

**Mechanische Untersuchung der Festigkeitsänderung  
von Spongiosaprobe des humanen Femurkopfes  
durch Zellbesiedelung**

**Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Zahnheilkunde**

**der Medizinischen Fakultät  
der Eberhard-Karls-Universität  
zu Tübingen**

**vorgelegt von  
Weng, Boris**

**2015**

**Dekan: Prof. Dr. I. Autenrieth**

**1. Berichterstatter: Professor Dr. T. Kluba**

**2. Berichterstatter: Privatdozent Dr. B. Rolauffs**

# Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis .....	2
1 Einleitung .....	5
1.1 Pathologischer Knochenverlust.....	7
1.1.1 Knochentumoren .....	7
1.1.2 Trauma.....	8
1.1.3 Prothesenlockerung / - infektion / Periprothetische Fraktur .....	9
1.2 Rekonstruktion von Knochendefekten .....	10
1.2.1 Chirurgische Rekonstruktion .....	14
1.2.2 Regenerative Medizin.....	18
1.2.3 Einsatz von Stammzellen in vivo .....	19
2 Problemstellung .....	22
3 Eigener Ansatz.....	24
3.1 Probenaufbereitung .....	24
3.2 Entwicklung Sägevorrichtung.....	24
3.3 Entwicklung Spannvorrichtung.....	25
3.4 Entwicklung Testprogramm.....	25
3.5 Mechanische Vorversuche .....	25
3.6 Auswertung .....	26
4 Ziel der Arbeit.....	26
5 Material und Methoden .....	27
5.1 Vorarbeiten .....	27
5.2 Humanes Material.....	29
5.2.1 Ethikkommission .....	30
5.2.2 Auswahl Testverfahren.....	30

5.2.3	Probenvorbereitung.....	31
5.3	Sägevorrichtung.....	39
5.3.1	Anforderungen .....	40
5.3.2	Konstruktion .....	41
5.3.3	Fertigung.....	48
5.4	Probenhalterung .....	51
5.4.1	Anforderungen .....	51
5.4.2	Konstruktion .....	51
5.4.3	Fertigung.....	54
5.5	Zellkultur .....	56
5.5.1	Besiedelungsablauf.....	57
5.6	Zug- Druck- Prüfmaschine MTS.....	60
5.6.1	Spezifikationen.....	61
5.6.2	Steuerung.....	62
5.7	Datenerfassung.....	64
5.7.1	Probenprotokoll .....	64
5.7.2	Messwerte.....	65
5.8	Datenauswertung.....	67
5.8.1	Auswertungsformular .....	67
5.8.2	Vorgehensweise.....	68
5.9	Prüfprozedur .....	69
5.9.1	Prozedureditor.....	71
5.10	Vorversuchsreihe .....	73
5.11	Stückzahlbestimmung.....	76
5.12	Micro-CT .....	77
6	Ergebnisse.....	82

6.1	Hauptversuche .....	82
6.1.1	Druckfestigkeit.....	82
6.1.2	E-Modul.....	84
6.2	Langzeitversuche .....	85
6.2.1	Druckfestigkeit.....	85
6.2.2	E-Modul.....	86
7	Diskussion.....	87
7.1	Material und Methoden .....	88
7.2	Schlussfolgerung .....	100
7.3	Ausblick.....	101
8	Zusammenfassung .....	104
9	Glossar.....	107
	Literaturverzeichnis .....	109
	Abbildungsverzeichnis.....	115
	Tabellenverzeichnis.....	118
	Erklärung zum Eigenanteil.....	119
	Danksagung .....	121
	Lebenslauf.....	122
	Anhang.....	I
	Konstruktionszeichnungen .....	I
	Probenstempel .....	I
	Probenhalterung.....	II
	Sägevorrichtung .....	III
	Prüfplan Ethikkommission.....	VII
	Digitaler Anhang .....	XII

# 1 Einleitung

Der vitale Knochen ist ein sich ständig dynamisch veränderndes Gebilde. Er unterliegt Umbauvorgängen, die die Knochenstruktur permanent erneuern und äußeren Umständen anpassen [1 S. 165] [2 S. 145] [3 S. 7]. Dieses Remodeling und damit auch Abbau oder Aufbau von Knochengewebe ist abhängig von Körpergewicht, mechanischer Belastung, Alter, Ernährung, Durchblutung, therapeutischen Eingriffen, Stoffwechsel und hormonellem Status [4] [1 S. 165] [2 S. 144-149] [3 S. 13] [5 S. 689]. Dies ist Ausdruck der hohen Anpassungsfähigkeit des Skelettes an sich ändernde äußere und innere, physiologische und pathologische Bedingungen sowie Teil der permanenten Erneuerung und Heilung des Körpers.

Der Organismus setzt im Skelettaufbau – unter Einbeziehung aller Einflussfaktoren – die exakte Umsetzung und permanente Anpassung eines hochentwickelten Leichtbausystems um. Versuche zeigen, dass durchschnittlich über 70 % der Biegemomente auf einen Knochen nicht durch das Körpergewicht, sondern den Muskelzug in Verbindung mit seinen Hebelverhältnissen entstehen [6 S. 721]. Im Finite Elemente Modell durchgeführte Simulationen demonstrieren, dass selbst die Geometrie einer knöchernen Struktur erst mit der Einbeziehung der muskulären Einflüsse korrekt errechnet werden kann [7 S. 75-81]. So entsteht ein hochangepasstes Konstrukt, das Kraftübertragung mit Material- und Gewichtersparnis kombiniert [8 S. S. 400]. Dieses Prinzip zeigt sich anschaulich an der Makroarchitektur des menschlichen Gesichtsschädels. Die knöchernen Struktur ist hier im Sinne einer hohlraum- und pfeilerorientierten Gestaltung – u.a. durch Stirn- und Nebenhöhlen, Jochbögen, Jochbeinpfeiler, Stirnnasenpfeiler und Flügelgaumenpfeiler – streng nach diesen Parametern optimiert [1 S. 5 u. 337]. Das mikroarchitektonische Korrelat zu dieser Strategie findet sich in der Organisation der Spongiosa in Trajektorien [9 S. 1]. Durch die den statischen und dynamischen Belastungen entsprechende Ausrichtung und Massenanhäufung der Trabekel bilden sich Zug- und Drucktrajektorien [3 S. 4] [2 S. 147]. Dadurch entsteht eine effiziente Kraftübertragung zwischen den

Kraftangriffsstellen wie Gelenkflächen, Muskelansätzen und -ursprüngen und über die Metaphyse auf die Diaphyse. Im gesunden Körper wird das Vorliegen eines Gleichgewichtes zwischen Auf- und Abbauvorgängen beschrieben [1 S. 165] [3 S. 7] [10]. Durch das Alter und nicht zuletzt durch damit einhergehende innere und äußere Einflüsse kommt es jedoch mit steigendem Lebensalter zu einer Verschiebung dieses Gleichgewichtes zugunsten des Abbaus [3 S. 7].

Große interindividuelle Streuungen beweisen, dass eben nicht nur das Alter, sondern die individuelle Summation der äußeren und inneren Einflüsse das Einsetzen des Knochenabbaus steuert. Auch wenn die Individuen starke Unterschiede hinsichtlich Einsetzen einer Reduktion der Muskelkraft und deren Fortschritt zeigen, lässt sich zum Beispiel anhand der Greifstärke zeigen, dass im Mittel ab der vierten Lebensdekade ein Abbau der Muskelkraft einsetzt [11 S. M82-M88].

Durch in vivo - Studien unter Einsatz verschiedener bildgebender Verfahren konnte eine Korrelation zwischen Alter und Abnahme der Knochenmineraldichte nachgewiesen werden. Ebenso konnte eine Abnahme der Trabekelanzahl sowie eine Zunahme der Trabekelabstände über dem Alter gezeigt werden [12 S. 114] [13 S. 1948].

Vereinfacht kann gesagt werden, dass es ab dem Zenit der Knochenmasse bei der dritten Lebensdekade zu einer Altersatrophie von ca. 1 % pro Lebensjahr kommt [3 S. 7]. Dies äußert sich in Entkalkung, Kortikalisverdünnung und Erweiterung der Trabekelabstände bei Verminderung der Trabekelanzahl [14 S. 28].

Abgesehen von durch Altersatrophie hervorgerufenen Folgeerscheinungen wie erhöhte Frakturanfälligkeit im hohen Alter, beinhaltet dieser Mechanismus keinen Krankheitswert [14 S. 28] [10]. Da Knochenverluste pathologischer Genese im Allgemeinen sehr viel schwerwiegendere Defekte zur Folge haben, soll im Weiteren das Hauptaugenmerk auf diese gelegt werden.

## **1.1 Pathologischer Knochenverlust**

### **1.1.1 Knochentumoren**

Die primären Knochentumoren stellen mit nur ca. 1 % aller humanen Tumoren – einen relativ kleinen Teil dar [15 S. 430] [16 S. 114]. Dennoch kommt ihnen in Bezug auf die Entstehung von Knochendefekten eine große Rolle zu.

Benigne Tumore werden zwar primär nur beobachtet, es muss aber eine Entfernung angedacht werden, wenn rezidivierende Beschwerden u.a. durch verdrängendes Wachstum, Schwellung und Schmerzen auftreten oder pathologische Frakturen auch bei nur langsamer Ausdehnung drohen. In Zweifelsfällen kann – als wichtiges diagnostisches Mittel – eine Biopsie indiziert sein. Im Falle einer Exzisionsbiopsie wird der Tumor in toto entfernt [15 S. 436 ff]. Da der Tumor komplett entfernt wird und die Resektionsgrenzen auch hier im Gesunden liegen sollten, entsteht so trotz Gewebeschonung nach dem Prinzip „so viel wie nötig, so wenig wie möglich“ ein der Tumorausbreitung entsprechender Defekt. Auch solche Defekte können eine die Knochenstabilität gefährdende Ausdehnung erreichen und machen eine entsprechende Rekonstruktion nötig [2 S. 230f].

Maligne Tumoren können aus jedem Gewebe des Bewegungsapparates hervorgehen [15 S. 457]. Es kann sich jedoch vor allem im Erwachsenenalter um sekundäre Tumoren handeln [2 S. 226]. Diese im Rahmen von Tumorstreuung entstandenen Metastasen können potentiell jedem Gewebe des Organismus entstammen, daher muss nicht immer der Primärtumor bekannt sein.

Die am häufigsten auftretenden malignen primären Knochentumoren sind das Osteosarkom mit 20 – 40 % und das medulläre Plasmozytom mit ca. 50 % aller malignen Knochentumoren.

Bei malignen Tumoren steht eine ausschließliche Beobachtung nicht als Therapieoption. Die Behandlungsplanung läuft heute an entsprechenden Zentren über Therapieprotokolle und über interdisziplinäre Tumorboards ab [16

S. 116]. Diese entscheiden über die Anwendung der zur Verfügung stehenden Maßnahmen wie Chemotherapie, Radiotherapie und Operation [2 S. 231]. Diese Maßnahmen sind je nach Fall untereinander kombinierbar oder einzeln anwendbar. Bei der operativen Therapie liegen die wesentlichsten Unterschiede in der Radikalität des Vorgehens.

Die Rekonstruktion nach solchen Eingriffen ist ein weites Feld, da Defektausdehnung und Weichgewebsbeteiligung mannigfaltige Ausprägungsmöglichkeiten aufweisen. Erfahrung seitens des Operateurs wie Vorgehen aus Endoprothetik, Transplantationsmedizin, biologischer Rekonstruktion, Weichgewebsdefektdeckung und Ablativtechnik ist nötig.

### **1.1.2 Trauma**

Der überwiegende Teil aller Frakturen bringt keinen therapielevanten Knochenverlust mit sich, da es sich um einen reinen Kontinuitätsverlust handelt. Dennoch gibt es Fälle, in denen die knöchernen Integrität derart zerstört wurde, dass eine Reposition der Fragmente nicht möglich ist. Im Extremfall kann es zur völligen primären Nichtwiederherstellbarkeit ganzer skeletaler Segmente kommen [17] [18]. Bei offenen Frakturen ist das initiale Débridement zur Vermeidung von muskuloskeletalen Infektionen unerlässlich. Hierbei werden nicht nur Fremdkörper vollständig entfernt, sondern auch offensichtlich nekrotisches Weich- und Knochengewebe [19 S. 22]. Hierbei kann es zwangsläufig notwendig werden, Knochenverluste in Kauf zu nehmen. Zur Wiederherstellung von durch Traumata entstandenen Defekten werden je nach Art und Ausprägung die in Abschnitt 1.2 aufgeführten Therapien solitär oder in Kombination angewandt [19] [17] [18].

### **1.1.3 Prothesenlockerung / - infektion / Periprothetische Fraktur**

#### **Prothesenlockerung**

Durch Faktoren wie mechanische Belastung, periprothetische Knochenatrophie, Unverträglichkeit des Prothesenmaterials, materialabriebbedingte partikelinduzierte Osteolyse und Knochenumbauaktivitäten kann es über längere Tragedauer zur aseptischen Lockerung einer Endoprothese kommen. Dieser Aspekt wird besonders bei jüngeren und aktiveren Patienten deutlich [20 S. 844]. Osteoporose, Geschlecht, sowie Alter und Aktivität des Patienten sind demnach Risikofaktoren [21 S. 656]. Abgesehen von der Funktionseinschränkung durch die Schmerzsymptomatik entsteht ein erhöhtes Risiko für periprothetische Frakturen [22] [23 S. 95] [24 S. 36] [25 S. 1885]. An freibeweglichen Prothesenschaftenden ergeben sich – besonders in Verbindung mit durch Prothesenwanderung ausgedünnten Knochenbereichen – Spannungsspitzen. Diese stellen Prädilektionsstellen für Frakturen dar.

#### **Periprothetische Fraktur**

Häufiger betroffene Patientengruppen sind Frauen, Patienten über 70 Jahren und Patienten mit Revisionsprothese. Als Risikofaktoren gelten unter anderem Osteoporose, Osteopenie, Rheumatoide Arthritis, Neuromuskuläre Erkrankungen, Lockerung, Infekt, zementfreie Implantationstechnik und eine zusätzliche Prothese am selben Knochen. Zu unterscheiden sind die intraoperativen Frakturen, deren Risiko durch den „Press-Fit“ bei unzementierter Versorgung etwas höher ist und die postoperativen Frakturen. Ähnlich wie bei den Osteoporosefrakturen, sind 75 % der postoperativen Frakturen – wenn eine Implantatlockerung vorliegt – auf ein Niedrigenergietrauma zurückzuführen. Mit steigender Anzahl der Totalendoprothesen kommt es auch immer häufiger zu diesen Frakturtypen. [26 S. 688f] [24 S. 36].

## **Protheseninfektion**

Es wird eine Frühinfektion und eine späte oder chronische Infektion unterschieden. Die Frühinfektion erlaubt den Erhaltungsversuch der Prothese unter konservativer Therapie. Die Spätinfektion erfordert ein weitaus radikaleres Vorgehen, der im Abschnitt – 1.2.1 Endoprothetik – näher beschrieben wird [27 S. 242].

Bei allen drei Komplikationen wird oft ein Implantatwechsel nötig. Für die meisten dieser Fälle ist jedoch die Implantatlockerung verantwortlich [20 S. 844] (siehe 1.2.1. Endoprothetik).

## **1.2 Rekonstruktion von Knochendefekten**

Knochendefekte können einen Umfang erreichen, der es dem Organismus verunmöglicht, die Kontinuität aus eigenem Regenerationspotential wiederherzustellen.

Je älter die Patienten, desto schlechter die Knochenqualität und je größer der Defekt, desto schwieriger ist die adäquate Versorgung [28 S. 78]. Um eine Heilung dennoch zu erreichen, kann es helfen, Transplantate zu verwenden. Die Knochentransplantation wird genutzt, um den Defekt direkt zu beseitigen beziehungsweise eine Leitschiene und bestenfalls Induktion für die Bildung von neuem Knochen zu bieten oder die Bildung eines suffizienten Implantatlagers überhaupt erst zu gestatten. Anders als bei der Endoprothetik soll sekundär ein Remodeling stattfinden, um so die physiologische belastungsgerechte Heilung zu gewährleisten [28 S. 78]. Die hierfür geeigneten Möglichkeiten sollen im Weiteren gezeigt werden.

**Autologes / Autogenes Transplantat:** Hierbei wird einem Individuum an der Spenderstelle Knochen entnommen, welcher demselben Individuum an der Empfängerstelle wieder implantiert wird. Ein wesentlicher Vorteil bei dieser Methode liegt darin, dass durch die Einheit von Spender und Empfänger eine

immunologische Abstoßungsreaktion verunmöglicht wird (vgl. Eigenblutspende). Außerdem befindet sich das Transplantat in vitalem Zustand ohne die Gefahr einer Erregerübertragung. Im vitalen Transplantat sind die wichtigsten Faktoren für eine komplikationslose Osseointegration vorhanden. Diese sind Osteokonduktion, Osteoinduktion und vitale Knochenzellen sowie gespeicherte Wachstumsfaktoren. Desweiteren bietet es natürlich vollständige Resorbierbarkeit, was eine Integration in das Remodeling erlaubt. Diese Eigenschaften machen das autologe Transplantat zur effektivsten Transplantatform. Keines der sonstigen Knochenersatzmaterialien weist alle Faktoren gemeinsam auf [29] [30 S. 79] [28 S. 78] [31 S. 482] [32 S. 756 ff] [33 S. 761]. Da für die Entnahme vorzugsweise Stellen in der skeletalen Struktur gewählt werden, die einen Strukturverlust durch die Entnahme statisch tolerieren, gibt es einige klassische Entnahmestellen. Diese sind vor allem Crista iliaca anterior und posterior. Außerdem ist eine Entnahme auch an Scapula sowie der im Rahmen von Hüftgelenksendoprothetik ohnehin zu entfernende Femurkopf gängig. Auch aus dem Femurschaft kann mittels Reamer-Irrigator-Aspirator-System Spongiosa gewonnen werden [34 S. 446 ff]. Häufig beinhalten die genannten Bereiche einen hohen Anteil an Spongiosa. Dies begünstigt durch höhere Stammzellichte sowie bessere Durchblutung eine schnellere Einheilung. Sie besitzen daher höchste biologische Wertigkeit [19 S. 38] [35 S. 352]. Probleme bei der Verwendung von autologem Knochen bestehen vor allem bei Kindern und älteren Patienten in der begrenzten Verfügbarkeit und der erhöhten Komplikationsrate. Weiter wirken sich der nötige zusätzliche Operationssitus, die verlängerte Operationszeit und die höheren Kosten negativ aus [28 S. 78]. Die Komplikationsrate – durch Infektionen, gestörte Wundheilung, Hämatome, Nachblutungen, Verletzungen der Nerven, Frakturen und persistierende Schmerzen – wird in der Literatur zwischen 0,75 % und 44 % angegeben und ist ventral am Becken höher als dorsal [31 S. 483] [32 S. 758]. Eine sehr aufwendige Variante der autologen Knochentransplantation ist das gefäßgestielte Transplantat.

**Allogenes / Homologes Transplantat:** Es handelt sich um ein, der gleichen Spezies, aber einem anderem Individuum entnommenes Implantat [28 S. 97]. Diese Transplantate weisen den wesentlichen Unterschied auf, dass eine Abstoßungsreaktion primär möglich wäre. Im Fall von vital transplantierten strukturellen Allografts, wie beispielsweise komplette Gelenkbereiche, werden aus diesem Grund teilweise immunsupprimierende Medikamente nötig [18] [28 S. 90 ff]. Für kleinere – nicht strukturelle – Knochentransplantate wird dies allerdings umgangen, indem nur die intakte Knochenhartschicht mit devitalisiertem Weichgewebe eingesetzt wird. Da durch die Devitalisierung die zellbiologischen Grundlagen für eine Immunreaktion stark abgeschwächt sind, kann der Organismus durch Anbau und Umbau des eingebrachten Hartgewebes dieses osteointegrieren und so zu einer vitalen Funktion zurückführen. Bei reiner Transplantation von Knochen spielt die immunologische Abstoßung ohnehin eine untergeordnete Rolle, da rein kollagenes Gewebe kaum Abstoßungsreaktionen provoziert [3 S. 49]. Häufigste Entnahmestelle ist der bei der Totalendoprothetik des Hüftgelenkes anfallende Hüftkopf [3 S. 49]. Die Heilung verläuft hier in Ermangelung vitaler Zellen und Wachstumsfaktoren deutlich langsamer als bei der autologen Transplantation [28 S. 78]. Dennoch bieten die Transplantate gute Leitschiene-funktion [3 S. 49]. Bei großen Transplantaten bleibt der vollständige Umbau zum Teil aus. Hierdurch ist auch das Risiko einer Infektion höher. Obwohl die Lagerung in tiefgefrorenem Zustand die Devitalisierung der zellulären Strukturen zur Folge hat, ist eine Übertragung von Krankheitserregern wie Viren und Prionen möglich. Aus diesem Grund existieren spezielle chemische, thermische sowie physikalische Sterilisations- und Desinfektionsverfahren [19 S. 40] [28 S. 78] [33 S. 762]. Eine strenge Anamnese vor und Testung auf HIV, Hepatitis B und - C sowie Syphilis ist vor und nach Transplantatentnahme umzusetzen [36 S. 2].

**Xenogenes / heterologes Transplantat:** Hierfür wird Knochen einer anderen Spezies verwendet. Es kann sich sowohl um tierisches als auch pflanzliches Gewebe handeln. Folgerichtig aus dem schon Beschriebenen kommt hier nur die Nutzung des Hartgewebes in Frage. Gängige Spezies sind das Schwein

und Rind. Xenogenes Material stellt die Basis für einige alloplastischen Materialien dar. Es wird in denaturierter Form als Granulat, solide Körper, Membranen oder Schwämmen genutzt. Durch Demineralisation werden flexible Materialien gewonnen, die weitgehend aus Kollagenlyophilisat bestehen. Durch Kalzinierung oder Pyrolyse werden poröse Granulate oder Blöcke unter Erhalt der natürlichen Porenstruktur hergestellt [33 S. 762].

**Alloplastik:** Bei den alloplastischen Materialien handelt es sich um synthetische bzw. so stark denaturierte Materialien, dass es sich nicht mehr um biologisches Material im eigentlichen Sinne handelt [33 S. 762]. Vorteile hierbei sind die wegfallende Spendermorbidity und eine beinahe unbegrenzte Verfügbarkeit. Nachteil ist, dass zwar teilweise einzelne positive Eigenschaften des autologen Knochens erzielt werden können, jedoch bis dato nie Osteokunduktion, Osteoinduktion und vollständige Resorbierbarkeit erreicht wurden [33 S. 763]. Es gibt inzwischen Allografts auf Basis von Keramik, Polymeren, Kalziumsulfaten, Korallen und bovinem Material [28 S. 102].

Hydroxylapatitkeramiken werden als Ergänzung oder Substitution von Knochenmarksaspirat oder autologem Knochen in Block- oder Granulatform verwendet (z.B. Endobon<sup>®</sup>, Pyrost<sup>®</sup> und Bio-Oss<sup>®</sup>) [30 S. 74].

### **Artifizielle Knochenersatzmaterialien**

Diese Werkstoffe sind vor allem aus der Endoprothetik und durch die Osteosynthese schon länger bekannt.

Gängige Metalle und Legierungen sind im Fall von Endoprothesen CoCrMo, CrNiMo, CoCrWNi und CoNiCrMo. In der Endoprothetik kommt Titan aus Kosten- und Stabilitätsgründen seltener zur Anwendung [14 S. 65]. Bei der Osteosynthese und Wiederherstellungschirurgie dafür umso öfter [33 S. 766].

In die Klasse der Polymere wird der bei vielen Operationen – zu Zwecken der Fixation, als Platzhalter oder Interimslösung – verwendete Kalziumphosphat haltige Knochenzemente auf Basis des Polymers Polymethylmetacrylat

(PMMA) eingeordnet (z. B. NORIAN SRS®) [17 S. 126]. Weiter kommen Polyäthylen Polyethylenterephthalat (PET), Polyurethan (PU), Polypropylen (PP), Silikone und Polytetrafluorethylen (PTFE) zur Anwendung [33 S. 766] [3 S. 49]. Besondere Bedeutung besitzt das Polyäthylen. Es wird für die Herstellung von Gelenkpfannen von Endoprothesen verwendet [3 S. 49].

### **1.2.1 Chirurgische Rekonstruktion**

Standardmäßig werden heute im Wesentlichen vier autologe Rekonstruktionstechniken angewandt [34 S. 446].

Den „Goldstandard“ stellen die Auffüllung von Defekten mittels Beckenkammspongiosa oder einem kortikospongiösen Span aus dem Beckenkamm dar [35 S. 350 ff]. Weitspannige Defekte können mit mikrovaskulär angeschlossenen, autogenen Transplantaten überbrückt werden. Für den Röhrenknochen steht die Distraktionsosteogenese als elegante, aber sehr zeitintensive Methode zur Verfügung [30 S. 72] [17 S. 125] [37 S. 215-218] [28 S. 78]. Bei der Distraktionsosteogenese wird durch sehr langsames Auseinanderbewegen zweier Knochensegmente mittels meist externer Fixation die stückweise Neubildung von Knochen im Segmentspalt erreicht [19 S. 41].

#### **Endoprothetik**

Der Gelenkersatz durch Endoprothesen ist heute an nahezu allen Gelenken möglich. Als bekanntestes Beispiel gilt es, die Versorgung der Oberschenkelhalsfraktur durch die Hüftendoprothese zu nennen. Hinzu kommen aber noch viele weitere, wie die Versorgung von komplexeren Unfallschäden, Gelenkdysplasien, degenerativen Gelenkerkrankungen aus dem rheumatischen Formenkreis und die Tumorendoprothetik. Mit 350000 endoprothetischen Primärversorgungen des Hüft- und Kniegelenkes allein im Jahr 2010 ist diese Art von Gelenkersatz ein sehr häufiger Eingriff und zählt – nicht zuletzt deshalb – mittlerweile zu den erfolgreichsten Operationen überhaupt [20 S. 844] [3 S. 144]. Hierbei kommen alloplastische Materialien wie Metalle, Kunststoff, Keramik und Silikon zur Anwendung. Das Indikationsfeld ist

breit. Die Gelenkpfanne wird durch eine künstliche Pfanne ersetzt, die am Beispiel der Hüftendoprothese am Acetabulum nach dessen positionsgerechter Ausfräsung mittels Formfräser befestigt wird. Der Hüftkopf wird im Markraum des Femurs mit seinem Schaft verankert. Hierfür wird der Markraum vorher mit – entsprechend der Schaftform – geformten Raspeln aufbereitet. Hierfür gibt es zwei verschiedene Prinzipien. Es gibt die Möglichkeit, den Schaft mittels Knochenzement im Implantatlager zu verankern. Da der Knochenzement nach längerer Zeit allerdings zu Versprödung und Abnutzung neigt, birgt diese Methode das erhöhte Risiko einer Implantatlockerung. Insbesondere bei jüngeren Patienten wird das Implantat daher häufig in das Lager eingeschlagen und so eine „Pressfit-Verankerung“ erreicht und damit das etwas erhöhte Risiko für periprothetische Frakturen in Kauf genommen [14 S. 65] [3 S. 144].

Da die Implantatlockerung jedoch ebenfalls einen Risikofaktor für periprothetische Frakturen darstellt, bleibt zu diskutieren ob die „Pressfit-Verankerung“ eine dahingehende Risikoerhöhung darstellt [21 S. 657].

Die häufigste Lösung bei den Hüftendoprothesen stellt die Schaftprothese dar. So zum Beispiel auch bei der Femurkopfnekrose, die eine Indikation darstellen kann, wenn andere Therapiemöglichkeiten ausscheiden [38 S. 61]. Die zementfreie Schaftprothese stellt hier den Goldstandard dar. Zwar gibt es Ansätze, einen Hemioberflächenersatz, Vollständigen Oberflächenersatz oder die Kurzschaftprothese zu verwenden, doch gibt es im Vergleich sehr viel weniger Studien hierzu und es wird ein erhöhtes Lockerungsrisiko diskutiert [39 S. 46-52].

Bei Deformationen durch Nichtanlagen oder ähnliches, müssen häufig Diskontinuitäten im Hartgewebe geschlossen oder ein besseres Implantatlager geschaffen werden. Bei der Hüftendoprothese bietet sich hierfür in vielen Fällen der im gleichen Eingriff ohnehin anfallende Femurkopf als Transplantatquelle für autologe Spongiosa an [3 S. 49]. Dies hat natürlich den Vorteil, dass kein zweiter Operationssitus eröffnet werden muss.

Die Problematik bei der Revisionsprothetik liegt im Wesentlichen dabei, dass – durch die Kompromittierung des umgebenden Knochens, durch Osteolyse und

die Entfernung der primären Prothese – nach Implantat- und Zemententfernung ein größerer Knochendefekt besteht als bei Erstimplantation [36 S. 1].

Je nach Defektart und -ausprägung kommen alle gängigen Fixationsmaterialien wie Zerklage und Platten zur Anwendung. Bei stärkeren Knochenverlusten wird eine zusätzliche autologe oder allogene Knochentransplantation empfohlen [40 S. 994]. Versuche einer nicht chirurgischen Therapie zeigten unbefriedigende Ergebnisse [25 S. 1883f] [24 S. 42].

Bei späten bzw. chronischen Infektionen von Endoprothesen gilt es, durch ein radikales Vorgehen in erster Linie die Infektionssanierung zu erreichen. Hierzu muss der komplette Biofilm entfernt werden. Dadurch ist die Explantation der Prothesenteile mit konsequentem Débridement unter Entfernung aller Zementreste und des kompletten nekrotischen Gewebes nötig. Die Defekthohlräume werden anschließend aufgefüllt und mittels Antibiogramm ermitteltem Antibiotikum lokal therapiert. So können die Voraussetzungen für eine spätere erneute Implantatversorgung geschaffen werden.

### **Rekonstruktion nach Tumorentfernung**

Bei – durch benigne Tumoren entstandenen – Defekten ist meist die direkte Auffüllung mittels Beckenkammpongiosa möglich [15 S. 442]. Jedoch kann auch bei benignen bzw. semimalignen Tumoren nach Kürettage eine zweizeitige Versorgung des Defektes angezeigt sein. Hilfreiches Mittel zur Bestimmung des Weiteren Vorgehens bietet eine Schnellschnittdiagnostik anhand der genauen Bestimmung der Tumorart und der Resektionsränder [16 S. 114]. Bei Tumorarten, die eine sehr hohe Rezidivrate aufweisen wird der Defekt primär nicht mit empfängereigener Spongiosa sondern mittels Knochenzement versorgt. Nach Rezidivfreiheit von zwölf Monaten bis zu zwei Jahren kann der Zement gegen Spongiosa ausgetauscht werden. Dieses Vorgehen hat auch den Hintergrund, dass ein autologes Implantat so nicht dem Risiko ausgesetzt wird, durch ein Rezidiv zerstört zu werden. Desweiteren ist die radiologische Diagnostik eines Rezidivs auf diese Weise einfacher. So vorgegangen wird beispielsweise beim Riesenzelltumor und beim Chondroblastom [2 S. 246] [15 S. 444] [15 S. 447].

Die tumorähnlichen Läsionen werden sehr ähnlich therapiert wie die benignen Tumoren. Bei der zu diesen gehörenden aneurysmatischen Knochenzyste findet das zweizeitige Vorgehen ebenfalls auf Grund der – mit ca. 20 % – hohen Rezidivgefahr Anwendung [15 S. 453]. Im Falle der juvenilen/solitären Knochenzyste wird nach Kürettage häufig direkt mit Spongiosa gefüllt. Allerdings sind bei überschaubarer, die Stabilität nicht gefährdender Ausdehnung sowohl eine spontane Rückbildung ggf. nach Injektion von Kortikosteroid haltiger Lösung als auch die Druckentlastung mittels Hohlschraube möglich [15 S. 451] [2 S. 246f] [3 S. 119] [14 S. 97].

Durch die operative Entfernung maligner Tumoren entstandene Läsionen werden im Wesentlichen ebenfalls mittels der bereits beschriebenen Techniken versorgt. Diese Tumore besitzen im Gegensatz zu den benignen Tumoren die Eigenschaft zu streuen und nicht nur verdrängend, sondern invasiv zu wachsen. Hinzu kommt, dass bei vielen Tumorarten wie beispielsweise dem Chondrosarkom weit im Gesunden reseziert werden muss [15 S. 462] [2 S. 241]. Daher kommt es bei den malignen Tumoren häufiger zu sehr ausgedehnten Defekten. Abgesehen von den herkömmlichen Techniken sind deshalb auch die Versorgung mittels Endoprothesen, alloplastischen Materialien oder Kombinationen der verschiedenen Methoden indiziert [41 S. 1272] [42 S. 459].

Seltener wird auch die Transplantation kompletter durch Organspende gewonnener Gliedmaßen bzw. funktioneller Gruppen vorgenommen. Dies kann bei sehr jungen Patienten eine Alternative zur Endoprothetik darstellen, bringt jedoch den Nachteil einer notwendigen Immunsuppression mit sich [17].

Als letzte Rückzugsmöglichkeit kann die Amputation betrachtet werden. Trotz fortschrittlicher Orthesentechnik darf hier natürlich nicht mehr von einer Rekonstruktion gesprochen werden [17 S. 125].

## 1.2.2 Regenerative Medizin

Auch wenn die Idee, Zellen zur Heilung von Krankheiten einzusetzen schon 1931 aufkam, ist die regenerative Medizin ein relativ junges Gebiet. Auf Grund der hervorragenden Plastizität von Stammzellen aus dem Knochenmark, zeigen sich neue Möglichkeiten zur Organregeneration [43 S. A 1663]. In der Therapie von Leukämien ebenso wie beim Hodgkin-Lymphom und anderen wird sie in Form der Stammzelltransplantation schon seit längerem erfolgreich durchgeführt, wodurch sie hohen Bekanntheitsgrad erlangen konnte. Aktuell wird in vielen Fachgebieten an der stammzellbasierten Therapie geforscht. Einige Vorreiter sind die Therapie von Herz-Kreislauf-Erkrankungen, hier besonders die des Herzinfarktes, neurologische Erkrankungen wie die Parkinsonsche Krankheit, Rückenmarksverletzungen und die Alzheimersche Krankheit, Diabetes mellitus und nicht zuletzt orthopädische Erkrankungen [44 S. 5809]. Im Bereich der Orthopädie wird bei der Therapie des Multiplen Myeloms – bereits seit einiger Zeit – ebenfalls die Stammzelltransplantation eingesetzt [15 S. 465].

Einer der neueren Schwerpunkte in der regenerativen Medizin ist die Anwendung des Tissue engineering für die alternative Versorgung knöcherner Defekte. Dabei sollen die natürlichen Heilungsvorgänge des Körpers genutzt werden. Bei der Versorgung von Hartgewebsdefekten bildet hierfür das Zusammenspiel von osteogenen Zellen, Wachstumsfaktoren und Scaffolds auf Basis von Biomaterialien als Leitschiene die Grundlage [41 S. 1274]. Hierbei wird auf das Potential der Knochenmarksstammzellen gebaut, sich zu Osteoprogenitorzellen und deren Nachfolger differenzieren zu können und so die Knochenregeneration zu unterstützen [10]. Das gleiche Prinzip gilt auch für andere Gewebe wie z.B. das Knorpelgewebe an Gelenkoberflächen [44 S. 5810].

Für den gezielten Einsatz ist es nötig, die Knochenmarks-MSCs zusammen mit einer biokompatiblen Matrix im Sinne eines Scaffolds an die Stelle des Defektes zu bringen [44 S. 5810]. Eine solche Matrix sollte im Idealfall vollständig resorbierbar und so zu integrieren sein, dass zumindest eine übergangsstabile

Belastbarkeit erreicht wird. Die Anwendung von steuernden Wachstumsfaktoren gilt als weiterer Schritt zu einer beschleunigten Defektheilung. Der zuerst entdeckte und bekannteste Stoff aus dieser Gruppe ist das bone morphogenetic protein (BMP). Später wurde erkannt, dass es sich hierbei um eine ganze Gruppe an Proteinen handelt und diese der Familie der TGF zugeordnet werden können. Auch wenn das BMP fähig ist, die komplette Kaskade der Osteoinduktion zu aktivieren, zeigt dies deutlich, dass es sich nicht um ein einzelnes Protein handelt, sondern dass die Steuerung der MSCs einer komplizierten Symphonie von Steuerungsmechanismen unterliegt [30 S. 74]. Des Weiteren gibt es eine große Zahl an Stoffen, deren Wirksamkeit auf Vermehrung und Differenzierung in vivo nachgewiesen werden konnte. Das Verständnis für MSCs ist nach wie vor in vitro wesentlich weiter fortgeschritten, als in vivo. Daher fehlt der Nachweis für die Funktion von vielen Substanzen in Hinblick auf eine praktische Anwendung noch weitgehend [10] [44 S. 5811-5814].

