

Aus dem
Institut für Veterinär-Anatomie
des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Freien Universität Berlin
und dem
Julius Wolff Institut, Charité –
Universitätsmedizin Berlin

**Etablierung eines atrophen Pseudarthrose-Modells
am Femur der Ratte**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Veterinärmedizin (Dr. med. vet.)
an der
Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Svenja Dormann
Tierärztin aus Marburg

Berlin 2017
Journal-Nr.: 3785

Aus dem
Institut für Veterinär-Anatomie
des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Freien Universität Berlin
und dem
Julius Wolff Institut, Charité –
Universitätsmedizin Berlin

Etablierung eines atrophen Pseudarthrose-Modells am Femur der Ratte

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Veterinärmedizin (Dr. med. vet.)
an der
Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Svenja Dormann
Tierärztin
aus Marburg

Berlin 2017

Journal-Nr.: 3785

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Freien Universität Berlin

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Jürgen Zentek
Erster Gutachter: Prof. Dr. Karl D Weyrauch
Zweiter Gutachter: Prof. Dr.-Ing. Georg N. Duda
Dritter Gutachter: Prof. Dr. Leo Brunnberg

Deskriptoren (nach CAB-Thesaurus):

rats; animal models; bone fractures; osteotomy (MeSH); pseudarthrosis (MeSH);
healing; periosteum; osteogenesis (MeSH); external fixators (MeSH); fracture
fixation; radiography; histology; immunohistology

Tag der Promotion: 08.07.2017

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: 978-3-86387-851-1

Zugl.: Berlin, Freie Univ., Diss., 2017

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 2017

Choriner Str. 85 - 10119 Berlin

verlag@menschundbuch.de – www.menschundbuch.de

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	7
2	Stand des Wissens.....	10
2.1	Zur Biologie der Knochen	10
2.1.1	Makroskopie der Knochen.....	10
2.1.2	Mikroskopie des Knochens.....	11
2.1.3	Periost und Endost.....	16
2.1.4	Blutversorgung des Knochens.....	18
2.2	Ungestörte Knochenbruchheilung.....	19
2.2.1	Primäre Knochenbruchheilung	19
2.2.2	Sekundäre Knochenbruchheilung.....	21
2.3	Gestörte Knochenbruchheilung.....	26
2.3.1	Definition der Heilungsstörung	26
2.3.2	Klassifizierung der Heilungsstörungen	30
2.3.3	Atrophe Pseudarthrose	33
3	Material und Methoden.....	37
3.1	Auswahl und Haltung der Versuchstiere	37
3.2	Operatives Vorgehen.....	38
3.2.1	Knochenmarksentnahme	38
3.2.2	Externer Fixateur.....	39
3.2.3	Osteotomie.....	40
3.2.4	Nachsorge.....	44
3.2.5	Applikation von Expansionsmedium	45
3.3	Kontrolluntersuchungen der Versuchstiere	45
3.4	Gewinnung des Untersuchungsmaterials.....	46
3.5	Erstellung der histologischen Präparate.....	47
3.5.1	Entkalken, Entwässern und Einbetten der Präparate.....	47
3.5.1.1	Immunhistologie/ Histologie	47
3.5.1.2	Histomorphometrie	48
3.5.2	Schneiden der Präparate	49
3.5.2.1	Immunhistologie/ Histologie	49
3.5.2.2	Histomorphometrie	50
3.5.3	Histologische Färbungen.....	50
3.5.3.1	Immunhistologie	51
3.5.3.2	Histologie.....	54
3.5.3.3	Histomorphometrie	56
3.6	Auswertungen.....	57
3.6.1	Festlegung einer Region of Interest (ROI).....	57
3.6.2	Radiologische Auswertung.....	59
3.6.3	Histologische Auswertung	60
3.6.3.1	Deskriptive Auswertung	60
3.6.3.2	Zählung der Osteoklasten.....	60
3.6.3.3	Zählung der Gefäße.....	61
3.6.4	Histomorphometrische Auswertung.....	61
3.6.4.1	Computergestützte Bildanalyse	61
3.6.4.2	Statistische Analysen.....	64
4	Ergebnisse	66
4.1	Postoperatives Befinden der Versuchstiere	66
4.2	Radiologische Auswertung	67
4.2.1	Periostaler Kallus	67
4.2.2	Endostaler Kallus	69
4.2.3	Intrakortikaler Spaltbereich.....	70
4.2.4	Intramedullärer Spaltbereich	71
4.2.5	Integrität der Kortizes	72
4.2.6	Umgebung um die Kirschner-Drähte	73
4.3	Histologische Auswertung.....	75

Inhaltsverzeichnis

4.3.1	Deskriptive Auswertung nach der achtwöchigen Standzeit.....	75
4.3.1.1	Der periostale Kallus.....	75
4.3.1.2	Das Periost.....	81
4.3.1.3	Der endostale Kallus.....	83
4.3.1.4	Der Osteotomiespalt.....	86
4.3.1.5	Die Kortikalis.....	88
4.3.2	Dichte der Osteoklasten (OC).....	93
4.3.3	Dichte der Gefäße.....	94
4.3.4	Ergebnisse der histomorphometrischen Auswertung.....	96
4.3.4.1	Analyse der Gesamtflächen.....	96
4.3.4.2	Analyse des periostalen Kallus.....	98
4.3.4.3	Analyse des endostalen Kallus.....	99
4.3.4.4	Analyse des Osteotomiespaltes.....	100
4.3.4.5	Analyse der Kortikalis.....	101
4.4	Zusammenfassung der Ergebnisse.....	102
4.4.1	Radiologie.....	102
4.4.2	Deskriptive Histologie.....	103
4.4.3	Dichte der Osteoklasten.....	106
4.4.4	Dichte der Gefäße.....	106
4.4.5	Ergebnisse der histomorphometrischen Auswertung.....	107
4.4.5.1	Analyse der Gesamtflächen.....	107
4.4.5.2	Analyse des periostalen Kallus.....	107
4.4.5.3	Analyse des endostalen Kallus.....	107
4.4.5.4	Analyse des Osteotomiespaltes.....	107
4.4.5.5	Analyse der Kortikalis.....	107
5	Diskussion.....	108
5.1	Diskussion von Material und Methoden.....	108
5.1.1	Das Modell der atrophen Pseudarthrose.....	108
5.1.2	Tiermodell.....	109
5.1.3	Versuchsaufbau.....	112
5.1.4	Entnahme und Aufbereitung des Untersuchungsmaterials.....	116
5.1.5	Auswertungen.....	117
5.2	Diskussion der Ergebnisse.....	120
5.2.1	Operationsverlauf und Kontrolluntersuchungen der Versuchstiere.....	120
5.2.2	Radiologie.....	122
5.2.3	Histologie und Histomorphometrie.....	127
5.2.4	Vergleich mit anderen Studien.....	139
5.2.5	Schlussfolgerung und Ausblick.....	142
6	Zusammenfassung.....	145
7	Summary.....	147
8	Literaturverzeichnis.....	149
9	Publikationsverzeichnis.....	159
	Danksagung.....	160
	Selbständigkeitserklärung.....	161

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
ABC	Avidin-Biotin-Complex
AG	Antigen
AK	Antikörper
AP	Alkalische Phosphatase
Aqua dest.	Aqua destillata
BMP	bone morphogenic protein
bzgl.	bezüglich
bzw.	beziehungsweise
C	Celsius
ca.	circa
cm	Zentimeter
diesbzgl.	diesbezüglich
d.h.	das heißt
DMEM	Dulbecco´s Modified Eagle Medium
DOPC	determined osteogenic precursor cells
etc.	et cetera
Fa.	Firma
g	Gramm
ggf.	gegebenenfalls
gr.	griechisch
h	Stunde
IOPC	inductible osteogenic precursor cells
kg	Kilogramm
KGW	Körpergewicht
l	Liter
µl	Mikroliter
MEA	Methoxaethylacetat
mg	Milligramm
ml	Milliliter
mind.	mindestens
Min.	Minute
mm	Millimeter
mm ²	Quadratmillimeter
n	Anzahl
Nm	Newtonmeter
Nmm	Newtonmillimeter
NSAID	Nichtsteroidale Antiphlogistika
OP	Operation
PBS	Phosphat-Puffer-Lösung
PMMA	Polymethylmetacrylat
resp.	respektive
ROI	region of interest
RT	Raumtemperatur
α-SMA	α-Smooth Muscle Actin
s.	sive
Str.	Stratum
Tab.	Tabelle
TRAP	Tartrate-Resistant Acid Phosphate
u. a.	unter anderem
u./ o.	und/ oder
usw.	und so weiter
v.a.	vor allem
z.B.	zum Beispiel
°	Grad
%	Prozent

1 Einleitung

Knochen spielen mit ihren vielfältigen Funktionen eine unverzichtbare Rolle im menschlichen und tierischen Körper. Umso wichtiger ist es, ihre vollständige Integrität und Funktionsfähigkeit zu erhalten¹⁻⁵. Die Knochenregeneration stellt einen komplexen Prozess dar, der durch viele Zellen und Signalmoleküle koordiniert und reguliert wird^{3,6-15}. Treten innerhalb dieser Regulationsvorgänge Störungen auf, kann in Folge die Heilung eines Knochens beeinträchtigt sein^{3,16-21}. In den vergangenen 50 Jahren wurden bedeutende Fortschritte in der Behandlung von Frakturen gemacht, dennoch weisen gegenwärtig 10 - 20 % aller Knochenbrüche im klinischen Alltag Heilungsstörungen auf^{9,12,19,20,22-27}. Diese bedeuten für die Patienten eine oft langwierige und nicht immer erfolgreiche Behandlung. Sie können mit einer massiven Einschränkung der Lebensqualität einhergehen, z.B. durch verringerte Mobilität, Arbeitsunfähigkeit oder Invalidität. Weiterhin entstehen vermehrte Kosten durch zusätzliche Operationen, Wiederholungsbehandlungen, Wechsel von Osteosynthesen, lange Krankenhausaufenthalte und Physiotherapien^{5,11,14,15,20,24,25,27-36}.

Heilungsstörungen treten in Form einer verzögerten oder völlig ausbleibenden Heilung auf^{7,16,22,25,34,37,38}. Benötigt der Heilungsprozess mehr Zeit als erwartet, schreitet aber weiterhin fort, handelt es sich um eine verzögerte Heilung^{2,21,25,34,39,40}. Nimmt der verzögerte Heilungsprozess zu viel Zeit in Anspruch, kann als Resultat die Heilung ausbleiben^{2,21,34,38,41}. Es entstehen sogenannte „Pseudarthrosen (Falschgelenke)“, deren Heilungsantwort völlig zum Erliegen gekommen ist^{5,20,21,25,34,35,38,39,42}. Unterschieden werden vitale und avitale Erscheinungsformen^{26,27,34,37,38}. Vitale, auch so genannte „hypertrophe Pseudarthrosen“, gelten biologisch als noch reaktionsbereit. Wird die Hauptursache ihrer Entstehung, eine zu geringe Stabilisierung der Fraktur, beseitigt, würde dies zur Heilung führen^{3,7,17,20,34,38,40,43-45}. Avitale Pseudarthrosen, zu denen auch die „atrophe Pseudarthrose“ zählt, werden als reaktionsunfähig bewertet, eine Heilungstendenz ist nicht erkennbar^{19-21,27,34,37,38,46-48}. Ätiologisch kommen mechanische und biologische Faktoren in Betracht. Insbesondere eine gestörte Vaskularisierung im Frakturbereich und eine zu hohe Rigidität des angewandten Fixierungssystems gelten als Risikofaktoren. Aber auch schwere Schäden der Weichteile und ein beeinträchtigter Gesundheitsstatus des Patienten, z.B. durch Diabetes mellitus, systemische Hormonstörungen, das Alter oder durch ein erschöpftes Potential der zur Heilung notwendigen mesenchymalen Zellen aus dem Knochenmark, müssen bei der Ursachenforschung in Betracht gezogen werden^{3,7,8,17-20,27,31,33,34,43,48-52}. Aufgrund der bisherigen Unkenntnis über die genauen Mechanismen, die der Entwicklung einer atrophen Pseudarthrose zugrunde liegen, ist es trotz vielfacher Versuche bisher nicht möglich, kausal zu therapieren^{3,7,8,19,25,26,34,53-55}. Die derzeit angewandten symptomatischen Therapien beinhalten zunächst ein chirurgisches Debridement des Frakturbereiches, um einen biologischen Stimulus zu setzen und die Revaskularisierung zu fördern^{8,20,29,34,35,43,50,56}.

Zeitgleich sollte die Optimierung der biomechanischen Situation erfolgen, denn durch weniger rigide Osteosynthesesysteme erhöht sich die Mikrofragmentbewegung, welche im entsprechenden Maß ebenfalls heilungsfördernd wirkt^{5,20,22,23,34,35,43,48,56,57}. Einen weiteren Therapieansatz stellt das Einbringen von osteogen reaktionsfähigem Substrat in den Frakturbereich dar, da es der atrophen Pseudarthrose an diesem mangelt^{8,11,20,21,24,34,36,45,48,56,58}. So wird derzeit vornehmlich per Transfer von autologem Spongiosagewebe therapiert^{5,8,20,21,25,34,43,45,56,58-60}. Aber auch die Transplantation von Periost^{43,61,62} oder mit osteogenen Substanzen bzw. Zellen beladenen Knochenersatzmaterialien^{12,20,34,35,43,45,47,63,64} scheint erfolgsversprechend. Ebenso wird das Einbringen von Knochenmark^{5,31,34-36,45,48,65}, Periostzellen^{43,59,66} und pluri- oder monopotenten mesenchymalen Stammzellen^{3,8,20,25,31,34,35,45,47,48,67} in den Defekt erprobt. Die lokale Anwendung von Wachstumsfaktoren steht dabei besonders im Fokus, da diese Signalmoleküle bei der Frakturheilung eine wichtige Rolle spielen^{20,24-27,29,31,34,35,45,47,49,56-60,68-73}. Seit wenigen Jahren wird auch über eine Intervention der Frakturheilung über das Immunsystem^{12,31,74} oder per Gentherapie mittels viraler Vektoren diskutiert^{15,45}. Bei vielen Therapieansätzen liegt durch mögliche Infektionen oder Unverträglichkeitsreaktionen ein hohes Risiko an Nebenwirkungen vor, welche die ohnehin schon komplizierte Behandlung zusätzlich erschweren^{3,20,21,29,34,43,45,58,60,66,67,75}.

Das Ziel dieser Studie ist, ein standardisiertes und gut reproduzierbares Modell einer experimentellen atrophen Pseudarthrose am Femur der Ratte zu etablieren, da zu Beginn dieser Modelletablierung kein geeignetes Modell in der Literatur zu finden war. Gelingt dies, dann würde die entstehende atrophe Pseudarthrose die klinische Situation, in der oft eine Unterbrechung des Periosts und Schäden der umliegenden Weichgewebe sowie medullären Bereiche des Knochens auftreten, annähernd realistisch darstellen^{3,6,19,25,27,33,34,49,76,77}. Somit wäre ein kliniknahes Modell geschaffen, welches für weitere Fragestellungen, die vorliegende therapeutische Problematik betreffend, herangezogen werden könnte.

Bisher beschäftigten sich viele Studien mit dem Heilungspotential von Pseudarthrosen. Allerdings lagen hier vornehmlich Modelle mit großen Frakturspalten, auch Defekt kritischer Größe (Critical Size Defect - CSD) genannt, vor^{19,21,30,47,57,58,66,76,78-82}. Dort herrscht jedoch ein anderes mechanisches und biologisches Milieu vor, weshalb nicht die biologisch inaktive Situation, in der sich eine atrophe Pseudarthrose entwickeln würde, repräsentiert wird^{7,17,32,40,48,49,53}. Einige Studien arbeiteten auch mit intramedullären Marknägeln als Fixierungssystem^{7,14,17,24,32,33,45,60,83}. Dieses bringt jedoch eine Rotationsinstabilität und damit einhergehende Bewegung im Frakturspalt mit sich, woraus eine vitale, hypertrophe Pseudarthrose resultiert^{17,25,33,40,84}.

In dieser Studie sollte die Situation der „kliniknahen“ atrophen Pseudarthrose durch das Setzen einer Osteotomie mit anschließender thermischer Zerstörung des Periosts

^{3,7,14,15,17,24,25,33,35,36} und Entfernung des Knochenmarks ^{15,33,36,47,48} am Femur der Ratte erreicht werden. Dieses Vorgehen ging von der Hypothese aus, dass eine atrophe Pseudarthrose durch einen Mangel an osteogen reaktionsfähigem Substrat bedingt ist, welches unter physiologischen Bedingungen vornehmlich durch lokale mesenchymale Stammzellen sowie deren Vorläufer gestellt wird ^{3,8,18,20,28,31,34,35,48,49,66,67,85}. Daher galt es für die Modelletablierung, das biologische Heilungspotential der entsprechenden Zellquellen in der unmittelbaren Umgebung der Osteotomie auszuschalten. In einer weiteren Hypothese wird das Periost bei der Heilung eines Defektes am langen Röhrenknochen als essentielle Leitstruktur vermutet, wobei es immer die Phase der periostalen Rekonstruktion durchlaufen muss. Als Stabilisationssystem wurde ein unilateraler Fixateur externe gewählt. Dieser minimierte Interaktionen zwischen dem Fixierungssystem und den Heilungsprozessen im Frakturbereich und ermöglichte eine hohe Rigidität des Osteotomiebereiches unter standardisierten Bedingungen.

Die Einschätzung der Verwendbarkeit dieses Modelles erfolgte anhand radiologischer, histologischer, immunhistologischer und histomorphometrischer Auswertungen der Rattenfemora nach einer Standzeit von 56 Tagen. Nach Ablauf dieser Zeit ist bei Ratten die Entwicklung einer atropen Pseudarthrose mit Sicherheit vorhersagbar ^{7,17,47,53}.

