die virtuellen Ebenen am 3D-Modell der µCT-Bilder und Übertragung dieser Schnittebenen per Hand auf den Technovit®-Blöcke konnten die jeweiligen Läsionen in den histologischen Schnitten gut sichtbar und die Säulenorganisation beobachtet werden (Abbildung 3.21). Eine Anschneidung aller Läsionen in dem Wachstumsfugen-nahen Abschnitten war nicht möglich, da die Schnittflächen in divergenten Richtungen angeordnet waren und sich teilweise behinderten.



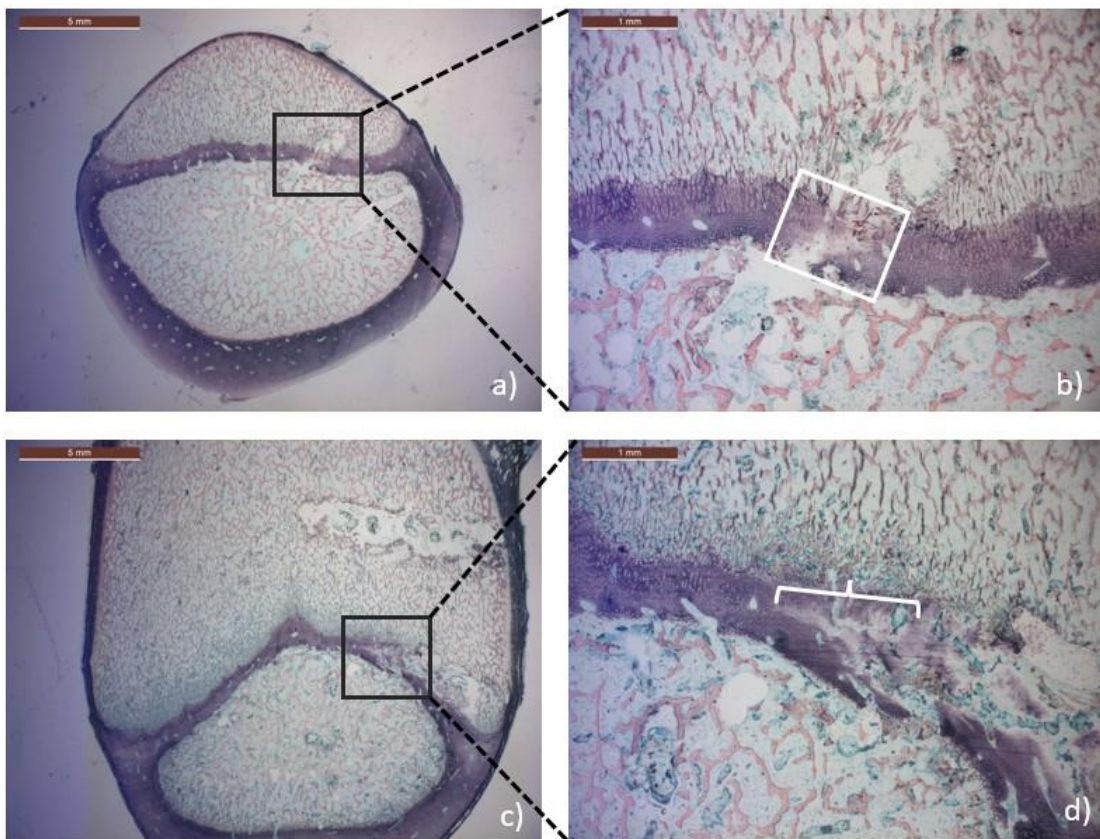
**Abbildung 3.21 Histologische Schnittbilder mit sichtbaren Läsionen.** Von der Elektrodenspitze hervorgerufene Läsionen sind mit Pfeilen markiert, in 0,63-facher Vergrößerung. a) Femur links Läsion 1 (oberer, grauer Pfeil), Läsion 3 (Kontrollläsion, unterer schwarzer Pfeil); b) Femur rechts Läsion 4; c) proximale Tibia links Läsion 1; d) Radius rechts Läsion 2. Hämatoxylin-Eosin-Färbung (a,d). *Sanderson-Rapid-Stain* und *Van-Gieson-Counterstain* (b,c). Maßstableiste 5 mm.

Das Gewebe um die Elektrodenspitzen-Einstichstelle herum zeigte keine großflächigen Veränderungen im Knochengewebe, was besonders an den Läsionen sichtbar war, welche nicht die Wachstumsfuge berührten. Der Einstichkanal war geprägt durch das zylinderförmig fehlende Gewebe. Teilweise zeigten sich durch den Einstich verschleppte Zellinseln oder Luftblasen, welche vermutlich durch die applizierte Hitze oder während der Einbettung entstanden waren (Abbildung 3.22).



**Abbildung 3.22 Histologisches Bild der Läsion eines Einstichkanals, welcher nicht die Wachstumsfuge erreichte.** Femur links Läsion 1 in *Sanderson-Rapid-Stain* und *Van-Gieson-Counterstain*: a) Einstichkanal in 0,63-facher Vergrößerung, Maßstableiste 5 mm; b) in 2,5-facher Vergrößerung, Maßstableiste 1 mm. Darin sichtbar war eine durch den Einstich verschleppte Zellinsel (roter Pfeil), sowie weitere Veränderungen und Artefakte (weiße Sternchen).

In den histologischen Schnitten von Läsionen, die die Wachstumsfuge berührten, waren Veränderungen unterschiedlichen Ausmaßes sichtbar, sowohl bei Kontrollläsionen, bei denen keine Thermoablation stattgefunden hatte, als auch bei solchen mit Hitzeapplikation. In beiden Fällen wurde die schichtförmige Organisation der Wachstumsfuge bei Ein- oder Durchstich der Elektrodenspitze gestört. Es zeigten sich eine Disruption der Organisationsstrukturen sowie fehlende und verklumpte Zellen in den Säulen (Abbildung 3.23).



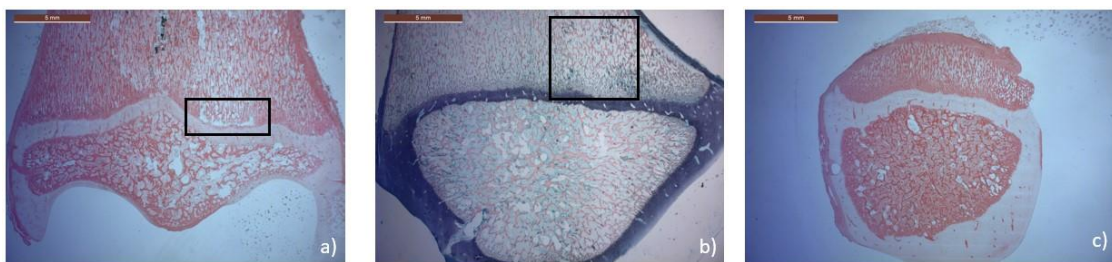
**Abbildung 3.23** Histologische Schnitte mit sichtbaren Veränderungen der Wachstumsfuge.

Proximale Tibia links Läsion 1 in 0,63-facher (a) und 2,5-facher Vergrößerung (b). Femur links Läsion 3 (Kontrollläsion) in 0,63-facher (c) und 2,5-facher Vergrößerung (d). Markierung der veränderten Säulenstrukturen (weißer Kasten) und ein von der Läsion abgehender Gewebestreifen mit reduzierter Färbung (weiße Klammer). Alle Bilder in *Sanderson-Rapid-Stain* und *Van-Gieson-Counterstain*. Maßstableiste 5 mm (a,c) und 1 mm (b,d).

Das Gewebe auf der medialen Seite der Wachstumsfuge zeigte keine morphologischen Veränderungen durch den Einstich und die Thermoablation der Elektrodenspitze auf der lateralen Seite. Auch der angrenzende Gelenkknorpel war intakt, womit zumindest im *In-vivo*-

Modell eine Schädigung der applizierten Hitze ausgeschlossen wurde. Diese Information wäre für eine *In-vitro*-Applikation essenziell.

Bei Anfertigung der Kontrollschnitte, welche mit einem Zentimeter Abstand von einer der Läsionen angefertigt wurden, zeigten sich teilweise fehlende oder dünnere Bereiche im Knochengewebe, die wie herausgerissen wirkten (Abbildung 3.24). Diese Veränderungen müssen bei Betrachtung aller histologischen Schnitte als mögliche Artefakte gewertet werden, eventuell durch ein verkürztes Protokoll bei der Einbettung der doch großen Knochenblöcke.



**Abbildung 3.24 Histologische Bilder der Kontrollschnitte.** In 0,63-facher Vergrößerung distale Tibia links Kontrollschnitt 4(a); proximale Tibia rechts Kontrollschnitt 1(b); Radius rechts Kontrollschnitt 2(c). Veränderungen die vermutlich durch die nicht optimale Einbettung entstanden sind und sich als dünnere Bereiche (b) oder herausgerissen wirkende Gewebeabschnitte (a) zeigen, sind mit schwarzen Kästen umrandet. Hämatoxylin-Eosin-Färbung (a,c) und *Sanderson-Rapid-Stain* und *Van-Gieson-Counterstain* (b). Maßstableiste 5 mm.

## 4 Diskussion

Aufgrund der kindlichen Anatomie mit Wachstumsfugen und geringem Knochendurchmesser gibt es oft in der Medizin keine geeigneten Implantate für kinderorthopädische oder –traumatologische Spezialfragestellungen (Paley 2015; Jäckle et al. 2020). Ein gravierendes Problem stellt die große Beinlängendifferenz bei Kindern unter zehn Jahren dar (Hasler 2000; Vogt et al. 2020). Daher wird kontinuierlich versucht, hier besonders schonende, kleine und innovative Spezialimplantate zu entwickeln (BMBF; Extern steuerbares Plattenosteosynthesystem für Kinder (KiD Plate) (Nr.13GW0302B)). Bevor Implantate im menschlichen Organismus eingebaut werden, sind sorgfältige biomechanische, *In-vitro*- und *In-vivo*-Studien nötig.

Das in der vorliegenden Arbeit verwendete MAGEC®-Implantat zur Überbrückung und beabsichtigten späteren Verlängerung einer Extremität zeigte bei präoperativen biomechanischen Belastungstests eine ausreichende axiale Stabilität, die sich nach Implantation jedoch als nicht ausreichend erwiesen hat. Besonders Rotationskräfte spielten eine tragende Rolle und führten zum Implantatversagen.