### **1.2.3 Einsatz von Stammzellen in vivo**

Auf Grund oben genannter Nachteile der autologen Transplantation wird bereits seit ca. vier Jahrzehnten an Alternativen zu den autologen Spenderknochen geforscht [30 S. 72].

Mittlerweile gibt es aussagekräftige Erkenntnisse in der Praktischen Anwendung von Stammzellen zur Defektrekonstruktion.

Bei steroidinduzierter Hüftkopfnekrose im Frühstadium wurde im Tierversuch das Potential der Stammzelltherapie getestet. Die mesenchymalen Stammzellen wurden hierfür durch Aspiration aus dem Synovialspalt gewonnen und mittels Alginat zu einem Granulat weiterverarbeitet. Das Differenzierungspotential der Zellen wurde zuvor in vivo durch Proteinanalysen bestätigt. Durch Kombination von core decompression und Applikation des Stammzell-Alginat-Granulates konnte eine Förderung der Regeneration im Kaninchenmodell beobachtet werden. Im Tierversuch kamen radiologische und histologische

Untersuchungen zum Einsatz. Eine Verknöcherung konnte bereits sechs Wochen nach Zellapplikation deutlich erkannt werden. Die Anwendung von core decompression plus Stammzellen zeigte eine bessere Wirkung gegen den Kollaps des Femurkopfes als die alleinige core decompression. Auch das Volumen an neu gebildetem Knochen war deutlich höher als ohne Stammzelleinsatz. Die positiven Ergebnisse dieser Methodik konnten mehrfach nachgewiesen werden [45] [46].

In einer weiteren Studie wurde bei Patienten mit Hüftkopfnekrose ebenfalls die Stammzelltherapie untersucht. Hier wurde die Applikation von unbehandeltem Knochenmark im Vergleich zu isolierten Knochenmarksstammzellen jeweils nach core decompression getestet. Die Anwendung von isolierten Stammzellen zeigte sich als sicher und ermöglichte bessere Ergebnisse als das unbehandelte Knochenmark. Sowohl radiologisch als auch funktionell zeigte der Einsatz von isolierten Stammzellen signifikant bessere Ergebnisse [47]. Auch andere Studien ergaben positive Erfahrungen mit dieser Methode [48] [49].

Damit ließen sich sowohl im Tierversuch als auch im klinischen Versuch die hervorragenden angiogenen und osteogenen Eigenschaften von Stammzellen nachweisen.

Die verschiedenen Möglichkeiten, Stammzellen zu gewinnen ergeben jeweils spezifische Vor- und Nachteile. Durch eine Knochenmarksentnahme an der Spina iliaca erhöht sich die Eingriffsdauer und Patientenmorbidity. Bei anschließender Isolation der enthaltenen Stammzellen erhöht sich zwar – wie oben erwähnt – die Effektivität der Therapie, jedoch erhöht sich die Dauer des Eingriffes zusätzlich. Schließlich müssen hierfür zellbiologische Verfahren außerhalb des OP's in Anspruch genommen werden. Hierzu gehören das Abzentrifugieren der Stammzellen, das Suspendieren des Pellets, die Zellzählung, ein Brauchbarkeitstest und das erneute Abzentrifugieren und Suspendieren in einem Schutzmedium. Diese Aufbereitung nimmt ca. eine Stunde in Anspruch [47 S. 224]. Im Gegensatz hierzu bietet die Gewinnung der benötigten Stammzellen über die Aspiration von Synovia aus einem

Gelenkspalt den Vorteil, dass sie unabhängig vom eigentlichen Eingriff möglich ist. Auch die Patientemorbidity ist vergleichsweise gering [45].

Der Hintergrund der hier dokumentierten Arbeit ist der Gedanke, ein Hybrid aus autologem zellulären Gewebe und homologem Hartgewebe zu generieren, um ein Transplantat im Sinne des tissue engineering zu generieren. Es wird angestrebt, die normalerweise als Allograft avital applizierten Spenderknochen als Scaffold zu nutzen und mit empfängereigenen Stammzellen zu besiedeln. Die vollständige Resorbierbarkeit bleibt so erhalten, eine exzellente Leitschiene-Funktion ist gegeben und spendereigene osteogene Zellen sind vorhanden. Drei der wesentlichsten Voraussetzungen für die knöchernen Heilung sind damit durch das Transplantat gegeben. Hierdurch wird erwartet, dass der Organismus beschleunigt mit der Osseointegration beginnen kann. So würde sich die Heilungsphase verkürzen, das Abstoßungsrisiko verringert und eine schnellere Remobilisierung könnte erfolgen.

## 2 Problemstellung

Für die Zellbesiedelung ist es nötig, die Proben mehrere Tage in einem Zellkulturmedium zu lagern. Durch das hierbei bestehende zumindest flüssige, gegebenenfalls sogar aggressive Milieu ist eine Veränderung der strukturellen Festigkeit des Spenderknochens denkbar. So wäre tendenziell eine Absenkung der Festigkeit zu erwarten. Dieser Effekt könnte allerdings durch andere Mechanismen – nicht zuletzt die Besiedelung durch die Stammzellen und deren Differenzierung – ausgeglichen oder sogar überkompensiert werden. Dadurch wäre theoretisch eine Steigerung der Festigkeit bis hin zur Versprödung nicht undenkbar.

Solide Transplantate müssen meist durch Schrauben, Drähte oder sonstiges Osteosynthesematerial, am Bestimmungsort zur Rekonstruktion des Defektes fixiert werden. Notwendig ist dies, um die – für die Knochenheilung notwendige – Ruhigstellung des Knochenersatzmaterials sowie eine Primärstabilität zu erreichen. Nur so lässt sich die angestrebte Frühmobilisation der operierten Patienten ermöglichen. Die Kenntnis der lokalen Knochenqualität sowie der Knochenqualität eines Transplantates ist daher für den Operateur immer von Relevanz [50 S. 1]. Aus diesem Grund ist es von Interesse, ob und gegebenenfalls in welche Richtung sich die mechanischen Eigenschaften verändern.

Potenzielle Komplikationen durch eine Festigkeitsverringering wären strukturelle Haltbarkeitsprobleme. Diese können während des Eingriffes zum Tragen kommen, jedoch auch erst im Anschluss durch eine erst verzögerte mögliche Belastbarkeit und Mobilisation. Durch eine massiv gesteigerte Festigkeit sind Probleme bei der spanenden Bearbeitbarkeit – beispielweise beim Anpassen der Geometrie und beim Einbringen der Verschraubungen – zu vermuten. Im Extremfall ist an eine potenzielle Gefahr von Sprödbrüchen – gleichfalls während des Eingriffes sowie bei anschließender Belastung – zu denken.

Es stellt sich also die Frage, ob durch das zellbiologische Verfahren eine Festigkeitsänderung auftritt, die einen Einfluss auf die Verarbeitbarkeit oder Belastbarkeit haben könnte.

Die Arbeit soll zur Abklärung dieser Fragestellung dienen und so die mögliche Einsetzbarkeit, aus praxisbezogener Sicht, überprüfen.

### **3 Eigener Ansatz**

Da sich von biologischer Seite her das in den Vorversuchen angewandte Verfahren zur Zellbesiedelung als erfolgreich erwiesen hat (siehe 5.1), soll dieses unverändert weiter zur Anwendung kommen. Auch die Verwendung von Knochenproben aus dem Femurkopf soll in ähnlicher Form fortgeführt werden.

Die gewonnenen Femurköpfe werden zu zwei symmetrischen Proben zugesägt. Eine der beiden wird zellbesiedelt, die andere bleibt unbehandelt. Zur Ermittlung der mechanischen Festigkeit werden die Proben in einer computergesteuerten Zug-/Druck-Prüfmaschine der Firma MTS fixiert und, unter Aufzeichnung von Kraft und Verformung, bis über die Bruchlast hinaus belastet. Folglich handelt es sich hierbei um eine zerstörende Prüfung, was bedeutet, dass anschließend aus mechanischer Sicht keine weiteren Erkenntnisse mehr aus den Fragmenten gezogen werden können. Die gewonnenen Werte werden statistisch ausgewertet, so dass eine Aussage bezüglich der Abweichung der erfassten Werte zwischen unbesiedelter und besiedelter Probe möglich wird.

Um den Ansatz verfolgen zu können, sind einige wesentliche Teilschritte zu bearbeiten.

#### **3.1 Probenaufbereitung**

Es werden Sägeproben durchgeführt, um Möglichkeiten für eine reproduzierbare Konfektionierung zu entwickeln. Dies sind auch die Vorbereitungen, mittels derer die aus den vorhandenen Knochenspenden zuverlässig erreichbare Probengröße festgestellt werden soll.

#### **3.2 Entwicklung Sägevorrichtung**

Es muss eine kontinuierliche geometrische Qualität der Proben gewährleistet werden, wobei es notwendig ist, eine Vorrichtung zu konstruieren und zu

bauen, die sowohl die Anforderungen einer Führungslehre als auch einer Schablone in sich vereint. Essenziell sind hierbei in erster Linie Genauigkeit und Verschleißfestigkeit. Da die Sägearbeiten im OP-Saal unter sterilen Bedingungen stattfinden, aber auch Hygienefähigkeit sowie problemlose Handhabung.

### **3.3 Entwicklung Spannvorrichtung**

Um die Knochenproben für das Aufbringen der Versuchskraft in der Maschine zu verankern, muss eine Spannvorrichtung konstruiert und erstellt werden. Diese muss austauschbar an der Maschinenaufnahme adaptiert werden können und die Proben bewegungsfrei und ohne die Gefahr einer Vorschädigung während des gesamten Versuchsablaufs fixieren.

### **3.4 Entwicklung Testprogramm**

Bei der für die Studie verwendeten Prüfmaschine MTS 858 Mini Bionix<sup>®</sup> II handelt es sich um eine computergesteuerte, voll programmierbare Vierachsmaschine. Auch wenn für die gegebene Untersuchung nur eine Achse verwendet wird, ergeben sich viele mögliche Belastungsformen oder Abfolgen. Die Einarbeitung in Handhabung der Maschine und Programmierung der Steuerungssoftware stellt einen Teilbereich der Arbeit dar. In Frage kommende Prüfprozeduren müssen gefunden, programmiert und getestet werden.

### **3.5 Mechanische Vorversuche**

Eine Versuchsreihe, die Aufschluss über die Ausrichtung der Trabekelverlaufsrichtung und Belastungsform bieten soll, wird den Hauptversuchen vorgeschaltet. Dadurch sollen die Belastungsrichtung auf den Knochen sowie die Prüfprozedur durch die Prüfmaschine – die die geringste Ergebnisstreuung verursachen – gefunden werden. Außerdem soll über eine

statistische Auswertung der Vorversuchsdaten die Fallzahl bestimmt werden, die nötig ist, um eine signifikante Aussage über die Hauptversuchsreihe treffen zu können.

### **3.6 Auswertung**

Aus den durch die Vor- und Hauptversuche gewonnenen Daten müssen verwertbare Parameter gewonnen werden, die die Festigkeit repräsentieren. Entsprechend geeignete Kenngrößen müssen gefunden werden. Für die Datenaufbereitung ist es notwendig, ein möglichst automatisiertes Auswertungsschema zu erarbeiten, so dass die erhaltenen Ergebnisse in gebündelter Form der statistischen Auswertung zugeführt werden können.

## **4 Ziel der Arbeit**

Die ermittelten Festigkeitsunterschiede innerhalb der einzelnen Probenpaare sollen statistisch signifikant über die Gesamtanzahl der Probenpaare zu einer Abschätzung des Einflusses der Lagerung im Zellmedium auf die Belastbarkeit führen. Damit soll die Verwendbarkeit des behandelten Knochens aus rein mechanischer Sicht im operativen Vorgehen abgeschätzt werden. Dies kann als Basis und Argument herangezogen werden, um weiteren Forschungs- und Entwicklungsaufwand abzusichern und zu rechtfertigen.

## **5 Material und Methoden**

### **5.1 Vorarbeiten**

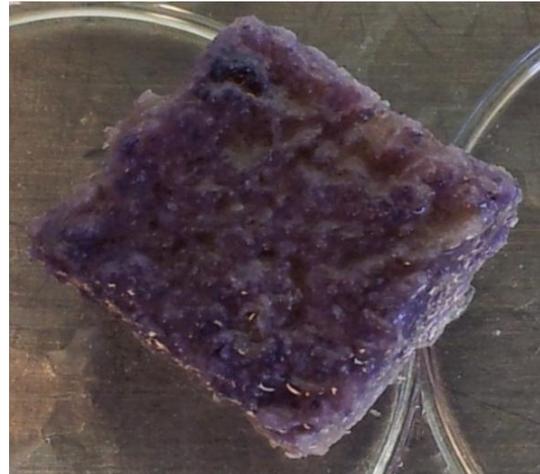
Bei verschiedenen orthopädischen Eingriffen besteht die Möglichkeit, Knochenmark inklusive der entsprechenden Stammzellen zu gewinnen, bzw. es wird ohnehin zwangsläufig gewonnen [3 S. 49]. Das zum UKT gehörige Institut für Klinische und Experimentelle Transfusionsmedizin (IKET) bearbeitet ein breites Spektrum an Forschungsschwerpunkten mit starker Gewichtung der Zellbiologie. Einen wesentlichen Teilbereich stellt hier die Stammzellforschung dar. Unter anderem aus diesen Gründen besteht sowohl zu Untersuchungs- als auch zu Forschungszwecken eine langjährige Zusammenarbeit zwischen der Orthopädischen Abteilung der Universitätsklinik Tübingen und dem IKET.

Im Rahmen dieser Zusammenarbeit entstand eine Reihe von Vorversuchen, in denen die Besiedelung von humanen, durch Tiefkühlung devitalisierten Allografts untersucht wurde. Bei diesen Versuchen konnte eine Zellbesiedelung erreicht und nachgewiesen werden. Die Besiedelung wurde durch Standardverfahren der Zellbiologie durchgeführt.

Der Nachweis fand qualitativ mittels Proliferations-Assay, Lichtmikroskopie, Rasterelektronenmikroskopie sowie mittels Mitose-Tracking statt. Quantifizierende Methoden wurden in dieser Versuchsreihe nicht angewandt. Zu den genannten Versuchen gibt es bisher keine Veröffentlichung.



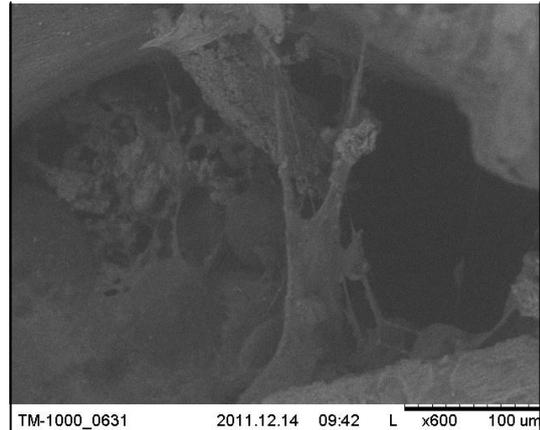
**Abb. 1: Probe unbesiedelt**  
Herkunft IKET<sup>1</sup>



**Abb. 2: Probe nach Besiedelung**  
Nachweisfärbung mit  
Proliferationsassay  
Zwei Wochen Besiedelungszeit  
Herkunft IKET<sup>2</sup>



**Abb. 3: Zellkolonie histologisch**  
HE-Färbung Vergrößerung x5  
Fünf Tage Besiedelungszeit  
Herkunft IKET<sup>3</sup>



**Abb. 4: Zelle REM**  
Vergrößerung x600  
Fünf Tage Besiedelungszeit  
Herkunft IKET<sup>4</sup>

<sup>1</sup> Mit freundlicher Genehmigung des Institut für Klinische und Experimentelle Transfusionsmedizin.

<sup>2</sup> Mit freundlicher Genehmigung des Institut für Klinische und Experimentelle Transfusionsmedizin.

<sup>3</sup> Mit freundlicher Genehmigung des Institut für Klinische und Experimentelle Transfusionsmedizin.

<sup>4</sup> Mit freundlicher Genehmigung des Institut für Klinische und Experimentelle Transfusionsmedizin.

Die Orthopädische Universitätsklinik Tübingen besitzt ein integriertes Biomechaniklabor, in dem Forschungsarbeiten zu biomechanischen Fragestellungen erfolgen. Zur technischen Ausstattung gehören unter anderem ein Bewegungssimulator zur Vermessung von Gelenkbewegungen, ein Kuka-Industrieroboter zum Aufbringen von – in Größe und Richtung – definierten Kräften sowie zwei Zug-Druck-Prüfmaschinen.

Nachdem der Nachweis für die erfolgreiche Besiedelung erbracht wurde und die Erfahrung sowie Ausstattung auf dem Gebiet der mechanischen Untersuchung gegeben sind, konnte durch die Zusammenarbeit der beiden Einrichtungen eine erfolgreiche Studie mit sowohl zellbiologischen als auch biomechanischen Inhalten gestartet werden.

## **5.2 Humanes Material**

Bei dem Versuchsmaterial handelt es sich um humane Hüftköpfe. Während der Implantation von Hüftgelenksendoprothesen werden diese durch Absetzen gewonnen und in einer Knochenbank zur späteren Transplantation eingelagert. Aufgrund der Übertragungsgefahr von Virus- oder Prionerkrankungen gibt es strenge Auflagen für die Verwendung von freien / nicht konservierten allogenen Knochentransplantaten [1 S. 443]. Ausgehend von den Richtlinien zum Führen einer Knochenbank [51], dürfen die für diese Studie verwendeten Femurköpfe nicht zur Transplantation genutzt werden. Deshalb würde das Gewebe – ohne die Einbeziehung in eine Studie – ohne weiteren Nutzen verworfen werden. Durch Verwendung der von der Klinik vorgesehenen Entsorgungswege für humanes Material (Biomechaniklabor der Orthopädischen Klinik) geschieht dies nun erst im Anschluss an die Untersuchung.



**Abb. 5: Femurkopf**  
Tiefgefroren. Links oben abgesetztes  
Ligamentum capitis femoris

### **5.2.1 Ethikkommission**

Die Arbeit wurde mittels Prüfplan (siehe Anhang) der Ethik-Kommission an der Medizinischen Fakultät der Eberhard-Karls-Universität und am Universitätsklinikum Tübingen vorgelegt und genehmigt. Die zugehörige Projektnummer ist 271/2012BO2.

### **5.2.2 Auswahl Testverfahren**

Es soll die mechanische Veränderung im Material erfasst werden. Dazu ist es nötig, eine passende, zuverlässig erfassbare Kenngröße auszuwählen. In der Werkstoffkunde gibt es diverse gängige mechanische Kenngrößen, die über ihre spezifische Methode gemäß ihrer Belastungsform ermittelt werden [9 S. 6]. Die wohl am häufigsten benutzte und bekannteste Prüfmethode ist der Zugversuch.

Um einen Zugversuch durchführen zu können, müsste eine Spannfläche von suffizienter Länge oder eine Möglichkeit zur Verschraubung an den Proben

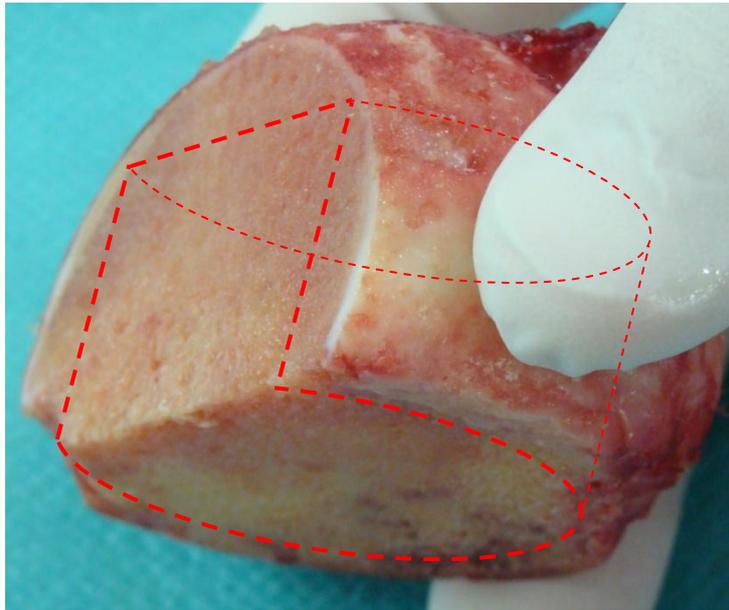
vorhanden sein. Der Spannungsbereich müsste räumlich durch Abstand und geometrisch durch Querschnittsverringern von der Sollbruchstelle getrennt werden, so dass Spannungsbereich und die dort induzierten Kräfte durch die Klemmung vom Bruchbereich ausreichend entkoppelt sind. Dies würde sehr große Probenlängen erfordern. Da zur Probengewinnung jedoch nur die maximalen Abmessungen der Spongiosa des Femurkopfes zur Verfügung stehen, ist dies nicht möglich. Auch alternative Testmethoden wie Biegeversuch oder Torsionsversuch wären mit den vorhandenen Materialabmessungen schlecht durchführbar.

Aus diesem Grund fällt die Wahl auf den Druckversuch. Des Weiteren ist der Druckversuch das gängigste Testverfahren zur Gewinnung von Festigkeitswerten von Knochenproben [9] [52] [53]. Dieser ist mit dem Zugversuch eng verwandt. Im Unterschied zum Zugversuch wird lediglich die Bewegungsrichtung umgekehrt. Es kommt nicht zu einer Zerreißen, sondern zu einem Stauchungsbruch. Da die Proben hierbei komprimiert werden, geschieht die Kraftübertragung auf das Gewebe an den horizontalen Auflageflächen der Proben. Das heißt, es muss keine Probenlänge oder spezielle Geometrie zur Kraftübertragung vorhanden sein. Lediglich ein seitliches Verrutschen der Proben ist durch eine Sicherung zu verhindern. Die so ermittelte Kenngröße ist die Druckfestigkeit, welche mit der in der Werkstoffkunde als Standard geltenden Zugfestigkeit sehr gut korreliert [53 S. 571]. Diese Kenngröße spiegelt die Festigkeit eines Werkstoffes ideal wider. Aus demselben Versuch kann zusätzlich der Elastizitätsmodul als Kennwert für die Steifigkeit des Werkstoffes gewonnen werden. Auch diese Kenngröße ist in dem hier behandelten Zusammenhang gängig [9].

### **5.2.3 Probenvorbereitung**

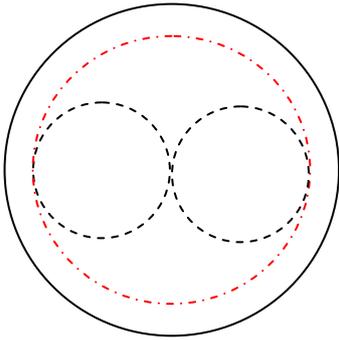
Der Femurkopf kann näherungsweise als sphärisch angenommen werden. Als nutzbare Querschnittsfläche kann nur die Fläche verwendet werden, die über die Probenhöhe nicht die sphärische Oberfläche durchdringt. Deshalb und aufgrund der oberflächlichen Knorpel- und Kompaktaschicht ergibt sich eine

nutzbare Grundfläche, die kleiner ist als der Außendurchmesser des Femurkopfes. Knorpel- und Kompaktaschicht sollen nicht in das Probenvolumen einbezogen um möglichst homogene Spongiosaprobe zu erhalten.



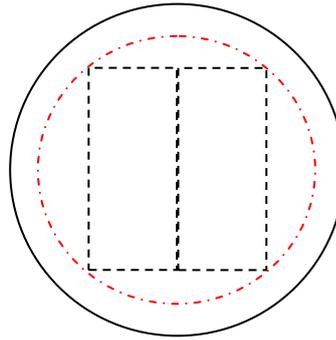
**Abb. 6: Nutzbares Volumen/ Grundfläche**  
Randständige Kortikalis und Knorpelschicht gut sichtbar

Es ist möglich, mit einem Drepanbohrer zylindrische Proben aus dem Knochenmaterial zu entnehmen [9 S. 5]. Dieses Vorgehen hat den Vorteil, dass die Probenquerschnittsflächen aller Proben automatisch identisch sind. Dabei handelt es sich demnach um ein schnelles Verfahren, welches die Entnahme reproduzierbar identischer Proben bietet. Alternativ können mittels pneumatischer Pendelsäge quaderförmige Proben zugesägt werden.



**Abb. 7: Zylinderform**

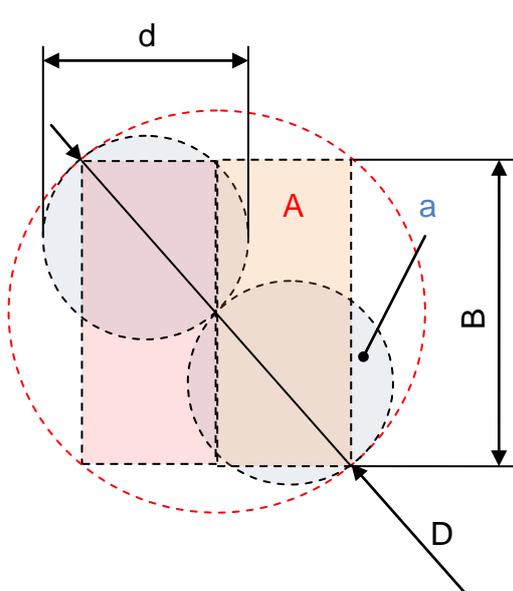
Durchgezogen: Umfang Femurkopf  
 Gestrichelt: Umfang der Proben  
 Rot gestrichelt: Nutzbarer Querschnitt



**Abb. 8: Quaderform**

Durchgezogen: Umfang Femurkopf  
 Gestrichelt: Umfang der Proben  
 Rot gestrichelt: Nutzbarer Querschnitt

Interessant ist hier also, welche Methode mehr Materialausnutzung zulässt. Um dies zu untersuchen, wird die folgende Berechnung angestellt:



$$(1) d = \frac{D}{2}$$

$$(2) a = 2 \times \frac{\pi}{4} \times d^2 \quad (1) \text{ in } (2) \rightarrow a = 2 \times \frac{\pi}{4} \times \left(\frac{D}{2}\right)^2$$

$$\text{mit } D = 1 \rightarrow \underline{a = 0,393}$$

$$(3) D = B \times \sqrt{2} \rightarrow (4) B = \frac{D}{\sqrt{2}}$$

$$(5) A = B^2 \quad (4) \text{ in } (5) \rightarrow A = \left(\frac{D}{\sqrt{2}}\right)^2 = \frac{D^2}{2}$$

$$\text{mit } D = 1 \rightarrow \underline{A = 0,5}$$

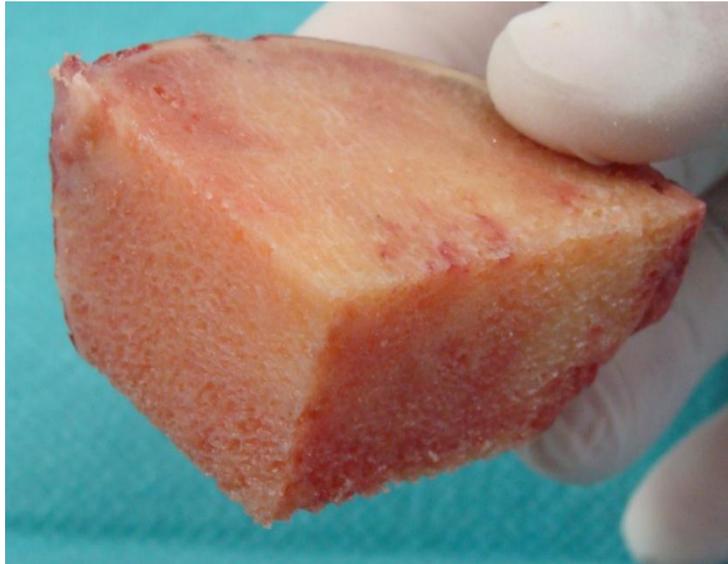
**Abb. 9: Querschnittsflächen Vergleich**

Rot gestrichelter Kreis: Nutzbarer Querschnitt  
 Blaue Fläche **a**: Gesamtfläche der zylindrischen Proben  
 Rote Fläche **A**: Gesamtfläche der quaderförmigen Proben  
 Die Sägeschnittbreiten werden vernachlässigt

Zum Zweck der Vergleichbarkeit wird für die Berechnung ein fiktiver einheitenloser Wert gleich eins für D eingesetzt. Für den runden Querschnitt ergibt sich damit eine Gesamtfläche von 0,393, für den quadratischen von 0,5. Dies zeigt, dass die quaderförmigen Proben eine ca. 20 % größere Grundfläche besitzen als die zylindrischen. Da es von Vorteil ist, eine möglichst große Querschnittsfläche zu erreichen, um so Gewebeinhomogenitäten auszumitteln, fällt die Wahl auf gesägte Proben mit quaderförmigem Querschnitt.

Um die geringstmögliche Streuung innerhalb der Probenpaare zu erreichen, muss untersucht werden, welche Orientierung innerhalb des Femurkopfes die symmetrischste Verteilung der anisotropen Strukturen ergibt. Es muss also die am besten geeignete Lage der Schnitte für den Probenzuschnitt definiert werden.

Beim Femurkopf handelt es sich um eine komplex belastete Struktur. Dies kann zurückgeführt werden auf die verschiedenen Lastfälle während verschiedener Bewegungsmuster sowie seine geometrische Anbindung an den Femur. Da sich knöchernen Strukturen generell ihren Belastungen entsprechend entwickeln, spiegelt sich diese Komplexität auch in der knöchernen Architektur des Femurkopfes wider [54 S. 1] [1 S. 165] [2 S. 145] [3 S. 7]. Diese Anisotropie lässt sich schon anhand des makroskopischen Erscheinungsbildes auf der Schnittfläche durch einen Femurkopf erahnen [9 S. 3].



**Abb. 10: Trabekelstruktur**

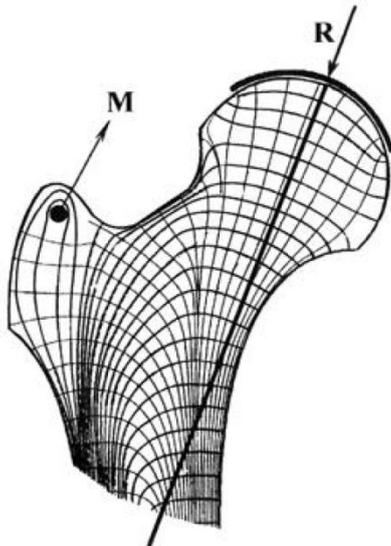
Oben gelegene Fläche = parafrontalschnitt  
 Links oben: Ansatz des Ligamentum capitis femoris  
 Fokal optisch dichtere Spongiosa als peripher  
 Die Trabekelrichtung auf oben gelegener Fläche ist als linear zu erahnen

Die reine Dichte der knöchernen Areale lässt sich jedoch schlecht in Relation zu deren Festigkeit setzen [53 S. 574] [9 S. 13]. Trotzdem lässt sich der optische Eindruck der Anisotropie auch durch eine Abhängigkeit der Festigkeit von der Belastungsrichtung nachweisen [9 S. 2] [52 S. 237]. Vertikal belastete Proben erwiesen sich um ca. 27,5 % stabiler als horizontal belastete [9 S. 13].

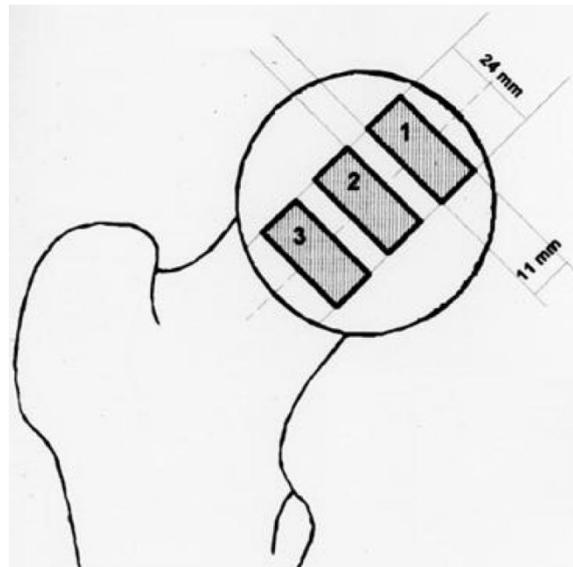
Hohe Absolutwerte bewirken, dass die messgenauigkeitsbedingte Streuung abnimmt. Zudem wurde auch an anderer Stelle bereits von höherer Korrelation zwischen dichteren Strukturen berichtet [54 S. 4]. Dies spricht also für die vertikale Orientierung und Testung der Proben. Allerdings bleibt die aus der Knochenstruktur kommende Streuungsgefahr die höher zu bewertende. Daher müssen weitere Betrachtungen angestellt werden.

In dem hier interessanten Bereich liegt die Hauptbelastungsrichtung – resultierend aus Körpergewicht und Muskelzug – entsprechend Abb. 11 angegeben [9 S. 3]. Auch bei Spannungsuntersuchungen an zweidimensionalen Modellen konnten in diesem Bereich erhöhte Spannungen nachgewiesen werden [9 S. 3]. Einen weiteren Erkenntnisgewinn bot eine

Studie zum Nachweis der Abnahme der Festigkeit entlang dieser Achse [9 S. 3]. Es war möglich, eine Abnahme der Festigkeit von proximal nach distal nachzuweisen. Dies gelang durch Entnahme und mechanische Untersuchung von Proben aus den in Abb. 12 zu sehenden Bereichen [9 S. 10].



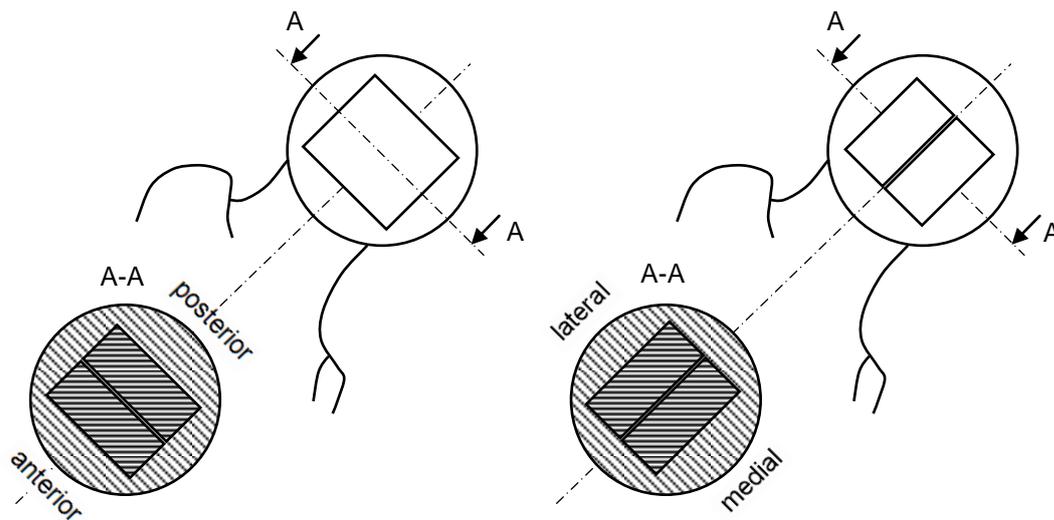
**Abb. 11: Hauptbelastungsrichtung**  
Herkunft [9 S. 3]



**Abb. 12: Entnahmestellen**  
Herkunft [9 S. 4]

Unter dem Gesichtspunkt der symmetrischen Probenstruktur wäre eine Anordnung wie in Abb. 12 für die Proben dieser Studie nicht zielführend. Eine um 90° gedrehte Anordnung in paralleler Anordnung zur Hauptbelastungsrichtung erscheint sinnvoller, da so der auftretende Festigkeitsgradient in beiden Proben symmetrisch vorliegt und hierdurch keine Erhöhung der Streuung zustande kommt. Auch diese Betrachtung deutet also auf eine im weitesten Sinne vertikale Ausrichtung.

