

Aus dem
Institut für Veterinär-Anatomie
des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Freien Universität Berlin

und dem
Centrum für Muskuloskeletale Chirurgie, Charité
Universitätsmedizin – Berlin

**Korrelation serologischer Parameter mit der histologischen
Struktur im Verlauf der Frakturheilung im Schafmodell**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Veterinärmedizin
an der
Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Christine Exner-Oliaß
Tierärztin aus Offenburg
Berlin 2009
Journal-Nr.: 3295

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Freien Universität Berlin

Dekan: Univ.-Prof. Dr. med. vet. L. Brunnberg
Erster Gutachter: Apl. Prof. Dr. med. vet. H. H. Bragulla
Zweiter Gutachter: Prof. Dr. Ing. G. N. Duda
Dritter Gutachter: Univ.-Prof. Dr. med. vet. L. Brunnberg

Deskriptoren (nach CAB-Thesaurus):

sheep, experimental animals, bones, bone formation, blood serum, alkaline phosphatase, acid phosphatase, osteocalcin, matrix proteins, biochemical markers, bone resorption. collagen, isoenzymes, osteocalcin, peptides, fracture healing

Tag der Promotion: 30.07.2009

Bibliografische Information der *Deutschen Nationalbibliothek*

Die Deutsche Nationalbibliothek verzeichnet diese Publikation in der Deutschen Nationalbibliografie; detaillierte bibliografische Daten sind im Internet über <<http://dnb.ddb.de>> abrufbar.

ISBN: 978-3-86664-727-5

Zugl.: Berlin, Freie Univ., Diss., 2009

Dissertation, Freie Universität Berlin

D 188

Dieses Werk ist urheberrechtlich geschützt.

Alle Rechte, auch die der Übersetzung, des Nachdruckes und der Vervielfältigung des Buches, oder Teilen daraus, vorbehalten. Kein Teil des Werkes darf ohne schriftliche Genehmigung des Verlages in irgendeiner Form reproduziert oder unter Verwendung elektronischer Systeme verarbeitet, vervielfältigt oder verbreitet werden.

Die Wiedergabe von Gebrauchsnamen, Warenbezeichnungen, usw. in diesem Werk berechtigt auch ohne besondere Kennzeichnung nicht zu der Annahme, dass solche Namen im Sinne der Warenzeichen- und Markenschutz-Gesetzgebung als frei zu betrachten wären und daher von jedermann benutzt werden dürfen.

This document is protected by copyright law.

No part of this document may be reproduced in any form by any means without prior written authorization of the publisher.

alle Rechte vorbehalten | all rights reserved

© **mensch und buch verlag** 2009

choriner str. 85 - 10119 berlin

verlag@menschundbuch.de – www.menschundbuch.de

Meiner Schwester

Andrea Schiefer

„Quidquid agis, prudenter agas, et respice finem“

Inhaltsverzeichnis

1	EINLEITUNG	10
1.1	Hypothesen der Studie.....	11
2	LITERATURÜBERSICHT	12
2.1	Anatomie des langen Röhrenknochens.....	12
2.2	Histologie des langen Röhrenknochens.....	14
2.3	Die Frakturheilung	18
2.3.1	Spontane Knochenheilung.....	18
2.3.2	Rahmenbedingungen der Frakturheilung.....	23
2.3.3	Frakturheilungsprobleme	24
2.3.4	Tiermodell	25
2.4	Serumparameter	26
2.4.1	Kollagenfragmente (PICP, PIIINP, CPII).....	29
2.4.2	Enzyme (sALP, TRAP).....	31
2.4.3	Nicht-kollagene Matrixkomponenten (Osteocalcin, COMP).....	33
2.4.4	Messmethoden der Serumparameter.....	36
2.4.5	Einflussfaktoren auf die Serumparameter.....	38
3	MATERIAL UND METHODE	40
3.1	Tiere und Tierhaltung.....	40
3.2	Gruppeneinteilung der Tiere	40
3.3	Fixateur externe	41
3.4	Operation.....	43
3.5	Postoperative Nachversorgung.....	46
3.5.1	Pinpflege.....	46
3.5.2	Röntgen	46

3.6	Blutentnahme und -verarbeitung	46
3.7	Entnahme der Knochenpräparate	47
3.8	Aufarbeitung der Proben	48
3.8.1	HE-Färbung	50
3.8.2	Immunhistologie	51
3.8.3	Histochemie	54
3.9	Messung der Serumparameter	55
3.10	Messung des Kollagenanteils im Kallus	56
3.10.1	Deskriptive Histologie	56
3.10.2	Computergestützte Bildanalyse	57
3.11	Auswertung der Osteoklasten	60
3.12	Statistische Auswertung	60
4	ERGEBNISSE	63
4.1	Serumparameter	64
4.1.1	Kollagenfragmente	68
4.1.2	Enzyme	74
4.1.3	Nicht-kollagene Matrixkomponenten	78
4.2	Histologie	82
4.2.1	Deskriptive Histologie	82
4.2.2	Kollagen I, II, III	85
4.2.3	Osteoklasten	91
5	DISKUSSION	99
5.1	Tiermodell	99
5.2	Methoden	101
5.2.1	Blutentnahme	101
5.2.2	Auswertung der Serumparameter	102

	Seiten
5.2.3	Histologische Aufarbeitung 102
5.2.4	Computergestützte Bildanalyse 102
5.2.5	Osteoklastenzählung..... 103
5.3	Ergebnisse..... 103
5.3.1	Serumparameter und Histologie 105
5.3.2	Knorpelparameter und Histologie 107
5.3.3	Juvenile Serumparameter..... 109
5.3.4	Klinischer Nutzen der Serumparameter 109
6	ZUSAMMENFASSUNG..... 112
7	SUMMARY 114
8	VERZEICHNISSE..... 116
8.1	Literaturzitate..... 116
8.2	Tabellen..... 131
8.3	Abbildungen 133
9	ANHANG..... 136
9.1	Calcium und Phosphor Werte 136
10	PUBLIKATIONSVERZEICHNIS 137
11	DANKSAGUNG 138
12	UNABHÄNGIGKEITSERKLÄRUNG..... 139

Abkürzungsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
BMU	Basic multicellular units
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
CV %	Variationskoeffizient in Prozent
Da	Dalton
ELISA	Enzyme-linked immuno sorbent assay
g	Gramm
h	Stunde
KCl	Kaliumchlorid
kDa	kiloDalton
kg	Kilogramm
KM	Körpermasse
min	Minuten
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mm ²	Quadratmillimeter
n/a	nicht anwendbar
ng	Nanogramm
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
NaCl	Natriumchlorid
resp.	respektive
RIA	Radioimmunoassay
ROI	Region Of Interest
RT	Raumtemperatur

Stabw.	Standardabweichung
sog.	so genannte/r/s
s. u.	siehe unten
Tab.	Tabelle
u. a.	unter Anderem
vs.	versus
z. B.	zum Beispiel
°	Grad
%	Prozent

1 Einleitung

Frakturheilungsstörungen führen besonders im Bereich der unteren Extremitäten zu relevanten klinischen Problemen sowohl in der Human- als auch in der Veterinärmedizin. Zehn bis zwanzig Prozent aller Frakturheilungsprozesse sind verzögert oder sogar gestört (Frost, 1989 b; Haas, 2000; Southwood et al., 2003).

Die diagnostischen Möglichkeiten bei Erkrankungen des Skelettsystems konzentrieren sich neben der klinischen Untersuchung auf radiologische oder computertomographische Methoden (Southwood et al., 2003). Eine mögliche Knochenbiopsie ist für den Patienten schmerzhaft und mit einem hohen Infektionsrisiko verbunden. Alle diese Untersuchungen sind zum einen belastend für den Patienten, zum anderen mit einem hohen technischen und monetären Aufwand verbunden. Eine objektive und wenig belastende quantitative Methode auf der Basis von Blutuntersuchungen, um die Zellaktivität während der Frakturheilung besser abzuschätzen, könnte die Diagnostik ergänzen oder sogar verbessern (Aro et al., 1990).

Seit einigen Jahren wird im Bereich der metabolischen Knochenerkrankungen die Diagnostik mit Erfolg durch serologische Analysen sogenannter Knochenmarker ergänzt. Diese können Veränderungen im Knochenstoffwechsel widerspiegeln und ein dynamisches Bild des Frakturheilungsverlaufes wiedergeben (Delmas et al., 1997; Eriksen et al., 1995). Diese Knochenmarker können auch im Bereich der Frakturheilung zur Verifizierung der Diagnose und des Therapieerfolgs genutzt werden. Von Nutzen wären serologische Parameter, welche eine Aussage über den Status und den weiteren Verlauf der Frakturheilung ermöglichen. Der größte Vorteil der serologischen Parameter im Vergleich zur Standarddiagnostik läge im Idealfall darin, in einer objektiven, für den Patienten wenig belastenden Weise eine Vorhersage über den Heilungsverlauf der Fraktur machen zu können. Routinemäßig durchgeführte Blutuntersuchungen könnten ein dynamisches Bild der Frakturheilung wiedergeben (Liesegang, 2000). Entscheidungen, wie zum Beispiel die Entfernung von Implantaten oder die Indikation zu weiteren chirurgischen Eingriffen, ließen sich besser begründet treffen.

Einzelne klinische Untersuchungen in diesem Bereich kamen zu vielversprechenden Ergebnissen (Kurdy et al., 1998; Yu-Yahiro et al., 2001). Andere Autoren kamen zu einem kontroversen Untersuchungsergebnis (Joerring et al., 1994; Einhorn et al., 1990). Die individuelle Variation von serologischen Parametern scheint ein Grund für die unterschiedlichen Ergebnisse zu sein, denn im klinischen Alltag liegen meist keine prä-operativen oder prätraumatischen Blutwerte des Patienten vor.

Es ist also notwendig, die diagnostischen Möglichkeiten, die serologische Parameter für die Beurteilung des Heilungsverlaufes von Frakturen bieten könnten, in einem standardisierten Modell zu überprüfen. Dabei sollte untersucht werden, ob der lokal umschriebene Prozess einer Frakturheilung

serologisch nachweisbar ist. Zu diesem Zweck müssen die Ergebnisse der serologischen Untersuchungen mit „lokalen“ (histologischen) Befunden verglichen werden.

Das aktuelle Verständnis der Frakturheilungsprozesse basiert zum größten Teil auf Tierversuchsreihen. Im Schaf als Versuchstier können humanmedizinische Implantate verwendet werden. Zudem ist die Struktur der Tibia des Schafes, ihre Belastung und der Frakturheilungsverlauf der humanen Tibia ähnlich (Nunamaker, 1998). Serologische Parameter parallel zur Frakturheilung wurden beim Schaf bis jetzt in sehr wenigen Studien analysiert, sodass die Analysetechniken oder die passenden Testsysteme für die verschiedenen serologischen Parameter erst etabliert werden müssen.

Das Ziel dieser Studie ist es, unter standardisierten Bedingungen den Verlauf der Frakturheilung anhand verschiedener serologischer Parameter zu verfolgen und soweit möglich serologische Parameter zu finden, die für die frühe Phase der Frakturheilung indikativ sind.

1.1 Hypothesen der Studie

Die Frakturheilung bewirkt detektierbare Veränderungen der ausgewählten serologischen Parameter.

Die Veränderungen der Spiegel der serologischen Parameter korrelieren mit dem histologischen Frakturheilungsverlauf.

2 Literaturübersicht

2.1 *Anatomie des langen Röhrenknochens*

Knochen sind das Gerüst des Körpers. Dieses Gerüst schützt, stützt und formt den Körper. Es besteht aus dem Skelett mit seinen langen Röhrenknochen, kurzen und platten Knochen, sowie aus Gelenken als Hebel für den Muskelansatz. Die Funktionen von Knochen sind vielfältig. Außer der Unterstützung der Bewegungsabläufe dient er als Schutz für Gehirn, Rückenmark, Sinnesorgane und Knochenmark. Weiterhin ist der Knochen ein Calcium- und Phosphorreservoir. Knochengewebe ist ein spezialisiertes Bindegewebe, das durch geordneten Einbau von Mineralien versteift wird. Knochengewebe stellt die Hauptkomponente des Skelettes dar. Seine differenzierte Struktur ermöglicht ihm, diesen vielfältigen Funktionen gerecht zu werden (Trostle et al., 1996; Webb et al., 2000).

Die Entstehung der langen Röhrenknochen läuft überwiegend nach dem Prinzip der indirekten (chondralen) Ossifikation ab. Hierbei wird der vorgeformte Knorpel des Primordialskelettes abgebaut und durch Knochen ersetzt.

Am Anfang der Verknöcherung eines Röhrenknochens steht die direkte perichondrale Ossifikation, wobei das knorpelige Element des Primordialskelettes an seinem Schaft unter der Knorpelhaut von einer gürtelförmigen Knochenmanschette (Anulus osseus perichondralis) eingehüllt und stabilisiert wird. Während der folgenden enchondralen Ossifikation kommt es zur Einsprossung von Blutgefäßen in das Zentrum des Knorpelschaftes und damit zur Entstehung von Verknöcherungskernen (Centrum ossificationis primarium). Es entsteht die primäre Knochenmarkshöhle (Cavum medullare primarium) mit dem primären Knochenmark.

An den Enden des knorpeligen Elementes des Primordialskelettes kommt es etwas später ebenfalls zur Einsprossung von Blutgefäßen und zur Bildung von Verknöcherungskernen (Centrum ossificationis secundarium) (Budras et al., 1996).

Die langen Röhrenknochen der Extremitäten haben in der Regel eine lange, zylindrische Gestalt, die sich an beiden Enden erweitert. Der so genannte lange Röhrenknochen wird, seiner Form entsprechend (Abb. 2.1-1), in den Knochenschaft (Diaphyse) und seine Knochenenden (Epiphysen) unterteilt. Die Epiphyse vermindert die auf die Gelenke einwirkenden Kräfte, da diese auf eine Fläche mit größerem Querschnitt verteilt werden (Trostle et al., 1996). Am Übergang von Diaphyse zu Epiphyse liegt die Metaphyse. Hier findet der Umbau von primären in sekundäre Knochenbälkchen statt. Zwischen Metaphyse und Epiphyse liegt die Epiphysenfugenknorpelscheibe, auch Wachstumsfuge genannt. Sie dient dem Längenwachstum nach dem Prinzip der enchondralen Ossifikation und wird mit dem Alter immer schmaler, weil die Zubildung von Knorpelgewebe sistiert und schließlich der Ersatz des Knorpelgewebes durch Knochengewebe überwiegt respektive vollendet

wird. Ist die Epiphysenfugenknorpelscheibe völlig verknöchert, wird das gesamte Ende des Knochens als Metaphyse bezeichnet. (Rhineland, 1974; Trostle et al., 1996).

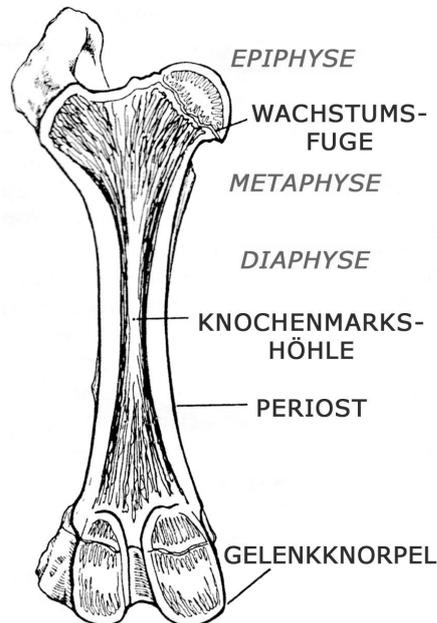


Abb. 2.1-1: Röhrenknochen (Trostle et al., 1996)

Knochen besteht aus der harten kompakten Ummantelung der Epiphyse (Substantia corticalis), der stabilen Wand der Diaphyse (Substantia compacta) und inneren, dünnen Knochenbälkchen (Substantia spongiosa) (Trostle et al., 1996). Der gesamte Knochen ist bis auf die Gelenkflächen oder die Ansatzstellen der Muskeln von der Knochenhaut (Periost) umgeben. Dieses Periost ist von zwei Lagen aufgebaut, oberflächlich liegt das Stratum fibrosum und darunter das Stratum osteogenicum (Kambiumschicht). Das Stratum fibrosum strahlt mit seinen Fasern (Fibrae perforantes) in die Substantia compacta des Knochens ein und bildet eine feste Verbindung mit dem Knochen. In der unteren Lage, dem Stratum osteogenicum verlaufen viele Gefäße, Nervenstränge und eine dichte Ansammlung von verschiedensten für die Knochenumbauprozesse wichtiger Stammzellen. Diese Zellen sind für die Frakturheilung von besonderer Bedeutung, da sie schnell in das Frakturgebiet vordringen können (Trostle et al., 1996). Vom Stratum osteogenicum geht auch das Dickenwachstum der langen Röhrenknochen aus (Budras et al., 1996).

Im Inneren der Diaphyse liegt die Knochenmarkhöhle, die außer Knochenmark und Fettgewebe auch die arterielle Blutversorgung des Knochens enthält (Trostle et al., 1996). Ihre innere Auskleidung ist das Endost, das ähnlich wie das Periost Vorläuferzellen für den Knochenumbau aufweist (Budras et al., 1996).

Literaturübersicht

Die Substantia spongiosa in den Knochenenden ist so aufgebaut, dass sie durch die trajektorielle Ausrichtung ihrer Knochenbälkchen entsprechend den Ausrichtungen der einwirkenden Druck- und Zugkräfte große Energiemengen aufnehmen kann, ohne Schaden zu nehmen. Die Substantia compacta (Lamellenknochen) hingegen gibt dem Knochen Stabilität und Steifigkeit. Das Zusammenspiel dieser beiden Bauformen des Knochengewebes ermöglicht es dem Knochen den täglichen starken Belastungen zu widerstehen (Radasch, 1999). Dieses Bauprinzip ermöglicht insgesamt eine hohe Stabilität, aber zugleich auch eine begrenzte Biegsamkeit (Webb et al., 2000). Knochengewebe wird im lebenden Organismus ständig den sich ändernden mechanischen Belastung durch Umbauprozesse angepasst.

2.2 Histologie des langen Röhrenknochens

Knochen befindet sich in ständigem Umbau und weist einen sehr aktiven Stoffwechsel auf (Katagiri et al., 2002; Liesegang, 2000). Drei prinzipielle Komponenten des Knochengewebes sind zu unterscheiden: die Zellen, die organische extrazelluläre Matrix und die anorganischen Bestandteile des Knochens. Diese drei Komponenten des Knochengewebes sind eng miteinander verbunden, um auf die Bedürfnisse des Körpers reagieren zu können (Trostle et al., 1996).

Die funktionale Beschaffenheit eines Knochens hängt von der Menge organischer und anorganischer Bestandteile ab. Im Geflechtknochen gibt es einen deutlich höheren Anteil organischer Substanz als im Lamellenknochen, der mehr Hydroxylapatit enthält (Oni, 1997). Der organische Anteil des Knochengewebes besteht aus kollagenen Fasern und Glykosaminoglykanen und gibt dem Geflechtknochen seine hohe Elastizität (Radasch, 1999). Der Lamellenknochen erhält seine Festigkeit zusätzlich durch seine geordnete Struktur. Der histologische Aufbau des Knochens zeigt die Knochenzellen, die Osteozyten, und die Interzellularsubstanz, die aus kollagenen Fibrillen und verkalkter Kittsubstanz besteht. Weiterhin gibt es die Knochengewebe aufbauenden Zellen (Osteoblasten) und die Knochengewebe abbauenden Zellen (Osteoklasten), die eine wichtige Rolle im Knochenstoffwechsel spielen (Trostle et al., 1996).

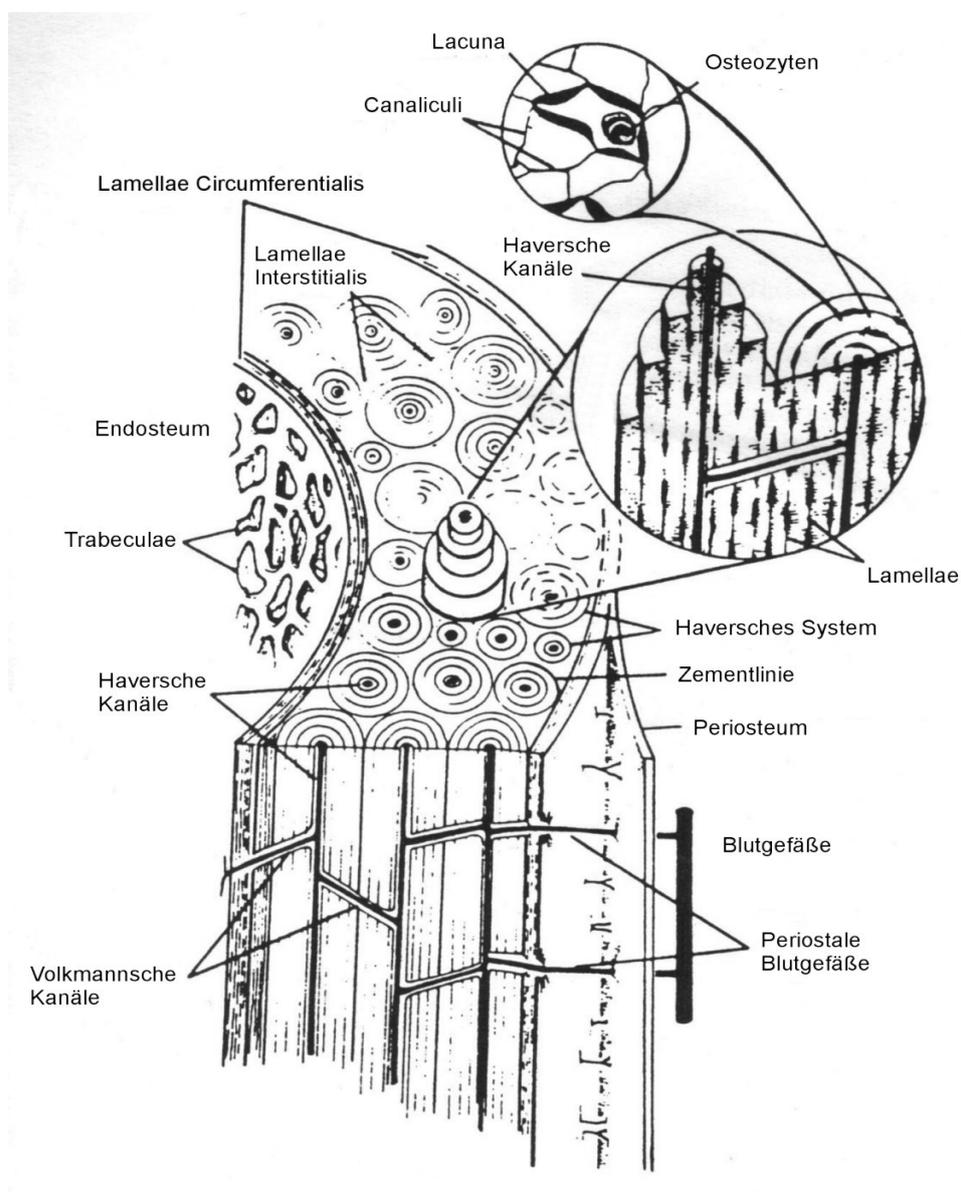


Abb. 2.2-1: Knochenaufbau (modifiziert nach Lea & Febiger, 1989)

Beim Aufbau von Knochengewebe werden zirka zehn Prozent der Osteoblasten mit Knochenmatrix umgeben und auf diese Weise fest im Knochengewebe fixiert. In dieser Form nennt man sie Osteozyten. Mehrere Osteozyten bilden die fundamentale Einheit des Knochengewebes, das Osteon (Haversche System). In der Mitte eines jeden Osteons ist ein kleiner Kanal (Haversscher Kanal), der Blutgefäße, Nerven und Lymphbahnen enthält. Das Osteon besteht aus konzentrisch aufgebauten Lagen von mineralisiertem Knochengewebe, den Speziallamellen, in die Kollagenfasern eingebettet sind. Die Kollagenfasern in den Speziallamellen wechseln von Lage zu Lage die Richtung (Troostle et al., 1996). Zwischen den einzelnen Haversschen Kanälen in jedem Zentrum von Osteonen gibt es

Literaturübersicht

gefäßführende Verbindungskanäle, die Volkmanschen Kanäle (Abb. 2.2.-1). Die Osteozyten bilden Zellfortsätze aus, die in einem umfangreichen Kanalsystem, den Canaliculi ossei, mit anderen Osteozyten kommunizieren und Stoffe austauschen (Trostle et al., 1996).

Unter „bone remodelling“ versteht man zyklisch ablaufenden Umbauvorgänge, welche durch lokale Einheiten, so genannten „basic multicellular units“ (BMU) ermöglicht wird (Frost, 1969; Katagiri et al., 2002). Der Knochen ist zeitlebens diesen Umbauvorgängen unterworfen, die aus der engen Kopplung von Resorption durch Osteoklasten und Knochenneubildung durch Osteoblasten („resorption/formation coupling“) resultieren (Abb. 2.2-2). BMUs findet man auf allen Knochenoberflächen, also unter dem Periost, in den Markräumen entlang des Endostes und in den Gefäßkanälen der Osteone (vorwiegend in der Substantia compacta). Sie enthalten alle an den Umbauvorgängen beteiligten Zelltypen, beziehungsweise deren undifferenzierte Vorläuferzellen (Christenson, 1997; Frost 1989 b; Klaushofer et al., 1994).

Die Vorläufer der Osteoblasten, sogenannte Osteoprogenitorzellen, findet man im pluripotenten Mesenchym des Erwachsenen (Marks et al., 1988). Diese Zellen differenzieren sich über Präosteoblasten zu reifen Osteoblasten. Während der Initialphase der Knochenneubildung werden aus Präosteoblasten zunächst unreife Osteoblasten, die Matrixproteine wie zum Beispiel Proteoglykane synthetisieren (Chambers, 2000). Für eine ausreichende Mineralisierung und damit auch Strukturierung des neugebildeten Knochens ist eine weitere Differenzierung der Osteoblasten notwendig. Spezialisierte Zellfunktionen, wie die Induktion des Enzyms alkalische Phosphatase und die Synthese von Osteocalcin, einem Protein der Interzellularsubstanz (Osteoid), sind nur bei ausdifferenzierten Osteoblasten möglich (Katagiri et al., 2002; Klaushofer et al., 1994).

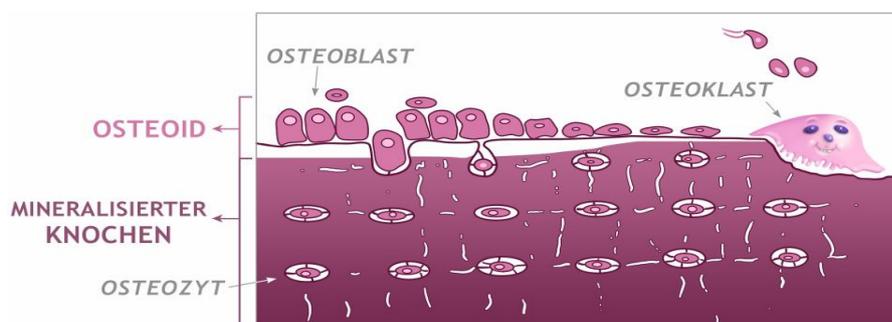


Abb. 2.2-2: Topographische Beziehung zwischen den Knochenzellen (modifiziert nach Liesegang, 2000).

Osteoklasten sind vielkernige Riesenzellen, die sich aus hämatopoetischen Stammzellen entwickeln und mit Monozyten und Makrophagen eine gemeinsame Vorläuferzelle besitzen (Marks et al. 1988; Owen, 1970; Teitelbaum, 2000). Aus diesen Vorläuferzellen entstehen einkernige Osteoklastenprogenitorzellen, die in Kontakt mit Osteoblasten und mit der Knochenmatrix eine

Umwandlung in Präosteoklasten erfahren. Mehrere dieser Präosteoklasten verschmelzen, um einen funktionstüchtigen vielkernigen Osteoklasten zu bilden (Katagiri et al., 2002).

Die Aktivierung der Osteoklasten erfolgt indirekt über die Osteoblasten. Nur Osteoblasten besitzen die spezifischen Membran- oder zytoplasmatischen Rezeptoren für die resorptionsaktivierenden Hormone, wie zum Beispiel Parathormon (Klaushofer et al., 1994).

Hat ein Osteoklast sich an den Knochen angelagert, bildet sich eine Resorptionszone, die als rauer, verschwommener Bereich (ruffled border) im Mikroskop sichtbar wird (Sasaki, 2003). Hier werden Säuren und lysosomale Enzyme aus dem Osteoklasten freigesetzt, die den Knochen entmineralisieren und die organischen Bestandteile abbauen (Marks et al., 1988; Teitelbaum, 2000).

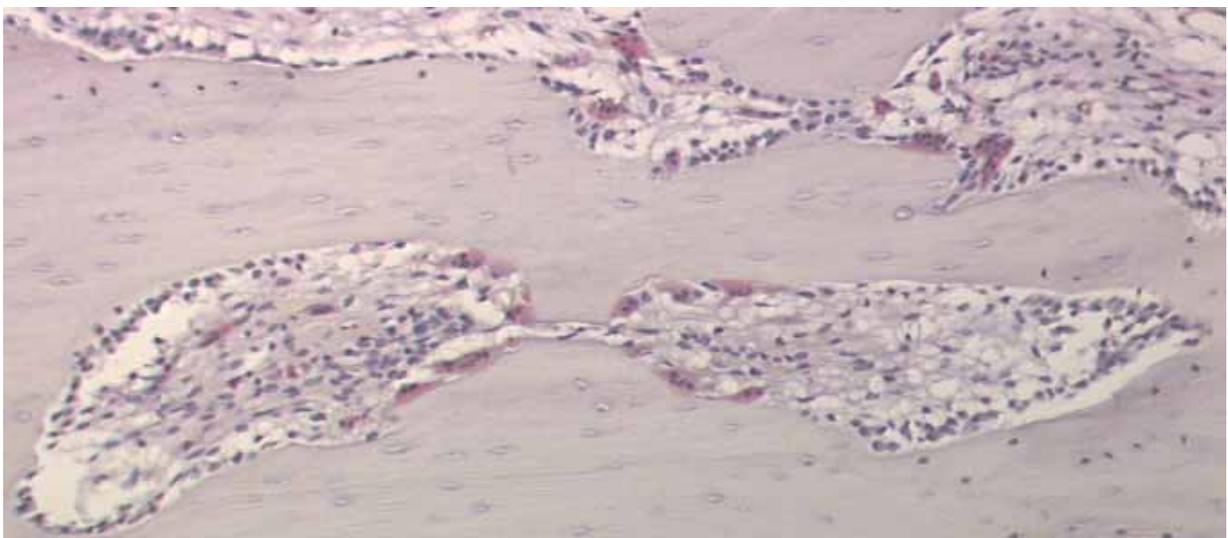


Abb. 2.2-3: Lakunen in der Kortikalis. Die Lakunen im Knochengewebe werden durch die Knochenresorption der Osteoklasten (rot) vergrößert und verschmelzen miteinander. Die Osteoblasten (blau) liegen als Saum am Rand des Knochengewebes und führen zu einem geordneten Knochenaufbau (Verg.: 27,5x).

Es entstehen so genannte „Howship'sche Lakunen“, die sich wie Löcher im Knochen darstellen. Diese resorbierten Bereiche werden von Blutgefäßen, retikulärem Bindegewebe und Osteoblasten aufgefüllt, die wiederum den Knochen neu aufbauen (Abb. 2.2-3) (Teitelbaum, 2000).

Die Umbauvorgänge des Knochens lassen ein Zusammenspiel mehrerer Hormone vermuten. Ein effektives „resorption/formation coupling“ dürfte darauf beruhen, dass die wichtigsten regulatorisch wirkenden Hormone, wie zum Beispiel das Calcitonin und das Parathormon, in Abhängigkeit von ihrer jeweiligen Gewebskonzentration sowohl Knochenaufbau als auch Knochenabbau fördern können (Frost, 1969; Klaushofer et al., 1994; Schmolke, 2001).

2.3 Die Frakturheilung

Eine Fraktur (ein Knochenbruch) entsteht, wenn eine bestimmte Energiemenge auf den Knochen auftrifft, die von ihm nicht vollständig absorbiert werden kann. Der Knochen bricht, und dieses Ereignis setzt eine Kaskade von lokalen und den ganzen Organismus betreffenden Mechanismen in Gang (Lane, 1998; Simmons, 1985). An erster Stelle steht die Schädigung des Knochengewebes und das damit verbundene Zerreißen der Gefäße und des umliegenden Gewebes (Cruess et al., 1975).

2.3.1 Spontane Knochenheilung

Phasen der spontanen Frakturheilung:

Die Frakturheilung ist keine Heilung im eigentlichen Sinne, sondern ein Regenerationsprozess. Im Gegensatz zur Heilung eines Sehnenrisses oder eines Hautschnittes kommt es bei der Frakturheilung nicht zur Narbenbildung, denn die ursprüngliche Belastbarkeit des frakturierten Knochens wird vollständig wiederhergestellt (Brighton, 1984; Brighton et al., 1991). Die spontane Knochenheilung wird auch „sekundäre Knochenheilung“ genannt, da in ihrem Verlaufe nicht direkt neues Knochengewebe gebildet wird, sondern durch den Umbau von Binde- und Knorpelgewebe sekundär Knochengewebe gebildet wird. Schon in der Antike wird diese Form der Knochenheilung mit Kallusbildung beschrieben (Boni, 2000). Allgemein wird die sekundäre Frakturheilung in mehrere Phasen unterteilt, wobei diese Phasen nicht schematisch aufeinander folgen, sondern fließend ineinander übergehen (Carter et al., 1998; Stürmer, 1996). Das heißt, ein beschriebener Teilprozess ist nicht zeitdiskret und kann in einer vorigen Phase beginnen, aber erst in der nächsten Phase enden. Trotzdem ist ein spezieller Teilprozess in der einen Phase der Frakturheilung dominant und bestimmt ihr histologisches Bild (Cruess et al., 1975).

Entzündungsphase

Direkt nach der überanspruchenden Krafteinwirkung auf das Knochengewebe mit resultierender Fraktur kommt es zur Entzündung. Es entsteht ein Hämatom im Frakturspalt. Klinisch korreliert diese Phase mit den typischen Entzündungssymptomen wie Schwellung, Rötung und Schmerz (Brighton, 1984). Die Osteozyten sterben im frakturierten Knochengewebe bis zu den Kollateralgefäßen ab und es sammelt sich nekrotisches Gewebe im Frakturbereich an (Cruess et al., 1975). Lysosomale Enzyme werden aus den toten Osteozyten freigesetzt und lösen die intrazelluläre und interzelluläre organische Matrix des Knochengewebes auf (Remedios, 1999). Zusammen mit dem nekrotischen Material von Muskulatur und umliegendem Gewebe wird ein Reiz gesetzt, der zu einer weiteren starken Entzündungsreaktion führt (Brighton, 1984). „Akut-Phase-Proteine“ (Mediatoren/Botenstoffe), z. B. Interleukin-1 und Interleukin-6, aktivieren die proteolytische Enzymkaskade (Remedios, 1999).

Die Gefäßwände werden, gesteuert von solchen Entzündungsmediatoren, durchlässig, wodurch Plasma in den Extrazellarraum austritt. Es werden Entzündungszellen, vor allem polymorphkernige neutrophile Granulozyten und Makrophagen, angelockt (von Mediatoren wie z. B. Histamin, Interleukin) und wandern aktiv in das Frakturgebiet ein (Brighton, 1984; Cruess et al., 1975). Makrophagen und Lymphozyten geben Wachstumsfaktoren ab, welche die Gefäßneubildung initiieren, was zudem durch die lokale Hypoxie gefördert wird (Lane, 1998; Remedios, 1999). Nach ca. 48 Stunden sind auch vermehrt Mastzellen im Frakturgebiet zu finden. Ihre Funktion im frühen Kallus ist bisher nur unvollständig bekannt. Allgemein wird vermutet, dass sie für die Migration von Zellen zuständig sind (Pennig, 1990). Im Hämatom, welches den Frakturspalt ausfüllt, finden sich Fibrin, ursprünglich vorhandenes Kollagen und retikuläre Fibrillen (Pennig, 1990). Es kommt im weiteren Verlauf der Entzündungsphase zur Einwanderung von Osteoblasten und Osteoklasten beziehungsweise ihrer Vorläuferzellen, den sogenannten Osteo- und Chondroprogenitorzellen. Die Osteoblasten produzieren unter anderem Kollagen und beginnen die Knochenneubildung, wohingegen die Osteoklasten für den aktiven Abbau des toten Knochenmaterials zuständig sind (Olmedo et al., 2000). Das Frakturhämatom wird in wenigen Stunden bis Tagen zu Granulationsgewebe umgebaut. Die gesamte Entzündungsphase dauert im Mittel drei Tage (Brighton, 1984; Klaushofer et al., 1994).

Regenerationsphase

1. Weicher Kallus

Diese Phase der Frakturheilung beginnt, wenn die klinischen Symptome der Entzündung, wie Schwellung, Rötung und Schmerz, am stärksten sind und dauert zirka drei Wochen an (Brighton, 1984).

Das Hämatom im Frakturspalt wird durch ein Fibringerüst organisiert und dieses dient als Leitschiene für verschiedene an der Regeneration beteiligte Zellen und einsprossende Gefäße. Die Ausdifferenzierung der pluripotenten Stammzellen hängt von mehreren Faktoren ab. Ein Faktor ist das im Frakturspalt herrschende chemische Milieu, welches erst einen leicht sauren pH-Wert aufweist und dann über den neutralen Bereich hinweg alkalisch wird (Cruess et al., 1975; Pennig, 1990). Ebenso wichtig für die Differenzierung der Zellen sind die Scher- und Druckkräfte, die auf die Zelle einwirken. Sie entstehen bei Belastung des Knochens durch das Körpergewicht oder den Zug der angegliederten Sehnen bzw. Muskeln. Diese mechanischen Faktoren spielen eine wichtige Rolle bei der Ausdifferenzierung von Knochenzellen, denn Knochengewebe formt sich der Belastung entsprechend (Carter et al., 1996; Murray et al., 1996).

Ein kleiner Teil der Zellen, die für die Reparatur der Fraktur verantwortlich sind, kommt aus der Kambiumschicht (Stratum osteogenicum) des Periosts und bildet das erste ungeordnete

Literaturübersicht

Knochengewebe. Endothelzellen, Fibroblasten, Lipoblasten, sowie Osteo- und Chondroprogenitorzellen sind auch an der Reparatur beteiligt, wohingegen die durch die Ischämie abgestorbenen Osteozyten abgebaut werden (James et al., 1986; Olmedo et al., 2000). Die meisten an der Frakturheilung beteiligten Zellen gelangen über die umgebenden Gefäße und das neugebildete Granulationsgewebe in das Frakturgebiet (Cruess et al., 1975; Klaushofer et al., 1994). Die Blutzufuhr zum Frakturgebiet erreicht ihr Maximum normalerweise am zehnten Tag nach dem Trauma (Remedios, 1999). Das heißt, es besteht eine direkte Verbindung zwischen Gefäßversorgung und Reparaturprozess. Es ist noch nicht völlig geklärt, woher das Granulationsgewebe ursprünglich seine Blutversorgung erhält. Allgemein wird davon ausgegangen, dass erst die Gefäße des Periosts am Aufbau beteiligt sind und später die nutritiven medullären Gefäße des Knochens die Hauptversorgung übernehmen (McKibbin, 1978; Stürmer et al., 1980).

Die im Hämatom vorhandenen Zellen bilden den sogenannten „weichen“ Kallus. Er hüllt die Frakturrenden ein, erhöht aber die Stabilität des frakturierten Knochens nur geringfügig. Seine Bestandteile sind Bindegewebe, Knorpel und undifferenzierter fibröser Knochen. Mit Hilfe der Immunhistologie kann man die Kollagenstruktur der Frakturheilung darstellen. Am Anfang des Heilungsverlaufs sieht man bei stabil versorgten Frakturen vor allem Kollagen III und V. Ungefähr fünf bis sieben Tage nach der Fraktur wird Kollagen I an das bestehende Kollagengerüst angelagert. Nach sieben bis vierzehn Tagen werden oft kleine Kollageninseln sichtbar, die aus Kollagen II und IX bestehen (Cruess et al., 1975).

Ist die Fraktur nicht stabil versorgt, so werden größere Knorpelbereiche sichtbar. Die Umwandlung von Kollagen III in Kollagen I verzögert sich. Der Kallus kann nicht mineralisiert werden, da nur Kollagen I die nötige Struktur für den Einbau von Mineralien bietet (Einhorn, 1996; Oni, 1997). Mineralsalze, wie zum Beispiel Calcium-Hydroxylapatit, können an den Kollagenfibrillen entlang der Bindegewebszellen festgestellt werden (Brighton, 1984).

Die Differenzierung der einzelnen Zellen oder des Zellverbands in diesem Kallus wird durch Umwelteinflüsse gesteuert. So führt die Kompression der Frakturrenden oder der Mangel an Spannung zur vermehrten Bildung von Bindegewebe, während ein Mangel an Sauerstoff zur Entwicklung von Knorpelgewebe führt, welches in einem Umbauprozess zu Knochen umgeformt werden kann. Knochengewebe wird nur dann „per primum“, also direkt aus kollagenfaserigem Bindegewebe (direkte Ossifikation) gebildet, wenn die Stammzelle ausreichend mit Sauerstoff versorgt und gleichzeitig in gewissem Maße mechanisch belastet wird, aber die Knochenenden stabil miteinander verbunden sind (Cruess et al., 1975; Stürmer, 1996). Bei spontaner Knochenheilung mit intakter Durchblutung kommt es bei vermehrter Bewegung der Fragmentenden zu starker Kallusbildung und starker Resorption (Frost, 1989 a; Stürmer, 1996). Zu Anfang der spontanen Frakturheilung herrscht die Knorpelbildung vor, und es ist eine hohe Konzentration an Proteoglykanen und Knorpelgrundsubstanzen (Hyaluronsäuren, Dermatansulfat, Keratansulfat, etc.) vorhanden. Ein Anstieg der Kollagenproduktion

und eine Akkumulation von Calcium-Hydroxylapatit-Kristallen leitet die letzte Phase der Knochenheilung ein (Cruess et al.; 1975).

2. Harter Kallus

Die Frakturrenden sind zu Beginn dieser Phase vollständig von weichem Kallus umgeben und miteinander verbunden. Der Bindegewebe- und Knorpelanteil des Kallusgewebes wird nach und nach mineralisiert und in Geflechtknochen umgewandelt, der als harter Kallus bezeichnet wird. Der Geflechtknochen ist relativ ungeordnet und lässt strukturelle oder belastungsabhängige Orientierungen der Knochenlamellen bzw. Osteone vermissen. Die Architektur des Knochengewebes richtet sich meist nach der Lage der neugebildeten Kapillaren aus, von denen aus dieses ungeordnete Knochengewebe ernährt wird (Cruess et al., 1975; Klaushofer et al., 1994). Die Osteoblasten des Geflechtknochens sind schon früh in das Frakturgebiet eingewandert und haben sich an den Frakturrenden verankert. Dort bilden sie wenige kurze Verbindungskanäle, welche als Gerüst für die ausdifferenzierten Osteozyten und somit dem Aufbau von lamellärem Knochengewebe dient (Kusuzaki et al., 2000; Shapiro, 1988). Die Mineraldichte im Geflechtknochen ist höher als die im lamellären Knochen (Oni, 1997). Lamelläres mineralisiertes Gewebe, also reifes Knochengewebe, hat eine den einwirkenden Druck- und Zugkräften entsprechende Struktur, was in dieser frühen Phase der Frakturheilung noch nicht erreicht ist. Der Geflechtknochen muss den einwirkenden mechanischen Kräften gemäß weiter organisiert beziehungsweise umstrukturiert werden, was fortlaufende Umbauprozesse erfordert. Die Fraktur kann allerdings in dieser Phase der Frakturheilung schon klinisch und röntgenologisch als geheilt bezeichnet werden, da der Knochen größtenteils seine mechanischen und physiologischen Funktionen erfüllen kann. Meistens ist diese Phase nach drei bis vier Monaten abgeschlossen (Brighton, 1984). Parallel dazu hat die Umbauphase, die nächste Phase der Frakturheilung, längst begonnen (Cruess et al., 1975).