Die thermische Ablation der Wachstumsfuge bei dieser Pilotstudie lieferte daneben die Erkenntnis, dass eine thermische Ablation als minimalinvasive Methode zu Zerstörung begrenzter Bereiche der Wachstumsfuge genutzt und somit vermutlich bei der Beeinflussung der kindlichen Wachstumslenkung verwendet werden kann. Für eine Überprüfung dieser Hypothese sind zukünftige *In-vivo*-Versuche notwendig.

### 4.1 Schaf als Modelltier und Klauendruckmessungen

In der vorliegenden Arbeit wurden mehrere Versuchsansätze mit weiblichen Lämmern der Rasse Leinelamm als Modelltier verfolgt. Vorherige erfolgreiche Studien zu Methoden der Epiphysiodese fanden unter anderem an Kaninchen statt (Ghanem et al. 2009; Widmann et al. 2010). Eine Durchführung von Versuchen an Großtiermodellen ist jedoch von Bedeutung, bevor eine Übertragung in die Klinik stattfinden kann (Shiguetomi-Medina et al. 2014). Die Erprobung neuer Implantate zur Knochenverlängerung wurde daher auch in anderen Studien an Schafen durchgeführt (Cole et al. 2001; Ehrnthaller 2008). Im Vergleich zu anderen Großtieren ist die Handhabung von Schafen einfach (Sparks et al. 2020). In dieser Studie erfüllten die Schafe die meisten der als wichtig erachteten Kriterien eines für diese Versuche passenden Tiermodells, sowohl für die Anbringung des MAGEC®-Implantats, als

auch für die Thermoablation. Dazu gehören die Eignung als Analogon, die Übertragbarkeit der Organismen, Kosten und Verfügbarkeit, Leichtigkeit und Anpassungsfähigkeiten an experimentelle Manipulationen sowie die ökologischen Folgen und ethischen Implikationen (Davidson et al. 1987).

In Bezug auf den Knochenstoffwechsel ist ein geschlechtsspezifischer Unterschied bei Schafen festzustellen. Während männliche Schafe eine stabile Rate des Knochenumsatzes gewährleisten, zeigten weibliche Schafe eine schnellere Verknöcherung der Wachstumsfugen (Ho et al. 1989; Sparks et al. 2020). Die Entscheidung für weibliche Schafe in dieser Studie wurde anhand der Verhaltensmuster getroffen (Rahmann 2007). Zur Vermeidung von Rankkämpfen innerhalb der Herde wurde auf männliche Tiere verzichtet. Zusätzliche Anstrengungen der Tiere nach einer Operation sollten damit umgangen werden.

Zur Beurteilung der Lämmer wurde ein Score Sheet erstellt werden, welcher zur Feststellung des Gesundheitszustandes der Tiere diente und sich an der sehr sensitiv bewerteten *Sheep Grimace Scale* anlehnte (Biernot 2017). Aufgrund fehlender Operationen nach einer initialen Problematik konnten keine prä- und postoperativen Scores der Schafe verglichen werden. Eine weitere Methode zur Messung des Stresslevels in zukünftigen Studien könnte die Messung des Cortisols im Speichel der Tiere sein (Biernot 2017). Mittlerweile wurde der *Sheep Grimace Scale* auch auf Lämmer übertragen, was bei der Verwendung oder Erstellung eines neuen Score Sheets für juvenilen Schafe Beachtung finden sollte (Guesgen et al. 2016).

Die Versuchstiere wurden in einem 40 m<sup>2</sup> großen Stall gehalten. Im Gegensatz zu anderen Studien entsprach dies nicht der natürlichen Umgebung der Tiere mit natürlichen Licht- und Wetterbedingungen, großflächiger Weide und dauerhaftem Zugang zu frischem Gras (Fierro und Bryant 1990; Bojkovski et al. 2014; Morton et al. 2014). Dies kann einen Einfluss auf das in dieser Arbeit beobachtete Verhalten haben, da die Zeit, die Schafe für die verschiedenen Aktivitäten aufwendeten, mit der verfügbaren Masse und Qualität von Futter korrelierte (Lyons und Machen 2000). Allerdings entsprachen die Bedingungen im Versuchsstall der Umgebung, der die Versuchstiere auch nach der operativen Implantation eines Kraftträgers und während der Knochenverlängerung ausgesetzt sein würden. Demnach ist das gewählte Setting passend, um die Belastungen unter Laborbedingungen zu testen. Aufgrund der von nur einer Person durchgeführten live-Beobachtungen ist die Zahl, der über insgesamt 24 Stunden beobachteten Tiere, mit  $n = 3$  relativ niedrig. Die Beobachtungsphasen erstreckten sich aufgrund von Gegebenheiten wie der Akkulaufzeit der Kamera für die nächtlichen Beobachtungen und notwendigen Pausen der Beobachterin bei den live-Beobachtungen über mehrere Tage, was als limitierender Faktor dieser Studie



genannt werden sollte. Squires et al. (1974) stellten bei ihren Beobachtungen allerdings fest, dass sich das Verhalten der beobachteten Schafe an den verschiedenen Versuchstagen nicht beträchtlich voneinander unterschied. Mithilfe von technischen Hilfsmitteln, wie einem dreiaxialen Accelerometer-Sensor oder einer *Activewatch* am Halsband, könnte man den Aufwand der menschlichen Beobachtung in Zukunft minimieren und die erhobenen Daten präzisieren (Morton et al. 2014; Ikurior et al. 2021).

Die in dieser Arbeit beobachtete Tagesrhythmik der Versuchstiere zeigte sich auch in anderen Studien. Besonders in den Morgen- und Abendstunden bewegen sich Schafe demnach am meisten (Morton et al. 2014), was besonders durch die Jahreszeit bzw. Sonnenauf- und untergang gesteuert wurde (Chilelli 1981; Morton et al. 2014). Diese Faktoren spielten bei der vorliegenden Evaluation aufgrund der Bedingungen in der ZTE eine untergeordnete Rolle. Auch der Gesundheitsstatus hat einen Einfluss auf die Aktivität der Versuchstiere. Bei Veränderungen wie dem Befall der Tiere mit Helminthen kam es zu Verhaltensänderungen (Högberg et al. 2021). Der Wurmbefall der hier evaluierten Versuchstiere wurde allerdings vor Durchführung der Verhaltensbeobachtungen erfolgreich therapiert.

Verhaltensveränderungen der hier evaluierten Versuchstiere waren teilweise während der Klauendruckmessungen aufgrund der ungewohnten Umgebung zu beobachten. Bei der zuerst verwendeten Methodik nutzten wir Sensoren an 3D-gedruckten Klauenschuhen und die Datenerfassungsgeräte wurden an einem Körpergurt fixiert. Die Klauenschuhe wurden von den Tieren sofort angenommen und es zeigte sich äußerlich kein verändertes Gangbild. Der Körpergurt wurde von den nicht gemessenen Tieren der Herde anfangs beschnuppert, schien die Versuchstiere in ihren Bewegungen jedoch nicht zu beeinflussen. Dies stellten auch Hobbs-Chell et al. (2012) in ihren Versuchen fest. Aufgrund der technischen Probleme der Sensoren konnten mit dieser Methodik allerdings keine Daten mit auswertbaren Ergebnissen erhoben werden.

Die für die Klauendruckmessungen verwendete zweite Methodik beinhaltete die Nutzung einer Sensormatte. Diese zeigte bei der Gewichtsvalidierung in der Summe der Einzelkräfte Werte, die mit den per analoger Waage gemessenen gut übereinstimmten. Ungenauigkeiten könnten hier bei der analogen Waage, durch die sich während der Messung bewegenden Schafe entstanden sein. Des Weiteren hatte die Standwaage mit 1 kg-Schritten eine ungenauere Skalierung.

Im Gegensatz zu anderen Studien zur Ganganalyse von Schafen wurden im vorliegenden Versuch keine standardisierten Videoaufnahmen der Tiere erstellt (Agostinho et al. 2012;

Faria et al. 2014). Die Klauendrucke wurden anhand der Aufzeichnungen der Sensormatte abgeleitet, was eine Beeinflussung durch abnorme Körperhaltung der Tiere nicht erfasste. Klinisch konnten während der Messungen auf der Sensormatte bei allen Versuchstieren Verhaltensauffälligkeiten beobachtet werden. Ein kontrolliertes Messen der Tiere im Stehen, Laufen und Springen konnte nicht mit allen Tieren in gleicher Anzahl an Messungen durchgeführt werden. Eine Verfehlung der Sensormatte mit den Beinen, wie von Taylor et al. (2006) beschrieben, zeigte sich im vorliegenden Versuchsaufbau hauptsächlich bei der Erfassung der Sprünge. Das gleichzeitige Betreten der Sensormatte zweier Schafe stellte für das Messsystem und die Analyse der Schritte keine Limitation dar, wie dies in anderen Studien beschrieben wurde (Taylor et al. 2006). Auf die Vorgabe eines Schrittempos für die Tiere wurde hier bewusst verzichtet, sodass die gemessenen Werte ein möglichst natürliches Gangbild darstellten und ein Vergleich von prä- und postoperativen Messungen möglich gewesen wäre. Postoperative Veränderungen könnten sich, wie in anderen Studien erfasst, durch eine Entlastung des operierten und eine stärkere Belastung des kontralateralen Beines zeigen (Lienau et al. 2005).

In dem Versuchsaufbau anderer Studien wurden Halfter genutzt, Futter als Lockmittel verwendet oder die Tiere auf der Messstrecke trainiert (Seebeck et al. 2005; Kim und Breur 2008; Agostinho et al. 2012; Faria et al. 2014). Dabei zeigte sich, dass die Effektivität dieser Maßnahmen nicht konklusiv war. Der Fluchttrieb, der von der Herde getrennten Tiere, ließ sich auch durch längere, wiederholte Übungszeiten oder die Nutzung eines Halters nicht verhindern (Kim und Breur 2008). Eine Idee für die Verbesserungen zukünftiger Versuchsaufbauten wäre es, den als Schutzmechanismus vorhandenen Herdeninstinkt zu nutzen. Demnach würden die Tiere über die Sensormatte laufen, während sie am Ende der Matte ihre Herde und im Sichtfeld keine als Bedrohung wahrnehmbaren Menschen sehen. Außerdem sollten Lämmer gemeinsam mit ihren Muttertieren über die Sensormatte laufen dürfen, um natürliche Verhaltens- und Gangmuster darzustellen.