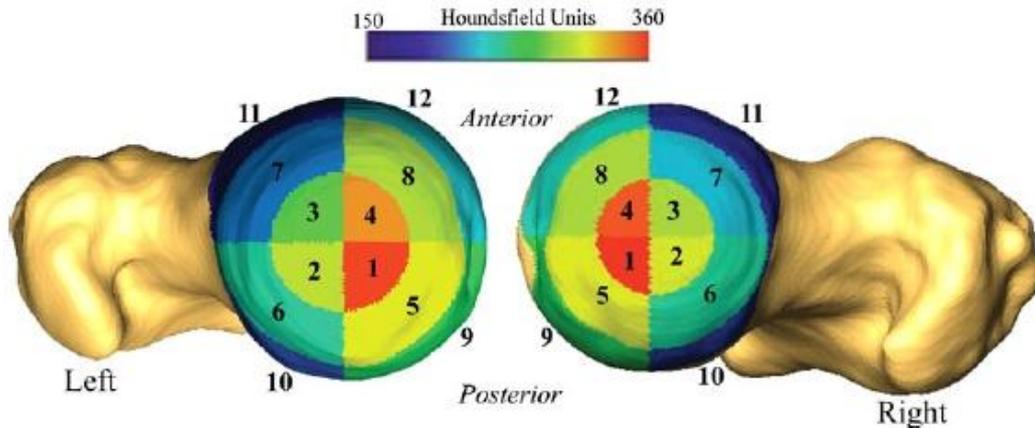
Nach der Klärung der Achslage bleibt noch die Frage, ob eine anterior-posteriore oder medial-laterale Ausrichtung zu bevorzugen ist.



**Abb. 13: Probenausrichtung ant.-post.**  
 Schnittdarstellung A-A  
 Schnittausrichtung Draufsicht  
 axial zu Collumachse

**obenpausrichtung medial-lateral**  
 obenpaar in Schnittdarstellung A-A  
 :hrittausrichtung Draufsicht axial zu  
 )llumachse

Es existiert eine Untersuchung zur Symmetrieverteilung der röntgenologischen Knochendichte. Diese bezieht sich zwar ausschließlich auf den subchondralen Bereich innerhalb von fünf Millimetern unter der Gelenkoberfläche, zeigt jedoch eindeutige Ergebnisse [54 S. 4 ff]. Die markantesten Bereiche liegen innerhalb der gewählten Probengeometrie. Es besteht eine gewisse Wahrscheinlichkeit, dass sich die gefundenen Verhältnisse in die Tiefe fortsetzen.



**Abb. 15: Radiologische Knochendichte**

Segmentzonen 1-12

Dichtewerte (Hounsfield Units) über die jeweilige Zone gemittelt

Herkunft [54 S. 4]

Abb. 15 zeigt übersichtlich eine wesentlich bessere Symmetrieübereinstimmung zwischen allen anterioren und posterioren Segmenten als zwischen den medialen und lateralen. Nach dieser Darstellung wäre also eine anterior-posteriore Ausrichtung zu wählen. Eine weitere Abklärung blieb hierzu jedoch sinnvoll, da sich die Studie, wie erwähnt, mit den oberflächennahen Verhältnissen beschäftigt. Die Ausrichtung wurde daher in der ohnehin anstehenden Vorversuchsreihe mit untersucht (siehe Abschnitt 5.10) und zugunsten der anterior-posterioren Ausrichtung entschieden (Abb. 13).

Nach diesen theoretischen und praktischen Betrachtungen wurden also die Achsausrichtung sowie die Orientierung der Proben um die Achse festgelegt.

Um die zuverlässig bei den verschieden großen Femurköpfen erreichbare Probengröße zu ermitteln, wurden Sägeversuche durchgeführt. Auch bei kleinen Köpfen konnten zuverlässig zwei Klötzchen mit einer Abmessung von jeweils 21 x 10 x 19 (l x b x h [mm]) erreicht werden. Die Höhe wurde etwas geringer als die Länge gewählt, um diese bei der Versuchsdurchführung eindeutig identifizieren zu können (siehe 5.3.2). Markierungsmöglichkeiten wie Markierungskerben wurden wegen der Entstehung von inkonstanten Auflageflächen bzw. Sollbruchstellen nicht durchgeführt. Auch von Farbmarkierungen wurde – aufgrund der Gefahr der Beeinträchtigung der Sichtbarkeit über die Zeit der Zellbesiedelung – abgesehen. Weiter würde eine

Farbmarkierung das Einführen von Fremdstoffen in das Zellkulturbad bedeuten. Die Auswirkungen hierdurch wären schwer absehbar. Die genannten Abmessungen wurden dementsprechend als Zielgröße für die Proben angesetzt.

### 5.3 Sägevorrichtung

Oben genannte Sägeversuche wurden ebenfalls genutzt, um Erkenntnisse für die Konstruktion der Sägevorrichtung zu gewinnen sowie die Handhabung der Knochensäge zu erproben.



**Abb. 16: OP-Pendelsäge**  
Mit aufgesetztem Sägeblatt  
Rechts oben: Luftdruckanschluss  
Hersteller: Fa. Synthes®

Im Zuge des Versuchsablaufes wurden u. a. Grundfläche und Höhe der Knochenproben vermessen und protokolliert, um sie in die Berechnung von Spannung und Dehnung einfließen zu lassen. Dennoch sollten die Proben höchstmögliche geometrische Symmetrie erreichen. Dies hat den Vorteil, dass keine Beeinflussung der Festigkeit durch nichtlineare Oberflächen- oder Volumenunterschiede entstehen kann. Weiter muss die Spannvorrichtung bei der Fixierung der Proben weniger maßliche Schwankungen kompensieren. Nicht weniger wichtig ist das Herstellen von Proben mit möglichst ideal rechtwinkligen und parallelen Flächen. Dies ist notwendig, um schon ab dem ersten Stempelkontakt bei der Kompression ein flächiges Anliegen des

Druckstempels zu gewährleisten. Außerdem wird so die Gefahr des Wegrutschens oder Knickens während des Versuchsablaufes vermieden. Zu diesem Zweck muss eine Vorrichtung erstellt werden, die es in der Art einer Schablone ermöglicht, Proben akkurat zuzusägen.

### 5.3.1 Anforderungen

In Hinblick auf die spätere Stammzellbesiedelung der Knochenproben muss die Sägearbeit unter sterilen Bedingungen stattfinden. Die Bedingungen während der Sterilisation sowie das feuchte Milieu während des Einsatzes der Vorrichtung machen den Einsatz von sterilisierbaren Werkstoffen unabdingbar. Im Zuge der fehlerfreien Reinigung sollte auch an eine Demontierbarkeit gedacht werden. Trotz dieser muss eine störungsfreie Benutzung innerhalb der sterilen Bedingungen gewährleistet sein, da durch Unterbrechungen zur Wartung bzw. Nachjustierung die Gefahr einer Kontamination steigen könnte.

Die reine Funktion als Schablone würde zwar eine sehr einfache Bauart mit sich bringen, würde jedoch gemäß den Erkenntnissen aus den Sägeversuchen der Genauigkeit sicherlich nicht ausreichend Rechnung tragen. Es muss mehr die Funktion einer Führungsschiene gegeben sein, die das Sägeblatt körperlich breitflächig fasst.



**Abb. 17: Gehrungsschiene**

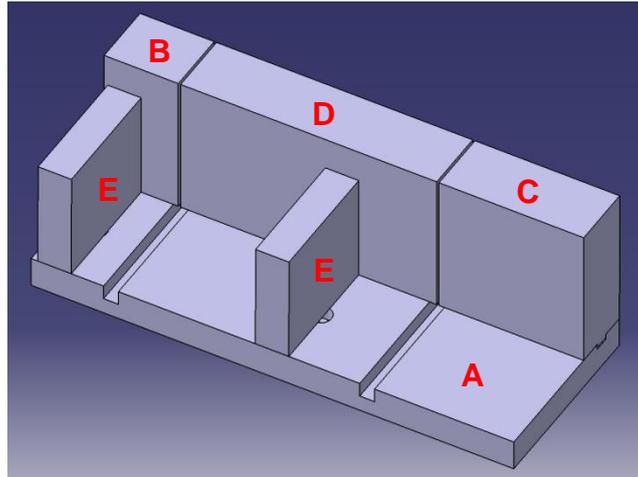
Für das Gehrungssägen von Leisten und Profilen  
auf 90° und 45° mit feiner Handsäge  
Werkstoff Aluminiumprofil  
Grundplatte zur Schonung des Sägeblattes aus Holz

Nur so können exakte rechte Winkel und Parallelität zuverlässig reproduzierbar gelingen. Die so gearbete Führung des Sägeblattes in einem Spalt bedeutet Reibung mit hoher Frequenz zwischen verhältnismäßig harten Teilen und bringt die Notwendigkeit einer überdurchschnittlichen Verschleißfestigkeit des Materials mit sich. In den Sägeversuchen stellte sich der Fettanteil der Spongiosa durch seine Schmierwirkung als nicht zu vernachlässigender Faktor zur Reibungsminderung heraus. Da auch bei sehr widerstandsfähigen Führungsflächen auf Dauer von einem gewissen Verschleiß ausgegangen werden muss, sollte eine Möglichkeit zum Nachstellen bzw. Überarbeiten der Führungsflächen vorgesehen werden. Diese Funktion lässt sich mit der geforderten Demontierbarkeit gut kombinieren. Eine Verstellbarkeit nicht nur im Bereich der Führungsgeometrien, sondern auch an den Anschlägen ist sinnvoll. Durch die verstellbaren Anschläge können abweichende Probenabmessungen hergestellt werden. Dies bietet Vorteile für diese und auch andere, eventuell folgende Studien.

### **5.3.2 Konstruktion**

Alle 3D- und 2D-Konstruktionen wurden mit dem CAD-System CATIA erstellt.

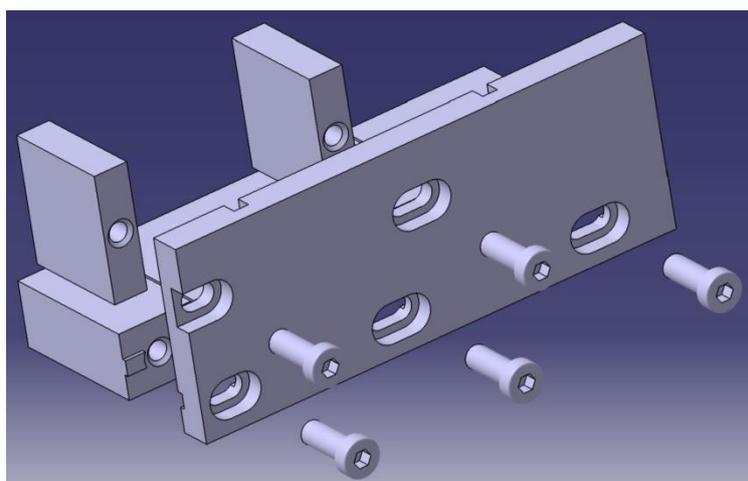
Anfänglich bestand die Überlegung, Teile der Vorrichtung, insbesondere die in Kontakt zum Sägeblatt stehenden, aus Keramik zu fertigen. Der Vorteil der Verschleißfestigkeit unterlag jedoch den nachteiligen Faktoren wie schwieriger Verarbeitbarkeit und Spröbruchgefahr durch die oszillierende Belastung. Diese Idee wurde daher schnell verworfen. Auch eine Führung über Rollen wurde aufgrund fraglicher Dauerhaltbarkeit und Hygienefähigkeit als nicht sinnvoll eingestuft. Danach wurde für alle Bauelemente ein für Lebensmittel- und Medizintechnik zugelassener Edelstahl gewählt. Dieser V4A-Stahl zeigte sich als geeignet, da er die Anforderungen an Hygiene, Korrosionsbeständigkeit und Verschleißfestigkeit vereint. Die hohe Zähigkeit und Abriebfestigkeit ermöglicht eine hohe Standzeit und hält die Gefahr der Verschleppung von Metallabrieb auf die Probenschnittflächen minimal.



**Abb. 18: Sägevorrichtung**

- A: Grundplatte
- B: Führungsklotz kurz
- C: Führungsklotz mittel
- D: Führungsklotz lang
- E: Queransschläge

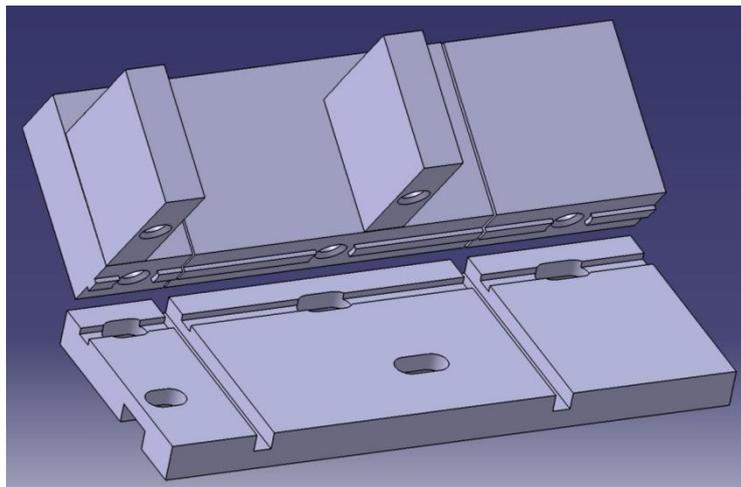
Die Verschraubung der Führungsklötze und der maßbestimmenden Anschlagplatten wurde über Langlöcher verschieblich gestaltet. Dadurch sind Korrekturen an den Probenabmessungen sowie das Nach- und Einstellen der Führungsschlitze möglich. Die Langlöcher sind mit Plansenkung versehen, um das Eintauchen der Schraubenköpfe zu gewährleisten. So bleibt die Rückseite der Grundplatte als ebene Auflagefläche erhalten.



**Abb. 19: Sägevorrichtung Explosionsdarstellung**

- Ansicht von unten
- Langlöcher in Verstellrichtung mit Einsenkung für Schraubenköpfe

Zudem wurden die Führungsklötze zusätzlich zur Verschraubung mit Federn versehen, die zusammen mit den Nuten der Grundplatte eine winkelstabile Längsschiene bilden. Dies verhindert ein Verdrehen der Führungsklötze, was zu keilförmigen Führungsschlitz, Klemmen des Sägeblattes sowie Ungenauigkeiten führen würde. Die Führungsklötze können dadurch unproblematisch gelöst und verschoben werden. Zusätzlich ist dadurch nur eine Schraube pro Führungsklotz ausreichend. Orthogonal zur Längsschiene wurden an den Schnittpositionen zwei tiefere Nuten angelegt. Diese dienen als Freilauf zur Schonung des Sägeblattes. Das Probenmaterial kann so nach unten komplett durchtrennt werden, ohne dass das Sägeblatt zwingend mit der Grundplatte in Kontakt kommt.



**Abb. 20: Sägevorrückung Explosionsdarstellung**

Grundplatte für besseren Blickwinkel abgeklappt

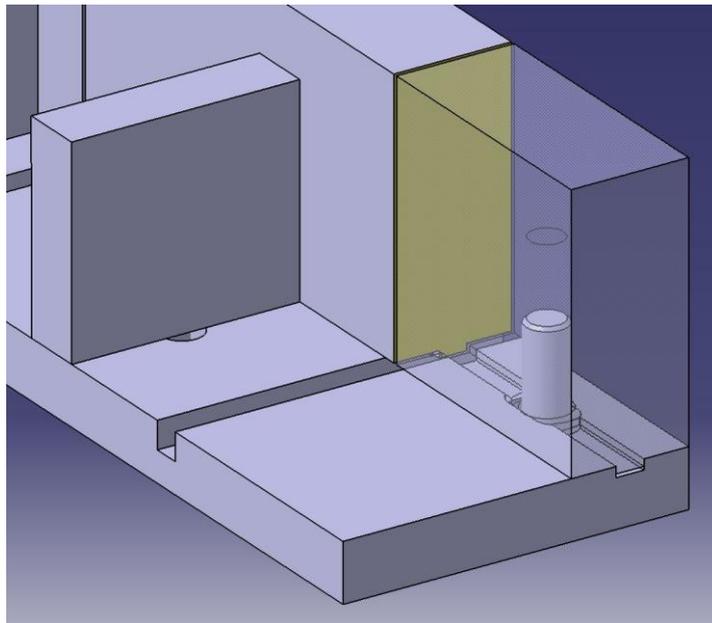
Nut- und Federverbindung

Langlöcher in Verstellrichtung

Tiefe Nuten zum Verschleißschutz des Sägeblattes

Im Gegensatz zur oben aufgeführten Gehrungsschiene wurde statt der zwei in Flucht zueinander gelegenen Führungsspalte nur ein Spalt gewählt. Dies ist der Geometrie des Sägeblattes sowie einer möglichst einfachen Nachstellbarkeit geschuldet. Die den Spalt begrenzenden Flächen müssen eine ausreichend große Führungsfläche aufweisen. Ohne dies wäre eine rechtwinklige Führung des Sägeblattes nicht zu gewährleisten und ein Verkanten des Sägeblattes

wäre möglich. Dies war außerdem notwendig, um über eine große Reibfläche den Verschleiß der Führungsspalte gering zu halten. In ebenfalls über Langlöcher verstellbaren Abständen wurden Queranschlüge angebracht. Durch deren Abstände zu den Sägespalten ist die Probengröße einstellbar.



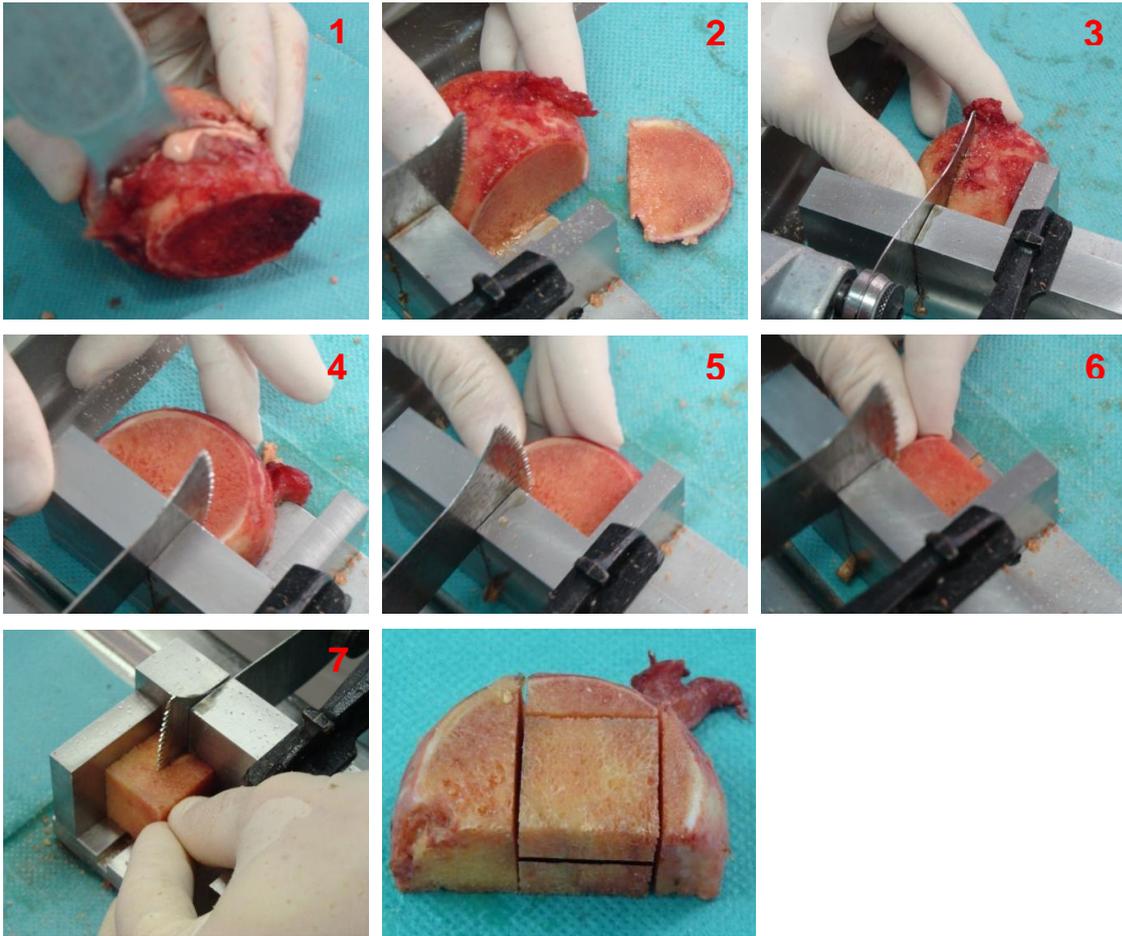
**Abb. 21: Führungsfläche**  
Führungsblock mittel transparent dargestellt  
Breite Führungsfläche (grün)

Diese Konstruktion ergibt in Verbindung mit der entsprechenden Sägereihenfolge die in Abschnitt 5.2.3 beschriebene Probenorientierung und -abmessungen.

Um dies reproduzierbar zu erreichen, wird nach folgendem Schema verfahren:

Im ersten Schritt wird der Übergang zum proximalen Schenkelhals frei Hand entfernt (Abb. 22 / Schritt 1). Die so entstandene Fläche bildet die Auflagefläche für den nächsten Schnitt. Der Hüftkopf wird nun in das offene Ende der Sägevorrichtung eingelegt und so orientiert, dass die Verbindungslinie zwischen Ligamentum capitis femoris und der meist gut sichtbaren Hauptabtriebsfläche am Knorpel parallel zum Führungsspalt orientiert ist. Mit dem Abtrennen einer – mindestens die spätere Probenfläche umspannenden – Scheibe wird die

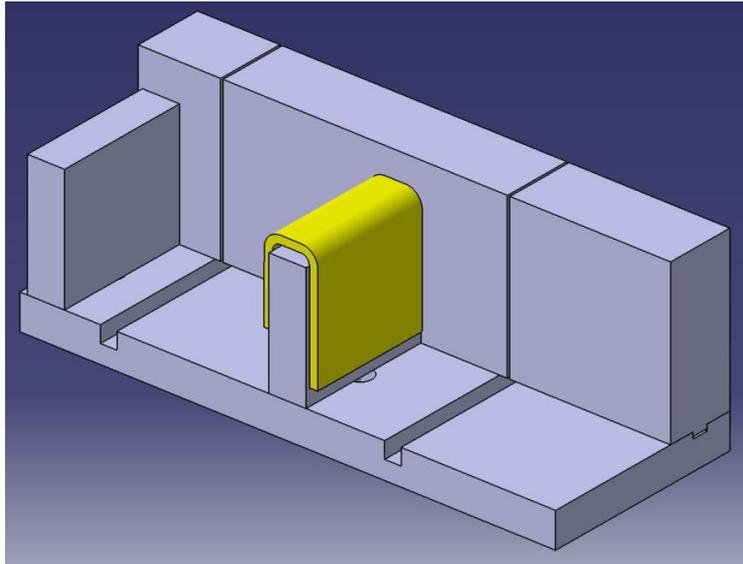
Seitenfläche generiert (Abb. 22 / Schritt 2). Die neu entstandene Fläche wird gegen den Queranschlag angelegt. Ein weiterer Schnitt durch den Führungsspalt stellt eine parallele Fläche genau mit dem Abstand von 21 mm zur zuvor entstandenen Fläche her (Abb. 22 / Schritt 3). Der Rohling wird auf die entstandene Seitenfläche gelegt und mit der Grundfläche gegen die Führungsklötze gelegt. Nun werden nach demselben Prinzip Vorder- und Hinterfläche gesägt (Abb. 22 / Schritt 4+5). Der letzte – in der offenen Seite der Vorrichtung – durchgeführte Schnitt dient der Herstellung der Probenhöhe. Hierzu wird die Grundfläche gegen den Queranschlag geschoben und in dieser Position erneut gesägt (Abb. 22 / Schritt 6). Der letzte Schnitt wird im geschlossenen, also von den zwei Queranschlügen begrenzten Bereich der Vorrichtung durchgeführt. Der entstandene Würfel wird mit der Grundfläche nach unten und der Seitenfläche an den Queranschlag angelegt, getrennt (Abb. 22 / Schritt 7). Da es sich um einen Würfel handelt, ist es wichtig, bei diesem Arbeitsschritt den Überblick über die Flächenanordnung zu behalten, um eine falsche Probenorientierung zu vermeiden. Durch die Einstellung der Anschläge wird die Würfelbreite von 21 mm halbiert, wobei durch die Breite des Sägeschnittes zwei 10 mm breite Proben entstehen. Um eine bessere Orientierung während der Sägeschritte, vor allem aber bei der Versuchsdurchführung zu erreichen, sollte die Probenhöhe von der Länge abweichen (siehe auch 5.2.3). Hierfür wurde eine Verstellmöglichkeit des ersten Queranschlages benötigt. Um eine schnelle und werkzeuglose Verstellung während des Einsatzes im OP zu gewährleisten, wurde eine aufsteckbare Lösung umgesetzt. Die Materialstärke beträgt zwei Millimeter. Wenn vor dem Schnitt für die Probenhöhe (siehe Abb. 22 / Schritt 6) die Aufsteckgabel adaptiert wird, ergibt sich also eine Probenhöhe von 19 mm. Diese Kantenlänge ist rein optisch von den anderen leicht abzugrenzen und beugt Fehlern bei der Probenausrichtung ausreichend vor.



**Abb. 22: Sägevorrichtung Ablauf**

Schnitte 1-7

Da die Bilderstrecke innerhalb der Vorversuchsreihen entstand, wurde nicht unter sterilen Bedingungen gearbeitet. Daher ist die schwarze Schraubzwinde nicht wie in den Hauptversuchen steril abgedeckt (2-7)



**Abb. 23: Aufsteckgabel**

Vorrichtung mit Aufsteckgabel (gelb)  
Der Abstand zwischen Führungspalt und  
Queranschlag wird hierdurch von 21 mm auf 19 mm  
verringert

Die technischen 2D-Fertigungszeichnungen sind im Anhang abgedruckt. Die 3-D-Konstruktionsdaten sind im digitalen Anhang zu finden.

### 5.3.3 Fertigung

Als Materialgrundlage wurde gewalzter V4A-Stahl aus der Lebensmittelindustrie in verschiedenen Stärken verwendet.



**Abb. 24: V4A-Halbzeug**

Oben Material für die Grundplatte

Mitte Material für die Anschläge

Unten Material für die Führungsklötze

Für die Fertigung kamen spanende Maschinen aus dem Maschinenbau zum Einsatz. Zu diesem Zweck wurde freundlicherweise die Werkstatt für Verfahrens- und Umwelttechnik der Hochschule Heilbronn zur Verfügung gestellt. Im Wesentlichen eine konventionelle Fräsmaschine der Firma Schaublin.

Um ausreichende Genauigkeit und Funktion zu erreichen, mussten alle Rohlingskonturen inklusive der Außenflächen bearbeitet werden. Zu Beginn wurden die Außenmaße aller Teile bearbeitet. Anschließend wurden Nuten, Federn, Gewindebohrungen und Langlöcher gefertigt.

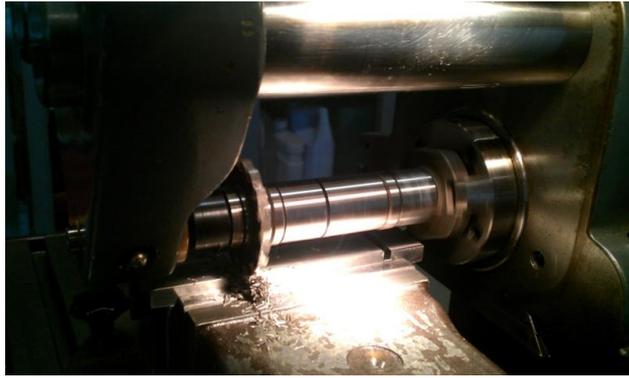


**Abb. 25: Schaublin Universalfräsmaschine**

Mit aufgesetztem Maschinenschraubstock zur  
Werkstückarretierung

Im Planfräsbetrieb zur flächigen Bearbeitung  
mittels HSS Zylinderfräskopf

Für diese Fertigungsmethodik stellte der gewählte Werkstoff das obere Limit dar. Dadurch lag der Werkzeugverschleiß sehr hoch, die Werkzeugzustellung und dadurch die Bearbeitungsgeschwindigkeit sehr niedrig. Für die Bearbeitung der Nuten konnten aufgrund des zähen Werkstoffes keine Fingerfräser verwendet werden, und es mussten Scheibenfräsen eingesetzt werden. Alle Gewindebohrungen mussten mittels speziellen Edelstahlbohrern und Edeltstahlgewindeschneidern gefertigt werden.



**Abb. 26: Einfräsen der Nuten in die Grundplatte**  
 Schaublin Universalfräsmaschine mit  
 umgebautem Fräskopf zur Aufnahme einer  
 Scheibenfräswelle  
 Mit aufgesetztem Maschinenschraubstock  
 Zur Werkstückarretierung  
 Im Scheibenfräsbetrieb zur Nuten-  
 herstellung mittels HSS Scheibenfräse



**Abb. 27: Fertiggestellte Sägevorrückung**  
 Montierter und eingestellter Zustand



**Abb. 28: Sägevorrückung in Einzelteilen**  
 Demontierter Zustand

## **5.4 Probenhalterung**

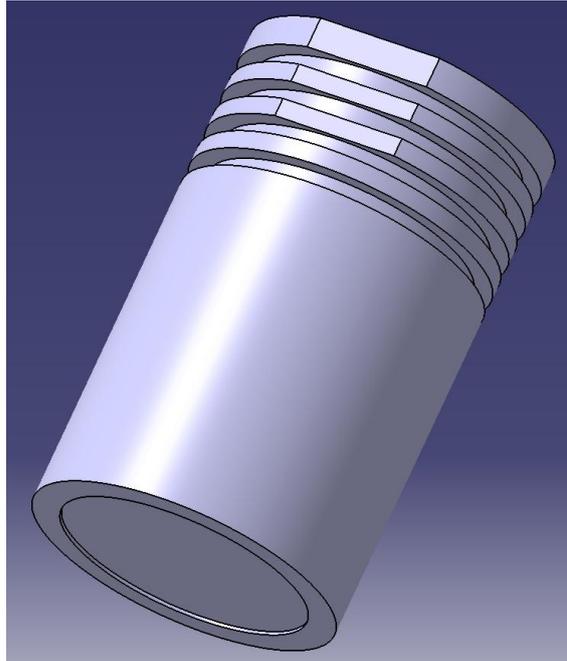
### **5.4.1 Anforderungen**

Die Halterung muss eine sichere Fixierung der Proben während der Versuchsdurchführung gewährleisten. Da mit Toleranzen bei der Probenherstellung zu rechnen ist, muss die Halterung einen gewissen Toleranzbereich bei den zu spannenden Proben abdecken. Die Befestigung soll ein Verrutschen der Proben verhindern, gleichzeitig aber nicht zu einer vorzeitigen Beschädigung durch zu hohe Spannkraften führen. An der Prüfanlage laufen mehrere Studien, daher muss eine einfache Adaption der Vorrichtung an die Anlage möglich sein. Das Material muss eine Desinfektion erlauben.

### **5.4.2 Konstruktion**

Alle 3D- und 2D-Konstruktionen wurden mit dem CAD-System CATIA erstellt.

Da eine Druck- und keine Zugprüfung durchgeführt werden soll, bietet sich die Ausführung als einseitige Spannvorrichtung mit Auflagefläche und Lagefixierung als Unterteil an. Die Kraft lässt sich mittels oben liegenden Stempels aufbringen. Es wird empfohlen, eine Teflonschicht zwischen Probe und Stempel einzubringen. Dies soll der Reibungsminderung dienen und so durch Schubkräfte eventuell entstehende Artefaktkräfte vermeiden. Der Probenstempel bekommt daher eine Einsenkung, in die eine 0,6 mm starke Teflonscheibe eingerastet wird.

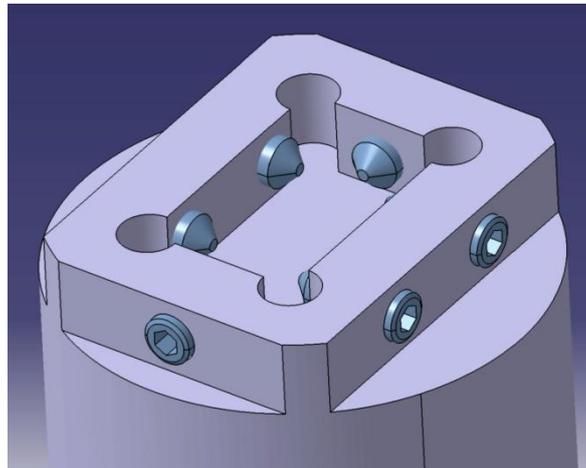


**Abb. 29: Probenstempel**

Oben: Retentionsbereich

Unten: Druckfläche mit Einsenkung für  
Teflonscheibe

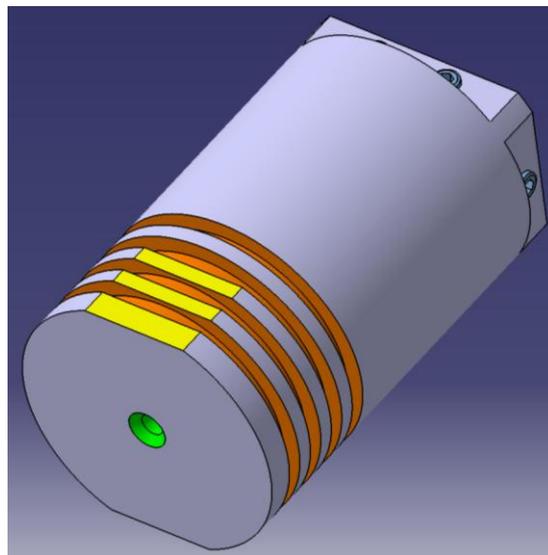
Die Fixierung der Proben soll mit spitzen Madenschrauben ermöglicht werden.



**Abb. 30: Probenhalterung Spannbereich**

Spannung über sechs Madenschrauben  
Schraubenachsen mit 4 mm Abstand  
zur Auflagefläche

Die Spitzen führen durch Verzahnung mit der spongiösen Probenoberfläche zu einer idealen Verschiebe- und Kippsicherung, auch wenn die Schrauben nur kraftlos angelegt werden. Die Kontaktstellen der Schraubenspitzen wurden sehr tief gelegt, so dass der Abstand zwischen Stempel und fixiertem Bereich möglichst groß ist. Selbst wenn die Spannkraft eine Auswirkung auf die Materialeigenschaften hätte, wäre so die ungestört verformbare Höhe maximiert und der relative Einfluss gering.



**Abb. 31: Probenhalterung Retentionsbereich**  
Verdrehsicherung (gelb)  
Retentionsrillen (orange)  
Axiale Gewindebohrung (grün)

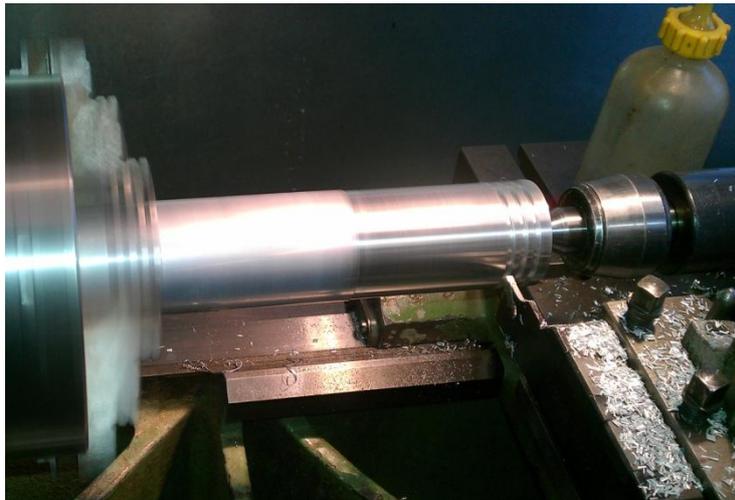
Als Adaptionssystem wurde die Routinemethode des Biomechaniklabors über gegossenen Kunststoffflansch und konfektionierten Spannrahmen verwendet (siehe 5.4.3 Abb. 36). Hierfür wurden Retentionsrillen und Flächen als Verdrehsicherungen an den Vorrichtungsteilen angebracht. Hinzu kommt eine axiale Verschraubung von Probenhalterung und Probenstempel gegen die Bodenplatte des Spannrahmens.

Die technischen 2D-Fertigungszeichnungen sind im Anhang abgedruckt. Die 3D-Konstruktionsdaten sind im digitalen Anhang zu finden.

### 5.4.3 Fertigung

Auch zur Fertigung dieser Teile stand freundlicherweise die Werkstatt für Verfahrens- und Umwelttechnik der Hochschule Heilbronn zur Verfügung.

Da die benötigten Teile größtenteils rotationssymmetrisch gestaltet sind, bietet sich eine weitgehende Fertigung auf der Drehbank an.



**Abb. 32: Spanende Fertigung auf Drehbank**  
Herstellung aller rotationssymmetrischen Konturen.  
Bei Stempel und Halterung identisch.  
Die Retentionsrillen werden eingestochen.  
Zuvor wurde die Außengeometrie überdreht.