Literaturübersicht

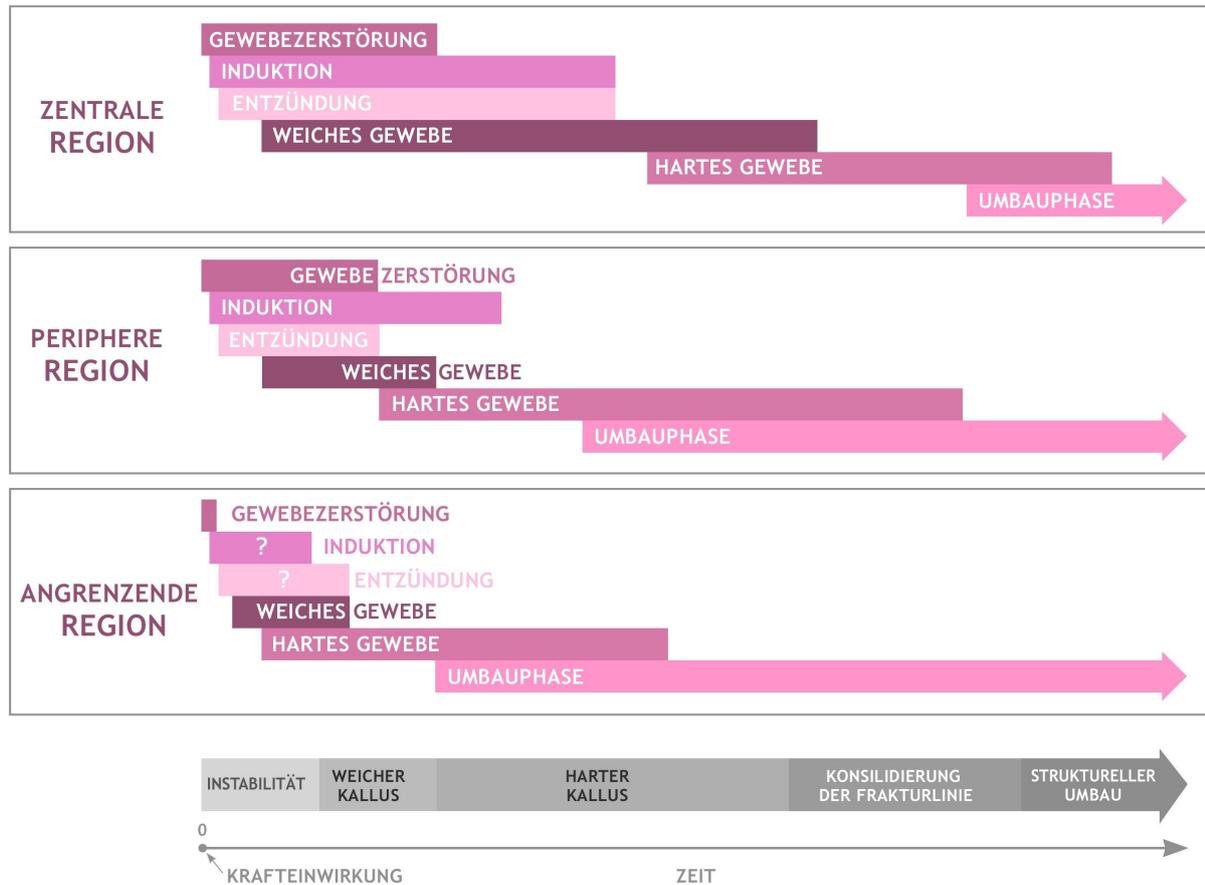


Abb. 2.3-1: Zeitverlauf der Frakturheilung in den verschiedenen Kallusregionen (modifiziert nach Sarmiento, et al. 1984).

Umbauphase

Die Umbauprozesse am Knochen finden über einen langen Zeitraum statt, der Monate bis Jahre (beim Menschen zwischen ein und vier Jahre) nach der Fraktur dauern kann (Frost, 1989 a). Der wichtigste Stimulus für den Umbau von Geflechtknochen in Lamellenknochen sind mechanische Kräfte. Das heißt, durch die natürliche Belastung wird der Knochen seiner Funktion entsprechend modelliert. Wird der Knochen nicht belastet, weder durch Muskelzug noch durch das Körpergewicht, verringert sich die Knochendichte (Brighton, 1984; Carter et al., 1996). Schon im Jahre 1872 hat Wolff beschrieben, dass sich die Struktur des Knochens nach der auf ihn einwirkenden Druck- und Zugbelastung ausrichtet. Die Osteone des Lamellenknochens sind trajektorieell entsprechend der Ausrichtung der auf den Knochen einwirkenden Kräfte angeordnet. Die Knochenlamellen scheinen auf mechanische Kräfte mit der Erzeugung von elektrischen Strömen und Potentialen – ähnlich wie piezoelektrische Materialien – zu reagieren. Wird ein Knochen belastet, so entstehen an der konvexen Seite des Knochens Ansammlungen von negativen elektrischen Ladungen, während an der konkaven

Seite des Knochens positive elektrische Ladungen überwiegen. Osteoklasten scheinen von der positiven Ladung einer elektrischen Spannung aktiviert zu werden und verstärken dort ihre Arbeit, wohingegen Osteoblasten vom negativen Pol einer elektrischen Spannung stimuliert werden (Steinberg et al., 1968).

Der Kallus wird von Osteoklasten abgebaut, wobei der Durchmesser der Frakturstelle wieder abnimmt und sich dem restlichen Knochenschaft anpasst. Auch die Knochenmarkhöhle wird durch Resorption von endostalem Kallusgewebe wiederhergestellt (Klaushofer et al., 1994). Die gesamte Umbauphase (Remodelling) ist dann beendet, wenn der Knochen der Kraft der Muskeln und dem Zug der Sehnen entsprechend in eine optimal an die Belastung angepasste Form gebracht wurde (Brighton, 1984; Cruess et al., 1975).

2.3.2 Rahmenbedingungen der Frakturheilung

Die Frakturheilung wird durch biomechanische Konditionen, im Besonderen durch die interfragmentären Bewegungen der Knochenbruchstücke und durch die Blutversorgung, sowie durch Hormone und Wachstumsfaktoren beeinflusst. Ist eine optimale Durchblutung der Fragmente gegeben, liegt der größte Einfluss auf die Frakturheilung bei den inter-fragmentären Bewegungen. Herbeigeführt werden diese durch die Belastung und die Art der Fixation der Fraktur (Claes et al., 1998). Ist die Fraktur durch Beweglichkeit der Fragmente oder/und eine große Spaltweite charakterisiert, wird grundsätzlich viel Kallusgewebe gebildet (Brighton, 1984; Stürmer, 1996; Wolf et al., 1998). Hierbei spielt die Intensität der Bewegung und die Spaltbreite eine entscheidende Rolle. Kleine interfragmentäre Bewegungen stimulieren die Kallusheilung, große Bewegungen hingegen verhindern häufig, dass eine knöcherne Überbrückung des Frakturspaltens zustande kommt (Pennig, 1990). Zudem ist die Ausdehnung des Frakturspaltens entscheidend. Ein breiter Frakturspalt erhöht durch die Instabilität des den Frakturspalt überbrückenden Gewebes stark das Risiko der Entwicklung einer Pseudarthrose (Claes et al., 1998; Claes et al., 2000; Claes et al., 2002).

Die Bildung eines Kallus ist der natürliche Weg der Stabilisierung von Knochenfragmenten. Sie ermöglicht eine Heilung ohne jede äußere Stabilisierung, geht allerdings oft mit einer Fehlstellung des Knochens einher. Kallusgewebe soll temporär die Knochenenden mechanisch stabil überbrücken, damit eine Heilung der Kortikalis ermöglicht wird (Claes et al., 2000). Die Verknöcherung des erst weichen Kallusgewebes beginnt frakturfern und verbindet sich auf Höhe des Frakturspaltens. Eine Knochenbrücke entsteht, die die Bewegungen der Frakturfragmente gegeneinander stark einschränkt und somit die Heilung im Zentrum ermöglicht (Claes et al., 2000). Es ist festgestellt worden, dass nach Amputationen von Gliedmaßen am Knochenstumpf ein Kallus entsteht, der sehr schnell wieder abgebaut wird. Die Dehnung des interfragmentären Gewebes durch die Bewegung der Frakturrenden scheint der entscheidende Triggermechanismus für die Überbrückung zweier Frakturbruchstücke zu

Literaturübersicht

sein (Claes et al., 2000; Stürmer, 1996). Liegen die Knochenenden aufeinander und die Frakturstelle ist bei wenig Weichteiltrauma stabil versorgt, dann findet die Heilung fast ohne Kallusbildung statt (Pennig, 1990; Shapiro, 1988).

2.3.3 Frakturheilungsprobleme

Trotz Osteosynthese kommt es manchmal zu einer überschießenden Kallusbildung ohne Heilung im Zentrum der Fraktur oder zu einer ungenügenden Kallusbildung mit verzögerter Heilung. Technische Schwierigkeiten, wie Materialermüdung und Knocheninfektionen, waren vor den 40er Jahren des vergangenen Jahrhunderts die Hauptursachen für Frakturheilungsprobleme. Mit immer besseren Osteosynthese-Systemen und neuen Antibiotika konnten diese Probleme zum großen Teil behoben werden. Biologische Ursachen für überschießende oder ungenügende Kallusbildung machen heutzutage einen kleineren Teil der Frakturheilungsprobleme aus. Sie können vielfältige Ursachen haben und z. B. durch Medikamente, Röntgenstrahlen oder metabolische Erkrankungen wie Diabetes mellitus ausgelöst werden. Bei den meisten Frakturheilungsstörungen bleibt die Ursache unklar. Dieses liegt daran, dass die genauen Stoffwechselforgänge in der Frühphase der Frakturheilung noch nicht genau geklärt sind (Frost, 1989 b).

Die langen Röhrenknochen sind während der Rehabilitation Kräften ausgesetzt, die durch die Körpermasse, die muskuläre Kontraktion und die physische Aktivität bestimmt werden (Palmer et al., 1992). Ein frakturierter Knochen, der während der Heilung stark belastet wird, erleidet wiederholt Mikrotraumata resp. „Mikrofrakturen“ und heilt deshalb nur verzögert (Stürmer, 1996).

Die Schädigung des frakturumgebenden Gewebes hat ebenfalls einen großen Einfluss auf den Heilungsverlauf. Große nekrotische Bereiche im und um das Frakturgebiet und verminderte Durchblutung verursachen geringe Stabilität und ein großes Infektionsrisiko (Hierholzer et al., 1982; Schandelmaier et al., 1997). Frakturen mit Gelenkbeteiligung sind besonders problematisch, da die Synovia die Fibrinfibrillen auflöst und dadurch die erste Phase der Frakturheilung aufgehalten wird (Cruess et al., 1975; Frost, 1989 b). Ein chirurgisches Vorgehen führt durch das Verschrauben von Platten auf den Knochen oder durch das Einbringen eines Marknagels zu einem relativ großen Weichteiltrauma (Frost, 1989 b). Die Blutversorgung wird dadurch unterbrochen oder zumindest eingeschränkt, was die Frakturheilung verzögert, da die Osteozyten in den mit Blut unterversorgten Gebieten absterben (Cruess et al., 1975; Stürmer et al., 1980). Es kommt vermehrt zur Knorpelbildung in den Bereichen, wo eine zu geringe Blutzufuhr vorherrscht (Ford et al., 2004). Wurde sehr viel Gewebe zerstört, verteilt sich das Frakturhämatom über einen großen Wundbereich und die mesenchymalen Zellen können nicht gezielt im Frakturspalt wirken. Das Frakturhämatom verteilt sich im defekten Gewebe und es braucht länger, um dieses durch mit dem Blut angelieferte Entzündungszellen zu organisieren. Kommt es bei einer Fraktur zu so großen Weichteilschäden, dass

Muskulatur zwischen die Frakturrenden gelangt, so kann keine Knochenbrücke durch Kallusgewebe gebildet werden (Stürmer, 1996). Bewegen sich die Knochenfragmente bei intakter Muskelmanschette deutlich weniger, wirkt sich das positiv auf die Reparaturmechanismen aus.

Sind die Knochenenden beweglich, kommt es vermehrt zur Knorpelbildung im Frakturspalt, da das Einsprossen der Blutgefäße behindert wird (Ford et al., 2004). Dieses Knorpelgewebe wird über die enchondrale Ossifikation in Geflechtknochen umgebaut, der die Frakturrenden stabilisiert. Erst jetzt kann die Rekonstruktion des lamellären Knochens beginnen (Brighton, 1984; Einhorn, 1996).

Sind sowohl die versorgenden Gefäße aus dem Periost, als auch die nutritiven Gefäße der Markhöhle zerstört, kann es eventuell zur Revaskularisierung des toten Knochens aus der vitalen Grenzschicht über den Umbau der Haversschen Systeme kommen. Die Knochenheilung kann dann erst verzögert einsetzen, wenn die vitale Grenzschicht die Fraktur erreicht. So ist es möglich, dass ein Knochenfragment, dessen Blutversorgung vollständig zerstört war, durch einsprossende Kapillaren von den vitalen Fragmenten versorgt wird (Stürmer, 1996).

Die Kenntnisse der biomechanischen Einflüsse und der interfragmentären Bewegung auf die Frakturheilung ist somit besonders wichtig für eine optimale chirurgische Versorgung einer Fraktur (Claes et al., 2000).

2.3.4 Tiermodell

Verschiedene Tierspezies, wie z. B. Mäuse, Ratten, Hunde, Schafe und Vögel, wurden als Modell für die Erforschung der Frakturheilung herangezogen. Die Auswahl des Versuchstiers sollte von der Zielsetzung des Forschungsprojektes abhängen. Es muss bedacht werden, dass die einzelnen Spezies unterschiedliche Frakturheilungsmuster oder einen zum Menschen sehr unterschiedlichen Knochenstoffwechsel aufweisen.

Auch die Größe und das Alter des Versuchstieres spielen eine wichtige Rolle. Für Studien der Frakturheilung sollten nur Tiere verwendet werden, die nicht mehr im Wachstum sind, also Tiere mit geschlossenen Wachstumsfugen, um Verfälschungen der Ergebnisse durch Veränderungen des Stoffwechsels während des Körper- und Knochenwachstums zu verhindern (Eitel et al., 1981 b; Lippuner et al., 1992; Nunamaker, 1998).

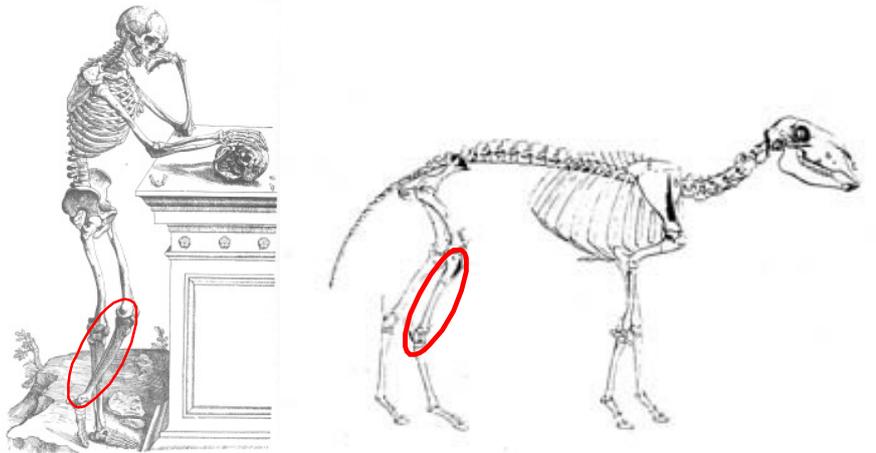


Abb. 2.3-2: Vergleich des humanen und ovinen Skelettaufbaus, die Tibia ist markiert. Quellen: linkes Bild aus Clemente (1987), rechtes Bild aus (Nickel et al., 1992)

Das Schaf hat sich im Bereich der Forschung über die Frakturheilung besonders als Tiermodell für die Testung von Platten- und Schraubenosteosynthesen oder dem Fixateur externe bewährt. Das liegt vor allem an der Größe eines Schafes, die es ermöglicht, für die humanmedizinische Behandlung entwickelte Fixationssysteme zu verwenden. Ein weiterer Vorteil des Versuchstiers Schaf ist seine natürliche Tendenz, die operierten Extremitäten sofort zu belasten (Nunamaker, 1998; Pastoureau et al., 1988; Shea et al., 2002). Allerdings unterscheidet sich die Gefäßversorgung des Schafsknochens von der des Menschen. Der Schafsknochen weist eine netzartige Verzweigung des Gefäßsystems mit vielen Anastomosen auf. Beim Mensch hingegen gibt es einen baumartigen Aufbau des Blutgefäßsystems im Knochen, der leicht zur Unterversorgung einzelner Areale führt, da an vielen Stellen Anastomosen fehlen (Eitel et al., 1981 b; Rhinelander, 1974). Weiterhin entspringt beim Schafsknochen die Gefäßversorgung aus periostalen Bereichen, wo hingegen der menschliche Röhrenknochen hauptsächlich über medulläre Gefäße versorgt wird. In diesem Punkt der Blutgefäßversorgung eines Knochens ist der Hund dem Menschen ähnlicher als das Schaf (Eitel et al., 1981 a). Das wichtigste Argument für die Auswahl des Schafes als Versuchstier für Untersuchungen der Frakturheilungsprozesse an der Tibia ist die mit dem Menschen vergleichbare Knochendimension und -form. Da bei einer ähnlichen Form auch auf eine ähnliche Funktion und Struktur geschlossen werden kann, zumindest im Bereich der Lastaufnahme, bietet die Schafstibia ein gutes Modell in Bezug auf den Unterschenkel des Menschen (1892, Gesetz zur Transformation des Knochens von Wolff, Julius, Berliner Anatom, 1836 – 1902) (zitiert nach Augat et al., 1996).

2.4 Serumparameter

Das Skelett befindet sich in einem dynamischen Zustand ständiger Umbauvorgänge, welche als Knochenremodelling bezeichnet werden. Hierbei wird, je nach Belastungszustand des jeweiligen Knochens, Knochensubstanz entweder durch osteoklastäre Resorption abgebaut oder durch

osteoblastären Anbau aufgebaut. Die osteoklastäre Resorption und/oder der osteoblastären Knochenaufbau können durch Serumparameter verfolgt werden. Solche Serumparameter können zum einen Enzyme sein, die bestimmte Stoffwechselforgänge im Knochen katalysieren, zum anderen sind es Spaltprodukte des Knochenstoffwechsels, die als zellulärer Abfall ins Blut abgegeben werden (Delmas, 1990; Liesegang, 2000). Grundsätzlich muss man zwischen Markern der Knochenresorption und Markern der Knochenneubildung unterscheiden (Allen, 2003; Charles et al., 1994).

Der ideale Serummarker für den Knochenaufbau sollte ein Strukturprotein sein, welches proportional zu seinem Einbau in den Knochen auch ins Blut abgegeben wird. Die Abgabe ins Blut sollte nicht durch andere Erkrankungen beeinflusst werden und die Funktion dieses Strukturproteins muss eindeutig charakterisiert sein. Während der Knochenresorption darf das Strukturprotein nicht unverändert freigesetzt werden und die metabolischen Abbauewege so wie die Serumhalbwertszeit für dieses als Marker ausgewählte Strukturprotein müssen bekannt sein (Eriksen et al., 1995). Der ideale Marker für die Knochenresorption ist ein Abbauprodukt des Knochengewebes, welches in keinem anderen Gewebe zu finden ist. Der Serumlevel dieses Abbauproduktes sollte nicht unter separater endokriner Kontrolle stehen und das Abbauprodukt darf nicht wieder beim Aufbau neuen Knochenmaterials genutzt werden (Eriksen et al., 1995). Die gleichzeitige Analyse mehrerer serologischer Marker, sowohl für den Knochenaufbau, als auch für den Knochenabbau, ergibt ein vollständigeres Bild der Stoffwechselforgänge im Zuge der Frakturheilung (Heinegard et al., 1989; Mansson et al., 1995).

Ein Teil dieser Serummarker werden schon heute bei der Diagnostik von metabolischen Knochenerkrankungen (z. B. Osteoporose, Rachitis, Hyperparathyreoidismus und Osteomalazie) erfolgreich genutzt und zeigen ein dynamisches Bild des Knochenstoffwechsels. Dieses ermöglicht eine genauere Therapieauswahl und eine bessere Therapiekontrolle bei diesen Erkrankungen (Bedossa et al., 1987; Charles et al., 1994; Nicodemo et al., 1999; Schmolke, 2001).

Im Bereich der Frakturheilung werden die serologischen Parameter noch nicht zum Monitoring der Heilungsprozesse eingesetzt. In der Forschung und auch in der klinischen Diagnostik der Frakturheilung gewinnt man Information über den Knochenumbau anhand der Röntgenverlaufskontrolle oder seltener mittels invasiver Methoden, wie zum Beispiel der Knochenbiopsie (Risteli et al., 1987; Southwood et al., 2003). Zu beachten ist hierbei, dass Röntgenstrahlen schädlich für den Patienten sind und deshalb nur begrenzt eingesetzt werden sollten, was die Verlaufskontrollen eingeschränkt. Außerdem kann mit Hilfe der Radiologie kaum eine Aussage über die Zusammensetzung des die Fraktur umgebenden Weichteilgewebes gemacht werden. Die anhand einer Knochenbiopsie getätigten histomorphometrischen Messungen geben keine dynamische Einsicht in den Knochenmetabolismus, sondern lassen lediglich eine zeitlich auf die Probenentnahme beschränkte Aussage zu (Allen, 2003; Liesegang, 2000). Auch kann nur ein lokal umschriebener Bereich untersucht werden, der nicht zwangsläufig mit der restlichen Knochenstruktur

Literaturübersicht

korreliert. Weiterhin ist die Biopsie eine kosten- und zeitintensive Untersuchung, die durch den operativen Eingriff zudem ein hohes Infektionsrisiko birgt (Allen, 2003; Liesegang, 2000).

Die Diagnostik der Frakturheilung könnte mit Hilfe von im Blut messbarer Parameter, die die Knochenheilungsprozesse widerspiegeln, verbessert werden (Allen, 2003; Delmas et al., 1997; Heinegard et al., 1989; Pastoureau et al., 1988).

Die Entwicklung von Messmethoden und die Suche nach solchen klinisch nutzbaren serologischen Parametern sind daher von großem Interesse. Diese würden die Möglichkeit bieten, über einen längeren Zeitraum den Metabolismus des Knochens bzw. der Frakturheilungsprozesse zu überwachen (Heinegard et al., 1989; Liesegang, 2000). Mit sensitiven und spezifischen Serummarkern wäre es möglich, die Rate der Knochenneubildung besser abzuschätzen oder eine verzögerte Frakturheilung frühzeitig zu erkennen, um therapeutisch gegen zu wirken (Hannon et al., 2004; Nakanishi et al., 1999; Southwood et al., 2003).

Für den Vorgang der Knochenresorption als auch für die Knochenneubildung existieren zur Zeit mehr oder weniger spezifische Marker im Serum oder im Harn, welche den Metabolismus des Skelettsystems widerspiegeln. Zumindest bei einer generalisierten Erkrankung des Knochengewebes sind diese Faktoren gut als diagnostisches Hilfsmittel einsetzbar (Delmas et al., 1997; Hannon et al., 2004).

Die Bestimmung der Hydroxyprolin Konzentration ist die am längsten bekannte Messung eines Serummarkers für den Knochenstoffwechsel. Die Exkretion von Hydroxyprolin findet über den Urin statt und wird auch in diesem gemessen. Hydroxyprolin ist ein unspezifischer Knochenmarker. Er kann auch in anderen nicht knochenassoziierten Kollagen-Strukturen oder in der Nahrung vorkommen und daher in den Harn gelangen (Liesegang, 2000; Nicodemo et al., 1999). Diese Nachteile der Hydroxyprolin-Konzentrationsmessung führten in den letzten Jahren dazu, nach weiteren Parametern zu suchen, die weniger variabel bzw. spezifischer für Knochengewebe sind. Deshalb wurden die im Blute vorkommenden Kollagenfragmente als Serummarker herangezogen. Zu den Hauptproblemen der Auswertung dieser Kollagenfragmente gehört, dass sie auch in anderen knochenassoziierten Geweben vorkommen können (Liesegang, 2000). Außerdem unterscheiden sie nicht zwischen kortikalem und spongiösem Knochen und spiegeln das Knochenremodelling im gesamten Skelett und nicht nur in der Frakturzone wider (Charles et al., 1994; Liesegang, 2000).

Die zeitweilig verwendete Exkretion von Kalzium im Urin hat sich ebenfalls als wenig aussagekräftiger Marker für das Monitoring von Frakturheilungsprozessen heraus kristallisiert, da in der so genannten „steady-state“-Phase der Frakturheilung eher die Absorption von Kalzium aus dem Darm ermittelt wird als die Knochenresorption (Eriksen et al., 1995; Eriksen et al., 1993). Die metabolischen Abbauprozesse eines Serummarkers in der Leber und/oder in der Niere beeinflussen die Aussagekraft des Serumparameters entscheidend, da durch diese Ausscheidungsprozesse

(Clearance) Fehlinterpretationen entstehen können (Liesegang, 2000; Young-Min et al., 2001). Besonders erschwerend für die Suche nach einem geeigneten Serumparameter für das Monitoring der Frakturheilungsprozesse ist, dass jedes Individuum einen unterschiedlich hohen Basiswert des jeweiligen serologischen Parameters hat (Taniguchi et al., 2003). Eine hohe inter-individuelle Variation der bekannten Serumparameter vermindert die klinische Nutzung, denn in der Regel stehen in der Klinik keine Werte für den Zeitpunkt vor der Fraktur zur Verfügung. Dadurch lassen sich die nach der Fraktur analysierten Werte nicht auf den individuellen Basiswert beziehen (Hannon et al., 2004).

Osteoblasten bilden Kollagene, Enzyme und einige nicht-kollagene Matrixproteine, die am Knochenaufbau und an der Mineralisation von Knochengewebe beteiligt sind. Beim Abbau von Kollagen werden im Zuge des osteoklastären Knochenabbaues mehrere Metaboliten ins Blut abgegeben und über den Harn ausgeschieden (Young-Min et al., 2001). Zudem werden auch vom Osteoklasten mehrere Enzyme produziert, die eventuell als Marker für die Knochenresorption dienen könnten (Eriksen et al. 1995; Eriksen et al. 1993). Im Folgenden wird auf die ausgewählten serologischen Marker für das Monitoring von Frakturheilungsprozesse näher eingegangen und ihre Funktion, Möglichkeiten der Analyse und die klinische Anwendung dargestellt.

2.4.1 Kollagenfragmente (PICP, PIIINP, CPII)

Die Knochenmatrix besteht zu 97 % aus Typ I Kollagen und nur zu 3 % aus den Kollagentypen III, V und IX. Alle Kollagene werden als Prokollagene von Fibroblasten intrazellulär synthetisiert und enthalten Peptid-Extensionen sowohl am C- als auch am N-terminalen Ende. Diese nicht helikalen Peptid-Extensionen werden beim Ausschleusen des Prokollagens aus der Zelle enzymatisch abgespalten und in das Blut abgegeben, aus dem sie analysiert werden können (Eriksen et al., 1995; Kurdy et al., 1998; Marks et al., 1988). Da Kollagene 90 % der Knochenmatrix ausmachen, wird allgemein davon ausgegangen, dass die Menge der Kollagenproduktion der Osteoblasten mit der Formation der Knochenmatrix korreliert (Eriksen et al.; 1993, Liesegang; 2000).

Die Synthese des Kollagen I findet in den Osteoblasten statt. Dabei entsteht als erstes das Prokollagen I, welches aus drei Polypeptidketten besteht. Diese Ketten sind durch Hydroxylierung des Prolins quervernetzt und bilden eine Tripelhelix. Das Prokollagen wird von den Osteoblasten in den extrazellulären Raum abgegeben. Dort werden die Kollagenfibrillen polymerisiert und die beiden Enden des Prokollagen (PICP = carboxy-terminal propeptide of type I collagen und PINP = N-terminals propeptide of type I collagen) abgetrennt, es bildet sich Tropokollagen. Diese Tropokollagenfibrillen werden durch Deoxyypyridinolin und Pyridinolin quervernetzt und haben eine feste Struktur, an die sich Calcium-Hydroxylapatit anlagert (Cruess et al., 1975; Klaushofer et al., 1994; Liesegang, 2000).

Literaturübersicht

Das vom Prokollagen abgetrennte PICP findet man im Blut, in Lymph- und Wundsekret (Kurdy et al., 1998). Die Konzentration von PICP steht in einem direkten Verhältnis zur Formation von Kollagen Typ I und ist somit ein Indikator für die Synthese von Kollagen Typ I. Da Osteoblasten bei der Knochenneubildung für die Synthese von Kollagen Typ I verantwortlich sind, ist PICP auch ein Indikator für die Osteoblastenaktivität (Kurdy et al., 1998). Das PICP wird in der Leber abgebaut, seine Serumhalbwertszeit beträgt (bei Ratten) sechs bis acht Minuten. Studien an Schweinen haben gezeigt, dass die Mengen von PICP, die von der Lymphdrainage der Haut ins Blut eingebracht wird, zu vernachlässigen sind (Eriksen et al., 1995; Eriksen et al., 1993). PICP ist bei durch Kallus induzierter Knochenheilung deutlich erhöht und spiegelt somit eine vermehrte Kollagen I-Synthese wieder (Lotz et al., 1999). In der von Kurdy und Mitarbeitern (1988) veröffentlichten Studie wird ein Abfall des PICP-Wertes acht Tage nach der Fraktur beschrieben, was auf einen kurzfristigen generalisierten oder zumindest lokalen Funktionsstop der Osteoblasten als eine Reaktion auf eine schwere Verletzung zurückgeführt wird. Der PICP-Wert steigt während der gesamten 20 Wochen des Versuches stetig an, was in Einklang mit den Arbeiten von Page et al. (1986) und Lane et al. (1998) steht, wohingegen andere Autoren, wie Joerring et al. (1992), ein Maximum des PICP-Wertes im Serum nach vierzehn Tagen nachwiesen (Kurdy et al., 1998). Hohe PICP-Werte wurden auch bei degenerativen Erkrankungen der Hüfte gefunden (Charles et al., 1994). Die chronischen Veränderungen und die damit verbundene reibende Beanspruchung des Knochens führen zu einer reaktiven Stimulation des lokalen Knochenmetabolismus'. Es wurden bei 25 % dieser Patienten präoperativ erhöhte PICP-Werte ermittelt (Lotz et al., 1999). Patienten mit weniger als 80 % der normalen Knochendichte zeigen deutlich erniedrigte PICP-Werte im Verhältnis zu Patienten mit normaler Knochendichte (Lotz et al., 1999). Der klinische Nutzen von PICP wird allerdings durch die starke individuelle Variabilität seines Serumspiegels und durch den Einfluss anderer Knochen-erkrankungen auf diesen Serumspiegel eingeschränkt. (Lotz et al., 1999).

Das frühe Auftreten von Kollagen Typ III im Frakturkallus reflektiert die initiale mesenchymale Proliferation. Bei der Synthese von Kollagen III aus Prokollagen werden nicht alle propeptid-Extensionen abgespalten. Das Prokollagen (PIIINP = amino-terminal propeptide of type III collagen) wird nur teilweise entfernt, und kleine Mengen bleiben an den Kollagenfibrillen zurück. Diese können später beim Fibrillenabbau im Serum nachgewiesen werden. Die Serumkonzentration von PIIINP reflektiert also die Synthese als auch den Abbau von Kollagen Typ III (Jensen, 1997; Kurdy et al., 1998).

Wird Kollagen Typ III im Verlaufe der weiteren Frakturheilungsprozesse nicht durch Kollagen Typ I ersetzt, so kommt es nicht zu einer ausreichenden Mineralisation des Frakturkallusgewebes, da Kollagen Typ III nur wenige Mineralsalze binden kann (Kurdy, 2000). Die festgestellten erhöhten PIIINP-Werte bei schlecht heilenden Frakturen waren in einer von Kurdy veröffentlichten Studie erst nach zehn Wochen zu erkennen. Zu diesem Zeitpunkt war aber das klinische Bild einer gestörten

Frakturheilung schon manifest (Kurdy, 2000). In einer Arbeit von Kurdy et al. (1998) bestätigte sich die von Lane et al. (1998) und von Page et al. (1986) im Tiermodell festgestellte wellenförmige Veränderung des PIIINP-Wertes im Serum, mit einem Abfall um den achten Tag, sowie einem Anstieg bis zur fünften Woche (Kurdy et al., 1998). Beim Menschen ist der PIIINP-Wert im Serum einige Zeit erhöht, was mit der deutlich langsameren Frakturheilung, verglichen mit dem Tier (Ratte), übereinstimmt (Multimaki et al., 1987). Weiter ist zu bedenken, dass PIIINP sowohl die Synthese als auch den Abbau von Kollagen III widerspiegelt. Man geht davon aus, dass das die frühe mesenchymale Proliferation repräsentiert (Jensen, 1997; Kurdy et al., 1998).

Kollagen Typ II ist der dominante Kollagentyp im Knorpelgewebe, welcher die fibrilläre Grundstruktur der extrazellulären Matrix bildet. Es besteht aus drei identischen Strängen, die eine Tripelhelix bilden (Poole, et al. 2001). Seine Synthese erfolgt in gleicher Weise wie von anderen Glykoproteinen in den Chondroblasten und -zyten. Das Prokollagen formt fibrillenartige Strukturen und spaltet beim initialen Verknüpfen der Tripelhelix Chondrocalcin (CP II = Carboxy-terminal propeptid of type II collagen) ab. Chondrocalcin ist ein ausschließlich bei der Bildung von Knorpelgewebe vorkommendes Kollagenfragment, das ins Blut abgegeben wird. Sein Serumspiegel ist also direkt proportional zur Bildung von Knorpelgewebe (Nelson et al., 1998; Robion et al., 2001). Chondrocalcin ist außerdem ein Kalzium bindendes Protein. Dies führt zu einer Doppelfunktion im Aufbau von Knorpelgewebe, sodass sofort nach Verknüpfung der Fibrillen die Kalzifizierung der Knorpelmatrix beginnt (Heinegard et al., 1989; Van der Rest et al., 1986).

Allgemein wird angenommen, dass sich Chondrocalcin an der Mineralisationsfläche ablagert und auf diese Weise im Kallus verbleibt, wenn die enchondrale Ossifikation beginnt (Alini et al., 1992; Poole et al., 1984 a, b). Bei „knockout“-Mäusen, bei denen das Gen für Chondrocalcin stillgelegt war, kam es aber nicht zu Veränderungen des Phänotyps, sondern nur zu einer Wachstumsverlangsamung (Komatsu et al., 2002). Im Knorpel sind die Kollagen Typ II-Moleküle kovalent durch Pyrimidine (crosslinks) netzartig verbunden (Garnero et al., 2000). Weitere im Knorpel vorkommende, an Kollagen II gebundene Proteine, wie zum Beispiel Fibromodulin und Decorin, findet man auch in anderen Bindegeweben (Heinegard et al., 1989; Saxne et al., 1992), weshalb sie als Marker für das Monitoring der Fraktuheilung nicht geeignet sind.

2.4.2 Enzyme (sALP, TRAP)

In Leber, Knochen und Niere wurden drei Isoenzyme gefunden, die die alkalische Phosphatase repräsentieren. In sehr kleinen Konzentrationen gibt es auch noch eine intestinale und eine plazentäre alkalische Phosphatase (Eriksen et al., 1995; Magnusson et al., 2002).

Mittlerweile kann man die alkalische Phosphatase und die skelettale alkalische Phosphatase (sALP) getrennt im Serum messen (Delmas et al., 1997; Eriksen et al., 1995). Das Verhältnis der beiden

Literaturübersicht

Enzyme zueinander beträgt in etwa eins zu eins (Magnusson et al., 2002). Mit Hilfe der Gel-Elektrophorese oder Radioimmunoassays kann die knochenspezifische alkalische Phosphatase von den anderen Isotypen isoliert werden (Allen et al., 1998; Magnusson et al., 2002). Ihre Aufgaben bestehen in der Abspaltung eines anorganischen Phosphatrestes von organischem Phosphat, der Erhöhung des Kalzium-Phosphat-Produktes und der Ermöglichung der Mineralisation (Morris et al., 1988; Volpin et al., 1986). Außerdem spaltet die sALP anorganisches Pyrophosphat, welches die Mineralisation verhindert (Eriksen et al., 1995). Die sALP wurde immunologisch an der Osteoblastenzellmembran nachgewiesen, was untermauert, dass dieses Enzym an der Mineralisation des Knochens maßgeblich beteiligt sind (Magnusson et al., 2002; Morris et al., 1988; Nicodemo et al., 1999; Schmolke, 2001).

Kommt es zu Mutationen im aktiven Zentrum des Enzyms, so führt dieses zu Osteomalazie. Daraus lässt sich schließen, dass die alkalische Phosphatase für die physiologische Mineralisierung des Knochens zuständig ist (Eriksen et al., 1995). Auch bei der seltenen Gorham Disease kommt es zum Knochenverlust und zu einem Anstieg der sALP (Dickson et al., 1987).

Die alkalische Phosphatase des Knochens macht zirka 50 % der im Serum vorhandenen alkalischen Phosphatase aus und hat beim Menschen eine Serumhalbwertszeit von 24 bis 48 Stunden. Ausgeschieden wird die alkalische Phosphatase hauptsächlich über die Leber (Eriksen et al., 1995; Schmolke, 2001). Bei Patienten mit Frakturen der langen Röhrenknochen kommt es in der achten bis zwölften Woche nach Fraktur zu einem Anstieg der knochenspezifischen alkalischen Phosphatase (Taniguchi et al., 2003). In der Studie von Kurdy und Mitarbeitern kam es am achten Tag nach der Fraktur zu einem Abfall der sALP (Kurdy, 2000). Ist die Frakturheilung verzögert, kommt es nur zu einem geringeren Anstieg des Serumspiegels der sALP oder dieser Anstieg bleibt sogar ganz aus. In der Studie von Emami und Mitarbeitern (1999) war der Unterschied im Serumspiegel der sALP bei normaler verglichen mit verzögerter Frakturheilung signifikant, wohingegen Nyman (Nyman et al., 1991) bei einer kleineren Patientengruppe keine signifikanten Unterschiede gefunden hat (Hauge et al., 1999). In einer Studie mit verzögerter Frakturheilung beim Kaninchen kam es zu einem Anstieg der sALP bei großem Kallusgewebe (Southwood et al., 2003). Bei Risikopatienten für Osteomalazie oder Spontanfrakturen ist es sinnvoll, die alkalische Phosphatase und das Parathormon (dient dem gesteigerten Knochenabbau und setzt Kalzium frei) zu bestimmen (Eriksen et al., 1995).

Die tartrate-resistant acid Phosphatase (TRAP 5) ist eines der im reifen Osteoklasten mengenmäßig am meisten vorhandenen Enzyme. Sie wird von den Osteoklasten in den Interzellularraum sezerniert (Nakanishi et al., 1998; Schmolke, 2001) und kann deshalb als Serummarker für die Osteoklastenzahl beziehungsweise für das Maß der Knochenresorption dienen (Halleen et al., 2001; Lau et al., 1987). Die isolierte TRAP ist ein Glycoprotein, die ein Molekulargewicht von 30 – 40 kDa aufweist. Die Struktur dieses Enzyms ist bei Säugetieren hoch konserviert (Igarashi et al., 2002). Die TRAP kommt in zwei Isoformen vor, die mit 5a und 5b bezeichnet werden. Charakteristisch für

Osteoklasten ist nur die Isoform 5b (Halleen et al., 2001; Halleen et al., 2000; Schmolke, 2001). Sie unterscheidet sich von der Isoform 5a durch die nicht angeknüpfte Sialinsäure und den unterschiedlichen optimalen pH-Wert für die Funktion des Enzyms. Die TRAP 5b arbeitet bei einem pH-Wert von 5,7 – 6,1 optimal (Hannon et al., 2004; Igarashi et al., 2002). Erhöhte Serumlevel der TRAP 5b sind bei metabolischen Erkrankungen mit einhergehender starker Knochenresorption, mit oder ohne Veränderungen der Knochenformation gefunden worden (Delmas et al., 1997; Halleen et al., 2001; Nakanishi et al., 1999). Das Enzym TRAP 5b ist während der Pubertät und dem damit verbundenen starken Wachstum erhöht (Hannon et al., 2004). TRAP wird nicht nur von Osteoklasten, sondern auch von Makrophagen, pathologischen Gaucher's Zellen und Zellen der Leukemia reticuloendotheliosis exprimiert. Durch die zudem aus Erythrozyten oder Thrombozyten bei der Blutentnahme oder Blutgerinnung freigesetzte TRAP kann es zu Fehlern bei der Interpretation der Messergebnisse kommen (Nakanishi et al., 1998; Schmolke, 2001). Dieser Fehler kann durch eine einstündige Inkubation der Blutprobe bei 37°C minimiert werden, da dabei die im Erythrozyten enthaltene TRAP deaktiviert wird (Lau et al., 1987). Vorteilhaft für die Analyse der TRAP ist, dass es keine Anreicherung durch eine eingeschränkte Nierenfunktion gibt (Hannon et al., 2004).

2.4.3 Nicht-kollagene Matrixkomponenten (Osteocalcin, COMP)

Osteocalcin, auch bone γ -carboxy glutamic acid containing protein oder „bone gla protein“ (BGP) genannt, ist das am häufigsten vorkommende nicht-kollagene Matrixprotein des Knochens (Pastoureau et al., 1988). Es stellt 1 – 2 % des gesamten Knochenproteins dar. Es besteht aus 49 Aminosäuren und hat eine starke Affinität zu Hydroxylapatit. Es ist ein sehr kleines Protein mit einem Molekulargewicht von 5,8 kDa (Heinegard et al., 1989; Johansen et al., 1987). Die Produktion von Osteocalcin wird hauptsächlich von Osteoblasten und Odontoblasten bestritten, das macht Osteocalcin zu dem spezifischsten Knochenmarker für die Osteoblastenaktivität (Marks et al., 1988).

Die physiologische Signifikanz, also der Nutzen von Osteocalcin für den Organismus und damit seine Wertigkeit, ist nicht genau bekannt. Die Struktur von Osteocalcin blieb aber während der Evolution von Knochengewebe weitestgehend konserviert. Die Funktion des Osteocalcins scheint mit der Knochenmineralisation zusammen zu hängen, es verhindert die Präzipitation von Hydroxylapatit und reguliert die Matrixmineralisation (Heinegard, et al. 1989). Außerdem zieht es Osteoklasten-Vorläuferzellen chemotaktisch an. Die Sekretion von Osteocalcin ist abhängig von Calcitriol (Vitamin K), welches die Transkriptionsrate des Osteocalcingenes erhöht (Chiappe et al., 1999; Eriksen et al., 1995; Marks et al., 1988). Kleine Mengen Osteocalcin werden beim Aufbau des Knochens ins Blut abgegeben und können deshalb im Serum nachgewiesen werden (Emami et al., 1999; Windhagen et al., 2002). Knochenresorption bewirkt keinen Anstieg des Osteocalcinspiegels im Serum. Osteocalcin wird über die Nieren abgebaut, seine Halbwertszeit ist mit 15 – 70 Minuten kurz (Johansen et al.,

Literaturübersicht

1987). Der Serumspiegel wird durch viele Faktoren wie zum Beispiel den Vitamin D-Status, den weiblichen Hormonzyklus und den Alkoholkonsum beeinflusst. Die Analyse der Serumwerte muss deshalb solche Faktoren berücksichtigen (Schmolke, 2001).

Das Cartilage Oligomeric Matrix Protein (COMP) ist ein in Knorpel, Bändern und Sehnen vorkommendes Protein, das hauptsächlich in der Knorpelmatrix lokalisiert wurde (Saxne et al., 1992). COMP konnte bei verschiedenen Spezies im Knorpel nachgewiesen werden, die größte Menge ist in reifem Gelenkknorpel vorhanden (Heinegard et al., 1989; Saxne et al., 1992). Es liegt in der extrazellulären Matrix und umgibt die Chondrozyten (Hedbom et al., 1992). Seine genaue Funktion ist weitestgehend unbekannt (Saxne et al., 1992). Man vermutet, dass COMP einen Einfluss auf die Synthese von Kollagen II hat und an der Verknüpfung der Kollagen Typ II-Fibrillen beteiligt ist (Hedbom et al., 1992; Misumi et al., 2002; Poole et al., 2001). Es ist schon in der frühen Knochen- und Gelenkentwicklung nachweisbar (Koelling et al., 2006). Die Mutation des COMP-Gens führt zu Pseudoachondroplasie (Misumi et al., 2002). Die chemische Zusammensetzung des COMP besteht hauptsächlich aus den Aminosäuren Asparaginsäure und Glutaminsäure (Hedbom et al., 1992). Das Fehlen von Hydroxyprolin in der Aminosäuresequenz bestätigt seine nicht kollagene Natur (Hedbom et al., 1992). Es enthält kleine Mengen Chondroitinsulfat, was eine Zuordnung zu den Proteoglykanen nahe legt (Saxne et al., 1992). COMP besteht aus fünf Untereinheiten zu je 100 kDa. Seine Struktur besteht aus einem flexiblen Mittelstück, um das sich fünf Arme zylindrisch anordnen (Morgelin et al., 1992; Skoumal et al., 2003). Diese Arme sind durch Disulfidbrücken verknüpft. COMP ist strukturell verwandt mit Thrombospondin, hat aber ein eigenes Ausgangsgen (Kuhne et al., 1998).