Die hier im Laufen gemessenen Belastungen der Hinterbeine zeigten eine seitengleiche Belastung von durchschnittlich 36% des Körpergewichts. Dies deckt sich mit den Ergebnissen anderer Studien, in denen sich keine statistisch relevanten Unterschiede in den kinematischen Daten der rechten und linken Gliedmaße fanden (Kim und Breur 2008; Agostinho et al. 2012; Liu et al. 2021). Bei Schafen liegt der Schwerpunkt auf der Vorderseite der geometrischen Mitte des Rumpfes, wodurch eine größere Belastung der Vorderbeine festzustellen war (Liu et al. 2021). Demnach wurden nach Kim und Breur (2008) 30% des Körpergewichts auf den Vorderbeinen und 20% auf den Hinterbeinen gemessen. Die im

Stehen gemessenen Werte des Kollektivs dieser Arbeit lagen mit 31% des Körpergewichtes für das rechte Vorderbein und 23% für das linke nahe an diesen Werten. Als Ursache für die Differenz zwischen rechtem und linkem Vorderbein kann eine nach rechts gedrehte Kopfhaltung der Tiere angenommen werden, welche durch die Position der Herde rechts neben der Sensormatte bedingt wurde. Die geringe Anzahl an Messungen im Stehen ( $n = 3$ ) stellt eine Limitation der Aussage dar.

Nesbitt et al. (2014) bildeten mithilfe eines Roboters den Gang eines Schafes nach und ermittelten an diesem Modell die dreidimensionalen Gelenkkräfte und Drehmomente. Dabei wurden im Kniegelenk des Schafes Gesamtkräfte von 300 N in der Standphase gemessen. Rechnet man die in dieser Studie gemessenen Kräfte in Newton um, kommt man auf eine maximale Belastung einzelner Beine im Stehen von 120 N in den Vorder- und 77 N in den Hinterbeinen. Die Differenz dieser Werte ist sicher auch durch die verwendeten Versuchstiere entstanden. Nesbitt et al. (2014) nutzten zur Erstellung ihres Gangbildmodells Hintergliedmaße von skelettreifen weiblichen Schafen mit einem Gewicht zwischen 50 und 78 kg.

Bei Übertragung der Ergebnisse auf eine klinische Anwendung sind die Unterschiede anatomischer und mechanischer Art aufgrund des aufrechten Gangs des Menschen und des vierfüßigen Gangs des Schafes zu beachten (Aerssens et al. 1998). Laut Sparks et al. (2020) ist die Belastung der Hinterbeine bei Schafen im Gehen nur halb so hoch die wie des Menschen. Nach Xerogeanes et al. (1998) ist außerdem das Knie des Schafes dem menschlichen im Vergleich zu anderen Tieren am unähnlichsten. Ein signifikanter Unterschied ist dabei beispielsweise in den Kräften und der Kraftverteilung im vorderen Kreuzband des Schafsknies beschrieben worden (Xerogeanes et al. 1998). Für eine Berechnung der Belastungen einzelner Knochen und daran anzubringender Implantate müssten außerdem die Wirkungen von unter anderem Sehnen, Hautspannung und Rotationskräften Beachtung finden. Ein muskuloskelettales Modell verwendeten beispielweise Taylor et al. (2006) bei ihrer Erstellung einer 3D-Kinematik der hinteren Gliedmaße von Schafen. Dies ermöglichte ihnen die Berechnung der Kräfte im Tibio-Femoral-Gelenk des Schafknies zum Vergleich mit den mechanischen Bedingungen im Menschen (Taylor et al. 2006). Ähnliche Berechnungen zur Übertragung der hier ermittelten dauerhaften tagesdurchschnittlichen Belastung eines Hinterbeins von 2,94 kg/min zur Berechnung auf ein an der Tibia anzubringendes Implantat sind wegweisend und wünschenswert.

Bei den Berechnungen der tagesdurchschnittlichen Belastung wurde während des Liegens von keiner auf dem Hinterbein lastenden Kraft ausgegangen, da hier keine direkten Messungen vorgenommen werden konnten. Diese Belastung mit null Prozent des Körpergewichts entspricht jedoch offensichtlich nicht der Realität. Anzumerken ist auch, dass die hierbei vereinten Werte der Verhaltensbeobachtungen und Klauendruckmessungen an unterschiedlichen Schafen erhoben wurden. Während die Tiere für die Verhaltensbeobachtungen im Versuchsstall weniger als sechs Monate alt waren, waren bei den Tieren der Klauendruckmessungen Schafe im Alter von fünf bis achtzehn Monaten dabei.

Ein altersbezogener Unterschied in den kinematischen Daten von Schafen im Laufen konnte in der Studie von Faria et al. (2014) nicht beobachtet werden. Grund dafür seien die schnelleren Flexions-Extensions-Bewegungen in den beanspruchten Gelenken der jüngeren Tiere mit kürzeren Beinen. Auch in den hier gewonnenen Daten wurde beim Vergleich der Maximalbelastungen der Hinterbeine im Sprung keine altersabhängigen Unterschiede festgestellt.

#### **4.2 Schafsknochen und MAGEC®-Implantat**

Bei Betrachtung der Knochenstruktur von Schafen spielt das Alter der Tiere eine entscheidendere Rolle. Bis zu einem Alter von 15 Monaten zählen Schafe als skelettal unreif (Nafei et al. 2000). In dieser Zeit haben sie einen schwächeren Trabekelknochen, eine geringere Steifigkeit und Dichte sowie einen höheren Kollagengehalt, wodurch eine höhere Flexibilität gegeben ist als bei reifen Schafen (Nafei et al. 2000). Der verzögerte Umbau von primärem Knochengewebe zu sekundärem, durch Havers'sche Strukturen gekennzeichneten Knochengewebe, findet bei Schafen ab einem Alter von sechs Jahren statt und lässt laut einiger Quellen erst dann valide Rückschlüsse auf den erwachsenen, menschlichen Knochen zu (Newman et al. 1995; Sparks et al. 2020).

Der Knochenstoffwechsel des Schafes wird von Umweltbedingungen wie dem geografischen Standort, der Ernährung, dem Photoperiodenzyklus und den Jahreszeiten beeinflusst (Martini et al. 2001; Bonucci und Ballanti 2014; Sparks et al. 2020). Bei weiblichen Schafen ist auf den ganzjährigen oder saisonalen Östruszyklus hinzuweisen. So wird die begattungsfähige Zeit der Tiere bezeichnet, die mit einem veränderten Östradiolspiegel einhergeht (Martini et al. 2001; Berttram 2003; Schumacher 2007).

Grundsätzlich konnte beobachtet werden, dass sich Knochen des Schafes im Vergleich zum Menschen durch und eine höhere Trabekelknochendichte auszeichnen (Reichert et al. 2009). Das Schaf und die Tibia konnten sich trotz der genannten Unterschiede in der Knochenmorphologie als gutes klinisches Modell für den menschlichen Organismus etablieren (Martini et al. 2001). Daher wurde für den operativen Einbau des MAGEC®-Implantats die Tibia eines Leinelamms gewählt, auch wegen des einfachen operativen Zugangsweges und einer dicken Kortikalis, welche zu einer geringeren Morbidität nach Osteotomie der Diaphyse führte (Croker et al. 2016). Das Implantat konnte gut und fest an dem lateralen Knochen befestigt werden. Postoperativ zeigten sich mit Aufstehen des Tieres unerwartete Rotationskräfte mit Dislokation von Implantat und Knochen als Komplikation.

Die extramedulläre Implantation eines stabförmigen Implantats (PRECICE®), ähnlich des MAGEC®-Implantats, hatte zuvor zu erfolgreichen Verlängerung des Femurs bei elf Kindern verwendet werden können (Dahl et al. 2020). Dahl et al. (2020) positionierten den verlängerbaren Nagel lateral am Femur, was während der Verlängerung gut toleriert wurde. Präoperative biomechanische Testungen der Implantate erfolgten mit einer guten Stabilität bis zu einer axialen Belastung von 500 N, wo sich erstmals Dislokationen zeigten. Diese Kraft wurde als maximal gemessene axiale Kompression des Kniegelenks während des Gangzyklus eines Schafes beschrieben (Nesbitt et al. 2014).

Die durchschnittliche Spitzenbelastung der Hinterbeine beim Absprung betrug in den hier durchgeführten Messungen bis zu 100% des Körpergewichtes pro Bein. Bei einem durchschnittlichen Gewicht von 32 kg wäre das eine Belastung von 314 N und damit unter den biomechanisch als positiv getesteten axialen Belastungen. *In vivo* zeigten sich starke Rotationskräfte, welche bei zukünftigen Testungen mit einberechnet werden sollten. Unkontrolliert hohe Biegemomente, wie sie für ein Implantat beim Aufstehen und Hinsetzen der Tiere entstanden, wurden allerdings auch in anderen Studien als Störfaktoren genannt oder führten zum Implantatversagen (Evans 2014; Sparks et al. 2020).

Evans et al. (2014) ermittelten die Spitzenbelastungen ihrer postoperativ in Schlingen fixierten Schafe. Dabei lagen die an vier Tagen gemessene durchschnittliche Spitzenwerte bei 566 N. An zwei weiteren Tagen wurde eine Spitzenbelastung von 787 N und 1087 N erfasst. Hierbei ist zu bemerken, dass der Empfindlichkeitsbereich der Messvorrichtung auf 0 – 250 N festgelegt war und keine Angaben zum Gewicht der Tiere gemacht wurden, was

einen Vergleich zu den hier ermittelten Werten erschwert. Die in dieser Arbeit an Lämmern gemessenen maximalen Spitzenbelastungen lagen zwischen 308 N und 537 N.

Zur Verhinderung von postoperativen Rotationskräften beim Schaf könnte eine postoperative Fixierung der Tiere in einer Schlinge und die Anbringung eines Gipses am operierten Bein helfen. Die postoperative Haltung von Schafen in Schlingen wurde in anderen Studien als wirksame Maßnahme zur Minderung der hohen Belastungskräfte beim Aufstehen bewertet (Hahn et al. 2011; Evans 2014). Dabei gibt es Schlingensysteme, die den Tieren eine volle Belastung aller vier Gliedmaßen ermöglichen, andere Systeme tragen das komplette Gewicht der Tiere (Evans 2014; Christou und Walsh 2017). Die Reduktion der Lebensqualität der Versuchstiere durch eine eingeschränkte Beweglichkeit sollte bei der Entscheidung zur Nutzung solch einer Maßnahme erwogen werden. Während die hier evaluierten Versuchstiere über den Tag verteilt im Schnitt 41 Schritte pro Stunde machten, war der Durchschnitt der in einer Schlinge fixierten Tiere nur 25 Schritte pro Stunde (Evans 2014). Eine neue Methode der postoperativen Fixierung mit einer Schlinge wurde von Christou und Walsh (2017) entwickelt, mit der der auf den Schafsbeinen lastende Prozentsatz des Körpergewichts angepasst werden konnte. Durch die Kopplung einer Schlinge mit einem Federausgleichsgerät konnte eine konstante Spannung gehalten und somit die Übertragung einer konstanten Kraft auf das Tier gewährleistet werden. Damit sind die Tiere mobil, können Liegen oder Stehen und auch beim Wiederkauen in Bauchlage zeigten sich keine sichtbaren Anzeichen von Stress oder Unwohlsein (Christou und Walsh 2017).