Außenfläche, Konzentrische Gewindebohrung, Einstiche und Einsenkung für die Teflonscheibe wurden auf diese Art gefertigt. Auch die Teflonscheibe wurde auf der Drehbank gefertigt. Bei dem Verbund zwischen Teflonscheibe und Probenstempel war hohe Präzision gefordert, da die Scheibe durch eine Presspassung ohne weitere Halteelemente befestigt werden sollte.

Für den Bereich des Spanmechanismus kam wieder die Fräsmaschine zum Einsatz.



**Abb. 33: Fräsen der Halterungsgeometrie**  
 Schaublin Universalfräsmaschine  
 Werkzeug: HSS-Fingerfräser  
 $\varnothing = 8 \text{ mm}$   
 Werkstück mittels Backenfutter  
 gespannt



**Abb. 34: Einbringen der Gewindebohrungen**  
 Ständerbohrmaschine  
 Werkzeug: HSS-Zentrierbohrer  
 Werkstück mittels Maschinenschraubstock gespannt

Die fertigen Teile müssen nun noch mit dem Spannrahmen für die Adaption an der Prüfmaschine verbunden werden.



**Abb. 35: Probenhalterung und -stempel fertig**  
 Probenstempel mit eingelegter 0,6 mm  
 Teflonscheibe



**Abb. 36: Eingießen Probenhalterung und –stempel**  
 Links Probenstempel fertig eingegossen  
 Rechts Probenhalterung Gießprozess  
 PMMA-Kunststoff: Heraeus Technovit 2060

Vertiefungen und Löcher im Spannrahmen wurden abgeklebt und die Innenkontur mit Vaseline isoliert. Dadurch kann die Vorrichtung samt gegossenem Sockel später entnommen werden und der Rahmen für mehrere Studien gleichzeitig sowie später wieder verwendet werden. Die Fixierung des Sockels im Rahmen wird über jeweils vier horizontal angeordneten Klemmschrauben sowie eine konzentrische Schraube gewährleistet.

## 5.5 Zellkultur

Die Besiedelung der Knochenproben wurde freundlicherweise durch das Fachpersonal des IKET durchgeführt. Hierzu kam das dort etablierte Standardvorgehen zur Anwendung.

Das Zellkulturmedium, mit dem gearbeitet wurde, wird durch das IKET selbst hergestellt und setzt sich aus folgenden Bestandteilen zusammen:

- Zellkulturmedium, Alpha MEM von Biocym (Nr.: 880112) früher Lonza (Nr.: BE02-002F)
- Humanem AB-Serum (10 %), Gewinnung und Aufbereitung im Haus
- Penizillin-Streptomycin (1 %), Biocym (Nr.:882084) früher Lonza (Nr.:DE17-602F)

### 5.5.1 Besiedelungsablauf

Die Proben werden aus dem -80 °C-Gefrierschrank entnommen. Bei diesem Schritt erhalten die zu besiedelnden Proben die Kennung Bone\_“laufende Nr“\_1, die nicht zu besiedelnden Bone\_“laufende Nr“\_2. Nach dem Wiegen der Proben werden die nicht zu besiedelnden Proben unaufgetaut wieder in den Gefrierschrank gestellt.

Die aufgetauten Proben werden nun für 24 h in Zellkulturmedium gelagert.

Die Stammzellen werden in den Kulturflaschen von Medium befreit und mit Puffer gewaschen. Bei dem Puffer handelt es sich um einen PBS-Puffer von Biocym (Nr.: 882126), früher von Lonza (Nr.: BE17-516F). Anschließend werden die Zellen mittels Trypsin abgelöst. Medium wird zugegeben, wobei durch das Serum das Trypsin neutralisiert und die Ablösereaktion gestoppt wird.



**Abb. 37: Zellkulturflaschen**  
Zellvorrat kurz vor Einsatz  
Lagerung im Brutschrank

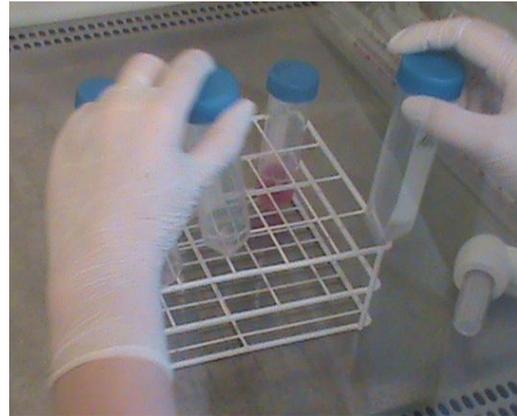


**Abb. 38: Pipetieren des Mediums**  
Auswaschen der Stammzellen nach  
Ablösung

Das Medium kann nun mit samt den darin frei flottierenden Zellen herauspipettiert und zentrifugiert werden.



**Abb. 39: Geerntete Zellen in Zentrifuge**

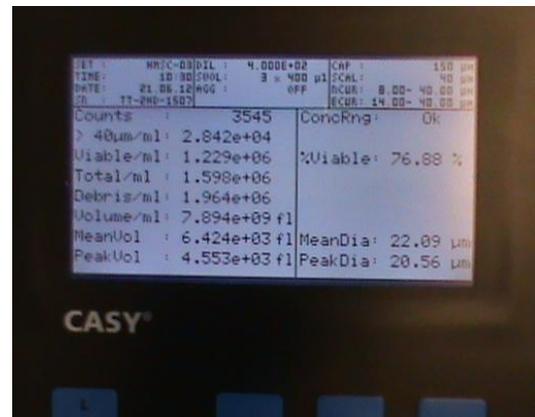


**Abb. 40: Weiterverarbeitung der Pellets**  
 Aufratschen/Ablösen der Pellets  
 Pellets bereit zum Versetzen mit Medium

Die so entstandenen Pellets werden durch „aufratschen“ mittels Vibration herausgelöst und die Zellmenge wird nach Resuspension mit Medium bestimmt.



**Abb. 41: Casy®-Zellzählungssystem**  
 Rechts: Frisch-Elektrolyt  
 Links: Gebrauchtelektrolyt  
 Rechts außen: Display- und Steuerungseinheit



**Abb. 42: Display / Steuerungseinheit**  
 Ergebnisanzeige

Die Mengenbestimmung geschieht mittels eines CASY®-Zellzählers auf Basis der Pulsflächenanalyse [55 S. 5]. Anschließend werden die Zellen soweit in Medium suspensiert, dass  $20 \times 10^5$  Zellen pro 100 µl Medium enthalten sind.

Der Knochen wird auf der Seite liegend bereitgestellt. Hierbei ist er durch etwas Zellkulturmedium am Gefäßboden gegen Austrocknung geschützt. Die oben liegenden Breitseiten der Proben werden mit 100 µl Zell-Medium-Suspension überschichtet. Auf der nach oben gerichteten Seitenfläche der Proben entsteht so ein stehender Flüssigkeitsspiegel. Dieser wird für zwei Stunden im Brutschrank so belassen. In dieser Zeit kommt es zur Zelladhäsion auf der benetzten Fläche. Nach Ablauf dieser Zeit werden die Proben vorsichtig gewendet und die Gegenseite auf gleiche Weise behandelt. Sind auch hier die zwei Stunden verstrichen, werden die Proben vorsichtig mit 10 ml Medium komplett überschichtet.



**Abb. 43: Aufbringen der Zellen**

Benetzung der Knochenprobe  
Hintergrund: Benetzte Knochenproben  
vor zweistündiger Adhäsionsphase



**Abb. 44: Brutschrank**

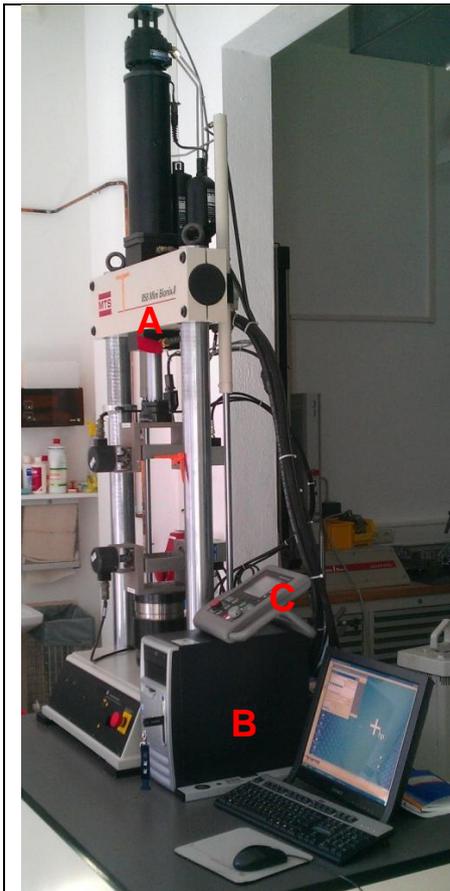
Obere Etage: Anzuchtflaschen  
Mittlere / untere Etage: Proben  
nach Besiedelung komplett  
überschichtet

Die Probengefäße werden über die Besiedelungsdauer im Brutschrank bei 37 °C und CO<sub>2</sub>-Schutzatmosphäre gelagert. Das Zellkulturmedium wird während dieser Zeit zweimal wöchentlich gewechselt.

Um die Kapazitäten des IKET nicht zu sehr zu beanspruchen, wurde die gesamte Probenanzahl in Kohorten zu jeweils vier bis zehn Probenpaaren aufgeteilt.

## 5.6 Zug- Druck- Prüfmaschine MTS

Bei dem verwendeten System handelt es sich um eine MTS 858 Mini Bionix® II in Lastrahmenkonfiguration 359.25 Standard. Die komplette Prüfanlage besteht aus fünf Einheiten:



**Abb. 45: Teststation, Workstation und RSC**

**A: Teststation**

Die eigentliche Teststation beinhaltet im Wesentlichen Säulen, Querhaupt, Sensoren, Aktuatoren, Lagerungen, Anbauteile, Hydraulik-anbindungen und Probenaufnahmen.

**B: PC-Workstation**

Über sie läuft die Kommunikation mit der Teststation. Sie dient der Programmierung der Testprozeduren, der Ausführung der Testprozeduren durch Ansteuerung des Servoreglers, der Überwachung des Prüfablaufes sowie der Aufzeichnung der Messdaten.

**C: RSC (Remote Station Control)**

Diese Fernsteuerung dient der bequemen Bedienung während der Testroutine. Alle wesentlichen Bedienfunktionen sowie ein programmierbares Display werden hierüber bereitgestellt.



**Abb. 46: FlexTest™**

Der Servoregler FlexTest™ GT hat die Ansteuerung der Aktuatoren zur Aufgabe. Er regelt die Hydraulikventile, über die Kraft und Weg der Aktuatoren gesteuert werden. Die Regelung von bis zu vier Teststationen ist mit dem FlexTest GT möglich.



**Abb. 47: Hydraulikaggregat**

Die Hydraulikanlage baut den Hydraulikdruck auf, der über die Hydraulikventile den Aktuatoren die Maximalkraft von 25 kN ermöglicht. Das Aggregat erzeugt unter Last große Hitze, weshalb eine Wasserkühlung integriert ist. Der Wasserzufluss muss vor Inbetriebnahme geöffnet werden.

### 5.6.1 Spezifikationen

Die MTS 858 Mini Bionix<sup>®</sup> II – Reihe lässt sich modular zusammenstellen, dadurch sind bei der Anschaffung einige verschiedene Konfigurationen mit entsprechend unterschiedlichen Spezifikationen möglich.

Durch den Lastrahmen 359.25 und die entsprechende Hydraulikeinheit beträgt die maximale Versuchskraft ( $F_{\max}$ ) 25 kN.

Die Genauigkeit der Kraftmessung entspricht 0,1 % von  $F_{\max}$ , hier also 25 N.

Bei voll ausgenutzter Säulenhöhe entspricht die maximale Verfahrestrecke im lastfreien Betrieb 605 mm, unter Last 100 mm.

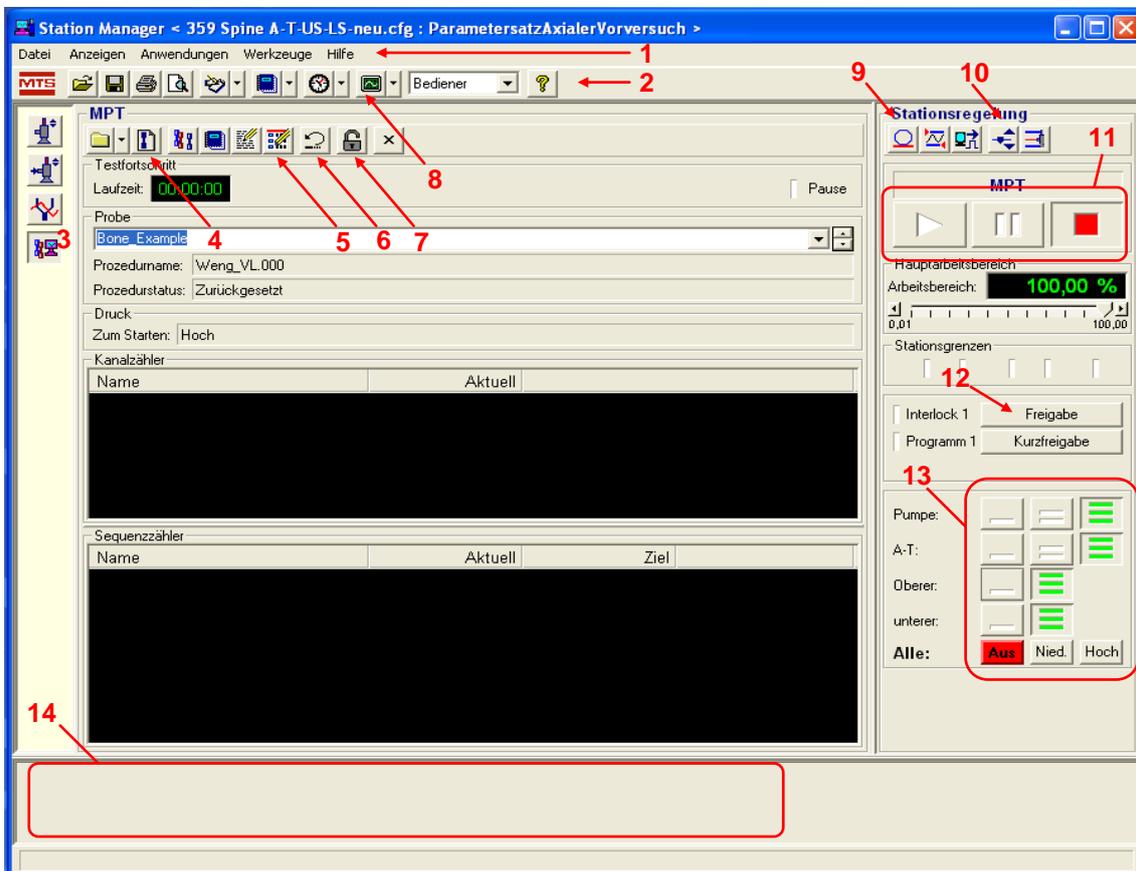
Im open loop, das heißt ohne aufgeschaltete Regelung, ist eine maximale Verfahrgeschwindigkeit von 260 mm/s bei einer Beschleunigungszeit von unter 0,01 s möglich.

Eine maximale Pulsfrequenz von bis zu 30 Hz ist erreichbar. Mit steigender Frequenz werden die möglichen Amplituden kleiner. Bei der hier beschriebenen Studie wird allerdings nicht in diese Betriebszustände vorgedrungen.

Das maximale Torsionsmoment beträgt 200 Nm, der maximale Rotationsweg 270°. Die maximale Rotationsgeschwindigkeit wird mit 210 °/s angegeben, die Rotationsbeschleunigung unter 0,01 s. [56 S. 15 ff]

## 5.6.2 Steuerung

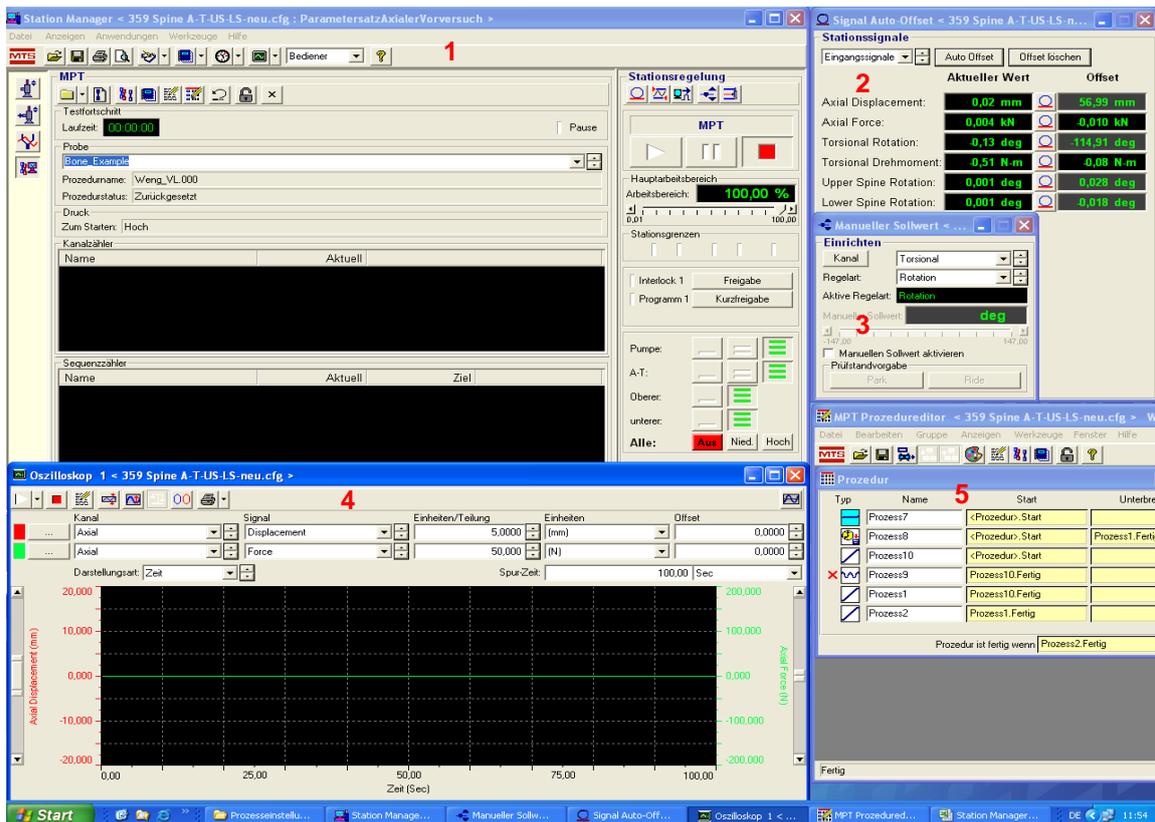
Der Station Manager ist die zur Anlage gehörende zentrale Steuerungssoftware. Alle wesentlichen Funktionen können von hier aus kontrolliert und gesteuert werden. Es handelt sich um ein windowsbasiertes Programm, das den Zugriff auf alle Steuerungs- und Kontrollelemente gewährleistet. Um den Rahmen zu wahren soll an dieser Stelle ausschließlich ein Überblick über die für diese Studie routinemäßig verwendeten Funktionen gegeben werden.



**Abb. 48: Station Manager Bedienoberfläche**

- |   |  |
|---|--|
| 1: Menüleiste   | 8: Öffnet die Oszilloskop-Schaltfläche         |
| 2: Werkzeugleiste   | 9: Öffnet die Signal-Schaltfläche              |
| 3: Probenbezeichnung  | 10: Öffnet die Manueller Sollwert-Schaltfläche |
| 4: Generiert eine neue Probe                                  | 11: Prozedursteuerung Start, Pause, Stopp      |
| 5: Öffnet den Prozedureditor                                  | 12: Gibt die Verriegelung der Hydraulik frei   |
| 6: Setzt die Prozedur auf Start zurück                        | 13: Hydrauliksteuerung                         |
| 7: Setzt den Status der Prozedur von Bearbeiten auf Ausführen | 14: Meldungsbereich                            |

Die Software bietet die Möglichkeit, alle Kontroll- und Steuerungsinstanzen parallel geöffnet und dadurch im Blick zu halten. Die in dieser Studie standardmäßig – während der Testung – geöffneten Fenster sind in Abb. 49 aufgeführt.



**Abb. 49: Station Manager Kontroll- und Bedienoberflächen offen**

- 1: Station Manager
- 2: Signal Auto-Offset
- 3: Manueller Sollwert
- 4: Generiert eine neue Probe
- 5: Prozedureditor

Das Fenster „Auto Signal-Offset“ gestattet das Verfolgen der Sensordaten aller Achsen in Echtzeit. Hier können Offsets beispielsweise durch die einwirkende Gewichtskraft von Probe und Spannvorrichtung von vorne herein eliminiert werden, so dass eine spätere rechnerische Kompensation hinfällig ist.

Der Bereich „Manueller Sollwert“ dient der freien Bewegung der Aktuatoren. So kann der Stempel nach oben gefahren werden, um Platz für den Einbau der Spannvorrichtung freizugeben. Auch für das Auswechseln der Probe nach jeder

Testung ist diese Funktion sehr hilfreich. Die Manipulation ist mittels Schieberegler, Absolutwerteingabe oder über den Drehschalter am RSC möglich.

Das „Oszilloskop“ dient der graphischen Visualisierung von Sensorwerten. Dadurch wird der zeitliche Verlauf der Messwertveränderung sichtbar gemacht. Dies vereinfacht das Erkennen und Überwachen des Testvorganges.

Der „Prozedureditor“ dient der eigentlichen Programmierung des Testablaufes. Auch die Ansteuerung der Aktuatoren und die Aufzeichnung der Messdaten übernimmt dieses Modul entsprechend der programmierten Abfolge und Regelparametern. Während der Testung wird der aktuell aktive Prozess innerhalb der Prozedur angezeigt. Zum Programmiervorgang siehe Abschnitt 5.9.

## **5.7 Datenerfassung**

### **5.7.1 Probenprotokoll**

Bei Entnahme der Proben aus der Knochenbank wurden diese anonymisiert, so dass keine Verbindung zwischen Gewebe und Patienten mehr gegeben ist. Dadurch sind für niemanden Rückschlüsse von der Probe auf den Patienten oder umgekehrt möglich. Das Protokoll erfasst Abmessungen, Masse, Versuchsdatum, Uhrzeit und Bemerkungen für eventuelle Besonderheiten der Proben oder während der Versuchsdurchführung. Die Abmessungen wurden unmittelbar vor Versuchsdurchführung mittels Messschieber gemessen und aufgenommen. Die Probenabmessungen waren später zur Berechnung von Spannung und Dehnung im Auswertungsformular nötig (siehe 5.8.1).

	LxBxH [mm]			Masse [g]	Datum	Uhrzeit	Bemerkung
Bone_8_1	21,2	10,8	19,5	5,5478	05.05.12	13:30	
Bone_8_2	21,4	10,1	19,5	5,0938	05.05.12	13:38	
Bone_9_1	21,4	10,0	20,5	4,9171	05.05.12	13:50	
Bone_9_2	20,1	10,7	18,9	4,3926	05.05.12	13:56	
Bone_10_1	20,8	10,6	19,0	4,7966	05.05.12	14:06	
Bone_10_2	20,9	10,0	19,3	4,2178	05.05.12	14:15	
Bone_11_1	20,8	11,0	18,9	5,7244	05.05.12	14:21	
Bone_11_2	20,7	9,9	19,3	4,8230	05.05.12	14:28	
Bone_12_1	20,7	10,0	18,9	4,6567	05.05.12	14:34	
Bone_44_1	20,9	9,8	19,0	4,2318	17.11.12	17:00	
Bone_44_2	20,8	9,8	19,3	4,4412	17.11.12	17:17	
Bone_45_1	20,8	10,2	19,0	5,1873	17.11.12	17:28	
Bone_45_2	20,6	10,1	19,0	5,3296	17.11.12	17:34	
Bone_46_1	20,9	10,5	18,7	4,4910	17.11.12	17:40	
Bone_46_2	20,2	9,9	19,2	4,1823	17.11.12	17:48	
Bone_47_1	20,5	10,1	19,2	4,5436	17.11.12	17:54	
Bone_47_2	20,6	10,6	18,9	4,5591	17.11.12	18:00	
Bone_48_1	21,1	10,0	19,0	4,6328	17.11.12	18:05	
Bone_48_2	21,1	10,4	19,2	4,7064	17.11.12	18:09	

**Abb. 50: Probenprotokoll**

Hier wird exemplarisch nur das Protokoll der Hauptversuche gezeigt.

Zur besseren Übersicht wurde die Zeilenanzahl in dieser Ansicht optisch reduziert.

Im IKET erfolgte vor der Zellbesiedelung die Ermittlung der Masse. Dies war notwendig, da die zu besiedelnden Proben zu diesem Zeitpunkt noch keine Veränderung durch das Kulturmedium erfahren hatten. So wird die Ausgangsmasse unter vergleichbaren Bedingungen der beiden Probenarten dokumentiert.

Die Protokolle für alle durchgeführten Versuche inklusive der Vorversuche sind im digitalen Anhang der Arbeit aufgeführt.

Zusätzlich zur schriftlichen Protokollierung wurde von jeder Probestung ein Video angefertigt. Diese sind ebenfalls im digitalen Anhang einsehbar.

**5.7.2 Messwerte**

Die Software der MTS-Prüfmaschine zeichnet für jede gelaufene Testung die Messwerte auf. Erfasst werden Laufzeit in Sekunden, lineare Verlagerung des Stempels (axial displacement) in mm und die dabei auftretende Gegenkraft (axial force) in Newton, danach folgt die Ablage der Daten in einer .txt-Datei. Über ein Makro kann anschließend die gewonnene Datenreihe direkt in eine

Excel-Datei konvertiert werden. Diese Datei beinhaltet alle auf Basis der Messung entstandenen Stammdaten für die anschließende Auswertung in Form von drei Spalten. Die Zeilenanzahl ergibt sich durch die Erfassung von acht Wertetriplets pro Sekunde und der benötigten Laufzeit. Ergänzend werden Laufzeit, Datum und Uhrzeit erfasst.

	A	B	C	D	E	F	G	H
1	MTS793 MPT DEU 1 2 . . 49 1 1 A							
2								
3	Datenerfassung				Zeit:	160,02637	Sec	10.11.2012 14:57
4	Laufzeit	Axial Displace	Axial Force					
5	Sec	mm	N					
6	0,14355469	-0,0015062	-1,7686316					
7	0,28613281	-0,0025293	-4,0292959					
8	0,42871094	-0,0081196	0,02771151					
9	0,57128906	-0,0147517	0,47509092					
10	0,71386719	-0,0195258	-3,6968734					
11	0,85644531	-0,0236884	-2,7544773					
12	0,99902344	-0,0297334	0,612688					
13	1,1416016	-0,0352155	-1,2634089					
14	1,2841797	-0,0414424	-3,5352015					
15	1,4267578	-0,0513258	-0,8344705					
1116								
1117	158,54785	-3,5215849	-2173,5911					
1118	158,69043	-3,5321944	-2169,0166					
1119	158,83301	-3,5358024	-2168,9211					
1120	158,97559	-3,5373983	-2167,9932					
1121	159,11816	-3,5409615	-2175,3157					
1122	159,26074	-3,5431511	-2175,749					
1123	159,40332	-3,5460701	-2178,9224					
1124	159,5459	-3,5479608	-2182,6113					
1125	159,68848	-3,5523968	-2183,1887					
1126	159,83105	-3,5543978	-2182,9509					
1127	159,97363	-3,5579767	-2186,0771					
1128								

**Abb. 51: Datenerfassung**

Rohdaten in Excel-Datei.

Darstellung der Ergebnisse einer Testung.

Zur besseren Übersicht wurde die Zeilenanzahl in dieser Ansicht optisch stark reduziert.

## 5.8 Datenauswertung

### 5.8.1 Auswertungsformular

Das Auswertungsformular stellt den Weg von den Rohdaten zu den Kenngrößen – Druckfestigkeit und E-Modul – dar. Hierzu wurde ein Excel-Formular erstellt, das diesen Weg weitestgehend automatisiert.

Alle Zellen, in die manuell Eintragungen gemacht werden müssen, sind grün markiert, Zellen, die errechnete Endergebnisse enthalten, rot.

Die ersten drei Spalten des Dokuments enthalten die unveränderten Rohdaten, die aus der entsprechenden Excel-Datei der Datenerfassung (siehe 5.7.2) importiert werden.

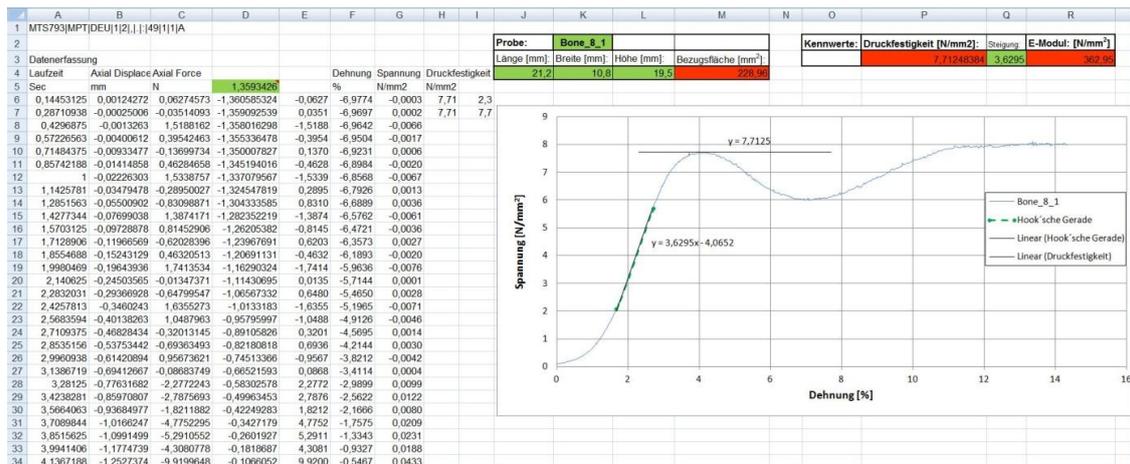


Abb. 52: Auswertungsformular

- Links: Rohdaten
- Mitte: Berechnung Spannung / Dehnung
- Oben: Flächenberechnung und Ergebnisse Druckfestigkeit und E-Modul
- Rechts: Diagramm mit graphischer Darstellung von Druckfestigkeit, Hook`schem Bereich sowie Berechnung des E-Moduls

Für die Berechnung der Dehnung gilt die allgemeine Formel:

$$\varepsilon = \frac{\Delta l}{l_0} \quad [57 \text{ S. } 177]$$

Für die Dehnung in Prozent muss mit 100 % multipliziert werden:

$$\varepsilon = \frac{\Delta l}{l_0} \times 100 \text{ in } [\%].$$

$\Delta l$  entspricht in diesem Fall dem axial displacement,  $l_0$  der unverformten Probenhöhe. Dementsprechend wird in Spalte F die Dehnung mittels der Rechenoperation `=D6/$L$4*100` berechnet.

Für die Berechnung der Spannung gilt die allgemeine Formel:

$$\sigma = \frac{F}{A} \text{ in } [\text{N}/\text{mm}^2] \text{ [57 S. 177]}$$

F entspricht hier der aufgezeichneten Kraft aus den Rohdaten. A entspricht der horizontalen Querschnittsfläche der Probe. Diese Bezugsfläche wird in Zelle M4 mittels `=J4*K4` berechnet. In Spalte G wird damit die Spannung durch die Rechenoperation `=E6/$M$4` berechnet.

Aus den Spalten F und G entsteht ein klassisches Spannungs-Dehnungs-Diagramm. Der Maximalwert der Spannungsspalte wird in Zelle P3 mit der Operation `=MAX(G6:G437)` ermittelt und als Linie im Diagramm dargestellt. Dieser Wert entspricht der Druckfestigkeit.

## 5.8.2 Vorgehensweise

Zur eindeutigen Identifizierung der Auswertung wird die laufende Probennummer in die Zelle K2 eingetragen.

Beim Import der Versuchsdaten kopiert man die kompletten Spalten A, B und C aus der Datenerfassungsdatei (Excel Bone\_X\_X.xlsx) in die Spalten A, B und C der Auswertungsdatei (Excel Bone\_X\_X\_Auswertung.xlsx).

Nun wählt man den Basiswert für die Trimmoperation. Hierzu wird in Spalte C die Zeile gesucht, ab der die Kräfte eine kontinuierliche Steigung aufweisen. Der in dieser Zeile zugeordnete Betrag des Displacements aus Spalte B wird in D5 kopiert.

Anschließend werden aus dem Testprotokoll die gemessenen Werte für Länge, Breite und Höhe der entsprechenden Probe in die Zellen J4, K4 und L4 übertragen. Der im Diagramm grün gestrichelt markierte Bereich der Hook'schen Geraden muss für eine korrekte Berechnung des E-Moduls den näherungsweise linear ansteigenden Bereich der Spannungs-Dehnungs-Datenreihe überspannen. Daher müssen die Quellenfelder für diesen Diagrammteil so angepasst werden, dass dieses Kriterium erfüllt ist. Innerhalb des Diagrammfeldes wird automatisch die – der Hook'schen Geraden entsprechende – Geradenfunktion berechnet und angezeigt. Sie besitzt die gängig Standardform  $y=a \cdot x+b$ , wobei  $a$  der Steigung und damit dem E-Modul entspricht. Dieser Wert muss – für die einheitenkorrekte Berechnung des E-Moduls – in die Zelle Q3 eingetragen werden. Danach liegen Druckfestigkeit und E-Modul vor und die Datei kann abgespeichert werden. Die Durchführung dieses Vorgangs ist für jede einzelne Probe notwendig.

## 5.9 Prüfprozedur

Aus der Literatur sind zwei verschiedene Prüfverfahren bekannt.

Bei der ersten findet vor der eigentlichen Druckprüfung eine sinusförmige Belastung statt. Die Amplitude wählt man hierbei – mit 0,3 % Dehnung – weit im unterschweligen Bereich. Das heißt, die Belastung führt noch nicht zum Versagen der Probe. Erst nach den Vorbereitungszyklen wird bis zur Zerstörung geprüft. Dieses Vorgehen soll einen konditionierenden Effekt auf die Probe haben und die Streuung verringern. Die Verfahrensgeschwindigkeit des Stempels bei der eigentlichen Prüfung wird mit 0,5 %/s angegeben [53 S. 572]. Bei einer Probenhöhe von 19 mm entsprechen 0,5 % 0,095 mm. Dadurch kommt eine Verfahrensgeschwindigkeit von 0,095 mm/s  $\approx$  0,1 mm/s zustande.

Das zweite Prüfverfahren gibt eine Vorlast von 7,5 N auf die Probe, um ein sattes Anliegen des Stempels auf der Probenoberfläche zu gewährleisten. Danach wird direkt die zerstörende Prüfung angeschlossen. Für diese wird eine Verfahrensgeschwindigkeit von 0,017 mm/s angegeben [9 S. 5].

In den Vorversuchsreihen sollen beide Verfahren getestet und die Ergebnisse verglichen werden.

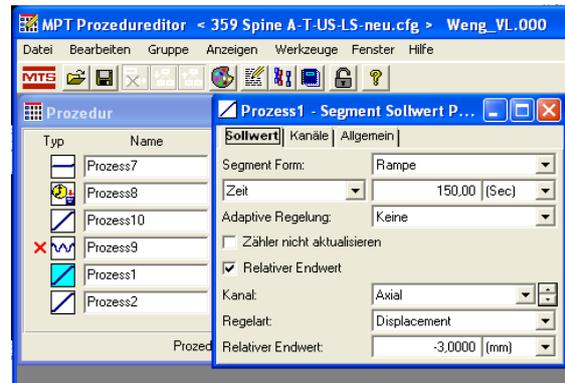
Um nicht zu viele Parameter zu verändern, soll eine Testprozedur mit Sinuskonditionierung zusammengestellt werden, von der sich die zweite Prozedur nur durch das Abschalten des Sinus unterscheidet.