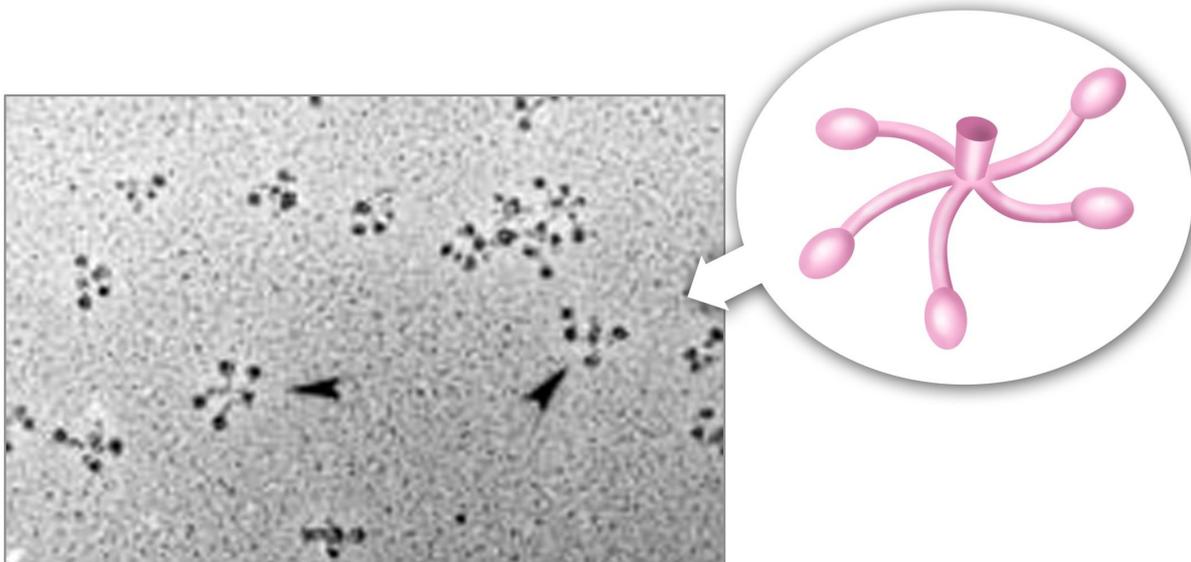


Abb. 2.4-1: Elektronenmikroskopische Aufnahme und skizzierte Darstellung: Cartilage Oligomeric Matrix Protein (COMP) (Morgelin et al., 1992).

Es konnte in mehreren Studien nachgewiesen werden, dass sich COMP sowohl in der Synovia als auch im Serum analysieren lässt. Allerdings können nur COMP-Fragmente nachgewiesen werden, was darauf schließen lässt, dass der Freisetzung aus dem Knorpel der Abbau des Proteins voraus gehen muss (Saxne et al., 1992). Eine Freisetzung in Synovia oder Serum erfolgte sowohl bei gesunden als auch bei gelenkerkrankten Probanden. Es gibt also auch ohne Erkrankung einen ständigen, wenn auch geringen Umbau von Knorpelgewebe (Mündermann et al., 2005; Saxne et al., 1992). Auch wenn die Freisetzung von COMP in Synovia oder Serum nicht spezifisch für eine bestimmte Gelenkerkrankung ist, so konnten doch Veränderungen des Serumspiegels von COMP im Vergleich zu gesunden Probanden ermittelt werden. Eine signifikante Korrelation bestand zwischen den COMP-Konzentrationen in Synovia und Serum von Probanden mit reaktiver Arthritis. Bei dieser Erkrankung handelt es sich um eine Monoarthritis, so dass COMP hierbei hauptsächlich aus einem Gelenk in die Blutbahn abgegeben wird (Saxne et al., 1992). Auch bei Reitpferden wurde eine Korrelation zwischen den COMP-Konzentrationen in Synovia und Serum gefunden (Skjoldebrand et al., 2001). Erhöhte Synovialwerte für COMP gibt es bei Osteoarthritis, „rapidly destructive rheumatoide arthritis“ und nach traumatischen Knorpelschäden (Mündermann et al., 2005; Skoumal et al., 2003). COMP ist vor allem am Anfang der Gelenkschädigung erhöht, was es zu einem frühen Indikator für Knorpelschäden macht (Skoumal et al., 2003). Diese Aussage konnte anhand von Studien an Marathonläufern bestätigt werden. Hier konnte nach dem Marathonlauf eine Erhöhung der COMP-Konzentration in der Synovia gemessen werden, die sich mit Werten aus verletzten Kniegelenken oder Kniegelenken mit Osteoarthritis vergleichen lassen (Skoumal et al., 2003). Auch eine Untersuchung von 30 traumatisch geschädigten Kniegelenken mit operativer Versorgung bestätigt den frühen Anstieg der COMP-Werte. Außerdem zeigte sich, dass diese Werte nur langsam abfallen und über Jahre auf erhöhtem Niveau bleiben (Kuhne et al., 1998). Mündermann und Mitarbeiter (2005) konnten zeigen, dass es schon nach dreißig Minuten normalen Gehens zu einer geringen Erhöhung der COMP-Werte kommt. Koelling und Mitarbeiter (2006) wiesen nach, dass COMP bei fortgeschrittener Osteoarthritis in der Umgebung des größten Defektes angereichert ist. Dieses lässt vermuten, dass COMP an der Regeneration der Knorpelmatrix beteiligt ist oder dessen weiteren Zerfall aufhalten soll (Koelling et al., 2006). Im Gegensatz dazu konnte keine Korrelation zwischen Entzündungsmarkern und den COMP-Werten ermittelt werden (Skoumal et al., 2003). Bei Entzündungen der Gelenke, die nicht mit einer starken Knorpeldegeneration einhergehen, wie z. B. bei Lupus erythematosus, Leucozytotoxic Vasculitis und anderen, konnte auch keine deutliche Erhöhung der COMP-Werte festgestellt werden (Skoumal et al., 2004). Eine Beziehung zwischen dem Alter der Probanden und den ermittelten COMP-Werten bestand auch bei Kindern nicht (Saxne et al., 1992). Die Ausscheidung von COMP aus dem Kreislauf ist noch nicht ausreichend erforscht und kann einen großen Einfluss auf die ermittelten Werte haben (Saxne et al., 1992).

2.4.4 Messmethoden der Serumparameter

Radioimmunoassay (RIA)

Rosalyn Sussman Yalow (1921) entwickelte während ihrer Arbeit mit radioaktiv markiertem Insulin den Radioimmunoassay (RIA). Der RIA beruht auf der Bindung von Antigen und Antikörper. Es ist eine radioimmunologische Methode zur quantitativen Bestimmung kleinster Substanzmengen (im ng-Bereich) zum Beispiel von Erreger-Antigenen, Hormonen, Enzymen, Serumweißkörper, Tumorantigenen, Arzneimittel und DNS.

Der RIA ist eine sog. Sättigungs-, Bindungs- oder Displacementanalyse mittels einer Antigen-Antikörper-Reaktion. Das zu bestimmende (nicht markierte) Antigen oder Hapten und eine definierte Menge von radioaktiv markiertem Antigen („Tracer“) oder Hapten werden mit ihrem spezifischen Antikörper zur Reaktion gebracht. Hierbei wird markiertes Antigen im Überschuss angeboten. Die Bindung der beiden Antigene an den Antikörper erfolgt in hoher Verdünnung kompetitiv nach dem Massenwirkungsgesetz. Der spezifische Antikörper wird in der Regel mittels Tierimmunisierung gewonnen. Nach angemessener Inkubationszeit (nach Herstellerangaben) wird eine Bestimmung der Strahlungsaktivität der aus der Lösung abgetrennten Antigen-Antikörper-Komplexe mit einer Gammakamera durchgeführt. Die Strahlungsaktivität ist dann ein Maß für die gesuchte Konzentration des Antigens. Aufgrund der Verdrängung von radioaktiv markiertem Antigen aus den spezifischen Bindungsstellen kann errechnet werden, wie groß die Konzentration des Antigens ist (Risteli et al., 1987; Roche Lexikon Medizin, 4. Auflage; Urban & Fischer Verlag, München, 1999; Psychrembel, 257. Auflage; Walter de Gruyter Verlag, New York, 1994)

Enzyme-linked immuno sorbent assay (ELISA)

ELISA-Tests sind ein inzwischen verbreitetes Verfahren, um einzelne Proteine nachweisen zu können. Dabei nutzt man, wie auch beim RIA, die Mechanismen des Immunsystems. Wird eine Substanz vom Immunsystem als fremd erkannt, bildet es „Antikörper“, die an das fremde Molekül andocken und es so markieren. Diese sogenannte Antikörper-Antigen-Reaktion wird für den ELISA-Test genutzt. Soll ein bestimmtes Protein nachgewiesen werden, müssen die dazu passenden Antikörper bekannt sein und zuvor mit verschiedenen gentechnischen oder zellbiologischen Verfahren hergestellt worden sein. Es gibt verschiedene Möglichkeiten der Testdurchführung des ELISAs, kompetitive, Sandwich- oder indirekte Methode.

1.) Kompetitive Methode:

Der Antikörper wird auf einem Träger (Cellulose, Polystyrol) gebunden. Die nicht mit Antikörper bedeckte Trägeroberfläche wird zum Beispiel mit Rinderserum-Albumin geblockt, um eine unspezifische Bindung des Antigens an der Oberfläche zu vermeiden. Nun wird die unbekannte

Menge des zu bestimmenden Antigens und eine bekannte Menge Antigen, an dem ein Enzym zum Nachweis gebunden ist, hinzugegeben. Als Kontrolle wird in einem weiteren Versuch nur das markierte Antigen verwendet bzw. man hat an den Träger keinen Antikörper gebunden. Man erhält so den 0 und 100 % Wert und kann die Menge des Antigens bestimmen. Verwendung monoklonaler Antikörper im Tandem-Zweischritt-Format ermöglicht eine direkte Quantitative Bestimmung. Die Bindung des Enzyms an das Antigen muss für jedes zu bestimmende Antigen aufs Neue durchgeführt werden, daher wird die kompetitive Methode nur in Spezialfällen eingesetzt.

2.) Sandwich-Methode:

Wie auch bei der kompetitiven Methode des ELISA wird der spezifische Antikörper an einer festen Trägersubstanz des Reaktionsgefäßes adsorbiert. Dann wird mit der unbekannt Menge Antigen inkubiert und danach nicht gebundenes Antigen durch Waschen entfernt. In einem zweiten Reaktionsschritt wird nun ein Antikörper gegen das Antigen hinzugegeben, der mit einem Enzym markiert ist. Dieser markierte Antikörper bindet nun an die Antigene, die bereits von dem an der Trägersubstanz adsorbierten Antikörper gebunden sind, es bilden sich Immunkomplexe. Durch einen weiteren Waschschrift werden die ungebundenen Antikörper entfernt und zum Schluss das Substrat für das Enzym zum Nachweis des gebundenen Antikörpers hinzugesetzt. Durch Zugabe eines chromogenen Substrates zum Reaktionsansatz können die Immunkomplex-gebundenen Enzym-Substrat-Komplexe sichtbar gemacht werden. Es ist auch möglich, die Antigenkonzentration in der Probe über eine photometrische Bestimmung des chromogenen Substrates zu ermitteln. Man braucht dazu einen Vergleich mit Standards bekannter Enzymaktivität. Die Sandwich-Methode des ELISA wird zum Beispiel angewendet, um in Blutproben Krankheitserreger oder Hormone nachzuweisen. Ein bekanntes Beispiel für die Anwendung dieser Methode ist der Schwangerschafts-Teststreifen. In der Molekularbiologie wird der Sandwich-ELISA als einfacher Test für ein zu isolierendes Protein verwendet.

3.) Indirekte Methode:

Die indirekte Methode des ELISA dient zur Bestimmung des Antikörper-Titers gegen ein vorgegebenes homologes Antigen. Hier wird nicht der Antikörper, sondern das homologe Antigen an die Festphase/Träger gebunden. Die Probe mit dem zu bestimmenden Antikörper-Titer wird nun hinzugegeben und die nicht gebundenen Teile durch Waschen entfernt. Anschließend wird ein unspezifischer Antikörper (zum Beispiel ein aus Schafen oder Ratten isolierter Antikörper gegen menschliche Proteine) hinzugegeben. In einem nachfolgenden Schritt werden zugefügte Enzym-markierte Anti-Antikörper zugegeben, die sich an die Immunkomplexe anlagern. Dieser zweite Antikörper reagiert nun mit den gebundenen Antikörpern aus der Probe. Nicht gebundene Antikörper werden durch Waschen entfernt und das Substrat hinzugesetzt. Der indirekte ELISA wird eingesetzt,

Literaturübersicht

um Viruserkrankungen (Aids, Hepatitis, Röteln, etc.), bakterielle oder Pilzinfektionen bzw. Parasitenbefall nachzuweisen.

Jeder Antikörper reagiert nicht nur mit seinem spezifischen Antigen sondern auch unspezifisch mit anderen Proteinen, auch die Enzymreaktion ist nicht 100 % spezifisch, so kann eine Umsetzung des Substrates zum Beispiel auch durch einen Bestandteil der Probe erfolgen. Daher ist jedem immunologisch positiven Befund zunächst einmal Skepsis entgegenzubringen. Da der ELISA jedoch gut automatisiert werden kann, eignet er sich gut für Routineuntersuchungen.

Der ELISA und der Radioimmunoassay sind sehr empfindliche Messmethoden für zahlreiche Substanzen im Blut, in Körperflüssigkeiten und in biologischen Proben und werden heute standardmäßig in biochemischen und medizinischen Labors eingesetzt (Engvall et al., 1971).

2.4.5 Einflussfaktoren auf die Serumparameter

- Alter

Alle Serummarker, die den Metabolismus von Knochengewebe belegen, zeigen im juvenilen Individuum hohe Level und nehmen nach der Pubertät signifikant ab (Allen et al., 1998; Chiappe et al., 1999; Price et al., 2001; Schmolke, 2001). Danach bleiben die Werte während der ersten Lebenshälfte auf diesem niedrigen Level. Erst mit höherem Alter nehmen die Serumwerte für Osteocalcin, skelettale Alkalische Phosphatase und Urin- Pyridinolin sowie die Exkretion von Hydroxyprolin langsam zu (Price et al., 2001; Schmolke, 2001). Eine Beziehung zwischen dem Alter der Probanden und den ermittelten COMP-Werten bestand bei Kindern nicht (Saxne et al., 1992).

- Geschlecht

Grundsätzlich gibt es eine eindeutige Erhöhung verschiedener Knochenmarker in der Menopause der Frau (Eriksen et al., 1995). Bis zur Menopause gibt es keinen Hinweis auf geschlechtsspezifische Unterschiede bei der Analyse von Knochenmarkern (Allen et al., 1998; Lepage et al., 1998). Die sALP steigt mit zunehmendem Alter unabhängig vom Geschlecht des Individuums an. Der Anstieg ist bei Männern ausgeprägter als bei Frauen. Erst nach der Menopause zeigt sich auch bei Frauen ein deutlicher Anstieg dieses Enzyms (Schmolke, 2001). Bei Pferden gab es jedoch keine geschlechtsspezifischen Unterschiede bei Osteocalcin (Lepage et al., 1998).

- Training

Bei Pferden konnte gezeigt werden, dass durch Training die Osteocalcinwerte ansteigen, was mit einer erhöhten Knochendichte einhergeht (Price, et al. 2001). Auch beim Menschen führt körperliche Aktivität zu einem Anstieg des Osteocalcins (Schmolke, 2001). Für COMP konnte gezeigt werden, dass schon dreißig Minuten normales Gehen zu einer Erhöhung der Werte führen (Mündermann et

al., 2005). Auch nach einem Marathonlauf kommt es zu erhöhten COMP Werten (Skoumal et al., 2003). Bei PICP, sALP und PIIINP verursachte Training keine Veränderung der Serumparameter (Price et al., 2001).

- Metabolismus

Osteocalcin wird ausschließlich über die Niere abgebaut, also muss eine Niereninsuffizienz Einfluss auf die zu ermittelnden Werte haben. Die ALP wird hingegen nur über die Leber abgebaut (Schmolke, 2001). PICP wird auch über die Leber abgebaut, hier besteht kaum Kumulationsgefahr, denn es bedarf einer hochgradigen Einschränkung der Leberfunktion, um die Serumwerte kumulativ zu verändern (Charles et al., 1992).

Bei den Knochenmarkern gibt es deutliche tageszeitliche Schwankungen, meistens hohe Werte in den frühen Morgenstunden und bei Nacht (Ladlow et al., 2002; Liesegang et al., 1999; Schmolke, 2001). Das Enzym sALP zeigt dahingegen einen Anstieg am Nachmittag (Ladlow et al., 2002). Bei PICP gibt es keine tageszeitlichen Schwankungen (Schmolke, 2001). Bei der Auswertung von Serumparametern sollte auf einen festgelegten Entnahmezeitpunkt der Blutproben geachtet werden (Liesegang et al., 1999).

Die Serumwerte der aufgelisteten Parameter werden auch durch den veränderten Metabolismus bei verschiedenen systemischen Krankheiten beeinflusst, zum Beispiel bei Hyperparathyreoidismus, Hyperthyreose, Osteomalazie oder Osteodystrophie (Delmas, 1990).

3 Material und Methode

3.1 *Tiere und Tierhaltung*

Die Untersuchung wurde an 40 weiblichen Merino-Mix Schafen im Alter von zwei Jahren (Zahnalterbestimmung) und an acht weiblichen Lämmern von ca. fünf Monaten durchgeführt. Das durchschnittliche Körpergewicht der erwachsenen Tiere betrug 75 kg. Die Tiere waren klinisch gesund und nicht trächtig. Die adulten Schafe wurden alle in der tierexperimentellen Einrichtung der Charité, Campus Virchow-Klinikum gehalten. Es stand ein Raum mit einer abgetrennten Box (12 m²) zur Verfügung, worin maximal acht Tiere gleichzeitig gehalten wurden (1,5 m² pro Tier). Der Stall wurde mit Spänen und Stroh eingestreut, alle zwei Tage ausgemistet und mit Wasser gereinigt. Im Raum herrschte eine Temperatur von 18 – 21 C° und die Luftfeuchtigkeit betrug 60 – 65 %. Tageslicht diente als hauptsächliche Lichtquelle. Die Lämmer wurden nicht aufgestallt, sondern einmalig zur Blutentnahme aus der Herde entnommen. Dem Tierversuchprojekt wurde durch das Landesamt für Arbeitsschutz, Gesundheitsschutz und technische Sicherheit zugestimmt, die Tierversuchsgenehmigungsnummer lautet G 0224/01.

Ernährung

Alle Tiere wurden morgens und abends mit einem halben Ballen Heu und zusätzlich zweimal wöchentlich mit geringen Mengen (500 g) pelletierten Kraftfutters gefüttert. Die Wasserzufuhr erfolgte ad libitum durch eine Selbsttränke, die täglich auf ihre einwandfreie Funktion kontrolliert wurde.

3.2 *Gruppeneinteilung der Tiere*

Die 40 adulten Schafe wurden in fünf Gruppen mit je acht Tieren unterteilt. Die Versuchsdauer für die Schafe in einer Gruppe betrug zwei, drei, sechs oder neun Wochen. Eine Gruppe von acht Tieren wurde für neun Wochen als Referenzgruppe ohne chirurgischen Eingriff zur Kontrolle der Serumparameter in den Versuch mit einbezogen.

Weiterhin wurde einmalig bei acht klinisch gesunden fünf Monate alten Lämmern Blut für die Analyse der Serumparameter entnommen.

	Anzahl	Schaf Nummer							
Standzeit nach OP 2 Wochen	8	60	67	71	74	76	85	86	90
Standzeit nach OP 3 Wochen	8	8	10	18	19	29	30	31	42
Standzeit nach OP 6 Wochen	8	9	21	23	24	25	26	27	28
Standzeit nach OP 9 Wochen	8	2	3	6	12	13	16	17	61
Kontrollgruppe 9 Wochen	8	81	82	88	89	90	91	95	96
Lämmer 5 Monate alt	8	1	2	3	4	5	6	7	8

Tab. 3.2-1: Auflistung der Gruppeneinteilung, gegliedert in Standzeit nach der Operation (OP), Kontrollgruppe und Lämmer

3.3 Fixateur externe

Der Fixateur externe wird vor allem zur Therapie der offenen Frakturen mit großem Weichteiltrauma von Röhrenknochen eingesetzt (McDonald et al., 1994). Eine bedrohte Gefäßversorgung des Knochens, sei es durch Trauma oder Infektion, stellt klinisch die wichtigste Indikation für die Montage eines Fixateur externe dar (Stürmer, 1984). Durch die geringe Intervention im Frakturgebiet kann die Blutversorgung der Fraktarenden und die Muskelmanschette weitestgehend geschont werden (Aro et al., 1993; Chao et al., 1989). Der Fixateur externe besteht aus mehreren Schanzschrauben (Pins), die punktuell in die Frakturfragmente eingebracht werden. Die eigentliche Versteifung der Fraktur erfolgt über ein außen am Körper angebrachtes Gestell aus zwei Metallstäben, die mittels Klemmböcken an den Schanzschrauben verankert sind (Abb. 3.3-1).

Der ideale Fixateur externe sollte leichtgewichtig, preiswert, einfach anzubringen, anpassbar und funktional bei Belastung sein. Zudem muss er die tägliche Wundpflege ermöglichen (Sladicka et al., 1998).

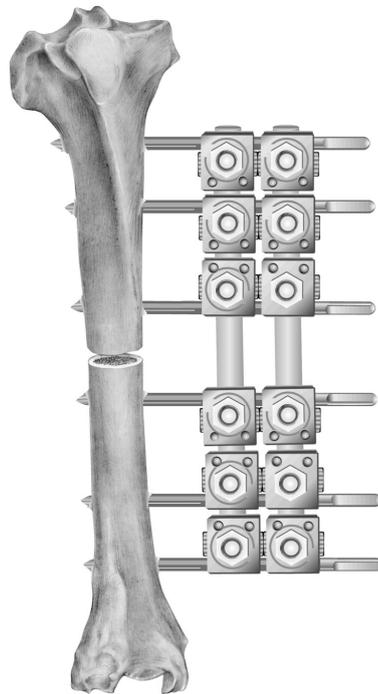


Abb. 3.3-1: Monolateraler Fixateur externe mit sechs Schanzschrauben, Klemmbacken und zwei Metallstäben zur Stabilisierung der osteotomierten Tibia

Der Fixateur externe hat einen besonderen Vorteil gegenüber allen anderen Fixationssystemen für die Frakturstabilisierung: mit ihm ist es möglich, im Verlauf der Frakturheilung den Steifigkeitsgrad des Fixateurs zu variieren (Claes et al., 2000; Aro et al., 1993), denn die optimale Frakturversorgung sollte sich in ihrer Steifigkeit über die Zeit ändern (Augat et al., 1996). Am Anfang fördert eine relativ hohe Steifigkeit die Qualität des Kallusgewebes. Nach ein paar Wochen sollte aber eine geringgradige Mobilisation des Frakturgebietes erfolgen, um eine schnelle stabile Durchbauung zu erreichen.

Die Versorgung mit einem Fixateur externe führt selten zu einer vollständigen Versteifung der Fraktur. Abhängig von der Montageform, der Bruchform, der Bruchlokalisierung, der Knochenfestigkeit und den einwirkenden Kräften (Lagerung, Entlastung) treten Kippbewegungen im Frakturspalt auf. Diese Mikrobewegungen fördern die Kallusbildung im Bereich der Fraktur (Stürmer, 1984, 1988; Wolf et al., 1998). In der vierten bis fünften Woche nach einem Knochenbruch wird unter Mikrobewegungen ein stabiler Kallus sichtbar, welcher dann in lamelläres Knochengewebe umgebaut wird. Dies ermöglicht ein frühes Entfernen der Schanzschrauben, die den Fixateur verankern (Augat et al., 1996; Stürmer, 1984).

Wird ein sehr steifer Fixateur extern ausgewählt und damit eine primäre Knochenheilung erzielt, stellt sich das Problem, den Zeitpunkt für die Entfernung der Implantate festzulegen. Bei der Plattenosteosynthese hat sich gezeigt, dass die Entfernung der implantierten Metallplatte beim Menschen erst nach ungefähr einem Jahr ohne Gefahr des Frakturrezidivs möglich ist (Stürmer, 1984). Diese lange Verweildauer des Implantates ist beim Fixateur externe nicht möglich, da das Lockern der den Fixateur externe verankernden Schanzschrauben und die Gefahr einer Infektion entlang der Schraubenkanäle ein großes Problem darstellt (Moroni et al., 2002). In der Humanmedizin muß deshalb der Fixateur externe nach kurzer Zeit durch andere Osteosynthesysteme ersetzt werden, wie z. B. durch einen Marknagel.

3.4 Operation

Operationseinleitung

Alle Operationen fanden in den Operationssälen der tierexperimentellen Abteilung der Charité, Campus Virchow-Klinikum statt. Nach ca. zwölfstündigem Futterentzug wurde den Schafen im Stall ein Venenverweilkatheter in die Vena cephalica antebrachii gelegt und dieser am Bein mit Klebeband fixiert. Über diesen Zugang wurden nach Blutentnahme 0,5 –1,0 g pro 50 kg KM Trapanal (Wirkstoff Thiopental-Natrium, Fa. Lomborg, Chemische Fabrik GmbH, Konstanz) bis zur völligen Entspannung des Schafes infundiert. Unter Kontrolle der Reflexe und der Atmung wurde das Tier in rechter Seitenlage auf den Operationstisch verbracht und in den Raum zur Operationsvorbereitung gefahren. Bei Bedarf wurde auf dem Weg und zur Intubation Trapanal im Bolus nachgegeben. Die Intubation des Schafes erfolgte mit einem Tubus der Größe neun. Nach der Intubation wurde das Schaf mit Sauerstoff, Isofluran und Lachgas narkotisiert. Eine Nasenschlundsonde wurde oral eingeführt und möglichst bis in die Gasblase des Pansens vorgeschoben, um eine Pansentympanie zu vermeiden. Das Einbringen der Schanzschrauben erforderte eine stabile Lagerung des rechten Hinterbeins auf dem Operationstisch, der als Gegendruck zum Bohrvorgang fungierte. Die linke Hinterextremität wurde nach vorne ausgebunden, um ein übersichtliches Operationsfeld zu erhalten. Es wurden alle vier Klauen mit Krankenunterlagen abgedeckt. Das mediale rechte Hinterbein wurde geschoren und mit Enthaarungscreme enthaart. Zudem wurde in EKG angeschlossen.

Material und Methode

Operationsablauf

Das Tier wurde in den Operationssaal verbracht und dort weiterhin mit Sauerstoff, Isofluran und Lachgas narkotisiert. Ein Kapnograph und das Gerät zur Sauerstoffpartialdruckmessung wurden angeschlossen. Die Beatmungsfrequenz betrug zwölf Atemzüge pro Minute, das Atemzugvolumen 500 – 800 ml (10 – 15 ml pro kg KM), perioperativ erhielten die Tiere 2,2 mg Augmentan i.v. (Wirkstoff Amoxicillin und Clavulanat, Fa. Smith Kline Beecham Pharma GmbH, München). Intraoperativ wurden ca. 500 ml isotone Kochsalzlösung und zur zusätzlichen Analgesie Fentanyl-Janssen (Wirkstoff Fentanyl-dihydrogencitrat, Janssen GmbH, Neuss) über einen Perfusor mit der Geschwindigkeit 10 ml pro Stunde (ca. 5 – 10 ml pro OP) infundiert. Das Tier wurde steril abgedeckt und die mediale Seite des rechten Hinterbeines mit Polividon-Jod-Alkohol (Braunoderm, Braun-Medical, Deutschland) desinfiziert. An die mediale Kontur der Tibia des rechten Hinterbeins wurde eine für den Fixateur erstellte Bohrschablone angelegt, ausgehend vom Malleolus medialis. Diese Bohrschablone ist eine 5 mm dicke, 164 mm lange und 20 mm breite, mit acht Bohrlöchern versehene Metallplatte. Durch die Bohrlöcher der Schablone wurden kleine Hautinzisionen vorgenommen. Die korrekte Lage der Bohrschablone wurde überprüft und eventuell korrigiert, so dass die Schrauben bikortikal eingebracht werden konnten. Mit einem 3,5 mm Bohrer und dazugehöriger Bohrhülse wurde senkrecht zur Tibia bis zur gegenseitigen Kortikalis vorgebohrt. Dabei wurde mit steriler Kochsalzlösung gespült. Die erste Bohrung erfolgte an Loch vier, gezählt von proximal nach distal, auf Höhe der schmalsten Stelle der Tibia. Je nach Tiefe des Bohrlochs wurde eine Schwanzschraube (Pin) mit 28 mm oder 32 mm Gewindelänge und 5 mm Durchmesser mit einem Handbohrfutter eingedreht. Um das Eindrehen von Weichgewebe zu verhindern, wurde ein Gewebeschutz verwendet.

Die Bohrung und das Einbringen der Schrauben erfolgt an den restlichen fünf Pinlöchern nach dem oben beschriebene Prinzip, wobei auf eine parallele Ausrichtung der Pins zueinander geachtet wurde. Der Gewebeschutz und die Bohrschablone wurden anschließend entfernt.

Der verwendete Fixateur externe bestand aus zwölf Klemmbacken und zwei Stahlrohren (Abb. 3.3-1). Die Klemmbacken wurden auf die Pins aufgesetzt und mit einem Schraubenschlüssel festgezogen. Es wurde möglichst viel Abstand zwischen Fixateurstangen und Knochen belassen, um genug Platz für den Sägevorgang zu haben. Eine Schablone wurde an Pin drei und vier angelegt, um die genaue Schnittebene für die Osteotomie festzulegen, und es erfolgte die Hautinzision. Das Weichteilgewebe wurde an dieser Stelle vom Knochen gelöst und zwei Homannhebel zum Schutz des Weichteilgewebes eingesetzt. Die Tibia wurde mit einer oszillierenden Säge (Schnittdicke 1 mm) durchtrennt, wobei mit steriler isotoner Kochsalzlösung gespült wurde. Die Muttern der Klemmbacken von den drei distalen Pins wurden an den Stangen gelöst. Der Frakturspalt wurde mit Hilfe eines Meißels aufgehebelt und mittels Abstandshalter auf 3 mm eingestellt. Die Muttern der Klemmbacken wurden wieder festgezogen und die Mutter der Klemmbacken an den proximalen Pins gelöst. Der Abstandshalter wurde an die Pins angelegt und die Stangen bis auf einen Abstand von 15 mm an den

Knochen herangeschoben. Die Muttern wurden wieder angezogen. Der Abstandshalter wurde entfernt und die Hautinzisionen um die Pins mit Einzelheften und die Hautinzision über dem Osteotomiespalt mit einer fortlaufenden Naht (Nahtmaterial: Prolene 3/0) nach Kürschner verschlossen. Es wurde ein steriler Verband angelegt und die rechte Tibia konventionell (70 kV, 2,5 mA) als auch digital (73 kV, 25 mA) in postero-anteriorer Ebene geröntgt. Das Tier wurde noch bis zum Einsetzen der Spontanatmung im Operationssaal belassen und dann in den Stall transportiert. Hier wurden die Schafe ca. 15 Minuten von einem Mitarbeiter in liegender Position gehalten, um ein schreckhaftes Aufstehen und damit verbundene Verletzungen zu vermeiden.

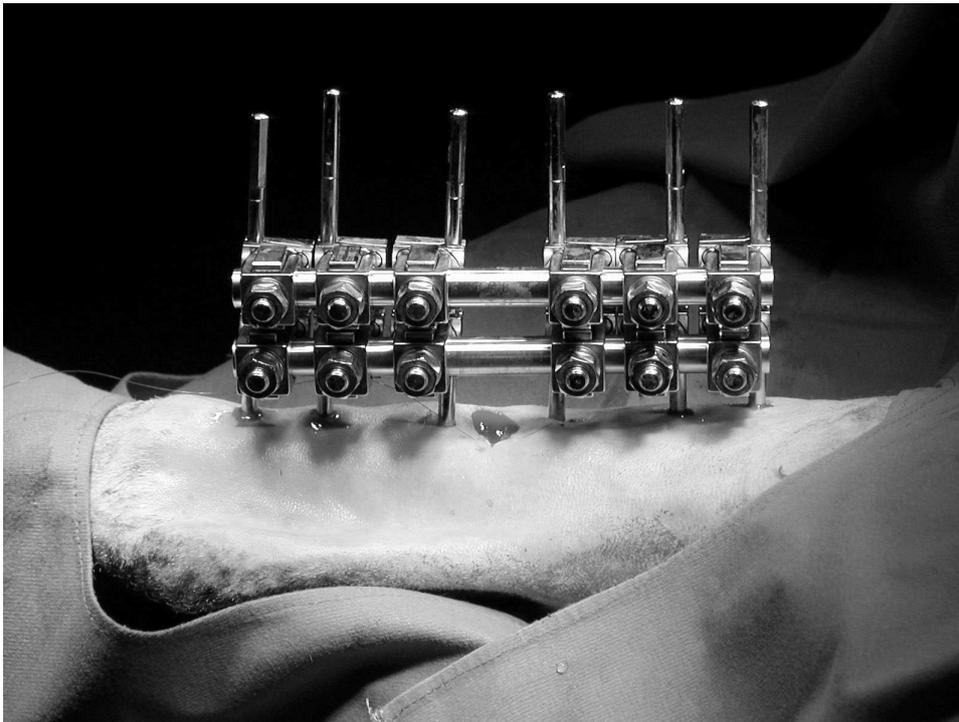


Abb. 3.4-1: Monolateraler Fixateur externe an der Schafstibia.

Material und Methode

3.5 Postoperative Nachversorgung

Postoperative Analgesie

Die Tiere erhielten zur postoperativen Analgesie täglich 1,1 ml/50 kg Flunixin-Meglumin (Finadyne®RP, Essex Tierarznei, München, Deutschland) subkutan injiziert für sieben Tage.

3.5.1 Pinpflege

Die Pineintrittstellen in die Haut wurden täglich mit Rivanol® (Chinosolfabrik, Seelze, Deutschland) gespült und mit sterilen Kompressen abgetupft. Fibrinkrusten wurden mit einer sterilen Pinzette entfernt. Von einem Schlauchverband wurde ein 120 cm langes Stück abgeschnitten und doppelt gelegt. Das Bein wurde an der Klaue gehalten und der Schlauchverband von unten über Tibia und Fixateur geschoben, beide Enden wurden mit medizinischem Pflaster befestigt. Bei starker Schwellung und Verdacht auf eine Pininfektion wurde eine mit Rivanol getränkte Komresse um den Pinansatz gelegt und das Tier präventiv mit Antibiotika versorgt.

3.5.2 Röntgen

Der Heilungsverlauf der Osteotomie der Tibia wurde anhand von Röntgenaufnahmen dokumentiert. Diese wurden wöchentlich sowie direkt nach der Euthanasie der Tiere in postero-anteriorer Ebene durchgeführt.

3.6 Blutentnahme und -verarbeitung

Die erste Blutentnahme erfolgte bei 32 Tieren präoperativ. Bei den Tieren mit einer Versuchsdauer von neun Wochen wurde drei Tage postoperativ zum zweiten Mal Blut entnommen, dann wurde Blut im wöchentlichen Rhythmus gewonnen.

Einer Gruppe von acht gesunden, nicht operierten Tieren (Kontrollgruppe) wurde ebenfalls wöchentlich Blut entnommen. Diese Werte dienten als Kontrolle der Serumparameteranalysen der operierten Tiere. Weiterhin wurde bei acht Lämmern einmalig Blut entnommen.

Die Blutentnahme erfolgte an der Vena cephalica mit Kathetern der Größe 18 G. Der Katheter wurde nach manuellem Ablegen und Fixation des Tieres im Liegen in die Vene vorgeschoben. Vor Punktion der Vene wurde die Haut mit Polividon-Iod-Alkohol (Braunoderm, Braun, Melsungen) desinfiziert. Es wurden jeweils drei Monovetten (5,5 ml) für die Serumgewinnung, drei Monovetten (5,5 ml), mit Lithiumheparin beschichtet, zur Plasmagewinnung und eine Monovette (2,7 ml), mit EDTA beschichtet, für die Blutbilddiagnostik verwendet. Die sechs großen Monovetten wurden nach der Füllung mit Blut bei 4°C und 3000 U/min 10 Minuten lang in der Zentrifuge (Varifuge RF, Heraeus, Hanau) zentrifugiert. Das Serum wurde in sechs blaue Reaktionsgefäße (1,5 ml), und das Plasma in sechs weiße Reaktionsgefäße (1,5 ml) pipettiert. Ein kleiner Rest des Plasmas wurde für die Bestimmung von Calcium, Phosphor, Magnesium, Haptoglobin und alkalischer Phosphatase im

Zentrallabor der Charité verwendet. In dem präoperativ entnommenen Blut wurde zusätzlich Kreatinin, Harnstoff, Glutamate Dehydrogenase (GLDH), Aspartate Transaminase (AST), auch als Serum Glutamat Oxalacetat Transaminase (SGOT) bezeichnet, Natrium und Kalium zur allgemeinen Gesundheitskontrolle bestimmt. Das zur Gerinnungshemmung mit Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) versehene Blut wurde für die Blutbilddiagnostik im Zentrallabor benötigt. Um Serum- und Plasmaproben zu identifizieren, wurden die Reaktionsgefäße mit der Ohrmarkennummer des Schafes, dem Datum des Entnahmetages und der Wochenzahl nach Operation gekennzeichnet, wobei die präoperative Entnahme mit null Wochen gekennzeichnet wurde. Die Reaktionsgefäße wurde in Kryoboxen mit Rastereinsätzen verbracht, auf die ebenfalls die Ohrmarkennummer des jeweiligen Schafes geschrieben wurde. Die Lagerung der Proben erfolgte bei - 80 °C in einem Gefrierschrank des Charité-Virchow Klinikums.

3.7 Entnahme der Knochenpräparate

Nach jeweils zwei, drei, sechs oder neun Wochen wurden alle Tiere einer Versuchsgruppe mit je 2,5 g Trapanal (Wirkstoff Thiopental-Natrium, Fa. Lomborg, Chemische Fabrik GmbH, Konstanz) und 100 ml Kaliumchlorid 14,9 % (Fa. B. Braun AG, Melsungen) über einen Venenkatheter euthanasiert. Der Herzstillstand wurde auskultatorisch festgestellt. Die Tiere wurden dann in den Sektionsraum des Forschungshauses verbracht.

Sektion

Das rechte Hinterbein wurde im Kniegelenk sowie im Tarsalgelenk exartikuliert und die Tibia von Haut und großen Muskelbäuchen befreit. Die Tibia wurde dann in posterioanteriorer Ebene geröntgt. Der Fixateur externe wurde an seinen Klemmbacken mit einem Maulschlüssel gelöst und entfernt. Die Schrauben wurden mit dem Handbohrfutter entfernt und die Tibia ohne Fixateur nochmals in zwei Ebenen geröntgt. Bei der Standzeit von zwei Wochen war der Frakturspalt nicht ausreichend stabil, um die Tibia ohne Stütze zu sägen, so dass der Fixateur während des folgenden Sägevorganges am Unterschenkel verblieb. Die Tibia wurde zur besseren Stabilisierung und zur Desinfektion zwei bis drei Stunden mit 10 % Formalinlösung fixiert.

Sägen

Die Tibia wurde mit einer Bandsäge (Makrotrennschleifsystem, Firma Exakt, Norderstedt) der Stärke 1 mm in vier 3 mm dicke Scheiben gesägt. Dazu musste die Tibia gut in der Sägevorrichtung fixiert werden, um exakte Scheibendicken zu erhalten. Die Schnittlinie wurde während des Sägevorganges mit Wasser gekühlt, um eine Schädigung des Gewebes durch Überhitzen zu vermeiden. Es wurde erst ein Transversalschnitt durch Pinkanal 3 (proximal) durchgeführt und dann der distale Tibiateil in

Material und Methode

Längsrichtung in die Sägevorrichtung eingespannt. Es wurden fünf Schnitte in der Tibialängsachse in einem Abstand von 3 mm gesägt. Hierbei wurde vom mittleren Schnitt ausgehend die eingespannte Tibia nach jedem Sägevorgang um 3 mm nach links beziehungsweise rechts verschoben. Es wurde bis an den Pinkanal 4 herangesägt. Dabei war zu beachten, dass der Markraum mittig getroffen wurde. Der letzte Schnitt erfolgte transversal durch den Pinkanal 4.

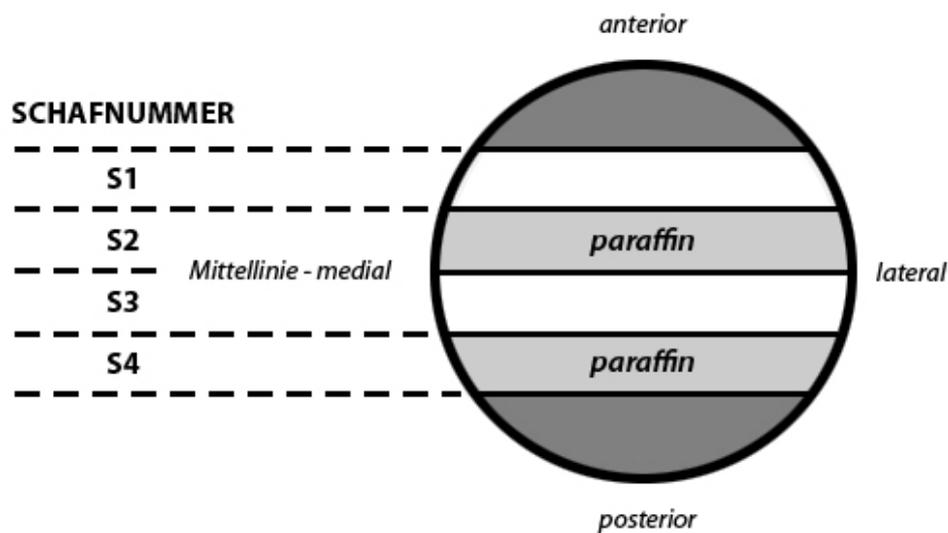


Abb. 3.7-1: Sägeschema zur Probenentnahme aus der rechten Tibia.

Die Randabschnitte wurden verworfen und die entstandenen 3 mm dicken Scheiben proximomedial mit einem Bleistiftpunkt in der Kortikalis markiert, um später eine räumliche Zuordnung des histologischen Präparates zu ermöglichen. Weiterhin bekam jede Scheibe von der Mitte ausgehend eine Nummerierung (Abb. 3.7-1). Nach dem die Scheiben zugeordnet waren, wurde Scheibe 2 und 4 in eine 10 %ige Fixierlösung aus gepuffertem Formaldehyd gegeben und in dieser für 24 – 48 Stunden belassen.

3.8 Aufarbeitung der Proben

Die Proben wurden aus der Fixierlösung entnommen, 10 Minuten lang gewässert und dann über einen Zeitraum von acht bis zwölf Wochen in einer 5%igen EDTA-Lösung im Inkubationsschrank bei 37°C entkalkt. Die EDTA-Lösung wurde zweimal wöchentlich gewechselt, wobei die Knochenscheiben mit einer Nadel auf ihre Festigkeit bzw. ihre Mineralisation überprüft wurden. Nach der Entkalkung

erfolgte eine Entwässerungsreihe mit 70 % bis 100 % Alkohol und Xylol, als Intermedium, um wasserfreie Präparate zu erhalten. Die Knochenscheiben wurden mit Hilfe der Einbettungsmaschine (Leica EG1120, Fa. Leica, München) in 61 °C warmes Paraffin eingebettet. Dazu wurden Ausgießrähmchen aus Metall zum Zusammenstecken verwendet. Von den eingebetteten Proben wurden dann mit dem Mikrotom (Leica RM 2125, Leica Instruments GmbH, Nußloch) 4 µm dünne Schnitte angefertigt, wobei die Paraffinblöcke zur Aushärtung für ein besseres Schnittergebnis auf Eis gelagert wurden. Der Paraffinblock wurde in das Rotationsmikrotom eingespannt und bei 5 Grad Messerneigung bis zur gewünschten Schnittebene heruntergeschnitten, wobei der Paraffinüberstand verworfen wurde. Die in der gewünschten Schnittebene liegenden Paraffinschnitte wurden vom Mikrotommesser abgenommen und direkt in einem kalten Wasserbad mit Hilfe eines Pinsels ausgestrichen. Danach wurden sie in ein 47°C warmes Wasserbad verbracht, um das Paraffin zu strecken. Die geglätteten Schnitte wurden dann auf Objektträger aufgezogen und im Wärmeschrank bei 37°C getrocknet.

Material und Methode

3.8.1 HE-Färbung

Alle Präparate wurden zur Gesamtübersicht mit Hämatoxylin und Eosin (HE) gefärbt.