Grundsätzlich ist die Übertragbarkeit von Implantaten in Tierstudien nur unter Vorbehalt auf die klinische Situation am menschlichen Knochen möglich. Durch den vierbeinigen Gang der Schafe entsprechen die Belastungen der hinteren Gliedmaße beispielweise nur der Hälfte der beim Menschen gemessenen Belastungen, wodurch die Anforderungen an das Implantat unterschätzt werden könnten (Taylor et al. 2006; Reichert et al. 2009; Nesbitt et al. 2014). Genaue Messungen der Belastungen kindlicher Beine müssten folgen. Die hier verwendete acht-Punkt kortikale Fixierung wird bei einer Osteosynthese am kindlichen Knochen grundsätzlich als ausreichend bewertet (Jäckle et al. 2020). Trotz der geringen Stichprobe mit  $n = 1$  und dem Wissen, dass jeder Knochen individuelle Unterschiede aufweisen kann, wird von einer Verwendung der juvenilen Schafstibia als präklinisches Modell für die extramedulläre Implantation eines stabförmigen Verlängerungsimplantates in der hier genannten Weise, abgeraten.

### 4.3 Methodische Synergie von $\mu$ CT und Histologie

Die Informationsübertragung von virtuell an den  $\mu$ CT-Bildern erstellten Ebenen auf die Blöcke mit den eingebetteten Knochenstücken der Thermoablation zeigte sich als effektive Methode, um repräsentative histologische Schnitte zu erstellen. Der geringe Materialverlust durch das Schneiden mit dem Lasermikrotom ermöglichte eine gute Vergleichbarkeit von Schnitten, die nacheinander erstellt und verschieden gefärbt wurden. Eingeschränkt wurde die Einstellung der optimalen Schnittfläche durch die Lage des Knochens im Technovit®-Block. Für eine sichere Fixierung des Blocks in der Haltevorrichtung des Trennschleifsystems musste ausreichend Material als Angriffspunkt zur Verfügung stehen. Durch die im dreidimensionalen Raum unterschiedlich ausgerichteten Läsionen konnten diese von den Schnittflächen teilweise nicht oder nur unzureichend erfasst werden. Eine mögliche Ungenauigkeit besteht durch die manuelle Übertragung der virtuell erstellten Ebenen auf den Technovit®-Block. Diese Limitationen zeigten sich auch in der Diskrepanz zwischen dem in den histologischen Schnitten und  $\mu$ CT-Bildern sichtbaren Ausmaß der einzelnen Läsionen. Dies könnte zukünftig verhindert werden durch eine direkte Kopplung von  $\mu$ CT-Gerät und Lasermikrotom.

Der wesentliche Vorteil der hier entwickelten Vorgehensweise liegt in dem geringen Materialverlust der Proben. Dies ermöglichte die Gewinnung von deutlich mehr Schnitte aus einer Probe im Vergleich zur klassischen Trenn-Dünnschliff-Technik. Das verwendete Lasermikrotom der Firma LLS ROWIAK gehört zu einem der ersten Modelle seiner Art. Demnach waren einige Funktionen noch nicht optimal auf die hier vorliegende Probengröße abgestimmt. Die zuverlässige Fokusbestimmung funktionierte bei den Schnitten nur in einem Bereich von 40 bis 100 $\mu$ m. Im Computerprogramm zeigten sich außerdem Fehler in der Skalierung einer Einstellung, wodurch nur nach der Fokusbestimmung geschnitten wurde. Bei den Schnitten führte dies immer wieder zu Fehleinschätzungen des Programms und Schnitten im Glas des Objektträgers. In den histologischen Schnitten wurden diese Artefakte als Streifen schon bei geringeren Vergrößerungen sichtbar. Dieses Problem konnte mittlerweile durch ein Update der Firma behoben werden und sollte bei zukünftigen Lasermikrotom Anwendungen keine Rolle mehr spielen.

Bei der Etablierung der hier diskutierten Methodik offenbarten sich noch weitere Schwierigkeiten. Die Größe der Technovit®-Blöcke führte dazu, dass die Ränder der Objektträger hochgezogen wurden und beim Schneidevorgang nicht immer die vorher eingegebene Schnittdicke einheitlich eingehalten werden konnte. Während zu dicke Bereiche durch das Schleifen angepasst werden konnten, mussten zu dünne Abschnitte in dem

endgültigen Schnitt verbleiben. Die Wölbung des Objektträgers vor und nach Entlastung durch die Schneidung führte außerdem zu Rissen im Gewebe, welche unter dem Mikroskop in unterschiedlich ausgeprägter Stärke sichtbar waren.

Auch bei der Einbettung der präparierten Knochenstücke in Technovit® zeigten sich einige ungeplante Vorkommnisse. Die im Protokoll gewählten Zeitabschnitte der Einbettung waren möglicherweise nicht lange genug gewählt worden. Das Protokoll war von einem Protokoll für deutlich kleineren Rattenknochen auf das hier verwendete Großtiermodell übertragen und die Zeitintervalle angepasst worden. Bei einer ersten Testung dieses Protokolls zeigten sich keine Auffälligkeiten. Die dabei erstellten histologischen Schnitte wurden jedoch an einer üblichen Schneidemaschine und nicht mit dem Lasermikrotom erstellt. Bei Herstellung der hier diskutierten histologischen Schnitte mit dem Lasermikrotom zeigte sich jedoch, dass das Technovit® nicht immer in alle Poren der Knochenstruktur eingedrungen war. In den histologischen Schnitten sorgte dies dafür, dass die Blöcke sich nicht einwandfrei lösen ließen bzw. teilweise Abschnitte der Knochenstruktur herausgerissen wurden, sodass die Schnitte mit den Artefakten unvollständig wirkten. Des Weiteren entstanden im Laufe der Zeit an einzelnen Enden der Technovit®-Blöcke Risse. Diese beeinträchtigen teilweise die Erstellung histologischer Schnitte. Solche Risse entstanden hauptsächlich an den abgerundeten Enden der Blöcke, was die Vermutung aufkommen ließ, dass sich die Lösungen beim Einbetten in dem Plastikgefäß dort nicht wie erwartet vermischt hatten oder besonders abgelagert waren.

Für die hier angewandte Analyse eigneten sich nur Färbungen der Firma LLS ROWIAK. Alle anderen getesteten und vorher etablierten Methoden kamen nicht zum Einsatz, da die verwendeten Chemikalien mit dem Klebstoff interagierten und sich die Schnitte vom Objektträger lösten. Dass sich die Lichtmikroskopie als adäquate Methode zur morphologischen Analyse von Wachstumsfugen, wie in der Literatur beschrieben, eignete, zeigte sich auch mit dieser Färbung (Widmann et al. 2010). In den nicht abladierten Bereichen der Wachstumsfugen zeigten sich physiologischen Strukturen einer Wachstumsfuge.

Aufgrund der geringen Anzahl an Proben und den *In-vitro*-Bedingungen wurden in dieser Arbeit keine quantitativen Auswertungen der histologischen Bilder vorgenommen. Bei Betrachtung und Analyse der histologischen Schnitte konnte hauptsächlich der Verlust der histologischen Architektur an den Einstichstellen der Elektrodenspitzen festgestellt werden. Veränderungen des Säulenknorpels wurden bereits in anderen Studien beschrieben (Rosen



et al. 1990; Ghanem et al. 2009; Moon et al. 2012). Darüber hinaus konnten bei *In-vivo*-Studien Veränderungen in Form von einer Abnahme der Wachstumsfughöhe, nekrotischem Gewebe, Knochenbrücken und fibroproliferativen Reaktionen in der Nähe der Stelle der Thermoablation festgestellt werden (Ghanem et al. 2009; Moon et al. 2012).

#### 4.4 Thermoablation

Die effektive Nutzung der Radiofrequenzablation zur Destruktion einer Wachstumsfuge und damit Wachstumshemmung konnte von Widmann et al. (2010) am Kaninchen gezeigt werden. Ghanem et al. (2009) stellten die Hypothese auf, dass diese minimalinvasive Methode mit der Durchführung einer Hemiepiphysiodese zur Korrektur von Winkelabweichungen bei Kindern eventuell zu nutzen sei. Mit solch einem minimalinvasiven Ansatz der Epiphysiodese bzw. Hemiepiphysiodese sollten die Komplikationen bisher etablierter operativer Behandlungskonzepte verhindert werden. Dieser Idee folgend wurde in der vorliegenden Arbeit die Methode der Thermoablation an einem größeren Tiermodell *in vitro* untersucht.

Die gewonnenen Ergebnisse beziehen sich auf Knochen und Wachstumsfugen von nur einem neugeborenen Lamm, was die Aussagekraft der Untersuchungen einschränkt. Eine größere Studie wäre erforderlich, um die Ergebnisse dieser Pilotstudie zu bestätigen. Außerdem wurden die hier verwendeten Knochen nach dem natürlichen Versterben des Tieres und vor der Operation gekühlt gelagert. Von einem Unterschied der Beschaffenheit und Temperatur des aufgetauten Gewebes im Vergleich zu den Auswirkungen der Hitze an einem lebenden Modell, ist auszugehen. Einen Einfluss auf die Wirkung der applizierten Hitze im Gewebe hat beispielsweise der kühlend wirkende Blutfluss (Rosen et al. 1990). Des Weiteren fehlt der Vergleich zu nicht manipulierten Knochen, die unter denselben Umständen gelagert wurden, um die durch die Thermoablation entstandenen Veränderungen eindeutig von physiologisch entstandenen postmortalen Gewebeveränderungen zu unterscheiden.

Bei einer Erzeugung von nicht physiologisch vorkommenden Temperaturen in den Wachstumsfugen von Knochen ist die anatomische Nähe zu den Gelenken zu beachten. Während Rosen et al. (1990) bei ihrer Studie einen notwendigen Mindestsicherheitsabstand von fünf bis sechs Millimetern zu Gelenken festlegten, konnte in anderen Studien gezeigt werden, dass eine Thermoablation in der Nähe von Gelenkoberflächen durchgeführt werden konnte, ohne Knorpelschäden zu verursachen (Martel et al. 2008; Ghanem et al. 2009).