Die beiden Prozeduren aus der Literatur weisen eine um den Faktor zehn differierende Verfahrensgeschwindigkeit auf. Es wurde beobachtet, dass die Druckfestigkeit von Spongiosa unter schnelleren Verfahrensgeschwindigkeiten höher ist [52 S. 236]. Dies könnte auf einem dynamischen Effekt durch die Pufferwirkung des Knochenmarks beruhen, das bei hoher Kompressionsgeschwindigkeit der Kraft nur zähfließend ausweichen kann. Dieser Effekt würde bei langsamerer Kompression seine Wirksamkeit verlieren. Um eventuelle dynamische Effekte auszuschließen, wird mit 0,02 mm/s eine Geschwindigkeit nahe der geringeren Verfahrensgeschwindigkeit gewählt. Diese Geschwindigkeit soll sowohl für den Test an sich als auch für die Konditionierung verwendet werden. Die Rampe für den zerstörenden Test wird weggesteuert. Das heißt, die Probe wird 3 mm komprimiert. Bei dieser Kompressionsstrecke kommt es unter allen Umständen zum Versagen der Probe. Die sinusförmige Last erhält nach orientierenden Tests eine Amplitude von 250 N. Bei dieser Kraft kommen die in der Literatur angegebenen 0,3 % Dehnung zustande. Aus regelungstechnischen Gründen kann die Kraft nicht zwischen null und 250 N alternieren. Eine Grundlast muss kontinuierlich aufrechterhalten werden. Daher wird eine schwingende Kraft zwischen 50 N und 250 N gewählt. In verschiedenen Quellen werden drei, fünf, acht oder zehn Konditionierungszyklen durchlaufen [58 S. 602] [53 S. 572] [59 S. 1132]. Die Probe soll hier mit einer moderaten Anzahl von fünf Zyklen beaufschlagt werden.

## 5.9.1 Prozedureditor



**Abb. 53: Prozedureditor**  
 Prozedur mit abgeschalteter  
 Sinusschwingung  
 Prozessstyppalette mit Baustein-  
 auswahl



**Abb. 54: Prozess1 Eigenschaften**  
 Prozedur mit geöffneten  
 Prozesseigenschaften von Prozess1  
 (Icon daher blau unterlegt)  
 Sollwertreiter sichtbar

Die Prozeduroberfläche zeigt Prozessstyp, Prozessname, Startbedingung und Unterbrechungsbedingung an. Jeder Prozess kann geöffnet werden, um auf dessen Eigenschaften zuzugreifen und dessen Einstellungen anzupassen.

Prozess7 dient der Verriegelung der nicht benötigten Maschinenachsen. So wird vermieden, dass sich durch die auftretenden Testkräfte unerwünschte Bewegungen entstehen. Die verriegelten Achsen sind die Torsionsachse, lower spine und upper spine. Dieser Prozess startet und endet mit Start und Ende der Prozedur.

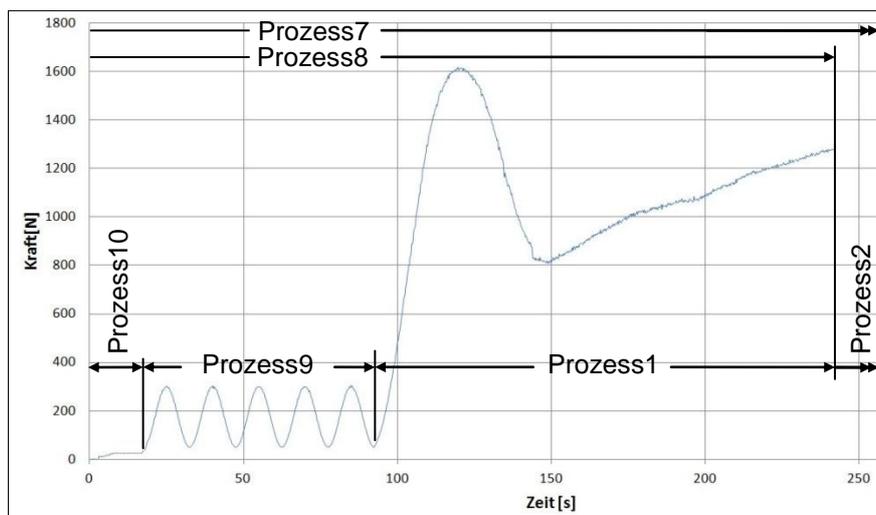
Prozess8 zeichnet die Messdaten auf. Die Aufzeichnung von Laufzeit, axialer Verfahrensweg, axiale Kraft sowie die Aufzeichnungsfrequenz werden hier gesteuert. Der Prozess beginnt mit dem Prozedurstart und endet nach Ablauf von Prozess1.

Mittels Prozess10 wird der Kontakt zur Probe hergestellt. Mit einer kraftgesteuerten Rampe fährt der Stempel über zehn Sekunden und einen Anpressdruck von 20 Newton gegen die Probe. Dies gewährleistet einen kontrollierten sanften Kontakt zur Probe und stellt einen flächigen Kontakt zwischen Stempel und Probenfläche her. Der Prozess beginnt mit dem Prozedurstart und endet nach Ablauf der Rampenlaufzeit von 20 s.

Prozess9 übernimmt die oben beschriebene Konditionierung. Amplitude, Zyklenzahl und Frequenz werden hierüber gesteuert. Prozess 8 startet mit dem Ende von Prozess10 und endet nach Ablauf der 5 Konditionierungszyklen.

Prozess1 stellt die eigentliche Testung dar. Mittels weggesteuerter Rampe wird der Stempel über 150 s Sekunden 3 mm weit abwärts bewegt. Der Prozess beginnt nach Beendigung von Prozess8 und endet mit Ablauf seiner 150-sekündigen Laufzeit. Im Falle der Deaktivierung von Prozess8 beginnt Prozess1 am Ende von Prozess10.

Prozess2 fährt den Stempel weggesteuert innerhalb von fünf Sekunden um fünf Millimeter nach oben. Der Stempel fährt dadurch in eine Abstandsposition, so dass die Probe frei wird und gehandelt werden kann. Dieser Prozess startet mit Ende des vorigen und stellt das Ende der Prozedur dar.



**Abb. 55: Prozedurablauf**

Diagramm des Prozedurablaufes Kraft über Zeit aufgetragen. Prozesslaufzeiten wurden eingezeichnet. Prozess 7 und 8 komprimiert dargestellt, da Zeitachse bei 250s zur besseren Übersichtlichkeit endet.

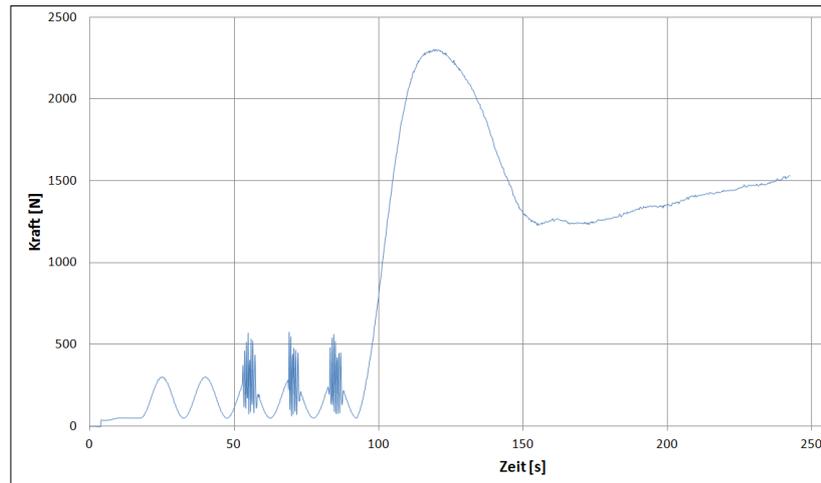
Die detaillierten Eigenschaften der Prozesse können dem digitalen Anhang entnommen werden.

## 5.10 Vorversuchsreihe

Die Vorversuchsreihe wurde durchgeführt, um zwischen den zwei verschiedenen Testverfahren zu entscheiden sowie die nötige Fallzahl für die Hauptversuchsreihe zu ermitteln. Weiter galt es, die zu wählende Probenorientierung anterior-posterior bzw. medial-lateral zu überprüfen. Darüber hinaus fand der Probenablauf inklusive aller Vorrichtungen exakt wie in den Hauptversuchen statt, da so die Zuverlässigkeit der Methodik validiert werden konnte. Hierfür standen 37 Femurköpfe zur Verfügung. Sinuslast-Prozedur und Vorlast-Prozedur wurden im Wechsel durchgeführt. Dadurch war es möglich im Falle eines frühzeitigen Ausschlusskriteriums die restliche Probenanzahl dem zielführenderen Test zu unterziehen. Die Tests zur Probenausrichtung wurden an sechs Femurköpfen mit dem Testverfahren, auf das die letztendliche Wahl fiel, durchgeführt.

Die auf der Stempelstirnfläche adaptierte Teflonplatte erwies sich schnell als den mechanischen Belastungen nicht gewachsen. Nach den ersten Versuchen zeigten sie starke Verformungserscheinungen sowie Impressionen der Trabekelstruktur. Im Weiteren wurde daher auf die Teflonschicht verzichtet und die Reibungsminimierung durch Schmierung mittels Vaseline gewährleistet.

Bei der Sinuslast-Prozedur trat während der Konditionierung wiederholt ein Aufschwingungsphänomen auf. Dies hatte zur Folge, dass die programmierten Maximalkräfte, wenn auch nicht um ein Vielfaches, doch aber unkontrolliert überschritten wurden. Dies ließ an der Zuverlässigkeit des Testverfahrens zweifeln. Eine Erklärung hierfür könnten ruckartige Impulse aus Defekten der Mikrostruktur sein, die zum Aufbau einer Schwingung im Regelkreis führen. Das Auftreten von Mikrodefekten bei der Konditionierung, die bei dieser Belastung bereits entstehen, wird in der Literatur beschrieben [59 S. 1132].



**Abb. 56: Aufschwingen bei Konditionierung**

Diagramm des Prozedurablaufes Kraft über Zeit aufgetragen. Aufschwingerscheinungen im Bereich der Scheitelpunkte von Sinusschwingung 3, 4 und 5 zu sehen.

Anfangs wurden zehn Probenpaare mittels Vorlast-Prozedur, elf mittels Sinuslast-Prozedur getestet. Für die Ausrichtungstests wurden sechs Probenpaare verwendet. Diese wurden medial-lateral, also um 90° zur in Abschnitt 5.2.3 festgelegten Schnittrichtung gedreht, aus dem Femurkopf entnommen.

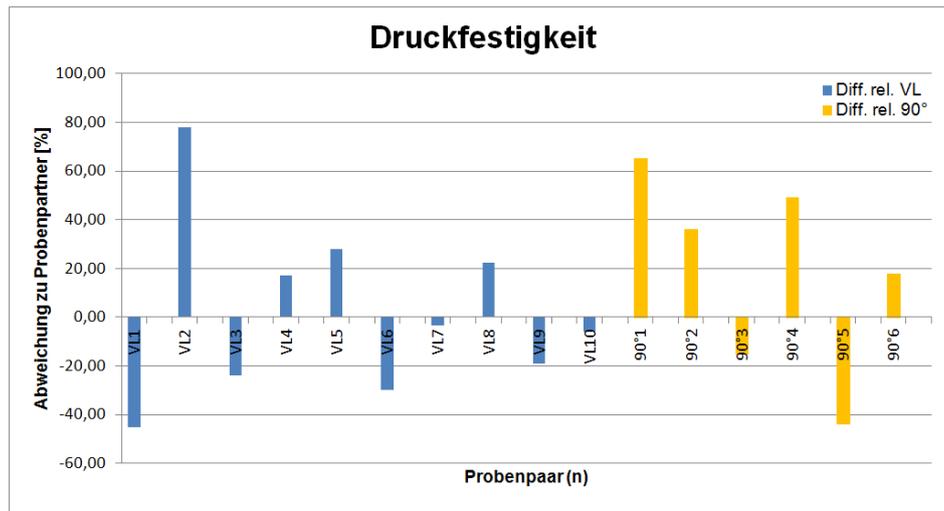
Die Aufschwingerscheinungen im Sinuszyklus zeigten sich im Versuchsverlauf als unberechenbar und verstärkten den Eindruck der Unzuverlässigkeit dieses Testverfahrens. Die Vorlast-Testungen ohne Konditionierung verliefen durchgehend ohne Komplikationen. Diese Erkenntnisse führten zu der Entscheidung zugunsten der Testung ohne sinusförmige Konditionierung. Schon für die Ausrichtungstests wurde deshalb der Vorlasttest verwendet.

Für die Betrachtung des Einflusses der Probenorientierung wurden die Testergebnisse aufbereitet und im Diagramm dargestellt.

Eine übersichtliche Darstellung der Daten konnte durch die Bildung der relativen Abweichung, jeweils zwischen den beiden Proben innerhalb eines Probenpaares, erreicht werden. Diese berechnet sich wie folgt:

$$\frac{VL_{1,2} - VL_{1,1}}{VL_{1,1}} \times 100 \%$$

In einem Diagramm aufgetragen, zeigt sich eine übersichtliche Darstellung der prozentualen Abweichung innerhalb der einzelnen Probenpaare (siehe Abb. 57). Beispielsweise zeigte die Probe VL\_1\_2 innerhalb des Probenpaares VL\_1 eine um über 40 % niedrigere Druckfestigkeit in Vergleich zu Probe VL\_1\_1 (siehe Abb. 57).



**Abb. 57: Vorversuchsergebnisse VL und 90°**

Relative Differenzen der Druckfestigkeit innerhalb der Probenpaare  
 Blau: Probe mit anterior-posteriorer Ausrichtung  
 Gelb: Probe mit anterior-posteriorer Ausrichtung

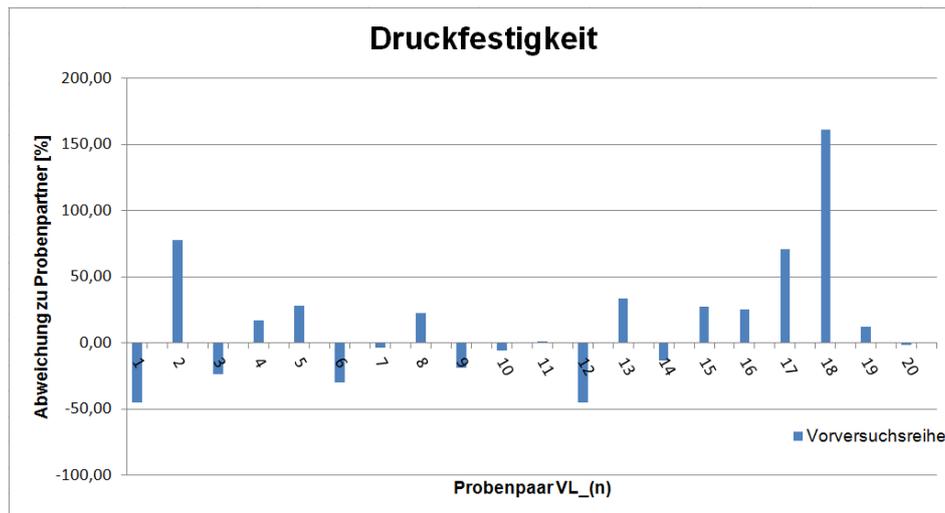
Nach Aufbereitung und Visualisierung der Testergebnisse folgte die statistische Analyse. Alle statistischen Auswertungen in dieser Arbeit wurden mit der Open-Source-Software R durchgeführt und können im digitalen Anhang im Detail eingesehen werden.

Zum Vergleich der Varianzen der beiden Gruppen kam ein F-Test zur Anwendung [60 S. 195]. Der Test konnte keinen signifikanten Unterschied zwischen den Varianzen der beiden Gruppen nachweisen ( $p = 0,1921$ ). Die auf gleiche Weise durchgeführte Analyse der E-Moduln ergab dieselbe Aussage ( $p = 0,6419$ ). Die ursprünglich erdachte und durch die Literatur gestützte anterior-posteriore Probenorientierung (Abb. 13) wurde daher beibehalten.

Nach dieser Entscheidung fanden Vorlasttests an weiteren zehn Probenpaaren statt, um für die Stückzahlbestimmung eine größere Datenbasis zu generieren.

## 5.11 Stückzahlbestimmung

Die in den Vorversuchen mittels Vorlastprozedur getesteten zwanzig Probenpaare wurden zur Bestimmung der benötigten Stückzahl für die Hauptversuche herangezogen.



**Abb. 58: Druckfestigkeit Vorversuche**  
 Relative Differenzen der Druckfestigkeit innerhalb der Probenpaare  
 Probenorientierung anterior-posterior  
 Testverfahren Vorlastprozedur

Zunächst wurden ein Jarque-Bera-Test und ein Shapiro-Wilk-Test durchgeführt, um auf der Basis der Stichprobenwerte zu ermitteln, ob die Differenzen aus einer normalverteilten Grundgesamtheit stammen können [61 S. 255-259] [62 S. 591-611].

Vorversuche	Jarque-Bera-Test	Shapiro-Wilk-Test
<b>Druckfestigkeit</b>	p = 0,6319	p = 0,6449
<b>E-Modul</b>	p = 0,9872	p = 0,9836

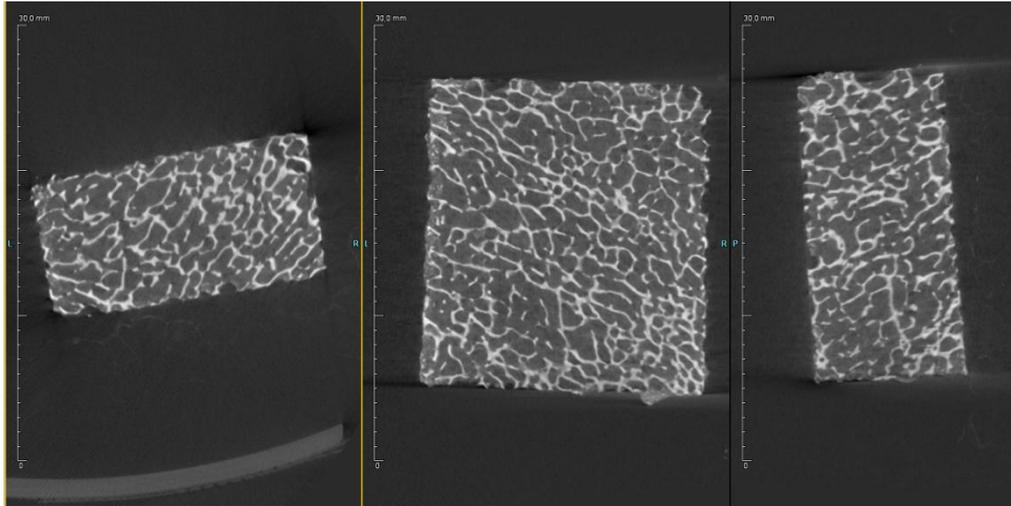
**Tab. 1: Normalverteilungstests Vorversuche**  
 p-values

Beide Tests ergaben für Druckfestigkeit und E-Modul gleichermaßen, dass die Hypothese des Vorliegens einer Normalverteilung nicht verworfen werden kann. Es wird also davon ausgegangen, dass die Differenzen innerhalb der Probenpaare einer Normalverteilung unterliegen. Diese Voraussetzung lässt die Durchführung einer t-Test-basierten Poweranalyse zur eigentlichen Stückzahlbestimmung zu. Die hierbei verwendeten Parameter sind die für den vorliegenden Fall in der Literatur vorgeschlagenen. Das Signifikanzniveau liegt bei 5 %, die Power bei 80 %, die Effect Size bei 0,5 [63 S. 155-159]. Es wurde ein beidseitiger t-Test gewählt, da durch die Zellbesiedelung – wie beschrieben – Differenzen nach oben oder unten denkbar wären. Die Analyse ergab ein N von mindestens 34 zu testenden Probenpaaren. Um einen Puffer für eventuelle Ausreißer o.ä. zu erreichen und da diese Probenanzahl realistisch erreichbar schien, wurde eine Stückzahl von 40 anvisiert. Beim Ausbleiben von Störungen konnte auf diese Weise eine höhere erreichbare Power von 86,9 % errechnet werden.

## **5.12 Micro-CT**

Erst im Verlauf der Arbeit wurde der Kontakt zur Forschungsgruppe des PET-Labors in Tübingen hergestellt. Deshalb und auf Grund des hohen Aufwandes war nicht die Untersuchung aller Proben möglich. Dennoch sollte die Micro-Computertomographische Untersuchung einiger Proben im Zuge dieser Arbeit durchgeführt werden. Von besonderem Interesse war hierbei Identifizierung von Strukturinhomogenitäten wie z.B. zystoiden Arealen oder Frakturen in den Probekörpern. So sollte eine Eliminierung von Ausreißern in den Messreihen ermöglicht werden.

Die Messungen der Proben und deren Auswertung wurden von der Forschungsgruppe um Herrn Prof. Bernd Pichler (Werner Siemens Imaging Center, Universitätsklinikum Tübingen) an einem Inveon Kleintier-SPECT/CT der Firma Siemens (Siemens Preclinical Solutions, Knoxville, TN, USA) durchgeführt.



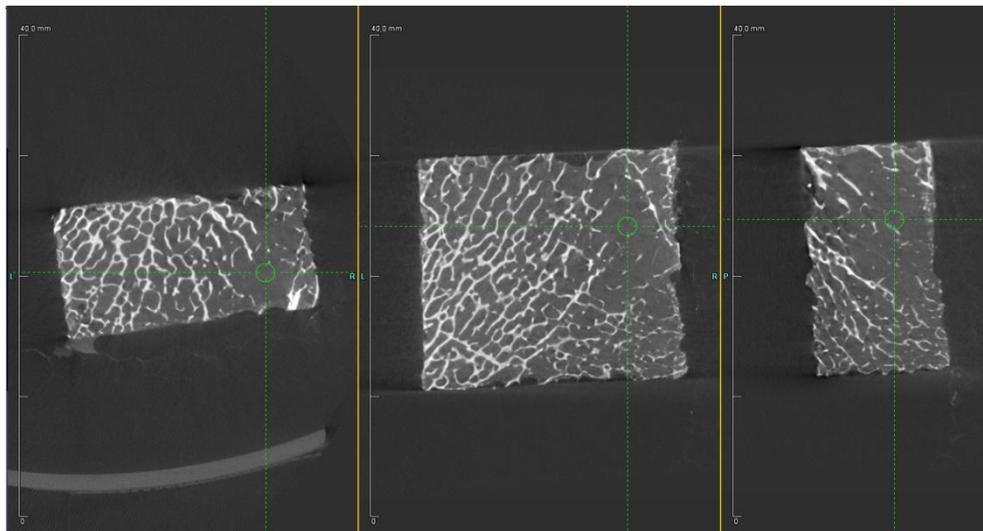
**Abb. 59: CT Homogene Probe**

Bone\_48\_1

Musterbeispiel für eine homogene Knochenprobe

Rekonstruierte Pixelgröße 35  $\mu$

Es konnten CT-Befunde gefunden werden, die aufgrund von mikrostrukturellen Defiziten den Verdacht einer entsprechend geringeren Festigkeit nahe legen. Die zugehörige Druckfestigkeit konnte dann aber mitunter trotzdem deutlich erhöhte Festigkeitswerte aufweisen.



**Abb. 60: CT Probe mit Strukturinhomogenität**

Bone\_47\_2

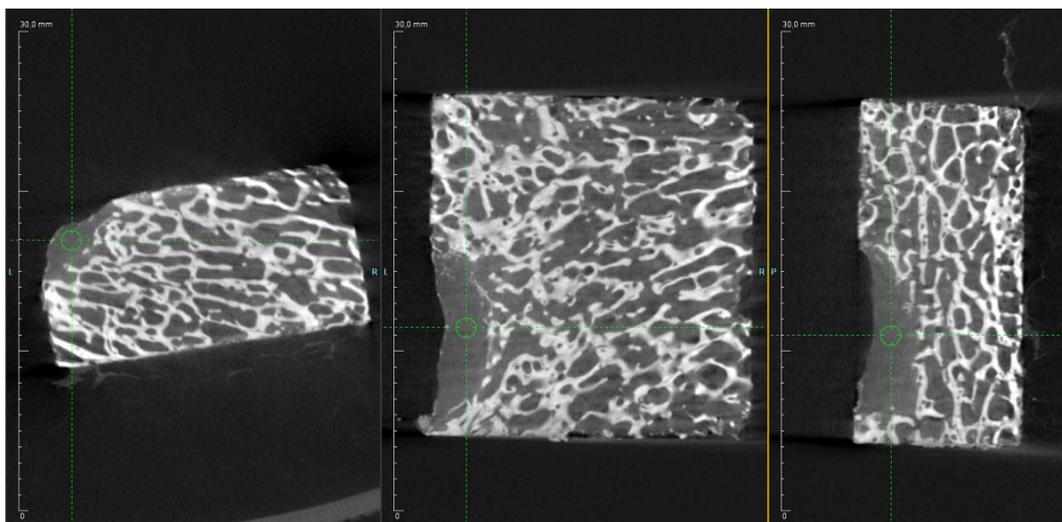
Hypomineralisierte Zone durch Fadenkreuz markiert

Rekonstruierte Pixelgröße 35  $\mu$

Der Verdacht liegt nahe, dass Defekte durch umliegendes Gewebe kompensiert oder sogar überkompensiert werden können, so dass sie sich nicht oder nur dezent als Festigkeitsbeeinträchtigender Faktor niederschlagen. Durch den Abgleich von schon ohne apparativen Aufwand sichtbar defektbehafteten Proben mit den zugehörigen Druckfestigkeiten konnte diese Hypothese bestärkt werden.



**Abb. 61: Probe mit Zyste**  
Bone 41\_2



**Abb. 62: CT Probe mit Zyste**  
Bone\_41\_2  
Zystoider Bereich durch Fadenkreuz markiert  
Rekonstruierte Pixelgröße 35  $\mu$

Die Probe 41\_2 wies eine in Abb. 61 gut zu erkennende große zystoide Veränderung auf. Dennoch erreichte die Probe eine ca. 61 % höhere Druckfestigkeit als der Durchschnittswert aller Proben der Hauptversuchsreihe. Der Wert war ebenso um ca. 54 % höher als die Druckfestigkeit der zystenlosen zweiten Probe aus diesem Probenpaar. Auch wenn in Abb. 62 keine direkte Hartgewebsverdichtung zu sehen ist, wäre eine Kompensation durch die Struktur der umliegenden Mikroarchitektur denkbar.

Eine einheitliche Korrelation zwischen Bildgebung und Festigkeitsmesswerten war demnach nicht erkennbar, daher konnte die Micro-CT-Untersuchung nicht dazu beitragen, eventuelle Ausreißer zu identifizieren.

Durch die sehr feine Auflösung war die Sichtbarkeit eines dichteren Zellbesatzes oder initialer Kalziumablagerung nach Langzeitbesiedelung vorstellbar. Unter anderem zur Überprüfung auf eventuelle hierauf basierende randständige Verschattungen wurden die langzeitbesiedelten Proben der CT-Untersuchung unterzogen.

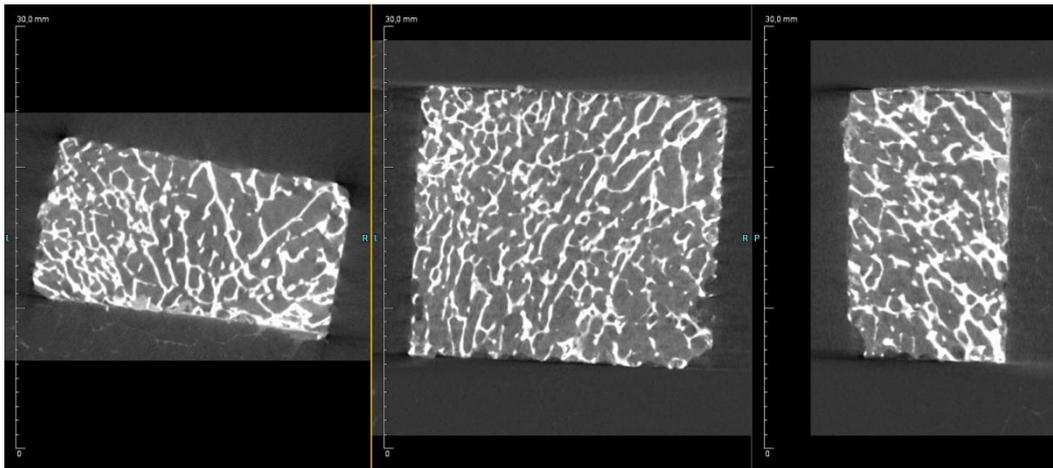
Mineraldichte Anlagerungen konnten radiologisch nicht beobachtet werden. Jedoch konnte ein dichterer Zellbesatz sowohl mit bloßem Auge als auch radiologisch identifiziert werden.



**Abb. 63: Unbesiedelte / besiedelte Probe**  
Links unbesiedelte Probe ohne Zellayer  
Rechts besiedelte Probe mit Zellayer



**Abb. 64: Langzeitbesiedelt**  
Deutlicher Zellayer nach  
fünfwöchiger Besiedelung



**Abb. 65: CT Langzeitbesiedelte Probe**

Bone\_23\_3

Rechts außen randständig partiell dichter Zellbesatz sichtbar

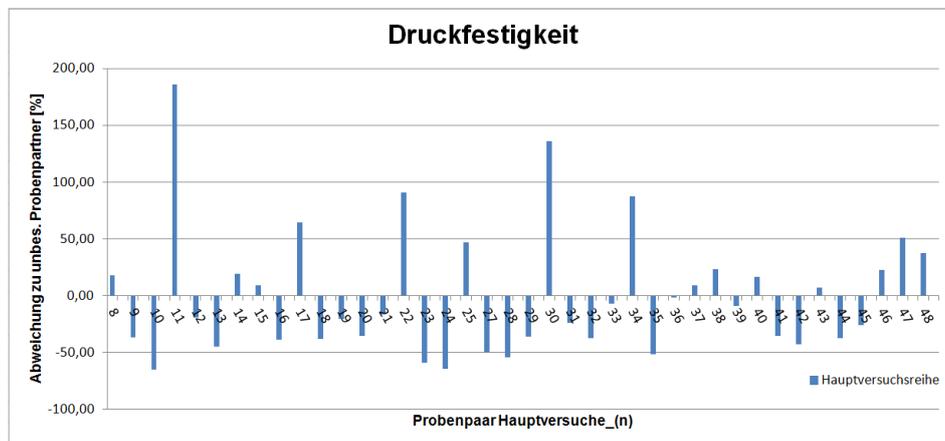
Rekonstruierte Pixelgröße 35  $\mu$

## 6 Ergebnisse

### 6.1 Hauptversuche

#### 6.1.1 Druckfestigkeit

Die Datenaufbereitung und -darstellung findet wie im Abschnitt 5.10 beschrieben statt.



**Abb. 66: Druckfestigkeit Hauptversuche**  
 Relative Differenzen der Druckfestigkeit innerhalb der Probenpaare  
 Probenorientierung anterior-posterior  
 Testverfahren Vorlastprozedur

Auch hier werden zunächst ein Jarque-Bera-Test und ein Shapiro-Wilk-Test durchgeführt, um auf der Basis der Stichprobenwerte zu ermitteln, ob die Differenzen aus einer normalverteilten Grundgesamtheit stammen können.

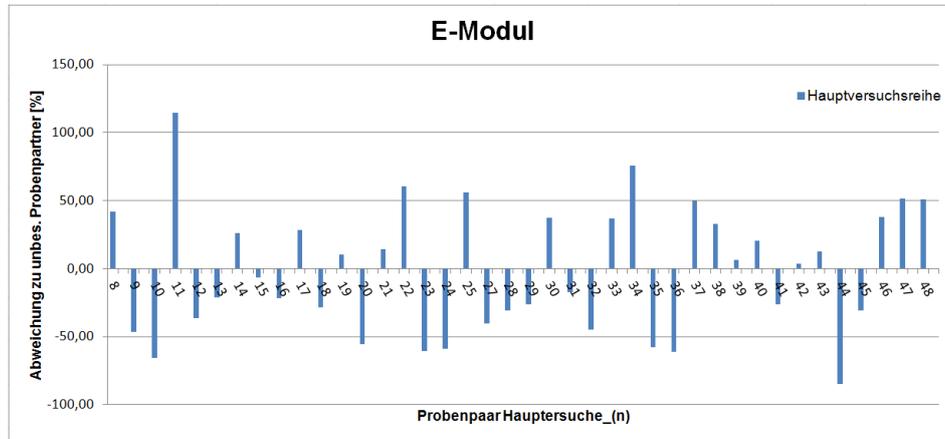
Hauptversuche	Jarque-Bera-Test	Shapiro-Wilk-Test
Druckfestigkeit	$p = 0,0496$	$p = 0,0840$

**Tab. 2: Normalverteilungstests Druckfestigkeit Vorversuche**  
 p-values

Die Hypothese, dass eine normalverteilte Grundgesamtheit vorliegt, kann zu einem Signifikanzniveau von 1 % nicht verworfen werden, was die Anwendung eines parametrischen Verfahrens rechtfertigt. Hierfür wird der Zweistichproben-t-Test verwendet [60 S. 187-191]. Dieser ermittelt, ob sich die Mittelwerte der besiedelten Proben und der nicht besiedelten Proben signifikant voneinander unterscheiden. Bei einem Signifikanzniveau von 1 % ergibt dieser Test keine signifikante Veränderung der Druckfestigkeit durch die Zellbesiedelung ( $p = 0,2122$ ).

Allerdings muss die Hypothese des Jarque-Bera-Tests bei der Druckfestigkeit mit  $p = 0,0496$  zu einem Signifikanzniveau von 5 % knapp verworfen werden. Daher könnte Skepsis hinsichtlich der angenommenen normalverteilten Grundgesamtheit gerechtfertigt sein. Damit könnte die Voraussetzung für die Anwendung des t-Tests in Frage gestellt werden. Deshalb werden für diese Versuchsreihe zusätzlich zwei nichtparametrische Testverfahren angewendet. Diese benötigen die Voraussetzung einer zugrundeliegenden normalverteilten Grundgesamtheit nicht. Die dafür eingesetzten Tests sind die beiden Zweistichproben-Problem-Tests für verbundene Stichproben, Sign-Test und Wilcoxon-Test [64 S. 165-174]. Die Hypothese zu diesen Tests kann zu Signifikanzniveaus von 1 % und 5 % nicht verworfen werden ( $p_{\text{Wilcoxon}} = 0,0867$  /  $p_{\text{Sign}} = 0,2682$ ). Daher erbringen auch diese beiden Tests das Ergebnis, dass keine signifikante Veränderung der Druckfestigkeit besteht.

## 6.1.2 E-Modul



**Abb. 67: E-Modul Hauptversuche**

Relative Differenzen des E-Moduls innerhalb der Probenpaare  
 Probenorientierung anterior-posterior  
 Testverfahren Vorlastprozedur

Hauptversuche	Jarque-Bera-Test	Shapiro-Wilk-Test
E-Modul	$p = 0,3761$	$p = 0,1092$

**Tab. 3: Normalverteilungstests E-Modul Vorversuche**  
 p-values

In diesem Fall kann im Jarque-Bera-Test und Shapiro-Wilk-Test die Hypothese, dass die Differenzen aus einer normalverteilten Grundgesamtheit stammen, nicht verworfen werden. Der Vollständigkeit halber wird dennoch nicht auf die parametrischen Tests verzichtet.

Die t-Test-Betrachtung des E-Moduls ergibt zu Signifikanzniveaus von 5 % und 1 %, dass von einer Verschiedenheit des Mittelwertes der beiden Testreihen besiedelter und nicht besiedelter Proben nicht ausgegangen werden kann ( $p = 0,188$ ). Die Ergebnisse der nicht parametrischen Tests ergeben erneut dieselbe Aussage ( $p_{\text{Wilcoxon}} = 0,2163$  /  $p_{\text{Sign}} = 1,0$ ).

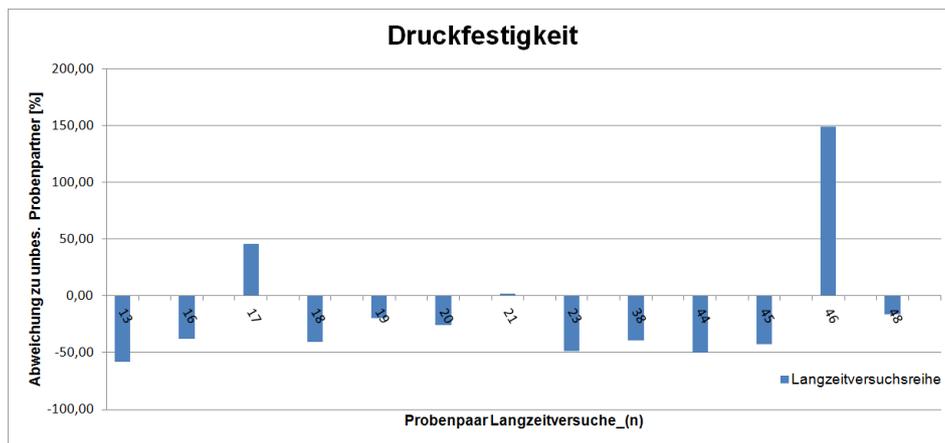
So kann zusammenfassend die Aussage getroffen werden, dass alle Tests keine signifikante Veränderung der mechanischen Eigenschaften durch die

vorangegangene Behandlung ergeben. Dies gilt, sowohl für die Betrachtung der Druckfestigkeitswerte, als auch der E-Modulwerte.