Färbanleitung:

Schnitte in Xylol entparaffinieren und in einer absteigenden Alkoholreihe rehydrieren

Hämatoxylin nach Harris (Kernfärbung)

7 Minuten

Spülen in Aqua dest.

3x

HCL-Alkohol (0,25%)

kurz (5 bis 15 sec.)

Wässern mit Leitungswasser

10 Minuten

Eosin

3 - 4x eintauchen

Entwässern in einer aufsteigenden Alkoholreihe und Xylol, eindeckeln

In den HE-gefärbten Präparaten stellen sich Kerne und grampositive Bakterien blau dar, alles übrigen Strukturen sind in abgestuften Rottönen zu sehen. Die Übersichtsfärbung dient der Orientierung im Schnitt und gibt erste Hinweise auf die Gewebszusammensetzung.

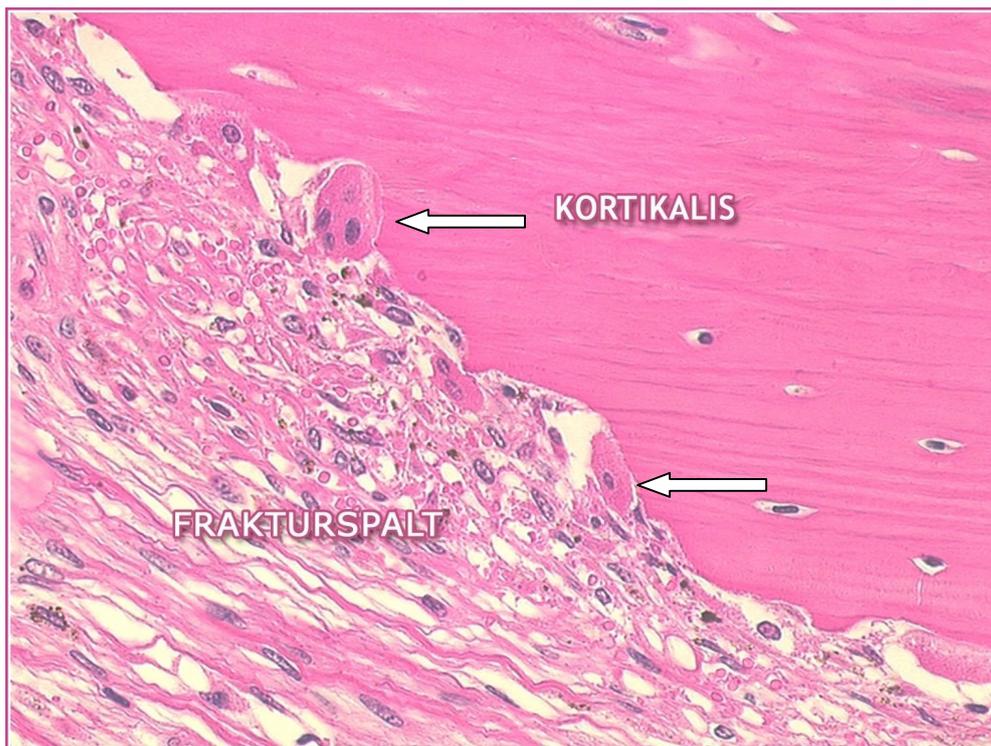


Abb. 3.8-1: Ausschnitt aus einem mit HE gefärbten Präparat einer Tibia drei Wochen nach der Osteotomie. Entlang der Kortikalisgrenze sind Lakunen (Pfeil) mit Osteoklasten entstanden. Der Osteotomiespalt ist von kapillarisiertem kollagenfaserigem Bindegewebe ausgefüllt (Vergr.: 55x).

3.8.2 Immunhistologie

Färbung der Kollagene I, II und III:

Färbearbeitung:

Die Schnitte wurden beschriftet, entparaffiniert und rehydriert. Sie wurden dann in einer phosphat-gepufferten Salzlösung (Phosphate Buffered Solution = PBS) gespült und das Präparat wurde mit einem Fettstift umrandet, um später ein Ablaufen der flüssigen Nachweisreagentien und damit das Austrocknen des Präparates zu vermeiden. Es wurde eine Hyaluronidase-Sigma-Lösung (8 mg/50 ml PBS, pH 6,7) aufgetragen, wobei 500 µl pro Objektträger verwendet wurden. Die so beschichteten Objektträger wurden für vier Stunden bei 37°C inkubiert und anschließend mit PBS-Puffer gespült.

Für die Kollagen II Färbung wurden die Präparate nach Anleitung des Herstellers mit 1 % Pepsin-Lösung beschichtet und 30 min lang präinkubiert, danach in Leitungswasser und Puffer zehn Minuten gespült.

Alle Präparate wurden im nächsten Arbeitsgang für 20 min bei Raumtemperatur mit Normalserum beschichtet (Ziegenserum, Vector Laboratories, Burlingame, California/USA), um ein unspezifisches Binden des Primärantikörpers im Gewebe zu vermeiden. Es wurde nun ohne Zwischenspülen der Primärantikörper aufgetragen und bei 37°C eine Stunde lang inkubiert. Die Primärantikörper (Anti-Collagen Typ I, II, III, Antigene aus dem Rind, BioLogo, Kronshagen) wurden vorher je nach Angabe des Herstellers mit Dako-Antibody-Diluent (Dako Cytomation, Carpinteria, California/USA) verdünnt.

Kollagen I : im Verhältnis 1:700

Kollagen II : im Verhältnis 1:100

Kollagen III : im Verhältnis 1:700

Nach der Inkubation mit dem Primärantikörper wurde das Präparat mit Puffer gespült und dann der biotinylierte Sekundärantikörper (Vector Laboratories, Burlingame, California/USA) aufgetragen und für 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurde der histologische Schnitt mit Puffer gespült.

Die ABC-Reaktionslösung (Vector Laboratories, Burlingame, California/USA) zum Nachweis des gebundenen biotinylierten Sekundärantikörpers wurde aufgebracht und für 50 Minuten bei Raumtemperatur auf dem Präparat belassen. Dieses Nachweisreagenz muß 30 Minuten vor dem Auftragen angemischt werden. Nach 50 Minuten erfolgte erst ein Spülen mit PBS-Puffer und dann eine Inkubation mit dem Chromogenpuffer, wobei letzterer auf die Objektträger pipettiert wurde und dort 10 Minuten verblieb.

Das Alkalische-Phosphatase-Substrat (Vector Laboratories, Burlingame, California/USA) wurde frisch angesetzt und nach Abgießen des Chromogenpuffers auf die Objektträger geschichtet. Hierbei wurde

Material und Methode

in kurzen Intervallen unter dem Mikroskop der Färbeporgang begutachtet. Die optimale Intensität der Färbung war erreicht, wenn die für den Kollagentyp spezifischen Zellen rot gefärbt waren. Dabei war wichtig, dass der Färbeporgang mit Hilfe von PBS-Puffer rechtzeitig abgestoppt wurde, bevor es zu einer unspezifischen Anfärbung des Gewebes im Hintergrund kam. Es folgte eine Kern-Gegenfärbung mit der Färbelösung nach Meyer und danach die Entwässerung in einer aufsteigenden Alkoholreihe und Xylol. Das Eindeckeln der Objektträger wurde mit Vitroclud (Einschlussmittel für mikroskopische Technik, R. Langenbrink, Emmendingen) durchgeführt. Die Objektträger wurden anschließend luftgetrocknet (Abb. 3.8.2-1-3). Bei den Färbungen wurde zur Positivkontrolle gemäß den Herstellerangaben Gewebe vom Rind und zur Negativkontrolle Gewebe von der Ratte mitbearbeitet, um das Färberegebnis zu verifizieren.



Abb. 3.8-2: Immunhistologischer Nachweis von Kollagen I in einer ostetomierten Tibia neun Wochen nach der Osteotomie. Es zeigt sich eine diffuse Verteilung des Kollagen I im ganzen Schnitt.



Abb. 3.8-3: Immunhistologischer Nachweis von Kollagen II spezifisch für Knorpelgewebe in der ostetomierten Tibia zum Zeitpunkt drei Wochen nach der Osteotomie. Der Knorpel ist deutlich angefärbt. Die angefärbten Areale befinden sich im Bereich des Frakturspalts.

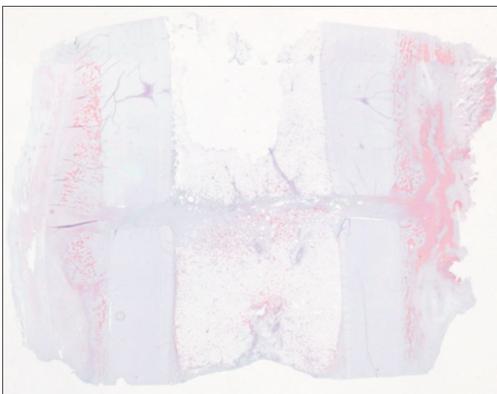


Abb. 3.8-4: Immunhistologischer Nachweis von Kollagen III im retikulären Bindegewebe des Kallus zwei Wochen nach der Osteotomie der Tibbia. Im Kallus ist das Kollagen III zwischen den Knochenbälkchen verteilt.

Material und Methode

3.8.3 Histochemie

Darstellung der Osteoklasten anhand ihrer sauren Phosphatase

Färbearbeitung:

Zur Vorbereitung wurden die Objektträger in ein Färbekörbchen/Schiffchen einsortiert, entparaffiniert und rehydriert. Die Schnitten wurden danach kurz mit Aqua destillata (A. d.) und dann zehn Minuten in 0,1 M Natriumacetat-Puffer (pH-Wert 5,6) gespült. In der Zwischenzeit wurde die Reaktionslösung zum Nachweis der sauren Phosphatase hergestellt.

Reaktionslösung:

250 ml 0,1 M Natriumacetat-Puffer (pH 5,6)

2500 µl Hexonium-Pararosanilin hergestellt aus:

(4 mg Pararosalin auf 100 µl 2N HCL)

1250 µl 2 N HCl + 0,05 g Pararosanilin

(4 mg Natriumnitrit auf 100 µl A.d.)

1250 µl A.d. + 0,05 g Natriumnitrit

gut mischen und 5 Minuten reagieren lassen

125 mg Naphthol-As-Tri-Phosphat gelöst in 2,5 ml Triton X 100

alle Komponenten mischen und eine Stunde bei 37°C inkubieren

Nach der Inkubation wurden die Schnitte gründlich mit Aqua dest. gespült und in 4 %iger Formalinlösung für 2 – 3 h bei RT nachfixiert. Es folgte ein Spülen mit Leitungswasser und dann eine Gegenfärbung mit Färbelösung nach Meyers. Die Präparate wurden in der aufsteigenden Alkohohlreihe und mit Xylol entwässert und mit Vitroclud (Einschlussmittel für mikroskopische Technik, R. Langenbrink, Emmendingen) eingedeckelt.

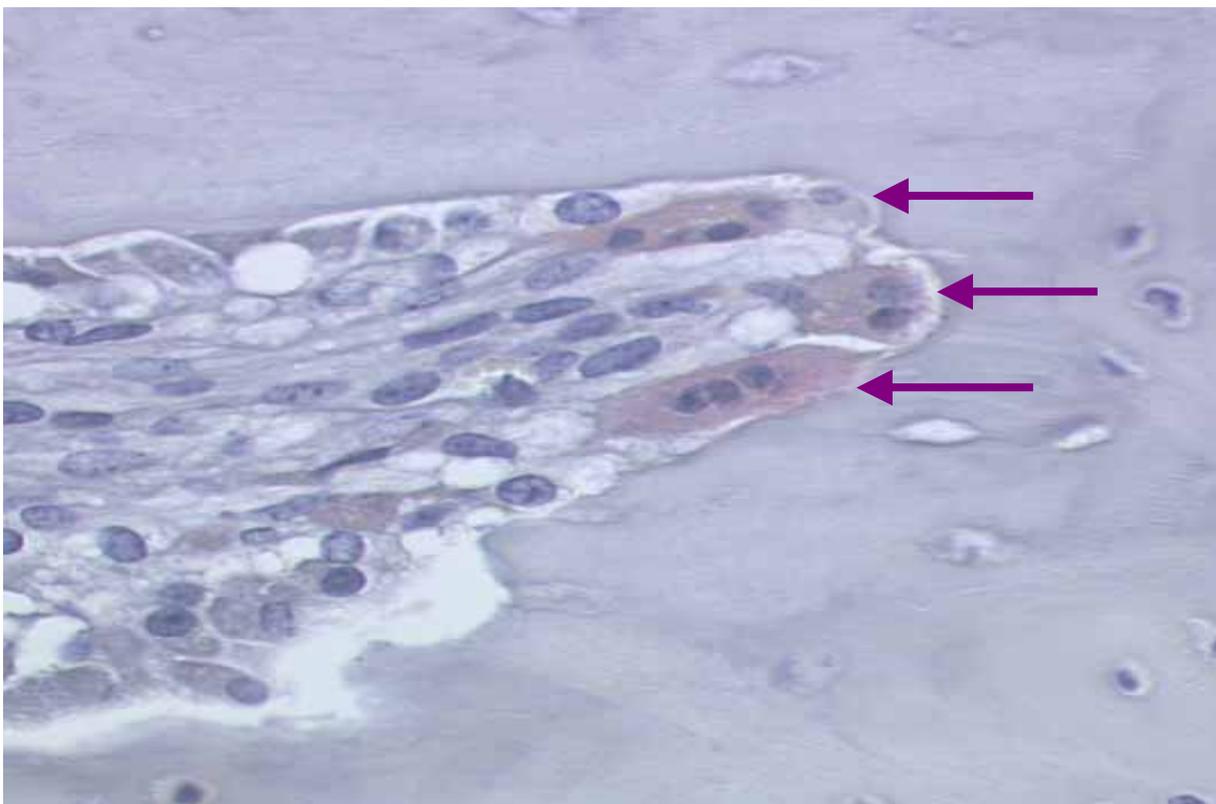


Abb. 3.8-5: Osteoklasten identifiziert durch den Nachweis des Enzyms Saure Phosphatase (rot): Es ist deutlich zu erkennen, wie sich die mehrkernigen Zellen an den Saum des Knochens anlegen und eine Resorptionszone erzeugen (Pfeile) (Verg.: 110x).

3.9 Messung der Serumparameter

Die Messung der Schafserumparameter erfolgte mittels ELISA oder RIA. Es wurden die Serumspiegel von folgenden Markern bestimmt: PICP, PIIINP, CII, sALP, TRAP, Osteocalcin und COMP. Die Durchführung der ELISA/RIA erfolgte nach der jeweiligen Testanleitung des Herstellers. Das Probenserum wurde im Reagenzglas mit dem Antikörper und dem radioaktiv markierten Antigen zusammengeführt. Nach Inkubation und Waschung konnte beim ELISA eine Farbreaktion sichtbar gemacht werden, die mit einem Photometer gemessen wurde. Beim RIA wurde mit Hilfe einer Gammakamera die Strahlung des Präzipitates in jedem Röhrchen gemessen.

Es wurde für jeden Wert eine Doppelbestimmung vorgenommen und eine Eichkurve erstellt. Um Schwankungen der Testergebnisse, die Testmaterial abhängig sind, zu vermeiden, wurden alle Blutproben eines Tieres zu einem bestimmten Zeitpunkt gleichzeitig gemessen. Kam es zu Schwankungen der Essays von mehr als 15 % zwischen zwei Messungen, wurde die Probe ein drittes Mal gemessen.

Material und Methode

Die Serumanalyse erfolgte zum Teil in der Radiologie, Charité Virchow Klinikum, in Zusammenarbeit mit Herrn Michel oder in nachfolgend aufgelisteten Instituten. Die Angaben über die Herstellerfirmen der verwendeten ELISA-Kits sind ebenfalls in nachstehender Tabelle (Tab. 3.9-1) zusammengefasst.

Parameter	Assay	Hersteller
PICP	RIA	Orion Diagnostica Espoo, Finnland
PIIINP	RIA	Orion Diagnostica Espoo, Finnland
CP II	ELISA (kompetitiv)	Ibex Diagnostics Montreal, Kanada
sALP	RIA	Beckman Coulter GmbH Krefeld, Germany
TRAP	ELISA	Sba-sciences Turku,Finland
Osteocalcin	RIA	DiaSorin Stillwater, MN, USA
COMP	ELISA (kompetitiv)	AnaMar Medical AB Lund, Sweden

Tab. 3.9-1: Auflistung des Serumparameters, der Testart und des Herstellers bzw. des bearbeitenden Instituts.

3.10 Messung des Kollagenanteils im Kallus

Die Auswertung der Kollagenfärbungen erfolgt zum einen deskriptiv und zum anderen über eine quantitative Methode in der Bildanalyse.

3.10.1 Deskriptive Histologie

Die deskriptive Histologie erfolgte anhand eines selbst entwickelten Auswertungskataloges. Es wurden alle drei Kollagenfärbungen und die HE-Färbung anhand dieses Kataloges untersucht.

Auswertungskatalog mit folgenden Kriterien:

Zusammensetzung des Kallusgewebes

- hauptsächlich Bindegewebe
- Bindegewebe, Knorpel und Knochen
- überwiegend Knochen

Kollagenverteilung in Bezug auf den Frakturspalt

- in Höhe des Frakturspaltes
- außerhalb des Frakturspaltes

Spezifische Lage des Kollagens

- endostal
- periostal medial; periostal lateral
- interkortikal

Knöcherner Überbrückung des Frakturspaltes

- keine vorhanden
- diskontinuierliche
- kontinuierliche
- interkortikal vollständige Trabekel: transversal oder longitudinal

Dichte des kortikalen Knochengewebes in der Nähe zum Osteotomiespalt

- Kortikale Dichte unverändert
- Kortikale Dichte moderat reduziert
- Kortikale Dichte stark reduziert und Kortikalis schlecht abgrenzbar

3.10.2 Computergestützte Bildanalyse

Für die Auswertung der immunhistologisch gefärbten Kollagenflächen mittels der computergestützten Bildanalyse wurden die Schnitte mit einer Digitalkamera fotografiert. Um später eine Kalibrierung zu ermöglichen, wurde bei allen Aufnahmen ein Lineal mit fotografiert. Bei allen Aufnahmen wurde das Präparat so positioniert, dass der mediale Kallus auf der rechten Seite des Bildes zu sehen war.

Nach dem Übertragen der Daten in den Computer erfolgte die Bearbeitung mit dem Computerprogramm (KS400, Zeiss, Oberkochen; mittels Makro den Messzwecken angepasst). Das

Material und Methode

digitale Bild wurde zuerst mit Hilfe des Lineals kalibriert, wobei drei Millimeter auf dem Lineal als Maßstab dienten.

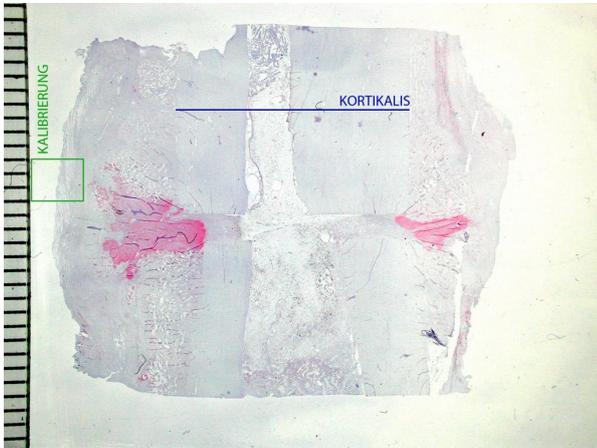


Abb. 3.10-1: Sagittalschnitt durch die Schaftstibia; Kalibrierung des digitalen Bildes mittels Maßstab (grün) und Messung der Kortikalisbreite (blau).

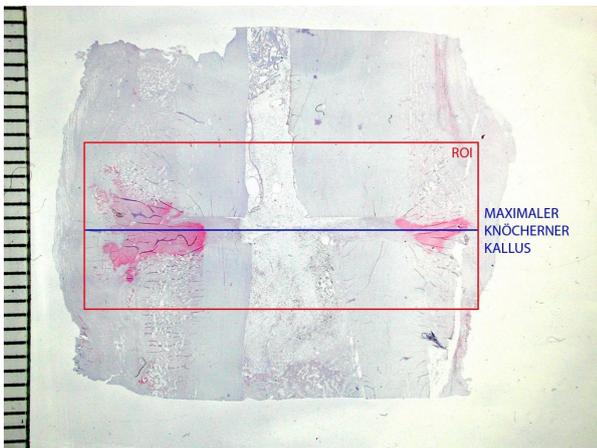


Abb. 3.10-2: Region of Interest (ROI), 12 mm hoch mit je 6 mm beidseits der Mitte des Osteotomiespaltes (blaue Linie

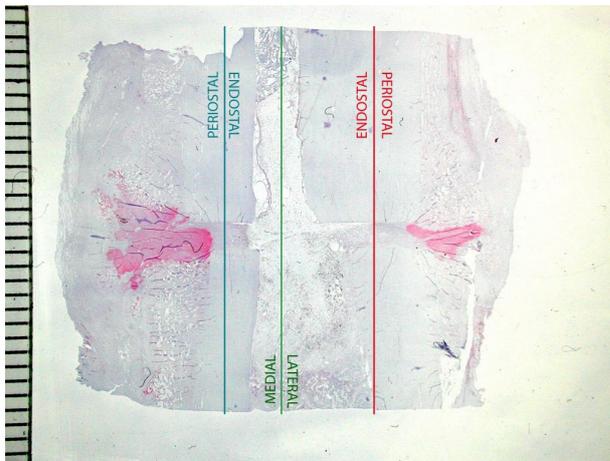


Abb. 3.10-3: Einteilung des Sagittalschnittes einer Schafstibia in verschiedene Bereiche entsprechend der lokalen Struktur mit Hilfe von senkrechten Linien: periostal, endostal (rot und blau) und lateral, medial (grün). Die Mitte der Kortikalis definiert die Grenze zwischen periostal und endostal. Die Mitte des Markraumes unterteilt lateral und medial.

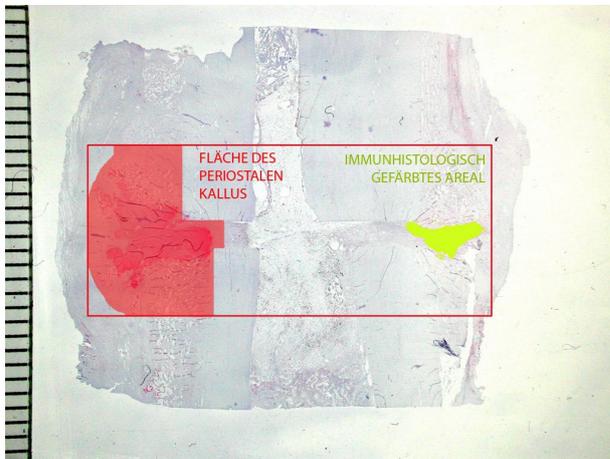


Abb. 3.10-4: Gesamtfläche der ROI (roter Kasten) und Beispiele für Teilflächen (rot bzw. gelb) definiert durch den lokalen Gewebetyp innerhalb der ROI

Danach wurde die Breite des Kallus und der Kortikalis eingezeichnet, wobei zwischen gesamter Kallusbreite und knöcherner Kallusbreite unterschieden wurde, hierbei wurde auch gleichzeitig die Mitte des Frakturspaltes festgelegt.

Das Computerprogramm zur quantitativen Analyse definierte eine vorgegebene, sechs Millimeter proximal und distal von der Mitte des Frakturspaltes (gesamt zwölf Millimeter Höhe) und der gesamten Kallusbreite ausgehende ROI. Als nächstes wurden die Grenzen zwischen periostalem und endostalem Kallus festgesetzt, indem die Mitte der Kortikalis gesucht wurde, sowie die Markraummitte definiert. Die Grenzen der Kortikalis, des periostalen und des endostalen Kallus' wurden umfahren und die Flächen farblich markiert. Zuletzt wurde die vom Programm vorgegebene Markierung der immungefärbten Areale manuell überprüft und je nach Ergebnis intensiviert oder reduziert. Teilweise mussten manuell auch Flächen hinzugefügt oder entfernt werden, da zum Beispiel Falten im Präparat mit markiert wurden, da sie intensiv rot erschienen und somit vom Computer fälschlicherweise als positives Signal gewertet wurden.

Material und Methode

Parameterdefinition

Die mit Hilfe der computergestützten Bildanalyse erhobenen Parameter sind im Folgenden aufgeführt. Die englischen Begriffe sind aus dem Computerprogramm zur Bildanalyse (Makro) übernommen und werden hier erläutert. Die Parameterdefinitionen sind der Arbeit von Parfitt (1988) entnommen.

Region of Interest (ROI): Auswertungsfläche [mm²] – ergibt sich aus der festgelegten ROI-Höhe von 12 mm multipliziert mit dem Gesamtkallusdurchmesser. Der Osteotomiespalt liegt vertikal zentral in der ROI.

Gap-ROI (kleinere direkt im Osteotomiespalt liegende Region of Interest): Auswertungsfläche [mm²] – ergibt sich aus der festgelegten ROI-Höhe von 3 mm multipliziert mit dem Gesamtkallusdurchmesser. Der Osteotomiespalt liegt vertikal zentral in der ROI. Die Gap-ROI soll speziell das Geschehen im Frakturspalt widerspiegeln, der während der Operation auf drei Millimeter Höhe distrahiert und fixiert wurde.

Total Kollagen Area: Gesamtkollagenfläche [mm²] – Gesamtfläche, die innerhalb der ROI immunhistologisch positiv für Kollagen I angefärbt war. Für die Auswertung wurden nur die Bereiche des periostalen und endostalen Frakturkallus innerhalb der ROI berücksichtigt, diese wurden zu einer Gesamtkallusfläche zusammengefasst. Die Gesamtkollagenfläche wurde sowohl für die ROI, als auch für die Gap-ROI getrennt berechnet.

3.11 Auswertung der Osteoklasten

Die Zählung der Osteoklasten erfolgte manuell unter dem Mikroskop. Die Region von Interesse (ROI) wurde, wie auch bei der Kollagenauswertung, mit zwölf Millimeter Höhe bezogen auf die gesamte Breite des Schnittes in Höhe des Frakturspalts festgelegt. Jeder Schnitt wurde mit einem zehnfach vergrößernden Objektiv an dem gleichen Mikroskop untersucht. Die Osteoklasten wurden innerhalb der ROI vollständig gezählt, dabei wurde die ROI in die Bereiche endostaler und periostaler Kallus sowie Kortikalis unterteilt. Diese Bereiche wurden mäanderförmig abgefahren und die Anzahl der Osteoklasten mit einem Zellzählgerät erfasst. Die Einzelzählungen wurden dokumentiert und dann zu einer Gesamtzahl zusammengefasst.

3.12 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung der Daten und die Erstellung der Grafiken erfolgte in Zusammenarbeit mit dem Institut für Biometrie und klinische Epidemiologie der Charite Berlin. Aufgrund der geringeren Fallzahl pro Gruppe (n = 6 bis 8) wurden nichtparametrische Tests verwendet. Die Veränderungen der

einzelnen Parameter über die Zeit sind entsprechend als Mediane mit zugehörigen Interquartil-Bereichen dargestellt. Bei Vergleichen der Meßwerte zwischen den verschiedenen Gruppen zu einzelnen Zeitpunkten erfolgt die graphische Darstellung der Parameter über Boxplots.

Die statistische Auswertung einzelner Parameter zu bestimmten Zeitpunkten erfolgte mit Hilfe des Computerprogrammes SPSS (SPSS 12.0, SPSS Inc., Chicago, Illinois/USA). Unabhängige Parameter wurden dementsprechend mit dem Mann-Whitney-U-Test statistisch ausgewertet. Wiederholungsmessungen über die Zeit und Vergleiche der Parameterverläufe über die Zeit zwischen den Gruppen wurden mit Hilfe eines SAS-Makros (SAS 8.2, SAS Institute Inc., Cary, North Carolina/USA) zur nichtparametrischen Analyse longitudinaler Daten analysiert. Verwendet wurde das Modell SAS-Macro von Brunner, (Modell „F1-LD-F1“, Brunner und Langer, 1999), Diese nichtparametrische Analyse von longitudinalen Daten ist nach Brunner gerade für ordinalverteilte Daten aus kleinen Fallzahlen hinreichend genau. Für ordinalverteilte Daten wird der Median und das Konfidenzintervall genutzt. Mit dem SAS-Makro von Brunner wurden die Daten auf Unterschiede in den Merkmalen untersucht. Das Signifikanzniveau wurde auf $\alpha < 0,05$ festgelegt. Bei Mehrfachvergleichen wurde das Signifikanzniveau nach der Methode von Bonferoni-Holm (Guggenmoos-Holzmann et al., 1996) korrigiert.

Die Ergebnisse der Kollagenauswertung und der Osteoklastenzählung werden als Boxplots dargestellt (Abb. 3.12-1). Der Boxplot setzt sich zusammen aus dem Median (auch 50-Prozentquartil genannt) und dem 25- und 75-Prozentquartil. Außerdem sind Ausreißer und Extremwerte dargestellt. Der Körper (Box) des Boxplots wird vom 25- und 75-Prozentquartil begrenzt und vereint 50 Prozent der Werte in sich. Die sich oben und unten an den Boxplotkörper anschließenden Whisker umfassen jeweils die Werte unterhalb des 25-Prozentquartils bzw. oberhalb des 75-Prozentquartils. Die Whisker können maximal die 1,5-fache Länge der Box betragen. Gibt es Fälle mit Werten außerhalb dieses Bereichs, werden sie als Ausreißer bzw. Extremwerte bezeichnet.

Material und Methode

- * Extremwerte: Fälle mit Werten, die über 3 Boxlängen vom oberen oder unteren Rand der Box entfernt sind.
- Ausreißer: Fälle mit Werten, die zwischen 1,5 und 3 Boxlängen vom oberen oder unteren Rand der Box entfernt sind.

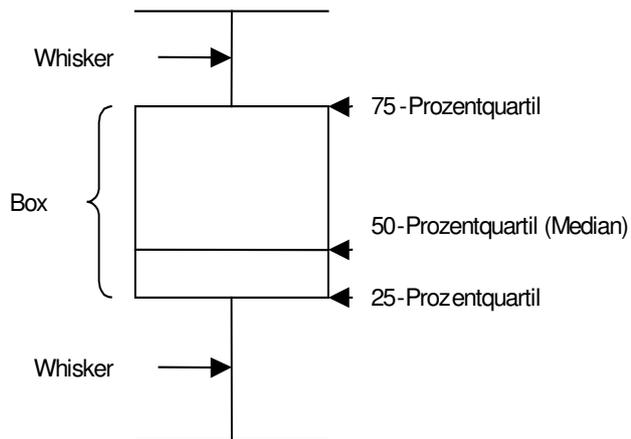


Abb. 3.12-1: Darstellung eines Boxplots und Erläuterungen seiner Einzelteile

4 Ergebnisse

Die Darstellung der Ergebnisse gliedert sich in die Beschreibung der serologischen Parameter und in die Darstellung der histologischen Parameter in den zu vier Zeitpunkten nach der Osteotomie entnommen Proben aus der Tibia. Die histologischen Parameter werden differenziert in Kollagenverteilung und Osteoklastenzahl. In die Auswertung der serologischen Parameter wurden die Messwerte von acht Tieren der operierten Gruppe (fx-Gruppe) und acht Tieren der Kontrollgruppe mit neun Wochen Standzeit aufgenommen. Weiterhin werden die Ergebnisse der Serumparmater der acht Lämmer dargestellt. Für die Auswertung der histologischen Daten ergaben sich folgende Tierzahlen: in der Gruppe zwei und neun Wochen Standzeit jeweils acht Tiere, drei Wochen Standzeit sechs Tiere und in der Gruppe sechs Wochen Standzeit sieben Tiere (Tab. 3.12-1). Drei Tiere wurden aufgrund von Schwierigkeiten mit dem Sägevorgang der Tibia und damit nicht vergleichbaren Schnittebenen aus der histologischen Beurteilung ausgeschlossen. Alle in die Auswertung einbezogenen Tiere wiesen während des Untersuchungszeitraums keine klinischen Anzeichen einer Infektion oder Erkrankung auf. Der Heilungsverlauf der Fraktur aus den operierten Tiergruppen verlief erwartungsgemäß ohne Komplikationen.

	Anzahl	Schaf Nummer							
Standzeit nach OP 2 Wochen	8	60	67	71	74	76	85	86	90
Standzeit nach OP 3 Wochen	6	8	10	(18)	19	29	30	(31)	42
Standzeit nach OP 6 Wochen	7	(9)	21	23	24	25	26	27	28
Standzeit nach OP 9 Wochen	8	2	3	6	12	13	16	17	61
Kontrollgruppe 9 Wochen	8	81	82	88	89	90	91	95	96
Lämmer 5 Monate alt	8	1	2	3	4	5	6	7	8

Tab. 3.12-1: Auflistung der Gruppeneinteilung, gegliedert in Standzeit nach der OP, Kontrollgruppe und Lämmer. Drei Tiere wurden aus der Studie aufgrund von Schwierigkeiten mit dem Sägevorgang der Tibia und damit nicht vergleichbaren Schnittebenen aus der histologischen Beurteilung ausgeschlossen (Schaf 18 / 31 / 9).

Ergebnisse

4.1 Serumparameter

Im Folgenden werden die absoluten serologischen Werte der einzelnen Parameter vor der Operation dargestellt (Tab. 4.1-1) und diese mit den Absolutwerten der Lämmer verglichen, dann werden die serologischen Parameter im Zeitverlauf der Kontrollgruppe gegenübergestellt.

Die absoluten Daten der Tiere zeigten eine große inter-individuelle Spannbreite. Dies gilt sowohl bei den erwachsenen wie auch bei den jugendlichen Tieren. Deshalb diente der vor der Operation ermittelte Ausgangswert als Referenz, um die Daten prozentual zu betrachten und somit eine bessere Gegenüberstellung der einzelnen Parameter zu ermöglichen.

Die Serumlevel von PICP, PIIINP, sALP, TRAP und COMP der juvenilen Tiere waren signifikant ($p < 0,03$) höher als bei den erwachsenen Tieren. Bei Osteocalcin waren die Werte der Lämmer tendenziell, aber nicht signifikant ($p = 0,052$) höher. Die maximalen Werte bei den Knochenparametern der operierten Tiere erreichten nie die Höhe der juvenilen Werte ($p < 0,01$) (Tab. 4.1-2).

Die serologischen Werte von CP II als Knorpelparameter waren bei den juvenilen Tieren nur geringfügig höher als bei den erwachsenen, unoperierten Tieren, die als Standard dienten. Die Werte der erwachsenen, operierten Tiere übertrafen die Messwerte der juvenilen Tiere.

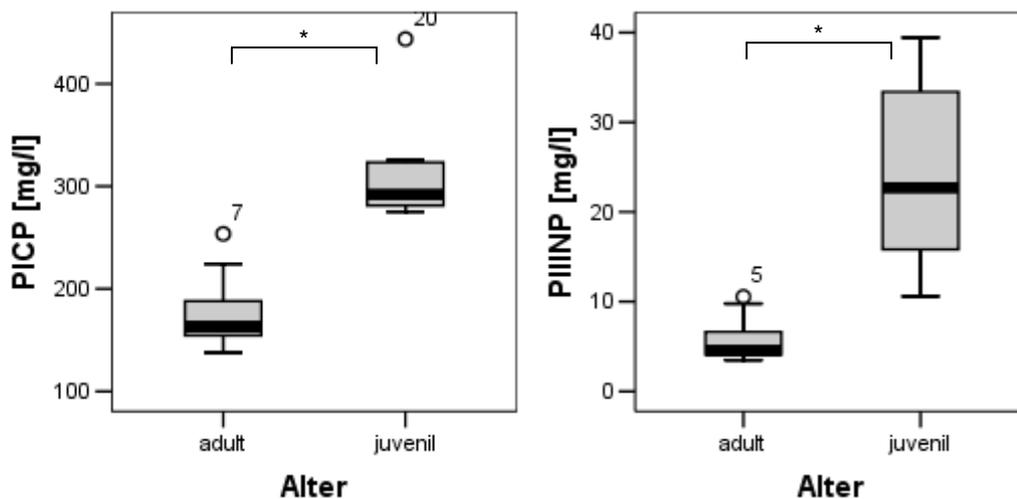
		Parameter							
	Schaf	PICP mg/l	PIIINP mg/l	CPII ng/l	SALP mg/l	TRAP U/l	Osteocalcin µg/l	COMP U/l	
OP-Gruppe	2	203,59	9,77	576,00	10,46	0,35	6,91	82,00	
	3	157,16	4,13	625,00	6,45	0,39	5,67	97,00	
	6	224,45	3,76	851,00	10,69	0,42	14,14	92,00	
	12	156,66	4,63	944,00	7,03	0,32	12,49	91,00	
	13	179,22	10,54	837,00	37,25	0,52	15,13	84,00	
	16	186,64	4,13	599,00	42,94	0,28	13,05	79,00	
	17	253,62	5,51	760,00	39,03	0,32	15,71	99,00	
	61	160,39	7,15	812,00	9,52	0,19	7,26	78,00	
		min	156,66	3,76	576,00	10,46	0,19	5,67	78,00
		max	253,62	10,54	944,00	42,94	0,52	15,71	99,00
	median	182,93	5,07	786,00	37,25	0,34	12,77	87,50	
Kontroll-Gruppe	81	161,89	3,48	127,47	16,51	0,14	8,67	102,00	
	82	165,49	4,52	183,76	31,87	0,19	7,20	132,00	
	88	151,67	3,80	239,04	12,27	0,14	4,50	70,00	
	89	152,22	4,09	265,89	10,69	0,21	2,80	117,00	
	90	137,69	4,53	291,90	26,86	0,17	8,77	94,00	
	91	189,24	7,90	243,98	23,91	0,25	7,21	79,00	
	95	165,04	4,67	115,92	17,30	0,38	8,85	92,00	
	96	142,34	6,11	336,37	32,64	0,28	5,32	104,00	
		min	137,69	3,48	115,92	10,69	0,14	2,80	70,00
		max	189,24	7,90	336,37	32,64	0,38	8,85	132,00
	median	157,06	4,53	241,51	20,61	0,20	7,21	98,00	
Lämmer	1	281,96	15,86	1208,00	73,58	4,17	13,29	147,00	
	2	275,19	18,36	749,00	82,27	1,77	14,19	177,00	
	3	280,36	39,45	823,00	103,10	5,87	14,74	260,00	
	4	443,69	28,51	643,00	84,49	2,12	12,31	195,00	
	5	325,27	38,27	893,00	143,10	3,42	11,87	314,00	
	6	283,17	27,06	859,00	90,80	1,61	11,68	255,00	
	7	321,38	15,78	976,00	117,23	1,08	10,53	196,00	
	8	300,54	10,60	678,00	56,07	1,36	11,36	145,00	
		min	275,19	10,60	643,00	56,07	1,08	10,53	145,00
	max	443,69	39,45	1208,00	143,10	5,87	14,74	314,00	
	median	291,86	22,71	841,00	87,65	1,95	12,09	195,50	

Tab. 4.1-1: Absolutwerte des jeweiligen individuellen Serumparameters vor Operation, gegliedert in drei Gruppen Osteotomie-Gruppe, Kontrollgruppe und Lämmer, sowie die daraus berechneten statistischen Werte Median, Minimum und Maximum.

Ergebnisse

		Parameter						
		PICP [µg/l]	sALP [µg/l]	Osteocalcin [µg/l]	TRAP [U/l]	PIINP [µg/l]	CPII [µg/l]	COMP [U/l]
Basiswerte vor OP (n=16)	Min	156,70	6,40	5,70	0,19	3,80	576,00	78,00
	Max	253,60	42,90	15,70	0,52	10,50	944,00	99,00
	Median	182,93 ^{a,c}	10,58 ^{a,c}	12,77 ^c	0,34 ^{a,c}	5,1 ^{a,c}	786,00	87,50
	CV[%]	17,90	61,70	44,10	38,90	39,40	19,40	11,70
Werte nach OP (n=8)	Min	178,90	12,10	7,00	0,28	5,40	847,00	83,00
	Max	308,30	47,60	16,40	0,52	11,40	1481,00	157,00
	Median	229,2 ^b	31,8 ^b	14,10	0,39 ^b	8,8 ^b	1041,00	125,00
Jugendliche Werte (n=8)	Min	275,20	56,10	10,50	1,10	10,60	643,00	145,00
	Max	443,70	143,10	14,70	5,90	39,50	1208,00	314,00
	Median	291,9	87,6	12,10	1,95	22,70	841,00	195,5
	CV[%]	17,80	28,80	11,60	62,4	44,6	21,50	30,60

Tab. 4.1-2: Basiswerte der untersuchten Serumparameter vor der Osteotomie, Maximalwerte der adulten Tiere während der Frakturheilung und die Werte der jugendlichen Tiere: a = normale (präoperative) vs. jugendliche Werte ($p \leq 0.03$), b = präoperative vs. maximale Werte ($p \leq 0.01$), c = maximale vs. jugendliche Werte ($p \leq 0.043$), CV [%] = inter-individuelle Variabilität.



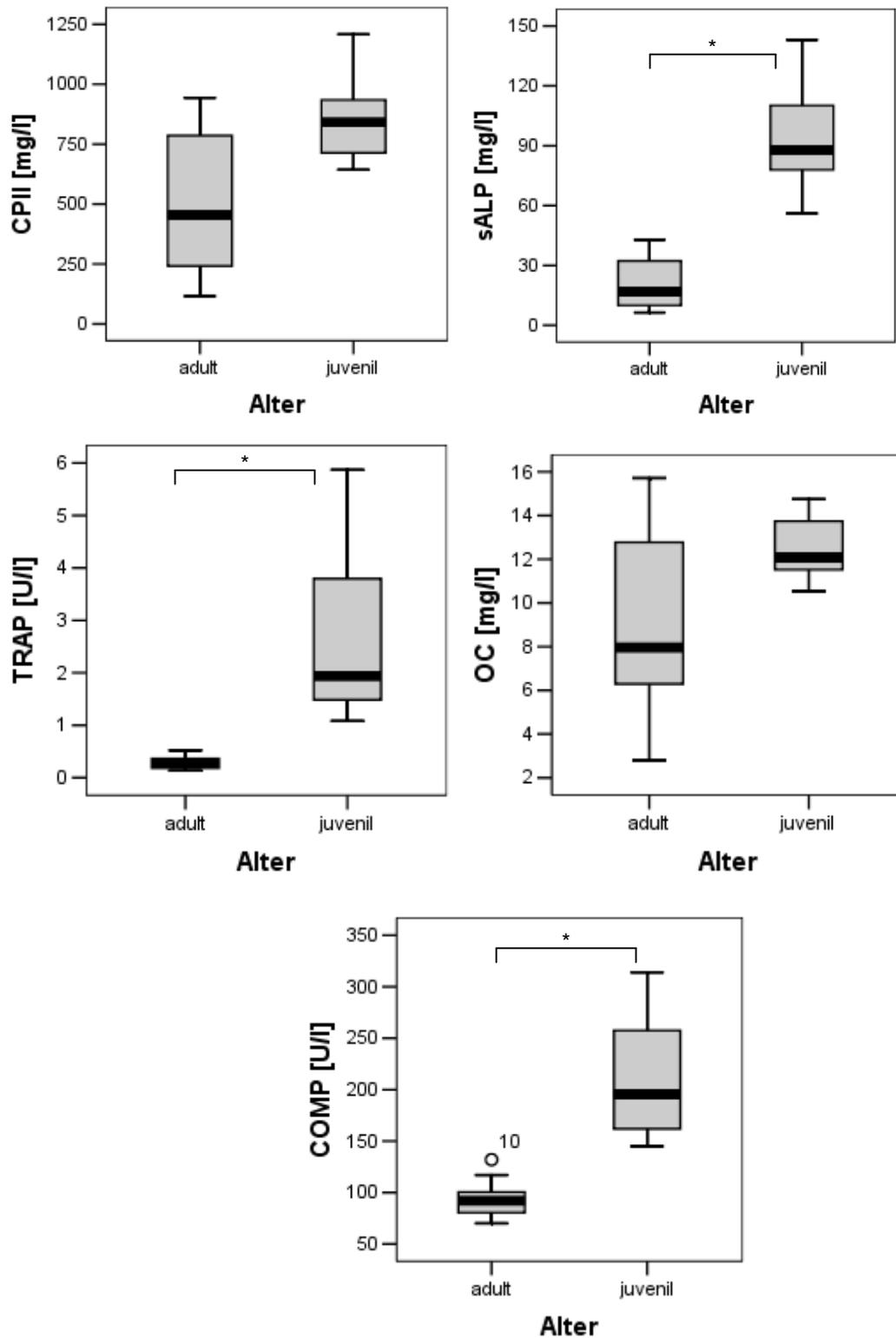


Abb. 4.1-1: Darstellung der einzelnen Serumparameter im Vergleich adult vs. juvenil. Bei PICP, PIINP, sALP, TRAP und COMP waren die Blutspiegel der jugendlichen Tiere signifikant höher als die der adulten Tiere ($p \leq 0,03$).