2 Stand des Wissens

2.1 Zur Biologie der Knochen

Dem Skelettsystem des menschlichen und tierischen Körpers werden vielfältige Aufgaben zugeschrieben ⁸⁶. Der dreidimensionale Bau des harten Knochengewebes formt die Architektonik des Körpers vieler Lebewesen. Diese Stützfunktion wird durch das Zusammenwirken von Knochen, Gelenken, Sehnen, Bändern, Muskeln und deren Ansatzstellen an Knochen ergänzt und das Lebewesen somit zur Lokomotion befähigt. Weiterhin wird sensiblen Organen durch eine vollständige oder teilweise knöcherne Ummantelung Schutz gewährt, und als Speicher von Mineralstoffen ist der Knochen für den Körperstoffwechsel unentbehrlich. Auch ist er durch seine ausgeprägte Sensitivität und metabolische Stoffwechselleistung in der Lage, sich der jeweiligen mechanischen Belastung anzupassen (Plastizität) ^{5,12,46,87}. So zieht zeitlebens jede Änderung von physiologischen Druck-, Zug-, Biegungs- und Torsionskräften einen Knochenumbau nach sich ^{4,5,87-89}. Bezüglich seiner Kompressions- und Spannungsfähigkeit ist das Knochengewebe weit stärker als Beton oder Granit ⁸⁷. Auch die dem Knochen aufliegende Haut (Periost) ist in diese vielfältigen Funktionen integriert ^{11,19,26,70,74,90,91}.

2.1.1 Makroskopie der Knochen

Im Skelettsystem existieren verschiedene Knochenformen. Aufgrund ihrer typischen makroskopischen Gestalt entwickeln vorwiegend die Röhrenknochen Pseudarthrosen und eignen sich so besonders für wissenschaftliche Arbeiten, wie auch der hier genutzte Oberschenkelknochen (Os femoris) ^{20,23,26,27}. Die konisch verbreiterten Enden des Röhrenknochens bezeichnet man als Epiphysen. Treten an den dort angrenzenden Gelenken Belastungen auf, werden diese auf den größeren Epiphysenquerschnitt verteilt ⁹². An die Epiphysen schließen sich beim wachsenden Individuum die Metaphysen (Epiphysenfugen) an. Diese zunächst knorpeligen Bereiche sind für das Längenwachstum des Röhrenknochens verantwortlich ^{90,91}. Die Diaphyse bildet den Schaft eines Röhrenknochens. Eine hier vorliegende dicke knöcherne Ummantelung (Substantia compacta) gibt dem Knochen die für die Stützfunktion nötige Steifheit ¹⁸. Sie umschließt die innen liegende Knochenmarkshöhle, in der sich ein schwammartiges Netzwerk aus Knochenbälkchen (Substantia spongiosa) befindet. Zwischen den Bälkchen liegen Blut- und Lymphgefäße sowie zur Blutbildung befähigtes Knochenmark ^{90,91}. Der enorme Gefäßreichtum macht den Markraum zum führenden Versorgungskompartiment des Knochens und durch den Hohlraum ist eine gewisse elastische Verformbarkeit des Knochens gegeben ¹⁸. So stellen die langen Knochen ein Meisterstück der biomechanischen Planung dar, da widersprüchliche Eigenschaften wie Steifigkeit und Flexibilität oder Stärke und Leichtigkeit durch ihren speziellen Aufbau und ihre besondere Zusammensetzung vereint werden ^{5,87}. An der Knochenaußenfläche befindliche Vorsprünge, die Apophysen, dienen dem widerstandsfähigen Ansatz von Muskeln, Bändern

und Sehnen^{86,93}. Der gesamte Knochen ist auf der Außenfläche und der Knochenmarkshöhle zugewandten Innenfläche mit einer dünnen Hülle bedeckt. Eine Ausnahme bilden die Gelenke und Muskelansatzstellen. Außenseitig bezeichnet man diese Haut als Periost, im Inneren als Endost. Beiden kommt eine Aufgabe in der Ernährung des Knochens und als Träger eines wesentlichen Pools an Zellen, die zur Knochenbildung befähigt sind, zu (Punkt 2.1.3)^{7,11,14,47,52,74,83,87,90,91}.

2.1.2 Mikroskopie des Knochens

Neben seinem makroskopischen Aufbau verdankt das Knochengewebe seine Einstufung als eines der am höchsten differenzierten Stützgewebe des Körpers auch seiner mikroskopischen Zusammensetzung⁹⁴.

Dabei lässt die Substanz der Knochen, die sogenannte **Knochenmatrix**, feinstofflich zwei wesentliche Komponenten, die anorganischen und die organischen Bestandteile, erkennen. Die Festigkeit des Knochens ergibt sich durch dessen Mineralisierung, bedingt durch seine anorganischen Bestandteile. Diese machen ca. zwei Drittel der Knochenmatrix aus⁹⁵. Vornehmlich bilden Kalzium und Phosphat ein kristallines Raumgitter aus Hydroxylapatit. Weiterhin sind u.a. nichtkristallines Kalziumphosphat, Bikarbonat und Zitrat beteiligt. Das übrige Drittel der Knochenmatrix stellen die organischen, unverkalkten Bestandteile, welche für die notwendige Flexibilität des Knochens sorgen. Dies wird hauptsächlich über elastische Fasern aus Kollagen des Typs I, einem Skleroprotein, erreicht⁹⁵. Daneben sind zu einem wesentlich geringeren Anteil teilweise knochenspezifische Glykoproteine, Proteoglykane, Lipide und Wasser enthalten⁹⁵, welche die ungeformte Grundsubstanz bilden und in Verbindung mit den Kollagenfasern als Osteoid bezeichnet werden^{88,90-92}. Die charakteristische Widerstandsfähigkeit des Knochens ergibt sich allerdings aus dem Zusammenspiel der anorganischen und organischen Komponenten. So dienen die tripelhelikalen Strukturen des Kollagens Typ I als Leitstrukturen für die Anlagerung der nadel-förmigen Mineralkristalle. Dieses Konstrukt ist wiederum von der proteoglykanreichen Grundsubstanz umgeben^{87,90,91}. Auf den Knochen einwirkende Zugkräfte werden hauptsächlich durch die Kollagenfasern abgefangen, Druckkräfte hingegen durch die Mineralisierung⁹⁰.

Die **Zellen des Knochens** sind verantwortlich für den physiologischen Auf- und Abbau sowie den Erhalt bzw. die Regeneration des Knochengewebes, welche einem empfindlichen Gleichgewicht unterliegen. Die hierfür wesentlichen Zellen sind die Knochenbildungszellen (Osteoblasten), die Knochenzellen (Osteozyten) und die den Knochen abbauenden Zellen (Osteoklasten)^{91,96}.

Die **Osteoblasten** sorgen für den Aufbau der organischen Knochenmatrix, für einige Mechanismen der Verkalkung sowie für eine gewisse Modulation der Osteoklastenfunktion^{11,12,18,67,90,95}. Im Periost bzw. Endost liegen die Vorläuferzellen der Osteoblasten, die äußerst teilungsaktiven spindelförmigen **Osteoprogenitorzellen**, vor. Diese haben sich aus

undifferenzierten mesenchymalen Stammzellen entwickelt^{12,31,35,88,91,95} und differenzieren sich nachfolgend zu **Präosteoblasten**, welche bevorzugt in knochenseitig gelegenen Schichten des Periosts und Endosts und entlang von Gefäßen im Knochenmark auftreten^{91,95}. Aus ihnen entstehen letztendlich die nicht mehr teilungsfähigen Osteoblasten. Sie können im Knochen als aktive oder als ruhende Zellen vorliegen. Im aktiven Zustand befinden sie sich meist an den Knochenoberflächen, wo sie das Osteoid synthetisieren und sezernieren. Durch ihre kubische bis zylinderförmige Gestalt, dem runden Zellkern, dem basophilen Zytoplasma und den zahlreichen ausgeprägten Organellen sind sie gut zu erkennen^{90,91}. Das sezernierte Osteoid liegt in zunächst ungeordneter Form vor⁹¹. Durch weitere von den Osteoblasten gebildete Proteine wird der nachfolgende Prozess der Mineralisierung reguliert^{18,90,91}. Diese Proteine sorgen durch ihre hohe Affinität für Kalzium und Phosphat für deren Anlagerung an die Kollagenfasern und für ihre Umwandlung zu Hydroxylapatitkristallen^{90,91}. Da der Knochen im physiologischen Zustand je nach Änderung auf ihn einwirkender Kräfte ständigen Umbauprozessen unterliegt, wobei der Knochen auf- und abgebaut wird, werden auch knochenabbauende Zellen benötigt, die Osteoklasten (s.u.). Diese werden in ihrer Arbeit von den Osteoblasten unterstützt. Durch abgegebene Signalmoleküle werden Osteoklasten zum Zielgebiet gelotst, abgegebene Enzyme lösen die Matrixsubstanzen auf und gewähren den Osteoklasten den Zugang zum Zielgewebe^{12,91,97}.

Ist die lokale Knochenbildung abgeschlossen, lässt die Aktivität der Osteoblasten nach, die Zellen flachen sich spindelförmig ab, der Kern wird länglich, die Basophilie nimmt ab und es bilden sich fingerförmige Zytoplasmafortsätze aus⁹⁰. In dieser inaktiven, ruhenden Form werden sie auch als **Knochenoberflächenzellen (Bone lining cells)** bezeichnet. Sie behalten weiterhin ihr osteogenes Potential und die Fähigkeit zur Proliferation⁹¹.

Etwa 15% der Osteoblasten werden jedoch bei der Knochenbildung vollständig von mineralisiertem Knochengewebe eingeschlossen und differenziert sich zu **Osteozyten**, den reifen Knochenzellen^{87,88,90,91,94}. Sie übernehmen entscheidende Aufgaben zur Erhaltung des Knochens und zur Anpassung an die mechanische Beanspruchung. Ihre Entwicklung geht mit einer massiven Größenabnahme einher, ihre Gestalt wird mandelförmig, der Kern ist groß und oval und die Organellen werden stark reduziert, da auch die Aktivität stark abnimmt. Sie bilden ebenfalls lange Fortsätze aus, die in winzigen Knochenkanälchen, den Kanalikuli, liegen^{88,90,91}. Über diese Fortsätze stehen sie mit anderen Osteozyten, Osteoblasten, Gefäßen und der extrazellulären Matrix in Kontakt, wodurch ein ständiger Nährstoff-, Abfallprodukt- und Informationsaustausch stattfindet^{87,90,91}. Da die Osteozyten in schmalen Lakunen zwischen den lamellären, verkalkten Knochenschichten liegen und nur einige sich in direkter Nachbarschaft zu Blutgefäßen und Nervenfasern befinden, wird über die Kanalikuli die Versorgung aller Osteoblasten gewährleistet^{88,91}. Insgesamt stellen die Osteozyten eine wesentliche Voraussetzung für den Knochenstoffwechsel. Degenerieren sie, z.B. durch eine Unterbrechung des Nährstofftransportes durch Gefäßruptur im Rahmen

eines Knochenbruches, geht auch die sie umgebende Matrix zugrunde⁹¹. Eine weitere wichtige Aufgabe kommt ihnen bei der strukturellen Anpassung des Knochengewebes an sich ändernde mechanische Belastungen zu^{90,91}. Man nimmt an, dass sie als Mechano-sensoren fungieren und Deformationen des Knochens wahrnehmen können, ähnlich einer Spinne, die die Vibrationen eines im Netz zappelnden Insekts wahrnimmt^{87,90}. Sie reagieren mit einer Änderung ihrer Aktivität und stimulieren über ihre Fortsätze weitere Zellen. Neue Knochenmatrix wird synthetisiert und Kalzium freigesetzt, wodurch sich das Knochengewebe entsprechend verstärkt, Mikrobeschädigungen repariert werden und totes Gewebe ersetzt werden kann^{87,91}.

Bei jeder Art von Um- und Abbauprozessen des Knochengewebes spielen die **Osteoklasten** mit ihren knochenresorbierenden Mechanismen eine bedeutende Rolle^{11,12,74}. Man vermutet ihre Herkunft in Vorläuferzellen der Monozyten aus dem Knochenmark, welche den weißen Blutzellen zugeordnet werden⁹⁰. Durch Verschmelzung mehrerer Monozyten entstehen die vielkernigen Riesenzellen. Sie besitzen mindestens zwei, manchmal aber auch bis zu 100 Zellkerne^{90,91}. Durch ein komplexes Netz aus Proteinfilamenten und Mikrotubuli innerhalb der Zelle sind sie zur Lokomotion befähigt und heften sich an die zu resorbierende Knochenoberfläche^{91,94}. Aktive Osteoklasten weisen ein stark basophiles, granuliertes Zytoplasma auf. Sie enthalten eine Vielzahl an Organellen und Vakuolen, da sie für ihre Aufgabe viel Energie aufwenden und Substanzen speichern bzw. transportieren müssen^{90,91}. Zunächst setzen sie Enzyme frei, welche die Struktur der Grundsubstanz auflösen und so die Hydroxylapatitkristalle freilegen. Anschließend wird das Milieu azidifiziert und eine Auflösung der Kristalle, somit eine Entmineralisierung des Knochens, bewirkt⁹⁰. Offengelegte Fragmente von Kollagenfasern und Grundsubstanz können nun weiter aufgeschlossen werden. Sämtliche Produkte werden aufgenommen und in den Vakuolen der Zelle weiter „verdaut“ um schließlich an den Blutkreislauf abgegeben werden zu können. Erfolgt der Abbau direkt an der Knochenoberfläche, bildet sich eine Resorptionslakune (Howship-Lakune). Ein Abbau entlang von Gefäßen führt eher zu einer kanalähnlichen Resorption. So befinden sich aktive Osteoklasten typischerweise stets unmittelbar am Knochen in ihren resorbierten Zonen. Nach lokaler Beendigung der Knochenresorption lösen sie sich und wandern zu einer anderen Stelle, um dort den Knochenabbau fortzusetzen⁹¹.

Die übergeordnete Kontrolle der Knochenformation und -resorption unterliegt der Schilddrüse bzw. Nebenschilddrüse durch die Regulation von kalzitropen Hormonen (Parathormon, Kalzitronin). Durch Kalzitronin erfahren Osteoblasten und Osteozyten eine Aktivierung, durch den Gegenspieler Parathormon werden sie in ihrer Aktivität gehemmt. Bei den Osteoklasten verhält es sich umgekehrt^{91,94}. Zusätzlich kommen einige lokal wirkende Faktoren zum Tragen, wie Steroidhormone, Zytokine, Interleukine, Wachstumsfaktoren und Prostaglandine^{1,10-12,16,35,45,47,50,51,69,74,83,95,96,98}.

Die **Knochenbildung (Osteogenesis)** kann über zwei Wege erfolgen. Entsteht aus vorliegendem mesenchymalen Bindegewebe direkt Knochengewebe, so handelt es sich um die desmale (auch primäre, direkte oder bindegewebige) Ossifikation. Wird jedoch eine bestehende Knorpelmatrix durch Knochen ersetzt, spricht man von der chondralen (auch sekundären oder indirekten) Ossifikation. In beiden Fällen entsteht zunächst Geflechtknochen, welcher später meist durch Lamellenknochen ersetzt wird ^{11,32,84,90,91,95}.

Einige Knochen, wie z.B. die Deckknochen des Schädeldaches werden auf dem Weg der **desmalen Ossifikation** gebildet. Ausgehend von mehreren primären Verknöcherungskernen, den Ossifikationszentren, weitert sich die Mineralisierung aus, bis die einzelnen Ossifikationszentren miteinander verschmelzen und der entstehende Knochen vollständig durchbaut ist ^{86,90,91,93}. Zu Beginn differenzieren sich vorliegende Mesenchymzellen zu Osteoblasten und synthetisieren das unverkalkte Osteoid. Im weiteren Verlauf mineralisiert dieses und formiert sich zu Knochenbälkchen (Trabeculae) aus primärem Geflechtknochen ^{1,90,91}. Dieser Vorgang wird durch das starke Einsprießen von Kapillaren in das Ossifikationszentrum begleitet. Über diese Gefäße dringen zusätzliche Zellen ein ^{16,90,91} und es werden für die Mineralisierung notwendige anorganische Knochenbestandteile herangeführt ^{86,93}. Die Osteoblasten differenzieren sich weiter zu Osteozyten und es entsteht der sekundäre Geflecht- oder Faserknochen, in welchem fein- und grobfibrilläre Kollagenfaserbündel ungeordnet vorliegen ^{86,91,93,95}. Dieser, während der embryonalen Entwicklung angelegte, sekundäre Geflechtknochen wird nach der Geburt zügig in Lamellenknochen umgewandelt (Remodeling), mit Ausnahme weniger skelettaler Bestandteile ^{90,91}. Durch die höhere Zelldichte, den geringeren Anteil anorganischer Substanzen und die unregelmäßige Anordnung der Kollagenfaserbündel ist der Geflechtknochen im Vergleich zum Lamellenknochen flexibler und tritt überall dort auf, wo über längere Zeit mechanische Kräfte durch Zug einwirken, er weist jedoch insgesamt eine geringere mechanische Festigkeit auf ⁹⁰⁻⁹². Auch im Rahmen der Knochenbruchheilung spielt die desmale Ossifikation eine bedeutende Rolle (Punkt 2.2.2) ^{11,32,84,90,91,95}.