## 6.2 Langzeitversuche

Die Werte der langzeitbesiedelten Proben erfahren dieselbe statistische Aufarbeitung.

### 6.2.1 Druckfestigkeit



**Abb. 68: Druckfestigkeit Langzeitversuche**  
Relative Differenzen der Druckfestigkeit innerhalb der Probenpaare  
Probenorientierung anterior-posterior  
Testverfahren Vorlastprozedur

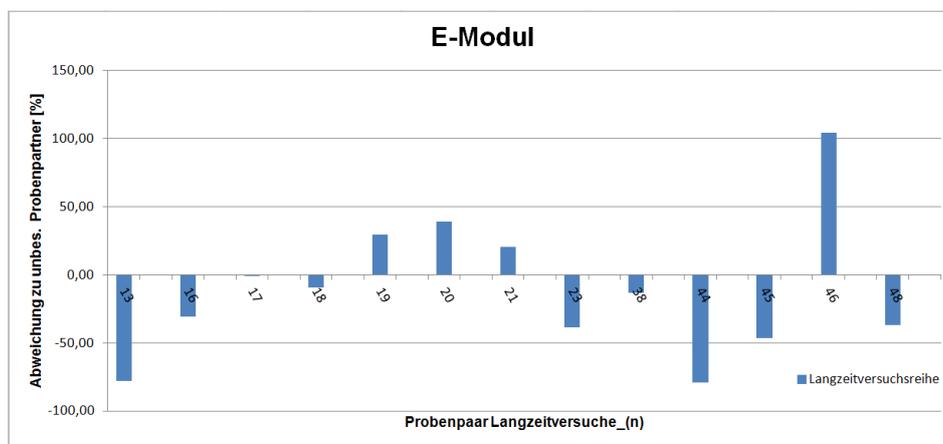
Langzeitversuche	Jarque-Bera-Test	Shapiro-Wilk-Test
Druckfestigkeit	$p = 0,9759$	$p = 0,9986$

**Tab. 4: Normalverteilungstests Druckfestigkeit Langzeitversuche**  
p-values

Auch hier folgt aus Tab. 4, dass von einer normalverteilten Grundgesamtheit ausgegangen werden kann. Wie auch zuvor kommen daher

erneut t-Test, Wilcoxon-Test und Sign-Test zur Anwendung. Auch hier zeigen diese zu einem Signifikanzniveau von 1 %, dass durch die Besiedelung keine signifikante Festigkeitsänderung auftritt ( $p_{t\text{-Test}} = 0,0433$  /  $p_{\text{Wilcoxon}} = 0,0479$  /  $p_{\text{Sign-Test}} = 0,0923$ ).

## 6.2.2 E-Modul



**Abb. 69: E-Modul Langzeitversuche**

Relative Differenzen des E-Moduls innerhalb der Probenpaare  
 Probenorientierung anterior-posterior  
 Testverfahren Vorlastprozedur

Langzeitversuche	Jarque-Bera-Test	Shapiro-Wilk-Test
<b>E-Modul</b>	$p = 0,4428$	$p = 0,4974$

**Tab. 5: Normalverteilungstests E-Modul Langzeitversuche**  
 p-values

Nach Tab. 5 kann auch hier die Hypothese, dass eine normalverteilte Grundgesamtheit vorliegt, zu Signifikanzniveaus von 1 % und 5 % nicht verworfen werden. Dies rechtfertigt erneut die Anwendung von t-Test, Wilcoxon-Test und Sign-Test. Auch hier ergeben diese, dass durch die Besiedelung zu einem Signifikanzniveau von 1 % keine signifikante

Festigkeitsänderung auftritt ( $p_{t\text{-Test}} = 0,0433$  /  $p_{\text{Wilcoxon}} = 0,0479$  /  $p_{\text{Sign-Test}} = 0,0923$ ).

Das heißt, dass trotz der sehr langen Besiedelungsdauer keine signifikante Veränderung von Druckfestigkeit und Elastizitätsmodul beobachtet werden kann. Allerdings sollte hierbei beachtet werden, dass die Stückzahl in der Reihe der Langzeitbesiedelung sehr viel geringer ist als die der Hauptversuchsreihe. Die Aussage bezüglich dieser Werte sollte daher allenfalls als Abschätzung betrachtet werden.

## 7 Diskussion

Der Arbeit zu Grunde lag das Bestreben, devitalisierten – und im heute gängigen Fall auch so transplantierten [65] [66] – allogenen Spenderknochen mit empfängereigenen Stammzellen zu besiedeln. Spenderknochen könnten zukünftig mit autologen Stammzellen des Empfängers in vitro vor der Übertragung des Transplantates besiedelt werden. Hierdurch soll eine dem autologen Transplantat ähnliche Situation geschaffen werden, um eine verbesserte und beschleunigte Osseointegration des Knochentransplantates zu erzielen. Durch die – zur Zellbesiedelung nötige – mehrtägige Lagerung in einem Zellkulturbad, könnte es aber zu einer negativen Veränderung der biomechanischen Eigenschaften des Transplantatknochens kommen.

Ziel der vorliegenden Studie war es, Festigkeitsänderungen statistisch signifikant zu erfassen und eine Abschätzung des Einflusses der Lagerung im Zellmedium auf die Belastbarkeit des homologen Scaffolds zu erreichen. Damit sollte die Verwendbarkeit des behandelten Knochens aus rein mechanischer Sicht im operativen Vorgehen abgeschätzt werden.

An 39 symmetrischen, aus humanen Femurköpfen zugeschnittenen Probenpaaren erfolgte mittels Druckversuch an einer MTS Bionix-Prüfmaschine die Versuchsdurchführung. Hierfür fand zunächst Konstruktion und Bau von Probenhalterung sowie Sägevorrichtung statt. Mit Vorversuchen an 60 nicht zellbesiedelten Probenpaaren wurde die zur Datenerhebung benötigte

Stückzahl ermittelt sowie die möglichen Belastungsmuster durch die Prüfmaschine festgelegt [9] [53]. Aus den gewonnenen Daten folgte die Ableitung und Programmierung einer Prüfprozedur für die numerische Steuerung der Prüfmaschine. Jeweils eine Probe aus jedem Probepaar wurde über zehn Tage zellbesiedelt und gegen die jeweils unbesiedelte, aus demselben Femurkopf, auf Druckfestigkeit sowie E-Modul gemessen. Zur Abschätzung des Einflusses der Besiedelungsdauer wurden exemplarisch weitere 13 Proben über einen Zeitraum von fünf Wochen besiedelt und anschließend getestet. Um eine Kontrolle über eventuelle strukturelle Inhomogenitäten wie Risse oder zystisch bzw. sklerotisch veränderte Bereiche zu erhalten, erfolgte vor der Prüfung ein hochauflösendes Mikro-Computertomogramm.

Da es sich hierbei um einen neuen Ansatz handelt, gibt es bisher keine Studien oder Daten zur Stabilität von Knochentransplantaten vor und nach Zellbesiedlung. Eine Diskussion zu vergleichender Literatur ist daher leider nicht möglich.

Im Folgenden sollen Herangehensweise und Erkenntnisse der einzelnen Teilabschnitte der Arbeit diskutiert werden.

## **7.1 Material und Methoden**

### **Probenmaterial**

Als Probenmaterial kam in der vorliegenden Studie der humane Femurkopf zum Einsatz. Der wesentliche Vorteil hierbei ist, dass durch Eingriffe im Rahmen der Hüftendoprotetik eine ausreichende Menge an solidem humanem Knochenmaterial anfällt. Ein Nachteil dieser anatomischen Struktur ist die ihr eigene biomechanisch begründbare Inhomogenität [54 S. 1] [1 S. 165] [2 S. 145] [3 S. 7]. Um durch Gewebehomogenität bedingte Festigkeitsabweichungen möglichst zu minimieren, wurde eine entsprechende Entnahmeerorientierung der Propekörper ermittelt und eine Mittelung der Gewebehomogenität durch möglichst große Probengrundfläche gewählt.

Dennoch blieb die grundlegende Schwierigkeit natürlich in Grenzen bestehen. Um Abhilfe zu schaffen, wäre es denkbar, Knochenmaterial aus möglicherweise homogeneren anatomischen Regionen zu rekrutieren. Dabei tritt jedoch wiederum die Beschaffungsproblematik in den Vordergrund. Sollte alternativ die Verwendung tierischen Materials angestrebt werden, um eine einfache Beschaffung gewährleisten zu können, könnte jedoch die Übertragbarkeit der Ergebnisse auf die humanen Gegebenheiten in Frage gestellt werden. Unter den gegebenen Rahmenbedingungen sollte daher in Summe der Femurkopf die beste Alternative darstellen.

### **Testverfahren**

Bei der Wahl des Testverfahrens wurde dem Vorbild der Literatur gefolgt [9] [52] [53]. Den Druckversuch als Testverfahren einzusetzen, zeigte, wie in Abschnitt 5.2.2 eruiert, nur Vorteile. Es gab keine Schwierigkeiten bei der Probenfixierung. Ebenso konnten Einflüsse auf Grund von Spannkraften durch die Probenfixierung ausgeschlossen werden. Um im Druckversuch Messartefakte durch die Kontaktflächen zwischen Knochenprobe und Druckstempel – so genannte Endartefakte – zu vermeiden, bestehen in der Literatur verschiedene Ansätze. Hierbei kommt die Verminderung der Reibung zwischen Stempel und Probe zum Einsatz. Ein Mittel zur Reibungsverminderung ist eine aus Teflon bestehende Stempeloberfläche [9 S. 5]. Teilweise wurde jedoch auch auf eine Reibungsverminderung verzichtet beziehungsweise mittels Verkleben der Auflageflächen die Reibung quasi gegen Unendlich erhöht [53 S. 572]. Die Umsetzung in den genannten Studien war in diesem Punkt also gegensätzlich. Die Tatsache, dass die nach Verklebung der Flächen mittels Cyanacrylatklebstoff auftretenden Scherkräfte die Verklebung zum Versagen brachte, zeigt die Notwendigkeit einer Relativbewegungsmöglichkeit zwischen den Reibflächen. In der hier vorliegenden Studie wurde folglich eine Reibungsverringerung unternommen. Hierfür hat sich das verwendete Teflon als nicht ausreichend fest herausgestellt. Als alternative kam daher eine Schmierung der Oberfläche

mittels Vaseline vor jedem Test zur Anwendung. Eventuelle Unregelmäßigkeiten wie Stick-Slip-Effekte durch ein Gleiten der Oberflächen konnte bei keiner Probe festgestellt werden. Auch ist sich die Literatur einig, dass eine exakt parallele Ausrichtung der aneinander liegenden Flächen günstige Auswirkungen zeigt, da es auch hierdurch weniger zu extraaxialen Kräften kommen kann [9 S. 5] [53 S. 572]. Dieser Faktor war in dieser Arbeit durch die exakte Probenaufbereitung ebenfalls bestmöglich erfüllt. Ein weiterer Weg Endartefakte zu vermeiden, wurde durch den Einsatz eines Extensometers beschrieben. Da das Extensometer direkt am Probenmaterial etwas entfernt von den Werkstückenden angeklebt wird, wird nur die Kompression der Probenmitte gemessen. Hierdurch werden eventuelle Endartefakte nicht in der Messung erfasst. Grundvoraussetzung für die Funktion ist natürlich, dass das Versagen in diesem Fall auch in dem durch das Extensometer begrenzten Bereich auftritt. In der Literatur wurde die Erfahrung beschrieben, dass dies der Fall sei [53 S. 572]. Im Verlauf der hier vorliegenden Arbeit konnte jedoch deutlich beobachtet werden, dass bei der Mehrzahl der Proben das Versagen im oberen Probendrittel oder der gesamten Probenhöhe zugleich auftrat beziehungsweise Brüche zumindest teilweise die Randbereiche betrafen.



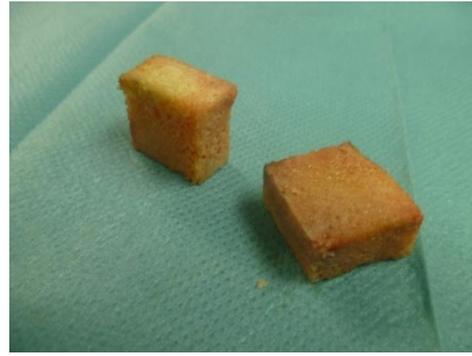
**Abb. 70: Versagemuster homogen**  
linke Probe vor dem Test  
rechte Probe getestet



**Abb. 71: Versagemuster homogen**  
linke Probe vor dem Test  
rechte Probe getestet



**Abb. 72: Versagensmuster Auflagenah**  
beide Proben getestet  
Fraktur im Randbereich



**Abb. 73: Versagensmuster Auflagenah**  
beide Proben getestet  
Fraktur im Randbereich

Möglicherweise war dieser Unterschied in den Beobachtungen der unterschiedlichen Querschnittsfläche was Größe und Form angeht geschuldet. Die Probengrundflächen waren nicht rechteckig sondern rund und deutlich kleiner gestaltet. Aus den gemachten Beobachtungen verbot sich folglich die Anwendung eines Extensometers in der hier dokumentierten Studie.

### **Probenvorbereitung**

Die Verwendung der Femurköpfe als Probenmaterial stellte sich als unproblematisch heraus. Nur wenige Hüftköpfe mussten auf Grund von zu starken degenerativen Veränderungen in Kombination mit kleinem Gesamtvolumen verworfen werden. Bei diesen Exemplaren war es nicht möglich, ein Probenpaar mit ausreichenden Abmessungen aus dem Hüftkopfvolumen zu gewinnen. Auch die Bearbeitbarkeit in gefrorenem Zustand mittels OP-Pendelsäge war präzise und ohne Beschädigung der Proben möglich. Alternativ wird für den Probenzuschnitt der Trepanbohrer verwendet [9] [53]. Allerdings muss hierbei die Probe nach dem Bohrvorgang aus dem Zylinder befreit werden. Kommt es hierbei zu einem Verkeilen der Probe und in Folge dessen zu mechanischer Belastung, können Beschädigungen vor der Testung nicht ausgeschlossen werden. Die in dieser Studie angewandte Art der Probenherstellung schien daher überlegen.

Für den Zuschnitt der Proben wurden diese nicht aufgetaut. Dieses Vorgehen bot den Nachteil, dass die Säugeschwindigkeit auf Grund der harten Knochenmarks abnimmt. Allerdings konnte im Gegensatz zu auf Raumtemperatur erwärmtem Material eine thermische Zerstörung durch Reibungswärme an den Schnittoberflächen zuverlässig vermieden werden. Bei einer Verarbeitung unmittelbar nach Entnahme aus dem -20 °C-Kühlschrank war eine ausreichende Eigenkühlung ohne Zusatzmaßnahmen immer gegeben. Zwar wurde in einer anderen Studie eine permanente Wasserkühlung während der Sägearbeiten verwendet [9 S. 5], jedoch liegt der Verdacht einer Temperaturerhöhung durch das relativ gesehen warme Kühlwasser im Vergleich zum gefrorenen Material nahe. Auch konnte bei keiner Schnittfläche ein Anzeichen von thermischer Zerstörung des Gewebes beobachtet werden. Gewährleistet werden muss hierfür natürlich eine Entnahme des Probenrohlings aus der Kühleinheit erst unmittelbar vor der Bearbeitung.

### **Sägevorrichtung**

Wie erwartet erwies sich das verwendete Material als sehr verschleißfest. Dennoch war ein Nacharbeiten der Führungsflächen jeweils nach ca. 50 hergestellten Proben nötig. So konnte dauerhaft Maß- und Winkelgenauigkeit eingehalten werden. Zwar könnte über die Verwendung von gehärtetem Stahl oder Keramik zu einer noch höheren Verschleißfestigkeit nachgedacht werden, jedoch wären in diesem Fall, mit Spannungsproblemen im Sterilisationsprozess, erhöhtem Fertigungsaufwand sowie höherer Bruchgefahr zu rechnen. Die Möglichkeit, die Vorrichtung demontieren und nachstellen zu können, hat sich in Hinblick auf die Nacharbeitung der Führungsflächen sehr gut bewährt. Ebenso wurde die Reinigung durch die Demontierbarkeit extrem erleichtert.

Statt der in Kapitel 5.3.2 beschriebenen Steckgabel wurde ebenfalls ein mit der Vorrichtung fest verbundener Klappmechanismus getestet. Da dieser allerdings durch über die Säge induzierte Vibrationen dazu neigte, sich wiederholt zu lösen, kam letztendlich die Steckgabel zum Einsatz. Diese stellte kein Hindernis

beim Einlegen der Proben dar, da sie komplett entfernt werden konnte und bot eine bessere Möglichkeit der Reinigung als eine Gelenkverbindung.

Während des sterilen Einsatzes der Vorrichtung wurde diese mittels einer Schraubzwinde fest an einem Tisch befestigt. Die Schraubzwinde wurde vorher in ein steriles Tuch eingeschlagen, um eine potentielle Kontamination von Arbeitsmitteln und Material zu verhindern. Für weitere sterile Arbeiten mit der Vorrichtung könnte die Konstruktion und Anfertigung einer sterilisierbaren Befestigungsmöglichkeit weitere Prozesssicherheit und Komfort bringen.

Der Probenzuschnitt ließ sich reproduzierbar und schnell bewerkstelligen. Die Messtoleranzen lagen bei entsprechender, erwähnter Wartung dauerhaft bei nur wenigen zehntel Millimetern. Diese minimale Ungenauigkeit wurde bei der Berechnung der Auswertungsgrößen eliminiert und stellte dadurch kein Problem dar.

### **Probenhalterung**

Die Probenhalterung wurde mittels Kunststoffgießmasse in die Standardhalterungen eingegossen. Hierbei zeigte sich ein großer Vorteil in der schnellen Austauschbarkeit der Vorrichtung. Dieser kam in Phasen, in denen an der Zug-Druck-Prüfmaschine verschiedene Versuchsreihen mit verschiedenen Vorrichtungen durchgeführt wurden, wesentlich zum Tragen. Dadurch wurden die Umbauzeiten deutlich verringert.

Die wie oben erwähnt am Druckstempel zur Reibungsminderung eingesetzte Teflonscheibe zeigte sich schon während der Vorversuche als nicht dauerhaft. Nach wenigen Proben traten deutliche Impressionen in der Oberfläche auf. Es kam weiter zu einer Wölbung, die eine definierte Anlage an der Probenoberfläche verhinderte. Wie oben erwähnt, wurde daher die Teflonscheibe durch regelmäßige Schmierung ersetzt.

Die Fixierung der Proben mittels Madenschrauben könnte Skepsis verursachen, da eine die Festigkeit beeinflussende Auswirkung vermutet werden könnte. Denkbar wäre dies durch Spannungsspitzen, die durch die Spannkraft

eingeleitet werden. Dies wurde dadurch vermieden, dass die Schrauben nur mit irrelevantem Drehmoment an die Probenseiten angelegt wurden. Die Spitzen der Schrauben legen sich so in die Unebenheiten der spongiösen Oberflächen. Hierdurch entstand eine formschlüssige statt einer kraftschlüssigen Fixierung. Dadurch konnte zuverlässig ein Halten der Proben und kein mit Spannungsinduktion verbundenes Spannen gewährleistet werden. Dass der Spanmechanismus keine Sollbruchstelle induziert, zeigt die Tatsache, dass wie oben gezeigt die Versagensregionen variabel waren und sehr häufig weit von der Schraubenkontaktstelle entfernt lagen. Diese Art der Fixierung bot gegenüber einer Verklebung mit einer Fläche Sicherheit über die Scherfestigkeit des Klebstoffes hinaus. Gegenüber einer formschlüssigen Tasche, in welche die Probe gestellt wird, wurde eine deutlich höhere maßliche Flexibilität erzielt.

### **Zellkultur**

Die Zellkultur wurde im IKET Tübingen von sehr erfahrenen Mitarbeitern angelegt und gepflegt. Für die Zellbesiedelung kam das in der Abteilung verwendete Standardverfahren zur Anwendung. Die Prozesssicherheit war durch diese Rahmenbedingungen so gut gegeben, dass es zu keinen Probenausfällen aus zellbiologischen Gründen kam. Die Voruntersuchungen wiesen eine unproblematische Machbarkeit in Kombination mit dem geplanten Probenmaterial auf. Für die Besiedelung wurde die hier gängigen Knochenmarksstammzellen genutzt. In der Literatur wird von der Verwendung synovialer Stammzellen berichtet. Diese werden durch Aspiration aus dem Synovialspalt gewonnen [45]. In Hinblick auf eine praktische Anwendung der hier untersuchten Methodik zum Knochenersatz könnte mit dieser Entnahmemöglichkeit ein zweiter Operationssitus zur Stammzellgewinnung eingespart werden. Damit bestünde die Möglichkeit, die Spendermorbidity zu reduzieren.

## **Zug-Druck-Prüfmaschine**

Die MTS-Zug-Druck-Prüfmaschine zeigte sich als sehr gut geeignet für die Testung der Knochenproben. Die Programmierung der Steuerung lässt die Gestaltung aller erdenklichen Testzyklen in allen Achsen zu und ist dennoch nach adäquater Einarbeitung intuitiv programmierbar. Ein großer Vorteil während der Versuchsdurchführung bestand in der Echtzeitüberwachung der Messwerte anhand von Oszilloskopdiagrammen. Hierdurch war eine direkte Einschätzung des Testverlaufes möglich. Potentielle Fehler, die sich andernfalls systematisch durch eine Kohorte fortsetzen könnten, waren so direkt feststellbar und zu beseitigen. Nachteile des Systems zeigten sich einzig bei der Vorkonditionierung der Proben mittels einer niedrigfrequenten Sinuslast. Hierbei kam es zu einem Aufschwingen des Systems, wodurch die voreingestellten Konditionierungskräfte deutlich überschritten wurden. Diese Art der Konditionierung wurde daher im weiteren Verlauf nicht umgesetzt. Das Schwingungsphänomen war sehr wahrscheinlich auf eine Resonanz zwischen Hydraulikregelung und Regelungssoftware in Verbindung mit der anisotropen Widerstandskraft der Proben zurückzuführen. Dieser Verdacht ließ sich dadurch begründen, dass die Schwingungen nicht bei allen auf diese Art getesteten Proben zu Stande kamen. Daraus konnte der Zusammenhang mit dem unterschiedlichen Versagensverhalten der Proben gefolgert werden. Eventuell könnte zur Vermeidung dieses Phänomens mit mechanischen oder steuerungstechnischen Dämpfungssystemen gearbeitet werden. In dieser Arbeit wurde dieser Gedanke nicht weiter verfolgt, da die Probenanzahl hierfür zu begrenzt und der Nutzen der Vorkonditionierung zu ungewiss war.

## **Datenerfassung / Datenauswertung**

Die direkte Übertragung der erfassten Daten in eine Excel-Datei zeigte nicht nur aus Gründen der Zeitersparnis große Vorteile, sondern auch dadurch, dass Übertragungsfehler durch manuelles Kopieren verunmöglicht werden. Auch die Weiterverarbeitung der Daten zu den benötigten Kenngrößen wie

Druckfestigkeit und E-Modul wurde weitestgehend automatisiert, um Fehlerquellen auszuschalten.

### **Prüfprozedur / Vorversuche**

Die Konzeption der Prüfprozedur wurde an die Literatur [9] [53] angelehnt und in den Vorversuchen validiert. Aus oben genannten Gründen wurde die sinusförmige Vorkonditionierung nach wenigen Versuchen nicht weiterverfolgt. Nach dieser Entscheidung wurden die weiteren Vorversuche schon mit demselben Testprogramm durchgeführt wie alle späteren Hauptversuche. Dies durfte als erstklassige Voraussetzung gesehen werden, da hierdurch die Stückzahlermittlung für die Hauptversuche bereits unter genau denselben Bedingungen durchgeführt werden konnten wie später die Hauptversuche. Das Vorgehen erwies sich als sehr effektiv, da so gleichzeitig das Testverfahren und der Einfluss der Probenorientierung validiert werden konnten, sowie die Daten für die statistische Ermittlung der Stückzahl erhoben wurden.

Auf Grund der bereits erwähnten natürlichen Streuung der Festigkeitswerte innerhalb der getesteten Knochenregion war die präzise Ermittlung der benötigten Stückzahl hier von besonderer Bedeutung. Mit einer ermittelten Stückzahl von 40 Proben war ein Umfang der Studie bestätigt, der aus Sicht des zur Verfügung stehenden Probenmaterials sowie des zellbiologischen sowie logistischen Aufwandes noch zuverlässig zu handhaben war. Im weiteren Verlauf der Arbeit war es möglich, noch eine kleinere Kohorte langzeitbesiedelte Proben anzulegen. Dadurch sollte der Einfluss der Besiedelungsdauer ersichtlich gemacht werden.

### **Micro CT**

Im PET-CT Labor wurden einige Proben einem Micro-CT unterzogen. Dies ermöglichte, die Mikroarchitektur der Proben vor der Testung mit einer Auflösung von 30  $\mu\text{m}$  zu begutachten. Ziel war es hierbei, eventuelle mikrostrukturelle vorbestehende Schäden wie Zysten oder Frakturen zu

diagnostizieren. Der Ausschluss von Ausreißern wäre so plausibel zu untermauern gewesen. Leider ergab sich diese Möglichkeit erst im Verlauf der Studie, so dass es nicht möglich war, alle Proben dieser Untersuchung zu unterziehen. Lediglich bei der langzeitbesiedelten Kohorte wurde bei allen Proben ein Mikro-CT durchgeführt. Allerdings offenbarte sich nach Abschluss der Auswertungen, dass im Falle von einigen zystischen Veränderungen keine Korrelation zu einer Festigkeitsveränderung bestand. Es wäre denkbar, dass Defekte durch umliegendes Gewebe kompensiert werden können. Das würde ein nachgewiesenes Vorliegen einer Störung der Mikroarchitektur ohne Festigkeitseinbußen erklären.

### **Statistik**

Die statistische Auswertung fand unter der Verwendung gängiger statistischer Auswertungsalgorithmen statt [60 S. 195] [61 S. 255-259] [62 S. 591-611] [63 S. 155-159] [64 S. 165-174]. Als Datenbasis zur Ermittlung der Stückzahl standen 20 Probenpaare zur Verfügung. Hinterfragt werden könnte hierbei die überschaubare Stückzahl. Zum einen musste an dieser Stelle darauf geachtet werden, dass durch die Vorversuchsreihe nicht zu viele Ressourcen eingesetzt werden, wodurch die für die Hauptversuche zur Verfügung stehende Stückzahl gemindert worden wäre. Zum anderen ergab die Auswertung durch Jarque-Bera- und Shapiro-Wilk-Test, dass die Differenzen aus einer normalverteilten Grundgesamtheit stammen. Diese Aussage war zu einem Signifikanzniveau von 1 % und 5 % so eindeutig, dass die zu Grunde liegende Datenbasis, als absolut ausreichend angesehen werden durfte. Auf dieser Grundlage wurde die anschließende die eigentliche Stückzahlermittlung durch einen t-Test-basierten Poweranalyse durchgeführt. Die hierbei genutzten Parameter entsprachen den aus der Literatur gängigen Größen [63 S. 155-159]. Dem möglichen Einwand, dass bei der vorliegenden Untersuchung sowohl positive als auch negative Festigkeitsveränderung resultieren könnten, wurde durch das zu Grunde legen eines beidseitigen t-Tests Rechnung getragen. Um im Bereich der Stückzahlzielsetzung zusätzliche Sicherheit zu erhalten, wurde die ermittelte

Stückzahl von 34 Probenpaaren auf 40 erhöht. Auf diese Weise konnten mögliche Verluste wie zum Beispiel durch Ausreißer gepuffert werden. Desweiteren stieg der Parameter der Power durch diese Maßnahme um von 80 % auf Power von 86,9 %. Letztendlich gab es nur den Ausfall eines Probenpaares, das auf Grund einer vorbestehenden Fraktur unmittelbar vor der Testung ausgesondert werden musste. Die endgültig bewertete Stückzahl belief sich demnach mit 39 Probenpaaren deutlich über den benötigten 34.

Bei der Auswertung der Haupt- und Langzeitversuche wurde zum Beginn der Auswertung wieder das Vorliegen einer normalverteilten Grundgesamtheit überprüft. Obwohl das Vorliegen einer solchen zu erwarten war, da sich Rahmenbedingungen wie Probenmaterial und mechanische Testung nicht geändert hatten, kamen hierfür erneut Jarque-Bera- und Shapiro-Wilk-Test zum Einsatz. Dieser Schritt war sinnvoll, denn das Vorliegen einer Normalverteilung ist zwingende Grundlage für die statistische Testung der Ergebnisse mittels parametrischer Tests. Das Vorliegen einer Festigkeitsveränderung wurde demnach durch den t-Test überprüft.

Allerdings musste die Hypothese, dass die Differenzen der Druckfestigkeit aus einer normalverteilten Grundgesamtheit stammen können mit  $p = 0,0496$  zu einem Signifikanzniveau von 5 % knapp verworfen werden. Daher könnte Skepsis hinsichtlich der angenommenen normalverteilten Grundgesamtheit gerechtfertigt sein. Hierdurch könnte die Voraussetzung für die Anwendung des t-Tests in Frage gestellt werden. Deshalb wurden sicherheitshalber zusätzlich zum t-Test bei allen Auswertungen die beiden nichtparametrischen Tests Wilcoxon-Test und Sign-Test angewandt. Diese benötigen als Voraussetzung nicht das zu Grunde liegen einer normalverteilten Grundgesamtheit [64 S. 165-174].

## Ergebnisse

Die Ergebnisse der Hauptversuche zeigten, dass durch die Zellbesiedelungsmaßnahmen keine signifikante Festigkeitsveränderung auftrat. Zu diesem Schluss kam sowohl die Bewertung der Daten in Hinblick auf die Druckfestigkeit, als auch die des E-Moduls. Sowohl die parametrische statistische Testung, als auch die nichtparametrische kamen einstimmig zu derselben Aussage. Obwohl von einer normalverteilten Grundgesamtheit der Daten ausgegangen werden darf, träfe dieses Ergebnis also wie oben erläutert auch für den Fall zu, dass keine Normalverteilung bestünde.

Auch die langzeitbesiedelten Proben zeigten keine Festigkeitsveränderung. Bei der Auswertung der langzeitbesiedelten Proben konnte die Hypothese, dass keine signifikante Änderung durch die Zellbesiedelung auftrat nur zu einem Signifikanzniveau von 1 % nicht verworfen werden. Anders als bei den anderen Testungen wurde hier demnach das Signifikanzniveau von 5 % nicht erreicht. Dies könnte als Einschränkung der Aussagefähigkeit der Langzeitwerte gesehen werden. Ein Zusammenhang mit der vergleichsweise geringen Stückzahl der langzeitgetesteten Proben erscheint hier sehr wahrscheinlich. Um eine diesbezüglich höhere Sicherheit zu erreichen, müsste eine größere Kohorte getestet werden. Diese Kohortengröße müsste den vorigen Ausführungen folgend ebenfalls  $N = 34$ , wie bei den Hauptversuchen betragen. Durch das Erreichen eines Signifikanzniveaus von 1 % war jedoch die von vorneherein geplante Zielsetzung, die Langzeitkohorte als Abschätzung zum zeitlichen Einfluss zu verwenden, durchaus erreicht worden.

## 7.2 Schlussfolgerung

Eine signifikante Veränderung der ermittelten Festigkeitswerte konnte nicht festgestellt werden. Dies ließ sich schon durch die Betrachtung der Diagramme erahnen, da die Ausschläge der Differenzen sowohl positiv als auch negativ verteilt sind. Trotz gleicher Herkunft der verglichenen Proben was Individuum und anatomische Region betrifft, zeigten die Proben unterschiedliche Ausgangsfestigkeiten. Feststellen ließ sich dies bereits bei den Voruntersuchungen, die ebenfalls positive und negative Abweichungen zeigten (siehe Abb. 58). Schon vorher bestehende, zum Beispiel durch Osteoporose hervorgerufene, Störungen der Mikroarchitektur könnten hierfür verantwortlich sein. Jedoch ließ sich keinerlei Korrelation der in der Micro-CT-Untersuchung sichtbaren Störungen mit auffälligen Differenzwerten herstellen. Auch nach Zellbesiedelung konnte die Verteilung der Ausschläge nach oben und unten in den Ergebniswerten beobachtet werden. Die positiven und negativen Ausschläge blieben selbst nach der Langzeitbesiedelung bestehen, was diese Erkenntnis trotz geringerer Stückzahl zusätzlich bekräftigt.

Dies erlaubt zusätzlich zu der statistischen Aussage den Schluss, dass die natürliche Schwankungsbreite des Knochenmaterials den eventuellen Einfluss der Zellbesiedelung übersteigt.

Da in jeder Hinsicht keine Änderung der Festigkeitswerte beobachtet wurde, spricht von den mechanischen Gesichtspunkten her nichts gegen eine zuversichtliche Haltung in Hinblick auf eine operative Anwendbarkeit.

Die zellbiologische Behandlung zeigte praktisch keine Anfälligkeit in der Prozesssicherheit. Zusammen mit der komplikationslosen Knochengewinnung und Aufbereitung kann dies als sehr positiv zu wertende Grundvoraussetzung für eine klinische Anwendung betrachtet werden. Demnach darf die Aussage getroffen werden, dass nach den Erkenntnissen der hier vorgelegten Dissertation einer weiteren Forschung an dem bearbeiteten Konzept zum Knochenersatz nichts im Wege steht. Durch weitere Studien auf diesem Gebiet sollte angestrebt werden, das Konzept zur klinisch einsetzbaren Reife zu bringen.

### 7.3 Ausblick

Als nachteiligen Aspekt für die homologe Knochenspende müssen immer mehr die Kosten gesehen werden. In Zeiten der steigenden Dokumentations-, Zertifizierungs- und Prüfungspflichten wird das Führen einer Knochenbank immer aufwändiger und damit auch kostenintensiver. Bereits im Jahr 2011 wurden diese Kosten im Rahmen einer Dissertation auf jährlich etwas über 40000 Euro errechnet, hierbei wurde von einem Aufkommen von 100 Spenden pro Jahr ausgegangen [67 S. 44]. Die Einhaltung der Richtlinien der Bundesärztekammer, stellt also mittlerweile einen sehr großen Aufwand dar. Die Folge ist, dass manche Kliniken den Betrieb einer Knochenbank stark reduziert oder wie beispielsweise die Universitätsklinik für Orthopädie Tübingen ganz eingestellt haben.

Mancherorts wird der mit Knochenbanken verbundene Aufwand demnach momentan nicht mehr als wirtschaftlich angesehen. Es wäre jedoch möglich, dass sich diese Sichtweise nach weiterer positiver Evaluation der in dieser Arbeit untersuchten Möglichkeiten ins Gegenteil umkehrt.

Es bestehen denkbare Alternativen zur Verwendung von homologen Knochenspenden über eine Knochenbank. Beispielsweise könnte man Spenderknochen prozessieren und so im Sinne autologen Materials, das nicht mehr den Regularien und aufwändigen Lagerungsbedingungen unterliegt, verwenden. Dies wird über Firmen wie z.B. die Firma Tutogen Medical GmbH angeboten. Das nach dem Tutogen-Verfahren<sup>®</sup> prozessierte Transplantat ist steril, antigen- und zellfrei, biokompatibel, vollständig umbaufähig und fünf Jahre bei Raumtemperatur haltbar [68]. Der Aufwand einer Knochenbank wäre auf diese Art sicher umgangen. Auch sonstigen Materialien wie beispielsweise xenogener Herkunft wären eventuell gangbare Alternativen als scaffold für eine autologe Besiedelung. Unter Umständen werden hierbei dann jedoch Nachteile in Bezug auf Resorbierbarkeit erkaufte (siehe 1.2).

In der hier vorliegenden Dissertation wurden für die Zellbesiedelung Knochenmarksstammzellen verwendet. Eine interessante Möglichkeit, die Spendermorbidity durch die Zellgewinnung zu senken, könnte die Anwendung

synovialer Stammzellen bieten. Hierfür wäre es interessant, diese auf ihr Potential in Hinblick auf Besiedlungsfähigkeit und anschließende Differenzierung in Osteoprogenitorzellen zu prüfen. Ein ähnliches Vorgehen wie in den Vorarbeiten dieser Dissertation wäre hierfür gegebenenfalls gut möglich (siehe 5.1). Synoviale Stammzellen wurden im Tierversuch bereits erfolgreich zur Therapie der avaskulären Knochennekrose des Femurkopfes eingesetzt [45]. Auch inzwischen diskutierte alternative Verfahren zur Stammzellgewinnung könnten hier Optionen bieten. Allerdings wurde bereits die Beobachtung publiziert, dass sich Plazentastammzellen schlechter in Richtung Knochenzellendifferenzierung beeinflussen lassen als aus Knochenmark gewonnene [69].