Ergebnisse

Die einzelnen serologischen Parameter werden aufgrund der großen inter-individuellen Spannweite in Prozent des präoperativen Wertes dargestellt. Der präoperative Wert wird hierbei als 100 Prozent angesetzt. Es sind der Median sowie die Minimal- und Maximalwerte aufgelistet (Tab. 4.1.1-1 bis 4.1.3-2). Im Diagramm (Abb. 4.1.1-1 bis 4.1.3-2) werden die serologischen Parameter im Zeitverlauf dargestellt. Die einzelnen Datenpunkte sind der Median des jeweiligen Messzeitpunktes und der dazugehörige Interquartilbereich. Es werden für jeden Serumparameter die Ergebnisse der operierten und die der Kontrollgruppe in einem Diagramm gezeigt.

4.1.1 Kollagenfragmente

4.1.1.1 PICP

PICP Tage	fx-Gruppe			Kontrollgruppe		
	median	min	max	median	min	max
0	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00
3	85,46	72,31	107,05	n/a	n/a	n/a
7	98,52	83,30	125,98	113,88	89,36	139,24
14	99,83	65,97	121,55	110,66	80,44	115,11
21	94,41	68,22	138,22	81,80	75,44	98,32
28	104,12	61,61	134,12	80,21	62,70	88,50
35	95,26	70,78	162,11	101,84	91,26	119,79
42	104,05	75,51	143,68	96,57	84,82	108,29
49	98,77	65,01	131,59	110,67	83,73	122,32
56	88,63	71,77	134,43	95,74	88,80	108,60
63	89,76	66,38	118,97	110,26	74,99	124,48

Tab. 4.1-3: Prozentuale Werte des Verlaufs des PICP-Serumspiegels über die einzelnen Messzeitpunkte, dargestellt als Median, Minimum und Maximum. Der präoperative Wert wird als 100 % angesetzt.

Der Verlauf des PICP-Wertes im Serum zeigt bei der operierten Gruppe direkt nach der Operation einen Abfall auf 85,46 % (72,43 % - 107,05 %), stieg bis zur vierten Wochen auf den Ausgangswert 104,12 % (61,61% - 134,12 %) an und fiel von der fünften Woche bis zur neunten Woche post operationem wieder auf 89,76 % (66,83 % - 118,97 %) ab.

Bezogen auf den Ausgangswert der Kontrollgruppe stieg der Wert von PICP im Serum die ersten zwei Wochen post operationem deutlich an und fiel dann zur dritten Woche auf ca. 80 Prozent des Ausgangswertes 81,80 % (75,44 % - 98,32 %) ab. Fünf Wochen nach der Osteotomie war wieder der Ausgangswert 101,84 % (91,26 % - 119,79 %) erreicht, der bis zum Ende des

Untersuchungszeitraumes nicht mehr unterschritten wurde. Es gab keine signifikanten Unterschiede zwischen der operierten und der Kontrollgruppe. Die Kontrollgruppe zeigte während der neun Untersuchungswochen zeitabhängige signifikante Unterschiede ($p < 0,001$).

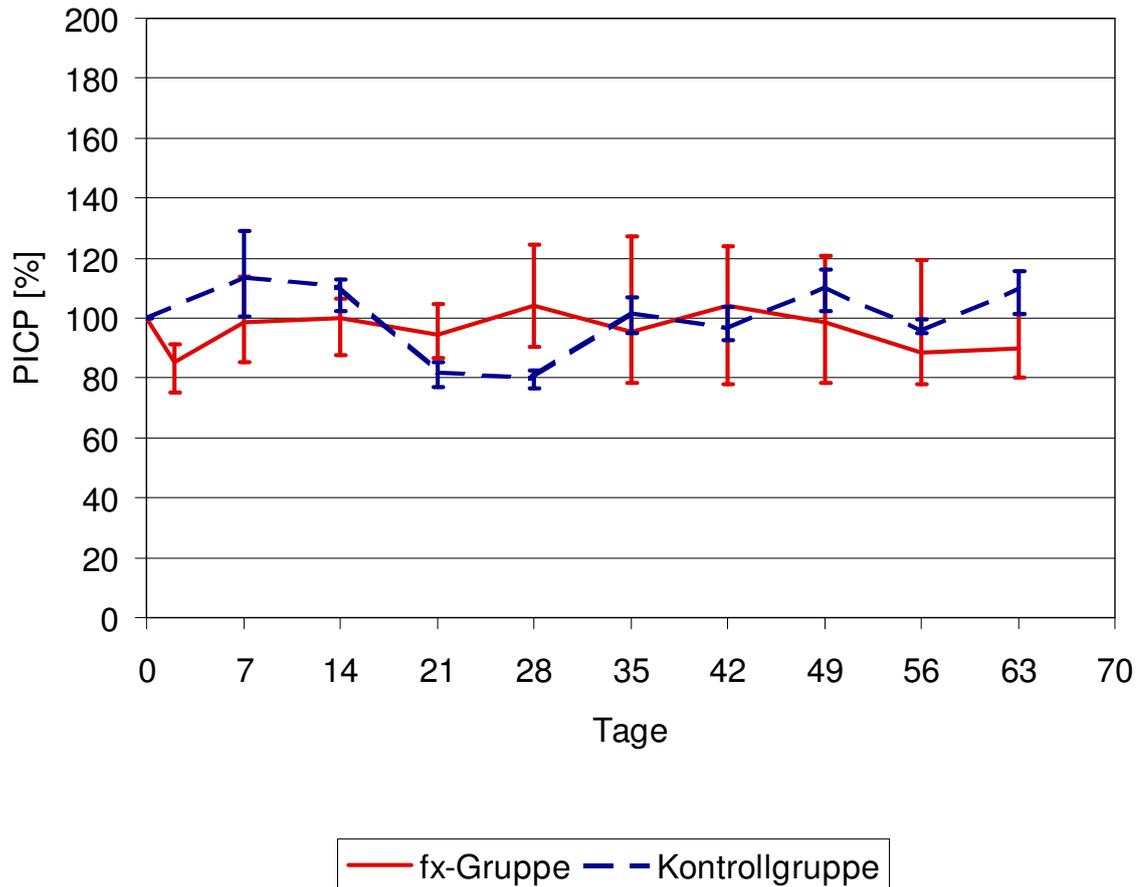


Abb. 4.1-2: Darstellung der prozentualen PICP-Werte im Zeitverlauf in der Osteotomie- (= fx) vs. Kontrollgruppe. Die PICP-Werte im Serum der Kontrollgruppe zeigten im Versuchszeitraum signifikante Unterschiede ($p < 0,001$).

Ergebnisse

4.1.1.2 PIIINP

Tage	fx-Gruppe			Kontrollgruppe		
	median	min	max	median	min	max
0	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00
3	67,84	39,74	105,48	n/a	n/a	n/a
7	84,45	45,62	109,07	128,35	79,70	227,04
14	94,56	52,57	102,56	98,06	57,24	217,68
21	89,15	44,27	120,83	69,48	47,07	104,77
28	82,13	42,69	212,11	65,36	48,52	98,08
35	105,92	55,07	227,76	102,28	55,46	182,76
42	107,13	47,73	185,94	82,30	66,82	126,16
49	96,24	43,72	276,25	88,92	54,82	128,56
56	95,73	46,94	177,05	103,00	65,40	134,87
63	90,58	70,79	227,65	149,18	86,75	181,41

Tab. 4.1-4: Prozentuale Werte des des PIIINP-Serumspiegels über die einzelnen Messzeitpunkte, dargestellt als Median, Minimum und Maximum. Der präoperative Wert wurde als 100% angesetzt.

Der initiale Abfall des PIIINP-Serumspiegels der operierten Tiere von 67,84 % (39,74 % - 105,48%) wurde von einem Anstieg bis zur fünften Woche post operationem auf 105,92 % (55,07 % - 227,11 %) gefolgt. Bis zur neunten Woche nach der Operation sank der Serumspiegel für PIIINP mit 90,58 % (70,79 % - 227,65 %) wieder unter den präoperativen Wert.

Der Serumspiegel für PIIINP in der Kontrollgruppe zeigte zu Beginn des Versuches einen Anstieg auf 128,35 % (79,70% - 227,04%), der in der zweiten Untersuchungswoche in einen Abfall deutlich unter den Ausgangswert übergang und in der vierten Woche bei 65,36 % (48,52 % - 98,08 %) seinen Tiefpunkt erreichte. In der achten Woche wurde wieder der in der Erstblutabnahme ermittelte Wert erreicht, der dann in der neunten Woche deutlich überschritten wurde und bei 149,18 % (86,75 % - 181,41 %) des Ausgangswertes lag.

Die serologischen Werte von PIIINP waren zwischen den beiden Gruppen ($p = 0,045$) signifikant verschieden. Außerdem waren die serologischen Werte innerhalb der Kontrollgruppe über den Untersuchungszeitraum signifikant unterschiedlich ($p < 0,001$).

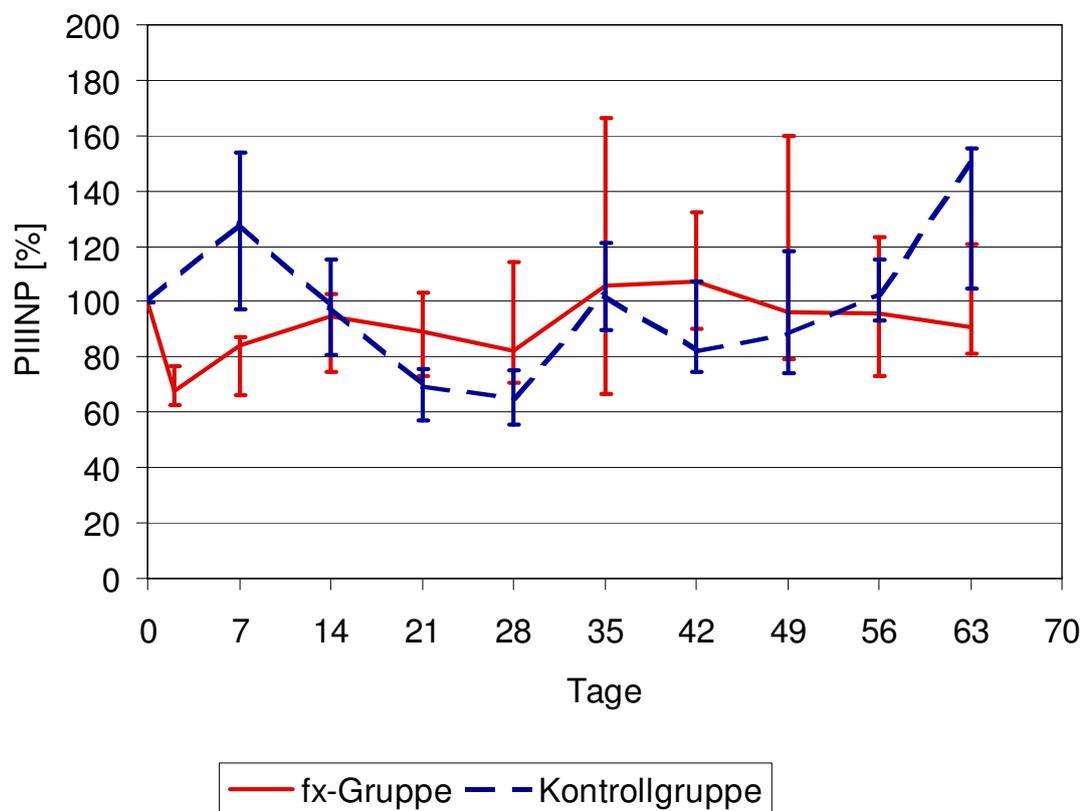


Abb. 4.1-3: Darstellung der PIINP-Werte (in %) im Zeitverlauf über neun Wochen in der Gruppe der Osteotomie (= fx) und der Kontrollgruppe. Es ergaben sich signifikante Unterschiede zwischen den beiden Gruppen ($p = 0,045$). Zudem wies die Kontrollgruppe signifikante Unterschiede ($p < 0,001$) innerhalb des Zeitverlaufs auf.

Ergebnisse

4.1.1.3 CP II

CPII Tage	fx-Gruppe			Kontrollgruppe		
	median	min	max	median	min	max
0	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00
3	105,14	99,05	147,75	n/a	n/a	n/a
7	102,55	82,11	157,81	57,72	44,92	74,76
14	117,53	86,37	165,44	50,59	41,19	64,05
21	109,56	82,26	194,87	57,21	44,23	74,83
28	102,08	81,25	149,92	38,71	31,96	52,47
35	109,72	81,67	155,36	59,34	38,43	72,40
42	91,49	80,14	156,00	50,49	37,77	55,07
49	103,74	60,59	153,60	62,58	32,77	75,17
56	98,78	78,60	143,36	42,68	28,85	72,86
63	107,29	75,95	191,20	59,19	38,57	70,47

Tab. 4.1-5: Prozentuale Werte des Verlaufs des CPII-Spiegels im Serum über die einzelnen Messzeitpunkte (in Tagen), dargestellt als Median, Minimum und Maximum. Der präoperative Wert wurde als 100 % angesetzt.

Die operierte Tiergruppe zeigte in der zweiten Untersuchungswoche einen deutlichen Anstieg der CP II-Werte auf 117,53 % (86,37 % - 165,44 %). In der vierten Woche sanken die Werte wieder auf den präoperativen Wert ab. Für die weiteren fünf Wochen der Untersuchungsdauer pendelte der Wert zwischen 91,48 % (80,14 % - 156,00 %) und 109 % (81,67 % - 155,36 %) und lag am Ende leicht über dem präoperativen Wert.

In der Kontrollgruppe gab es nach einer Woche einen Abfall der CPII-Serumwerte auf 57,72 % (44,92 % - 74,76 %). Danach blieben die Werte in der Kontrollgruppe auf diesem niedrigen Niveau und schwankten zwischen 38,71 % (31,96 % - 52,47 %) und 62,58 % (32,77 % - 75,17 %).

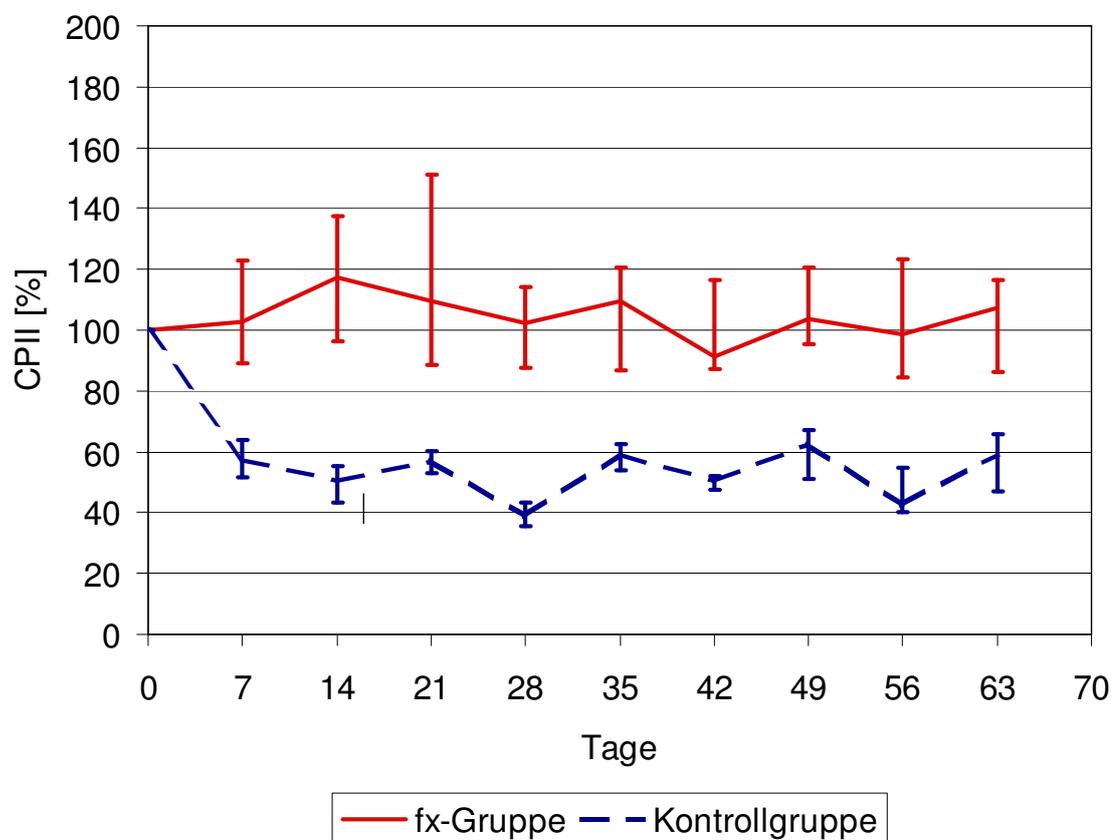


Abb. 4.1-4: Darstellung der prozentualen CPII-Werte im Zeitverlauf nach der Operation in der Osteotomie- (= fx) und der Kontrollgruppe.

Ergebnisse

4.1.2 Enzyme

4.1.2.1 SALP

sALP	fx-Gruppe			Kontrollgruppe		
	Tage	median	min	max	median	min
0	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00
3	74,97	59,32	95,77	n/a	n/a	n/a
7	72,42	51,11	84,56	84,06	7,64	150,20
14	107,64	65,62	126,46	115,65	32,03	183,13
21	125,50	57,02	183,50	67,66	47,55	116,19
28	110,82	48,98	175,78	75,91	38,56	91,64
35	97,38	45,62	270,20	29,57	15,95	50,17
42	116,62	48,32	372,62	32,51	20,78	85,56
49	117,58	40,24	329,74	32,39	5,55	80,69
56	109,45	40,75	303,57	39,71	2,34	219,77
63	105,26	45,25	409,21	59,12	22,71	94,03

Tab. 4.1-6: Prozentuale Werte des sALP-Serumspiegels über die einzelnen Messzeitpunkte, dargestellt als Median, Minimum und Maximum. Der präoperative Wert wurde als 100 % angesetzt.

Die skelettale Alkalische Phosphatase (sALP) fiel in beiden Gruppen über den gesamten Untersuchungszeitraum ab. In der Gruppe der operierten Tiere kam es zu einem steilen Abfall in der ersten Woche auf 72,42 % (51,11 % - 84,56 %) des präoperativen Ausgangswertes und dann zu einem Anstieg über den präoperativen Wert auf 125,50 % (57,02 % - 183,50 %) in der dritten Woche. Der weitere Verlauf ist wellenförmig mit einem Abfall in der vierten und fünften Woche und einem nochmaligen Anstieg bis zur siebten Woche. Dieser lag bei 117,58 % mit einer besonders großen Schwankungsbreite von 40,24 % bis 329,74 %. Von diesem Zeitpunkt an sank der Wert bis zur letzten Blutentnahme auf 105,26 % (45,25 % - 409,21 %) ab.

Bei der Kontrollgruppe war erst ein geringer Abfall der Werte unter den präoperativen Wert zu sehen 84,06 % (7,64 % - 150,20 %) und dann trat – wie in der operierten Gruppe – in der zweiten Woche ein Anstieg auf 115,65 % (32,03 % - 183,13 %) auf.

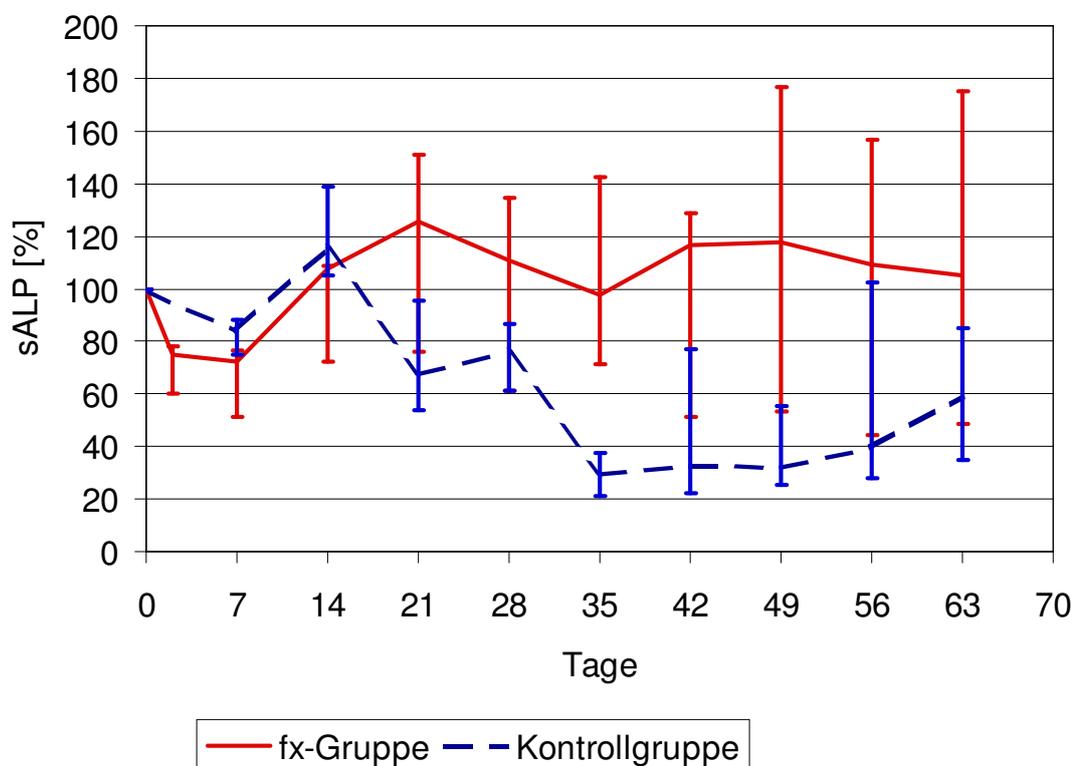


Abb. 4.1-5: Darstellung der prozentualen sALP Werte im Zeitverlauf in der Osteotomie- (= fx) vs. Kontrollgruppe. Es zeigten sich signifikante Unterschiede zwischen den beiden Gruppen ($p = 0,03$). Die Kontrollgruppe wies zudem signifikante Unterschiede ($p < 0,001$) innerhalb des Zeitverlaufs von neun Wochen auf.

Ab diesem Zeitpunkt kam es zu einem starken Abfall der Serumwerte von sALP auf ca. 30 % des präoperativen Wertes, der in der fünften Woche bei 29,57 % (15,95 % - 50,17 %) seinen Tiefpunkt erreichte. Bis zum Ende des Untersuchungsintervalls stiegen die sALP Werte wieder kontinuierlich auf 59,12 % (22,71 % - 94,03 %) an. Der Verlauf der sALP-Serumspiegel war signifikant unterschiedlich zwischen der operierten Gruppe und der Kontrollgruppe ($p = 0,03$). Außerdem gab es zeitabhängige Unterschiede innerhalb der Kontrollgruppe ($p < 0,001$).

Ergebnisse

4.1.2.2 TRAP

TRAP	fx-Gruppe			Kontrollgruppe		
	Tage	median	min	max	median	min
0	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00
3	77,41	56,32	116,48	n/a	n/a	n/a
7	86,96	47,51	110,80	100,23	74,49	104,81
14	96,84	51,72	113,64	97,04	67,61	123,36
21	83,21	34,09	117,65	89,01	70,71	110,11
28	63,29	42,61	101,60	85,33	69,23	116,37
35	80,38	46,74	125,00	80,42	62,35	120,21
42	84,71	38,70	117,11	80,89	67,79	147,34
49	82,59	37,93	112,30	72,26	54,64	133,92
56	89,13	55,56	108,56	89,85	58,30	113,57
63	111,28	50,96	150,27	90,59	66,83	139,18

Tab. 4.1-7: Prozentuale Werte des Verlaufs der TRAP-Serumspiegel über die einzelnen Messzeitpunkte, dargestellt als Median, Minimum und Maximum. Der präoperative Wert wurde als 100 % angesetzt.

Der Serumspiegel von TRAP fiel in der Gruppe der operierten Tiere in der ersten Woche auf 86,96 % (47,51 % - 110,80 %) ab, gefolgt von einer Annäherung an den präoperativen Wert in der zweiten Woche nach der Operation auf 96,84 % (51,72 % - 113,64 %). Der TRAP-Level fiel dann wieder bis zur vierten Woche auf 63,29 % (42,61 % - 101,60 %) ab und stieg anschließend ab der vierten Woche bis zum Ende der Untersuchung nach neun Wochen über den präoperativen Wert hinaus auf 111,28 % (50,96 % - 150,27 %) an.

In der Kontrollgruppe fiel der Serumspiegel von TRAP bis zur siebten Woche kontinuierlich auf 72,26 % (51,72 % - 113,64 %) ab. Dieser Abfall geht gegen Ende in einen geringen Anstieg von 90,59 % (66,83 % - 139,18 %) über, der aber den Ausgangswert nicht erreicht. Der Verlauf des TRAP-Serumspiegels war signifikant unterschiedlich zwischen den beiden Gruppen ($p < 0,01$). In der Kontrollgruppe gibt es zudem eine signifikante Veränderung über die Zeit von neun Wochen ($p = 0,04$).

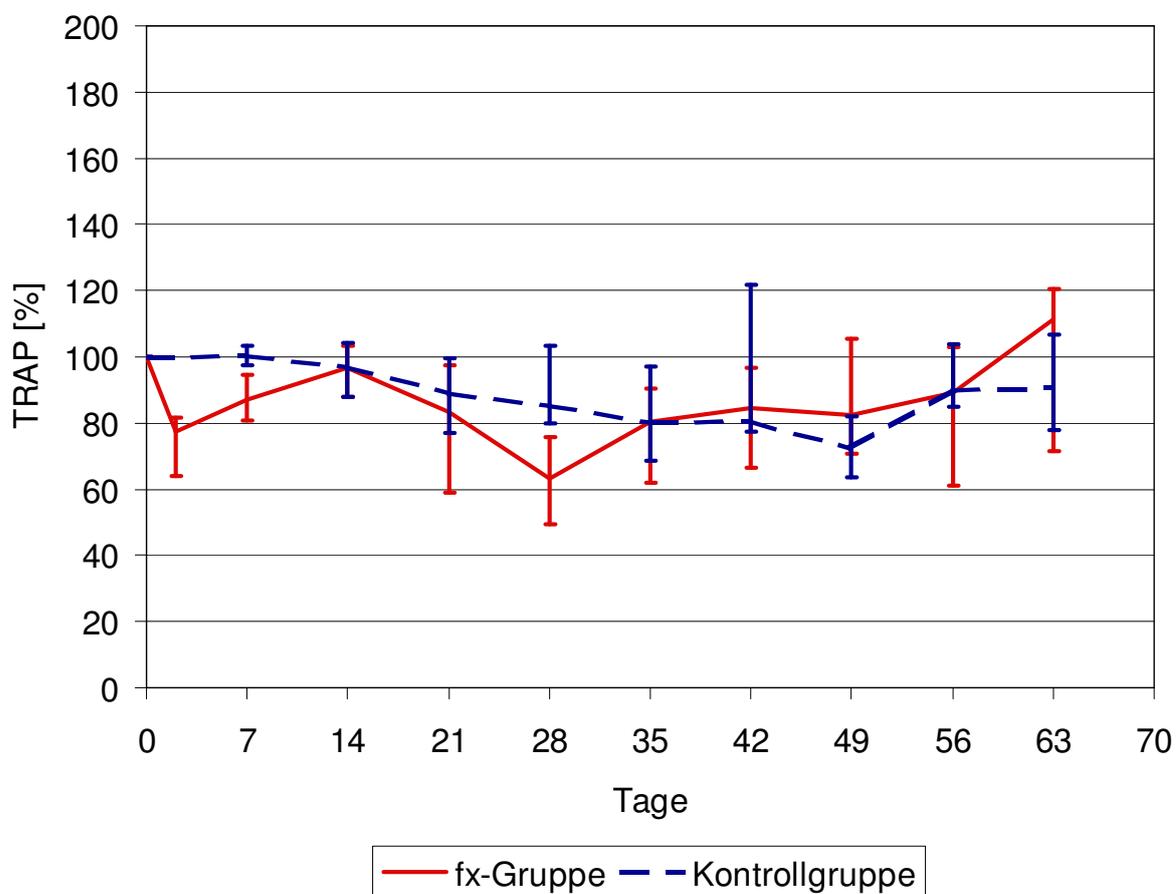


Abb. 4.1-6: Darstellung der prozentualen TRAP-Werte im Zeitverlauf von neun Wochen in der Osteotomie- (= fx) vs. Kontrollgruppe. Es zeigten sich signifikante Unterschiede zwischen den beiden Gruppen ($p < 0,01$). Die Kontrollgruppe wies außerdem signifikante Unterschiede ($p = 0,04$) innerhalb des Zeitverlaufs auf.

Ergebnisse

4.1.3 Nicht-kollagene Matrixkomponenten

4.1.3.1 Osteocalcin

Tage	fx-Gruppe			Kontrollgruppe		
	median	min	max	median	min	max
0	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00
3	76,04	45,01	130,99	n/a	n/a	n/a
7	88,33	69,61	106,88	105,91	56,78	118,89
14	83,99	55,20	105,64	105,16	86,97	124,44
21	90,06	74,60	98,55	85,14	64,24	142,86
28	94,96	80,32	123,63	64,99	48,10	75,17
35	89,86	80,82	137,21	91,09	80,97	158,21
42	87,88	76,48	163,84	90,24	61,71	174,64
49	97,65	73,37	145,86	89,36	61,48	132,22
56	95,26	61,40	132,45	82,43	69,90	158,93
63	77,58	62,86	139,86	95,34	82,24	120,00

Tab. 4.1-8: Prozentuale Werte des Verlaufs des Osteocalcinspiegels über die einzelnen Messzeitpunkte, dargestellt als Median, Minimum und Maximum. Der präoperative Wert wurde als 100 % angesetzt.

In der Gruppe der operierten Tiere war ein im Vergleich zum Ausgangswert vor der Operation erniedrigter Osteocalcin Spiegel während der gesamten Heilungsphase festzustellen. Es zeigte sich in den ersten drei Tagen nach der Operation ein starker Abfall des Serumspiegels auf 76,04 % (45,01 % - 130,99 %), wonach die Werte bis zur siebten Woche wieder langsam auf 97,65 % (73,37 % - 145,86 %) des präoperativen Wertes anstiegen, diesen Ausgangswert aber nicht mehr erreichten. In der letzten Untersuchungswoche wurde noch einmal ein Abfall auf das Niveau von 77,58 % (62,86 % - 139,86 %) der ersten Messung nach der Operation festgestellt.

In der Kontrollgruppe war nach einem geringen Anstieg des Serumspiegels von Osteocalcin in den ersten 14 Tagen auf 105,16 % (86,97 % - 124,44 %) in der vierten Woche ein deutlicher Abfall des Parameters messbar, der bei 64,99 % (48,10 % - 75,17 %) lag und danach blieb der Level wenig unter dem Ausgangswert. Ein signifikanter Unterschied der Osteocalcin-Werte bestand zwischen den beiden Gruppen ($p = 0,006$) und in der Kontrollgruppe veränderten sich zudem die gemessenen Osteocalcinwerte signifikant im Zeitverlauf ($p < 0,001$).

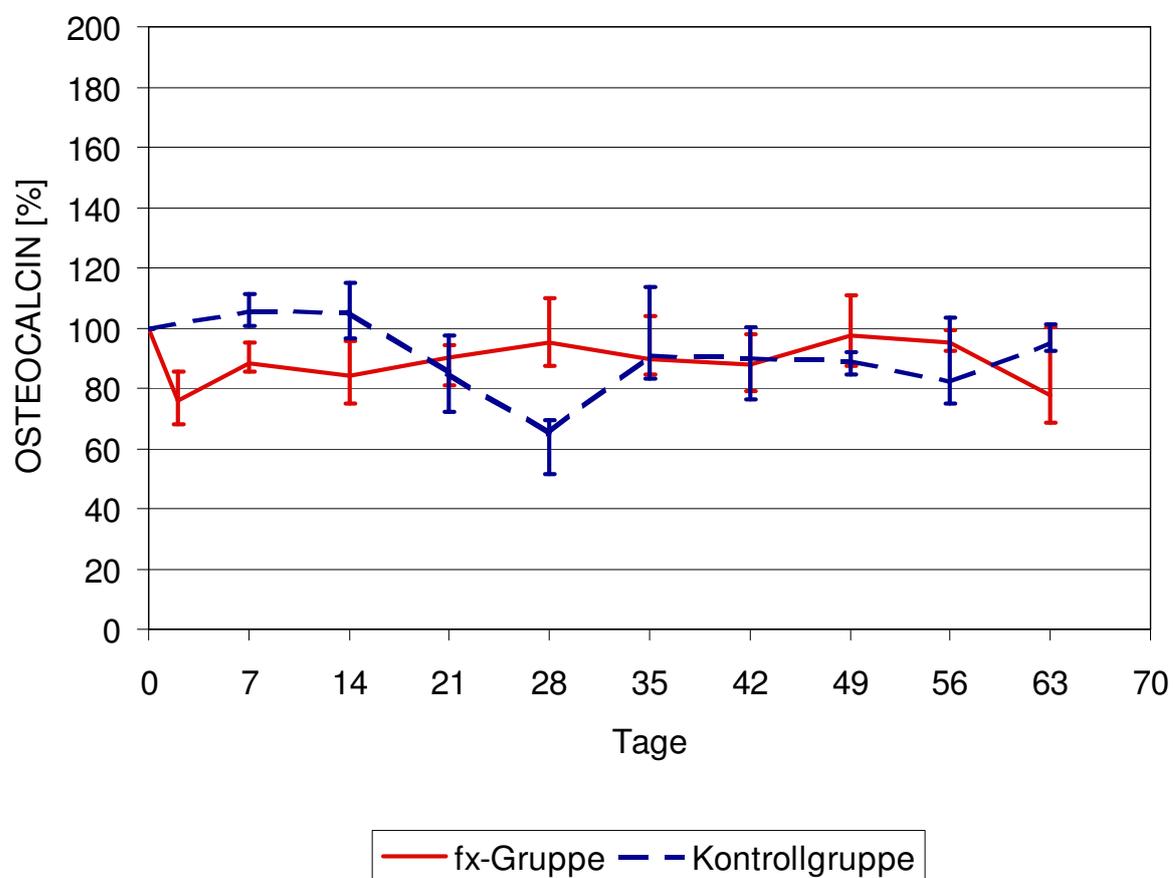


Abb. 4.1-7: Darstellung der prozentualen Osteocalcin-Werte im Zeitverlauf in der Osteotomie- (= fx) und in der Kontrollgruppe. Es ergaben sich signifikante Unterschiede zwischen den beiden Gruppen ($p = 0,006$). Die Kontrollgruppe wies außerdem signifikante Unterschiede ($p < 0,001$) innerhalb des Zeitverlaufs auf.

Ergebnisse

4.1.3.2 COMP

Tage	fx-Gruppe			Kontrollgruppe		
	median	min	max	median	min	max
0	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00
3	93,64	69,51	110,31	n/a	n/a	n/a
7	93,96	70,33	103,26	67,80	47,87	83,33
14	88,19	70,33	111,90	74,36	44,44	94,29
21	122,14	72,53	180,41	68,55	56,38	77,14
28	111,38	95,96	135,05	61,82	34,19	78,48
35	113,21	89,01	167,01	72,41	43,59	93,67
42	112,54	74,39	170,65	65,48	47,01	78,26
49	101,65	67,07	152,17	74,05	46,15	103,80
56	98,98	75,82	147,83	80,34	64,10	96,15
63	104,46	82,42	164,13	74,21	44,29	98,08

Tab. 4.1-9: Prozentuale Werte des Verlaufs des COMP-Serumspiegels über die einzelnen Messzeitpunkte, dargestellt als Median, Minimum und Maximum. Der präoperative Wert wurde als 100 % angesetzt.

Die operierten Tiere zeigten einen Abfall der COMP-Werte bis zur zweiten postoperativen Woche auf 88,19 % (70,33 % - 111,90 %) des präoperativen Ausgangswertes. Dann kam es bis zur dritten Woche zu einem deutlichen Anstieg dieses Parameters, der bei 122,14 % (72,53 % - 180,41 %) lag. Die COMP-Messwerte erreichten zwischen dritter und vierter Woche post operationem ihr Maximum und fielen dann kontinuierlich bis zum Ende des Untersuchungsintervalls von neun Wochen auf den präoperativen Wert ab. Die Kontrollgruppe wies in der ersten Untersuchungswoche einen Abfall des COMP-Serumspiegels auf 67,80 % (47,87 % - 83,33 %) auf. Der stieg in der zweiten Woche geringfügig auf 74,36 % (44,44 % - 94,29 %) an und pendelt dann während des restlichen Untersuchungszeitraums zwischen 60 % und 80 % des präoperativen Wertes. Der Verlauf der COMP-Messwerte war bei den operierten Tieren signifikant ($p < 0,001$) unterschiedlich über den Zeitraum von neun Wochen.

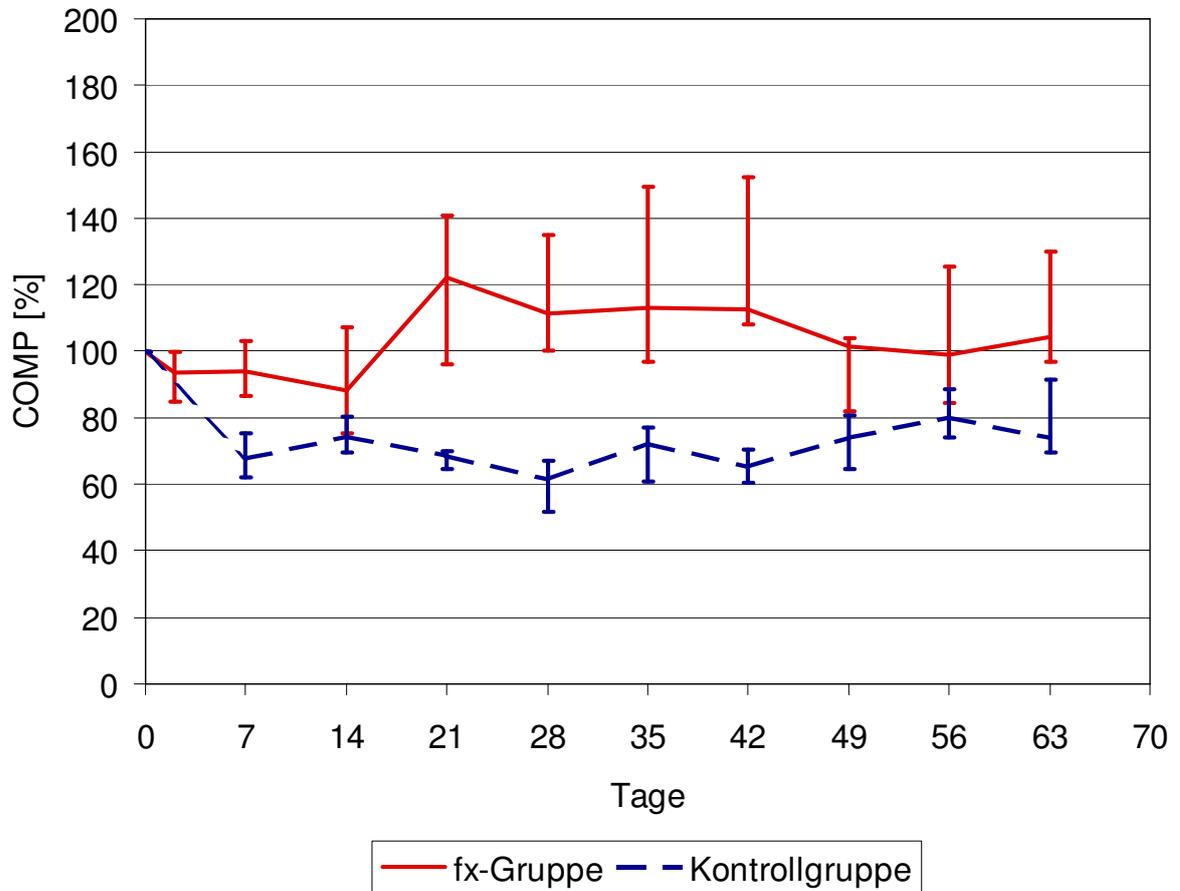


Abb. 4.1-8: Darstellung der prozentualen COMP-Werte im Zeitverlauf von neun Wochen in der Osteotomie- (= fx) und in der Kontrollgruppe. Die fx-Gruppe zeigte im Zeitverlauf der Untersuchung signifikant unterschiedlich hohe Messwerte ($p < 0,001$).

Ergebnisse

4.2 Histologie

Die Auswertung der histologischen Schnitte erfolgt zum einen deskriptiv, basierend auf dem Auswertungskatalog, und zum anderen quantitativ mit Hilfe der computergestützten Bildanalyse.

Die quantitativen Ergebnisse beziehen sich auf die festgelegte ROI von Gesamtkallusbreite und 12 Millimetern Höhe oder auf die Gap-ROI, die im Osteotomiespalt liegt und sich aus der Gesamtkallusbreite und 3 Millimetern Höhe ergibt.

4.2.1 Deskriptive Histologie

Bei der mikroskopischen Beurteilung der Gewebe in der osteotomierten Tibia anhand der drei Kollagenfärbungen zeigten sich deutliche Unterschiede in der Kollagenverteilung im Kallusgewebe. Das Kollagen III ist im weichen Kallus vorhanden und repräsentiert das undifferenzierte Bindegewebe. Bevor der Knochen mineralisiert wird, muß das Kollagen III durch Kollagen I ersetzt werden, um die Bindung der Mineralien zu ermöglichen. Kollagen II ist ausschließlich in hyalinem Knorpelgewebe vorhanden und Kollagen I repräsentiert das mineralisierte Knochengewebe.

Bei Kollagen Typ III ist der angefärbte Bereich hauptsächlich im periostalen Kallus zu sehen, aber auch endostal ist Kollagen Typ III in kleinen Mengen vorhanden (Abb. 3.8-4). Zum Zeitpunkt zwei Wochen nach der Osteotomie enthält der gesamte Kallus Kollagen vom Typ III. Dieses ist die Phase des weichen Kallus. Die Kallusfläche vergrößert sich bis zum Zeitpunkt drei Wochen post operationem noch, dennoch wird von jetzt an immer weniger Kollagen III angefärbt. Im Kallusgewebe wird Kollagen III durch Kollagen I ersetzt und dieses beginnt zu mineralisieren.

Der Nachweis von Kollagen Typ II zeigt, dass sich hyaliner Knorpel ausschließlich in Höhe des frakturspaltnahen Kallus bildet (Abb. 4.2.1-2). Dieser Bereich liegt am weitesten weg von der noch vorhandenen Gefäßversorgung aus dem Periost oder aus der Markhöhle.

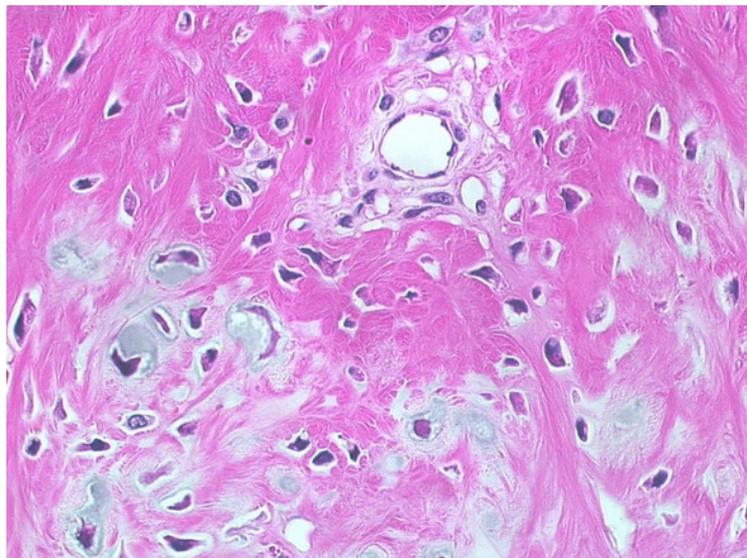


Abb. 4.2.1.-1 Der Osteotomiespalt mit Blutgefäß. Es sind in der unmittelbaren Nähe des Blutgefäßes keine Knorpelzellen sichtbar (Verg.: 55x).

Interkortikal im Osteotomiespalt gibt es kaum Kollagen Typ II Anfärbung. In der zweiten Untersuchungswoche sind einzelne kleine Knorpelzellen lateral und medial des Frakturspaltes zu sehen. Diese werden zunehmend größer und die größten Knorpelareale zeigen sich dann nach drei Wochen. Diese Knorpelareale werden im weiteren Heilungsgeschehen von Knochengewebe ersetzt. Das heißt, von der dritten bis zum sechs Woche post operationem sind verschiedene Stadien der enchondralen Ossifikation zu sehen.