Zur Beurteilung der Lage der Elektrodenspitze zur Thermoablation wurden standardisierte Röntgenbilder angefertigt. Dabei war die makroskopische Beurteilung der Bilder und die Treffsicherheit begrenzt durch die Auflösung des Röntgengeräts und die wellenförmige Struktur der Wachstumsfugen des Schafes. Letzteres zeigte sich auch in Studien an anderen Modelltieren (Canale et al. 1986; Rosen et al. 1990). Wie beim Kaninchen stellte sich besonders die Wachstumsfuge des distalen Femurs eines juvenilen Schafknochens als wellenförmig dar und war somit schwerer zu treffen (Ghanem et al. 2009). In der vorliegenden Studie war dies am besten in der Wachstumsfuge des rechten distalen Femurs zu beobachten. Dort wurden nach Einstechen der Elektrodenspitze in die Wachstumsfuge auf den Kontrollröntgenbildern zwei der vier Läsionen als „nicht getroffen“ bewertet und demnach keine Hitze appliziert. Von diesen beiden durch die Elektrodenspitze verursachten Läsionen zeigte sich im  $\mu$ CT später eine davon, im MRT beide Läsionen bzw. deren Ausmaße, als die Wachstumsfuge berührend. Die hier erzielte erfolgreiche Trefferquote lag nach Auswertung der Röntgenbilder bei 80%, dem  $\mu$ CT zufolge bei 87,5% und bei Beurteilung der Läsionen in den MRT-Bildern bei 93,75%.

In Anbetracht der anatomischen Gegebenheiten und der hier ermittelten Treffsicherheiten wurde deutlich, dass die alleinige konventionelle Röntgenbildgebung nicht geeignet war, um das Treffen der Wachstumsfuge mit der Elektroauterspitze zu beurteilen. Zukünftig könnte hier durch eine intraoperativ höhere Auflösung der Röntgenbildgebung und Darstellung in mehreren Ebenen eine Verbesserung erreicht werden. Rosen et al. (1990) konnten allerdings auch bei mit der Nadel verfehlter Wachstumsfuge einen Effekt der Ablation ausmachen. Der resultierende Wachstumsstopp-Effekt war allerdings bei den direkt getroffenen Wachstumsfugen ausgeprägter (Rosen et al. 1990). Morein et al. (1978) beobachteten bei ihren Kontrollläsionen hingegen eine Auffüllung der gesetzten Defekte mit epiphysärem Knorpel, wodurch es zu keiner Bildung von Knochenbrücken kam. In der vorliegenden Studie konnte ein signifikanter Volumenunterschied zwischen den Läsionen und Kontrollläsionen festgestellt werden. Die in der histologischen Bildgebung sichtbaren Einstichstellen und Gewebeveränderungen der Wachstumsfuge unterschieden sich allerdings nicht gravierend. Daher sind Studien zur besseren Unterscheidung zwischen den mechanisch und per Hitze entstandenen Schäden und deren Folgen auf das Wachstum notwendig. Ebenso ist der Effekt während des weiteren Wachstums zur abschließenden Einschätzung der Methode wichtig, da eine direkte oder indirekte thermische Verletzung der Wachstumsfuge einen Fugenschluss hervorrufen sollte (Rosen et al. 1990; Moon et al. 2012).

Die bei der Ablation entstandenen Läsionen waren in anderen Studien als kugel- oder zylinderförmig beschrieben worden (Moon et al. 2012). Dies deckte sich mit den im  $\mu$ CT sichtbaren Veränderungen um den Einstichkanal der Elektrodenspitze. Im MRT hingegen, welches sich besonders zur Darstellung der Wachstumsfuge eignet (Synder et al. 2001), erschienen die nekrotischen Bereiche unförmiger und ohne scharfe Begrenzung. Daher wurde zur Ermittlung der Volumina der Läsionen die Funktion *Volume of Interest* im Programm Syngo.via angewandt, wobei die Ränder des zu ermittelnden Volumens in den einzelnen Schichten per Hand eingezeichnet wurden. Das Volumen der thermoablatierten Läsionen entsprach dabei durchschnittlich  $60,63 \text{ mm}^3$ , das der Kontrollläsionen  $25,83 \text{ mm}^3$ . Aufgrund der per Hand eingezeichneten Volumenränder sowie der groben Schichtdicke und einer Präzision der Software von  $0,01 \text{ cm}^3$  ist von Abweichungen der hier im MRT gemessenen auszugehen. Dies ist vermutlich auch einer der Gründe, warum die rechnerisch ermittelten Unterschiede der Volumengrößen zwischen den Läsionen mit und ohne Hitzeapplikation sich nicht in dem Ausmaß in den histologischen Schnitten zeigten.

#### 4.5 Ausblick

Bei der Übertragung der hier dargestellten Methodik auf ein klinisches Setting, sollte die Thermoablation individuell auf die Gegebenheiten der Knochen der Patient\*innen abgestimmt werden. Bei Verwendung von Schafen als Tiermodell ist zu beachten, dass die Wachstumsfugen – beim Kind oder Lamm – eine undulierende Struktur aufweist. Eine gute Sichtbarkeit der Wachstumsfuge im Röntgenbild kann zu einer vereinfachten Platzierung der Elektrodenspitze führen, weshalb die Anfertigung hochauflösender Röntgenbilder in mehreren Ebenen empfehlenswert ist. Weiterhin sollte das Volumen der hervorgerufenen Läsion steuerbar sein, z. B. durch Variieren der Stromstärke und des Zeitintervalls der Applikation. Langfristig sollte innerhalb der Tierstudien erfasst werden, welche Art und Größe von Läsionen notwendig sind, um einen gewünschten Effekt, wie die Lenkung von Wachstum zu erzielen. Sollte eine mehrmalige Radiofrequenzablation notwendig sein für die gewünschte Achsenkorrektur während des Wachstums, könnte zukünftig auch die von Dodge et al. (2007) formulierte Idee einer perkutan implantierbaren Elektrode verfolgt werden.

## 5 Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurden im Rahmen des BMBF-Projektes „Extern steuerbares Plattenosteosynthesystem für Kinder (KiD Plate)“ (Nr.13GW0302B) Untersuchungen zum Versuchstier Schaf für kinderorthopädische Implantatforschung, sowie Pilotstudien zur Implantation eines extramedullären, internen, magnetisch zu lenkenden Kraftträgers und zur Thermoablation von Wachstumsfugen durchgeführt.

Bei insgesamt 15 Versuchslämmern wurden Verhaltensbeobachtungen ( $n = 7$ ) und ausgedehnte Aktivitätsanalysen unter Laborbedingungen ( $n = 3$ ), sowie die Messung der Belastung der Schafsbeine ( $n = 8$ ) vorgenommen. Die Verwendung einer Sensormatte erwies sich dabei als besonders geeignet. Wie in der Literatur beschrieben war dabei eine stärkere Belastung der Vorderbeine zu erkennen ohne Unterschiede in Bezug auf die Körperhälfte. Bei zukünftiger Anwendung dieser Methodik ist eine Videoaufnahme während der Ganganalyse zu empfehlen. Aus den hier gewonnenen Daten konnte außerdem eine tagesdurchschnittliche Belastung der Hinterbeine mit 2,94 kg/min berechnet werden, welche bei den Messungen und Auswertungen im Vordergrund stand entsprechend der Beine am Kind. Diese kann als Maßstab bei Entwicklungen neuer Implantate zur Beinverlängerung mit *in vivo* Messungen am Schaf herangezogen werden. Zu beachten ist dabei, dass die auf die Knochen wirkenden Kräfte von beispielsweise Muskeln und Sehnen nicht miteinberechnet wurden.

In einem weiteren Versuch dieser Arbeit wurde ein magnetisch steuerbares Implantat an der Tibia eines juvenilen Leinelamms angebracht. Die verbreiteten chirurgischen Methoden der Knochenverlängerung zur Korrektur von Beinlängendifferenzen stellen vor allem bei Kindern unter zehn Jahren keine zufriedenstellenden Behandlungsmethoden dar. Das stabförmige MAGEC®-Implantat wurde hier *off-label* extramedullär implantiert. Die vorherige biomechanische Testung mit axialen Kräften bis zu 500 N ließ eine ausreichende Stabilität erwarten. Der postoperative Verlauf zeigte allerdings eine fehlende Stabilität des Implantats gegenüber den *in vivo* wirkenden Rotationskräften. Aufgrund der auch per Re-Operation nicht korrigierbaren Problematik musste das Versuchstier euthanisiert werden. Für zukünftige Versuche, die Implantate an Schafsextremitäten beinhalten, ist eine postoperative Fixierung der Tiere in Schlingen anzuraten, um Rotationskräfte zu umgehen.

Neben den *in vivo* Versuchen wurden bei diesen Studien auch Schafsknochen unter *in vitro* Bedingungen verwendet. Dafür wurde eine Pilotstudie zur Testung der Thermoablation als therapeutisches Instrument zur Beeinflussung der Wachstumsfuge des Lammes untersucht.

Nach konventioneller Röntgenuntersuchung wurde über eine Elektroauterspitze Hitze appliziert. Eine Auswertung erfolgte konventionell radiologisch und mittels  $\mu$ CT, MRT und Histologie. Die hier erzielte erfolgreiche Trefferquote lag nach Auswertung der Röntgenbilder bei 80%, dem  $\mu$ CT zufolge bei 87,5% und bei Beurteilung der Läsionen in den MRT-Bildern bei 93,75%. Daher scheint die alleinige Röntgendiagnostik wie in dieser Studie vorgenommen unzureichend. In den histologischen Bildern der verwendeten Knochen zeigten sich Gewebeschädigungen in Wachstumsfuge und Knochengewebe. Demnach scheint die hier beschriebene Methodik zur Ablation eines begrenzten Abschnittes der Wachstumsfuge im Rahmen der Wachstumshemmung oder -lenkung beim Kind geeignet zu sein. Die Auswirkungen der applizierten Hitze sollten zur Bestätigung dieser Hypothese jedoch noch *in vivo* im Langzeitverlauf untersucht werden.

Im Rahmen der Erstellung histologischer Schnitte, der zur Thermoablation verwendeten Knochen, wurde in dieser Arbeit außerdem eine neue Methodik zur möglichst präzisen Erstellung der histologischen Schnitte verfolgt. Dabei konnten durch die  $\mu$ CT-Aufnahmen der eingebetteten Knochenstücke 3D-Modelle erstellt und Schnittebenen virtuell definiert werden. Per Hand wurden diese Schnittebenen auf den Technovit®-Blöcken markiert und bei der Erstellung der histologischen Schnitte mithilfe des Lasermikrotoms herangezogen. Durch den geringen Materialverlust histologischer Schnitte wurde eine Darstellung der Läsionen an den gewünschten Stellen in verschiedenen Färbungen möglich. Dabei auftretende technische Probleme wurden im Laufe der Etablierung dieser Methodik oder im Nachhinein durch Updates der Firma behoben. In Zukunft kann eine Weiterentwicklung dieser Methodik angestrebt werden, welche die Ungenauigkeiten durch die per Hand markierten Ebenen weiter verringert.