Die meisten Knochen des Skelettes entstehen jedoch per **chondraler Ossifikation** aus vorgeformten Knorpelmodellen ⁹⁰. Diese dienen in der embryonalen Entwicklung (Primordialskelett) und Knochenbruchheilung (Punkt 2.2.2) als Platzhalter ^{90,91}, beim heranwachsenden Individuum bildet dieser hyaline Knorpel die Grundlage für das Längenwachstum des Knochens. Sich am Ablauf der desmalen Ossifikation orientierend differenzieren sich während der Embryonalentwicklung die Osteoblasten aus Zellen, welche im Perichondrium, einer dem Primordialskelett aufliegenden Knorpelhaut, enthalten sind ⁹¹. In der Mitte des Röhrenknochens, der späteren Diaphyse, beginnen sie unterhalb des Perichondriums Osteoid zu synthetisieren, welches verkalkt und auf diese Weise eine Knochenmanschette in Form eines hohlen Knochenzylinders entstehen lässt ^{90,91}. Diese Manschette, der spätere Bereich der Knochenkompakta, sorgt für eine erste mechanische

Stabilisierung^{86,93}. Das dem knöchernen Mantel aufliegende Perichondrium entwickelt sich zur Knochenhaut, dem Periost (Punkt 2.1.3)^{90,91,93}. Dieser ersten Phase, der **perichondralen Ossifikation**, schließt sich die **enchondrale Ossifikation**, die Verknöcherung, an^{11,47,90,91}. Die vorliegende Knochenmanschette führt zu einer Verringerung des Stoffwechsels des im Knochenzylinder verbliebenen Primordialskeletts, so dass dessen Knorpelzellen, die **Chondrozyten** zunächst hypertrophieren. In dieser Phase der erhöhten Aktivität setzen sie gespeichertes Kalzium frei, welches in den Prozess der Kalzifizierung eingeht¹⁶, danach gehen sie per Apoptose zugrunde⁹⁰. Aus dem Periost einsproßende Gefäße⁹⁹, wachsen über die Knochenmanschette in den Knorpel ein^{1,16,90,91}. Aus diesen Perforationsstellen entstehen später die Gefäßkanäle für die Blutversorgung des Knochens^{86,93}. Über die Gefäße gelangen knorpelauflösende Zellen, die **Chondroklasten**, in die teils verkalkte Knorpelmatrix und resorbieren verbliebene Knorpelreste^{90,91}. Zeitgleich mit den Chondroklasten wandern mesenchymale Stammzellen in das Zentrum der entstehenden Diaphyse ein¹⁶, die sich zu Osteoblasten entwickeln. Sie ummanteln die noch vorhandenen Reste verkalkter Knorpelmatrix und synthetisieren per desmaler Ossifikation Knochenmatrix, so dass Geflechtknochen entsteht. Während die Ossifikation zentrifugal in proximaler und distaler Richtung bis zu den Epiphysen fortschreitet, bildet sich durch ständige Ab- und Umbauvorgänge im Zentrum des Knochens die Knochenmarkshöhle^{90,91}. Dort entstehen die Knochenbälkchen mit ihrer schwammähnlichen Struktur (Substantia spongiosa) und in die zwischenliegenden Kammern sproßen Kapillaren. Ebenfalls einwachsendes Bindegewebe differenziert sich über mehrere Schritte zum Knochenmark^{86,91,93}. Zeitgleich beginnt in den Epiphysen der zentral gelegene Verknöcherungskern per enchondraler Ossifikation zu mineralisieren und sich zentrifugal auszubreiten^{86,93}. Die zwischen den epiphysialen und diaphysialen Ossifikationsbereichen liegenden Epiphysenfugen beinhalten Wachstumsknorpel, welcher für das Längenwachstum des Knochens verantwortlich ist und zunächst nicht mineralisiert. Hier proliferieren die Chondrozyten bis etwa zum 20. Lebensjahr. Danach wird die Epiphysenfuge knöchern geschlossen und das Längenwachstum beendet^{86,90,93}.

Im Zuge des **Remodelings**, der Kombination von Knochenauf- und -abbau, wird der entstandene Geflechtknochen durch das Zusammenspiel von Osteoblasten, Osteoklasten und begleitenden Blutgefäßen in den mechanisch kompetenteren Lamellenknochen umgewandelt^{2,16,90}. Durch Austauschen und Hinzufügen von Knochensubstanz in und auf den Trabeculae² vollzieht sich der „schleichende Ersatz“. Bei der Frakturheilung läuft das Remodeling in wesentlich schnellerer Form ab (Punkt 2.2.2)^{11,14,35,90,91,99}. Das Hauptcharakteristikum des Lamellenknochens ist die regelmäßige Anordnung seiner Grundstrukturen, der Osteone^{90,91}. Der britische Arzt Clopton Havers entdeckte 1691 diese kleinen Einheiten, daher werden sie auch als Havers-System bezeichnet. Sie kennzeichnen sich durch eine konzentrische Schichtung mehrerer Knochenlamellen, den Speziallamellen, um einen Zentralkanal, dem Havers-Kanal. Darin verlaufen kleine Gefäße, Nervenfasern und

Bindegewebe zur Nährstoffversorgung und Reizübertragung^{18,88,90,91}. Die umschließenden Lamellen setzen sich aus streng parallel angeordneten Kollagenfasern und mineralisierter Knochenmatrix zusammen. Durch die sich von Lamelle zu Lamelle rechtwinklig ändernde Verlaufsrichtung der Fasern entsteht eine gitterartige Struktur. Und auch untereinander sind die einzelnen Lamellen durch Kollagenfibrillen verbunden. Durch diese Vernetzung ist der Lamellenknochen extrem widerstandsfähig gegenüber Zug- und Druckbelastungen⁹⁰⁻⁹². Die Osteozyten sitzen meist zwischen, aber auch in den Lamellen^{18,41,87,88,92}. Jedes Osteon wird von mineralisierter Matrix, dem Zement, umgeben^{90,92}. Dieser grenzt das Osteon gegen die umliegenden Schaltlamellen ab, wobei es sich um verbliebene Reste von Osteonen ohne funktionelle Aufgaben handelt^{90,91}. Sie werden, je nach vorliegender statisch-mechanischer Belastung und Stoffwechsellage, im Zuge des zeitlebens stattfindenden Knochenumbaus ersetzt^{2,89}. Die benachbarten Havers-Kanäle einzelner Osteone stehen über quer verlaufende Volkmann-Kanäle, entdeckt von dem deutschen Physiologen Alfred Wilhelm Volkmann im 19. Jahrhundert, miteinander in Verbindung^{90,91}. Besonders in der Substantia compacta wird die typische Organisation des Lamellenknochens ersichtlich⁹⁰. Hier liegen die Osteone sehr dicht in paralleler Anordnung, welche sich nach der mechanischen Belastung des Knochens orientiert, im Fall der Diaphyse longitudinal^{41,88}. Die Ausrichtung der Knochen trabekel in Richtung der mechanischen Kräfte wurde als erstes 1892 von Julius Wolff erkannt, und als das Wolff'sche Gesetz, das Transformationsgesetz der Knochen, formuliert^{100,101}. Zum Endost und Periost hin werden die zahlreichen Osteone durch die inneren und äußeren Generallamellen abgegrenzt^{90,91}. Lamellenknochen enthält im Vergleich zum Geflechtknochen weniger Zellen. Durch die spezielle Anordnung der Lamellen mit einem höheren Anteil anorganischer Substanzen⁹¹ ist er fester und somit mechanisch belastbarer, vor allem was Druckkräfte anbelangt^{90,92}.

2.1.3 Periost und Endost

Die äußere Abgrenzung des Knochens erfolgt, ähnlich der Rinde eines Baumes, durch eine zweischichtige Ummantelung, der **Knochenhaut (Periost)**. Nur an wenigen Stellen, z.B. an Gelenkknorpelflächen, fehlt dieses spezialisierte Bindegewebe⁵¹. Es spielt in der Knochenentwicklung und auch in der Knochenbruchheilung (Punkt 2.2.2) eine bedeutende Rolle^{19,25,26,47,66,83}.

Die äußere straffe Schicht des Periosts, das **Stratum fibrosum**, ist von fibrös-elastischer Natur^{2,4}. Es besteht aus abgeflachten Bindegewebszellen und Kollagenfaserbündeln, den Sharpey-Fasern, welche durch die innere Schicht, die Kambiumzellschicht (Stratum cambium s. osteogenicum), ziehen¹⁰² und in die Knochenmatrix einstrahlen¹⁸. So wird das Periost fest mit dem Knochen verbunden², und es kann angrenzenden Muskeln, Sehnen und Bändern als Befestigung dienen¹⁰³. Mit den Sharpey-Fasern treten auch Nerven und Gefäße in die Knochenmatrix ein^{18,51}. Ein Netzwerk aus Arteriolen und Venolen spielt eine wesentliche Rolle im Rahmen der Knochendurchblutung^{7,41}. Die arterielle Blutversorgung

bezieht sich hauptsächlich auf das äußere Drittel der Kortikalis ^{4,41,77}. Von größerer Bedeutung ist jedoch das venöse System, welches für die Drainage der gesamten Kortikalis sorgt ⁷⁷. Das periostale Netzwerk aus Arteriolen und Venolen trägt ein hohes blutversorgendes Potential, sollte die physiologische Blutzufuhr des Knochens, z.B. durch Fraktur, unterbrochen sein ^{23,26,41,77,83} (Punkt 2.1.4). Die Schmerzempfindlichkeit des Periosts kommt durch dessen ausgeprägte Innervierung zustande ⁷.

Anfang des 20. Jahrhunderts wurde das Periost als begrenzende Membran des Knochens zum umliegenden Weichgewebe angesehen und man nahm an, dass die für Knochenwachstum und -heilung notwendigen Zellen aus dem Knochen selbst stammen würden ^{2,85}. Bald aber stellte man fest, dass bei Entfernung des Periosts vom Knochen dieser in seiner Osteogenese erheblich gestört ist ^{2,14,19,25,31,33,35,47,77,83,104}. Wird aber ein Stück Knochen entfernt und das Periost verbleibt, kann sich leicht neuer Knochen bilden ². Heute wird dieses hohe osteo- und chondrogene Potential der inneren, sehr zellreichen Schicht des Periosts, der **Kambiumzellschicht (Stratum cambium s. osteogenicum)** zugeordnet ^{18,95}. Diese liegt direkt der Knochenoberfläche auf ^{2,4,51} und enthält eine Vielzahl an Zellen. Zum einen beinhaltet sie multipotente Vorläuferzellen, sogenannte Osteo- und Chondroprogenitorzellen von mesenchymaler Herkunft, welche sich unter passenden Bedingungen teilen und zu knochenbildenden Osteoblasten bzw. knorpelbildenden Chondroblasten entwickeln können ^{2,45,51,52,66,83,85,105}, zum anderen enthält sie ruhende Osteoblasten, Osteoklasten, Bindegewebszellen, Endothelzellen und noch undifferenzierte mesenchymale Zellen ^{11,16,18,47,74,90}.

Während des Wachstums erfolgt neben dem Längenwachstum der Knochen deren endgültige Formierung durch das Periost ^{51,52,86,87}. Die von dort ausgehende Apposition von Knochenmatrix auf der Knochenoberfläche führt zum Dickenwachstum. Es ist mit Abschluss des Längenwachstums ebenfalls weitgehend beendet ^{52,86,87,93}. Das Periost ist in jungen Jahren dicker, aktiver und robuster ^{51,52,77}, mit zunehmendem Alter verringert sich sein osteogenes Potential ^{51,52,85}. Es enthält dann weniger ruhende Zellen ^{51,52}. Im Laufe des Lebens können diese durch mechanische Stimuli wie z.B. Trauma wieder aktiviert werden ^{51,90}. Die grundlegenden biologischen Antworten auf diese Reize gehen im Alter nicht verloren und ändern sich nicht qualitativ, sie lassen nur quantitativ nach ⁵².

Da dem Periost besonders in der Frakturheilung eine wichtige Aufgabe zugesprochen wird (Punkt 2.2.2), war es bereits Gegenstand vieler Studien ^{51,59,61-64,66,98,106-111}. Dort führte man Versuche durch in deren Rahmen das Periost zerstört wurde um die Frakturheilung zu beeinträchtigen ^{3,7,14,24,25,31,33,36,47,48} oder Zellpopulationen des Periosts stimuliert wurden zur Förderung der Knochenheilung ^{19,51}. Auch entnahm und kultivierte man Periostzellen ^{63,107,108}, häufig um sie anschließend mit Hilfe von biologischen Knochenersatzstrukturen als Trägersysteme in Knochendefekte zu retransplantieren ^{64,66,107-109}. Auch ganze Periostlappen

mit ⁶² oder ohne Knochenanteile wurden transplantiert ^{59,61,98,110,111}. Dieser Forschungsbereich verweist auf vielversprechende Möglichkeiten in der Rekonstruktion von Knorpel- und Knorpelgeweben ^{59,107,110}.

Die innere Abgrenzung zwischen Knochen und Knochenmarkshöhle erfolgt durch das **Endost**. Es besteht aus einer Schicht abgeflachter Bindegewebszellen mit eher wenigen Kollagenfasern, wodurch es wesentlich dünner ist als das Periost. Hauptsächlich dient es, wie auch das Knochenmark, als Träger osteogener Zellen ^{11,74,78,82,90,94,112} und spielt ebenfalls eine, wenn auch geringere, Rolle in der Knochenneubildung ^{2,36,41,42,47,48,91,95} (Punkt 2.2.2).

2.1.4 Blutversorgung des Knochens

Knochengewebe ist überaus reich vaskularisiert ⁸⁷. Außerhalb des Knochens verlaufende Gefäße perforieren den Knochenkortex und treten so in den Knochenmarksbereich ein bzw. aus ^{4,18,41}. Wie bei anderen Organen des Körpers erfolgt die Blutversorgung über ein afferentes, nährstoffreiches Blut zuführendes, und eine efferentes, Stoffwechselendprodukte ableitendes, vaskuläres System ⁴¹.

Insgesamt spaltet sich das **afferente System** in drei Kompartimente auf: Die Hauptversorgungsarterie, die metaphysären Arterien sowie die periostalen Arterien ^{18,41,95}. Die Hauptversorgungsarterie (Arteria nutricia) tritt im proximalen Drittel der Diaphyse in den Markraum ein und verzweigt sich dort in die ascendente sowie descendente Markraumarterie. Diese spalten wiederum viele Arteriolen ab, die sich auf der gesamten Oberfläche des Endosts verteilen und den Markraum sowie die inneren zwei Drittel der Kortikalis versorgen ^{4,18,37,41,95,113}. Die metaphysären Arterien treten proximal und distal in die Knochenmarkshöhle ein, verzweigen sich vielfach und sind für den spongiösen Knochen der Meta- und Epiphysen zuständig ⁴¹. Im Markraum anastomosieren Zweige dieser metaphysären Arterien mit den beiden Markraumarterien. Vom Periost treten viele kleine periostale Arteriolen über die Sharpey-Fasern in den Knochenkortex ein ^{18,90}. Im gesunden Knochen versorgen diese das äußere Drittel der Knochenkortikalis ^{4,77} und anastomosieren innerhalb der Kortikalis mit den Ästen der Markraumarterien ^{18,41}. Diese intrakortikalen Kapillaren liegen geschützt in den knöchernen Kanälen der Havers- und Volkmann-Systeme ⁴¹. Die Volkmann-Gefäße verlaufen quer durch die longitudinal orientierten Osteone und bilden so eine Verbindung zwischen Periost und Endost. Die Havers-Gefäße im Zentralkanal eines jeden Osteons liefern Nährstoffe zu den Zellen der umliegenden Speziallamellen ^{18,91}.

Das **efferente System** besteht aus einer großen zentralen Markvene, in welche mehrere kleine Venen münden. Diese sind exklusiv für den medullären Ablauf zuständig. Kortikale Venolen leiten Blut aus den tieferen Schichten der Kortikalis in periostale Venolen ab. Diese wiederum münden in periostale Kapillaren an der Oberfläche des Kortex, welche auch Blut aus den oberflächlichen Bereichen des Knochenkortex ableiten ⁴¹. Im Gegensatz zum arteriellen System ist der venöse Abfluss aber noch nicht eindeutig erforscht ¹⁸.

Ist der Knochen mit seinem gesamten Blutsystem intakt, erfolgt der Blutfluss zentrifugal vom Markraum über den Knochenkortex in Richtung Periost^{2,41,85,95}. Im Falle einer Fraktur, bei der die beschriebenen arteriellen Systeme in ihrer Funktion beeinträchtigt sind, kommt neben der Stimulierung der verbliebenen vaskulären Kompartimente⁴¹ eine zusätzliche, vorübergehende Versorgungsquelle zum Tragen, welche aus dem umliegenden Weichteilgewebe entstammt^{41,85}, das **extraossäre arterielle System**. Somit verläuft der Blutfluss bei der Knochenbruchheilung umgekehrt in zentripetaler Richtung. Nach Regeneration der zerstörten arteriellen Systeme des Knochens übernehmen diese wieder ihre ursprüngliche Funktion und das extraossäre System wird zurückgebildet⁴¹.

2.2 Ungestörte Knochenbruchheilung

Die Struktur der Knochen ist perfekt an die tagtäglich fortwährenden Beanspruchungen angepasst. Trotzdem hat nahezu jeder erwachsene Mensch schon einmal die schmerzliche Erfahrung eines Knochenbruchs gemacht. Das Ziel der Frakturbehandlung ist die Restitutio ad integrum, die völlige Rekonstitution und Regeneration des verletzten Gewebes, der ursprünglichen Anatomie und Funktionalität entsprechend^{1-4,12,41,74,82,114}. Dabei liegen dem kontinuierlichen, höchst effizienten Prozess der Frakturheilung^{10,12,21,42} gut organisierte, aber sehr komplexe Kaskaden an biologischen Ereignissen zugrunde^{3,7,9,11,14-16,22,24}, die durch eine Vielzahl von systemischen und lokalen Faktoren beeinflusst werden^{2,6,12-14,18,35,74}. Ebenso störanfällig ist die Knochenregeneration, so dass unpassende Einflüsse während des Vorgangs schnell zu einer verzögerten oder ausbleibenden Heilung führen können^{3,99}. Daher wird bis zum heutigen Tag versucht, die zugrunde liegenden Prozesse besser zu verstehen, um letztendlich die angemessenen therapeutischen Maßnahmen ergreifen zu können^{12,22,24,40}.

Ist eine Verletzung aufgetreten, sind sowohl das Weichgewebe als auch der Knochen in der Lage neues Gewebe an dieser Stelle zu formieren^{1,5}. Weichgewebe heilen durch den Ersatz mit einer fibrösen Narbe, Knochen durch den Versuch der narbenlosen Wiederherstellung des Ursprungsgewebes^{1,2,12,40,42,74}.

Von der Natur sind verschiedene Wege der Knochenbruchheilung vorgesehen. Histologisch werden die osteonalen, die intramembranösen und die enchondralen Knochenformierungsreaktionen differenziert, welche von unterschiedlichen Lokalisationen (kortikal, periostal und endostal) ausgehen können. Diese treten aber nicht unbedingt getrennt voneinander auf, sie können auch kombiniert ablaufen⁴². Nach der klassischen histologischen Einteilung wird außerdem zwischen primärer und sekundärer Knochenbruchheilung unterschieden¹⁶.