Ergebnisse

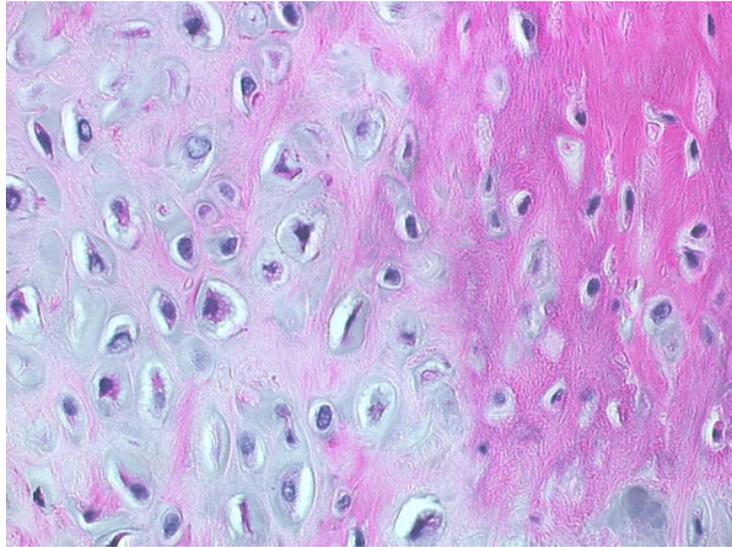


Abb. 4.2.1.-2 Knorpelgewebe im Kallus am Rande des Frakturspalts. Die Umwandlung des Knorpelgewebes in Knochengewebe, die chondrale Ossifikation ist zu sehen (Verg.: 55x).

Kollagen des Typs I ist schon nach zwei Wochen post operationem diffus im Schnitt verteilt sichtbar, wobei die Kortikalis eine starke Intensität der Färbung aufweist. Im Frakturspalt ist zu diesem Zeitpunkt kein Kollagen des Typs I zu finden. In den nächsten Wochen steigt die Farbintensität der Nachweisreaktion für Kollagen I im Kallusgewebe an. Im Frakturspalt kommt es schnell zu einer teilweisen oder vollständigen knöchernen Überbrückung. Nach sechs Wochen post operationem ist bei allen Tieren der Frakturspalt knöchern überbrückt. Dann wird spätestens neun Wochen nach der Osteotomie eine Abgrenzung von Kallus und Kortikalis kaum mehr möglich. Der Frakturspalt lässt sich nur noch anhand der querverlaufenden Trabekel im Knochengewebe lokalisieren.

Die Dichte der Kortikalis war bei allen drei Kollagentypen zwei und drei Wochen nach der Osteotomie unverändert. Sechs Wochen nach der Operation lockerte sich die Kortikalis leicht auf und es waren Lakunen mit Osteoblasten und Osteoklasten im Knochengewebe zu sehen. Neun Wochen nach der Osteotomie war eine starken Auflockerung der Kortikalis festzustellen. Es waren viele Lakunen zu sehen und die Ränder der Kortikalis waren nur undeutlich begrenzt. Der Kallusumfang nahm zudem ab.

4.2.2 Kollagen I, II, III

Die Auswertung der Kollagennachweise fand, wie bereits in dem Kapitel „Methoden“ beschrieben, mit Hilfe der computergestützten Bildanalyse statt. Es wurden die Quadratmillimeter der angefärbten Fläche ermittelt und diese differenziert nach Kallusfläche und Fläche im Bereich des Frakturspalts im Diagramm dargestellt.

Quantitative Auswertung des immunhistologischen Nachweises von Kollagen I bezogen auf die Schnittfläche durch den Kallus respektive durch den Osteotomiespalt

Statistiken		Kollagenfläche im Kallus	Kollagenfläche im Osteotomiespalt
Wochen		Kollagen I	Kollagen I
2	Median	37,70	11,44
	Minimum	11,49	2,95
	Maximum	52,67	16,97
3	Median	34,78	10,87
	Minimum	13,72	5,64
	Maximum	59,12	19,39
6	Median	33,92	14,81
	Minimum	0	0
	Maximum	72,92	24,25
9	Median	52,86	19,63
	Minimum	18,49	9,26
	Maximum	75,95	32,19

Tab. 4.2-1: Messwerte (mm²) der spezifisch für Kollagen I gefärbten Fläche im Kallus und der im Osteotomiespalt über den Zeitraum von neun Wochen nach der Osteotomie der Tibia.

Die spezifisch für Kollagen Typ I angefärbte Fläche nahm im Bereich des Frakturspaltes während des Heilungsverlaufs zu. Der Median 11,44 mm² (2,95 mm² - 16,97 mm²) stieg vom Messzeitpunkt nach der zweiten Woche zum Messzeitpunkt nach der neunten Woche auf 19,63 mm² (9,26 mm² - 32,19 mm²) an. Diese Zunahme der Fläche war aber nicht signifikant.

Ergebnisse

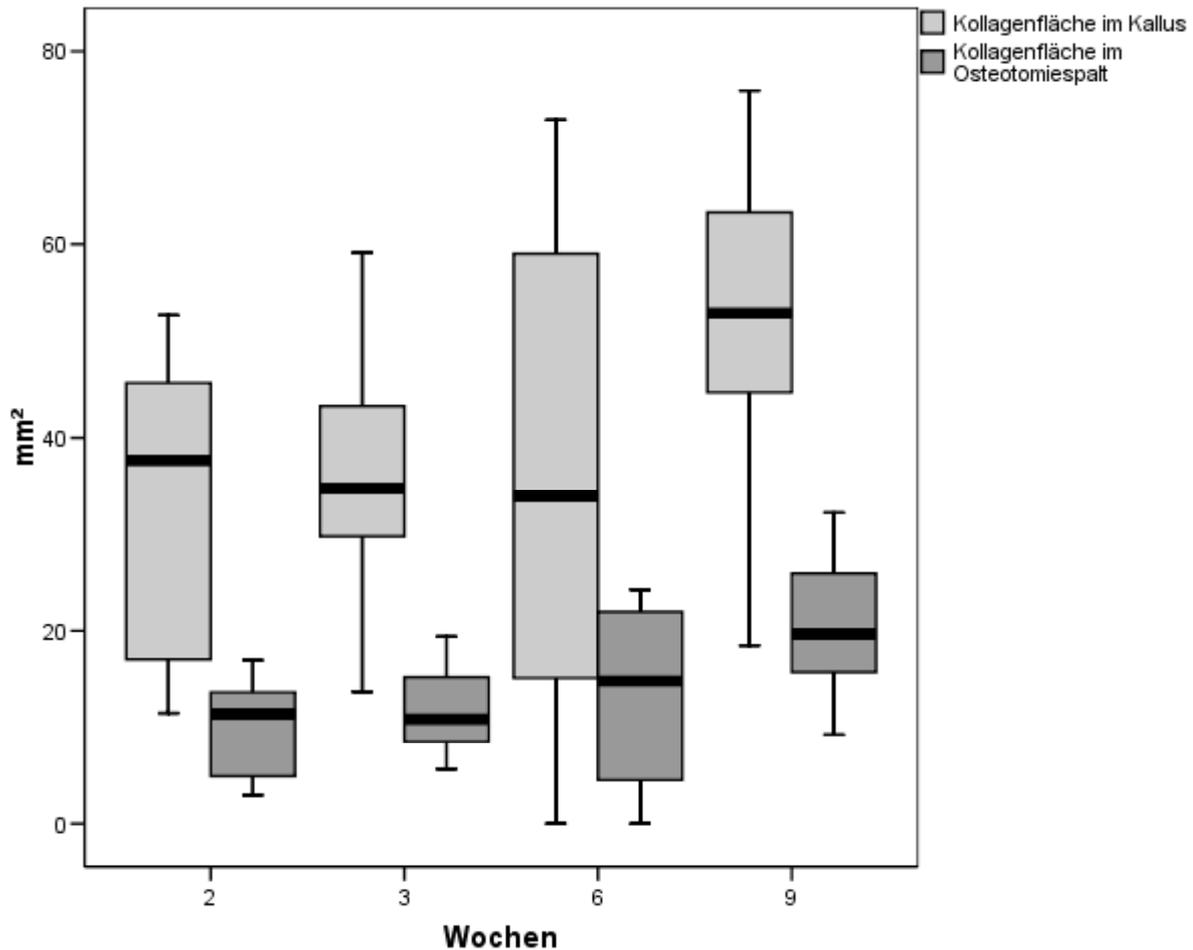


Abb. 4.2-1: Darstellung der Messwerte (mm²) der spezifisch für Kollagen I angefärbten Fläche im Kallus, getrennt für die Gesamt-ROI und für den Osteotomiespalt im Verlauf der Frakturheilung über neun Wochen.

In der gesamten ROI konnte nur nach der neunten Wochen post operationem eine vergrößerte Fläche von 52,86 mm² (18,49 mm² - 75,95 mm²) des Kollagen Typ I dargestellt werden. Zwischen der zweiten und dritten Woche sank die spezifisch für Kollagen I gefärbte Fläche um wenige Quadratmillimeter auf 34,78 mm² (13,72 mm² - 59,12 mm²) ab, blieb zum Zeitpunkt sechs Wochen post operationem mit 33,92 mm² (0,00 mm² - 72,92 mm²) relativ konstant und stieg dann nach der neunten Woche noch mal deutlich auf 52,86 mm² (18,49 mm² - 75,95mm²) an. Diese Unterschiede in der Größe der für Kollagen I spezifisch gefärbten Flächen zwischen den Untersuchungszeitpunkten sind nicht signifikant.

Quantitative Auswertung des immunhistologischen Nachweises von Kollagen II bezogen auf die Schnittfläche durch den Kallus respektive durch den Osteotomiespalt

Statistiken		Kollagenfläche im Kallus	Kollagenfläche im Osteotomiespalt
Wochen		Kollagen II	Kollagen II
2	Median	0,36	0,02
	Minimum	0	0
	Maximum	2,30	2,08
3	Median	5,68	3,29
	Minimum	0	0
	Maximum	9,51	9,00
6	Median	4,72	2,82
	Minimum	0,98	0,74
	Maximum	7,79	7,55
9	Median	1,61	1,01
	Minimum	0	0
	Maximum	3,40	2,44

Tab. 4.2-2: Ergebnisse der gemessenen, spezifisch für Kollagen II angefärbten Fläche (mm²) im Kallus und im Osteotomiespalt über den Zeitraum von neun Wochen nach der Osteotomie.

Die spezifisch für Kollagen Typ II angefärbte Fläche vergrößerte sich im Frakturspalt von 0,02 mm² (0,00 mm² - 2,08 mm²) in der zweiten Woche bis zur dritten Woche signifikant ($p = 0,020$) auf 3,29 mm² (0,00 mm² - 9,00 mm²). In der gesamten ROI war ein tendenzieller Anstieg von der zweiten Woche 0,36 mm² (0,00 mm² - 2,30 mm²) zur dritten Woche 5,68 mm² (0,00 mm² - 9,51 mm²) festzustellen. In der dritten Woche erreichte die Fläche spezifisch für Kollagen Typ II sein Maximum und fiel dann ab. Dieses galt für den Frakturspalt sowie für den gesamten Kallus. Von der sechsten zur neunten Woche verkleinerte sich die spezifisch für Kollagen-Typ II angefärbte Fläche (Tab.4.2.2-2) sowohl im Frakturspalt als auch in der gesamten ROI signifikant ($p = 0,014$). In der neunten Woche war diese angefärbte Fläche immer noch größer als in der zweiten Woche.

Ergebnisse

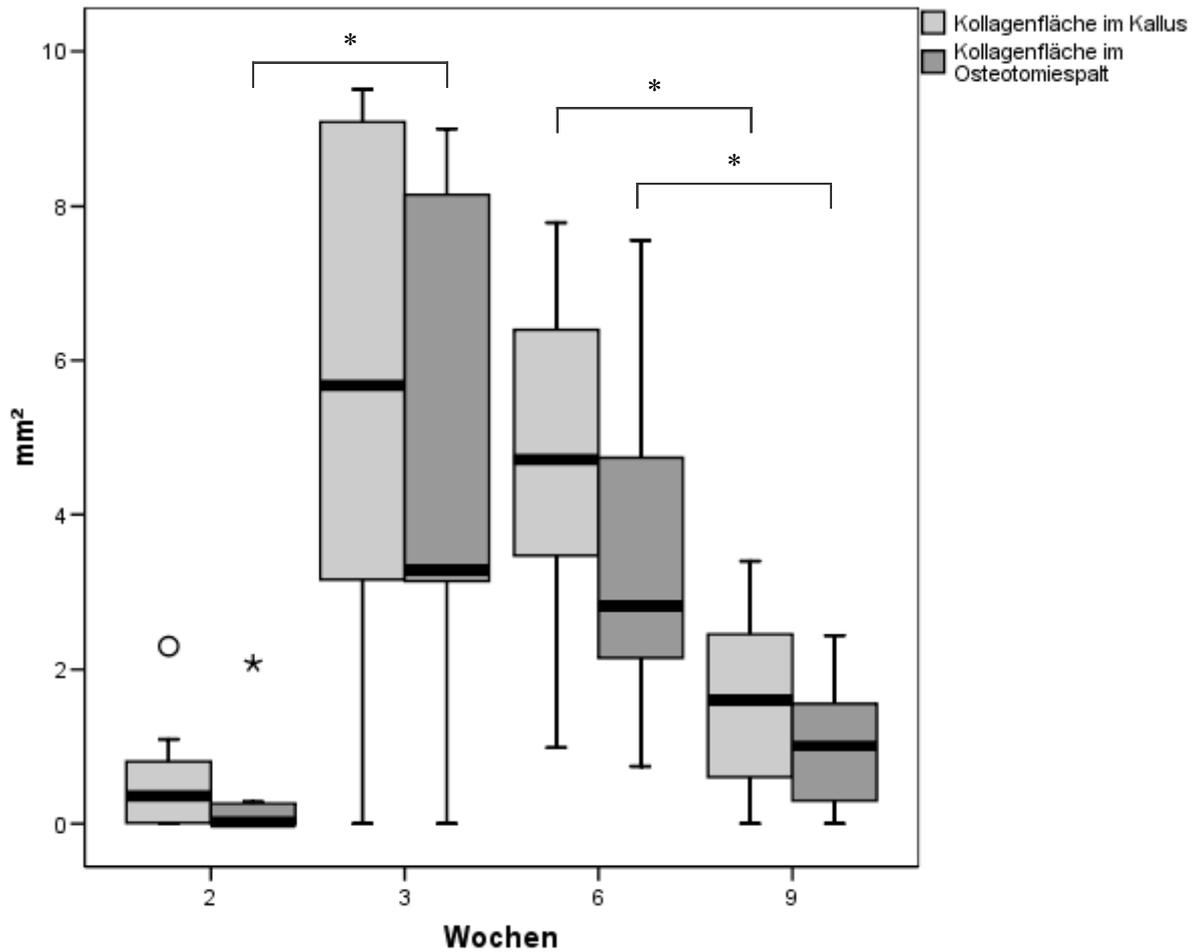


Abb. 4.2-2: Darstellung der Kollagen II-Verteilung im Kallus, getrennt für die Gesamt-ROI und für den Osteotomiespalt. Zwischen der zweiten und dritten Woche nach der Osteotomie gab es eine signifikante Vergrößerung der Kollagen II-Fläche im Frakturspalt ($p = 0,020$), zwischen der sechsten und der neunten Woche verkleinerte sich die Kollagenfläche in beiden ROIs signifikant ($p = 0,014$).

Quantitative Auswertung des immunhistologischen Nachweises von Kollagen III bezogen auf die Schnittfläche durch den Kallus respektive durch den Osteotomiespalt

Statistiken		Kollagenfläche im Kallus Kollagen III	Kollagenfläche im Osteotomiespalt Kollagen III
Wochen			
2	Median	8,34	3,89
	Minimum	0,15	0,15
	Maximum	25,62	10,28
3	Median	10,01	3,81
	Minimum	5,34	1,57
	Maximum	56,06	21,52
6	Median	4,98	1,22
	Minimum	0,27	0,13
	Maximum	29,80	14,78
9	Median	1,21	0,80
	Minimum	0,08	0,01
	Maximum	15,38	4,99

Tab. 4.2-3: Ergebnisse der gemessenen, spezifisch für Kollagen III angefärbten Fläche im Kallus und im Osteotomiespalt.

Im Gesamtkallus veränderte sich die spezifisch für Kollagen Typ III angefärbte Fläche während des Untersuchungsverlaufes nur gering. In der zweiten Woche lag der Median der Fläche im Kallus bei 8,34 mm² (0,15 mm² - 25,62 mm²) und stieg in der dritten Woche auf 10,06 mm² (5,34 mm² - 56,06 mm²) an. Zu diesem Zeitpunkt gab es eine besonders große Differenz zwischen den einzelnen Tieren. Nach der sechsten Woche post operationem kam es zu einem Abfall der Kollagen III-Fläche auf 4,98 mm² (0,27 mm² - 29,80 mm²), der aber nicht signifikant war. Am Ende der Untersuchungsreihe war der Median der Kollagen Typ III-Fläche nur noch bei 1,21 mm² (0,08 mm² - 15,38 mm²), was deutlich unter dem ersten Wert lag.

Im Frakturspalt gab es eine stetige Verkleinerung der Kollagen Typ III Fläche von 3,89 mm² (0,15 mm² - 10,28 mm²) von der zweiten Woche bis zur neunten Woche auf 0,8 mm² (0,01 mm² - 4,99 mm²), die nicht signifikant war.

Ergebnisse

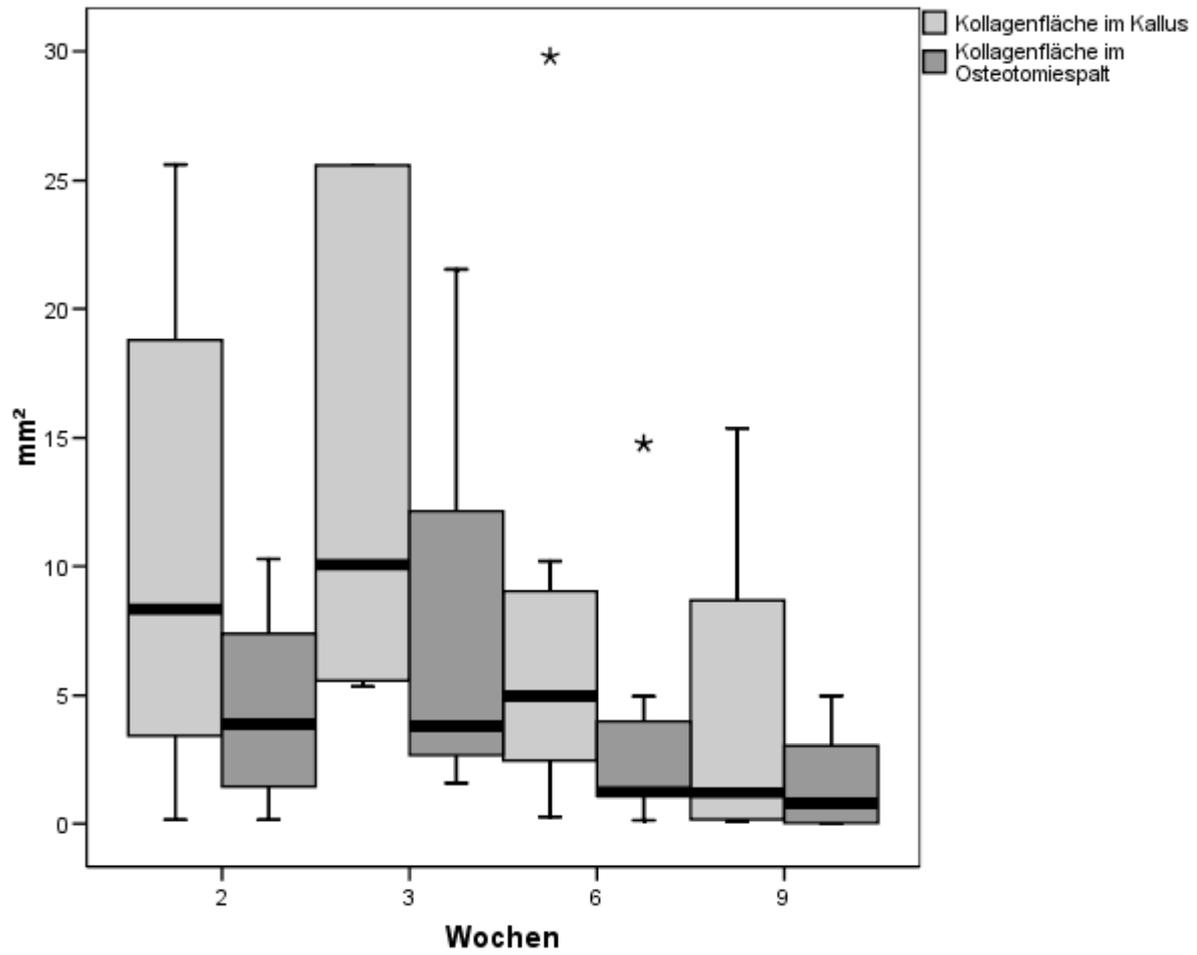


Abb. 4.2-3: Darstellung der Kollagen III-Verteilung im Kallus, getrennt für die Gesamt ROI und für den Osteotomiespalt.

4.2.3 Osteoklasten

Zahl der Osteoklasten im gesamten Kallus

Statistiken		Osteoklasten im gesamten Kallus
Wochen		
2	Median	50
	Minimum	34
	Maximum	211
3	Median	163
	Minimum	40
	Maximum	532
6	Median	209
	Minimum	30
	Maximum	831
9	Median	788
	Minimum	365
	Maximum	1034

Tab. 4.2-4: Ergebnisse der Osteoklastenzählung im gesamten Kallus.

Die Anzahl der Osteoklasten (OK) im gesamten Kallus stieg im Verlauf der Untersuchung, besonders zwischen der sechsten Woche [209 Ok (30 OK - 831 OK)] und der neunten Woche [788 OK (365 OK - 1034 OK)], an. Auch wenn kein signifikanter Unterschied zwischen den einzelnen Untersuchungszeitpunkten festgestellt wurde, gab es von der sechsten zur neunten Woche eine tendenzielle Zunahme der Osteoklastenanzahl ($p = 0,038$).

Ergebnisse

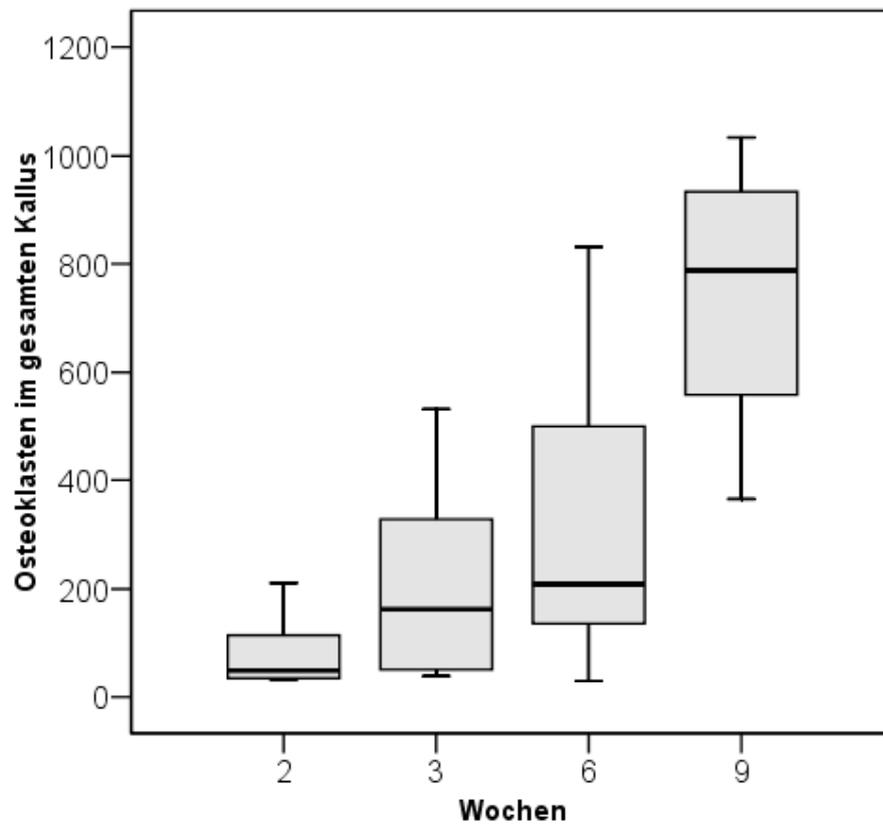


Abb. 4.2-4: Darstellung der Osteoklastenzahl im gesamten Kallus zwei, drei, sechs und neun Wochen nach der Osteotomie.

Zahl der Osteoklasten im periostalen Kallus

Statistiken		Osteoklasten im periostalen Kallus
Wochen		
2	Median	38
	Minimum	24
	Maximum	211
3	Median	129,5
	Minimum	20
	Maximum	477
6	Median	142
	Minimum	21
	Maximum	603
9	Median	339
	Minimum	139
	Maximum	382

Tab. 4.2-5: Ergebnisse der Osteoklastenzählung im periostalen Kallus über den Zeitraum von neun Wochen nach der Osteotomie der Tibia.

Im periostalen Kallus waren in der zweiten Woche schon einige Osteoklasten [38 Ok (24 OK - 211 OK)] vorhanden und die Anzahl der Osteoklasten stieg von der zweiten zur neunten Woche auf 339 Ok (139 OK – 382 OK) kontinuierlich an. Dieser Anstieg ist statistisch aber wegen der Schwankungsbreite der Anzahl nicht signifikant.

Ergebnisse

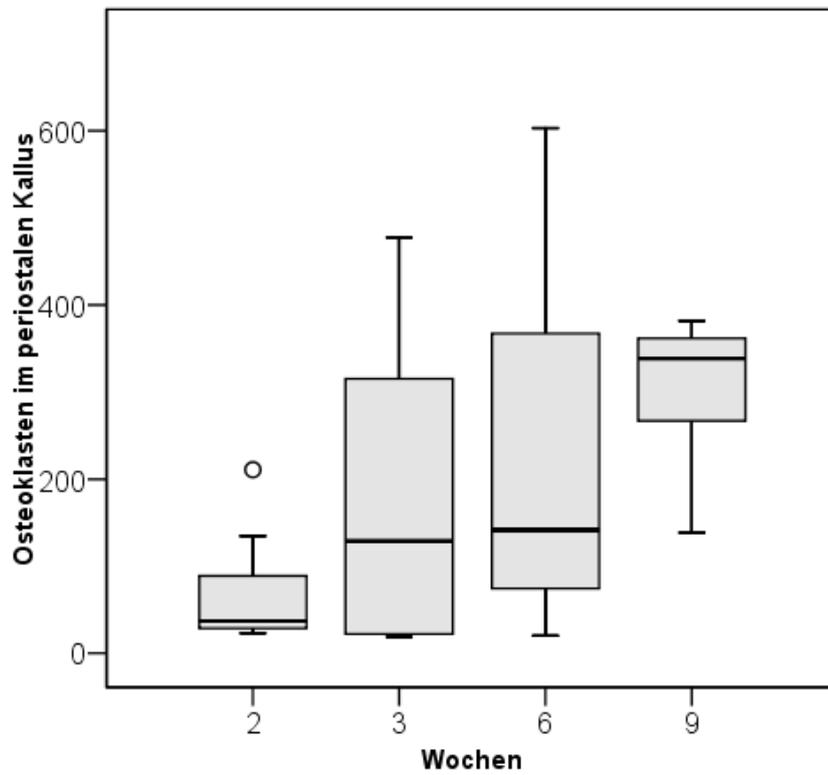


Abb. 4.2-5: Darstellung der Osteoklastenanzahl im periostalen Kallus zu vier Zeitpunkten nach der Osteotomie der Tibia.

Zahl der Osteoklasten im endostalen Kallus

Statistiken		Osteoklasten im endostal Kallus
Wochen		
2	Median	0
	Minimum	0
	Maximum	20
3	Median	9,5
	Minimum	0
	Maximum	54
6	Median	45
	Minimum	4
	Maximum	128
9	Median	153
	Minimum	56
	Maximum	228

Tab. 4.2-6: Ergebnisse der Osteoklastenzählung im endostalen Kallus der osteotomierten Tibia im Verlaufe der Heilung.

Im endostalen Kallus sah man zu Beginn der Untersuchung keine oder nur sehr wenige Osteoklasten [0 Ok (0 OK – 20 OK)]. Zum Ende des Untersuchungszeitraums gab es zwischen der sechsten Woche [45 OK (4 OK – 128 OK)] und der neunten Woche [153 OK (56 OK – 228 OK)] einen deutlichen Anstieg der Osteoklastenzahl. Dieser Anstieg war nicht signifikant. Es lies sich allerdings eine tendenzielle Erhöhung der Osteoklastenzahl im letzten Untersuchungsabschnitt zwischen der sechsten und neunten Woche post operationem ($p = 0,038$) nachweisen.

Ergebnisse

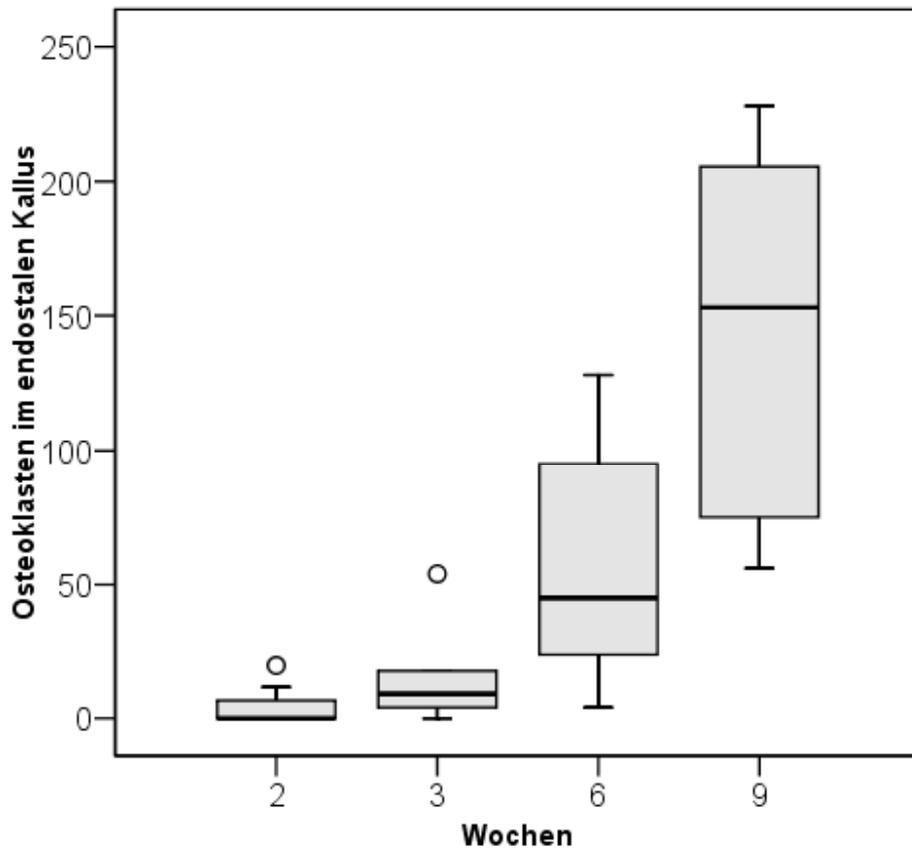


Abb. 4.2-6: Darstellung der Osteoklastenanzahl im endostalen Kallus zu den vier Untersuchungszeitpunkten.

Anzahl der Osteoklasten in der Kortikalis

Statistiken		Osteoklasten in der Kortikalis
Wochen		
2	Median	0
	Minimum	0
	Maximum	49
3	Median	11
	Minimum	2
	Maximum	44
6	Median	23
	Minimum	5
	Maximum	104
9	Median	269
	Minimum	95
	Maximum	639

Tab. 4.2-7: Ergebnisse der Osteoklastenzählung in der Kortikalis über den Zeitraum von neun Wochen nach der Osteotomie.

Im Bereich der Kortikalis der Tibia waren zu Beginn der Untersuchung nur sehr wenige Osteoklasten zu sehen [0 OK (0 OK – 49 OK)]. In der sechsten Woche stieg die Zahl der Osteoklasten deutlich auf 23 OK (5 OK – 104 OK) an und erhöht sich bis zur neunten Woche signifikant ($p = 0,001$) auf 269 OK (95 OK – 639 OK). Zugleich war eine deutliche Auflockerung der Kortikalis mit Lakunenbildung zu sehen.

Ergebnisse

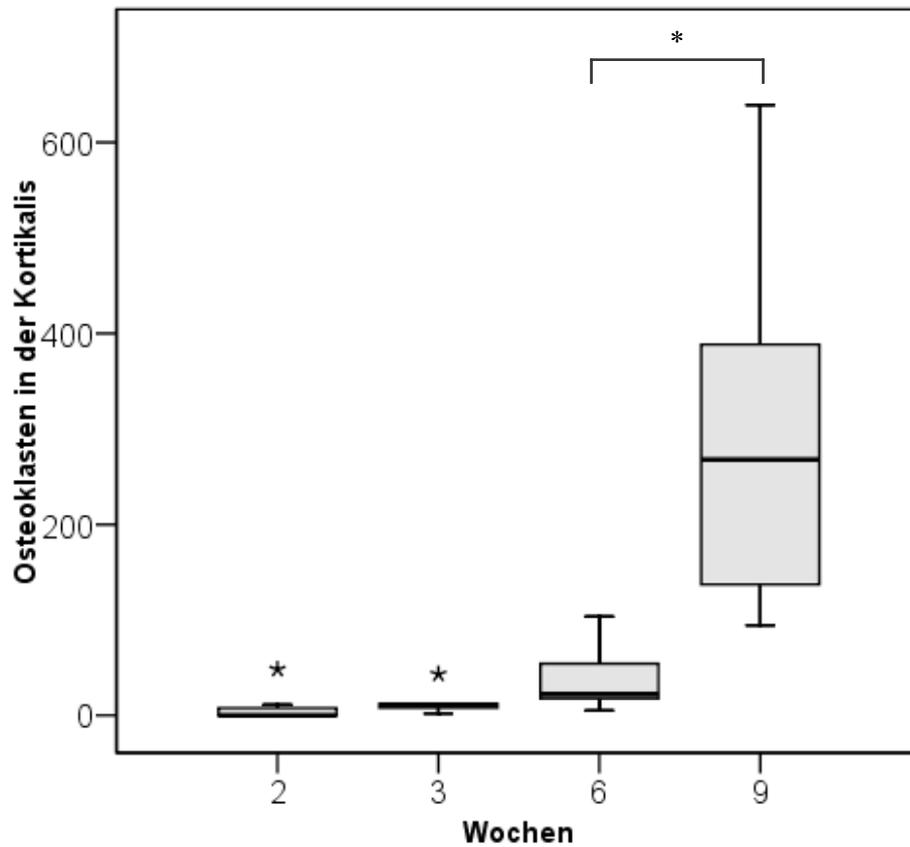


Abb. 4.2-7: Darstellung der Osteoklastenzahl in der Kortikalis zu vier Zeitpunkten nach der Osteotomie der Tibia. Von der sechsten zur neunten Woche war eine signifikant höhere Osteoklastenzahl ($p = 0,001$) festzustellen.

5 Diskussion

Ziel dieser Studie war es herauszufinden, ob die ausgewählten serologischen Parameter den Heilungsverlauf einer Fraktur beschreiben können.

Ein experimentelles Tiermodell wurde ausgewählt, um die serologischen Ergebnisse mit den histologischen Analysen der Kallusformation im Zuge der Frakturheilung zu vergleichen. Zu diesem Zweck wurde die Osteotomie der Tibia des Schafes ausgewählt. Tibiaschaftfrakturen entstehen häufig durch Hochenergieverletzungen, die vor allem bei jungen aktiven Menschen auftreten. Zehn bis zwanzig Prozent dieser Frakturen weisen Heilungsstörungen auf, die im Extremfall zur Amputation des Unterschenkels führen (Webb et al., 2000).

5.1 Tiermodell

Das Tiermodell ermöglicht im Gegensatz zu klinischen Studien einen standardisierten Untersuchungsablauf unter genormten Bedingungen (Roach et al., 1989). Es ist grundsätzlich den „in vitro“ Modellen für Knochenstoffwechsel überlegen, da es auch systemische Veränderungen im gesamten Organismus darstellen kann (Schaller et al., 2005).

Die Auswahl des Tiermodells hängt von unterschiedlichsten Faktoren ab. An erster Stelle steht hier die eigentliche Fragestellung oder Hypothese. Der Versuchsaufbau wird so gewählt, dass eine gute Korrelation zwischen den Ergebnissen aus dem Versuch und der klinischen Situationen möglich ist (Aerssens et al., 1998). Es gibt kein ideales Modell für die Untersuchung von Knochenerkrankungen. Die Verwendung der verschiedenen Spezies haben alle ihre Vor- und Nachteile (Aerssens et al., 1998). Es ist unwahrscheinlich, dass ein Tiermodell den Heilungsverlauf von Knochenfrakturen im Menschen vollständig und deckungsgleich nachahmen kann, aber um bestmögliche Resultate zu erzielen, müssen einige Faktoren beachtet werden. Dabei spielen die Größe und das Gewicht des Tieres eine wichtige Rolle, sowie eine ähnliche anatomische und histologische Knochenstruktur und die Geschwindigkeit, in der der Knochen heilt. Weiterhin muss die Möglichkeit der Haltung unter genormten Bedingungen gewährleistet sein, was bei großen Tieren (z. B. Rind) schwierig sein kann (Roach et al., 1989). Keines der üblicherweise verwendeten Tiere wie Hund, Schwein, Ratte, Schaf entspricht allen diesen Kriterien und es gibt auch bei allen Spezies interindividuelle Unterschiede in der Frakturheilung (Aerssens et al., 1998).

Das Schaf wurde in dieser Studie als Versuchstier gewählt, da es sich im Besonderen für die Untersuchung von Osteosyntheseimplantaten eignet, die für den Menschen verwendet werden, weil es in Größe und Gewicht in etwa dem Menschen entspricht. Auch die Stellung und Belastung der Tibia ist ähnlich der des Menschen. Der Heilungsverlauf entspricht außerdem zeitlich dem humanen Frakturheilungsgeschehen. Auch die Haltung von Schafen in kleinen Gruppen unter einheitlichen

Diskussion

Bedingungen ist gut durchzuführen. Schafe belasten die Gliedmaße schnell nach der Osteosynthese und benagen oder belecken weder die Fixationshilfe noch die Wunde.

Die Ergebnisse der vorliegenden Osteotomie-Studie bestätigen den zeitlichen Ablauf der Frakturheilung beim Schaf. In der Versuchsgruppe war neun Wochen nach der Operation histologisch eine vollständige Durchbauung des Osteotomiespaltes nachzuweisen, wobei die neugebildeten Knochenlamellen quer zum Knochenschaft ausgerichtet waren. Eine histologische Struktur des Schafsknochens, die unterschiedlich zu der im humanen Knochen sein soll, wie von Eitel und Mitarbeitern (1981) beschrieben, konnte in dieser Studie nicht nachgewiesen werden. In den histologischen Präparaten waren Havers'sche Systeme (Osteone) zu sehen und nicht die von Eitel und Mitarbeitern beschriebenen, mit Geflechtknochen umgebenen Primärosteone (Eitel et al., 1981 b).

Die operierten Tiere und die Kontrollgruppe wurden randomisiert aus einer homogenen Gruppe für die einzelnen Untersuchungszeiträume ausgewählt. Durch die zusätzliche Analyse der gleichen serologischen Parameter bei den Lämmern bestätigte sich, dass noch im Wachstum befindliche Tiere deutlich veränderte, meist höhere serologische Ausgangswerte haben.

Während des Versuchs zeigte sich außerdem, dass trotz objektiver Auswahlkriterien jedes dieser Tiere bezüglich der ausgewählten Serumparameter und des Heilungsverlaufes der Osteotomie ein Individuum ist.

5.2 Methoden

Die Fraktur bzw. die Osteotomie wurde in dieser Studie mit einem steifen Fixateur externe versorgt, der in Bezug auf das gesamte Projekt nach biomechanischen Gesichtspunkten ausgewählt wurde. Der Frakturspalt wurde mit Hilfe einer Schablone auf genau drei Millimeter eingestellt, was einer standardisierten Ausgangssituation entsprach. Die regelmäßige sorgfältige Pflege der Pins durch medizinisches Fachpersonal konnte die Pininfektionen auf ein Minimum reduzieren und damit einen Einflussfaktor auf den Heilungsverlauf eliminieren. In neun Wochen heilte bei allen Tieren die Tibiaosteotomie aus.

5.2.1 Blutentnahme

Die Blutentnahme erfolgte an der Vena cephalica mit einem Katheter der Stärke 18G, der die relativ große Entnahmemenge zügig ermöglichte. Da sie vor dem Versuch an Menschen gewöhnt wurden, waren die Tiere bei der Blutentnahme verhältnismäßig entspannt. Das Blut wurde immer zwischen zehn und zwölf Uhr morgens entnommen und sofort weiter bearbeitet. Dadurch wurde vermieden, dass tageszeitliche Schwankungen die Analyse der serologischen Parameter beeinflusst (Ladlow et al., 2002; Schmolke, 2001). Um möglichst standardisierte Ergebnisse zu erhalten, wurde das Blut erst nach einer halben Stunde bei 4°C für zehn Minuten zentrifugiert, um eine ausreichende Gerinnung zu gewährleisten, und sofort danach abpipettiert und bei – 80°C eingefroren. Dieses Vorgehen ist insbesondere bei TRAP und Osteocalcin wichtig, da diese bei Raumtemperatur nur zirka acht Stunden stabil sind (Allen, 2003; Hannon et al., 2004). Für die Auswertung der einzelnen Parameter wurden die Proben in die verschiedenen Labore verschickt (siehe Tabelle 3.9.-1) und dazu auf Trockeneis verpackt. Die Proben erreichten ihre Ziele unversehrt und gefroren und wurden weiterhin bis zur Untersuchung gefroren gelagert.

Diskussion

5.2.2 Auswertung der Serumparameter

Die Verwendung der Elisias bzw. der RIAs erfolgte standardisiert nach den Herstellerangaben, wobei immer eine Doppelbestimmung durchgeführt wurde. Kam es zu Differenzen von mehr als 15 % zwischen den Ergebnissen der Erst- und Zweitmessung, wurde ein drittes Mal nachgemessen. Um in der Analyse der verschiedenen Serumparameter gleiche Testbedingungen zu gewährleisten, wurden die gesammelten Proben eines Tieres über den gesamten Untersuchungszeitraum von neun Wochen auf einer Platte zusammen getestet.

5.2.3 Histologische Aufarbeitung

Die histologische Aufarbeitung der Schafstibia erfolgte in transversaler Ebene, so dass eine Beurteilung des Kallus in seiner gesamten Längsausdehnung möglich war. Auch wenn der histologische Schnitt nur eine zweidimensionale Darstellung des Frakturspalts ermöglicht, sieht man innerhalb der ROI die Querausdehnung und den Inhalt des Frakturspalts. Um eine dreidimensionale Darstellung des Frakturgebietes zu bekommen, hätten Serienschnitte angefertigt werden müssen (Parfitt, 1988). Dies ist sehr zeitaufwendig und kostenintensiv. Bei dieser Untersuchung wurden durch die drei Kollagenfärbungen und die HE-Färbung pro Tier jeweils vier Schnitte angefertigt, die einen repräsentativen Überblick über den zentralen Bereich des Frakturspaltes gegeben haben.

Für die immunhistologischen Nachweise wurden Antikörper gegen bovine Antigene (z. B. Anti-bovine Kollagen I, II oder III) gewählt, da keine Antikörper gegen Schafkollagene kommerziell erhältlich sind. Die ausgewählten Antikörper kreuzreagieren nach Herstellerangaben mit den entsprechenden Schafkollagenen. Diese Kreuzreaktion wurde durch die Ergebnisse der Positivkontrolle (Gewebe vom Rind) und der in den Schafgeweben bestätigt, während gleichzeitig die Negativkontrolle nicht angefärbt war, was eine unspezifische Bindung der Sekundäntikörper oder der chromogenen Nachweisreaktion als falsch positive Ergebnisse ausschloss.