## 6 Anhang

Score Sheet für Schafe nach einseitiger Osteotomie

Kategorie	Klinische Erscheinung	Score
Aktivität	Entspanntes Schlafen/Ruhen/Stehen	0
	Häufige Positionswechsel/häufige Versuche aufzustehen	2
	Rastlosigkeit	4
Gesichtsausdruck	Aufmerksam, Interesse an der Umwelt (Futter)	0
	Hängende Ohren, Augen fast geschlossen	2
	Ausdruckslosigkeit, Gesenkter Kopf, Hängende Ohren, Augen geschlossen/zur Wunde schauen	4
Wundheilung	Wunde akkurat verheilt	0
	Postoperative Wundheilungsstörungen, Röte, Überwärmung, Schwellung, eingeschränkte Funktion Nahtdehiszenz, Abszessbildung,	4
Osteomyelitis	Akkurate Heilung des Knochens, keine Anzeichen für Osteomyelitis	0
	Anzeichen für akute Entzündung (Rötung, Schwellung, Schmerzen, Erwärmung), Lahmheit	4
Verhalten in der Herde	Normale Bewegungen in/mit der Herde	0
	Leichte Veränderungen, läuft der Herde hinterher	1
	Mäßige Veränderungen, läuft der Herde hinterher, wenn man Tier antreibt	2
	Starke Veränderungen, immer von Herde separiert, kein Interesse an Herde	3
Verhalten des Einzeltiers	Wach, aufmerksam	0
	Wach, nicht an Umgebung interessiert	1
	Lethargisch, steht auf bei Annäherung	3
	Lethargisch, Festlegen, keine Reaktion auf Annäherung, keine Reaktion auf Auftreiben, Zähneknirschen, Stöhnen	4
Futter- und Wasseraufnahme, Verdauung	Trinkt, frisst und kaut wieder, Pansenmotorik 3x/2min, Ructus	0
	Keine Futter- und Wasseraufnahme, kein Wiederkauen, fehlende Pansenmotorik, Ructus	3
Atemfrequenz (Beurteilung an hinterer rechter Flanke)	20-40 Atemzüge/Minute	0
	Frequente, doppelschlägige Atmung (+Tachypnoe) (Schmerzen am Thorax)	3
	Erhöhte Atemfrequenz (Fieber, Infektion, Kreislaufversagen, Hitzestress), Unterdrücktes Atmen/flache Atemzüge (Schmerzen im Brustraum), Maulatmung, vorgestreckter Kopf (Atemnot)	
Puls (Auskultation; Palpation an A. femoralis, Innenseite Oberschenkel)	Lämmere 100-116 Schläge/Minute	0
	Undeutlich fühlbar (Kreislaufproblematik), Pochend (u.a. Entzündungsgeschehen in Nähe)	3
Haarkleid	Gut gefettete Wolle, Vlies dicht und gestapelt	0
	Verklebungen, Verschmutzungen im Schwanzbereich (Durchfall)	3
Innere Körpertemperatur (Lämmere, rektale Messung)	38,5 – 40,0°C	0
	Erniedrigt, (37,5 °C → akute Lebensgefahr), Erhöht (Hinweis auf Infektion, ab 41° Lebensgefahr)	3
Schleimhäute (Augen, Nase, Maul)	Blass-rosa, feucht, ohne Auflagerung, drittes Augenlid nicht vorgefallen	0
	Gerötet (Infektion), Injiziert (sklerale Gefäße: lokale Entzündungen, Kreislaufprobleme), Verwaschen (Vergiftung), Blass (Blutverlust/Anämie, Parasitenbefall, Kreislaufdefizit), vorgefallenes dritte Augenlid	3
Lymphknoten (Kniefaltenlymphknoten, L.n.subiliacus)	Zigarrenförmig	0
	Vergrößert (Infektion), nicht verschieblich (Entzündungsreaktion, Tumor), verschieblich (entzündlich, neoplastisch)	3

<p><b>Allgemeinbefinden Score</b></p> <p>1 Beobachtung</p> <p>≤ 2 Vorstellung bei Veterinärmediziner, dem Bedarf angepasste Schmerz-, antiinflammatorische und/oder antibiotische Behandlung</p>
--

Abbildung 6.1 Score Sheet

## 7 Literaturverzeichnis

- Aerssens J, Boonen S, Lowet G, Dequeker J (1998): Interspecies Differences in Bone Composition, Density, and Quality: Potential Implications for in Vivo Bone Research. *Endocrinology* 139, 8
- Agostinho FS, Rahal SC, Araújo FAP, Conceição RT, Hussni CA, El-Warrak AO, Monteiro FOB (2012): Gait analysis in clinically healthy sheep from three different age groups using a pressure-sensitive walkway. *BMC Vet Res* 8, 87
- Aumüller G, Aust G, Engele J, Kirsch J, Maio G, Mayerhofer A: Anatomie (Duale Reihe). 4., aktualisierte Auflage; Thieme, Stuttgart 2017
- Babu LV, Evans O, Sankar A, Davies AG, Jones S, Fernandes JA (2014): Epiphysiodesis for limb length discrepancy: a comparison of two methods. *Strategies Trauma Limb Reconstr* 2, 1–3
- Baumgart R, Thaller P, Hinterwimmer S, Krammer M, Hierl T, Mutschler W: A Fully Implantable, Programmable Distraction Nail (Fitbone) — New Perspectives for Corrective and Reconstructive Limb Surgery. In: Leung K-S, Taglang G, Schnettler R, Alt V, Haarman HJTM, Seidel H, Kempf I (Hrsg.): Practice of Intramedullary Locked Nails. Springer-Verlag, Berlin/Heidelberg 2006, 189–198
- Bertram M: Morphologische, endokrinologische und stoffwechselrelevante Verlaufsuntersuchungen an trächtigen Booroola \* Merinofleischschaf Kreuzungsgenotypen in Abhängigkeit von der Anzahl der Lämmer und deren Geburtsgewicht. Vet. Med. Diss. Leipzig 2003
- Biernot S: Beurteilung von Belastungsschweregraden mittels Phänotypisierung und klinischer Überwachung bei Versuchstieren. Vet. Med. Diss. Hannover 2017
- Birch JG, Makarov MR, Sanders JO, Podeszwa DA, Honcharuk EM, Esparza M, Tran EY, Jo C-H, Rodgers JA (2021): Lower-Extremity Segment-Length Prediction Accuracy of the Sanders Multiplier, Paley Multiplier, and White-Menelaus Formula. *JBJS* 103, 1713–1717
- Bøe KE, Berg S, Andersen IL (2006): Resting behaviour and displacements in ewes—effects of reduced lying space and pen shape. *Appl Anim Behav Sci* 98, 249–259
- Bojkovski D, Štuhec I, Kompan D, Zupan M (2014): The behavior of sheep and goats co-grazing on pasture with different types of vegetation in the karst region. *J Anim Sci* 92, 2752–2758
- Bonucci E, Ballanti P (2014): Osteoporosis—Bone Remodeling and Animal Models. *Toxicol Pathol* 42, 957–969
- Brady RJ, Dean JB, Skinner TM, Gross MT (2003): Limb length inequality: clinical implications for assessment and intervention. *J Orthop Sports Phys Ther* 33, 221–234
- Canale ST, Christian CA (1990): Techniques for epiphysiodesis about the knee. *Clin Orthop Relat Res* 81–85
- Canale ST, Russell TA, Holcomb RL (1986): Percutaneous epiphysiodesis: experimental study and preliminary clinical results. *J Pediatr Orthop* 6, 150–156
- Carter DR, Beaupré GS, Giori NJ, Helms JA (1998): Mechanobiology of Skeletal Regeneration. *Clin Orthop Relat Res* 355S, S41–S55
- Chavassieux P, Buffet A, Vergnaud P, Garnero P, Meunier PJ (1997): Short-term effects of corticosteroids on trabecular bone remodeling in old ewes. *Bone* 20, 451–455

- Chilelli M: Group organization and activity patterns of desert bighorn sheep. M.Sc. Arizona 1981
- Christou C, Walsh WR (2017): A novel method of suspending sheep for clinical research. *Lab Anim* 51, 652–655
- Cole JD, Justin D, Kasparis T, DeVlught D, Knobloch C (2001): The intramedullary skeletal kinetic distractor (ISKD): first clinical results of a new intramedullary nail for lengthening of the femur and tibia. *Injury* 32, 129–139
- Corby RR, Stacy GS, Peabody TD, Dixon LB (2008): Radiofrequency Ablation of Solitary Eosinophilic Granuloma of Bone. *AJR Am J Roentgenol* 190, 1492–1494
- Croker SL, Reed W, Donlon D (2016): Comparative cortical bone thickness between the long bones of humans and five common non-human mammal taxa. *Forensic Sci Int* 260, 104.e1-104.e17
- Dahl MT, Morrison SG, Laine JC, Novotny SA, Georgiadis AG (2020): Extramedullary Motorized Lengthening of the Femur in Young Children. *J Pediatr Orthop* 40, e978–e983
- Davidson MK, Lindsey JR, Davis JK (1987): Requirements and selection of an animal model. *Isr J Med Sci* 23, 551–555
- Deinhofer G, Stöger E (2019): Tiergesundheit bei Schaf und Ziege: Anatomie. Österreichischer Bundesverband für Schafe und Ziegen, 2019, 19
- Dodge GR, Bowen JR, Oh C-W, Tokmakova K, Simon BJ, Aroojis A, Potter K (2007): Electrical stimulation of the growth plate: a potential approach to an epiphysiodesis. *Bioelectromagnetics* 28, 463–470
- Ebraheim NA, Evans B, Liu X, Tanios M, Gillette M, Liu J (2017): Comparison of intramedullary nail, plate, and external fixation in the treatment of distal tibia nonunions. *Int Orthop* 41, 1925–1934
- Eerden BCJVD, Karperien M, Gevers EF, Löwik CWGM, Wit JM (2000): Expression of Indian Hedgehog, Parathyroid Hormone-Related Protein, and Their Receptors in the Postnatal Growth Plate of the Rat: Evidence for a Locally Acting Growth Restraining Feedback Loop After Birth. *J Bone Miner Res* 15, 1045–1055
- Ehrnthaller CM: Stimulation der Frakturheilung an der Diaphyse der Schafstibia durch zyklische Distraction und Kompression. Med. Diss. Ulm 2008
- Endo H, Asaumi K, Mitani S, Noda T, Minagawa H, Tetsunaga T, Ozaki T (2008): The Minimally Invasive Plate Osteosynthesis (MIPO) Technique with a Locking Compression Plate for Femoral Lengthening. *Acta Med Okayama* 62, 8
- Evans CH (2014): Improved Healing of Large, Osseous, Segmental Defects by Reverse Dynamization: Evaluation in a Sheep Model. Defense Technical Information Center, Fort Belvoir, VA. <http://www.dtic.mil/docs/citations/ADA613849>; abgerufen am 04.04.2022
- Faria LG, Rahal SC, Agostinho FS, Minto BW, Matsubara LM, Kano WT, Castilho MS, Mesquita LR (2014): Kinematic analysis of forelimb and hind limb joints in clinically healthy sheep. *BMC Vet Res* 10, 294
- Fierro LC, Bryant FC (1990): Grazing activities and bioenergetics of sheep on native range in Southern Peru. *Small Rumin Res* 3, 135–146