2.2.1 Primäre Knochenbruchheilung

Diese Form der Knochenregeneration kennzeichnet sich durch einen Heilungsvorgang, welcher hauptsächlich innerhalb der Kortikalis stattfindet (**kortikale Knochenheilung**)^{16,18,41,89,95,99}. Insgesamt ereignet dieser Vorgang jedoch eher selten^{16,99}, da sich die

Knochenenden im Frakturbereich in ihrer anatomisch korrekten Position^{16,89,115}, d.h. in direktem Kontakt^{2,11,32,41}, befinden müssen. Das kann erreicht werden, indem die Fraktur durch entsprechende Osteosynthesysteme, meist eine Platte, absolut stabil versorgt wird^{17,18,37,41,76,89,95,114,115}. War weiterhin eine störungsfreie Durchblutung sichergestellt, so ist diese Form der Ossifikation ohne jegliche Knorpel- und Kallusformation^{17-19,37,41,42,76,89,95,99,114,115} im Sinne einer „Verschweißung“ möglich^{17,18,89,99,115}. Meistens ereignet sich die kortikale Heilung jedoch mit Unterstützung eines schnell gebildeten und röntgenologisch nicht sichtbaren endostalen Kallus^{11,32,41,99} (Punkt 2.2.2). Generell handelt es sich bei der primären Knochenheilung eher um einen Mechanismus wie er beim physiologischen und ständig stattfindenden Knochenumbau vorkommt^{2,89} und auch um einen Remodelingprozess, welcher die letzte Phase in einem Heilungsvorgang darstellt (Punkt 2.2.2). Erfahrungsgemäß ist eine perfekte Adaptation aller Bereiche innerhalb einer Fraktur nahezu unmöglich. Daher treten je nach dem Abstand der Knochenfragmente zueinander zwei histologische Erscheinungsformen der Knochenheilung auf. Befinden sich die Knochenfragmente in direktem Kontakt, so tritt die „Kontaktheilung“ auf. Befindet sich ein minimaler Spalt zwischen den Knochenfragmenten kommt die „Spaltheilung“ zum Tragen. Beide Vorgänge können nebeneinander in ein und derselben Kortikalis auftreten^{11,37,41,89,99}.

Bei der **Kontaktheilung** haben die Bruchenden einer frakturierten Kortikalis weiterhin flächenhaften direkten Kontakt, wodurch das Eindringen von Blutgefäßen und umliegendem Gewebe verhindert wird. Aktivierte Osteoklasten bohren longitudinal gerichtete Resorptionskanäle durch die teilweise avitale Kortikalis, wobei sie von einem Bruchstück über die Bruchstelle in das benachbarte Bruchstück vordringen^{11,37,41,89,99,116}. Auf diese Art und Weise bauen die Osteoklasten ein neues Havers-System auf^{2,16,89}, über deren Wege Blutgefäße und sich differenzierende Osteoblasten einwandern können^{16,37,41,89}. Den kanalförmigen Abbauvorgängen der Osteoklasten folgt ein sofortiger Aufbau durch Osteoblasten, die die Kanäle mit Lamellenknochen füllen^{37,89,99}. Diese eigenständigen Remodelingeinheiten sind nichts anderes als neue Osteone^{2,41,99} und werden als „cutting cones“ bezeichnet¹⁶.

Sind kleine Lücken zwischen den Bruchstücken entstanden, werden sie im Zuge der **Spaltheilung** zunächst gefüllt. Einsprießende Gefäße und sie begleitende Zellen organisieren mittels desmalen Ossifikation eine „Knochenplombe“^{11,37,41,89,99}. Diese dient als Überbrückung über die eine Regeneration wiederum nach dem Prinzip der Kontaktheilung erfolgen kann^{11,37,41,99}.

Die biomechanische Umgebung wirkt sich auf die primäre Frakturheilung in anderer Weise aus als dies bei der sekundären Knochenbruchheilung der Fall ist. Ausgeprägte Rigidität ist hier essentiell für einen Überbrückungsprozess, da sich schon die kleinste Bewegung im Frakturspalt nachteilig auswirkt^{2,11,19,32,84}. Früher wurde die primäre Frakturheilung als Kunstform verstanden und viel praktiziert. Das Erscheinen von Kallus wurde als ein Mangel in der Behandlungstechnik aufgrund von zu viel Bewegung der Frakturenden angesehen².

Schenk und Mitarbeiter (1963, 1964, 1968)^{89,115,117} stellten bei der primären Knochenbruchheilung sowohl beim Menschen als auch in zahlreichen Tierexperimenten frühestens nach sechs Wochen eine ausreichende Konsolidierung der Fragmentenden fest. Sind frakturbedingt größere Knochennekrosen entstanden, kann bis zur Wiederherstellung der ursprünglichen mechanischen Stärke des Knochens jedoch noch sehr viel mehr Zeit vergehen, was McKibbin (1978)² als „überwältigenden Nachteil“ gegenüber der sekundären Knochenheilung wertete.

2.2.2 Sekundäre Knochenbruchheilung

Mit dem heutigen Verständnis der Medizin wird der sekundären Knochenbruchheilung der Vorzug gegeben. Natürlicherweise liegt etwas Bewegung im Frakturbereich vor und man weiß inzwischen, dass ein bestimmtes Maß an Mikrobewegung am schnellsten zu einem erfolgreichen Heilungsergebnis führt^{4,11,18,29,32,37,41,76,84,118}. Diese „förderliche Unruhe“ stimuliert die Kallusformierung und beeinflusst die Qualität und Quantität des Kallusgewebes. Durch den gebildeten Kallus entsteht eine gewisse mechanische Eigenstabilität^{38,65,114,118}. So können knöchern-knorpelige Kallusbänder vom proximalen und distalen Fragment ausgehend auf den Frakturbereich zuwachsen, bis sie sich treffen und eine feste Verbindung eingehen^{2,6,18,37,115}. Im weiteren Heilungsverlauf mineralisiert dieser Kallus vollständig aus, um die Stabilität im Frakturbereich zu erhöhen^{17,37}. Das Periost als Quelle osteogener Zellen spielt bei der Formierung eines Kallus die wahrscheinlich wichtigste Rolle^{3,4,11,16,19,61,69,74}. Der Reparaturprozess kann in mehrere Phasen untergliedert werden, welche nacheinander aber auch in Kombination nebeneinander auftreten können^{1,2,12,14,16,42,74}. Zuerst ereignet sich das Initialstadium, wobei ein Frakturhämatom entsteht, einhergehend mit einer Entzündungsreaktion und der entsprechenden Angiogenese. Anschließend folgen die Ossifikationsstadien, die intramembranöse und enchondrale Verknöcherung. Zum Schluss findet das Remodeling statt. Je nach Lokalisation lässt sich die sekundäre Knochenheilung aber auch in eine periostale und endostale Ossifikation einteilen. Die periostale Form bildet einen äußeren Kallus, welcher schnell entstehen kann und eine gute mechanische Festigkeit aufweist⁴. Bei der endostalen Form entwickelt sich ein medullärer Kallus. In Kombination mit der primären Knochenheilung verläuft diese sehr schnell und wird daher als frühe endostale Ossifikation bezeichnet. Es entsteht ein starker Knochen^{2,4,41,42}. Die späte endostale Ossifikation tritt im Verlauf der sekundären Knochenbruchheilung erst sehr spät in Erscheinung und verläuft sehr langsam, wobei sich an dieser Stelle Knochen von geringerer mechanischer Festigkeit bildet^{2,4,42}.

Der Übersicht halber werden die verschiedenen Stadien der sekundären Knochenbruchheilung im Rahmen der **periostalen Ossifikation** beschrieben. Der Heilungsprozess verläuft schnell, wenn das Periost nur wenig vom darunter liegenden Knochen abgehoben wurde, langsamer wenn die Entfernung beider durch die Fraktur größer geworden ist^{42,85}.

Wenn das **Frakturereignis** eintritt, wird oft das Periost mitsamt dem umgebenden Weichgewebe zerstört ^{7,12,50,70,95} und meist die Frakturrenden disloziert. Sofort danach setzt das sogenannte **Initialstadium**, also die sofortige Verletzungsantwort, ein ^{1,16}. Hierbei reagieren sämtliche von der Fraktur betroffenen Gewebe und bilden das **Frakturhämatom** ^{12,13,16,35,70,74,95}. Durch Einbluten von den zerstörten Knochenenden und dem umliegenden Gewebe bildet sich zunächst ein Blutpfropf zwischen den Fragmenten ^{2,52,70,95}. Wie bei einer oberflächlichen Hautverletzung gerinnt dieser, wobei von den beteiligten Thrombozyten Signalmoleküle, die so genannten Wachstumsfaktoren, freigesetzt werden ^{1,70,95}. Diese scheinen einen Einfluss auf die Initiation der Frakturheilung zu haben und in späteren Stadien osteoinduktive und chondroinduktive Funktionen auszuüben ^{8,12,16,69,70,95,96}. Denn sie regen besonders die festgelegten mesenchymalen Stammzellen in der Kambiumzellschicht des Periosts zur Proliferation und Differenzierung an und sie initiieren die zellulären Ereignisse sämtlicher nachfolgender Kaskaden ^{1,12,16,22,70,95}. Der durch die Gerinnung entstandene Pfropf verhindert auch, dass umliegendes Weichgewebe zwischen die Frakturrenden dringt, was das physiologische Fortschreiten des Heilungsprozesses stören würde. Im weiteren Verlauf wandern im Rahmen der Entzündungsreaktion Entzündungszellen in das Fibringerinnsel ein ^{1,2,11,13,35,50,52,74,95}. Sie resorbieren einen großen Teil des ausladenden Hämatoms und strukturieren den verbleibenden Rest ^{1,2,41,95}. Außerdem sondern die Entzündungszellen weitere Signalmoleküle und Entzündungsmediatoren, die Zytokine, ab ^{1,11,12,95}. Sie sind in die nachfolgenden Prozesse der Angiogenese und Chemotaxis involviert ^{11,12,39,95}. Somit ist der Vorgang der Hämatombildung ein wichtiger Bestandteil der Frakturheilung ^{70,85,95}. Er endet nach nur wenigen Tagen in der Formation eines festen, fibrovaskulären Frakturgranuloms aus faserigem Bindegewebe ^{2,37,70,99,114,115}.

Die besondere Rolle des Periosts kommt schon zu Beginn der Knochenbruchheilung zum Tragen ^{18,19,26,70,83,85,104}. Klinische und experimentelle Erfahrungen bestätigen, dass die periostale Heilung von einem gesunden Periost abhängt ^{2,4,11,19,25,42,47,74,83,104}. Als Träger des biologischen Regenerationspotentials ist es besonders für eine rasche Vaskularisation und Osteogenese verantwortlich ^{18,37,51,69,74,85,104,111}. Nach einer Verletzung reagiert das arterielle System des Periosts innerhalb kürzester Zeit mit einer inflammatorischen Hypervaskularisation, welche eine Voraussetzung für die sekundäre Knochenbruchheilung ist ^{18,37,104}. Denn die Osteogenese ist ein extrem stoffwechselaktiver Vorgang ¹¹⁹ und auch osteogene Vorläuferzellen erreichen die Frakturbereiche zunächst nur über die Gefäße ⁶⁷. Durch die Aktivierung proliferieren die periostalen und die im Frakturbereich verbliebenen funktionsfähigen medullären Gefäße und ihr Querschnitt nimmt zu (Vasodilatation). Schlummerkapillaren werden angeregt und Kapillaren im Periost sprießen neu ^{18,95,99}. Auch von den umgebenden Weichgeweben entwickelt sich sehr rasch eine extraossäre Blutversorgung, welche initial vornehmlich den frühen äußeren Kallus versorgt ^{2,41,120}. Inzwischen werden diese Ereignisse in einer eigenen Phase, dem **Angiogenesestadium**,

beschrieben, wobei unter Angiogenese die Entstehung von Blutgefäßen aus bereits bestehenden Gefäßen verstanden wird ^{10,16,35,95,118}.

Das **Ossifikationsstadium** ist durch eine Kombination der intramembranösen und enchondralen Ossifikation gekennzeichnet ^{16,76}.

Dabei ist die **intramembranöse Ossifikation** eine sehr schnell einsetzende, für die Frakturheilung fundamentale Reaktion seitens des Periosts ^{16,51,104}. Sie verläuft nach den Gesetzen der desmalen Ossifikation und bildet Geflechtknochen ohne knorpelige Zwischenstufe ^{1,11,16,37,99}. Diese primäre Kallusreaktion, auch als **periostale Ossifikation** bezeichnet, bringt durch eine stabilisierende, mantelförmige Knochenüberbrückung zwei bewegliche Fragmente zunächst zur Ruhe, bevor sie vollständig miteinander verbunden werden können ^{2,18,37,76,85,99,103}. Ist diese externe Knochenbrücke erst einmal formiert, können nachfolgende Prozesse, wie die Bildung der originalen Knochenbrücke und das Remodeling, ungestört ablaufen. Unmittelbar nach der Traumatisierung beginnen, durch Wachstumsfaktoren und Entzündungsmediatoren aktiviert, die undifferenzierten und osteogenen Zellen der Kambiumzellschicht deutlich zu proliferieren ^{4,37,50-52,95,104}, wodurch sich das Periost im hämatomnahen Bereich deutlich verdickt ^{1,51,52,76}. Nach Einhorn (1998a) ¹⁶ beginnt dieser Prozess in den ersten sieben bis zehn Tagen einige Millimeter vom Frakturspalt entfernt. Landry und Mitarbeiter (2000) ⁵⁰, Pennig (1990) ⁴ und Tonna und Mitarbeiter (1963) ⁵² verwiesen auf eine deutliche Aktivitätssteigerung innerhalb von zwei bis drei Tagen nach dem Frakturereignis. McKibbin (1978) ² konnte bereits acht Stunden nach Traumatisierung erste Anzeichen einer erhöhten Zellteilung auszumachen, welche innerhalb von 24 Stunden ihr Maximum erreichte. Dabei reifen in Periost, Endost und Knochenmark befindliche präterminierte osteogene Stammzellen (DOPC = determined osteogenic precursor cells, festgelegte Osteoprogenitorzellen, Vorläuferzellen) zu knochenbildenden Osteoblasten heran ^{1-4,7,11,16,18,28,52,69,85,99,121}. Von diesen wird dann zwischen der Kambiumzellschicht und dem Kortex neue Knochenmatrix synthetisiert ^{1,16,18,35,51,99}. Es bilden sich in der Defektperipherie zwei den diaphysären Knochen umschließende Kallusbänder, welche zielgerichtet in Richtung des Frakturspalt aufeinander zuwachsen ^{2,50,95,99}. Sie nehmen im Frakturbereich an Dicke zu, bis sie sich treffen und eine Brücke über dem Frakturspalt bilden ^{2,99}.

Die **enchondrale Ossifikation**, ebenfalls ein sehr rascher Prozess ², beginnt etwas später nach ca. sieben Tagen ^{4,114}. Sie überschneidet sich aber zeitlich mit der intramembranösen Ossifikation und vollzieht sich im Frakturgranulom direkt am und im Frakturspalt ^{11,16}. Hier beginnt sich zunächst Knorpelgewebe zu entwickeln, welches später kalzifiziert und durch Knochen ersetzt wird ^{16,41,76,114}. Dies erfolgt über die Phasen der **Knorpelbildung** (Chondrogenese), der **Knorpelkalzifizierung**, der **Knorpelbeseitigung** und der **Knochenformierung** ^{1,16,35}. Dem umliegenden muskuloskeletalen Stützgewebe wird bei der

sekundären Frakturheilung ebenfalls eine große Bedeutung zugesprochen, da von hier, zusätzlich zu den Osteoprogenitorzellen, undifferenzierte mesenchymale Zellen (IOPC = inductible osteogenic precursor cells, pluripotente Mesenchymzellen, nicht festgelegte Vorläuferzellen) rekrutiert werden^{2,4,18,66,69,74,78,82} und über die Blutgefäße ins Granulom gelangen^{1,99}. Im Rahmen der **Chondrogenese** beginnen sich diese Zellen zu differenzieren, zu proliferieren und avaskuläre, basophile Knorpelmatrix zu synthetisieren^{1,9,67,95,99,114}. Die so entstehende Knorpelregion verbreitert sich, wenn mehr mesenchymale Zellen zu Chondrozyten heranreifen^{1,16,114}. Solche Regionen aus fibrösem und knorpeligem Gewebe bezeichnet man als **weichen Kallus**^{1,11,12,16,25}. Diese Phase der Knochenheilung ist stark abhängig von den biomechanischen und anderen umgebungsbedingten Einflüssen^{2,7,16}, wie einer ausreichenden Blutzirkulation und einem entsprechenden Sauerstoffpartialdruck^{4,11,18,95,104,115}. Die Menge des gebildeten Kallus steht in enger Beziehung zur gegenwärtigen Bewegung im Frakturbereich^{2,76,84,114}. Bei zu starker Bewegung steigt die Zellaktivität der Chondrozyten an, wodurch sich große Mengen Knorpel bilden, mit dem Ziel, die Fraktur zu stabilisieren. Im Gegensatz dazu inhibiert eine zu rigide Fixation die Zellreaktionen und kann so die Kallusantwort völlig aufheben^{2,4,16,18,95}. Beide Fälle führen zu einer verzögerten oder ausbleibenden Heilung (Punkt 2.3). Auch der vorherrschende Sauerstoffpartialdruck und die Blutversorgung spielen eine große Rolle. Übersteigt die Kallusmenge die Blutversorgung und somit auch die verfügbare Sauerstoffmenge, bildet sich viel knorpeliges Gewebe, da dieses weniger sauerstoffabhängig ist. Dieses überbrückt den Frakturspalt so lange, bis die Blutversorgung wieder aufgeholt hat^{2,11,95,115}. Es folgt die essentielle Phase im Reparaturprozess, die **Kalzifizierung des Knorpels**^{1,11,16,35,122}. Nach zwei Wochen ist die initiale Zellproliferation der Chondrozyten beendet. Der Knorpel beginnt sich biochemisch, den Prozessen der enchondralen Ossifikation folgend, auf die Kalzifizierung vorzubereiten¹⁶. So steigt z.B. der bisher vorherrschende niedrige pH-Wert^{18,95} in den alkalischen Bereich, da sich hier das Optimum für die nun notwendigen Enzyme befindet⁴. Im Zuge ihrer Apoptose setzen die Chondrozyten Kalzium frei, wodurch die sie umgebende Knorpelmatrix innerhalb von 14 Tagen kalzifiziert^{1,4,9,16,37,78,95}. Vom benachbarten Knochen wachsen Kapillaren in diese extrazelluläre Matrix ein^{1,9,11,16,37,95}, worüber Chondroklasten^{16,95} zur **Knorpelbeseitigung** und sich zu Osteoblasten differenzierende Vorläuferzellen einwandern. Sie lagern sich am kalzifizierten Knochen an und beginnen mit der **Knochenformierung** von primärem Geflechtknochen^{16,67,95}. Ist der überwiegende Teil des Knorpels im weichen Kallus durch Knochen ersetzt, spricht man von einem **harten Kallus**^{1,11,12,16,25}.