5.2.4 Computergestützte Bildanalyse

Die Auswertung der immunhistologisch gefärbten Schnitte für die Kollagene I, II und III erfolgte in der computergestützten Bildanalyse. Teile der festgelegten ROI wurden hierbei vom Untersucher markiert (z. B. Breite des Kallus). Da dieser Vorgang subjektiv war, barg dieses eine Fehlerquelle. Auch das Markieren der Kallusgrenzen und der Kortikalis, sowie die Einstellung der Farbtintensität für die vom Computerprogramm vorgenommene halb-automatische Flächenmessung sind von der individuellen Einschätzung des Untersuchers abhängig. Bei Kollagen II und III gab es nur geringe Differenzen zwischen den Ergebnissen, was auf die deutliche Abgrenzung der gefärbten Bereiche vom restlichen Gewebe zurückzuführen ist. Bei Kollagen I war die Differenz deutlich höher, da hier die Einstellung der

Färbintensität, die vom Computerprogramm als positives Signal für die Flächenmessung gewertet wird, sehr stark subjektiv beeinflusst war. Besonders in den Tibiapräparaten, die neun Wochen nach der Osteotomie entnommen worden waren, konnte der histologische Schnitt nur schwer objektiv beurteilt werden, da die immunhistologische Nachweisreaktion den gesamten Schnitt diffus rosa färbte. In diesem Falle war auch die Abgrenzung der Kortikalis erschwert. Um möglichst genaue Ergebnisse zu bekommen und die Kortikalisgrenzen besser zu finden, wurde das Präparat parallel zur Bildanalyse in einer HE-Färbung unter dem Mikroskop angeschaut, so konnten die Grenzen der Kortikalis besser festgelegt werden.

5.2.5 Osteoklastenzählung

Die Auszählung der Osteoklasten konnte aufgrund der schwachen Anfärbung der Osteoklasten nicht mit Hilfe der computergestützten Bildanalyse vorgenommen werden. Bei der Auswertung der Osteoklasten wurde deshalb eine Plexiglasplatte zu Hilfe genommen, die über den histologischen Schnitt gelegt wurde. Sie markierte die ROI und sorgte gleichzeitig für Übersichtlichkeit im Schnitt, indem sie die Mitte des Frakturspaltes definierte. Die ROI entsprach der im Computerprogramm für die Kollagenauswertung definierten ROI.

Die spezifische Markierung der Osteoklasten wurde mit dem Nachweis des Enzyms saure Phosphatase durchgeführt, die auch in Makrophagen enthalten ist. Diese Methode führt zu einem geringen Fehler bei der Osteoklastenzählung, da durch die Markierung allein nicht zwischen diesen beiden Zellarten unterschieden werden kann. Es wurden aber ausschließlich mehrkernige Zellen an Knochenoberflächen gezählt, um keine Makrophagen mitzuzählen, die nur einen Zellkern enthalten.

Es war zudem auch möglich, Osteoklasten durch eine spezifische Färbung von TRAP darzustellen, da diese beim Schaf etabliert wurde. Die TRAP gibt es nur in ausdifferenzierten Osteoklasten, aber auch hier kommt es teilweise zur Anfärbung von Makrophagen (Halleen et al., 2001). Diese Färbung hat aber den Vorteil, dass sie dunkler und kräftiger anfärbt, was eventuell eine automatisierte Zählung mit Hilfe der computergestützten Bildanalyse ermöglicht und die manuelle Zählung, wie sie in der vorliegenden Arbeit vorgenommen wurde, bestätigen kann.

5.3 Ergebnisse

Um eine möglichst normal verlaufende Frakturheilung der Osteotomie der Tibia zu untersuchen, wurde mit dem Fixateur externe ein relativ steifes Fixationssystem gewählt, was sich in vorigen Untersuchungen als gut geeignet herausgestellt hat (Klein et al., 2003; Klein et al., 2004). In dieser Untersuchung wurde bei allen operierten Tieren eine sekundäre Frakturheilung erreicht, die mit der Ausbildung eines zuerst weichen und dann harten Frakturkallus verbunden war. Der weiche Kallus

Diskussion

wurde ab der dritten Woche nach der Fraktur umgebaut und mineralisiert. Es entwickelte sich dadurch ein harter Kallus, der in der sechsten Woche nach der Ostotomie seine größte Ausdehnung erreichte. Danach diente der Umbauprozess des Kallus nur noch der Wiederherstellung der normalen Tibiakontur (Remodelling).

Die präoperativen Normalwerte und die postoperativen Verlaufskurven der ausgewählten Serumparameter zeigten während der Frakturheilung starke inter-individuelle Variationen. Dieses stimmt mit den Ergebnissen zu Serumparametern vorausgegangener humanmedizinischer Studien überein (Ohishi et al., 1998). Bei allen Serumparametern wurden signifikante Veränderungen im Verlaufe der Frakturheilung festgestellt, die überraschenderweise auch in der Kontrollgruppe auftraten. Die Erwartungen in Bezug auf die Kontrollgruppe waren, im Rahmen der individuellen Schwankungen bei ausgewachsenen Tieren, gleichbleibende Serumspiegel als Vergleichswerte zu gewinnen. Es gab aber in der Kontrollgruppe bei den Parametern sALP, Osteocalcin, TRAP und COMP über den gesamten Untersuchungszeitraum von neun Wochen einen deutlichen Abfall der Werte auf bis zu 60 % des Ausgangswertes. Der Grund für diesen Abfall ist nicht klar, könnte aber mit den Haltungsbedingungen zusammenhängen. Die Aufstallungsbedingungen führten zu einer starken Bewegungseinschränkung der davor in größeren Herden gehaltenen Tiere. Wahrscheinlich führte diese Bewegungseinschränkung zu einem signifikanten Abfall des Stoffwechselumsatzes, insbesondere im Knochen- und Bindegewebe. Dieses ist beachtenswert, denn alle Tiere wurden vor Beginn der Untersuchung gleichermaßen ca. sechs Wochen akklimatisiert und hatten in dieser Zeit und während der Untersuchung den gleichen eingeschränkten Bewegungsrahmen. Auffällig ist hierbei, dass dieser Effekt des reduzierten Knochen- und Bindegewebsstoffwechsels lange anhielt. Über die sechs Wochen der Akklimatisation hinaus bis zum Ende der Studie konnte über 15 Wochen hinweg ein Abfallen der meisten Serumparameter in der operierten Gruppe und auch in der Kontrollgruppe registriert werden. Das legt nahe, dass die Verhaltensänderungen eines Patienten nach einer Fraktur Einfluss auf die Sensitivität der Serumparameteranalyse haben und dass damit die Schlussfolgerungen auf den Fortschritt der Frakturheilung verfälschen. Aufgrund der Ergebnisse dieser Studie kann davon ausgegangen werden, dass die Auswirkungen durch die Bewegungseinschränkung und den Stress der Untersuchung auf die Serumparameter größer sind, als die Veränderungen durch die umschriebene, relativ kleine Fraktursituation. Bei größeren Frakturen, Multitraumata im Bereich der Knochen oder verzögerter Frakturheilung ist vielleicht ein deutlicherer Anstieg der gewählten Serumparameter zu erwarten, was die Aussagekraft dieser Serumparameter für die Beurteilung des Fortschrittes einer Frakturheilung erhöhen würde.

Das Absinken der sALP Werte in der Gruppe der operierten Tiere wurde auch in anderen Studien beobachtet und kann mit der Stoffwechseldepression nach einem Trauma oder einer Knochenoperation in Verbindung stehen (Bail et al., 2001; Volpin et al., 1986).

Die Verlaufskurve der Serumwerte der operierten Tiere war zeitweise angehoben, aber dieser Anstieg blieb meistens unterhalb des präoperativen Wertes. Der durch die Bewegungseinschränkung verursachte Einfluss auf den Abfall der Serumwerte wäre ohne die Werte der Kontrollgruppe nicht sichtbar gewesen. Es zeigte sich nur im Vergleich der beiden Gruppen bei den operierten Tieren eine geringe Erhöhung einiger Serumparameter. Dieses war besonders bei sALP über die letzte Hälfte des Untersuchungsverlaufs der Fall. Die Serumparameterwerte in der Gruppe der operierten Tiere stellten sich zu bestimmten Zeitpunkten so dar, als würden sie durch die Frakturheilung beeinflusst werden, aber ohne die Werte der Kontrollgruppe, die über die Zeit abgefallen sind, wären diese Veränderungen nicht zu erkennen gewesen oder missinterpretiert worden. Die Ergebnisse zeigen aber deutlich, dass das Phänomen des bewegungsabhängigen Rückgangs des Knochenbindegewebsstoffwechsels beide Gruppen identisch beeinflusst. Dieser Einfluss wäre ohne Kontrollgruppe im Tierversuch und auch nicht in einer Gewebe- oder Zellkultur nicht zu ermitteln gewesen, was die Bedeutung eines Tierversuches belegt und den Aufwand für diesen rechtfertigt.

Die Reaktion der einzelnen Tiere auf die Fraktur (Osteotomie der Tibia) ist stark individuell geprägt, was auch in anderen Studien mit humanen Probanden ermittelt wurde (Ohishi et al., 1998). Bei allen Tieren war ein Abfall der serologischen Marker direkt nach der Operation bemerkenswert. Dieses ist mit einer postoperativen Depression des gesamten Körperstoffwechsels zu erklären, die nach einer Heilungsperiode von zwei Wochen nicht mehr erkennbar war. Im Gegensatz zu dieser Studie wird bei klinischen Studien der Referenzwert für einen bestimmten Serumparameter erst nach dem traumatischen Ereignis beziehungsweise nach der Operation ermittelt, was genau den Zeitpunkt der posttraumatischen Depression trifft. Demzufolge kann der Anstieg der Serumspiegel verschiedener Marker, der ein paar Tage nach dem Trauma erfolgt, missinterpretiert werden (Yu-Yahiro et al., 2001). Dieser „anscheinende“ Anstieg des Serumspiegels stellt sich in dieser Studie als Wiederherstellung der ursprünglichen Level der Parameter vor einer posttraumatischen Depression dar und nicht als signifikante Veränderung nach der Operation. Die Reaktion der serologischen Marker auf die Fraktur bzw. Frakturheilung wird durch diese Wiederherstellung des präoperativen Levels maskiert oder die Veränderungen sind so gering, dass sie nicht signifikant sind. Deshalb sind die ausgewählten Marker ohne Messwerte ihrer präoperativen Serumspiegel nicht für die Verlaufskontrolle von Frakturheilungsprozessen geeignet.

5.3.1 Serumparameter und Histologie

In Gegensatz zu Studien, die in der Humanmedizin bei Frakturpatienten durchgeführt wurden, konnten in dieser Studie beim Knochenheilungsprozess kein Anstieg der PICP Werte festgestellt werden (Joerring et al., 1994; Kurdy, 2000; Lotz et al., 1999). Der Verlauf der PICP-Serumwerte zeigte große Unterschiede im Verlaufe der Frakturheilung, obwohl immer der gleiche morgendliche

Diskussion

Entnahmezeitpunkt genau eingehalten wurde, um diesen Einfluss auf den Serumspiegel auszuschließen. Das lässt den Schluss zu, dass PICP für die Kontrolle der Frakturheilung nicht nutzbar ist, insbesondere nicht für die tägliche Routine im Klinikalltag, die eine solche regelmäßige Blutentnahme erschwert.

In dieser Studie konnte kein Anstieg der PIIINP Werte in der frühen Heilungsphase festgestellt werden, wie dieses von anderen Autoren beschrieben wurde (Joerring et al., 1992; Kurdy et al., 1998). Im Gegensatz dazu konnte ein Anstieg zu einem späteren Zeitpunkt in der fünften Untersuchungswoche festgestellt werden, der histologisch mit dem nachgewiesenen Kallusumbau von weichem in harten Kallus übereinstimmt. PIIINP ist laut anderer Studien ein Marker sowohl für die Formation von weichem Kallus als auch für den Abbau desselben. In dieser Untersuchung scheint der Serumspiegel von PIIINP mehr durch den Abbau des weichen Kallusgewebes verursacht worden zu sein, da PIIINP zu einem Zeitpunkt freigesetzt wurde, wo sich der Kallus von Kollagen III in Kollagen I umbaut und dann mineralisiert.

In der vierten postoperativen Woche beginnt der Serumspiegel von sALP anzusteigen und dieser Anstieg weist auf Veränderungen der Knochenformation hin. Hier gibt es eine gute Übereinstimmung mit vorangegangenen humanmedizinischen Untersuchungen, die ebenfalls eine Erhöhung der systemischen sALP-Werte einige Wochen nach der Fraktur beschreiben (Emami et al., 1999; Joerring et al., 1994; Kurdy et al., 1998; Lammens et al., 1998). Aber auch hier spielt die unbehandelte Kontrollgruppe eine wichtige Rolle, um diesen Anstieg des Serumspiegels von sALP zu bewerten, denn ohne den Vergleich mit den Werten in der Kontrollgruppe wäre diese Erhöhung der sALP-Werte nicht erkannt worden, denn sALP zeigte die deutlichste bewegungsabhängige Depression von allen Parametern. Außerdem zeigt der Serumspiegel von sALP die größten interindividuellen Schwankungen aller serologischen Parameter. Parallel zum Anstieg des Serumspiegels von sALP zeigt der histologische Schnitt eine auf den ersten Blick gute Übereinstimmung mit der Mineralisation des harten Kallus. Die Zunahme der Fläche des harten Kallus ist in der histologischen Auswertung besonders in den Präparaten von der dritten im Vergleich zu denen aus der sechsten Woche markant. Es stellt sich die Frage, ob der Anstieg der sALP-Werte ausschließlich den Fortschritt in der Frakturheilung widerspiegelt oder ob diese Erhöhung eine Folge von Veränderungen im Gesamtstoffwechsel des Probanden ist.

Der Verlauf der Osteocalcin-Werte dieser Versuchsreihe scheint am wenigsten durch Variationen von Tag zu Tag beeinflusst zu sein. Außerdem zeigt der Serumspiegel von Osteocalcin die geringsten inter-individuellen Unterschiede. Das lässt vermuten, dass mit der Bestimmung des Serumspiegels von Osteocalcin auch kleinere Veränderungen des Knochenstoffwechsels nachgewiesen werden können. Osteocalcin korreliert gut mit dem Calcium- und Phosphorspiegel im Serum (Anhang), die jeweils bei der Routineuntersuchung jeden Messzeitpunktes mitbestimmt wurden. Es stellt sich die Frage, ob der stetige Anstieg der Osteocalcin-Werte im Serum der operierten Tiere mit der

Mineralisation des Kallus zusammenhängt, oder ob nur der präoperative Ausgangswert wieder erreicht wird. Was der Grund für den deutlichen Abfall der Werte der Kontrollgruppe in der vierten Woche ist, bleibt unklar.

Die TRAP-Werte im Serum der operierten Tiere sanken ab der vierten Woche nach der Operation. Dieses könnte mit der Reduktion der Knochenresorption durch die Osteoklasten zusammenhängen. Gegen Ende der Frakturheilung steigen die TRAP-Werte wieder geringfügig an, was darauf schließen lässt, dass der neu geformte Knochen seiner Funktion entsprechend durch die Aktivität der Osteoklasten umstrukturiert wird. Die Belastung der Gliedmaße und die damit verbundenen Umbauvorgänge führen letztendlich durch Remodelling zu einer Form, die optimal an die auf den Knochen einwirkenden Zug- und Druckkräfte angepasst ist. Histologisch stellen sich die Osteoklasten kurz nach der Fraktur in ihrer Anzahl relativ unverändert dar, scheinen aber die ersten Tage nach der Fraktur inaktiv zu sein, was auch den Kurvenverlauf der TRAP-Serumlevel widerspiegelt. Die TRAP-Werte der operierten Tiere fallen kurz nach der Operation deutlich ab und steigen dann wieder auf den präoperativen Wert an. Es gibt kurz nach der Fraktur einen Zeitraum, in dem anscheinend die normalen von Osteoklasten bewerkstelligten Umbauvorgänge im Knochengewebe zum Erliegen kommen. In der sechsten Woche ist auch im gesamten Kallus ein tendenzieller Anstieg der Anzahl der Osteoklasten zu verzeichnen, die bis zur neunten Woche noch weiter ansteigt. Die Osteoklasten bauen den Geflechtknochen des Kallus ab und bilden Lakunen, in denen Osteoblasten neuen Knochen aufbauen. Dieses lässt den Schluss zu, dass die Struktur der Kortikalis systematisch umgebaut wird, um sich den neuen Belastungsbedingungen anzupassen (Schell et al., 2006). TRAP ist somit als Marker für die Knochenresorption grundsätzlich geeignet (Halleen et al., 2001). Um einen Anstieg der TRAP-Werte im Verlaufe einer Frakturheilung zu erkennen und entsprechend zu bewerten, benötigt man aber den Ausgangswert des TRAP-Serumspiegels des jeweiligen Individuums.

5.3.2 Knorpelparameter und Histologie

In Übereinstimmung mit anderen Studien, die besagen, dass die Stabilität der Frakturversorgung für die Menge des im Kallus gebildeten Knorpels verantwortlich ist, wurde während der gesamten Heilungsperiode bei dem in dieser Studie angewandten steifen Fixateur externe eine vergleichsweise kleine Menge Knorpel gefunden (Hietaniemi et al., 1995; Hietaniemi et al., 1998). Zu allen untersuchten Zeitpunkten war das Knorpelgewebe hauptsächlich in der Gap-Region, also im Kallus auf Höhe des Frakturspalts, zu finden. Man kann also schlussfolgern, dass die mechanischen Konditionen im Frakturspalt anders sind als in den anderen peripheren Kallusregionen, denn dort kommt es zur direkten Knochenformation durch intramembranöse Ossifikation (Augat et al., 1998; Claes et al., 1998). Die direkte Knochenformation in den peripheren Kallusbereichen wird durch die

Diskussion

Nähe zur intakten Kortikalis und durch die Überreste der Knochenhaut gefördert, denn letztere ist eine potente Quelle für Zellen der Knochenformation (Einhorn, 1998). Darüber hinaus wurde Knorpelgewebe in Bereichen gefunden, die wahrscheinlich am weitesten entfernt von neu gebildeten Kapillaren waren. Die Gefäßversorgung ist für die Knorpelbildung und auch für die Knorpelresorption unerheblich (Ford et al., 2003). In dieser Studie war der Übergang zwischen Kallus und interkortikalem Frakturspalt die Region, die am weitesten von neu wachsenden Kapillaren aus dem Periost und dem Endost der Markhöhle entfernt war (Einhorn, 1998).

Der Verlauf der COMP-Werte im Serum zeigte während der Frakturheilung eine deutliche Korrelation mit der histologisch nachgewiesenen Entwicklung von Knorpel. Der COMP-Level sank in den ersten zwei postoperativen Wochen ab, wobei zwei Wochen nach der Operation Knorpel histologisch sichtbar war. Auf der einen Seite weist dieser postoperative Abfall auf eine Aktivitätseinschränkung hin, die zu einem generalisierten Rückgang des Knorpelgewebsumsatzes (in allen Gelenkknorpeln) führt. Auf der anderen Seite wurde der Knorpeldegenerationsprozess im Ganzen reduziert zu Gunsten des Knorpelbildungsprozesses im Frakturspalt. Zwischen der dritten und der sechsten postoperativen Woche steigt der serologische COMP-Level ausgesprochen stark an, während die Knorpelmenge im Kallus in dieser Periode auf einem gleichmäßig hohen Level verbleibt. Der Prozess der Knorpelbildung und Knorpeldegradation befinden sich wahrscheinlich zu diesem Zeitpunkt in einem „steady state“, was zu einer fast konstanten Menge an Knorpel im Kallus führt. Die Knorpeldegradation beginnt vermutlich mit einer gewissen Verzögerung nach dem Beginn der Knorpelbildung. Deshalb hat der serologisch sichtbare Anfangspunkt der Knorpeldegradation zwischen der dritten und sechsten postoperativen Woche eine Übereinstimmung mit dem histologisch nachgewiesenen Gleichgewicht.

Das serologische Niveau von CII war in den ersten vier postoperativen Wochen angehoben. Die histologische Dokumentation zeigte, dass postoperativ sehr früh Knorpel zu sehen ist. Schon in den ersten zwei Wochen nach der Osteotomie ließen sich kleine Inseln von Knorpelgewebe anfärben. Auch wenn histologisch eine konstante Menge Knorpel im Kallus zwischen der dritten und der sechsten Woche postoperativ dokumentiert wurde, fiel das serologische CII-Niveau schon vor der sechsten Woche ab. Wahrscheinlich kam es ebenfalls zu einem „steady state“, der Zustand bei dem Knorpelaufbau und -abbau ausbalanciert sind. Danach wurde die Knorpelmenge weniger, was sich letztendlich mit den radiologischen Befunden (Muchow S., 2005) deckt, die ein erfolgreiches Überbrücken des Frakturspalt und damit den Umbau in mineralisierten Knochen zeigen. In dieser Studie wurde ein Absinken des serologischen CII-Levels zu einem Zeitpunkt festgestellt, wenn histologisch noch große Mengen Knorpel im Kallus sichtbar waren. Dieses kann damit erklärt werden, dass der Rückgang des serologisch nachweisbaren CII-Wertes den Beginn einer geordneten Mineralisation oder die Verkalkung des degenerierenden Knorpelgewebes im Kallus markiert. Dies bestätigten die radiologischen Befunde, die einen Anstieg an mineralisiertem Gewebe zwischen der

dritten und sechsten postoperativen Woche aufzeigten. Das heißt, das CPII verbleibt an seiner Anlagerungsstelle und wird nicht mehr ins Blut entlassen. Zwei Tiere zeigten keine Veränderung ihrer CPII-Werte im Serum während der ganzen Heilungsperiode. Beide Tiere waren weit voraus im Kallusremodelling und zeigten in der Form wieder hergestellte Tibiae im Vergleich mit der gesunden Seite. Es konnte kein Knorpel im Kallus ausgemacht werden. Es ist möglich, dass bei diesen zwei Tieren die Frakturheilung direkt, das heißt, ohne Formation eines voluminösen Kallus, erfolgte und nur sehr wenig Knorpel gebildet wurde. Dadurch kann der CPII-Wert eventuell unter der Nachweisgrenze geblieben sein.

5.3.3 Juvenile Serumparameter

Die Fraktur und ihre Heilung löst eine systemische Veränderung des Knochenstoffwechsels aus, die das gesamte knöchernerne Skelett betrifft. Bei Hüftfrakturen war bis zu einem Jahr nach der Fraktur ein Knochenverlust nachweisbar, vor allem aber in den ersten 60 Tagen (Einhorn et al., 1990; Yu-Yahiro et al., 2001). Deshalb ist anzunehmen, dass der Knochenumbau im Bereich des Frakturkallus während der Heilungsphase im gesamten Anstieg des Knochenumbaus untergeht. Dieser Anstieg des Knochen-Metabolismus war durch die individuelle Knochenumbaukapazität limitiert und bei erwachsenen Tieren deutlich geringer als bei den juvenilen Tieren, deren Werte die für diese Studie ausgesuchten serologische Parameter von den erwachsenen Tieren nie erreicht wurden.

Der Knorpelstoffwechsel wird durch eine Fraktursituation gar nicht, oder nur sehr geringfügig erhöht, da Knorpel sowieso nur eine geringe Umbaurate aufweist. Das COMP-Niveau war in der jugendlichen Gruppe deutlich höher als in den Tieren der Kontrollgruppe oder in den operierten Tieren. Es ist möglich, dass das die Konsequenz aus der allgemeinen Degradation von Knorpel aus den Wachstumsfugen ist (Ekman et al., 1997; Milz et al., 2002). Folgerichtig konnte die Heilung der relativ kleinen Osteotomie keine Erhöhung des serologischen COMP-Wertes über das jugendliche Niveau während der gesamten Heilungsperiode verursachen.

Das CPII-Niveau von erwachsenen gesunden Tieren anderer Studien ist mit den Werten erwachsener und junger Schafe dieser Studie vergleichbar, aber bestätigt nicht die in der Humanmedizin festgestellten höheren Werte für Kinder im Verhältnis zum Erwachsenen (Carey et al., 1997).

5.3.4 Klinischer Nutzen der Serumparameter

Es stellt sich die Frage, ob vorausgegangene Untersuchungen, die Knochenumbauparameter verwendeten, um die Frakturheilung zu beurteilen, in der Lage waren, den Verlauf der Frakturheilung zu detektieren. Es ist möglich, dass der gesamte Knochenstoffwechsel nur variiert und nicht wirklich die Frakturheilungsprozesse erfasst wurden, denn es wurde in den veröffentlichten

Diskussion

Studienergebnissen jeweils nur eine kleine und inhomogene Patientengruppe ausgewertet (Emami et al., 1999; Joerring et al., 1992; Joerring et al., 1994; Kurdy, 2000; Kurdy et al., 1998).

Die in dieser vorliegenden Studie ausgewählten serologischen Knochenmarker scheinen als generelle klinische Marker ungeeignet zu sein, um den Zustand oder den Verlauf der Frakturheilung zu beurteilen. Nicht nur die Fraktur hatte einen Einfluss auf die Knochenparameter, sondern auch alleine der eingeschränkte Bewegungsspielraum in der Kontrollgruppe. Die inter-individuellen Unterschiede als auch die starke Abhängigkeit von externen Faktoren, wie zum Beispiel dem individuellen postoperativen Aktivitätslevel, waren zu groß, um eine Korrelation zwischen dem Verlauf der Serumspiegelschwankungen einzelner Parameter und der histologischen Struktur der heilenden Fraktur herzuleiten. Darüber hinaus verhinderten die großen inter-individuellen Schwankungen, dass Normwerte, oder zumindest ein Schwellenwert festgesetzt werden konnte, der essentiell für den routinemäßigen klinischen Einsatz wäre. Es bleibt fraglich, ob die untersuchten Knochenumbauparameter den Verlauf der Kallusformation der Fraktur oder den systemischen Anstieg der Knochenformation nach einer Fraktur detektieren. PIIINP und TRAP sind eventuell geeignet, abnormale Frakturheilungen zu detektieren. Ein fehlender oder verspäteter Anstieg der serologischen PIIINP-Werte weist vermutlich auf eine verzögerte oder ausbleibende Kallusreifung hin. Der Verlauf der TRAP-Spiegel im Serum ermöglicht eventuell, große Resorptionsprozesse während der Frakturheilung frühzeitig zu erkennen, bevor diese im Röntgenbild sichtbar werden.

Vorausgegangene Studien haben angedeutet, dass mehrere Stoffwechselumsatzmarker geeignet wären, den Verlauf der Frakturheilung zu reflektieren und auch zwischen normaler und verzögerter Heilung zu unterscheiden (Emami et al., 1999; Joerring et al., 1992; Joerring et al., 1994; Kurdy, 2000; Kurdy et al., 1998). Auf der anderen Seite wird angenommen, dass die Prozesse in der Frakturheilung eine systemische osteogene Antwort im ganzen Skelett erzeugen (Einhorn et al., 1990; Poole, 2002). Es wurde in dieser Studie bestätigt, dass die serologischen Level der meisten Knochenmarker durch verschiedene äußere Faktoren beeinflusst werden, wie zum Beispiel die Aktivität der Patienten, ihr Alter und die Tageszeit der Blutprobennahme (Allen et al., 1998; Ladlow et al., 2002; Lepage et al., 1998; Liesegang, 2000; Liesegang et al., 1999). Außerdem ist der serologische Verlauf der Knochenmarker stark durch den ständigen Umbau des Skeletts beeinflusst, was die Umbauvorgänge während der Frakturheilung möglicherweise überdeckt, da diese relativ klein im Verhältnis zu dem allgemeinen Umbau sind (Poole, 2002).

Im Gegensatz dazu ist die Rate des Remodelling von intaktem Knorpel bei einem erwachsenen Individuum relativ klein. Die Knorpelmenge, die umgebaut wird, und damit der serologische Level des Knorpelstoffwechselmarkers wird ebenfalls durch externe Faktoren wie Aktivitätslevel und Alter beeinflusst (Billinghurst et al., 2003). Auch wenn, besonders für COMP, die Rate des Knorpelstoffwechsels sich möglicherweise durch die postoperative Bewegungseinschränkung verändert hat, war es doch möglich, einen eindeutigen Anstieg bei beiden Knorpelmarkern (COMP

und CII) während des Verlaufs der Frakturheilung zu detektieren. Weiterhin korrelierte der serologische Verlauf der analysierten Marker mit der histologischen Struktur der Knorpelentwicklung im Kallus. Die Knorpelmenge innerhalb des Frakturkallus wie auch der wahrgenommene Anstieg der Parameterlevel war relativ klein, was durch die steife Fixation der Fraktur begründet werden kann.

Die Ergebnisse dieser Studie repräsentieren unter anderem den serologischen Verlauf von Knorpelstoffwechselfparametern während einer normalen Frakturheilung und sollten mit einem Modell mit verzögerter Heilung verglichen werden. Dieses Vorgehen würde Rückschlüsse über den Nutzen dieser ausgewählten Marker für ein Monitoring von Frakturheilungsprozessen zu ziehen und ob es möglich ist, zwischen der direkten und der indirekten Frakturheilung zu unterscheiden oder ob frühzeitige Veränderungen im Heilungsverlaufe anhand der Serumspiegel dieser Marker erkennbar sind, bevor sie radiologisch sichtbar sind.

Im Falle einer verzögerten Frakturheilung kann es zu einer Verlängerung der knorpeligen Phase in Kombination mit einer Verzögerung der Mineralisationskaskade kommen (Epari et al., 2006; Hietaniemi et al., 1998). Angenommen, die verzögerte Heilung hat eine verlängerte chondrale Phase, so sollte dieses im Blut nachweisbar sein und den Serumspiegel der beobachteten Knorpelmarker COMP und CII verändern. Das könnte ein Ansatz sein, die verzögerte von der normalen Heilung zu unterscheiden. Beide Marker sind eventuell geeignet, die verzögerte oder nicht stattfindende Mineralisationskaskade während der enchondralen Ossifikation zu detektieren. So könnte vor allen Dingen der Verlauf von Tierstudien mit Hilfe der Serumwerte kontrolliert werden, denn die Blutentnahme ist anders als die histologische Beurteilung des Knochens nicht mit dem Verlust des Tieres verbunden und kann über einen langen Zeitraum wiederholt durchgeführt werden (Allen, 2003; Ladlow et al., 2002). Bemerkenswert war, dass der höchste Wert während der Heilungsphase auf jeden Fall deutlich höher war als die präoperativen normalen Werte von COMP und CII.

Klinisch wird ein Nutzen der Serumparameter zum Monitoring einer Frakturheilung durch viele Faktoren (tageszeitliche Schwankungen, individuelle Variation, kurze Halbwertszeit, etc.) kompliziert und auch durch chronische Gelenkserkrankungen, Gelenkstrauma vergesellschaftet mit einer Fraktur oder einfach durch Wachstum beeinflusst. Außerdem scheinen die Werte der in dieser Studie untersuchten Serumparameter durch eine reine Bewegungseinschränkung deutlich herabgesetzt zu werden, was ihre klinische Nutzung zur Zeit nicht möglich macht.

6 Zusammenfassung

Nach einer Tibiafraktur ist eine intensive Kontrolle des Frakturheilungsverlaufs wichtig, da es sich oft um Frakturen mit Knochenverlust handelt und eine schnelle Rehabilitation dadurch gefährdet sein kann. Fakt ist, dass trotz aller Fortschritte in der Frakturversorgung bei bis zu zwanzig Prozent der Frakturtherapien immer noch Heilungsstörungen auftreten, was die fortdauernde Forschung auf diesem Gebiet rechtfertigt (Haas, 2000).

Die Analyse von Serumparametern wird bei metabolischen Erkrankungen schon lange mit guten Ergebnissen eingesetzt. Die Analyse von Frakturheilungsprozessen anhand von verschiedenen Serumparametern führte aber zu kontroversen Ergebnissen (Delmas et al., 1997; Eriksen et al., 1995; Kurdy et al., 1998; Yu-Yahiro et al., 2001). Deshalb wurden in dieser Studie sieben Serumparameter in einem standardisierten Modell verglichen. Die sieben beschriebenen Serumparameter wurden am Schaf während der Heilung einer Tibiafraktur simuliert durch eine Tibiaosteotomie getestet, wobei die Enden der osteotomierten Tibia drei Millimeter distrahiert wurden. Die Fraktur wurde mit einem Fixateur externe stabilisiert. Der Versuchszeitraum betrug neun Wochen und in diesem heilte die Tibiaosteotomie klinisch aus. Den Schafen wurde einmalig vor der Osteotomie und wöchentlich nach dieser Blut entnommen. Die ermittelten Serumwerte wurden mit den Ergebnissen der histologischen Untersuchung der heilenden Osteotomie zu vier Zeitpunkten nach der Operation verglichen.

Alle Serumparameter zeigten große inter-individuelle Schwankungen und einen Abfall der Werte über den Untersuchungszeitraum von neun Wochen, auch bei den Tieren der Kontrollgruppe. Der systemische Knochenstoffwechsel ist auch bei gesunden Tieren sehr hoch, da sich der Knochen ständig der Belastung anpasst und zudem als Mineralienreservoir dient. Die relativ kleine Osteotomie der Tibia hatte keinen sichtbaren Einfluss auf diesen Gesamtstoffwechsel bzw. die Erhöhung des Knochenstoffwechsels durch die Fraktur ging darin unter. Nur im Vergleich mit der Kontrollgruppe und in Relation zu dem präoperativen Wert war ein geringer Anstieg bei einigen Knochenmarkern zu ermitteln. Die Ergebnisse der Knorpelmarker zeigten eine gute Korrelation mit dem im histologischen Präparat sichtbaren Heilungsverlauf und wurden weniger vom allgemeinen Körperstoffwechsel maskiert. Aber auch hier gab es einen Abfall der Knorpelparameter während des Studienverlaufs, sowohl bei den operierten Tieren als auch bei denen der Kontrollgruppe. Die Serum-Werte der juvenilen Tiere lagen allerdings deutlich über denen der operierten Gruppe, was durch den Abbau der Wachstumsfugen begründet werden kann. Eine klinische Nutzung der in dieser Studie untersuchten Serumparameter zur Beurteilung der Frakturheilungsprozesse ist nicht möglich, da nur in Verbindung mit dem präoperativen Wert und den Werten der Kontrollgruppe eine Aussage über den Verlauf der Werte möglich war, was im klinischen Alltag nicht durchzuführen ist. Es ist festzuhalten, dass eine Bewegungseinschränkung nach einer Osteotomie großen Einfluss auf die Serumparameterspiegel zu

haben scheint und dass die individuellen Unterschiede einen klinischen Nutzen in der Frakturdiagnostik zur Zeit unmöglich machen.

7 Summary

„Correlation of serologic parameters and the histological structure in fracture healing processes in the sheep.”

A fracture of the tibia demands an intensive monitoring of the fracture healing processes, because in many cases these fractures are combined with a loss of bone and, therefore, the rehabilitation can be delayed. As a matter of fact, up to twenty percent of the fracture therapies interfere with the healing process, despite taking into account the advances in orthopedic surgery, and this demands ongoing medical research in this area (Haas, 2000).

The analysis of the serum parameters examined in this study is used for the diagnosis of metabolic diseases for a long time. The analyses of the same serological parameters to monitor the progressing fracture healing gave controversial results (Delmas et al., 1997; Eriksen et al., 1995; Kurdy et al., 1998; Yu-Yahiro et al., 2001). To elucidate this contradiction, seven serum parameters were compared in this study in a standardized model of a fracture, the osteotomy of the tibia in sheeps, to monitor the fracture healing processes. The fracture, i.e, the osteotomy of the tibia with an artificial gap of 3 mm, was taking care of using an external fixateur. The tests were conducted over a period of nine weeks, whererin the tibia healed completely. Blood samples were taken from the sheep one time before the osteotomy and afterwards on a weekly basis. The serum parameters found, were compared with the histologic structure of the regenerating fracture two, three, six, and nine weeks after the orthopedic surgery.

All serum parameters showed a big inter-individual variation and reduction of the serum level during the nine weeks of the study. This was valid for the sheep in the reference group too. The systemic metabolism of bones is very active even in healthy animals, because the bones permanently react to changes of the mechanical forces and, in addition, are the reservoir for various minerals. The relatively small fracture, i.e., the 3 mm gap osteotomy, had no identifiable impact on the overall metabolism or the increase of bone metabolic processes were too small to be detected. Only in comparison to the reference group and in relation to the preoperative values, a small increase in some of the bonemarkers was detected in the serum of the sheep. The results of the serum markers indicative for metabolic processes in cartilage tissue showed a good correlation with the histological structure in the healing process and were only partially masked by the overall metabolism of the body. A reduction of the serum levels of the chondral parameter during the study was found in the reference group as well as in the group of treated animals. The serum levels of these parameters indicative for the metabolism in cartilage were significantly higher in juvenile sheeps than in the sheeps after orthopedic surgery. This may be explained by the degeneration of the epiphyseal cartilages in the juvenile sheeps. Based on the results of this study, the clinical application of the serum parameter to assess the progress of

fracture healing processes is not advisable, because only the comparison of the preoperative serum levels with those in the reference group provided confidence to predict the progress of the fracture healing process. In addition it has to be stated, that the reduction of mobility after the osteotomy of the tibia seems to have a major impact on the level of the serum parameters and that the individual differences of the levels prohibit a clinical application of this kind of diagnostics of the fracture healing.

8 Verzeichnisse

8.1 Literaturzitate

- Aerssens, J., S. Boonen, G. Lowet, and J. Dequeker (1998):
Interspecies differences in bone composition, density, and quality: Potential implications for in vivo bone research.
Endocrinology, 139: 663-670.
- Alini, M., Y. Matsui, G. R. Dodge, and A. R. Poole (1992):
The extracellular matrix of cartilage in the growth plate before and during calcification: changes in composition and degradation of type II collagen.
Calcif. Tissue Int., 50: 327-335.
- Allen, M. J. (2003):
Biochemical markers of bone metabolism in animals: Uses and limitations.
Vet. Clin. Pathol., 32: 101-113.
- Allen, M. J., W. E. Hoffmann, D. C. Richardson, and G. J. Breur (1998):
Serum markers of bone metabolism in dogs.
Am. J. Vet. Res., 59: 250-254.
- Aro, H. T., and E. Y. Chao (1993):
Biomechanics and biology of fracture repair under external fixation.
Hand Clin., 9: 531-542.
- Aro, H. T., B. W. Wippermann, S. F. Hodgson, and E. Y. Chao (1990):
Internal remodelling of periosteal new bone during fracture healing.
J. Orthop. Res., 8: 238-246.
- Augat, P., K. Margevicius, J. Simon, S. Wolf, G. Suger, and L. Claes (1998):
Local tissue properties in bone healing: Influence of size and stability of the osteotomy gap.
J. Orthop. Res., 16: 475-481.
- Augat, P., J. Merk, A. Ignatius, K. Margevicius, G. Bauer, D. Rosenbaum, and L. Claes (1996):
Early, full weightbearing with flexible fixation delays fracture healing.
Clin. Orthop. Relat. Res., 328: 194-202.
- Bail, H. J., S. Kolbeck, T. Lindner, M. Dahne, A. Weiler, H. J. Windhagen, K. Raun, C. Skjaerbaek, A. Flyvbjerg, H. Orskov, N. P. Haas, and M. J. Raschke (2001):
The effect of growth hormone on insulin-like growth factor I and bone metabolism in distraction osteogenesis.
Growth Horm. IGF Res., 11: 314-323.

-
- Bedossa, P., J. Bacci, G. Lemaigre, and E. Martin (1987):
Effects of fixation and processing on the immunohistochemical visualization of type-I, -III, and -IV collagen in paraffin-embedded liver tissue.
Histochemistry, 88: 85-89.
- Billinghurst, R. C., P. A. Brama, P. R. van Weeren, M. S. Knowlton, and C. W. McIlwraith (2003):
Significant exercise-related changes in the serum levels of two biomarkers of collagen metabolism in young horses.
Osteoarthr. Cartil., 11: 760-769.
- Boni, T. (2000):
Changes in the concept of fracture healing and callus formation.
Orthopäde, 29: 1072-1081.
- Brighton, C. T. (1984):
The biology of fracture repair.
Instr. Course Lect., 33: 60-82.
- Brighton, C. T., and R. M. Hunt (1991):
Early histological and ultrastructural changes in medullary fracture callus.
Am. J. Bone Joint Surg., 73: 832-847.
- Brunner Edgar, Langer Frank (1999):
Nichtparametrische Analyse longitudinaler Daten.
München, Wien Oldenburg Verlag.
- Budras, K., W. Fricke und R. Richter (1996):
Atlas der Anatomie des Hundes: Lehrbuch für Tierärzte und Studierende.
Hannover, Schlütersche Verlagsanstalt.
- Carey, D. E., M. Alini, M. Ionescu, J. S. Hyams, J. C. Rowe, L. C. Rosenberg, and A. R. Poole (1997):
Serum content of the C-propeptide of the cartilage molecule type II collagen in children.
Clin. Exp. Rheumatol., 15: 325-328.
- Carter, D. R., G. S. Beaupre, N. J. Giori, and J. A. Helms (1998):
Mechanobiology of skeletal regeneration.
Clin. Orthop. Relat. Res., 355: S41-55.
- Carter, D. R., M. C. Van Der Meulen, and G. S. Beaupre (1996):
Mechanical factors in bone growth and development.
Bone, 18: 5S-10S.
- Chambers, T. J. (2000):
Regulation of the differentiation and function of osteoclasts.
J. Pathol., 192: 4-13.

Literatur

- Chao, E. Y., H. T. Aro, D. G. Lewallen, and P. J. Kelly (1989):
The effect of rigidity on fracture healing in external fixation.
Clin. Orthop. Relat. Res., 241: 24-35.
- Charles, P., C. Hasling, L. Risteli, J. Risteli, L. Mosekilde, and E. F. Eriksen (1992):
Assessment of bone formation by biochemical markers in metabolic bone disease:
separation between osteoblastic activity at the cell and tissue level.
Calcif. Tissue Int., 51: 406-411.
- Charles, P., L. Mosekilde, L. Risteli, J. Risteli, and E. F. Eriksen (1994):
Assessment of bone remodelling using biochemical indicators of type I collagen synthesis
and degradation: relation to calcium kinetics.
Bone Miner., 24: 81-94.
- Chiappe, A., G. Gonzalez, E. Fradinger, G. Iorio, J. L. Ferretti, and J. Zanchetta (1999):
Influence of age and sex in serum osteocalcin levels in thoroughbred horses.
Arch. Physiol. Biochem., 107: 50-54.
- Christenson, R. H. (1997):
Biochemical markers of bone metabolism: An overview.
Clin. Biochem., 30: 573-593.
- Claes, L., R. Grass, T. Schmickal, B. Kisse, C. Eggers, H. Gerngross, W. Mutschler, M.
Arand, T. Wintermeyer, and A. Wentzensen (2002):
Monitoring and healing analysis of 100 tibial shaft fractures.
Langenbecks Arch. Surg., 387: 146-152.
- Claes, L., S. Wolf, and P. Augat (2000):
[Mechanical modification of callus healing].
Chirurg, 71: 989-994.
- Claes, L. E., C. A. Heigele, C. Neidlinger-Wilke, D. Kaspar, W. Seidl, K. J. Margevicius, and
P. Augat (1998):
Effects of mechanical factors on the fracture healing process.
Clin. Orthop. Relat. Res., 355: S132-147.
- Cruess, R. L., and J. Dumont (1975):
Fracture healing.
Can. J. Surg., 18: 403-413.
- Delmas, P. D. (1990):
Biochemical markers of bone turnover for the clinical assessment of metabolic bone
disease.
Endocrinol. Metab. Clin. North Am., 19: 1-18.
- Delmas, P. D., and J. Beaudreuil (1997):
Biochemical markers of bone turnover in osteoporosis.
Rev. Rhum. Engl. Ed., 64: 31S-36S.

- Dickson, G. R., R. A. Mollan, and K. E. Carr (1987):
Cytochemical localization of alkaline and acid phosphatase in human vanishing bone disease.
Histochemistry, 87: 569-572.
- Einhorn, T. A. (1996):
Enhancement of fracture healing.
Instr. Course Lect., 45: 401-416.
- Einhorn, T. A. (1998):
The cell and molecular biology of fracture healing.
Clin. Orthop. Relat. Res., 355: S7-21.
- Einhorn, T. A., G. Simon, V. J. Devlin, J. Warman, S. P. Sidhu, and V. J. Vigorita (1990):
The osteogenic response to distant skeletal injury.
J. Bone Joint. Surg. Am., 72: 1374-1378.
- Eitel, F., F. Klapp, W. Jacobson, and L. Schweiberer (1981 a):
Bone regeneration in animals and in man. A contribution to understanding the relative value of animal experiments to human pathophysiology.
Arch. Orthop. Trauma Surg., 99: 59-64.
- Eitel, F., H. Seiler, and L. Schweiberer (1981 b):
[Morphological examination of animal-experiment results: comparison with regeneration of the human bone-structure. II. Research results (author's transl.)].
Unfallheilkunde, 84: 255-264.
- Ekman, S., F. P. Reinholt, K. Hultenby, and D. Heinegard (1997):
Ultrastructural immunolocalization of cartilage oligomeric matrix protein (COMP) in porcine growth cartilage.
Calcif. Tissue Int., 60: 547-553.
- Emami, A., A. Larsson, M. Petren-Mallmin, and S. Larsson (1999):
Serum bone markers after intramedullary fixed tibial fractures.
Clin. Orthop. Relat. Res., 368: 220-229.
- Engvall, E., K. Jonsson and P. Perlmann (1971):
Enzyme-linked immunosorbent assay. II. Quantitative assay of protein antigen, immunoglobulin G, by means of enzyme-labelled antigen and antibody-coated tubes.
Biochim. Biophys. Acta, 251: 427-434.
- Epari, D. R., H. Schell, H. J. Bail, and G. N. Duda (2006):
Instability prolongs the chondral phase during bone healing in sheep.
Bone, 38: 864-870.
- Eriksen, E. F., K. Brixen, and P. Charles (1995):
New markers of bone metabolism: Clinical use in metabolic bone disease.
Eur. J. Endocrinol., 132: 251-263.