- Fishman LS (1982): Radiographic Evaluation of Skeletal Maturation: A Clinically Oriented Method Based on Hand-Wrist Films. *Angle Orthod* 52, 88–112
- Forriol F, Denaro L, Longo UG, Taira H, Maffulli N, Denaro V (2010): Bone lengthening osteogenesis, a combination of intramembranous and endochondral ossification: an experimental study in sheep. *Strategies Trauma Limb Reconstr* 5, 71–78
- Georgiadis AG, Rossow JK, Laine JC, Iobst CA, Dahl MT (2017): Plate-assisted Lengthening of the Femur and Tibia in Pediatric Patients. *J Pediatr Orthop* 37, 473–478
- Ghanem I, El Hage S, Diab M, Saliba E, Khazzaka A, Aftimos G, Dagher F, Kharrat K (2009): Radiofrequency Application to the Growth Plate in the Rabbit: A New Potential Approach to Epiphysiodesis. *J Pediatr Orthop* 29, 629–635
- Gladbach B, Pfeil J, Heijens E: Beinlängenausgleich und Achskorrekturen durch die perkutane Epiphysiodese nach Canale. In: Pfeil J, Siebert W, Janousek A, Josten C (Hrsg.): *Minimal-invasive Verfahren in der Orthopädie und Traumatologie*. Springer, Berlin, Heidelberg 2000, 263–268
- Gottliebsen M, Rahbek O, Poulsen HD, Møller-Madsen B (2013): Similar growth plate morphology in stapling and tension band plating hemiepiphysiodesis: A porcine experimental histomorphometric study. *J Orthop Res* 31, 574–579
- Green SA (1983): Complications of external skeletal fixation. *Clin Orthop Relat Res* 109–116
- Guesgen MJ, Beausoleil NJ, Leach M, Minot EO, Stewart M, Stafford KJ (2016): Coding and quantification of a facial expression for pain in lambs. *Behav Processes* 132, 49–56
- Häger C, Biernot S, Buettner M, Glage S, Keubler LM, Held N, Bleich EM, Otto K, Müller CW, Decker S, et al. (2017): The Sheep Grimace Scale as an indicator of post-operative distress and pain in laboratory sheep. *PLoS One* 12, e0175839
- Hahn JA, Witte TS, Arens D, Pearce A, Pearce S (2011): Double-plating of ovine critical sized defects of the tibia: a low morbidity model enabling continuous in vivo monitoring of bone healing. *BMC Musculoskelet Disord* 12, 214
- Hallett SA, Ono W, Ono N (2019): Growth Plate Chondrocytes: Skeletal Development, Growth and Beyond. *Int J Mol Sci* 20, 6009
- Hasler CC (2000): Leg-length discrepancy. Indication for equalization and importance of shortening procedures. *Der Orthopäde* 29, 766–774
- Haubruck P, Ober J, Heller R, Miska M, Schmidmaier G, Tanner MC (2018): Complications and risk management in the use of the reaming-irrigator-aspirator (RIA) system: RIA is a safe and reliable method in harvesting autologous bone graft. *PLoS One* 13, e0196051
- Heisterkamp J, van Hillegersberg R, IJzermans JN (1999): Critical temperature and heating time for coagulation damage: implications for interstitial laser coagulation (ILC) of tumors. *Lasers Surg Med* 25, 257–262
- Helsing AL (1988): Leg length inequality. A prospective study of young men during their military service. *Ups J Med Sci* 93, 245–253
- Hillebrand H, Sattelberger J, Gosheger G, Frommer A, Moller-Madsen B, Rahbek O, Gottliebsen M, Abood AA-H, Roedl R, Vogt B (2020): Comparison of Temporary Epiphysiodesis With RigidTacks™ and Blount-Staples in a Porcine Animal Model Using Magnetic Resonance Imaging. *J Orthop Res* 38, 946–953

- Ho L, Field RA, Russell WC, Riley ML, Ercanbrack SK, Williams FL (1989): Influence of gender, breed and age on maturity characteristics of sheep. *J Anim Sci* 67, 11
- Hobbs-Chell H, King AJ, Sharratt H, Haddadi H, Rudiger SR, Hailes S, Morton AJ, Wilson AM (2012): Data-loggers carried on a harness do not adversely affect sheep locomotion. *Res Vet Sci* 93, 549–552
- Högberg N, Hessle A, Lidfors L, Enweji N, Höglund J (2021): Nematode parasitism affects lying time and overall activity patterns in lambs following pasture exposure around weaning. *Vet Parasitol* 296, 109500
- Horn J, Steen H, Huhnstock S, Hvid I, Gunderson RB (2017): Limb lengthening and deformity correction of congenital and acquired deformities in children using the Taylor Spatial Frame. *Acta Orthop* 88, 334–340
- Ikurior SJ, Marquetoux N, Leu ST, Corner-Thomas RA, Scott I, Pomroy WE (2021): What Are Sheep Doing? Tri-Axial Accelerometer Sensor Data Identify the Diel Activity Pattern of Ewe Lambs on Pasture. *Sensors (Basel)* 21, 6816
- Iobst CA (2019): Intramedullary Limb-Lengthening: Lessons Learned. *JBJS Reviews* 7, e2
- Isaksson H, Comas O, van Donkelaar CC, Mediavilla J, Wilson W, Huiskes R, Ito K (2007): Bone regeneration during distraction osteogenesis: Mechano-regulation by shear strain and fluid velocity. *J Biomech* 40, 2002–2011
- Jäckle K, A B, V R, Hm L, S L, K T, Ka L, L B, Ak H (2020): Insufficient Stability of an Extramedullary Lengthening Device of the Tibia in Sheep. *CABI Agric Biosci* 10, 148–153
- Keshet D, Eidelman M (2017): Clinical utility of the Taylor spatial frame for limb deformities. *Orthop Res Rev* 2, 51–61
- Kessler P, Neukam FW, Wiltfang J (2005): Effects of distraction forces and frequency of distraction on bony regeneration. *British Journal of Oral and Maxillofacial Surgery* 43, 392–398
- Kim J, Breur GJ (2008): Temporospatial and kinetic characteristics of sheep walking on a pressure sensing walkway. *Can J Vet Res* 72, 50–55
- Koren L, Keren Y, Eidelman M (2016): Multiplanar Deformities Correction Using Taylor Spatial Frame in Skeletally Immature Patients. *Open Orthop J* 10, 71–79
- Lee DH, Ryu KJ, Song HR, Han S-H (2014): Complications of the Intramedullary Skeletal Kinetic Distractor (ISKD) in Distraction Osteogenesis. *Clin Orthop Relat Res* 472, 3852–3859
- Lienau J, Schell H, Duda GN, Seebeck P, Muchow S, Bail HJ (2005): Initial vascularization and tissue differentiation are influenced by fixation stability. *J Orthop Res* 23, 639–645
- Liu X, Kui H, Qian Z, Ren L (2021): Hoof Pressure Distribution Pattern of Blue Sheep During Walking on Different Slopes: A Subject-Specific Analysis. *Front Vet Sci* 8, 633509
- Lüllmann-Rauch R, Asan E: Taschenlehrbuch Histologie. 6. Auflage; Thieme, Stuttgart 2019
- Lyons RK, Machen RV (2000): Interpreting Grazing Behavior. *Texas A&M Agrilife Extension* 6
- Markel MD, Wikenheiser MA, Morin RL, Lewallen DG, Chao EY (1991): The determination of bone fracture properties by dual-energy X-ray absorptiometry and single-photon absorptiometry: a comparative study. *Calcif Tissue Int* 48, 392–399

- Martel J, Bueno A, Domínguez MP, Llorens P, Quirós J, Delgado C (2008): Percutaneous radiofrequency ablation: relationship between different probe types and procedure time on length and extent of osteonecrosis in dog long bones. *Skeletal Radiol* 37, 147–152
- Martini L, Fini M, Giavaresi G, Giardino R (2001): Sheep Model in Orthopedic Research: A Literature Review. *Comp Med* 51, 8
- Métaizeau JP, Wong-Chung J, Bertrand H, Pasquier P (1998): Percutaneous epiphysiodesis using transphyseal screws (PETS). *J Pediatr Orthop* 18, 363–369
- Mohammed AS, Anmut G, Urge M, Assefa G (2020): Grazing behavior, dietary value and performance of sheep, goats, cattle and camels co-grazing range with mixed species of grazing and browsing plants. *Vet Anim Sci* 10, 100154
- Moon SG, Kang HS, Hong S-H, Kim NR, Lee JW, Lim SD (2012): Chronologic Change in the Growth Plate After Radiofrequency-Induced Thermal Injury: MRI-Histologic Correlation. *AJR Am J Roentgenol* 198, W163–W172
- Morein G, Gassner S, Kplan I (1978): Bone Growth Alterations Resulting from Application of Co<sub>2</sub> Laser Beam to the Epiphyseal Growth Plates: An Experimental Study in Rabbits. *Acta Orthop* 49, 244–248
- Morton AJ, Rudiger SR, Wood NI, Sawiak SJ, Brown GC, Mclaughlan CJ, Kuchel TR, Snell RG, Faull RLM, Bawden CS (2014): Early and progressive circadian abnormalities in Huntington's disease sheep are unmasked by social environment. *Hum Mol Genet* 23, 3375–3383
- Moss ML, Noback CR (1958): A longitudinal study of digital epiphyseal fusion in adolescence. *Anat Rec* 131, 19–32
- Nafei A, Danielsen CC, Linde F, Hvid I (2000): Properties of growing trabecular ovine bone: Part I: Mechanical and physical properties. *J Bone Joint Surg Br* 82-B, 910–920
- Nesbitt RJ, Herfat ST, Boguszewski DV, Engel AJ, Galloway MT, Shearn JT (2014): Primary and Secondary Restraints of Human and Ovine Knees for Simulated In Vivo Gait Kinematics. *J Biomech* 47, 2022–2027
- Newman E, Turner AS, Wark JD (1995): The Potential of Sheep for the Study of Osteopenia: Current Status and Comparison with Other Animal Models. *Bone* 16, 277–284
- Ochsner PE, Baumgart F, Kohler G (1998): Heat-induced segmental necrosis after reaming of one humeral and two tibial fractures with a narrow medullary canal. *Injury* 29 Suppl 2, B1-10
- Oosterlinck M, Pille F, Sonneveld DC, Oomen AM, Gasthuys F, Back W (2012): Contribution of dynamic calibration to the measurement accuracy of a pressure plate system throughout the stance phase in sound horses. *Vet J* 193, 471–474
- Paley D (1990): Problems, obstacles, and complications of limb lengthening by the Ilizarov technique. *Clin Orthop Relat Res* 81–104
- Paley D (2015): PRECICE intramedullary limb lengthening system. *Expert Rev Med Devices* 12, 231–249
- Paley D (2016): Surgical reconstruction for fibular hemimelia. *J Child Orthop* 10, 557–583
- Paley D, Bhave A, Herzenberg JE, Bowen JR (2000): Multiplier Method for Predicting Limb-Length Discrepancy\*. *JBJS* 82, 1432