Findet die Kallusbildung im medullären Knochenbereich statt, handelt es sich um die **endostale Ossifikation**^{19,21,41,42}. Im Grunde ähnelt der Verlauf der periostalen Ossifikation, findet nur an einer anderen Lokalisation statt und geht mit einer geringeren Knorpelbildung einher^{19,78}. Sie ist die grundsätzliche Methode um den trabekulären Knochen der Markhöhle

zu produzieren²¹. Bestimmt wird sie ist durch die gleichen Einflüsse wie die periostale Ossifikation. Die beiden Prozesse können auch zeitgleich ablaufen, so dass sich später beide Kalli verbinden², der endostale Kallus kann aber auch in Abwesenheit des periostalen Kallus auftreten⁴². Die hierfür notwendigen osteochondralen Progenitorzellen entstammen vornehmlich dem Knochenmark und dem Endost^{2,78,82,112}.

So ist die endostale Heilung zu einer ersten und sehr raschen Überbrückung fähig und wird dann als **frühe endostale Ossifikation** bezeichnet^{42,95}. Im Gegensatz zum externen Kallus scheint sich absolute Immobilität im Frakturgebiet fördernd auf den medullären Kallus auszuwirken^{2,41}. Diese Form, ebenso basierend auf exzellenter intramedullärer Blutversorgung^{41,42}, erfolgt über die desmale und in geringem Maße auch enchondrale Ossifikation⁷⁸. In seiner Hauptfunktion dient dieser frühe medulläre Kallus zunächst als Platzhalter indem er von innen her Freiräume in der Frakturlinie mit Geflechtknochen füllt, um sie für die nachfolgende Frakturüberbrückung vorzubereiten. Die **späte endostale Ossifikation** ist auch bei nicht vollständiger Stabilität in der Lage, fibröses Gewebe durch Knochen zu ersetzen. Die Zellaktivität scheint vornehmlich vom Endost zu entstammen und verläuft kontinuierlich und sehr langsam. Auch die vaskuläre Reaktion verläuft wesentlich langsamer als in den weichteilnahen Bereichen um das Periost herum. Daher kann dieser medulläre Kallus erst wesentlich später im Heilungsprozess auftreten², oft erst nach Monaten und häufig auch, wenn die periostale Antwort eines größeren Spaltes fehlgeschlagen ist, also die Heilung bereits verzögert ist^{2,42} (Punkt 2.3.2). Diese Form der Kallusbildung ist der Grund warum fast alle Frakturen heilen, wenn man sie lange genug stabilisiert⁴².

In der sich zuletzt anschließenden **Remodelingphase** wird die ursprüngliche Knochenarchitektur in Form einer mechanisch kompetenten lamellären Struktur wiederhergestellt^{1,11,12,14,16,18,25,28,35,37,95,99,115}. Dabei handelt es sich um einen Vorgang wie er auch im normalen Knochenumbau kontinuierlich stattfindet^{2,89}. Die Mechanismen in der Frakturheilung unterscheiden sich hier nur bezüglich der Aktivität der Osteone, welche um zwei bis vier Prozent gegenüber der Norm erhöht ist⁹⁹. Je nachdem, ob der Prozess im spongiosen oder kompakten Bereich abläuft, gibt es Unterschiede im Ablauf. Im Falle des Geflechtknochens des Kallus und der Spongiosa liegen die Zellen in der Nähe von Blutgefäßen. So kann der Prozess des Knochenabbaus und -austausches an der Oberfläche der Trabekel stattfinden². In kompakten Bereichen des Knochenkortex jedoch, besonders in nekrotisierten Zonen, muss erst eine ausreichende Blutversorgung der tiefer sitzenden Zellen wiederhergestellt werden. Der Vorgang ähnelt dem Mechanismus der Kontaktheilung der primären Frakturheilung. Osteoklasten bohren einen Tunnel in den Knochen. Über einwachsende Gefäße wandern Osteoblasten in das neue Osteon und bauen Lamellenknochen auf. Auf diese Weise kann auch abgestorbener Knochen wieder in die mechanische Verbindung integriert

werden^{2,35,95}. Einige Teile des abgestorbenen Kortex jedoch, die keinen Zweck mehr erfüllen, müssen vollständig resorbiert werden^{2,99}.

Auch die Blutversorgung ändert sich im Rahmen des Remodelings. Hatten kurz nach dem Trauma das Periost und das umliegende Weichgewebe die Blutversorgung übernommen, so geht diese nun auf das wiederhergestellte medulläre System über⁴¹.

Erst nach vollständig vollzogenem Knochenumbau kann man von Restitutio ad integrum des betroffenen Knochens sprechen⁹⁹. Physiologischerweise ist diese Phase 12 – 36 Wochen nach dem Frakturereignis beendet⁵³.

2.3 Gestörte Knochenbruchheilung

2.3.1 Definition der Heilungsstörung

In den vergangenen Jahrzehnten zeigten sich bedeutende Fortschritte in der Behandlung von Frakturen bzgl. der medizinischen Technologie und dem orthopädischen Management^{16,19,22-27,43,45}. Es stießen auch immer wieder neue Impulse aus der Zell- und Molekularbiologie hinzu²², allerdings herrscht hier noch großer Forschungsbedarf^{16,23,43,70}. Denn obwohl die meisten Knochenbrüche erfolgreich ausheilen^{7,11,53}, weisen ca. 10 – 20 % aller Frakturen im klinischen Alltag Heilungsstörungen auf^{9,12,19,20,22,24,25,27}. Aufgrund der Vielfältigkeit der Ursachen (s.u.) und der unterschiedlichen Formen an Heilungsstörungen (Punkt 2.3.2) muss eine Behandlung individuell angepasst werden, was sich häufig als Herausforderung für den Kliniker darstellt^{8,10,21,23,26,28,29,61,82,108,123}.

Während einige dieser Frakturen schlecht heilen und dazu viel Zeit benötigen^{11,16}, resultieren andere in einer völlig ausbleibenden Heilung^{7,16,37}. Ob eine gestörte Knochenbruchheilung vorliegt, in welcher Form auch immer, ist abhängig von der Definition der Frakturvereinigung. In der Vergangenheit war es bisher nicht möglich, eine genaue Grenze festzulegen^{21,23,34,42,123}. Da der Prozess der Frakturvereinigung kontinuierlich erfolgt, ist schon vor Erreichen des Endzustandes eine Aussage möglich, ob es sich um einen physiologischen Ablauf handelt oder ob eine Störung vorliegt^{25,35,42}. Um die Begrifflichkeiten der knöchernen Vereinigung der Frakturrenden (Heilung), der verzögerten Vereinigung (verzögerte Heilung) oder der ausbleibenden Heilung (Pseudarthrosen) nun genau festzulegen, wäre eine einfache, jedoch recht willkürliche Zuordnung die Angabe einer definierten Zeitspanne^{7,25,37,42}. Da diese Einteilung allerdings nicht die verschiedenen Varianten eines Heilungsprozesses⁴² oder die biologische Potenz der gestörten Bruchheilung berücksichtigt³⁷, können keine allgemein gültigen zeitlichen Definitionen statuiert werden^{7,17,25,39}. Als günstiger erweisen sich somit Interpretationen, welche sich an den biologischen Vorgängen am Frakturspalt orientieren, z.B. am Stillstand der intramembranösen Heilungsantwort seitens des Periosts^{7,21,42} oder die Messung der Biegesteifigkeit des Bruchbereiches^{8,21,42,82,124,125}. So legten Marsh und Mitarbeiter (1998) diesbezüglich einen Wert von 7 Nm fest. Wird dieser erreicht, bedeutet das nach Marsh und

Mitarbeitern (1998) die zukünftige „Verpflichtung zur Heilung“. Bei einem Wert von 15 Nm ist wieder eine ausreichende strukturelle Stärke erreicht^{42,124}. Auch über die Radiologie, wie im klinischen Alltag am Menschen meist angewandt^{11,20,126}, lassen sich Aussagen zum Ausmaß der Mineralisierung und somit der Stärke und Steifigkeit des Knochens machen^{21,25,34,38,42}. Nach Schweiberer und Mitarbeitern (1999)¹⁸ handelt es sich bei der Frakturheilung um einen Regelkreis bestehend aus Osteostabilisation, Osteovaskularisation und Osteoregeneration. Somit sind also besonders die Biomechanik und die Vitalität zu berücksichtigen, um Vorhersagen über den Verlauf zu treffen. Nur so lässt sich die Form der Heilungsstörung klinisch sinnvoll bestimmen, damit letztendlich die geeigneten Therapiemaßnahmen angewendet werden können^{2,7,18,37,53,65,76,118,127,128}.

In diesem Zusammenhang muss auch die **Ätiologie** der Heilungsstörung analysiert werden. Viele Studien weisen auf die immense Bedeutung der Frakturstabilisierung bei der Knochenregeneration hin^{5-7,11,17,28,35,37,41,44,50,65,69,78,84,95,114,118,122,129-132}. Schon zu Zeiten des vorchristlichen Arztes Hippocrates wusste man was die Ruhigstellung einer Knochenfraktur bewirkt, lindert sie doch den Schmerz und führt zu einem schnelleren Heilungsergebnis^{4,18}. Selbst das Tier in der freien Wildbahn verfährt instinktiv in derselben Weise, indem es eine geschädigte Gliedmaße nicht belastet und zur Schienung eng an den Rumpf legt¹⁸. Infolge der Ruhigstellung kann sich ein Fixationskallus um die Fraktur bilden³⁷. Die vor einigen Jahren geforderte absolut rigide Fixierung eines Bruches kann zu dessen Ausheilung per primärer Knochenheilung ohne Kallusbildung führen^{11,18,19,84,130}, benötigt dabei jedoch viel Zeit^{2,4,11}. Erreicht werden konnte diese Form der Osteoregeneration allerdings nur über Osteosynthesysteme wie z.B. Platten¹⁸. Da bei deren Anwendung aber wichtige biologische Prinzipien missachtet blieben, wie z.B. die Gewährleistung der Durchblutung, waren teils beachtliche Komplikationsraten die Folge^{18,118}. Heute kommen diese Systeme in modifizierter Form weiterhin zum Einsatz¹⁸. Wird der Stabilisierung jedoch nicht genügend Aufmerksamkeit geschenkt, entstehen durch die vorhandene Bewegung im Frakturbereich ebenfalls Komplikationen, welche die Heilung verzögern oder gar verhindern^{5-7,17-19,29,44,99,115,118,127,130,133,134}. So entwickelt sich die Ausdehnung des Kallusgewebes und die Menge des darin enthaltenen, qualitativ wenig hochwertigen Faserknorpels^{41,42,65,118} proportional zum Grad der interfragmentären Bewegung^{27,41,42,65,76,95,99,122,130}, ein Eigenversuch des Knochens, den Frakturbereich zu stabilisieren^{37,42}. Selbst kleine Unterschiede in der Bewegung können einen tiefgreifenden Effekt haben, woraus ersichtlich wird, dass der Heilungsprozess ein sehr empfindliches System ist^{76,99}. Schon bei der Initiation der Frakturheilung scheinen die biomechanischen Faktoren eine große Rolle zu spielen, wird hier doch der Grundstein für die spätere Formierung und Differenzierung von Gewebe, sowie der notwendigen Blutversorgung gelegt^{17,27,41,44,118,123,132}. Auch die initiale Überbrückung an sich ist als kritischer Schritt zu bewerten. Erfolgt diese nicht mit festem Material, ist fortwährende Immobilität die Folge^{2,122}. Letztendlich führen sowohl eine zu

geringe Stabilisierung als auch eine absolute Steifheit nicht zu einem optimalen Heilungsverlauf^{5,18,44,130,133}. Nur mittels einer angemessenen Mikrobewegung im Frakturbereich kann eine Überbrückung stattfinden^{4,18,29,37,41,76,118}. Ist diese erfolgt, sind nachfolgende heilungshemmende Prozesse unwahrscheinlich².

Neben der Frakturstabilisierung ist auch die Blutzirkulation als einer der wichtigsten Faktoren in der Knochenbruchheilung zu berücksichtigen^{3,6,7,10,14,17,26,28,29,34,35,37,41,43,48,50,67,70,77,99,114,115,118,122,135-137}. Ist diese nicht in adäquatem Maße gewährleistet, fällt sie als treibende Kraft für die Initiation und Fortführung des Heilungsprozesses weg^{17,118,138}. Eine Störung der Vaskularisation ergibt sich zunächst aus dem Frakturtrauma, in dessen Folge große Gewebeerstörungen der umliegenden Weichteile, des Periosts und der medullären Bereiche auftreten können^{2,3,6,11,18,20,21,27,31,33,34,41,49,70,76,77,85,104,123,130}. All diese Kompartimente sind in der Lage, im Falle einer Fraktur zusätzliche Versorgungswege bereitzustellen, allerdings nur, wenn sie nicht selbst verletzt wurden^{41,42,77}. Sind sie jedoch selbst geschädigt, ist die komplizierte Blutanlieferung gestört^{2,7,8,18,41,44,49,77,85,104,114}, das Versorgungsgebiet kann nicht mehr durchblutet werden und es entstehen ausgedehnte avaskuläre Bereiche im Knochen^{18,85}. Dies hat eine Nekrose und Autolyse sämtlicher dort befindlicher Osteozyten zur Folge^{18,49,77,85}. Es ist ersichtlich, dass hieraus leicht eine verzögerte oder ausbleibende Heilung resultieren kann^{7,18,49,104}. Als eine weitere Ursache für die Störung der Durchblutung ist die iatrogene Zerstörung dieser Gewebe im Rahmen von Osteosynthese- und Wundbehandlungen bekannt^{6,11,25,27,34,41,49,114,122}. Denn auch der therapierende Chirurg verursacht bei seiner Frakturbehandlung eine nicht vermeidbare Gewebeerstörung^{41,130}. Ebenso kann das Osteosynthesystem an sich einen großen Einfluss auf die Durchblutung haben^{7,41,118}. So verringert eine intramedulläre Nagelung vornehmlich die endostale Durchblutung^{17,18,41,44,122}. Auf den Knochen angebrachte Platten gehen auf der periostalen Seite mit einer Devaskularisation und einem großen Weichteiltrauma einher^{18,41}.

Auch die Instabilität einer Fraktur kann den Blutfluss hemmen^{41,115,118}, werden die Gefäße durch die Bewegung der Fragmente doch immer wieder zerstört^{3,10,37,41,95}. Gerade die initialen mechanischen Konditionen wirken sich gravierend auf die Durchblutung aus¹¹⁸.

Die Gründe für die Entwicklung einer gestörten Knochenbruchheilung sind jedoch sehr vielfältig^{7,11,17,19,27,28,48} und müssen im klinischen Einzelfall möglichst genau eruiert werden^{26,123,139}. So existieren neben den zwei genannten Hauptfaktoren noch etliche Weitere. Schon allein die Natur der Fraktur übt einen gewissen Einfluss aus^{11,34,65,70,123}. Liegt ein glatter Bruch vor oder sind viele Bruchfragmente entstanden? Haben sich die Frakturrenden verschoben? Fehlen sogar Knochenfragmente? Je komplizierter der Bruch, desto größer ist die Gefahr einer Heilungsstörung. So ruft z.B. ein bestehender Spalt zwischen den Frakturrenden eine Heilungsverzögerung hervor, bzw. verhindert er ab einer gewissen Weite die Heilung vollständig (Punkt 2.3.2)^{2,6,7,11,17,27,28,34,40,44,76,79,114,122,123,139}. Lange Fragmente

abgestorbenen Knochens wirken sich ähnlich negativ aus². Abhängig von der Durchblutung ist auch der Sauerstoffdruck des Gewebes. Ist dieser zu niedrig, steht den Zellen nicht genug Energie für die notwendigen Prozesse zur Verfügung, besonders für die Initialisierung der Knochenrestauration¹⁷. Die bereits erwähnten Osteosynthesysteme können schon allein durch ihre Präsenz in der Frakturzone den Heilungsprozess stören^{127,140}. Das Trauma, nachfolgende Operationen und implantierte Systeme können auch das Gewebe kontaminieren und Infektionen zur Folge haben^{5,7,11,17,18,25,28,35,37,40,43,49,70,114,123}. Auch ist es möglich, dass sich umliegendes Gewebe in den Frakturspalt hinein verlagert oder sich sonstiges Fremdmaterial darin befindet. Beides stört den Heilungsprozess und bildet ein unüberwindbares Hindernis für das Periost und den periostalen Kallus^{2,5,7,17,35,37,114}. Weiterhin spielen die Lokalisation der Fraktur^{6,20,23,26,28,34,36,40,51} und die Krankengeschichte des Patienten bzgl. vergangener Operationen im Frakturbereich^{6,20,123} eine Rolle sowie im Hinblick auf den allgemeinen Gesundheitszustand^{3,43,70} Erkrankungen wie Diabetes mellitus^{17,20,31,34,43,123,141,142}, Osteoporose^{73,123}, ausgeprägte Adipositas^{31,37,43} und systemische Hormonstörungen^{5,11,17,50} aber auch das Alter^{11,17,20,34,51,52,143,144} und das Geschlecht^{11,21}. Auch ein schon erschöpftes Potential der zur Heilung notwendigen Zellen, wie z.B. der mesenchymalen Zellen aus dem Knochenmark, verzögert oder verhindert die Frakturheilung^{8,10,49}, genauso wie die andauernde Anwendung bzw. Einnahme einiger Medikamente (z.B. Indometacin, Heparin, Kortikoide, NSAID)^{7,11,17,20,34,43,96,123}. Ebenso die Missachtung der Anweisungen des Arztes⁶ und ungünstige Lebensgewohnheiten wie Rauchen^{5,6,11,20,31,34,43,123} und schlechte Ernährung^{11,17} können einen erheblichen Einfluss auf die Frakturheilung haben.