Zusätzlich zu den potenziellen zellulären und verfahrenstechnischen Optimierungsmöglichkeiten wären auch strukturelle anzudenken. Bei der hier vorgestellten Vorgehensweise, wurde nur die Mantelfläche der zu besiedelnden Knochenspenden inklusive deren Porositäten besiedelt. Das Volumen des zukünftigen Transplantates liegt daher weiter als nekrotischer Bereich vor. Die Vergrößerung der besiedelten Oberfläche könnte einen Vorteil darstellen, insbesondere wenn die Oberflächenvergrößerung den nekrotischen Kern des zu besiedelnden Knochens durchdringt, bestünde eine Möglichkeit für eine erheblich schnellere Revaskularisierung durch den gesamten Querschnitt. Bei der Therapie der steroidinduzierten Femurkopfnekrose mittels Stammzellen wird nach einem ähnlichen Prinzip verfahren. Hierbei wird die Nekrosezone mittels der sogenannten core decompression im Sinne einer zentral gelegenen Bohrung eröffnet, anschließend werden Stammzellen in den entstandenen Hohlraum appliziert [45] [46]. Ähnlich wie hier wäre also bei Knochenspenden das Anlegen und mit Besiedeln von einer oder mehreren zentralen Bohrungen denkbar. Dabei müsste gegebenenfalls eine strukturelle Schwächung des Transplantats durch die Bohrungen in Kauf genommen werden. Strukturelle Schwächung mit verzögerter Remobilisierung müssten gegen den eventuellen Vorteil bei der biologischen Gewebeintegration abgewogen werden. Es könnte demnach sinnvoll erscheinen, hierzu mechanische Testungen durchzuführen, sowie die zuverlässige Besiedelbarkeit von Bohrkanälen im Kulturmedium zu

testen. Hierbei wäre besonders der Einfluss von Bohrungsdurchmesser und -richtung auf die Festigkeit sowie von Bohrungsdurchmesser auf die Besiedelbarkeit zu untersuchen. Auf diese Art könnte eventuell ein Optimum von gutem Besiedelungsergebnis und geringster mechanischer Schwächung gefunden werden.

Die vorliegende Arbeit könnte als Basis für weiterführende Grundlagenuntersuchungen zur Korrelation zwischen Festigkeit und Knochendichte verwendet werden. Bei der röntgenologischen Knochendichte fallen die Weichgewebe verhältnismäßig schwach ins Gewicht, daher wird eine lineare Beziehung zwischen der Mineraleichte und der radiologischen Dichte angenommen [54 S. 6]. So zeigt sich, dass die Festigkeit größtenteils durch die Mineraleichte bestimmt wird und eine Relation zwischen Dichte und Festigkeit gefunden werden kann. Dies kann jedoch nur für quasistatische Belastung angenommen werden, da bei sehr schneller Kompression, die Weichgewebe einen Einfluss auf die Festigkeit ausüben [9 S. 2] [52 S. 236]. Die Korrelation zwischen Knochendichte und Festigkeit zeigt sich also seit längerem als komplexes Verhältnis.

Eine Korrelation zwischen der im CT ermittelten Knochendichte und der Festigkeit könnte untersucht und mit den Aussagen aus früheren Studien abgeglichen werden [9 S. 13] [52 S. 236] [53 S. 574]. Die für diese Dissertation gewonnenen Mikro-CT-Daten können computergestützt so ausgewertet werden, dass über eine Grauwerttrennung die Knochendichte unter komplettem Ausschluss des Knochenmarks berechenbar wird. Hierbei würde erstmals der Einfluss des Weichgewebegrauwertes nicht einfach vernachlässigt. Dieses Verfahren stand für die oben angeführten Studien noch nicht zur Verfügung. Der tatsächliche Anteil an der strukturellen Festigkeit von Weich- und Hartgewebe könnte mit den neuen Methoden also genauer erforscht werden. Weiter wäre eine interessante Betrachtungsweise der Daten die Überprüfung von Alters- und Geschlechtsabhängigkeit der Festigkeits- und Dichtewerte.

## 8 Zusammenfassung

Knochenersatzmaterialien sind in vielen Bereichen der Medizin ein aktuelles Thema. Unterschiedlichste Systeme zur Gewinnung und Prozessierung sowie verschiedene Arten von Scaffolds werden diskutiert, getestet und angewandt. Der hier dokumentierten Arbeit liegt die Idee zugrunde, devitalen Spenderknochen, wie er heute auch direkt transplantiert wird [65] [66] als Scaffold zu nutzen und mit empfängereigenen Stammzellen zu besiedeln. Hierdurch könnten die Vorteile des Scaffolds, optimale Leitschienenfunktion, vollständige Resorbierbarkeit und sehr gute mechanische Eigenschaften mit denen von vitalen Stammzellen kombiniert werden. Die Folgen könnten eine beschleunigte Osseointegration und Remobilisierung sowie eine verringerte Komplikationsrate sein. Durch die hierfür nötige mehrtägige Lagerung des Transplantates in einem Zellkulturmedium könnte es jedoch zu einer Beeinträchtigung der biomechanischen Eigenschaften kommen. Daher hat diese Studie zum Ziel, den Einfluss der zellbiologischen Methoden auf die Festigkeit des Knochens zu untersuchen. Als Testverfahren hierfür wurde wie in anderen Arbeiten auf den Druckversuch zurückgegriffen [9] [52] [53]. Hierfür kam eine voll programmierbare MTS-Bionix-Prüfmaschine zum Einsatz.

Die Voruntersuchungen im IKET wies die generelle Machbarkeit einer in vitro Zellbesiedelung von avitalem Knochen nach. Die Bewertung der Besiedelungsergebnisse fand mittels Histologie, Elektronenrastermikroskopie und Immunhistochemie qualitativ und quantitativ statt, dadurch konnte gezeigt werden, dass das zellbiologische Verfahren eine für die weiteren Versuche ausreichende Zuverlässigkeit bietet. Zunächst wurde eine Sägevorrichtung konstruiert und hergestellt, mit welcher eine gleichmäßige Herstellung von exakt rechtwinkligen und maßhaltigen Proben unter sterilen Bedingungen möglich ist. Ebenfalls fielen Konstruktion und Herstellung einer Halte- und Druckvorrichtung an, welche die Knochenproben während der Versuchsdurchführung in Position hält und den Druck der Prüfmaschine überträgt. Es folgte die Recherche und Programmierung geeigneter Steuerungsprozeduren für die Prüfmaschine. 20 Probepaare dienten in Vorversuchen der – per statistische Poweranalyse

ausgewerteten – Stückzahlermittlung. Die Vorversuche an weiteren 40 Probenpaaren brachten Erkenntnisse zur Ermittlung des Einflusses von Probenorientierung und die Entscheidung zwischen den entwickelten Testalgorithmen. Entsprechend der ermittelten Hauptversuchsstückzahl folgte die Rekrutierung und Zellbesiedelung von 40 Probenpaaren mit anschließender Testung. Eine Probe aus jedem Probepaar wurde über zehn Tage zellbesiedelt und gegen die jeweils unbesiedelte, aus demselben Femurkopf getestet. Außerdem konnten weitere 13 Proben einer fünfwöchigen Langzeitbesiedelung zugeführt werden, um eine Abschätzung des Langzeiteinflusses zu generieren. Die Abarbeitung erfolgte bedingt durch Probenaufkommen und Kapazität des Zellbiologischen Labors mittels Vierer- bis Sechserkohorten. Die Prozessierung aller gewonnenen Testdaten in Druckfestigkeit und E-Modul ermöglichte ein selbst entworfenes Excel-Makro schnell und effektiv.

Mittels bewährten Statistikverfahren wie Jarque-Bera-Test, Shapiro-Wilk-Test, t-Test, Sign-Test und Wilcoxon-Test wurden die Druckfestigkeit und der E-Modul ausgewertet. Sowohl bei den Hauptversuchen als auch den Langzeitversuchen wurde keine signifikante Veränderung der Festigkeit ermittelt.

Die Ausschläge der Messwerte sind sowohl positiv als auch negativ verteilt. Trotz gleicher Herkunft der verglichenen Proben was Individuum und anatomische Region angeht, zeigen die Proben unterschiedliche Ausgangsfestigkeiten. Schon vorher bestehende, zum Beispiel durch Risse oder zystisch bzw. sklerotisch veränderte Bereiche hervorgerufene Störungen der Mikroarchitektur könnten hierfür verantwortlich sein. Zur Detektion von solchen strukturellen Inhomogenitäten konnte von vielen der Proben vor der Testung ein hochauflösendes Mikro-Computertomogramm angefertigt werden. Jedoch gab es keinerlei Korrelation zwischen im Micro-CT sichtbaren strukturellen Störungen und auffälligen Festigkeitswerten. Eine Kompensation der strukturellen Schwächung durch das umliegende Gewebe scheint hier wahrscheinlich.

Auch nach der Langzeitbesiedelung konnte die Verteilung der Ausschläge nach oben und unten in den Ergebniswerten beobachtet werden. Dies lässt

zusätzlich zu der statistischen Aussage den Schluss zu, dass die natürliche Schwankungsbreite des Knochenmaterials den Einfluss der Zellbesiedelung weit übersteigt.

Da keine signifikante Festigkeitsänderung stattfand, gibt die vorliegende Studie aus Festigkeitssicht keinen Anlass zum Zweifel an einer technischen Verwendbarkeit des behandelten Scaffolds im operativen Einsatz. Dieses Erkenntnis rechtfertigt daher weitere Untersuchungen in Hinblick auf die Annäherung des Verfahrens an einen klinischen Einsatz. Eine Umsetzung der Strategie im operativen Feld könnte großes Potential für qualitativ hochwertigsten und quantitativ kaum begrenzten Knochenersatz bieten.

## 9 Glossar

Fachbegriff / Abkürzung	Deutsche Übersetzung / Erklärung
Allogen	Aus gleicher Spezies aber anderem Individuum stammend = Homolog
Alloplastik	Synthetisches Material / stark denaturiertes Material
Autogen	Aus gleichem Individuum stammend = Autolog
Autolog	Aus gleichem Individuum stammend = Autogen
core decompression	Entlastungsbohrung (meist in nekrotische Knochenbereiche)
CT	Computertomographie
Débridement	Entfernung von infiziertem, geschädigtem oder nekrotischem Gewebe
Femur	Oberschenkelknochen
Graft	Transplantat
HE-Färbung	Hämatoxylin-Eosin-Färbung
Heterolog	Von nicht menschlicher Herkunft = Xenogen
Homolog	Aus gleicher Spezies aber anderem Individuum stammend = Allogen
Hook`scher Bereich	Linearer Bereich im Spannungs-Dehnungs-Diagramm / Bereich der elastischen Dehnung
IKET	Institut für Klinische und Experimentelle Transfusionsmedizin
IL 1	Interleukin 1
IL 6	Interleukin 6
indiziert	angezeigt
Joint Space	Raum, der im gesunden Skelett durch das Gelenk eingenommen wird.
Ligamentum capitis femoris	Oberschenkelknochenkopfband
MSC	Mesenchymale Stammzelle
Osseointegration	Heranwachsen und feste Anheftung von Knochenzellen an ein Implantat
Osteoinduktion	Fähigkeit die Knochenneubildung anzuregen
Osteokonduktion	Eigenschaft eine Leitstruktur für die Knochenneubildung zu liefern.
p	p-Wert, Signifikanzwert, p-value

PBS-Puffer	Phosphate Buffered Saline = phosphatgepufferte Salzlösung
REM	Rasterelektronenmikroskop
Scaffold	Biologische Stützstruktur
SD	Standard Deviation = Standardabweichung
Skip-Metastase	Eine in räumlicher Nähe zum Primärtumor stehende Metastase aber von diesem durch gesundes Gewebe getrennt.
Stick-Slip-Effekt	Haftgleiten, wiederholtes Wechseln zwischen Haft- und Gleitreibung führt zum Rattern.
Synovia	Gelenkflüssigkeit im Gelenkspalt zur Schmierung und Knorpelernährung.
TGF	Tumor Growth Factor
tissue engineering	Gewebekonstruktion / Gewebezüchtung durch künstliche Herstellung biologischer Gewebe.
Trabekel	Knochenbälkchen
UKT	Universitätsklinikum Tübingen
Xenogen	Von nicht menschlicher Herkunft = Heterolog
Zerklage	Umschlingung / Zuggurtung zur Osteosynthese meist mittels Draht
$\epsilon$	Dehnung in %
$\sigma$	Spannung in $\text{N/mm}^2$

## Literaturverzeichnis

- [1]. **Schwenzer, N. und Ehrenfeld, M.** *Mund-Kiefer-Gesichtschirurgie*. Stuttgart : Georg Thieme Verlag, 2011, 4. Auflage. 978-3-13-593504-1.
- [2]. **Niethard, F. und Pfeil, J.** *Orthopädie*. Stuttgart : Georg Thieme Verlag, 2005, 5. Auflage. 3-13-130815-x.
- [3]. **Rössler, H. und Rüter, W.** *Orthopädie und Unfallchirurgie*. München : Urban & Fischer, 2005, 19 Auflage. 3-437-42381-9.
- [4]. **Burr, D.** Muscle Strength, Bone Mass, and Age-Related Bone Loss. *Journal of bone and mineral research*. 1997.
- [5]. **Schmidt, R. [HRSG.], Lang, F. [HRSG.] und Heckmann, M. [HRSG.]**. *Physiologie des Menschen*. Heidelberg : Springer Medizin Verlag Heidelberg, 2010, 31. Auflage. 978-3-642-01650-9.
- [6]. **Lu, T-W., et al.** Influence of muscle activity on the forces in the femur. *Transactions of the Orthopedic Research Society*. 22, 1997.
- [7]. **Mittlmeier, T., Mattheck, C. und Dietrich, F.** Effects of mechanical loading on the profile of human femoral diaphyseal geometry. *Medical Engineering & Physics*. 1994.
- [8]. **Pauwels, F.** *Gesammelte Abhandlungen zur funktionellen Anatomie des Bewegungsapparates*. Heidelberg : Springer-Verlag, 1965, 1. Auflage. 978-3-642-86842-9.
- [9]. **Birnbaum, K., et al.** Material properties of trabecular bone structures. *Surgical and Radiologic Anatomy*. 2002, Bd. 23, 6.
- [10]. **Bielbya, R., Jones, E. und McGonagle, D.** The role of mesenchymal stem cells in maintenance and repair of bone . *International Journal of the Care of the Injured*. 2007, Bd. 38, 1.
- [11]. **Kallman, D., Plato, C. und Tobin, J.** The Role of Muscle Loss in the Age-Related Decline of Grip Strength: Cross-Sectional and Longitudinal Perspectives. *Journal of Gerontology*. 1990, Bd. 45, 3.

- [12]. **Majumdar, S., et al.** Correlation of Trabecular Bone Structure with Age, Bone Mineral Density and Osteoporotic Status: In Vivo Studies in the Distal Radius Using High Resolution Magnetic Resonance Imaging. *Journal of Bone and Mineral Research*. 1997, Bd. 12, 1.
- [13]. **Riggs, B., et al.** Population-Based Study of Age and Sex Differences in Bone Volumetric Density, Size, Geometry, and Structure at Different Skeletal Sites. *Journal of Bone and Mineral Research*. 2004, Bd. 19, 12.
- [14]. **Krämer, J. und Grifka, J.** *Orthopädie*. Heidelberg : Springer Medizin Verlag Heidelberg, 2005, 7. Auflage. 3-54021970-6.
- [15]. **Kluba, T., et al.** *Orthopädie und Unfallchirurgie*. [Hrsg.] N. Wülker. Stuttgart : Georg Thieme Verlag, 2005, 1. Auflage. 3-13-129971-1.
- [16]. **Lang, S. und Windhager, R.** Schnellschnittdiagnostik in der Osteopathologie. *Der Orthopäde*. 2013, Bd. 42, 2.
- [17]. **Hofmann, G., et al.** Allogeneic vascularized grafting of a human knee joint with postoperative immunosuppression. *Orthopaedic and Trauma Surgery*. 1997, Bd. 116, 3.
- [18]. **Hofmann, G., et al.** Überbrückung langstreckiger Knochen- und Gelenkdefekte durch allogene vaskularisierte Transplantate. [Buchverf.] W. Hartel und C. Herfarth. *Vielfalt und Einheit der Chirurgie Humanität und Wissenschaft*. Heidelberg : Springer Berlin Heidelberg, 1998, S. 1285-1287.
- [19]. **Stannard, P., et al.** *Spezielle Unfallchirurgie*. Stuttgart : Georg Thieme Verlag, 2012. 978-3-13-147351-6.
- [20]. **Kretzer, J., et al.** Grundlagen zur tribologischen Analyse von Endoprothesen. *Der Orthopäde*. 2012, Bd. 41, 10.
- [21]. **Franklin, J. und Malchau, H.** Risk factors for periprosthetic femoral fracture. *International Journal of the Care of the Injured*. 2007, Bd. 38, 6.
- [22]. **Incavo, S., et al.** One-stage revision of periprosthetic fractures around loose cemented total hip arthroplasty. *American Journal of Orthopedics*. 1998, Bd. 27, 1.

- [23]. **Tsiridisa, E., Haddadb, F. und Gie, G.** The management of periprosthetic femoral fractures around hip replacements. *International Journal of the Care of the Injured*. 2003, Bd. 34, 2.
- [24]. **Gruner, A., Hockertz, T. und Reilmann, H.** Die periprothetische Fraktur. *Der Unfallchirurg*. 2003, Bd. 107, 1.
- [25]. **Lewallen, D., Berry, D. und Bone, J.** Periprosthetic fracture of the femur after total hip arthroplasty. *The Journal of Bone & Joint Surgery*. 1997, Bd. 79, 12.
- [26]. **Stange, R., Raschke, M. und Fuchs, T.** Periprothetische Frakturen. *Der Unfallchirurg*. 2011, Bd. 114, 8.
- [27]. **Herrmann, P., Thoele, P. und Heppert, V.** Die infizierte Knieprothese. *Operative Orthopädie und Traumatologie*. 2013, Bd. 25, 3.
- [28]. **Peters, K. und König, D.** *Fortbildung Osteologie*. Berlin : Springer-Verlag, 2010. Bd. 3. 978-3-642-05384-9.
- [29]. **Gazdag, A., et al.** Alternatives to Autogenous Bone Graft: Efficacy and Indications. *American Academy of Orthopaedic Surgeons*. 1995, Bd. 3, 1.
- [30]. **Rueger, J.** Knochenersatzmittel - Heutiger Stand und Ausblick. *Der Orthopäde*. 1998, Bd. 27, 2.
- [31]. **Niedhart, C., et al.** Komplikationen nach Entnahme autologen Knochens aus dem ventralen und dorsalen Beckenkamm - eine prospektive, kontrollierte Studie. *Orthopädie und Unfallchirurgie*. 2003, Bd. 141, 4.
- [32]. **Colterjohn, N. und Bednar, D.** Procurement of Bone Graft from the Iliac Crest. *The Journal of Bone and Joint Surgery, Incorporated*. 1997, Bd. 79, 5.
- [33]. **Heinemann, S., et al.** Resorbierbare Knochenersatzmaterialien. *Der Orthopäde*. 2011, Bd. 40, 9.
- [34]. **Pfeifer, R., et al.** Das Reamer-Irrigator-Aspirator (RIA)-System. *Operative Orthopädie und Traumatologie*. 2011, Bd. 23, 5.
- [35]. **Wagner, M.** Osteotomie als Zugang. *Der Orthopäde*. 2013, Bd. 42, 5.

- [36]. **Mittag, F., et al.** No red cell alloimmunization or change of clinical outcome after using fresh frozen cancellous allograft bone for acetabular reconstruction in revision hip arthroplasty: a follow up study. *arthroplasty: a follow up study*. 2012, Bd. 187, 13.
- [37]. **Kapukaya, A., et al.** Limb reconstruction with the callus distraction method after bone tumor resection. *Orthopaedic and Trauma Surgery*. 2000, Bd. 120, 3-4.
- [38]. **Siekman, H. und Klima, S.** *Operationsberichte Orthopädie*. Berlin, Heidelberg : Springer-Verlag , 2013. 978-3-642-20789-1.
- [39]. **Beckmann, J., et al.** Endoprothetische Gelenk-versorgung bei Hüftkopfnekrose. *Osteologie*. 2010, Bd. 1.
- [40]. **Wuisman, P., Gohlke, F. und Witlox, A.** Allografts in der Rekonstruktion von knöchernen Defekten bei primär malignen Knochentumoren. *der Orthopäde*. 2003, Bd. 32, 11.
- [41]. **Fuchs, B., et al.** Intercalary segmental reconstruction after bone tumor resection. *European Journal of Surgical Oncology*. 2008, Bd. 34, 12.
- [42]. **Donati, D., et al.** Allograft-Prosthetic Composite in the Proximal Tibia After Bone Tumor Resection. *Clinical Orthopaedics and Related Research*. 2008, Bd. 466, 2.
- [43]. **Tögel, F., et al.** Regenerative Medizin mit adulten Stammzellen aus dem Knochenmark. *Deutsches Ärzteblatt*. 2007, Bd. 104, 23.
- [44]. **Sakurada, K., McDonald, F. und Shimada, F.** Regenerative Medizin und stammzellbasierte Wirkstoffentwicklung. *Angewandte Chemie*. 2008, Bd. 120, 3.
- [45]. **Chen, Y. P., et al.** Effectiveness of synovial fluid mesenchymal stem cells embedded in alginate beads for treatment of steroid-induced avascular necrosis of the femoral head. *Journal of Orthopaedic Science*. 2014, Bd. 19.

- [46]. **Sun, Y., Feng, Y. und Zhang, C.** The effect of bone marrow mononuclear cells on vascularization and bone regeneration in steroid-induced osteonecrosis of the femoral head. *Joint Bone Spine*. 2009, Bd. 76, 6, S. 685-690.
- [47]. **Rastogi, S., et al.** Intralesional autologous mesenchymal stem cells in management of osteonecrosis of femur: a preliminary study. *Musculoskeletal Surgery*. 2013, Bd. 97, 3.
- [48]. **Gangji, V. und Hauzeur, J.-P.** Treatment of Osteonecrosis of the Femoral Head with Implantation of Autologous Bone-Marrow Cells. *The Journal of Bone and Joint Surgery*. 2005, Bd. 87, 1, S. 106-112.
- [49]. **Nöth, U., et al.** Zellbasierte Therapie der Femurkopfnekrose. *Der Orthopäde*. 2007, Bd. 35, 5, S. 466-471.
- [50]. **Grote, S., et al.** Mechanical torque measurement in the proximal femur correlates to failure load and bone mineral density *ex vivo*. *Orthopedic Reviews*. 2013, Bd. 5, 16.
- [51]. **Hoppe, J.-D. [HRSG.] und Sewing, K.-F. [HRSG.]** Richtlinien zum Führen einer Knochenbank. *Deutsches Ärzteblatt*. Jg. 98, 2001, Heft 15.
- [52]. **Galante, J., Rostoker, W. und Ray, R.** Physical Properties of Trabecular Bone. *Calcified Tissue International*. 1970, Bd. 5, 1.
- [53]. **Morgan, E. und Keaveny, T.** Dependence of yield strain of human trabecular bone on anatomic site. *Journal of Biomechanics*. 2001, Bd. 34, 5, S. 569–577.
- [54]. **Wright, D., et al.** Subchondral bone density distribution in the human. *Skeletal Radiology*. 2011.
- [55]. **Roche Innovatis AG.** CASY Cell Counter + Analyser System Model TT Operator Manual. Reutlingen : s.n.
- [56]. **MTS Systems Corporation.** The 858 Mini Bionix II Test System. 1999.
- [57]. **Kuchling, H.** *Taschenbuch der Physik*. München : Fachbuchverlag Leipzig, 2001. 3-446-21760-6.

- [58]. **Kopperdahl, D. und Keaveny, T.** Yield strain behavior of trabecular bone. *Journal of Biomechanics*. 1998, Bd. 31, 7.
- [59]. **Keaveny, T., et al.** Trabecular bone exhibits fully linear elastic behavior and yields at low strains. *Journal of Biomechanics*. 1994, Bd. 27, 9.
- [60]. **Bamberg, G. und Baur, F.** *Statistik*. München : Oldenbourg Wissenschaftsverlag, 2001, 11. Auflage. 3-486-25540-1.
- [61]. **Jarque, C. und Bera, A.** Efficient tests for normality, homoscedasticity and serial independence of regression residuals. *Economics Letters*. 1980, Bd. 6, 3.
- [62]. **Shapiro, S. und Wilk, M.** An Analysis of Variance Test for Normality (Complete Samples). *Biometrika*. 1965, Bd. 52, 3.
- [63]. **Cohen, J.** A Power Primer. *Psychological Bulletin*. 1992, Bd. 112, 1.
- [64]. **Büning, H. und Trenkler, G.** *Nichtparametrische statistische Methoden*. Berlin : Walter de Gruyter, 1994, 2. Auflage. 3-11-013860-3.
- [65]. **Gazdag A. R., Lane J. M., Glaser D., Forster R. A.** Alternatives to Autogenous Bone Graft: Efficacy and Indications. *American Academy of Orthopaedic Surgeons*. 1995, Bd. 3, 1.
- [66]. **Tomford, W. W.** Bone Allografts: Past, Present and Future. *Cell and Tissue Banking*. 2000, Bd. 1, 2, S. 105-109.
- [67]. **Stavar, A.** *Dissertation: Retrospektive Kohortenstudie in Bezug auf Knochendefekte und deren Therapie*. Regensburg : s.n., 2011.
- [68]. **Tutogen Medical GmbH.**  
<http://www.tutogen.de/de/transplantate/sonderartikel.html>. [Online] [Zitat vom: 23. 02 2015.]
- [69]. **Pilz, G., et al.** Human term placenta-derived mesenchymal stromal cells are less prone to osteogenic differentiation than bone marrow-derived mesenchymal stromal cells. *Stem Cells and Development*. 2011, Bd. 20, 4.

## Abbildungsverzeichnis

Alle Abbildungen, in der Abbildungslegende nicht anders gekennzeichnet, wurden vom Autor selbst erstellt.

Abb. 1:	Probe unbesiedelt .....	28
Abb. 2:	Probe nach Besiedelung .....	28
Abb. 3:	Zellkolonie histologisch .....	28
Abb. 4:	Zelle REM .....	28
Abb. 5:	Femurkopf .....	30
Abb. 6:	Nutzbares Volumen/ Grundfläche .....	32
Abb. 7:	Zylinderform .....	33
Abb. 8:	Quaderform .....	33
Abb. 9:	Querschnittsflächen Vergleich .....	33
Abb. 10:	Trabekelstruktur .....	35
Abb. 11:	Hauptbelastungsrichtung .....	36
Abb. 12:	Entnahmestellen .....	36
Abb. 13:	Probenausrichtung ant.-post .....	37
Abb. 14:	Probenausrichtung medial-lateral .....	37
Abb. 15:	Radiologische Knochendichte .....	38
Abb. 16:	OP-Pendelsäge .....	39
Abb. 17:	Gehrungsschiene .....	40
Abb. 18:	Sägevorrichtung .....	42
Abb. 19:	Sägevorrichtung Explosionsdarstellung .....	42
Abb. 20:	Sägevorrichtung Explosionsdarstellung .....	43
Abb. 21:	Führungsfläche .....	44
Abb. 22:	Sägevorrichtung Ablauf .....	46
Abb. 23:	Aufsteckgabel .....	47
Abb. 24:	V4A-Halbzeug .....	48
Abb. 25:	Schaublin Universalfräsmaschine .....	49
Abb. 26:	Einfräsen der Nuten in die Grundplatte .....	50
Abb. 27:	Fertiggestellte Sägevorrichtung .....	50

Abb. 28:	Sägevorrichtung in Einzelteilen.....	50
Abb. 29:	Probenstempel.....	52
Abb. 30:	Probenhalterung Spannbereich .....	52
Abb. 31:	Probenhalterung Retentionsbereich .....	53
Abb. 32:	Spannende Fertigung auf Drehbank.....	54
Abb. 33:	Fräsen der Halterungsgeometrie .....	55
Abb. 34:	Einbringen der Gewindebohrungen .....	55
Abb. 35:	Probenhalterung und –stempel fertig.....	55
Abb. 36:	Eingießen Probenhalterung und –stempel.....	56
Abb. 37:	Zellkulturflaschen.....	57
Abb. 38:	Pipetieren des Mediums .....	57
Abb. 39:	Geerntete Zellen in Zentrifuge .....	58
Abb. 40:	Weiterverarbeitung der Pellets.....	58
Abb. 41:	Casy <sup>®</sup> -Zellzählungssystem .....	58
Abb. 42:	Display / Steuerungseinheit .....	58
Abb. 43:	Aufbringen der Zellen .....	59
Abb. 44:	Brutschrank .....	59
Abb. 45:	Teststation, Workstation und RSC.....	60
Abb. 46:	FlexTest <sup>™</sup> .....	60
Abb. 47:	Hydraulikaggregat.....	61
Abb. 48:	Station Manager Bedienoberfläche.....	62
Abb. 49:	Station Manager Kontroll- und Bedienoberflächen offen .....	63
Abb. 50:	Probenprotokoll.....	65
Abb. 51:	Datenerfassung .....	66
Abb. 52:	Auswertungsfomular .....	67
Abb. 53:	Prozedureditor .....	71
Abb. 54:	Prozess1 Eigenschaften .....	71
Abb. 55:	Prozedurablauf .....	72
Abb. 56:	Aufschwingen bei Konditionierung.....	74
Abb. 57:	Vorversuchsergebnisse VL und 90°.....	75
Abb. 58:	Druckfestigkeit Vorversuche .....	76
Abb. 59:	CT Homogene Probe.....	78

Abb. 60:	CT Probe mit Strukturinhomogenität.....	78
Abb. 61:	Probe mit Zyste.....	79
Abb. 62:	CT Probe mit Zyste.....	79
Abb. 63:	Unbesiedelte / besiedelte Probe .....	80
Abb. 64:	Langzeitbesiedelt.....	80
Abb. 65:	CT Langzeitbesiedelte Probe .....	81
Abb. 66:	Druckfestigkeit Hauptversuche .....	82
Abb. 67:	E-Modul Hauptversuche .....	84
Abb. 68:	Druckfestigkeit Langzeitversuche .....	85
Abb. 69:	E-Modul Langzeitversuche .....	86
Abb. 70:	Versagensmuster homogen.....	90
Abb. 71:	Versagensmuster homogen.....	90
Abb. 72:	Versagensmuster Auflagenah .....	91
Abb. 73:	Versagensmuster Auflagenah .....	91

## Tabellenverzeichnis

Tab. 1:	Normalverteilungstests Vorversuche .....	76
Tab. 2:	Normalverteilungstests Druckfestigkeit Vorversuche .....	82
Tab. 3:	Normalverteilungstests E-Modul Vorversuche .....	84
Tab. 4:	Normalverteilungstests Druckfestigkeit Langzeitversuche .....	85
Tab. 5:	Normalverteilungstests E-Modul Langzeitversuche .....	86

## **Erklärung zum Eigenanteil**

Die Konzeption der Studie erfolgte zusammen mit Professor Dr. Kluba, Stellvertretender Ärztlicher Direktor der Universitätsklinik für Orthopädie Tübingen. Professor Dr. Kluba hat die Arbeit betreut und das Manuskript korrigiert.

Die Voruntersuchungen zur Zellbesiedelung (Abschnitt 5.1) sowie die Zellkultur für die Hauptversuche (Abschnitt 5.5) wurden von Dr. Rainer Kehlbach und Dr. Georg Siegel vom Institut für Klinische und Experimentelle Transfusionsmedizin in Tübingen konzipiert und organisiert. Die Zellbesiedelung wurde von den Mitarbeiterinnen Regine Bernhard, Ursula Hermanutz-Klein, Monika Hirlinger und Nadine Söldner durchgeführt.

Die für die Studie benötigten mechanischen Hilfsmittel wurden vom Doktoranden Boris Weng eigenständig konstruiert und hergestellt.

Die Programmierung der Testprozeduren und alle Versuche wurden nach Einweisung durch Frau Dr. Andrea Lorenz von dem Doktoranden Boris Weng eigenständig durchgeführt.

Die mechanische Aufbereitung und Logistik des Probenmaterials wurde von dem Doktoranden Boris Weng eigenständig durchgeführt.

Die Erhebung aller Daten sowie deren Auswertungen wurden von dem Doktoranden Boris Weng eigenständig durchgeführt.

Alle statistischen Untersuchungen wurden von Dr. Oliver Hermsen konzipiert und mit dem Doktoranden Boris Weng zusammen umgesetzt.

Die Mitarbeiter um Herrn Prof. Dr. Bernd Pichler, Julia Mannheim und Laura Kübler haben im Werner Siemens Imaging Center die Micro-CT-Messungen und Auswertung der Proben entsprechend Abschnitt 5.12 durchgeführt. Die Beurteilung Hinsichtlich Vorschädigungen der Proben zur Detektion von Ausreißern wurde vom Doktoranden selbst durchgeführt.

Die Veröffentlichung im Rahmen des DKOU 2014 wurde vom Doktoranden Boris Weng verfasst und von Professor Dr. Kluba vorgestellt.

Ich versichere, das Manuskript selbständig verfasst zu haben und keine weiteren als die von mir angegebenen Quellen verwendet zu haben.

**Tübingen, den** \_\_\_\_\_

**Doktorand:** \_\_\_\_\_

Boris Weng

## Danksagung

Allen voran möchte ich meinem Doktorvater Professor Dr. Kluba danken, ohne dessen Engagement diese Dissertation nie zustande gekommen wäre. Sein Organisationstalent, seine Auffassungsgabe und sofortige Unterstützung, wann immer nötig, waren beispielhaft. Vielen Dank für Ihr Vertrauen, die Hilfsbereitschaft und den netten Umgang.

Mein besonderer Dank gilt meiner Frau, die mich über meinen gesamten Werdegang unterstützt und mir den Rücken gestärkt hat. Danke für Deinen Glaube an mich, lange bevor das scheinbar unmögliche Realität wurde.

Meinen Schwiegereltern Ursula Langjahr und Dr. Hans-Georg Langjahr danke ich für den persönlichen und fachlichen Rückhalt, welcher mir immer eine große Erleichterung waren sowie für die herzliche Aufnahme in die Familie.

Meinen Eltern möchte ich danken, dass sie immer hinter meinen Entscheidungen standen.

Frau Dr. Andrea Lorenz danke ich für die Hilfe im Biomechaniklabor, während der Einarbeitungszeit und immer, wenn einmal etwas nicht reibungslos lief.

Herrn Dr. Oliver Hermsen gebührt besonderer Dank für die theoretische und praktische Unterstützung bei der statistischen Auswertung der Ergebnisse. Dank gebührt auch Miriam Hermsen, die uns während der Arbeit mehr als gut gepflegte.

Herrn Gerd Schröder bin ich während meiner Laufbahn wiederholt für das zur Verfügungstellen seiner Werkstatt und seines umfassenden fertigungstechnischen Know-hows zu Dank verpflichtet.

Dr. Rainer Kehlbach, Dr. Georg Siegel, und den Mitarbeiterinnen des IKET danke ich für die höchst professionelle Umsetzung der Zellbesiedelung und vorbildliche Hilfsbereitschaft weit über die Abteilungsgrenzen hinaus.

Dr. Julia Mannheim und Laura Kübler bin ich sehr dankbar für die aufwändige Umsetzung der Micro-CT-Messungen im Werner Siemens Imaging Center.