- Patkowski K, Pluta M, Lipiec A, Gregula-Kania M, Gruszecki TM (2019): Foraging Behavior Patterns of Sheep and Horses Under a Mixed Species Grazing System. *J Appl Anim Welf Sci* 22, 357–363
- Porter RM, Liu F, Pilapil C, Betz OB, Vrahas MS, Harris MB, Evans CH (2009): Osteogenic potential of reamer irrigator aspirator (RIA) aspirate collected from patients undergoing hip arthroplasty. *J Orthop Res* 27, 42–49
- Rahmann G: *Ökologische Schaf- und Ziegenhaltung - 100 Fragen und Antworten für die Praxis*. Bundesforschungsanstalt für Landwirtschaft, Institut für Ökologischen Landbau, Trenthorst 2007
- Ravaglioli A, Krajewski A, Celotti GC, Piancastelli A, Bacchini B, Montanari L, Zama G, Piombi L (1996): Mineral evolution of bone. *Biomaterials* 17, 617–622
- Rehman I, Smith R, Hench LL, Bonfield W (1995): Structural evaluation of human and sheep bone and comparison with synthetic hydroxyapatite by FT-Raman spectroscopy. *J Biomed Mater Res* 29, 1287–1294
- Reichert JC, Saifzadeh S, Wullschlegel ME, Epari DR, Schütz MA, Duda GN, Schell H, van Griensven M, Redl H, Hutmacher DW (2009): The challenge of establishing preclinical models for segmental bone defect research. *Biomaterials* 30, 2149–2163
- Richardson SS, Schairer WW, Fragomen AT, Rozbruch SR (2019): Cost Comparison of Femoral Distraction Osteogenesis With External Lengthening Over a Nail Versus Internal Magnetic Lengthening Nail. *J Am Acad Orthop Surg* 27, e430–e436
- Rosen MA, Beer KJ, Wiater JP, Davidson DD (1990): Epiphysiodesis by Electrocautery in the Rabbit and Dog. *Clin Orthop Relat Res* 256, 244–253
- Rosenthal DI (2006): Radiofrequency treatment. *Orthop Clin North Am* 37, 475–484, viii
- Rozbruch SR, Birch JG, Dahl MT, Herzenberg JE (2014): Motorized Intramedullary Nail for Management of Limb-length Discrepancy and Deformity. *J Am Acad Orthop Surg* 22, 403–409
- Runyan CM, Gabrick KS (2017): Biology of Bone Formation, Fracture Healing, and Distraction Osteogenesis. *J Craniofac Surg* 28, 1380–1389
- Schiborra F: *Das juvenile Schaf als Modelltier für orthopädische Studien: Untersuchungen an Sehne, Kreuzband, Meniskus und Gelenkknorpel während des Wachstums*. Vet. med. Diss. Hannover 2006
- Schumacher S: *Biochemische Marker des Knochenstoffwechsels nach Osteotomie - Das Schaf als Osteoporosemodell*. Vet. med. Diss. München 2007
- Seebeck P, Thompson MS, Parwani A, Taylor WR, Schell H, Duda GN (2005): Gait evaluation: a tool to monitor bone healing? *Clin Biomech (Bristol, Avon)* 20, 883–891
- Shiguetomi-Medina JM, Rahbek O, Abood AA-H, Stødkilde-Jørgensen H, Møller-Madsen B (2014): Thermal epiphysiodesis performed with radio frequency in a porcine model. *Acta Orthop* 85, 538–542
- Shim KS (2015): Pubertal growth and epiphyseal fusion. *Ann Pediatr Endocrinol Metab* 20, 8–12

- Silveira JCA da, Fonsêca V de FC, Furtado DA, Santos SGCG dos, Silva JA da, Pimenta Filho EC, Saraiva EP, Medeiros AN de (2018): Available space in feeders for housed sheep: social behavior and performance. *R Bras Zootec* 47
- Simpson AH, Kenwright J (2000): Fracture after distraction osteogenesis. *J Bone Joint Surg Br* 82, 659–665
- Sparks DS, Saifzadeh S, Savi FM, Dlaska CE, Berner A, Henkel J, Reichert JC, Wullschlegler M, Ren J, Cipitria A, et al. (2020): A preclinical large-animal model for the assessment of critical-size load-bearing bone defect reconstruction. *Nat Protoc* 15, 877–924
- Squires VR (1974): Grazing distribution and activity patterns of Merino sheep on a saltbush community in south-east Australia. *Appl Anim Behav Sci* 1, 17–30
- Stützle H, Hallfeldt K, Mandelkow H, Keßler S, Schweiberer L (1998): Knochenneubildung durch Knochenersatzmaterialien. *Orthopäde* 27, 118
- Synder M, Harcke H, Conard K, Bowen J (2001): Experimental epiphysiodesis: magnetic resonance imaging evaluation with histopathologic correlation. *Int Orthop* 25, 337–342
- Szymczuk VL, Hammouda AI, Gesheff MG, Standard SC, Herzenberg JE (2019): Lengthening With Monolateral External Fixation Versus Magnetically Motorized Intramedullary Nail in Congenital Femoral Deficiency. *J Pediatr Orthop* 39, 458–465
- Tanner JM, Davies PS (1985): Clinical longitudinal standards for height and height velocity for North American children. *J Pediatr* 107, 317–329
- Taylor WR, Ehrig RM, Heller MO, Schell H, Seebeck P, Duda GN (2006): Tibio-femoral joint contact forces in sheep. *J Biomech* 39, 791–798
- Tosun HB, Agir I, Gumustas S, Serbest S, Uludag A, Celik S (2016): Tibial Lengthening Using a Fixator-Assisted Lengthening Plate: A New Technique. *Trauma Mon* 21, e25340
- Vogt B, Gosheger G, Wirth T, Horn J, Rödl R (2020): Leg Length Discrepancy—Treatment Indications and Strategies. *Dtsch Arztebl Int* 117, 405–411
- Wei X, Hu M, Mishina Y, Liu F (2016): Developmental Regulation of the Growth Plate and Cranial Synchronosis. *J Dent Res* 95, 1221–1229
- Widmann RF, Amaral TD, Yildiz C, Yang X, Bostrom M (2010): Percutaneous Radiofrequency Epiphysiodesis in a Rabbit Model: A Pilot Study. *Clin Orthop Relat Res* 468, 1943–1948
- Xerogeanes JW, Fox RJ, Takeda Y, Kim H-S, Ishibashi Y, Carlin GJ, Woo SL-Y (1998): A Functional Comparison of Animal Anterior Cruciate Ligament Models to the Human Anterior Cruciate Ligament. *Ann Biomed Eng* 26, 345–352
- Yilgor C, Efendiyev A, Akbiyik F, Demirkiran G, Senkoylu A, Alanay A, Yazici M (2018): Metal Ion Release During Growth-Friendly Instrumentation for Early-Onset Scoliosis: A Preliminary Study. *Spine Deform* 6, 48–53
- Verwendung von Versuchstieren im Jahr 2018.  
[https://www.bmel.de/DE/Tier/Tierschutz/\\_texte/Versuchstierzahlen2018.html](https://www.bmel.de/DE/Tier/Tierschutz/_texte/Versuchstierzahlen2018.html);  
abgerufen am 31.03.2020

## Danksagung

Mein Dank gilt meiner Doktormutter Frau Prof. Dr. med. A.-K. Hell für die Möglichkeit zur Erstellung dieser Dissertation und wohlwollenden Begleitung im gesamten Verlauf dieser Arbeit, besonders bei den sich ergebenden Änderungen dieses Projektes.

Meinen Betreuerinnen Dr. Lena Braunschweig und Dr. Katja Lüders gilt mein herzlicher Dank für die Unterstützung bei der Erstellung der Graphiken und der Statistik. Die schnellen Antworten auf meine Fragen motivierten mich und Eure tatkräftige Unterstützung hat sehr zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen. Auch für die Zusammenarbeit mit Frau Dr. med. Katharina Jäckle und allen weiteren an den Operationen beteiligten Ärzt\*innen möchte ich mich bedanken. Bei den Tierpfleger\*innen sowie den Tierärztinnen der ZTE und den Ansprechpartnern vom Versuchsgut Rellichausen, möchte ich mich für die gemeinsame Arbeit mit den für diese Arbeit verwendeten Versuchstieren aufrichtig bedanken.

Des Weiteren danke ich Ramona Castro-Machguth und dem Team aus dem Labor der Unfallchirurgie, Orthopädie und Plastischen Chirurgie für die Unterstützung bei der Erstellung und der Färbung der histologischen Schnitte, sowie Frau U. Kant und Frau S. Ahlborn beim Polieren und Schleifen.

Die Unterstützung von PD Dr. Christian Dullin hat die Erstellung der  $\mu$ CT-Bilder sowie Nutzung des Lasermikrotoms und Anfertigung der histologischen Schnitte möglich gemacht. Auch Frau Sarah Garbode und Herrn Richter (LLS ROWIAK) sei in diesem Zusammenhang mein Dank ausgesprochen.

Für die Unterstützung bei der Erstellung und der Auswertung der MRT-Bilder danke ich Frau Tanja Otto und Herrn PD Dr. med. Johannes T. Kowallick.