Somit müssen biologische und biomechanische Gegebenheiten berücksichtigt werden um letztendlich eine geeignete **Therapie** zu finden^{4,17,20,48,115,139}. Zur Optimierung der Knochenheilung ist es zum einen notwendig, besonders initial die biomechanisch adäquaten Rahmenbedingungen mit Hilfe eines auf die Heilungsstörung ausgerichteten Osteosynthesystems zu schaffen^{2,5,7,19,20,23,25,28-30,34,35,43,48,56,57,69,99,118}. Dabei sind die akkurate Reposition der Frakturen^{20,34,37,85,99,139}, die angemessene Fixierung und die Belastung der Gliedmaße seitens des Patienten zu berücksichtigen^{6,20,35,44,65}. Zum anderen ist die Notwendigkeit der Revaskularisierung zu betonen^{20,26,29,31,34,35,41,56,77,79}. Durch gewebeschonende Operationstechniken und Osteosynthesysteme gilt es, besonders das Periost zu erhalten bzw. periostale Unterbrechungen zu vermeiden, aber auch das Endost sowie Gefäße zu schonen^{2-4,7,26,34,41,44,49,50,77,79,145}. Weiterhin sind feststellbare Störfaktoren so gut wie möglich zu beseitigen^{2,34}. Im Rahmen der Therapie erforscht man heutzutage auch verschiedene biologische Verfahren um die Heilung anzuregen, z.B. durch Einbringen von Knochenmark^{5,21,25,31,34,36,45,48,56,58,65,67,146}, Wachstumsfaktoren^{20,24-27,29,31,34,35,45,47,49,56-59,66-73} oder pluripotenten bzw. ausdifferenzierten Stammzellen^{3,8,20,26,34,35} u. a.^{17,135} in den Frakturspalt. Seit wenigen Jahren wird auch über eine Intervention der Frakturheilung über

das Immunsystem^{12,31,74} oder per Gentherapie diskutiert^{15,45}. Auf die verschiedenen therapeutischen Ansätze wird im Zuge der Beschreibung der atrophen Pseudarthrose noch expliziter eingegangen (Punkt 2.3.3).

2.3.2 Klassifizierung der Heilungsstörungen

Im Verlauf der physiologischen Heilung zeigt sich innerhalb von zwei Wochen nach dem Frakturereignis eine deutliche Tendenz zur Überbrückung^{2,114}. Viele Studien weisen eine knöcherne Brücke innerhalb von vier Wochen nach^{3,7,8,19,21,25,48,57,60,114,127}. In dieser Zeit sollte sich die Überbrückung eingestellt haben^{2,39}, denn die Zellproliferation des Periosts nimmt danach deutlich ab¹⁶. Bleibt die erwartete Überbrückung in dieser Zeit, bei weiterhin anhaltendem Heilungsprozess, aus, liegt zunächst nur eine **verzögerte Heilung (delayed union)** vor. Das Endergebnis steht noch nicht fest^{21,25,34,38-40}. Schon sehr früh im Heilungsverlauf können sich durch die genannten Störfaktoren biologische und biochemische Änderungen ergeben^{1,3,17,95}, die zu einer nicht-mineralisierten Gewebevereinigung führen^{38,115,122}. Dabei kommt der Proliferationsprozess des Periosts vollständig zum Erliegen bevor die Fraktur überbrückt werden kann^{42,122} und es folgt eine chondrale Phase^{7,38,41,49,122}. Der dabei entstehende Knorpel kann durch die Beeinträchtigungen nicht mineralisiert werden^{7,49,122}. Zunächst bleiben die Heilungskapazität und die Fähigkeit zur Mineralisierung erhalten. Sie verlieren sich jedoch nach einigen Wochen, wenn die Störfaktoren nicht beseitigt werden¹²². Ohne weitere Eingriffe wäre evtl. noch eine rasche Heilung über die frühe endostale Ossifikation möglich²¹ (Punkt 2.2.2). Der noch als physiologisch betrachtete Weg der „langsamen“, also späten endostalen Ossifikation, welche erst nach einigen Monaten einsetzt (Punkt 2.2.2), könnte als verzögerte Heilung betrachtet werden, als „Zweiter Versuch der Natur“, nachdem eine periostale Überbrückung nicht mehr möglich ist⁴².

Aus der verzögerten Heilung kann sich eine **ausbleibende Heilung (Nichtvereinigung, non union)** entwickeln^{2,41,114}, im deutschen Sprachgebrauch auch als Pseudarthrose bezeichnet. Hierbei sind sämtliche Knochenformierungsprozesse, periostale und endostale, zum Erliegen gekommen^{20,21,25,34,35,39,42,147}. Zwischen den Frakturrenden zunächst entstandener Knorpel wird durch fibröses Narbengewebe ersetzt^{21,25,42,78,122}, und das gesamte histologische Erscheinungsbild stellt sich zellruhend, inaktiv und avaskulär dar^{42,114}. Radiologisch lassen sich im medullären Kanal proximal und distal der Fraktur sklerotische knöcherne Kappen erkennen, welche das Knochenmark gegenüber dem Frakturbereich abdichten^{21,37,42}. Eine Vereinigung ist ohne weitere Maßnahmen nicht zu erwarten^{20,25,38,39,42}. Nach Brownlow und Mitarbeitern (2000)⁵³ ist die Entwicklung einer Pseudarthrose anhand ihres Erscheinungsbildes bereits nach acht Wochen vorhersagbar.

Da eine korrekte Klassifizierung für die Therapie essentiell ist, gab es in der Vergangenheit viele Versuche diesbzgl. einen Konsens zu finden^{20,34,123}. Dabei hat sich die Systematik

nach Weber und Cech³⁷ in verfeinerter Form bewährt, wonach sich Pseudarthrosen grundsätzlich in **vitale und avitale Erscheinungsformen** einteilen lassen^{21,25-27,34,38,123}.

Morphologisch **hypertrophe Pseudarthrosen** gelten biologisch noch als reaktionsbereit^{26,34,38,45}. Die Vitalität lässt sich mit Hilfe der Szintigraphie adäquat nachweisen^{37,38}. In Abhängigkeit vom Grad der Durchblutung und somit des lokalen Mineralstoffwechsels, welcher wiederum mit der Knochenregeneration korreliert, reichern sich intravenös verabreichte radioaktive Nuklide (Kalzium oder Strontium) im zu untersuchenden Zielorgan an^{37,148}. Auch die Konzentrationsmessung von Adenosintriphosphat (ATP), ein Stoff, der unmittelbar Energie an aktive Zellen bereitstellt, ist beschrieben worden und wird zur Bestimmung der metabolischen Aktivität von Geweben eingesetzt⁵³. Bei der Entwicklung einer hypertrophen Pseudarthrose ist ätiologisch eindeutig eine zu geringe Immobilisierung der Fraktur als Hauptfaktor anzuführen^{3,7,17,20,25,34,37,38,40,41,44,45,65,114,115,139}. Teils können auch eine ungenügende Reposition der Frakturrenden³⁷ oder Infektionen dazu führen^{42,95,99,134,139}. Da durch die Bewegung immer wieder Mikrorupturen im Kallus auftreten^{41,44} und einwachsende Blutgefäße zerstört werden^{3,37,41,95,115} verlängert sich die, bereits im Rahmen der verzögerten Heilung aufgetretene, chondrale Phase^{37,122} und eine übermäßige Kallusformierung mit gefäßlosem, minderwertigem Faserknorpel ohne Knorpelvereinigung ist die Folge^{2,17,20,25,35,37,38,40-42,44,65,76,95,99,114,115,118,122,130,133}. Weiterhin entstehen bewegungsinduzierte Resorptionen, wodurch sich der Frakturspalt erweitert^{99,115}. In bewegungsruhigeren und nur kleinen periostalen und peripheren Bereichen fernab von der Fraktur kann dieser Knorpel noch ossifizieren^{37,42}. Direkt am Frakturspalt stellen die hypertrophierenden Chondrozyten und das Periost ihre Aktivität jedoch nach wenigen Wochen ein^{17,122} und im weiteren Verlauf erlischt deren Mineralisierungskapazität vollständig¹⁷. Letztendlich wird der Frakturspalt mit nicht-mineralisiertem Bindegewebe gefüllt^{2,17,40,41,114,115,122}, die Narbe versteift geringfügig⁴² und eine „Synchondrosis“, ein „Falschgelenk“ mit zwischenliegendem Knorpel und Bindegewebe ohne interfragmentäre Flüssigkeit, ist entstanden^{17,37,42,76}.

Aufgrund der vorliegenden biologischen Aktivität der Fragmentenden^{18,37} würde therapeutisch eine Reposition der Frakturrenden, vor allem aber eine entsprechende stabile Fixierung zur Heilung führen^{18,25,28,34,37,38,41-45,95,114,115,139}. Erfolgt keine Behandlung, findet innerhalb der nachfolgenden Monate über das Remodeling eine Abnahme des Kallusgewebes statt und es entwickelt sich aus der hypertrophen eine atrophe Pseudarthrose (Punkt 2.3.3)^{17,20,122}.

Als avital bzw. biologisch reaktionsunfähig wird die Gruppe der **Nekrose-Pseudarthrosen** bezeichnet³⁸. Hier liegen avitale Knochenfragmente vor oder es fehlen ganze Knochenbereiche^{20,34,37}. So ergibt sich ein erweiterter Frakturspalt, angefüllt mit einem gefäßarmen, fibrösen Narbengewebe^{21,25,60,70,76,79} und einhergehend mit einer größeren

Instabilität^{21,42,46}. Diese Knochenbereiche um die Bruchstelle herum sind durch die massive Ablösung, Unterbrechung oder Zerstörung des Peri- und Endosts in ihrer Blutversorgung stark gestört^{18,20,26,34,37,38,123}. Während den Hauptfragmenten noch eine Blutversorgung aus den kortikalen und medullären Gefäßen zukommen kann, sind Zwischenfragmente auch von diesen Bereichen isoliert¹⁸ und somit dazu prädestiniert, im weiteren Verlauf ihre Heilungspotenz zu verlieren³⁷. Daher ist es nicht möglich einen periostalen Kallus zu formieren^{21,25,34,38,42} und eine spontane Heilungstendenz ist nicht erkennbar^{21,25,37,46}. Diese avitalen Kortikalisbereiche stellen äußerst angreifbare „Sollbruchstellen“ dar¹⁸. Dennoch sind auch diese Formen der Pseudarthrose nur selten biologisch völlig inaktiv, d.h. dass es handelt sich nicht unbedingt um einen vollends abgeschlossenen Prozess³⁷.

Die Therapie dieser Pseudarthrosen stellt sich problematischer dar^{12,18,25,31}, da das vollständige Verständnis für die Ätiologie noch fehlt^{1,19,25,55}. Die Stabilisierung des Bruches mit soliden Verbindungssystemen allein ist hier nicht mehr ausreichend^{37,38,43,81}. Eine Kombination aus biomechanischer und biologischer Therapie ist notwendig^{20,34,38,43,48}. So ist es erforderlich, durch umfangreiche und geeignete Interventionen die Knochenheilung wieder zu stimulieren^{11,20,34,38,43,53}, da die beteiligten Knochen allein nicht dazu in der Lage sind⁶⁶. So kann eine Wundauffrischung heilungsfördernde Signale am Frakturbereich setzen^{20,34,43}. Da aber auch osteogenes reaktionsfähiges Substrat fehlt muss dieses aus externen Quellen zur Verfügung gestellt werden^{11,18,20,34,37,38,45}, z.B. durch autologen Spongiosatransfer oder Transplantation von *in vitro* expandierten mesenchymalen Stammzellen. Hierauf wird bei der Beschreibung der atrophen Pseudarthrose noch genauer eingegangen (Punkt 2.3.3). Besonders wichtig bei der Behandlung dieser Pseudarthroseformen ist, die biologischen Prinzipien zu beachten¹⁸. Die Entstehung von Nekrose-Pseudarthrosen könnte oft vermieden werden, wenn die durchblutenden Kompartimente bei einem notwendigen Operationsverfahren geschont^{2-4,44,49,50,145} werden und implantierte Osteosynthesysteme durch ihre Präsenz die Blutversorgung nicht behindern würden¹⁸.

Als reaktionsunfähig werden die Drehkeil-, die Trümmerzonen-, die Defekt- und die atrophe Pseudarthrose bewertet³⁸. Bei Ersteren liegen ein oder mehrere Drittfragmente vor, welche ganz oder teilweise den Anschluss an die Blutzirkulation verloren haben und somit nekrotisieren³⁷. Der **Defekt-Pseudarthrose (critical size defect)** geht ein vorangegangener Substanzverlust, z.B. durch Knochenverlust am Unfallort, Knochentumorresektion oder Sequesterverlust durch Infekte oder osteolytische Tumore, voraus^{7,30,37,38,46,76,78,80-82,139,149}. Dadurch ergibt sich ein extrem erweiterter Spaltbereich, wobei in der Literatur nicht eindeutig geklärt ist, ab welcher Spaltweite eine Defekt-Pseudarthrose vorliegt, die Werte schwanken zwischen 4 – 8 mm^{25,46,47,81}. Obwohl die Fragmentenden vital sind, ist eine Überbrückung aufgrund des großen Spaltes nicht möglich^{29,37,38,46,55,76,79,82,150}, da die Fragmentenden durch

die „osteologisch tote“ Defektzone keine ausreichende Stimulierung erfahren^{37,76,81} und die Kapazität der Revaskularisierung limitiert ist⁷⁹.

2.3.3 Atrophie Pseudarthrose

Bleiben die vorhergehend aufgeführten Pseudarthroseformen unbehandelt⁵³ oder wird bei der Behandlung nicht genügend Augenmerk auf die biologischen Prinzipien der Knochenbruchheilung gelegt^{18,38}, ist in der Regel die Ausbildung einer atrophen Pseudarthrose die Folge^{17,76,137}. Da es Ziel dieser Studie ist, eine atrophe Pseudarthrose zu schaffen, wird im Folgenden näher auf diese eingegangen:

Morphologie und Diagnostik der atrophen Pseudarthrose

Biologisch ist die atrophe Pseudarthrose als völlig areaktiv zu werten^{3,7,26,34,38,41,42,128}. Die bisherigen Reparationsprozesse sind zum Stillstand gekommen. Durch die Inaktivität von Peri- und Endost differenzieren sich keine Chondro- und Osteozyten⁷, die an die Fraktur angrenzende intramembranöse und enchondrale Ossifikation bleibt aus^{3,7,14,17,19,20,27,31,33,42}. So kann sich kein Knorpel⁵³ und kein, oder nur sehr wenig spaltfernes, mineralisiertes Kallusgewebe bilden^{3,7,19,25,30,34,38,47-49,53,70,76,128,138}, die Frakturüberbrückung bleibt aus^{7,49}. Durch die Aktivität von Osteoklasten finden resorptive Vorgänge statt, welche die Fragmentkanten zunächst abrunden^{3,7,30,49,76}. In der folgenden Zeit entstehen dort deutliche Resorptionslakunen und im weiteren Verlauf verkürzen sich die Fragmentenden^{3,7,20,29,34,37,38,49} wodurch sich der Frakturspalt erweitert^{2,6,7,14,17,44,48}. Durch eine ungenügende Blutversorgung^{20,26,27,37,38,47,115,123,138,151} gehen die Osteozyten zugrunde, so dass ihre Lakunen im kortikalen Knochen histologisch leer sind und die Knochenenden nekrotisch werden^{3,18,19,29,38,49}. Weiterhin nimmt die Knochendichte ab^{30,37}. Letztendlich ist eine signifikante Erweiterung des Frakturspalt es die Folge^{3,17,42,49,60}. Endostal entstehen knöcherne Kappen^{3,42,76,138}, die das Knochenmark zum umliegenden Gewebe hin abdecken^{21,37,47,57,76} und im weiteren Verlauf sklerotisch werden^{7,25,42}. Im Frakturspalt und um den Spalt herum bildet sich lockeres, fibröses Narbengewebe^{7,14,17,21,25,28,38,49,70,76,78,138}, wodurch biomechanisch jedoch nicht die notwendige Stabilität erzeugt werden kann^{3,7,21,29,42,53,76,78}. Eine Syndesmosis, ein Falschgelenk mit zwischen liegendem fibrösem Gewebe, ist entstanden^{25,28,76,114}.

Jegliche osteogene Potenz scheint verloren gegangen^{19,21,31,34,37,38,45}. Brownlow und Mitarbeiter (2000)⁵³ untersuchten jedoch die metabolische Aktivität im Frakturbereich einer atrophen Pseudarthrose anhand der ATP-Konzentration (Adenosintriphosphat) und stellten fest, dass diese unerwartet hoch lag. Und auch Lattermann und Mitarbeiter (2004)²⁹ konnten in ihrem Versuch, eine atrophe Pseudarthrose zu erzeugen, nach 16 Wochen noch eine inflammatorische Aktivität feststellen. Somit bleibt die Schlussfolgerung, dass selbst atrophe Pseudarthrosen nicht völlig inaktiv sind und durch bestimmte Stimuli, v.a. therapeutische Eingriffe, zur Heilung angeregt werden können^{18,47,53,138}.

Diagnostisch geben im klinischen Alltag am Patienten die Anamnese und die klinische Untersuchung erste Hinweise^{11,20,21,34,56,125}. Zusätzlich sind bildgebende Untersuchungen wie vornehmlich Röntgen und Computertomographie sowie eventuell Ultraschall und MRT zur Bewertung der Frakturbeeinträchtigung vonnöten^{11,20,26,31,33,34,36,38,48,56,58,67,83,84,123,125}. Mitunter kommen noch spezifischere Techniken (Biopsie, Laborparameter,...) zur eindeutigeren Diagnosestellung zum Einsatz^{11,34}. Im Tierversuch lässt sich die atrophe Pseudarthrose röntgenologisch, computertomographisch, histologisch und biomechanisch deutlich darstellen^{3,7,29,49,66,152}.