# Lebenslauf

## Persönlicher Hintergrund

Geburtstag 06.01.1981  
Familienstand verheiratet

## Beruflicher Werdegang

1987-1991 Grundschole Murr  
1991-1996 Hauptschole Murr  
1996 **Hauptschulabschluss**

1996-2000 Berufsausbildung zum Gießereimodellbauer  
Fa. Modellbau Brose, Freiberg a.N.  
2000 **Erwerb des Gesellenbriefs**

2000-2001 Zivildienst als Schreiner in der  
therapeutischen Resozialisierungswerkstatt  
Karlshöhe Ludwigsburg

2001-2002 Beschäftigung als Modellbauer bei Fa. Brose

2002-2003 Einjähriges Berufskolleg am  
Kolping-Berufskolleg Bad-Cannstatt  
2003 **Erwerb der Fachhochschulreife**

09.2003 Maschinenbaustudium an der Hochschule  
Heilbronn  
09.2004 **Erwerb des Vordiploms**  
09.2005-02.2006 Praxissemester bei Fa. Porsche AG  
03.2007-09.2007 Diplomarbeit im Labor für Strömungsmaschinen  
der Hochschule Heilbronn  
09.2007 **Erwerb des Diploms**

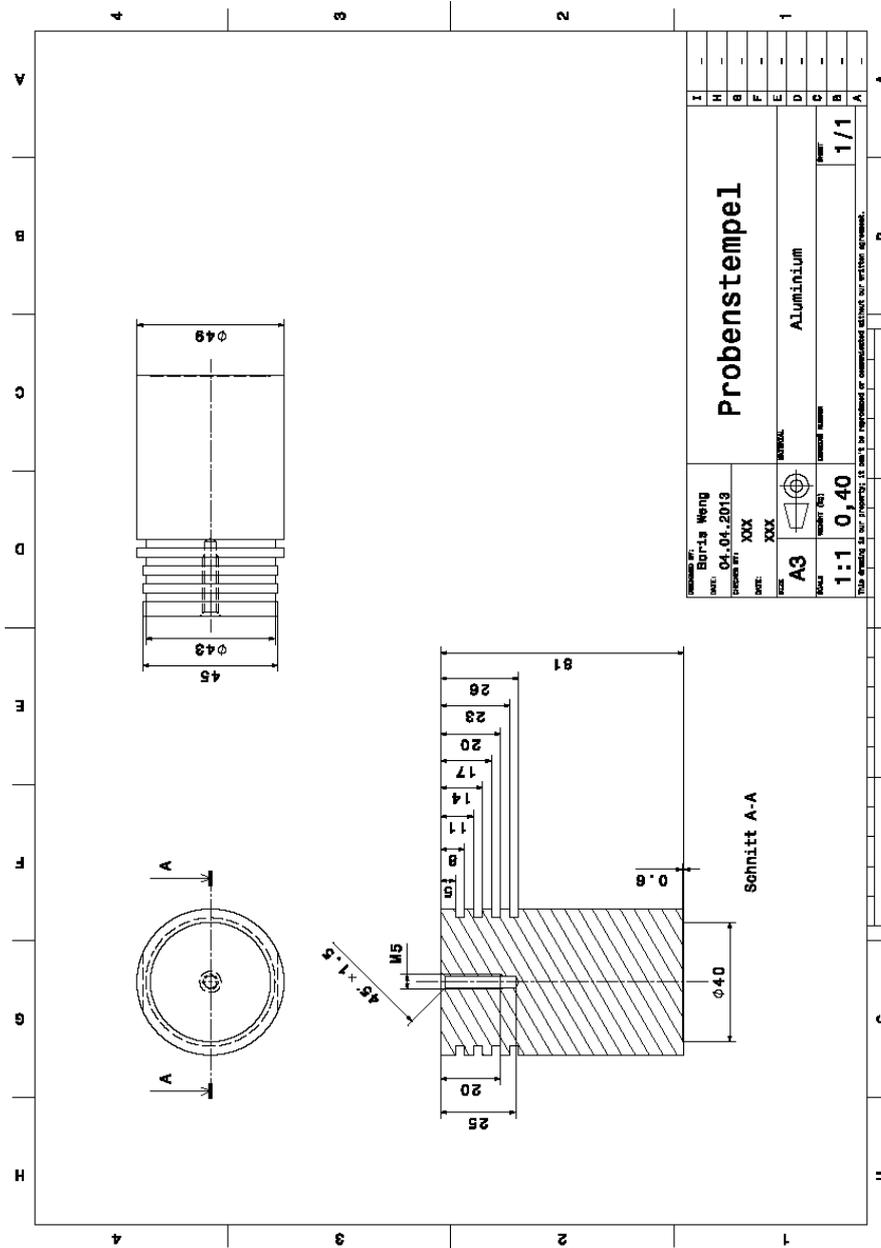
11.2007-04.2009 Beschäftigung als Entwicklungsingenieur bei  
Fa. Andreas Stihl AG Waiblingen

04.2009 Studium der Zahnheilkunde an der Eberhard  
Karls Universität Tübingen  
04.2010 **Erwerb des Vorphysikums**  
10.2011 **Erwerb des Physikums**  
11.2011 Promotionsbeginn  
08.12.2014 **Erwerb der Approbation als Zahnarzt**  
Seit 18.02.2015 Tätigkeit als Vorbereitungsassistent

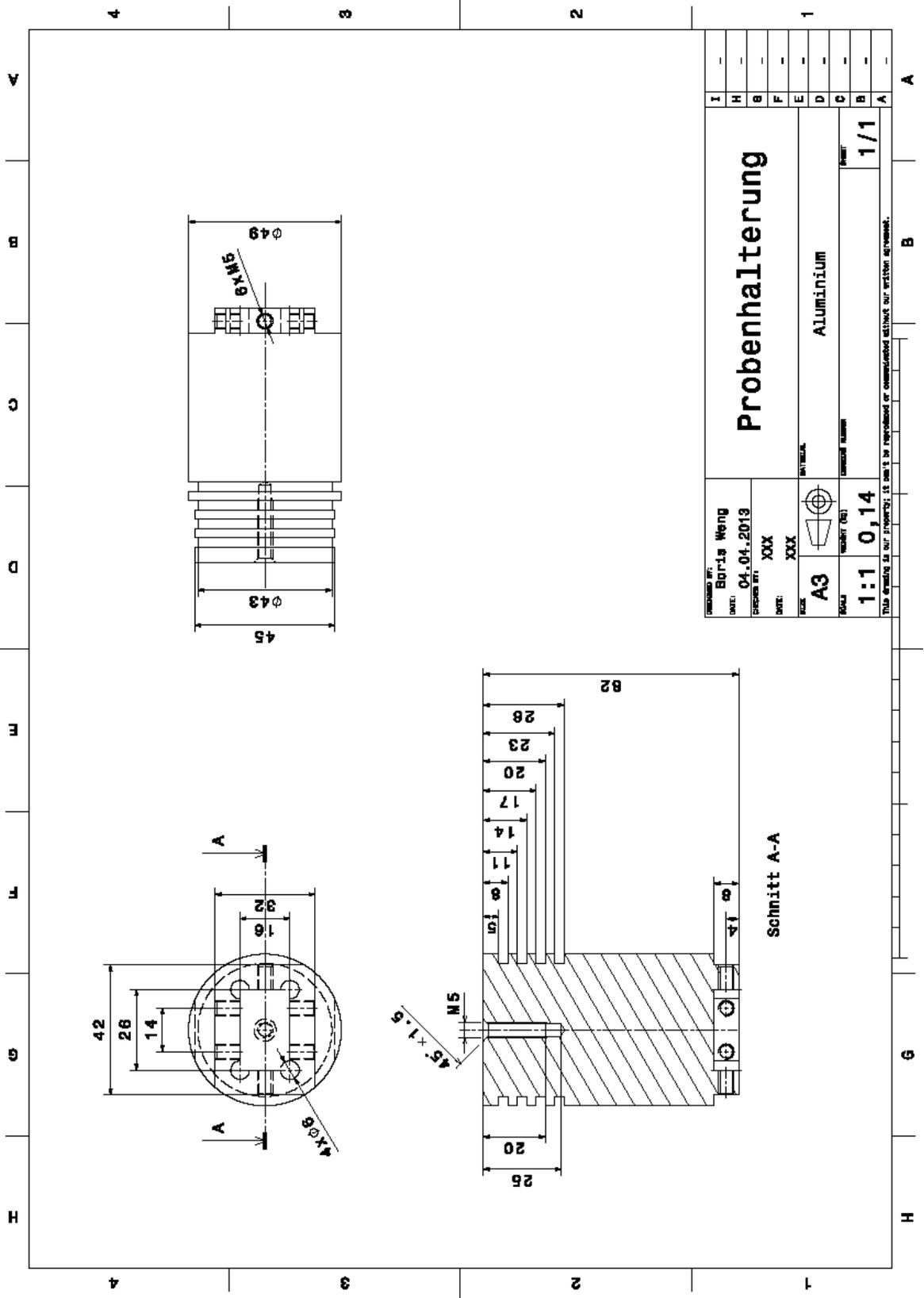
# Anhang

## Konstruktionszeichnungen

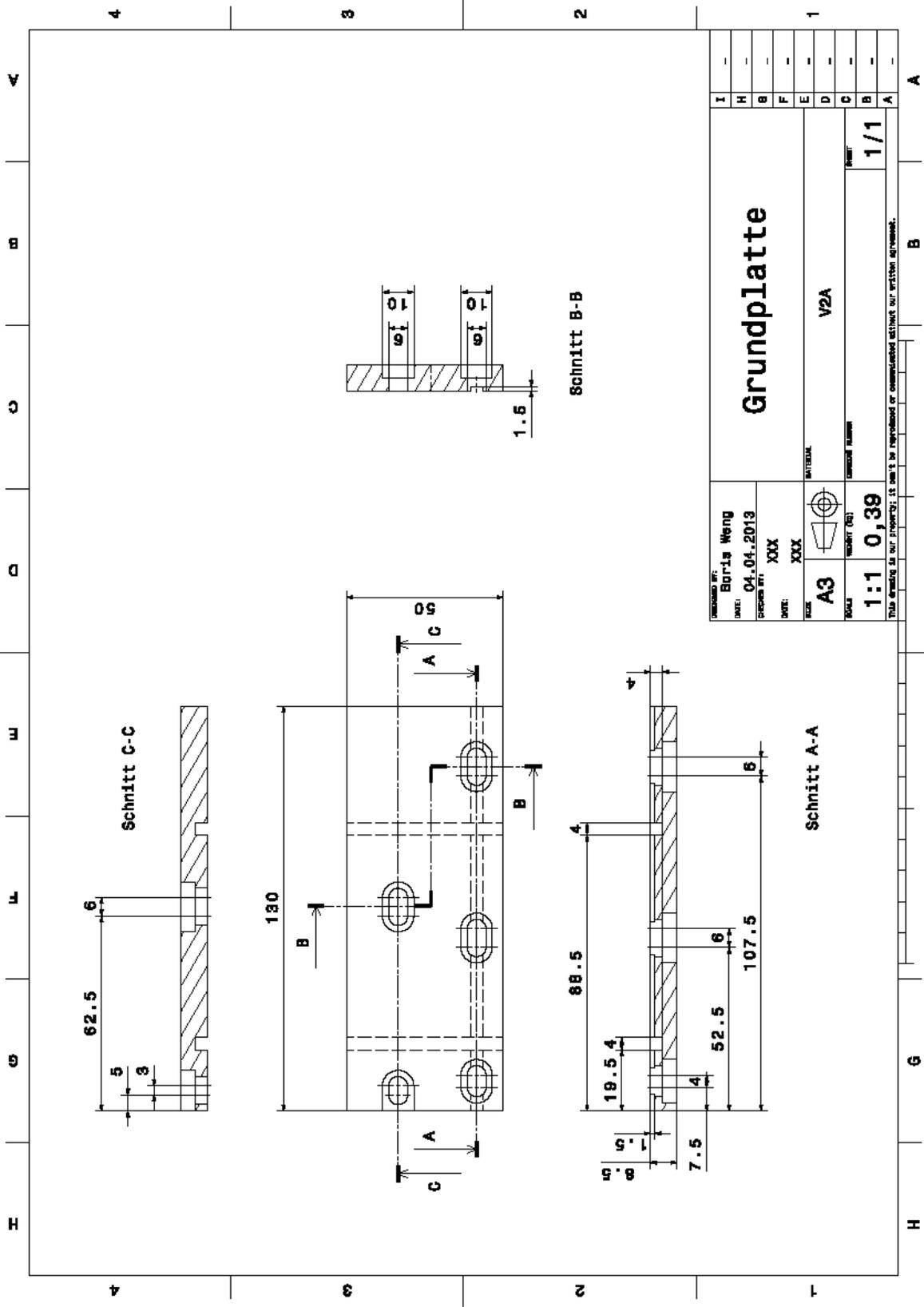
### Probenstempel

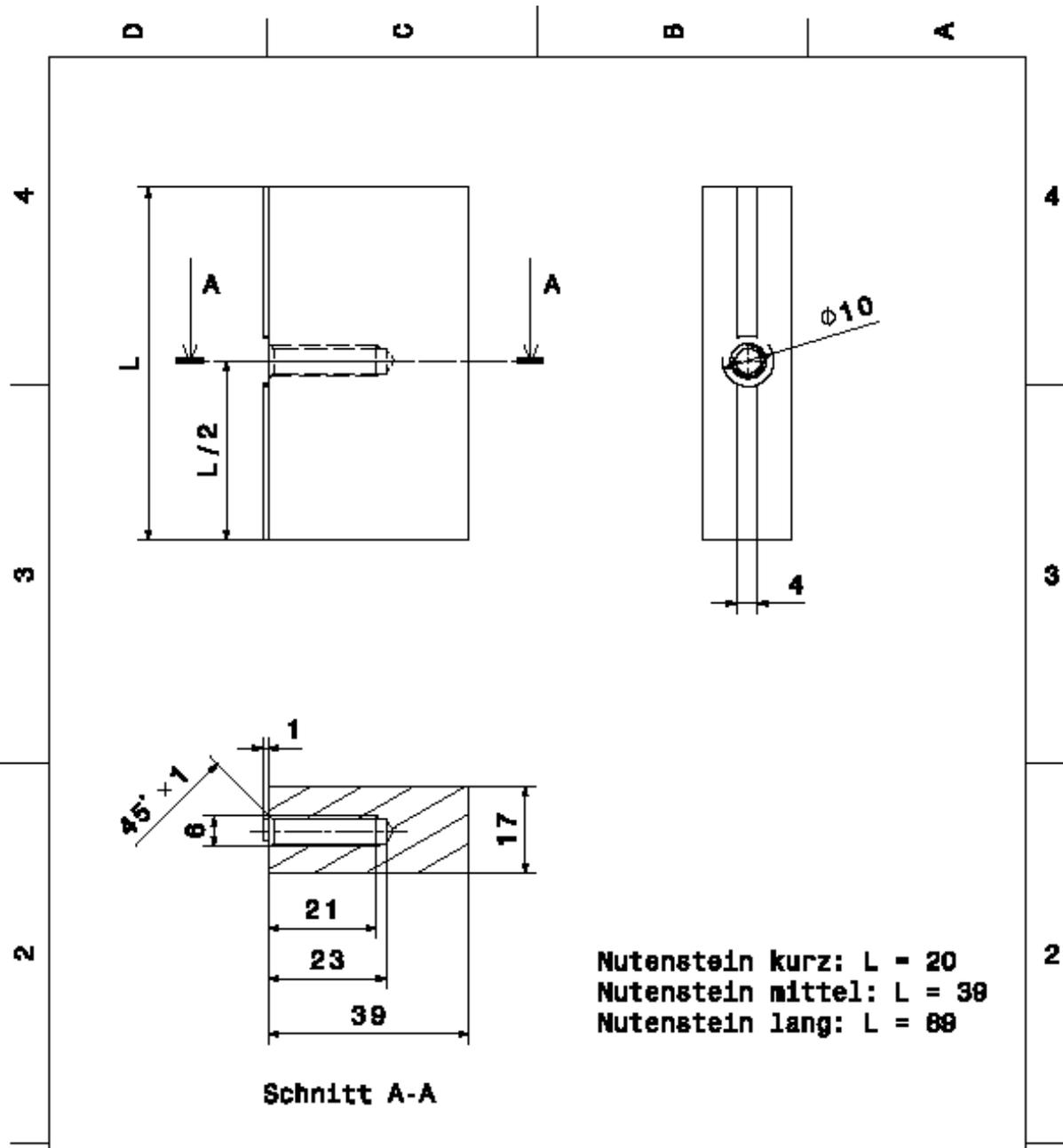


# Probenhalterung

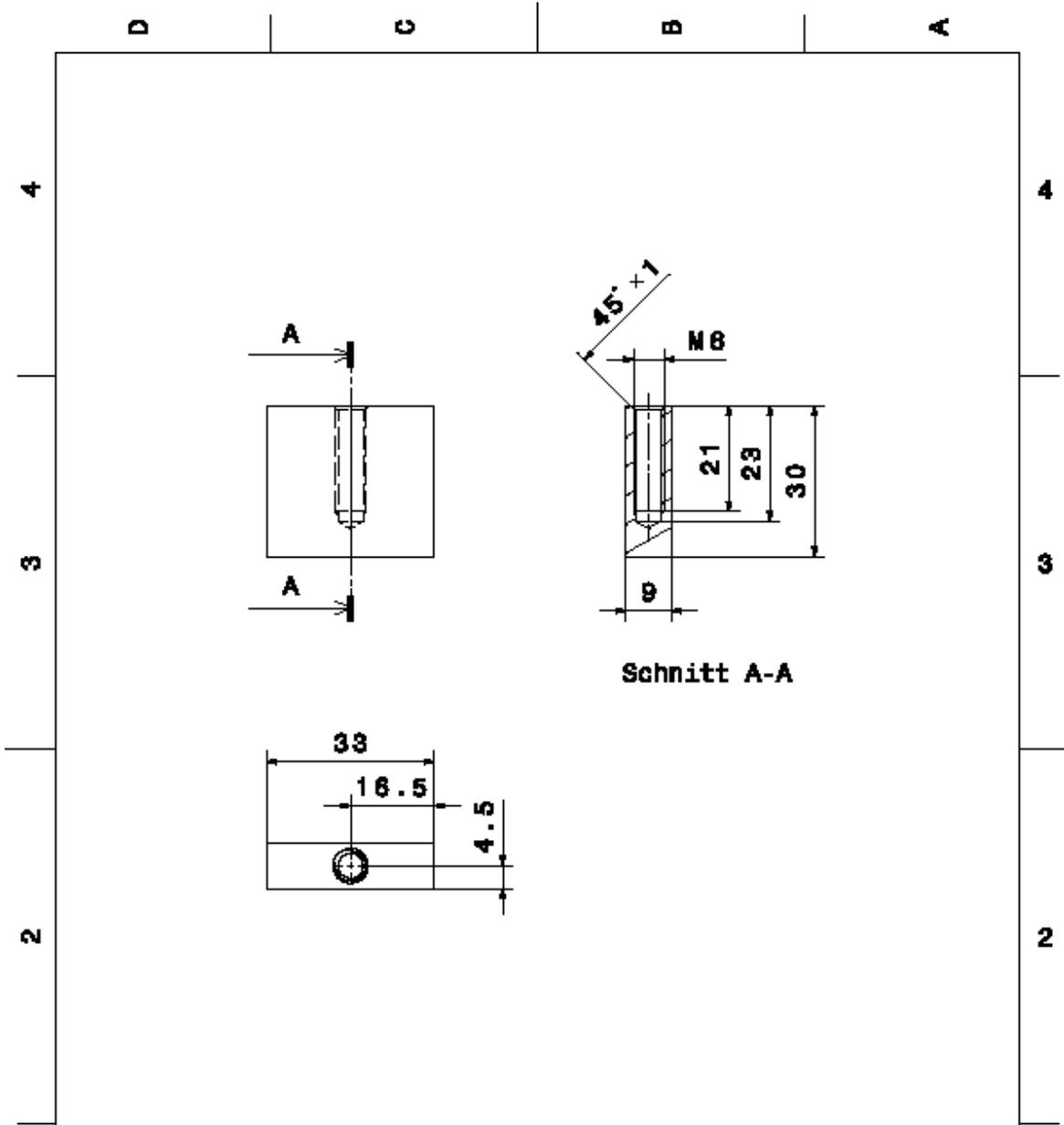


# Sägevorrichtung

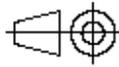


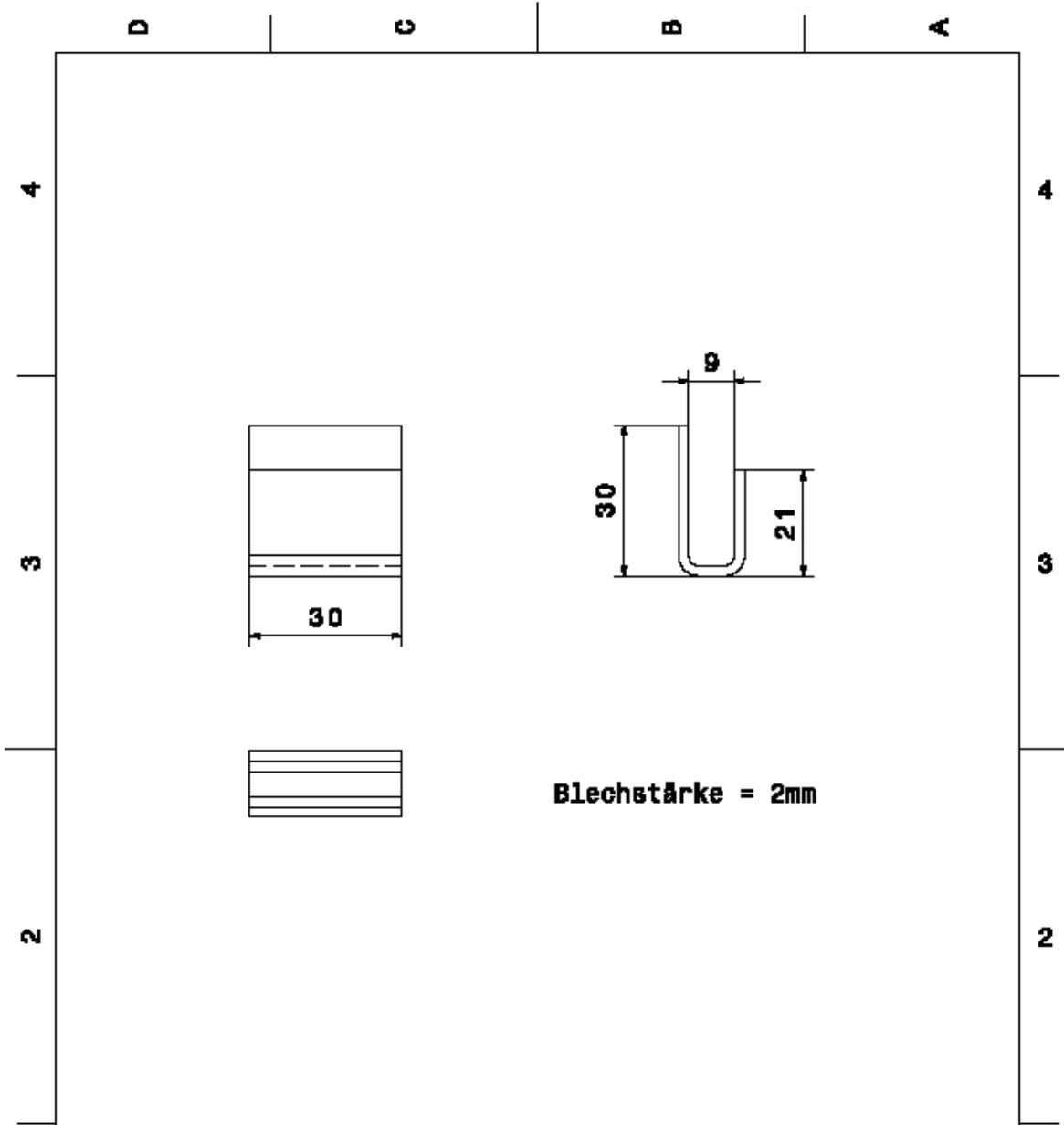


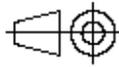
DESIGNED BY: <b>Boris Weng</b>		<b>Nutenstein</b> kurz/mittel/lang	I	-
DATE: <b>04.04.2013</b>			H	-
CHECKED BY: <b>XXX</b>			G	-
DATE: <b>XXX</b>		F	-	
SIZE: <b>A4</b>		E	-	
		D	-	
MATERIAL: <b>V2A</b>		C	-	
SCALE: <b>1:1</b>		B	-	
WEIGHT (kg): <b>0,05</b>		A	-	
OVERALL NUMBER: <b>1/1</b>		SHEET:		
This drawing is our property; it can't be reproduced or communicated without our written agreement.				



Schnitt A-A

DRAWING BY: <b>Boris Weng</b>		<h1>Queranschlag</h1>	I	-
DATE: <b>04.04.2013</b>			H	-
CHECKED BY: <b>XXX</b>			G	-
DATE: <b>XXX</b>		F	-	
SIZE: <b>A4</b>		MATERIAL: <b>V2A</b>	E	-
SCALE: <b>1:1</b>	WEIGHT (G): <b>0,01</b>	OVERALL NUMBER:	D	-
This drawing is our property; it can't be reproduced or disseminated without our written agreement.		QUANTITY: <b>1/1</b>	C	-
			B	-
			A	-



DESIGNED BY: <b>Boris Weng</b>		<h1>Steckgabel</h1>		I	-
DATE: <b>04.04.2013</b>				H	-
CHECKED BY: <b>XXX</b>				G	-
DATE: <b>XXX</b>		F	-		
SIZE: <b>A4</b>		MATERIAL: <b>V2A</b>		E	-
SCALE: <b>1:1</b>	WEIGHT (G): <b>0,03</b>	OVERALL NUMBER: 	SHEET: <b>1/1</b>	D	-
<small>This drawing is our property; it can't be reproduced or disseminated without our written agreement.</small>				C	-
				B	-
				A	-

# Prüfplan Ethikkommission

Ethik-Kommission an der Medizinischen Fakultät der Eberhard-Karls-Universität und am Universitätsklinikum Tübingen, Version 22. Februar, 2011

## **Prüfplan für wissenschaftliche Untersuchungen an Blut oder Gewebe aus einer bereits bestehenden Blut-, Gewebebank.**

Betreffend die Studie -

### **- Mechanische Untersuchung der Festigkeitsänderung von Spongiosaprobe des humanen Femurkopfes durch Zellbesiedelung -**

- Zur Erlangung des Doktorgrades Dr. med. dent.

Verantwortlicher Arzt: Professor Dr. med. T. Kluba  
Universitätsklinik für Orthopädie  
Hoppe-Seyler-Straße 3  
72076 Tübingen

Doktorand: Cand. med. dent. Boris Weng

Ansprechpartner/Studienleiter: Professor Dr. med. T. Kluba  
Tel. 07071/29-8 66 85  
Funk 151-8218  
Mail: Torsten.Kluba@med.uni-tuebingen.de

\_\_\_\_\_  
Datum                      Unterschrift

Ärztlicher Direktor : Prof. Dr. N. Wülker  
Orthopädische Universitätsklinik  
Tübingen

\_\_\_\_\_  
Datum                      Unterschrift

Angaben zur Blut-/Gewebebank:

Knochenbank der Universitätsklinik für Orthopädie  
Knochenbankverantwortlicher : Dr. I. Ipach

Hiermit bestätige ich, dass Gewebe - für die hier vorgelegte Untersuchung - aus genannter Knochenbank verwendet werden darf weil es Ausschlusskriterien für die Transplantation im klinischen Alltag aufweist:

24.5.2012  
\_\_\_\_\_  
Datum                      Unterschrift

## **INHALTSVERZEICHNIS**

1. Wissenschaftliche Hintergründe der geplanten Untersuchung
2. Studienziele
3. Fallzahl
4. Material
5. Geplante Methoden
6. Dauer des Projektes
7. Angaben zur Finanzierung des Projektes
8. Personenbezogene Daten
9. Bedeutung der Ergebnisse für die Patienten und ggf. Information der Patienten

### **1. Wissenschaftliche Hintergründe der geplanten Untersuchung**

Bei Verlust von Knochenhartschubstanz – beispielsweise durch Unfall, Tumorerkrankungen und andere pathologische oder physiologische Prozesse – kann der entstandene Defekt einen Umfang erreichen, der es dem Organismus verunmöglicht aus eigener Regeneration, die Kontinuität wiederherzustellen.

Um ein verwachsen dennoch zu erreichen kann es nötig werden, Knochen zu transplantieren. Die Knochentransplantation wird genutzt, um den Defekt direkt zu beseitigen oder eine Verankerung von prothetischen Implantaten überhaupt erst zu ermöglichen.

Um eine verbesserte und beschleunigte Einheilung des eingesetzten Knochens zu erzielen, wird angestrebt, die normalerweise avital applizierten Spenderknochen mit empfängereigenen Stammzellen zu besiedeln. Nun kann das Transplantat – vom Körper als körpereigen betrachtet – sofort mit einer Osteointegration beginnen.

### **2. Studienziele**

Durch die zur Zellbesiedelung nötige, mehrtägige Lagerung in einem Zellkulturbad, kann es zu einer Veränderung der Festigkeit der Knochenstruktur kommen.

Da die Transplantate häufig durch Schrauben, Drähte u.ä. mechanisch am Zielort fixiert werden müssen, ist es von Interesse, ob und gegebenenfalls in welcher Richtung sich die mechanischen Eigenschaften verändern.

Beispielsweise wäre eine massiv gesteigerte Härte bei der Fixierung mit Sprödbruchgefahr verbunden und bei einer Erweichung könnte es zu strukturellen Haltbarkeitsproblemen kommen was auch in der Nachbehandlung mit längerer Entlastung berücksichtigt werden müsste.

Diese Studie soll zur Abklärung dieser Fragestellung dienen und so die mögliche Einsetzbarkeit, aus praxisbezogener Sicht, überprüfen.

### **3. Fallzahl**

Es wird eine Anzahl von 40 bis 45 Probenpaaren angestrebt.

### **4. Material**

Bei den Probenpaaren handelt es sich um Hüftköpfe des menschlichen Femurs. Während der Operation zur Einbringung von Hüftgelenksprothesen, werden diese beim klassischen Vorgehen durch Absetzen gewonnen. In oben genannter Knochenbank werden sie, zum Zwecke der Transplantation, eingelagert.

Aufgrund von Ausschlusskriterien, entsprechend der Vorgaben zum Führen einer Knochenbank, dürfen die für die Studie verwendeten Köpfe nicht transplantiert werden und müssten (ohne die Studie) ohne weiteren Nutzen verworfen werden.

## **5. Geplante Methoden**

Die entnommenen Hüftköpfe werden zu zwei symmetrischen Proben zugesägt. Eine der beiden wird zellbesiedelt, die andere bleibt unbehandelt. Zur Ermittlung der mechanischen Festigkeit werden die Proben in einer Zug-/Druck-Prüfmaschine der Firma MTS fixiert und, unter Aufzeichnung von Kraft und Verformung, bis über die Bruchlast hinaus belastet. Da dieser Vorgang zur Zerstörung der Proben führt, können aus diesen anschließend keine weiteren Erkenntnisse mehr gezogen werden. Die Proben werden dann, über die von der Klinik vorgesehenen Entsorgungswege für humanes Material (Biomechaniklabor der Orthopädischen Klinik), verworfen.

Die ermittelten Festigkeitsunterschiede innerhalb der einzelnen Probenpaare führen statistisch, über die Gesamtanzahl der Probenpaare, zu einer Abschätzung des Einflusses der Lagerung im Zellbad auf die Belastbarkeit.

## **6. Dauer des Projektes**

Die Zeitspanne der Doktorarbeit wird auf ca. zwei Jahre angesetzt, da, wie in der medizinischen Fakultät gängig, ein Abschluss des Projektes bis zum Staatsexamen des Doktoranden angestrebt wird.

## **7. Finanzierung**

Es handelt sich ausschließlich um vorhandene Materialien, Proben und Testeinrichtungen. Es wird nicht mit dem Bedarf besonderer Anschaffungen gerechnet. Daher ist keine spezielle Finanzierung nötig/geplant. Drittmittelgelder/Fördergelder o.ä. sind ebenfalls nicht vorhanden.

## **8. Personenbezogene Daten**

Bei Entnahme der Proben aus der Knochenbank werden diese anonymisiert, so dass keine Verbindung zwischen Gewebe und Patient hergestellt werden kann.

## **9. Bedeutung der Ergebnisse für die Patienten und ggf. Information der Patienten**

Es sind keine Rückschlüsse von der Probe auf den Patienten möglich, da die Proben bei der Entnahme anonymisiert werden.

Gleichzeitig beinhalten die Erkenntnisse der geplanten Untersuchung keinerlei Relevanz für die Patienten, daher wird weder eine Information der Patienten noch eine Kontaktaufnahme mit ihnen nötig sein.



Ethik-Kommission an der Medizinischen Fakultät der Eberhard-Karls-Universität  
und am Universitätsklinikum Tübingen, Gartenstraße 47, 72074 Tübingen

Medizinische Fakultät

Ethik-Kommission

**Prof. Dr. med. D. Luft**  
Vorsitzender

Telefon: +49 7071 29-77661  
Telefax: +49 7071 29-5965  
E-Mail:  
ethik.kommission@med.uni-tuebingen.de

Herrn  
PD Dr. med. Torsten Kluba  
Abteilung Allgemeine Orthopädie mit Poliklinik  
Orthopädische Universitätsklinik  
Hoppe-Seyler-Straße 3  
72076 Tübingen

nachrichtlich:  
Herrn Prof. Dr. med. Nikolaus Wülker

**271/2012BO2**  
unsere Projekt-Nummer

03. Juli 2012  
eingegangen am

05. Juli 2012  
Datum

**Mechanische Untersuchung der Festigkeitsänderung von Spongiosaprobe des  
humanen Femurkopfes durch Zellbesiedelung.**

**Hier:**

**Fragebogen zur Anamneseerhebung bei Gewebespendern und Einwilligungserklärung  
Kriterien die zu einem Ausschluss als Gewebespende führen, Stand 21.02.2012  
Empfängerprotokoll-Hüftkopf, Version 1 (03/12)  
Entnahmeprotokoll Hüftkopf, Version 1 (03/12)  
Freigabe Protokoll-Hüftkopf, Version 1 (03/12)  
Schreiben vom 29.06.2012**

Sehr geehrter Herr Kollege,

der Prüfplan zur o.g. Studie hat der Ethik-Kommission an der Medizinischen Fakultät und am  
Universitätsklinikum Tübingen bereits zur Beratung vorgelegen. Mit Schreiben vom 26.06.2012  
hatte die Kommission um weitere Informationen zu den in der Studie verwendeten humane Fe-  
murköpfen gebeten. Mit Schreiben vom 29.06 haben Sie die o.g. Unterlagen vorgelegt.

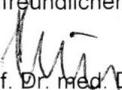
Soweit erkennbar stimmen die Hüftkopfspender ausschließlich den im optisch hervorgehobenen  
Textteil Abs 1 dargestellten Zielen der Hüftkopfbank zu, nämlich der Herstellung von Knochen-  
transplantaten, nicht aber der wissenschaftlichen Verwendung der gespendeten Gewebe.

Die Ethik-Kommission empfiehlt,

1. den Text zu ergänzen - wie dies bereits im Prüfplan formuliert wurde-, dass im Fall des  
Nachweises von Ausschlusskriterien nach Entnahme des Hüftkopfes die Spender gebeten  
werden, einer wissenschaftlichen Verwendung im Rahmen der Grundlagenforschung zur  
Knochentransplantation ebenfalls zuzustimmen.
2. Beim Hinweis auf die Untersuchung von Hepatitis B, Hepatitis C, AIDS sollten die Patienten  
ausführlich auf die Meldepflichten bei einem positiven Befund nach dem Infektionsschutz  
hingewiesen werden.

Für Rückfragen stehe ich Ihnen gern zur Verfügung.

Mit freundlichen Grüßen

  
Prof. Dr. med. Dieter Luft  
Vorsitzender der Ethik-Kommission

Universitätsklinikum Tübingen  
Anstalt des öffentlichen Rechts  
Sitz Tübingen  
Geissweg 3 · 72076 Tübingen  
Telefon +49 7071 29-0  
www.medizin.uni-tuebingen.de  
Steuer-Nr. 86156/09402  
USt-ID: DE 146 889 674

Aufsichtsrat  
Hartmut Schrade  
(Vorsitzender)

Vorstand  
Prof. Dr. Michael Bamberg (Vorsitzender)  
Gabriele Sonntag (Stellv. Vorsitzende)  
Prof. Dr. Karl Ulrich Bartz-Schmidt  
Prof. Dr. Ingo B. Autenrieth  
Jana Luntz

Banken  
Baden-Württembergische Bank Stuttgart  
(BLZ 600 501 01) Konto-Nr. 7477 5037 93  
IBAN: DE41 6005 0101 7477 5037 93  
SWIFT-Nr.: SOLADEST  
Kreissparkasse Tübingen  
(BLZ 641 500 20) Konto-Nr. 14 144  
IBAN: DE79 6415 0020 0000 0141 44  
SWIFT-Nr.: SOLADES1TUB

## **Digitaler Anhang**

### **Inhalt:**

- Bilder
- CAD-Daten und Zeichnungen
- DKOU-Veröffentlichung Abstract und Poster
- Ergebnisse und Auswertungen
- Ethikkommission Prüfplan und Korrespondenz
- Messdaten
- Statistik R-Auswertungsdatei
- Dissertationsschrift in Digitaler Form
- Probenprotokolle
- Prozedurdetails