Literatur

- Eriksen, E. F., P. Charles, F. Melsen, L. Mosekilde, L. Risteli, and J. Risteli (1993):
Serum markers of type I collagen formation and degradation in metabolic bone disease:
correlation with bone histomorphometry.
J. Bone Miner. Res., 8: 127-132.
- Ford, J. L., D. E. Robinson, and B. E. Scammell (2003):
The fate of soft callus chondrocytes during long bone fracture repair.
J. Orthop. Res., 21: 54-61.
- Ford, J. L., D. E. Robinson, and B. E. Scammell (2004):
Endochondral ossification in fracture callus during long bone repair: The localisation of
'cavity-lining cells' within the cartilage.
J. Orthop. Res., 22: 368-375.
- Frost, H. M. (1969):
Tetracycline-based histological analysis of bone remodelling.
Calcif. Tissue Res., 3: 211-237.
- Frost, H. M. (1989 a):
The biology of fracture healing. An overview for clinicians. Part I.
Clin. Orthop. Relat. Res., 248: 283-293.
- Frost, H. M. (1989 b):
The biology of fracture healing. An overview for clinicians. Part II.
Clin. Orthop. Relat. Res., 248: 294-309.
- Garnero, P., J. C. Rousseau, and P. D. Delmas (2000):
Molecular basis and clinical use of biochemical markers of bone, cartilage, and synovium
in joint diseases.
Arthritis Rheum., 43: 953-968.
- Guggenmoos-Holzmann, I, and K.-D. Wernecke. (1996):
Medizinische Statistik..
Blackwell Wissenschafts-Verlag, Berlin.
- Haas, N. P. (2000):
Callus modulation - fiction or reality?
Chirurg, 71: 987-988.
- Halleen, J. M., S. L. Alatalo, A. J. Janckila, H. W. Woitge, M. J. Seibel, and H. K. Vaananen
(2001):
Serum tartrate-resistant acid phosphatase 5b is a specific and sensitive marker of bone
resorption.
Clin. Chem., 47: 597-600.
- Halleen, J. M., S. L. Alatalo, H. Suominen, S. Cheng, A. J. Janckila, and H. K. Vaananen
(2000):
Tartrate-resistant acid phosphatase 5b: A novel serum marker of bone resorption.
J. Bone Miner. Res., 15: 1337-1345.

-
- Hannon, R. A., J. A. Clowes, A. C. Eagleton, A. Al Hadari, R. Eastell, and A. Blumsohn (2004):
Clinical performance of immunoreactive tartrate-resistant acid phosphatase isoform 5b as a marker of bone resorption.
Bone, 34: 187-194.
- Hauge, E., L. Mosekilde and F. Melsen (1999):
Missing observations in bone histomorphometry on osteoporosis: Implications and suggestions for an approach.
Bone, 25: 389-395.
- Hedbom, E., P. Antonsson, A. Hjerpe, D. Aeschlimann, M. Paulsson, E. Rosa-Pimentel, Y. Sommarin, M. Wendel, A. Oldberg, and D. Heinegard (1992):
Cartilage matrix proteins. An acidic oligomeric protein (COMP) detected only in cartilage.
J. Biol. Chem., 267: 6132-6136.
- Heinegard, D., and A. Oldberg (1989):
Structure and biology of cartilage and bone matrix noncollagenous macromolecules.
FASEB J., 3: 2042-2051.
- Hierholzer, G., and R. Kleining (1982):
[Theoretical principles and biomechanics of external fixator osteosynthesis].
Langenbecks Arch. Chir., 358: 105-112.
- Hietaniemi, K., M. U. Lehto, and P. Paavolainen (1998):
Major fibrillar collagens and fibronectin in an experimental nonunion: An immunohistochemical study.
Acta Orthop. Scand., 69: 545-549.
- Hietaniemi, K., J. Peltonen, and P. Paavolainen (1995):
An experimental model for non-union in rats.
Injury, 26: 681-686.
- Igarashi, Y., M. Y. Lee, and S. Matsuzaki (2002):
Acid phosphatases as markers of bone metabolism.
J. Chromatogr. (B) Analyt. Technol. Biomed. Life Sci., 781: 345-358.
- James, J., and G. L. Steijn-Myagkaya (1986):
Death of osteocytes. Electron microscopy after in vitro ischaemia.
J. Bone Joint. Surg. (Br.), 68: 620-624.
- Jensen, L. T. (1997):
The aminoterminal propeptide of type III procollagen. Studies on physiology and pathophysiology.
Dan. Med. Bull., 44: 70-78.
- Joerring, S., L. T. Jensen, G. R. Andersen, and J. S. Johansen (1992):
Types I and III procollagen extension peptides in serum respond to fracture in humans.
Arch. Orthop. Trauma Surg., 111: 265-267.

Literatur

- Joerring, S., M. Krogsgaard, H. Wilbek, and L. T. Jensen (1994):
Collagen turnover after tibial fractures.
Arch. Orthop. Trauma Surg., 113: 334-336.
- Johansen, J. S., J. E. Molholm Hansen, and C. Christiansen (1987):
A radioimmunoassay for bone Gla protein (BGP) in human plasma.
Acta Endocrinol. (Copenh.), 114: 410-416.
- Katagiri, T., and N. Takahashi (2002):
Regulatory mechanisms of osteoblast and osteoclast differentiation.
Oral Dis., 8: 147-159.
- Klaushofer, K., and M. Peterlik (1994):
[Pathophysiology of fracture healing].
Radiologe, 34: 709-714.
- Klein, P., M. Opitz, H. Schell, W. R. Taylor, M. O. Heller, J. P. Kassi, F. Kandziora, and G. N. Duda (2004):
Comparison of unreamed nailing and external fixation of tibial diastases - mechanical conditions during healing and biological outcome.
J. Orthop. Res., 22: 1072-1078.
- Klein, P., H. Schell, F. Streitparth, M. Heller, J. P. Kassi, F. Kandziora, H. Bragulla, N. P. Haas and G. N. Duda (2003):
The initial phase of fracture healing is specifically sensitive to mechanical conditions.
J. Orthop. Res., 21: 662-669.
- Koelling, S., T. S. Clauditz, M. Kaste, and N. Miosge (2006):
Cartilage oligomeric matrix protein is involved in human limb development and in the pathogenesis of osteoarthritis.
Arthritis Res. Ther., 8: R56.
- Komatsu, Y., H. Chusho, N. Tamura, A. Yasoda, T. Miyazawa, M. Suda, M. Miura, Y. Ogawa, and K. Nakao (2002):
Significance of C-type natriuretic peptide (CNP) in endochondral ossification: analysis of CNP knockout mice.
J. Bone Miner. Metab., 20: 331-336.
- Kuhne, S. A., M. Neidhart, M. P. Everson, H. Hantzschel, P. R. Fine, S. Gay, H. J. Hauselmann, and R. E. Gay (1998):
Persistent high serum levels of cartilage oligomeric matrix protein in a subgroup of patients with traumatic knee injury.
Rheumatol. Int., 18: 21-25.
- Kurdy, N. M. (2000):
Serology of abnormal fracture healing: the role of PIIINP, PICP, and BsALP.
J. Orthop. Trauma, 14: 48-53.

-
- Kurdy, N. M., S. Bowles, D. R. Marsh, A. Davies, and M. France (1998): Serology of collagen types I and III in normal healing of tibial shaft fractures.
J. Orthop. Trauma, 12: 122-126.
- Kusuzaki, K., N. Kageyama, H. Shinjo, H. Takeshita, H. Murata, S. Hashiguchi, T. Ashihara, and Y. Hirasawa (2000):
Development of bone canaliculi during bone repair.
Bone, 27: 655-659.
- Ladlow, J. F., W. E. Hoffmann, G. J. Breur, D. C. Richardson, and M. J. Allen (2002):
Biological variability in serum and urinary indices of bone formation and resorption in dogs.
Calcif. Tissue Int., 70: 186-193.
- Lammens, J., Z. Liu, J. Aerssens, J. Dequeker, and G. Fabry (1998):
Distraction bone healing versus osteotomy healing: A comparative biochemical analysis.
J. Bone Miner. Res., 13: 279-286.
- Lane, J. M. (1998):
Breakout session 2: Fracture repair process.
Clin. Orthop. Relat. Res., 355: S354-355.
- Lau, K. H., T. Onishi, J. E. Wergedal, F. R. Singer, and D. J. Baylink (1987):
Characterization and assay of tartrate-resistant acid phosphatase activity in serum: potential use to assess bone resorption.
Clin. Chem., 33: 458-462.
- Lepage, O. M., D. J. Hartmann, R. Eicher, B. Uebelhart, P. Tschudi, and D. Uebelhart (1998):
Biochemical markers of bone metabolism in draught and warmblood horses.
Vet. J., 156: 169-175.
- Liesegang, A. (2000):
[Use of bone markers in veterinary medicine.]
Schweiz. Arch. Tierheilkd., 142: 613-623.
- Liesegang, A., R. Reutter, M. L. Sassi, J. Risteli, M. Kraenzlin, J. L. Riond, and M. Wanner (1999):
Diurnal variation in concentrations of various markers of bone metabolism in dogs.
Am. J. Vet. Res., 60: 949-953.
- Lippuner, K., R. Vogel, S. Tepic, B. A. Rahn, J. Cordey, and S. M. Perren (1992):
Effect of animal species and age on plate-induced vascular damage in cortical bone.
Arch. Orthop. Trauma Surg., 111: 78-84.
- Lotz, J., T. Gaertner, M. Hahn, and W. Prellwitz (1999):
Collagen type I metabolism after bone surgery.
Arch. Orthop. Trauma Surg., 119: 212-216.

Literatur

- Magnusson, P., C. A. Sharp, and J. R. Farley (2002):
Different distributions of human bone alkaline phosphatase isoforms in serum and bone tissue extracts.
Clin. Chim. Acta, 325: 59-70.
- Mansson, B., D. Carey, M. Alini, M. Ionescu, L. C. Rosenberg, A. R. Poole, D. Heinegard, and T. Saxne (1995):
Cartilage and bone metabolism in rheumatoid arthritis. Differences between rapid and slow progression of disease identified by serum markers of cartilage metabolism.
J. Clin. Invest., 95: 1071-1077.
- Marks, S. C. Jr., and S. N. Popoff (1988):
Bone cell biology: The regulation of development, structure, and function in the skeleton.
Am. J. Anat., 183: 1-44.
- McDonald, D. E., R. H. Palmer, D. A. Hulse, J. S. Neigut, W. A. Hyman and M. R. Slater (1994):
Holding power of threaded external skeletal fixation pins in the near and far cortices of cadaveric canine tibiae.
Vet. Surg., 23: 488-493.
- McKibbin, B. (1978):
The biology of fracture healing in long bones.
J. Bone Joint. Surg. (Br.), 60-B: 150-162.
- Milz, S., A. Boszczyk, and R. Putz (2002):
[Development and functional structure of the epiphyseal plate.]
Orthopäde, 31: 835-840.
- Misumi, K., V. Vilim, T. Hatazoe, T. Murata, M. Fujiki, T. Oka, H. Sakamoto and S. D. Carter (2002):
Serum level of cartilage oligomeric matrix protein (COMP) in equine osteoarthritis.
Equine Vet. J., 34: 602-608.
- Morgelin, M., D. Heinegard, J. Engel, and M. Paulsson (1992):
Electron microscopy of native cartilage oligomeric matrix protein purified from the Swarm rat chondrosarcoma reveals a five-armed structure.
J. Biol. Chem., 267: 6137-6141.
- Moroni, A., C. Faldini, F. Pegreff, and S. Giannini (2002):
Fixation strength of tapered versus bicylindrical hydroxyapatite-coated external fixation pins: an animal study.
J. Biomed. Mater. Res., 63: 61-64.
- Morris, D. C., J. C. Randall, and H. C. Anderson (1988):
Light microscopic localization of alkaline phosphatase in fetal bovine bone using immunoperoxidase and immunogold-silver staining procedures.
J. Histochem. Cytochem., 36: 323-327.

- Muchow, S. (2005):
Vergleich zweier identischer Fixateure mit unterschiedlichen Schersteifigkeiten am Schafmodell Histologie und Histomorphometrie der Frakturheilung.
Berlin, Centrum für Muskuloskeletale Chirurgie, Charité, Freie und Humboldt Universität zu Berlin: Journal Nummer 2941
- Multimaki, P., H. Aro, and E. Vuorio (1987):
Differential expression of fibrillar collagen genes during callus formation.
Biochem. Biophys. Res. Commun., 142: 536-541.
- Mündermann, A., C. O. Dyrby, T. P. Andriacchi, and K. B. King (2005):
Serum concentration of cartilage oligomeric matrix protein (COMP) is sensitive to physiological cyclic loading in healthy adults.
Osteoarthritis Cartilage, 13: 34-38.
- Murray, D. W., J. Wilson-MacDonald, E. Morscher, B. A. Rahn, and M. Kaslin (1996):
Bone growth and remodelling after fracture.
J. Bone Joint Surg. (Br.), 78: 42-50.
- Nakanishi, M., K. Yoh, K. Uchida, S. Maruo, and A. Matsuoka (1998):
Improved method for measuring tartrate-resistant acid phosphatase activity in serum.
Clin. Chem., 44: 221-225.
- Nakanishi, M., K. Yoh, K. Uchida, S. Maruo, S. K. Rai, and A. Matsuoka (1999):
Clinical usefulness of serum tartrate-resistant fluoride-sensitive acid phosphatase activity in evaluating bone turnover.
J. Bone Miner. Metab., 17: 125-130.
- Nelson, F., L. Dahlberg, S. Laverty, A. Reiner, I. Pidoux, M. Ionescu, G. L. Fraser, E. Brooks, M. Tanzer, L. C. Rosenberg, P. Dieppe, and A. Robin Poole (1998):
Evidence for altered synthesis of type II collagen in patients with osteoarthritis.
J. Clin. Invest., 102: 2115-2125.
- Nickel, R., A. Schummer und E. Seiferle (1992):
Lehrbuch der Anatomie der Haustiere, Band I, 6. Auflage, Bewegungsapparat.
Berlin, Verlag Paul Parey.
- Nicodemo, M. L., D. Scott, W. Buchan, A. Duncan, and S. P. Robins (1999):
Effects of variations in live weight gain on bone growth and composition and on markers of bone turnover in lambs.
Exp. Physiol., 84: 579-587.
- Nunamaker, D. M. (1998):
Experimental models of fracture repair.
Clin. Orthop. Relat. Res., 355: S56-65.
- Nyman, M. T., P. Paavolainen, S. Forsius, and C. Lamberg-Allardt (1991):
Clinical evaluation of fracture healing by serum osteocalcin and alkaline phosphatase.
Ann. Chir. Gynaecol., 80: 289-293.

Literatur

- Ohishi, T., M. Takahashi, K. Kushida, H. Hoshino, T. Tsuchikawa, K. Naitoh, and T. Inoue (1998):
Changes of biochemical markers during fracture healing.
Arch. Orthop. Trauma Surg., 118: 126-130
- Olmedo, M. L., P. S. Landry, K. K. Sadasivan, J. A. Albright, and A. A. Marino (2000):
Programmed cell death in post-traumatic bone callus.
Cell Mol. Biol. (Noisy-le-grand), 46: 89-97.
- Oni, O. A. (1997):
The bony callus.
Injury, 28: 629-631.
- Owen, M. (1970):
The origin of bone cells.
Int. Rev. Cytol., 28: 213-238.
- Page, M., J. Hogg and D. E. Ashhurst. (1986):
The effects of mechanical stability on the macromolecules of the connective tissue matrices produced during fracture healing. I. The collagens.
Histochem J 18: 251-265
- Palmer, R. H., D. A. Hulse, W. A. Hyman, and D. R. Palmer (1992):
Principles of bone healing and biomechanics of external skeletal fixation.
Vet. Clin. North Am. Small Anim. Pract., 22: 45-68.
- Parfitt, A. M. (1988):
Bone histomorphometry: proposed system for standardization of nomenclature, symbols, and units.
Calcif. Tissue Int., 42: 284-286.
- Pastoureau, P., B. Merle, and P. D. Delmas (1988):
Specific radioimmunoassay for ovine bone gla-protein (osteocalcin).
Acta Endocrinol. (Copenh.), 119: 152-160.
- Pennig, D. (1990):
The biology of bones and of bone fracture healing.
Unfallchirurg, 93: 488-491.
- Poole, A. R. (2002):
Can serum biomarker assays measure the progression of cartilage degeneration in osteoarthritis?
Arthritis Rheum., 46: 2549-2552.
- Poole, A. R., T. Kojima, T. Yasuda, F. Mwale, M. Kobayashi, and S. Lavery (2001):
Composition and structure of articular cartilage: a template for tissue repair.
Clin. Orthop. Relat. Res., 391: S26-33.

-
- Poole, A. R., I. Pidoux, A. Reiner, H. Choi, and L. C. Rosenberg (1984 a):
The association of a newly discovered protein, called chondrocalcin, with cartilage calcification.
Acta Biol. (Hung.), 35: 143-149.
- Poole, A. R., I. Pidoux, A. Reiner, H. Choi, and L. C. Rosenberg (1984 b):
Association of an extracellular protein (chondrocalcin) with the calcification of cartilage in endochondral bone formation.
J. Cell Biol., 98: 54-65.
- Price, J. S., B. F. Jackson, J. A. Gray, P. A. Harris, I. M. Wright, D. U. Pfeiffer, S. P. Robins, R. Eastell, and S. W. Ricketts (2001):
Biochemical markers of bone metabolism in growing thoroughbreds: A longitudinal study.
Res. Vet. Sci., 71: 37-44.
- Radasch, R. M. (1999):
Biomechanics of bone and fractures.
Vet. Clin. North Am. Small Anim. Pract., 29: 1045-1082.
- Remedios, A. (1999):
Bone and bone healing.
Vet. Clin. North Am. Small Anim. Pract., 29: 1029-1044.
- Rhineland, F. W. (1974):
The normal circulation of bone and its response to surgical intervention.
J. Biomed. Mater. Res., 8: 87-90.
- Risteli, L., and J. Risteli (1987):
Analysis of extracellular matrix proteins in biological fluids.
Methods Enzymol., 145: 391-411.
- Roach, H. I., J. R. Shearer, and C. Archer (1989):
The choice of an experimental model. A guide for research workers.
J. Bone Joint Surg. (Br.), 71: 549-553.
- Robion, F. C., B. Doize, L. Boure, M. Marcoux, M. Ionescu, A. Reiner, A. R. Poole and S. Laverty (2001):
Use of synovial fluid markers of cartilage synthesis and turnover to study effects of repeated intra-articular administration of methylprednisolone acetate on articular cartilage in vivo.
J. Orthop. Res., 19: 250-258.
- Sarmiento, A., L. L. Latta, and R. R. Tarr (1984):
The effects of function in fracture healing and stability.
Instr. Course Lect., 33: 83-106.

Literatur

- Sasaki, T. (2003):
Differentiation and functions of osteoclasts and odontoclasts in mineralized tissue resorption.
Microsc. Res. Tech., 61: 483-495.
- Saxne, T., and D. Heinegard (1992):
Cartilage oligomeric matrix protein: A novel marker of cartilage turnover detectable in synovial fluid and blood.
Br. J. Rheumatol., 31: 583-591.
- Schaller, S., K. Henriksen, P. Hoegh-Andersen, B. C. Sondergaard, E. U. Sumer, L. B. Tanko, P. Qvist, and M. A. Karsdal (2005):
In vitro, ex vivo, and in vivo methodological approaches for studying therapeutic targets of osteoporosis and degenerative joint diseases: How biomarkers can assist?
Assay Drug Dev. Technol., 3: 553-580.
- Schandelmaier, P., C. Krettek, J. Rudolf, A. Kohl, B. E. Katz, and H. Tscherne (1997):
Superior results of tibial rodding versus external fixation in grade 3B fractures.
Clin. Orthop. Relat. Res., 342: 164-172.
- Schell, H., J. Lienau, D. R. Epari, P. Seebeck, C. Exner, S. Muchow, H. Bragulla, N. P. Haas, and G. N. Duda (2006):
Osteoclastic activity begins early and increases over the course of bone healing.
Bone, 38: 547-554.
- Schmolke, B. (2001):
[Laboratory diagnosis of osteoporosis.]
Orthopäde, 30: 425-436.
- Shapiro, F. (1988):
Cortical bone repair. The relationship of the lacunar-canalicular system and intercellular gap junctions to the repair process.
J. Bone Joint Surg. Am., 70: 1067-1081.
- Shea, J. E., R. K. Hallows, and R. D. Bloebaum (2002):
Experimental confirmation of the sheep model for studying the role of calcified fibrocartilage in hip fractures and tendon attachments.
Anat. Rec., 266: 177-183.
- Simmons, D. J. (1985):
Fracture healing perspectives.
Clin. Orthop. Relat. Res., 200: 100-113.
- Skioldebrand, E., P. Lorenzo, L. Zunino, G. J. Rucklidge, B. Sandgren, J. Carlsten, and S. Ekman (2001):
Concentration of collagen, aggrecan and cartilage oligomeric matrix protein (COMP) in synovial fluid from equine middle carpal joints.
Equine Vet. J., 33: 394-402.

-
- Skoumal, M., G. Haberhauer, J. Feyertag, E. M. Kittl, K. Bauer, and A. Dunky (2004):
Serum levels of cartilage oligomeric matrix protein are elevated in rheumatoid arthritis, but not in inflammatory rheumatic diseases such as psoriatic arthritis, reactive arthritis, Raynaud's syndrome, scleroderma, systemic lupus erythematosus, vasculitis and Sjogren's syndrome.
Arthritis Res. Ther., 6: 73-74.
- Skoumal, M., G. Kolarz, and A. Klingler (2003):
Serum levels of cartilage oligomeric matrix protein. A predicting factor and a valuable parameter for disease management in rheumatoid arthritis.
Scand. J. Rheumatol., 32: 156-161.
- Sladicka, S. J., S. R. Duffin and J. M. Erpelding (1998):
A biomechanical strength comparison of external fixators.
J. Trauma, 44: 965-969.
- Southwood, L. L., D. D. Frisbie, C. E. Kawcak, and C. W. McIlwraith (2003):
Evaluation of serum biochemical markers of bone metabolism for early diagnosis of nonunion and infected nonunion fractures in rabbits.
Am. J. Vet. Res., 64: 727-735.
- Steinberg, M. E., A. Bosch, A. Schwan, Jr. and R. Glazer (1968):
Electrical potentials in stressed bone.
Clin. Orthop., 61: 294-299.
- Stürmer, K. M. (1984):
[Histologic finding of fracture healing using external fixation and its clinical significance.]
Unfallchirurgie, 10: 110-122.
- Stürmer, K. M. (1988):
Histologie und Biomechanik der Frakturheilung unter den Bedingungen des Fixateur externe.
Hefte Unfallheilkd., 200: 233-242
- Stürmer, K. M. (1996):
Pathophysiology of disrupted bone healing.
Orthopäde, 25: 386-393.
- Stürmer, K. M., and W. Schuchardt (1980):
[New aspects of closed intramedullary nailing and marrow cavity reaming in animal experiments. III. Bone-healing, revascularisation and remodelling (author's transl).]
Unfallheilkunde, 83: 433-435.
- Taniguchi, T., T. Matsumoto, and H. Shindo (2003):
Changes of serum levels of osteocalcin, alkaline phosphatase, IGF-I and IGF-binding protein-3 during fracture healing.
Injury, 34: 477-479.

Literatur

- Teitelbaum, S. L. (2000):
Bone resorption by osteoclasts.
Science, 289: 1504-1508.
- Trostle, S. S., and M. D. Markel (1996):
Fracture biology, biomechanics, and internal fixation.
Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract., 12: 19-46.
- Van der Rest, M., L. C. Rosenberg, B. R. Olsen, and A. R. Poole (1986):
Chondrocalcin is identical with the C-propeptide of type II procollagen.
Biochem. J., 237: 923-925.
- Volpin, G., J. A. Rees, S. Y. Ali, and G. Bentley (1986):
Distribution of alkaline phosphatase activity in experimentally produced callus in rats.
J. Bone Joint Surg. (Br.), 68: 629-634.
- Webb, J. C. J., and J. Tricker (2000):
Bone biology - A review of fracture healing.
Current Orthopaedics, 14: 457-463.
- Windhagen, H., F. Witte, C. Hurschler, O. Maciejewski, D. Linnenberg and F. Thorey(2002):
Bone turnover during distraction osteogenesis in an experimental sheep model.
Arch Orthop Trauma Surg 122: 279-282
- Wolf, S., A. Janousek, J. Pfeil, W. Veith, F. Haas, G. Duda, and L. Claes (1998):
The effects of external mechanical stimulation on the healing of diaphyseal osteotomies fixed by flexible external fixation.
Clin. Biomech. (Bristol, Avon), 13: 359-364.
- Young-Min, S. A., T. E. Cawston, and I. D. Griffiths (2001):
Markers of joint destruction: Principles, problems, and potential.
Ann. Rheum. Dis., 60: 545-548.
- Yu-Yahiro, J. A., R. H. Michael, N. H. Dubin, K. M. Fox, M. Sachs, W. G. Hawkes, J. R. Hebel, S. I. Zimmerman, J. Shapiro and J. Magaziner (2001):
Serum and urine markers of bone metabolism during the year after hip fracture.
J. Am. Geriatr. Soc., 49: 877-883.

8.2 Tabellen

Tab. 3.2-1: Auflistung der Gruppeneinteilung, gegliedert in Standzeit nach der Operation (OP), Kontrollgruppe und Lämmer41

Tab. 3.9-1: Auflistung des Serumparameters, der Testart und des Herstellers bzw. des bearbeitenden Instituts..... 56

Tab. 3.12-1: Auflistung der Gruppeneinteilung, gegliedert in Standzeit nach der OP, Kontrollgruppe und Lämmer. Drei Tiere wurden aus der Studie aufgrund von Schwierigkeiten mit dem Sägevorgang der Tibia und damit nicht vergleichbaren Schnittebenen aus der histologischen Beurteilung ausgeschlossen (Schaf 18 / 31 / 9). 63

Tab. 4.1-1: Absolutwerte des jeweiligen individuellen Serumparameters vor Operation, gegliedert in drei Gruppen Osteotomie-Gruppe, Kontrollgruppe und Lämmer, sowie die daraus berechneten statistischen Werte Median, Minimum und Maximum.....65

Tab. 4.1-2: Basiswerte der untersuchten Serumparameter vor der Osteotomie, Maximalwerte der adulten Tiere während der Frakturheilung und die Werte der jugendlichen Tiere: a = normale (präoperative) vs. jugendliche Werte ($p \leq 0.03$), b = präoperative vs. maximale Werte ($p \leq 0.01$), c = maximale vs. jugendliche Werte ($p \leq 0.043$), CV [%] = inter-individuelle Variabilität. 66

Tab. 4.1-3: Prozentuale Werte des Verlaufs des PIIIP-Serumspiegels über die einzelnen Messzeitpunkte, dargestellt als Median, Minimum und Maximum. Der präoperative Wert wird als 100 % angesetzt. 68

Tab. 4.1-4: Prozentuale Werte des des PIIINP-Serumspiegels über die einzelnen Messzeitpunkte, dargestellt als Median, Minimum und Maximum. Der präoperative Wert wurde als 100% angesetzt. 70

Tab. 4.1-5: Prozentuale Werte des Verlaufs des CPII-Spiegels im Serum über die einzelnen Messzeitpunkte (in Tagen), dargestellt als Median, Minimum und Maximum. Der präoperative Wert wurde als 100 % angesetzt. 72

Tab. 4.1-6: Prozentuale Werte des sALP-Serumspiegels über die einzelnen Messzeitpunkte, dargestellt als Median, Minimum und Maximum. Der präoperative Wert wurde als 100 % angesetzt. 74

Tab. 4.1-7: Prozentuale Werte des Verlaufs der TRAP-Serumspiegel über die einzelnen Messzeitpunkte, dargestellt als Median, Minimum und Maximum. Der präoperative Wert wurde als 100 % angesetzt. 76

Tab. 4.1-8: Prozentuale Werte des Verlaufs des Osteocalcinspiegels über die einzelnen Messzeitpunkte, dargestellt als Median, Minimum und Maximum. Der präoperative Wert wurde als 100 % angesetzt. 78

Tab. 4.1-9: Prozentuale Werte des Verlaufs des COMP-Serumspiegels über die einzelnen Messzeitpunkte, dargestellt als Median, Minimum und Maximum. Der präoperative Wert wurde als 100 % angesetzt. 80

Tab. 4.2-1: Messwerte (mm^2) der spezifisch für Kollagen I gefärbten Fläche im Kallus und der im Osteotomiespalt über den Zeitraum von neun Wochen nach der Osteotomie der Tibia. 85

Tabellenverzeichnis

Tab. 4.2-2: Ergebnisse der gemessenen, spezifisch für Kollagen II angefärbten Fläche (mm ²) im Kallus und im Osteotomiespalt über den Zeitraum von neun Wochen nach der Osteotomie.....	87
Tab. 4.2-3: Ergebnisse der gemessenen, spezifisch für Kollagen III angefärbten Fläche im Kallus und im Osteotomiespalt.	89
Tab. 4.2-4: Ergebnisse der Osteoklastenzählung im gesamten Kallus.	91
Tab. 4.2-5: Ergebnisse der Osteoklastenzählung im periostalen Kallus über den Zeitraum von neun Wochen nach der Osteotomie der Tibia.....	93
Tab. 4.2-6: Ergebnisse der Osteoklastenzählung im endostalen Kallus der osteotomierten Tibia im Verlaufe der Heilung.	95
Tab. 4.2-7: Ergebnisse der Osteoklastenzählung in der Kortikalis über den Zeitraum von neun Wochen nach der Osteotomie.	97

8.3 Abbildungen

Abb. 2.1-1: Röhrenknochen (Trostle et al., 1996).....	13
Abb. 2.2-1: Knochenaufbau (modifiziert nach Lea & Febiger, 1989).....	15
Abb. 2.2-2: Topographische Beziehung zwischen den Knochenzellen (modifiziert nach Liesegang, 2000).	16
Abb. 2.2-3: Lakunen in der Kortikalis. Die Lakunen im Knochengewebe werden durch die Knochenresorption der Osteoklasten (rot) vergrößert und verschmelzen miteinander. Die Osteoblasten (blau) liegen als Saum am Rand des Knochengewebes und führen zu einem geordneten Knochenaufbau (Verg.: 27,5x).....	17
Abb. 2.3-1: Zeitverlauf der Frakturheilung in den verschiedenen Kallusregionen (modifiziert nach Sarmiento, et al. 1984).	22
Abb. 2.3-2: Vergleich des humanen und ovinen Skelettaufbaus, die Tibia ist markiert. Quellen: linkes Bild aus Clemente (1987), rechtes Bild aus (Nickel et al., 1992)	26
Abb. 2.4-1: Elektronenmikroskopische Aufnahme und skizzierte Darstellung: Cartilage Oligomeric Matrix Protein (COMP) (Morgelin et al., 1992).....	34
Abb. 3.3-1: Monolateraler Fixateur externe mit sechs Schanzschrauben, Klemmbacken und zwei Metallstäben zur Stabilisierung der osteotomierten Tibia.....	42
Abb. 3.4-1: Monolateraler Fixateur externe an der Schafstibia.	45
Abb. 3.7-1: Sägeschema zur Probenentnahme aus der rechten Tibia.....	48
Abb. 3.8-1: Ausschnitt aus einem mit HE gefärbten Präparat einer Tibia drei Wochen nach der Osteotomie. Entlang der Kortikalisgrenze sind Lakunen (Pfeil) mit Osteoklasten entstanden. Der Osteotomiespalt ist von kapillarisiertem kollagenfaserigem Bindegewebe ausgefüllt (Vergr.: 55x).....	50
Abb. 3.8-2: Immunhistologischer Nachweis von Kollagen I in einer osteotomierten Tibia neun Wochen nach der Osteotomie. Es zeigt sich eine diffuse Verteilung des Kollagen I im ganzen Schnitt.....	53
Abb. 3.8-3: Immunhistologischer Nachweis von Kollagen II spezifisch für Knorpelgewebe in der osteotomierten Tibia zum Zeitpunkt drei Wochen nach der Osteotomie. Der Knorpel ist deutlich angefärbt. Die angefärbten Areale befinden sich im Bereich des Frakturspalts.....	53
Abb. 3.8-4: Immunhistologischer Nachweis von Kollagen III im retikulären Bindegewebe des Kallus zwei Wochen nach der Osteotomie der Tibbia. Im Kallus ist das Kollagen III zwischen den Knochenbälkchen verteilt.	53
Abb. 3.8-5: Osteoklasten identifiziert durch den Nachweis des Enzyms Saure Phosphatase (rot): Es ist deutlich zu erkennen, wie sich die mehrkernigen Zellen an den Saum des Knochens anlegen und eine Resorptionszone erzeugen (Pfeile) (Verg.: 110x).	55
Abb. 3.10-1: Sagittalschnitt durch die Schafstibia; Kalibrierung des digitalen Bildes mittels Maßstab (grün) und Messung der Kortikalisbreite (blau).	58
Abb. 3.10-2: Region of Interest (ROI), 12 mm hoch mit je 6 mm beidseits der Mitte des Osteotomiespaltes (blaue Linie)	58

Abbildungsverzeichnis

Abb. 3.10-3: Einteilung des Sagittalschnittes einer Schafstibia in verschiedene Bereiche entsprechend der lokalen Struktur mit Hilfe von senkrechten Linien: periostal, endostal (rot und blau) und lateral, medial (grün). Die Mitte der Kortikalis definiert die Grenze zwischen periostal und endostal. Die Mitte des Markraumes unterteilt lateral und medial.....	59
Abb. 3.10-4: Gesamtfläche der ROI (roter Kasten) und Beispiele für Teilflächen (rot bzw. gelb) definiert durch den lokalen Gewebetyp innerhalb der ROI.....	59
Abb. 3.12-1: Darstellung eines Boxplots und Erläuterungen seiner Einzelteile	62
Abb. 4.1-1: Darstellung der einzelnen Serumparameter im Vergleich adult vs. juvenil. Bei PICP, PIIINP, sALP, TRAP und COMP waren die Blutspiegel der jugendlichen Tiere signifikant höher als die der adulten Tiere ($p \leq 0,03$).....	67
Abb. 4.1-2: Darstellung der prozentualen PICP-Werte im Zeitverlauf in der Osteotomie- (= fx) vs. Kontrollgruppe. Die PICP-Werte im Serum der Kontrollgruppe zeigten im Versuchszeitraum signifikante Unterschiede ($p < 0,001$).....	69
Abb. 4.1-3: Darstellung der PIIINP-Werte (in %) im Zeitverlauf über neun Wochen in der Gruppe der Osteotomie (= fx) und der Kontrollgruppe. Es ergaben sich signifikante Unterschiede zwischen den beiden Gruppen ($p = 0,045$). Zudem wies die Kontrollgruppe signifikante Unterschiede ($p < 0,001$) innerhalb des Zeitverlaufs auf.....	71
Abb. 4.1-4: Darstellung der prozentualen CPII-Werte im Zeitverlauf nach der Operation in der Osteotomie- (= fx) und der Kontrollgruppe.	73
Abb. 4.1-5: Darstellung der prozentualen sALP Werte im Zeitverlauf in der Osteotomie- (= fx) vs. Kontrollgruppe. Es zeigten sich signifikante Unterschiede zwischen den beiden Gruppen ($p = 0,03$). Die Kontrollgruppe wies zudem signifikante Unterschiede ($p < 0,001$) innerhalb des Zeitverlaufs von neun Wochen auf.	75
Abb. 4.1-6: Darstellung der prozentualen TRAP-Werte im Zeitverlauf von neun Wochen in der Osteotomie- (= fx) vs. Kontrollgruppe. Es zeigten sich signifikante Unterschiede zwischen den beiden Gruppen ($p < 0,01$). Die Kontrollgruppe wies außerdem signifikante Unterschiede ($p = 0,04$) innerhalb des Zeitverlaufs auf.	77
Abb. 4.1-7: Darstellung der prozentualen Osteocalcin-Werte im Zeitverlauf in der Osteotomie- (= fx) und in der Kontrollgruppe. Es ergaben sich signifikante Unterschiede zwischen den beiden Gruppen ($p = 0,006$). Die Kontrollgruppe wies außerdem signifikante Unterschiede ($p < 0,001$) innerhalb des Zeitverlaufs auf.	79
Abb. 4.1-8: Darstellung der prozentualen COMP-Werte im Zeitverlauf von neun Wochen in der Osteotomie- (= fx) und in der Kontrollgruppe. Die fx-Gruppe zeigte im Zeitverlauf der Untersuchung signifikant unterschiedlich hohe Messwerte ($p < 0,001$).....	81
Abb. 4.2-1: Darstellung der Messwerte (mm^2) der spezifisch für Kollagen I angefärbten Fläche im Kallus, getrennt für die Gesamt-ROI und für den Osteotomiespalt im Verlauf der Frakturheilung über neun Wochen.	86
Abb. 4.2-2: Darstellung der Kollagen II-Verteilung im Kallus, getrennt für die Gesamt-ROI und für den Osteotomiespalt. Zwischen der zweiten und dritten Woche nach der Osteotomie gab es eine signifikante Vergrößerung der Kollagen II-Fläche im Frakturspalt ($p = 0,020$), zwischen der sechsten und der neunten Woche verkleinerte sich die Kollagenfläche in beiden ROIs signifikant ($p = 0,014$).	88

Abb. 4.2-3: Darstellung der Kollagen III-Verteilung im Kallus, getrennt für die Gesamt ROI und für den Osteotomiespalt.	90
Abb. 4.2-4: Darstellung der Osteoklastenzahl im gesamten Kallus zwei, drei, sechs und neun Wochen nach der Osteotomie.	92
Abb. 4.2-5: Darstellung der Osteoklastenzahl im periostalen Kallus zu vier Zeitpunkten nach der Osteotomie der Tibia.	94
Abb. 4.2-6: Darstellung der Osteoklastenzahl im endostalen Kallus zu den vier Untersuchungszeitpunkten.	96
Abb. 4.2-7: Darstellung der Osteoklastenzahl in der Kortikalis zu vier Zeitpunkten nach der Osteotomie der Tibia. Von der sechsten zur neunten Woche war eine signifikant höhere Osteoklastenzahl ($p = 0,001$) festzustellen.	98

9 Anhang

9.1 Calcium und Phosphor Werte

fx-Gruppe

Schaf Untersuchung Nr.	Tage post OP	02		03		06		12		13		16		17		61	
		Ca [mmol/l]	P [mmol/l]														
0	0	2,48	1,64	2,40	1,86	2,67	2,33	2,60	1,67	2,72	1,72	2,54	1,78	2,59	1,87	2,41	2,47
1	3	2,81	1,35	2,76	2,10	2,60	1,64	2,62	1,57	2,31	2,11	2,78	1,51	2,65	1,46	2,52	1,75
2	7	2,72	1,41	2,42	2,04	2,62	1,83	2,60	1,31	2,73	2,00	2,65	1,72	2,72	1,73	2,42	2,01
3	14	2,68	1,48	2,29	1,49	2,56	1,88	2,66	1,81	2,68	1,58	2,75	1,65	2,63	1,73	2,39	1,75
4	21	2,83	2,22	2,48	1,44	2,66	1,98	2,63	1,70	2,85	2,22	2,60	1,87	2,70	1,62	2,54	1,95
5	28	2,87	2,34	2,68	2,76	2,94	2,18	2,60	1,72	2,76	1,82	2,63	1,53	2,76	1,58	2,63	2,20
6	35	2,82	2,03	2,59	2,17	2,76	2,16	2,56	1,89	2,73	1,71	2,60	2,06	2,59	1,68	2,62	1,83
7	42	2,54	1,60	2,44	1,66	2,63	2,11	2,68	2,09	2,64	1,86	2,71	2,13	2,56	1,96	2,55	1,94
8	49	2,60	1,25	2,38	1,66	2,63	1,73	2,50	1,80	2,62	1,51	2,74	1,96	2,78	1,90	2,48	2,19
9	56	2,63	1,51	2,48	1,40	2,58	1,41	2,58	1,93	2,73	1,91	2,71	1,94	2,70	1,72	2,31	1,94
10	63	2,57	1,57	2,27	1,47,	2,60	1,79	2,65	1,86	2,83	1,62	2,69	2,13	2,73	1,67	2,34	1,70

Kontrollgruppe

Schaf Untersuchung Nr.	Tage post OP	81		82		88		89		90		91		95		96	
		Ca [mmol/l]	P [mmol/l]														
0	0	2,7	2,84	2,57	2,08	2,7	2,3	2,82	2,05	2,62	2,18	2,33	2,35	2,7	2,78	2,44	2,56
1	3	n/a	n/a														
2	7	2,63	2,09	2,79	1,96	2,75	1,91	2,68	1,63	2,99	1,91	2,77	2,24	2,75	2,28	2,54	2,23
3	14	2,74	2,56	2,65	2,32	2,87	2,38	2,85	1,85	2,83	2,11	2,66	2,06	2,85	2,36	2,65	2,74
4	21	2,63	2,17	2,73	2,48	2,72	1,9	2,67	2,14	2,77	2,01	2,74	2,52	2,83	2,12	2,64	2,98
5	28	2,5	1,80	2,63	2,19	2,69	1,47	2,74	1,43	2,66	1,83	2,6	1,65	2,73	1,8	2,46	2,4
6	35	2,41	2,4	2,5	2,01	2,46	1,64	2,56	1,52	2,5	2,43	2,34	2,59	2,6	1,83	2,24	3,11
7	42	2,57	2,59	2,6	2,13	2,63	1,71	2,61	1,59	2,71	2,09	2,43	2,58	2,68	2,27	2,14	2,63
8	49	2,44	2,19	2,61	2,36	2,67	1,68	2,75	1,63	2,5	2,21	2,35	2,23	2,59	1,67	2,31	3,19
9	56	2,42	2,33	2,49	1,97	2,6	1,45	2,53	1,77	2,64	1,97	2,56	2,54	2,65	2,00	2,35	2,74
10	63	2,57	2,34	2,66	2,21	2,7	1,81	2,7	1,76	2,67	1,78	2,61	2,00	2,64	2,24	2,46	2,41

10 Publikationsverzeichnis

- n Seebeck P, Bail HJ, Exner C, Schell H, Michel R, Amthauer H, Bragulla H, Duda GN (2005)
Do serological tissue turnover markers represent callus formation during fracture healing?
Bone. 2005 Nov;37(5):669-77. Epub 2005 Aug 25..

- n Schell H, Lienau J, Epari DR, Seebeck P, Exner C, Muchow S, Bragulla H, Haas NP, Duda GN. (2006)
Osteoclastic activity begins early and increases over the course of bone healing.
Bone. 2006 Apr;38(4):547-54. Epub 2005 Dec 2.

Danksagung

11 Danksagung

Ich möchte meinem Doktorvater, Herrn Professor Dr. H. Bragulla, für die kompetente Betreuung meiner Arbeit danken.

Professor Dr. G. Duda danke ich für die Möglichkeit der Anfertigung dieser Dissertation und für die Einblicke in die Forschung.

Frau Wegener danke ich für die Hilfe bei der statistischen Auswertung.

Für die RIA-Auswertung der Serumparameter und die nette Zusammenarbeit mit Herrn Michel (Radiologie, Charité Virchow Klinikum) möchte ich mich sehr bedanken.

Frau Dr. Petra Seebeck danke ich für die fachliche Beratung aus großer Entfernung, schade dass Du gegangen bist.

Frau Dr. Hanna Schell stand mir stets hilfreich zur Seite, sowohl fachlich als auch freundschaftlich, dafür danke ich ihr sehr herzlich.

Weiterhin möchte ich mich bei allen Mitarbeitern und Doktoranden der BKH Arbeitsgruppe für die herzliche Zusammenarbeit bedanken.

Besonderer Dank an Lars Hielscher, Elke Thelen und Nedde, die meinen Motivationstiefs und meinem Kampf mit dem Computer mit schier unendlicher Geduld begegnet sind.

Dank an meine Familie für den unerschütterlichen Rückhalt und an viele Freunde, die immer mal wieder zu kurz gekommen sind.

Nicht zuletzt danke an Carsten für all Deine Liebe.

12 Unabhängigkeitserklärung

Die vorgelegte Arbeit ist von mir selbständig ohne unzulässige Hilfe Dritter verfasst und erstellt worden. Verwendete Hilfsmittel und Literatur sind vollständig angegeben.

Berlin, den 30.07.2009

Christine Exner-Oliaß