Ätiologie der atrophen Pseudarthrose

Ätiologisch kommen bei der Entstehung einer atrophen Pseudarthrose, neben der ungenügenden Behandlung vormals beschriebener Pseudarthroseformen^{38,53}, sämtliche bereits genannten Risikofaktoren biologischer, biomechanischer und allgemeiner Natur in Betracht, sie ist somit multifaktoriell bedingt (Punkt 2.3.1)^{7,19,27,34,48}. Allerdings sind die grundlegenden Mechanismen, die zur Entwicklung einer atrophen Pseudarthrose führen nicht genau bekannt^{3,34,53}. Die hochgradig gestörte Heilungskapazität^{20,21,25,29,34,38,45} ist hier ebenfalls primär durch die reduzierte Vaskularisierung verursacht^{19,27,29,33,34,53,138}, vornehmlich bedingt durch die Zerstörung des Periosts und der umliegenden Gewebe^{2,19,20,27,34,49}. Häufig gehen atrophe Pseudarthrosen auch aus Infektionen hervor^{25,27,53}. Biomechanisch können sie, im Gegensatz zu hypertrophen Pseudarthrosen, auch durch eine zu rigide Osteosynthese verursacht werden^{3,19,43}, denn, wie bereits erwähnt, ist ein Mindestmaß an Mikrofragementbewegung notwendig um die Gewebe im Frakturbereich zu stimulieren und die Heilung zu initiieren.

Therapie der atrophen Pseudarthrose

Da die exakten Entwicklungsprozesse der atrophen Pseudarthrose unbekannt sind und ihre biologische lokale Aktivität extrem reduziert ist^{19,43,48}, ist es schwierig, einen erfolgreichen therapeutischen Ansatz zu finden^{11,12,19,21,31,33,43,54,56}. Daher haben sich in der Vergangenheit viele Studien mit neuen Therapieoptionen für diese komplizierte Situation auseinandergesetzt^{3,8,12,13,19,20,22,23,25,29,31,34,45,48,49,58-60,67,118,152-154}. Dennoch konnte bisher kein Konsens über die optimale Strategie erreicht werden^{5,12,19,25,26}. Abhängig von der Ursache, der Lokalisation und der Erscheinung der atrophen Pseudarthrose^{26,43,123} ist meist eine Polytherapie vonnöten^{20,32,34,45}, welche häufig ein hohes Risiko an unerwünschten Nebenwirkungen beinhaltet^{3,21,23,25,34}.

Zunächst wäre ein aufwändiges chirurgisches Debridement erforderlich, welches abgestorbenes, infiziertes und unerwünschtes Material entfernt^{8,9,20,34,38,41,45,56,128,139,144}, einen biologischen Stimulus am Frakturspalt setzt^{20,43,50} und vor allem auch die unbedingt notwendige Revaskularisierung fördert^{9,12,19,20,26,29,31,34,37,41,45,59,67,95,139}. Andererseits bedeutet eine umfangreiche Chirurgie eine Gefahr für den ohnehin schon gestörten Blutfluss^{29,77}, und

das Risiko für Infektionen erhöht sich beträchtlich. Bisher schloss die Therapie eine exzessive Chirurgie mit ein²⁹, schon allein um das Osteosynthesystem anzubringen. Biomechanisch können weniger rigide Osteosynthesysteme den Raum für die notwendige Mikrofragmentbewegung liefern und ebenfalls heilungsanregend wirken⁴³. Als Begleitmaßnahme neben der biologischen Therapie ist die Optimierung der biomechanischen Situation unerlässlich^{5,9,20,22,23,34,35,37,38,43,65,139,144}. Im Therapiemanagement der atrophischen Pseudarthrose hat sich besonders der Ring-Fixateur nach Ilizarov bewährt^{20,143,144}. Die Mehrzahl der neuen Studien beschäftigt sich jedoch mit der Forderung nach osteogen reaktionsfähigem Substrat und setzt biologisches Material im Frakturbereich ein^{8,9,11,34,38,45,82}. Als derzeitiger Goldstandard der Therapie^{20,34,73}, vor allem für große Defekte, wird der Transfer von autologem Knochengewebe in Form von Spongiosa z.B. aus der Hüfte angesehen^{5,8,19,20,21,25,31,34,36,37,41,43,45,58-60,66,73,82,112,120,139,144,146,155}. Die Spongiosa heilt durch raschen Anschluss an das Gefäßsystem schnell ein und ist am Becken in meist ausreichender Menge verfügbar^{37,67,155}. Allerdings treten nachfolgend häufig Komplikationen, auch an der Entnahmestelle des Spongiosagewebes, auf, wie Infektionen, Hämatome, Wundhypersensitivität und neurologische Schäden^{5,8,9,20,21,25,31,34,45,58,60,66,67,112,155}. Weiterhin ist die Entnahmemenge bei großen Defekten limitiert^{21,25,31,34,58,66}. Die Transplantation von Periost mit oder ohne Knochenanteile kann die Osteogenese ebenfalls stimulieren^{20,43,59,61,62,66,98,110,111}. So haben Versuche ergeben, dass das Periost auch in einer heterotopen Umgebung ohne Knochen- oder Knorpelkontakt zur Bildung dieser Gewebe befähigt ist^{59,66,85,105,111}. Alternativ kommen biologische Knochenersatzmaterialien zum Einsatz^{12,20,21,34,35,43,45,47,59,63,64,66,107,108,111,112}, welche eine Trägerfunktion ausüben. Hierbei handelt es sich um Polymere aus Kollagenen^{43,59,64,156,157}, Silikon, Polyethylen, Hydroxyapatit, etc.^{20,34,45,66,107,108,111,112}. Diese transportieren osteoinduktive Substanzen oder Zellen (s. u.)^{21,34,43,45,59,63,64,107,108,112} und werden nach einiger Zeit vom Körper abgebaut^{34,66}. Sie beinhalten aber auch die Problematik von erhöhten lokalen Infektionen und Abstoßungs- bzw. Unverträglichkeitsreaktionen^{43,45,66}. Ein weiterer Therapieansatz ist die direkte Implantation dieser osteoinduktiven Substanzen bzw. Zellen. Erprobt wurden und werden hier perkutane Injektionen von Knochenmark^{5,31,35,36,65,112,146,147} und Zellkulturtechniken mit pluripotenten mesenchymalen Stammzellen^{3,8,19,20,25,31,34-36,45,47,48,60,67,152,153}, ihren schon ausdifferenzierten Nachfolgern^{3,31,154} oder auch Periostzellen^{25,35,43,59,66}. Ein Vorteil dieser für die Knochenheilung essentiellen Zellen¹⁶ ist, dass sie leicht aus dem Knochenmark oder Periost gewonnen und angezüchtet werden können^{8,25,34,35,45,47,66,67,107,112,153,154}. Die lokale Anwendung von Wachstumsfaktoren steht besonders im Fokus^{5,9,12,16,20,24,25,29,31,34,35,45,48,49,56-60,66-73,98,112,144,147}, wie z.B. der Transforming Growth Factor β (TGF β) zu dessen Familie auch das Bone Morphogenetic Protein (BMP) gehört. Es ist bewiesen, dass diese als Signalmoleküle bei der Frakturheilung eine wichtige Rolle spielen^{1,9,16,18,20,22,34,49,50,58-60,67,69,95}. Aber auch der genaue Wirkungsmechanismus der meisten Wachstumsfaktoren ist nicht

ausreichend bekannt ^{1,24,58,95}. Vorteile dieser Technik sind die verringerte Entnahmemorbidität am Beckenkamm, die Vermeidung bzw. Verringerung vieler mit der Knochentransplantation einhergehender Komplikationen, wie z.B. Infektionen, und die freie Verfügbarkeit der Wachstumsfaktoren ^{9,34}. Nachteilig wirkt sich die schnelle Verstoffwechselung dieser Substanzen aus ⁶⁹. Dadurch sind häufige Applikationen notwendig, die eine Manipulation z.B. durch Punktion der Frakturstelle mit sich bringen ^{69,95}, was die Heilung negativ beeinträchtigen könnte. Heute geht man davon aus, dass die lokale Anwendung von Wachstumsfaktoren für die Therapie zukünftig unerlässlich sein wird ^{22,29,59,69,95}. Eine Weiterentwicklung wäre der Versuch, Gene mit Hilfe von Viren einzuschleusen, die z.B. diese Wachstumsfaktoren generieren ^{15,29,45}. Auch über die Beeinflussung des Immunsystems, z.B. über bestimmte Lymphozyten- oder Makrophagenpopulationen und Zytokine wird versucht, die Pseudarthroseheilung zu beschleunigen ^{12,31,74}.

Viele dieser Techniken führen zu einer beschleunigten Heilungsantwort ^{3,8,29,49,59,68,72}. Dennoch gibt es bei der Entwicklung der geeigneten Therapie von atrophen Pseudarthrosen noch viel Forschungsbedarf, damit es bald möglich ist, die verschiedenen Phasen der Knochenheilung gezielt zu beeinflussen ^{12,15,22,23,25,34}.

3 Material und Methoden

3.1 Auswahl und Haltung der Versuchstiere

Zur Durchführung des Versuchs wurden 51 männliche Sprague-Dawley Ratten eingesetzt. Sie stammten aus dem Zuchtlabor (Fa. Harlan-Winkelmann GmbH, Borchon, Deutschland) und wurden sofort nach ihrer Ankunft in der Forschungseinrichtung für experimentelle Medizin der Charité, Campus Virchow-Klinikum, Berlin, auf Gesundheitszustand, Geschlecht und Gewicht untersucht.

Zum Einsatz kamen nur gesunde, ausgewachsene Tiere mit einem Gewicht zwischen 410 g und 460 g. Die anschließende Zuordnung aller Versuchstiere erfolgte zufällig. Es wurden zwei Gruppen, die Versuchs- und die Kontrollgruppe mit je 16 Tieren gebildet. Diese beiden Gruppen untergliederten sich entsprechend der geplanten Auswertungsverfahren in eine immunhistologische/ histologische und eine histomorphometrische Subgruppe mit je acht Tieren (Tab. 3.1). 19 Tiere mussten aus der Studie ausgeschlossen werden (Punkt 4.1).

Während der gesamten Versuchsdauer waren die Tiere in oben genannter Einrichtung der Charité untergebracht, zunächst in Gruppen von bis zu fünf Ratten pro Käfig (Makrolonkäfig Typ IV, Bodenfläche 1800 cm², Höhe 19 cm). Nach erfolgter Osteotomie wurden die Tiere in Einzelkäfigen (Makrolonkäfig Typ III, Bodenfläche 810 cm², Höhe 18 cm) gehalten, um ein gegenseitiges Benagen der Operationswunden zu vermeiden. Die Haltung erfolgte auf Holzstreu (Fa. Rettenmaier und Söhne GmbH und Co. KG, Rosenberg, Deutschland) mit zusätzlicher Gabe von ungebleichten Zellstofftüchern zur Befriedigung des Nestbautriebes. Einmal wöchentlich wurden die Käfige gereinigt. Gefüttert wurde ad libitum mit Alleinfuttermittel (sniff-Alleinfuttermittel für Ratten und Mäuse, Fa. sniff Spezialitäten GmbH, Soest, Deutschland), der Zugang zu einer Wassertränke war ebenfalls ad libitum möglich. Mittels einer Klimaanlage wurden kontinuierliche Umgebungsbedingungen aufrechterhalten, die einer täglichen Kontrolle unterlagen. Die Raumtemperatur betrug 21°C, die relative Luftfeuchte lag sich zwischen 60 - 70 %. Durch eine Zeitschaltuhr wurde ein regelmäßiger Tag-Nacht-Rhythmus von jeweils zwölf Stunden gewährleistet.

Alle Tierversuche wurden mit Genehmigung des Landesamtes für Arbeitsschutz, Gesundheitsschutz und technische Sicherheit durchgeführt (Genehmigungsnummer: G0036/04).

Subgruppe	Anzahl der Tiere	
	Versuchsgruppe	Kontrollgruppe
Histomorphometrie	8	8
Immunhistologie/ Histologie	8	8

Tab. 3.1: Einteilung der Tiere in Untersuchungsgruppen

3.2 Operatives Vorgehen

3.2.1 Knochenmarksentnahme

Sämtlichen Tieren wurde zwei Wochen prae operationem aus der rechten Tibia Knochenmark entnommen. Dieser Vorgang war notwendig, da die Tiere dieser Studie auch in nachfolgenden Forschungsarbeiten ausgewertet wurden. In diesen Studien wurde die Knochenregenerationspotenz von lokal implantierten mesenchymalen Zellen in einer atrophen Pseudarthrose zu definierten Zeitpunkten untersucht. Dabei wurden aus dem gewonnenen Knochenmarksaspirat autologe mesenchymale Stammzellen selektiert und mit Hilfe eines Zellnährmediums angezüchtet. Anschließend wurden diese als undifferenzierte, pluripotente Stammzellen oder prädifferentzierte, monopotente Osteoprogenitorzellen in den Osteotomie-spalt appliziert. Die Knochenmarksentnahme bei sämtlichen Tieren und die Applikation des Nährmediums bei den Tieren der Versuchsgruppe dienten der Vergleichbarkeit der sich anschließenden Forschungsprojekte, um Effekte dieser Eingriffe bzw. des Zellnährmediums auf die Knochenbruchheilung ausschließen zu können. Diese Maßnahmen stehen jedoch mit der Etablierung dieses Modells in keinem direkten Zusammenhang.

Mittels einer Feinwaage (Sartorius TE 6100, Fa. Sartorius AG, Göttingen, Deutschland) erfolgte prae operationem das Wiegen der Tiere in einer Kunststoffschale. Wiesen sie ein Gewicht innerhalb des vorgesehenen Intervalls von 410 - 460 g auf, wurden sie in das Projekt einbezogen.

Die Einleitung der Anästhesie erfolgte per Inhalationsnarkose. Hierzu wurde das Einzeltier in eine mit Narkosegas (3,5 % Isofluran (Forene ®, Fa. ABBOTT GmbH, Wiesbaden, Deutschland), 0,6 l/min O₂ und 0,4 l/min N₂O) angereicherte durchsichtige Plastikbox verbracht. Die Narkosegasmischung lief über einen Schlauch aus dem Narkosegerät (STEPHAN-Respirator ABV, Fa. Stephan, Gackebach, Deutschland) zu. Mit adspektorisch ersichtlichem Eintritt der Narkose wurde das Tier aus der Box genommen. Auf einem OP-Beitisch liegend erhielt es während der gesamten Knochenmarksentnahme die Inhalationsnarkose über eine selbst angefertigte Gesichtsmaske. Im Laufe der nachfolgenden Prozedere fand eine fortwährende adspektorische Kontrolle der Vitalfunktionen des Tieres (Atmung und Kreislauf) statt. Zunächst wurde das rechte Knie samt zugehörigem Unterschenkel mit einer Schermaschine (Favorita II, Fa. Aesculap, Tuttlingen, Deutschland) rasiert und die geschorenen Flächen des Beines mit Polyvidoniod-Lösung (Braunoderm®, Fa. B. Braun, Melsungen, Deutschland) desinfiziert. Unter sterilen Bedingungen erfolgte nun eine ca. 1 cm lange Schnittinzision medio-distal der Tuberositas tibiae, welche bis auf den Knochen reichte. Das vorhandene Weichteilgewebe wurde vorsichtig nach lateral geschoben, bis der Knochen vollständig frei lag. Mit einem Bohrgerät mit flexiblem Handstück, elektrischem Fußpedal (16.000 Upm, Fa. Proxxon, Niersbach/ Eifel, Deutschland) und aufgesetztem Kugelkopfbohrer (Durchmesser 1 mm, Fa. Proxxon) konnte von medio-ventral nach kaudo-latero-distal gerichtet eine Öffnung in die Tuberositas tibiae

gebohrt werden. Über diese Öffnung wurde eine Kanüle (22 G, Fa. BD Microlance™, Irland), die auf eine 1 ml Einmalspritze (Fa. BD Plastipack™, Madrid, Spanien) aufgesetzt war, vorsichtig eingeführt. Unter sanftem, kontrolliertem Druck und einhergehender leichter Aspiration des auftretenden Hämatoms wurde die Kanüle nach distal in den Knochenmarkskanal der Tibia vorgeschoben. Durch leichte Bewegung der Kanüle konnte das Knochenmark aspiriert werden. Der anschließende Verschluss der Inzision erfolgte durch ein Einzelknopfheft mit nichtresorbierbarem Faden (3-0 Prolene® mit Nadel, Fa. Ethicon, Norderstedt, Deutschland).

Hinterher wurden die Tiere in ihren Käfig gelegt und bis zum Erwachen beobachtet. Das gewonnene Aspirat wurde bei den Tieren der Kontroll- und Versuchs-Gruppe verworfen, da es für die eigentlichen Versuche keine Verwendung fand.

3.2.2 Externer Fixateur

Der in diesem Modell verwendete monolaterale Fixateur externe bestand aus einem Grundkörper und vier Kirschner-Bohrdrähten. Der Grundkörper setzte sich aus zwei Edelstahlplatten (29 mm Länge, 5 mm Breite sowie eine Dicke von 2,8 mm und 1,8 mm) zusammen, deren unterschiedliche Dicke sich aus Stabilitätsgründen ergab. Die Verbindung der Platten erfolgte über zwei Senkschrauben (M 2,5), deren Senkkopflöcher sich in der stärkeren Platte befanden. Weiterhin wiesen die Edelstahlplatten des Grundkörpers vier korrespondierende Nuten auf, in welche nach Verschraubung der Platten die vier Kirschner-Bohrdrähte (Durchmesser 1,25 mm, Länge 10 cm, Gewindelänge der Spitze 10 mm, Fa. M. Jagel, Bad Blankenburg, Deutschland) zu liegen kamen (Abb. 3.1). Das Gesamtgewicht des Fixateursystems betrug 5,4 g.

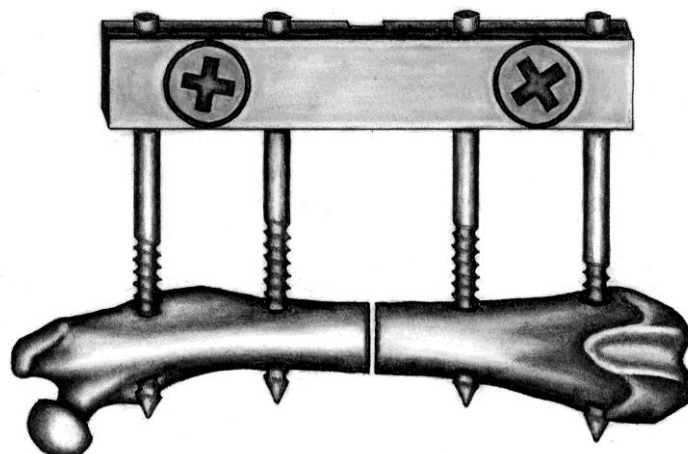


Abb. 3.1: Darstellung des osteotomierten Femurs mit montiertem Fixateur externe (Ansicht von kranial); die vier Kirschner-Bohrdrähte werden von links nach rechts als Pin1 (P1) bis Pin4 (P4) durchnummeriert²⁰¹

3.2.3 Osteotomie

Anästhesie und Analgesie

Zu Beginn der Operation wurden die Versuchstiere erneut gewogen, um Tiere mit zu geringem (< 410 g) oder hohem Gewicht (> 460 g) auszuschließen. Anschließend erfolgte die Narkoseeinleitung per Inhalationsnarkose, wie unter Punkt 3.2.1 beschrieben. Zur Erreichung und Aufrechterhaltung eines für die Operation günstigen Narkosestadiums erhielten die Tiere während der Inhalationsnarkose per Gesichtsmaske zusätzlich eine Injektionsnarkose, bestehend aus ca. 0,5 ml eines Gemisches aus Ketaminhydrochlorid (100 mg/ml, Ursotamin[®], Fa. Serum-Werk Bernburg AG, Bernburg, Deutschland) und Xylazinhydrochlorid (20 mg/ml, Rompun[®], Fa. Bayer Vital GmbH, Leverkusen, Deutschland) in einem Verhältnis von 4:3 (1,0 ml/kg KGW). Die Injektionsnarkose wurde nach lokaler Desinfektion mit Polyvidoniod-Lösung (Braunoderm[®], Fa. B. Braun) intraperitoneal in der Regio abdominis media injiziert. Mit Applikation des Injektionsnarkotikums konnte die Inhalationsnarkose beendet werden. Nach lokaler Desinfektion der Regio interscapularis mit Polyvidoniod-Lösung kamen zur Analgesie 0,5 ml Buprenorphinhydrochlorid (0,1 mg/KGW, Temgesic[®], Fa. Essex Pharma GmbH, München, Deutschland), subkutan injiziert, zum Einsatz.

Nach Applikation des Narkotikums und Analgetikums erfolgte eine großzügige Schur des gesamten linken Beines und der umliegenden Bereiche mit der Schermaschine, sowie die Desinfektion der rasierten Flächen mit Braunoderm[®]. Um einer Austrocknung der Hornhaut des Auges vorzubeugen, wurde Dexpanthenol-Augensalbe (Bepanthen[®], Fa. Jenapharm, Jena, Deutschland) auf beide Korneae aufgebracht.

Anschließend wurde das Tier mit der rechten Körperseite auf eine mit einem sterilen Tuch (Foliodrape[®], Fa. Hartmann, Heidenheim, Deutschland) abgedeckte, elektrische Wärmeplatte (37°C) gelagert und mit einem sterilen, gelochten Epiduraltuch (Fa. Allegiane Santé S.A.[®], Châteaubriant, Frankreich) abgedeckt. Lediglich das linke Bein blieb unbedeckt und wurde nochmals mit Braunoderm[®] desinfiziert.

Osteotomie des Femurs

Über die gesamte Länge des linken Femurs erfolgte lateral eine Schnittinzision, bis die Faszie des Muskelgewebes sichtbar war (Abb. 3.2.a). Das Septum intermuskuläre war in der Aufsicht als feine, weiße Linie zu erkennen. Um die Muskulatur zu schonen, wurde entlang des Septums, zwischen den Adduktoren und Abduktoren, also zwischen Musculus quadriceps und Kniesehnenmuskulatur, mit einer spitzen Präparierschere stumpf gearbeitet, bis das Os femoris zum Vorschein kam. Dieses wurde auf ganzer Länge vorsichtig stumpf freipräpariert, während die Operationsassistenten mit Hilfe zweier feiner stumpfer Wundhaken die Sicht auf den Knochen frei hielt (Abb. 3.2.b).

Mit dem Bohrgerät und aufgesetztem Bohrer (Durchmesser 0,9 mm, Fa. Proxxon) erfolgte am distalen Ende des Os femoris, zwischen dem Epicondylus lateralis und der Trochlea ossis femoris, mittig und im Winkel von 90° zur Längsachse des Knochens, eine monokortikale Bohrung. Durch diese wurde ein Kirschner-Bohrdraht bikortikal und senkrecht zur Femurachse mit einem manuellen Bohrgerät eingedreht, bis von der medialen Seite des Os femoris die Bohrdrahtspitze zu ertasten war (Abb. 3.2.c). Um eine entsprechende Stabilität zu gewährleisten, sollte die Spitze des Kirschner-Drahtes eine Gewindeumdrehung aus dem Knochen herausragen. Dieser distale Kirschner-Draht erhielt die Bezeichnung „P4“. Der Fixateur-Grundkörper konnte nun an P4 montiert werden und diente als Bohrschablone für die übrigen drei Bohrlöcher. Mit dem Bohrer wurde die korrekte Position der übrigen Bohrlöcher ertastet, anschließend erfolgte die Bohrung für den proximalen „P1“ (Abb. 3.2.d). Die Durchführung dieser zweiten Bohrung entsprach der von P4, wobei darauf geachtet werden musste, exakt parallel zu diesem zu bohren, um Spannungen des Fixateurs nach seiner Verschraubung zu vermeiden. Anschließend wurden die Kirschner-Drähte mit einer Drahtschneidezange auf ca. 4 cm gekürzt und die beiden inneren Kirschner-Drähte „P2“ und „P3“ auf gleiche Weise gesetzt und gekürzt. Auch hier musste darauf geachtet werden, dass die Implantation parallel zu den beiden erstimplantierten Kirschner-Drähten von statten ging (Abb. 3.2.e). Sämtliche Bohrungen erfolgten unter Spülung mit steriler isotoner Kochsalzlösung (Plastipur®, Fa. Fresenius Kabi, Bad Homburg, Deutschland), um eventuell entstandene Metall- und Knochenspäne zu entfernen und thermisch bedingte Knochennekrosen zu vermeiden.

Oberhalb des Fixateur-Querbalkens wurde ein zweiter Fixateur-Querbalken montiert, der als temporäres System zur Stabilisierung diente. Die Muskulatur zwischen P2 und P3 konnte nun vorsichtig, ohne das anliegende Periost zu verletzen, mit dem Raspatorium über eine Länge von ca. 4 mm vom Knochenschaft gelöst und von der Assistenz mit Hilfe zweier stumpfer Wundhaken vom zu sägenden Bereich auf Abstand gehalten werden. Mit dem elektrischen Bohrgerät und aufgesetztem runden Diamantsägeblatt (Stärke 0,4 mm, Durchmesser 16 mm, Fa. Proxxon) erfolgte die vollständige Durchtrennung des Femurschaftes mittig zwischen P2 und P3 und unter ständiger Spülung mit steriler Kochsalzlösung (Abb. 3.2.f). Auf diese Weise entstand ein Osteotomiespalt von ca. 0,5 mm Breite. Der dem Knochen zugewandte Fixateur-Querbalken wurde gelöst und in einem Abstand von zwei Fixateurbreiten zum Knochen fest verschraubt (Knochen-Querbalkenabstand: 10 mm). Als Maßstab dienten zwei Edelstahlplatten eines dritten Fixateur-Querbalkens, welche übereinander gestellt und direkt auf der Knochenoberfläche platziert den standardisierten Knochen-Querbalkenabstand gewährleisteten. Während dieses Vorgehens hielt der zweite montierte Fixateur-Querbalken die Knochenfragmente in ihrer anatomischen Position. Den Tieren der Kontrollgruppe wurde dieser anschließend entfernt

und überstehende Drahtreste mit der Drahtschneidezange möglichst nah am Fixateur-Querbalken gekürzt.

Zur Induktion der atrophen Pseudarthrose in der Versuchsgruppe entfernte man zunächst beide Querbalken. Dies ermöglichte das „Aufklappen“ des Knochens an der Osteotomie und nachfolgend die Kürettage des Knochenmarks ca. 4 mm proximal und distal vom Osteotomiespalt mittels einer feinen, chirurgischen Pinzette und einem Gazetupfer. Mit steriler, isotoner Kochsalzlösung erfolgte eine Spülung der Knochenmarkshöhlen. An beiden Osteotomieenden wurde mit einem elektrischen, monopolaren Thermokauter das Periost, jeweils 2 mm proximal und distal des Osteotomiespaltes thermisch zerstört (Abb. 3.2.g).

Nach den Manipulationen an den Osteotomieenden wurden diese durch das Anbringen des Fixateurs, wiederum im Abstand von zwei Fixateurbreiten (10 mm), möglichst genau reponiert (Abb. 3.2.h).

Zum Schluss wurde die Operationswunde mit steriler, isotoner Kochsalzlösung gespült und genäht. Das Muskelgewebe wurde mittels einer fortlaufenden Naht mit einem resorbierbaren Faden verschlossen (Vicryl® mit Nadel, 7-0 metric, Fa. St-Stevens-Woluwe, Belgien), die Hautnaht wurde mit drei bis vier Einzelknopfheften mit einem nichtresorbierbaren Faden (Prolene®, 3-0 metric, Fa. Ethicon GmbH) gesetzt (Abb. 3.2.i). Abschließend erfolgte eine Wunddesinfektion mit Iodlösung.

Die Gesamtdauer der Operation pro Tier betrug in der Kontrollgruppe etwa 35 Minuten und in der Versuchsgruppe etwa 45 Minuten.

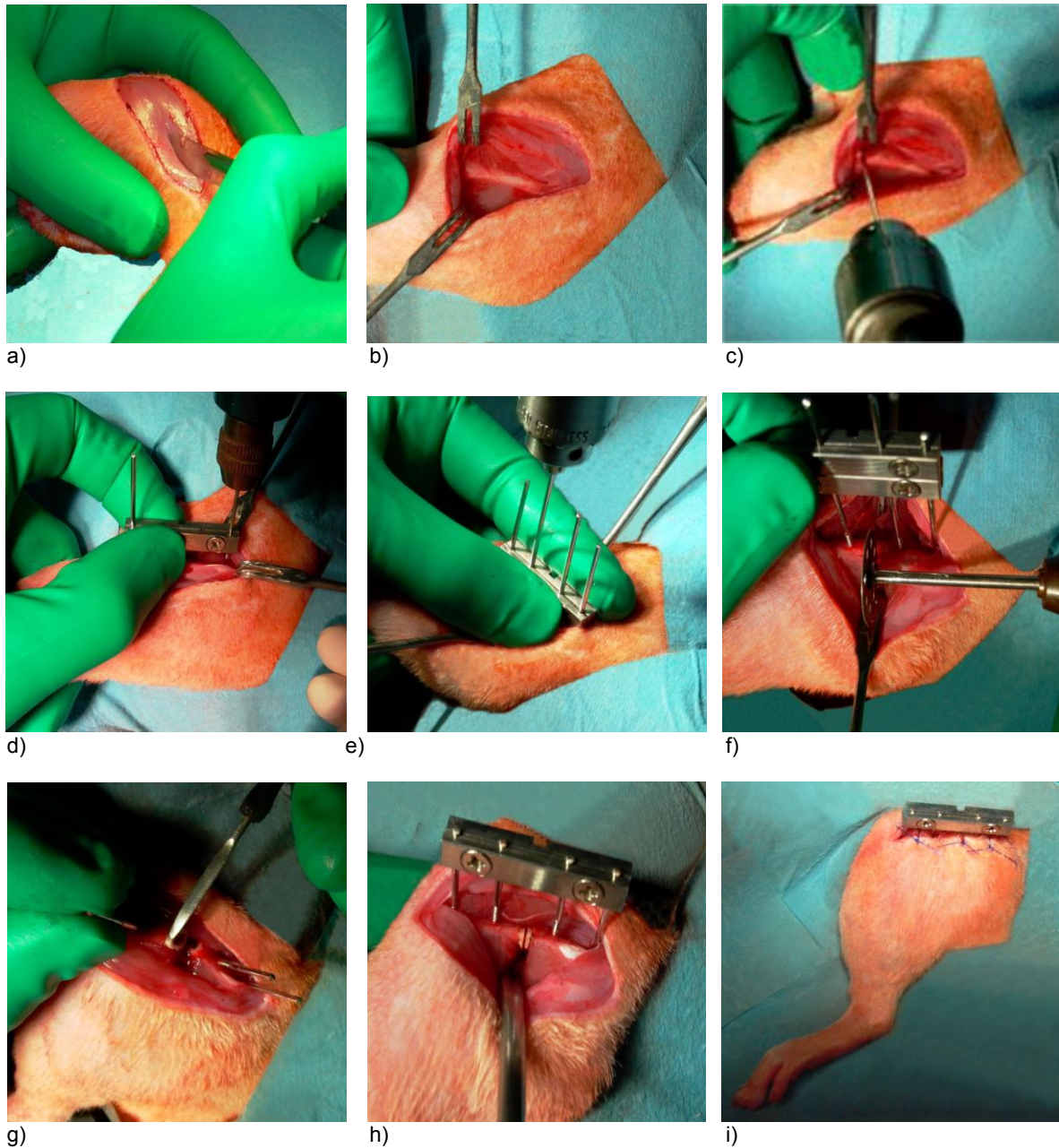


Abb. 3.2: Vorgehensweise bei der Osteotomie des Femurs

- a) Schnittinzision am linken Femur
- b) Freipräparieren des Os femoris
- c) Senkrechte Bohrung für Kirschner-Bohrdraht P4
- d) Bohrung für P1 mit Bohrführung
- e) Verankerung der Kirschner-Drähte P2 und P3
- f) Setzen der Osteotomie
- g) Kautern des Periosts (Versuchsgruppe)
- h) Aufsicht auf die Osteotomie post OP (Versuchsgruppe)
- i) Aufsicht auf das Rattenfemur mit montiertem Fixateur externe²⁰²

3.2.4 Nachsorge

An die Operation anschließend wurden mittels eines mobilen Röntgengerätes (Mobilett Plus[®], Fa. Siemens, München, Deutschland) Aufnahmen in 3 Ebenen vorgenommen. Die erste Aufnahme erfolgte in Bauchlage, mit leicht abgespreiztem Femur, in postero-anteriorem Strahlengang, die zweite in Rückenlage antero-posterior, die dritte Aufnahme wurde in sitzender Position ebenfalls antero-posterior geschossen. Die optimale Belichtung der Röntgenfilme (CRONEX 5 Medical X-Ray-Film[®], Fa. AGFA-Gevaert, Deutschland) kam bei einer Intensität von 52 kV, einer Belichtungsdauer von 1,8 mA/s und einem Abstand der Strahlenquelle zum Röntgenfilm von 60 cm zustande. Anhand der Röntgenbilder erfolgte die Kontrolle des korrekten Sitzes des externen Fixateurs anhand der physiologischen Ausrichtung der Fragmente. Zu beachten war, dass der rechteckige Querbalken des Fixateurs stets senkrecht von der Seite getroffen wurde, um den Osteotomiespalt ebenfalls exakt senkrecht zu treffen. Nur so konnte eine Überlagerung der Knochen vermieden und die Vergleichbarkeit der Röntgenbilder gewährleistet werden (Abb. 3.3).

Anschließend wurden die Ratten, um die Atmung zu erleichtern, in Brust-Bauchlage in ihren Käfig gelegt und dieser bis zu ihrem Erwachen unter eine Rotlichtlampe gestellt. Sie blieben solange unter Beobachtung, bis sie in der Lage waren, sich sicher zu bewegen. Eine Belastung der operierten Gliedmaße war den Tieren sofort nach der Operation möglich. Futter und Wasser wurde direkt nach der Operation ad libitum zur Verfügung gestellt. Sämtliche erhobenen Daten, wie Gewicht und Operationszeiten, wurden neben ihrem Eintrag im Laborbuch und auf der entsprechenden Tierkarteikarte auch in einer elektronischen Datenbank gespeichert.

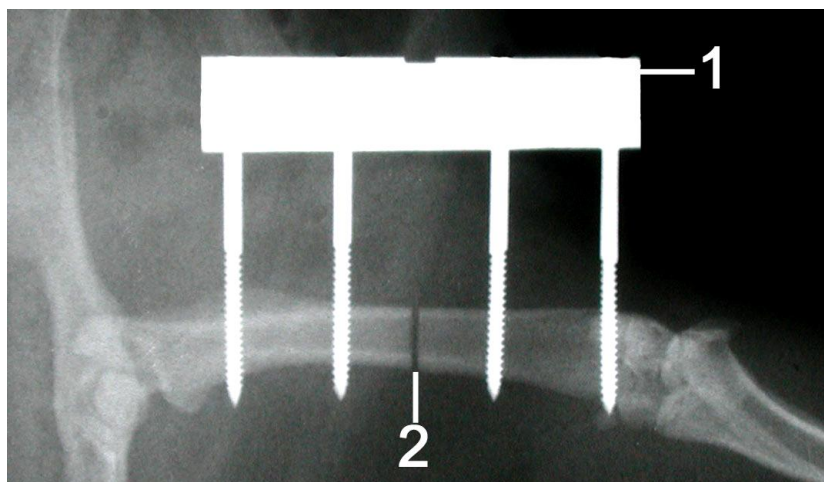


Abb. 3.3: Röntgenaufnahme des linken osteotomierten Femurs post operationem mit montiertem Fixateur externe (antero-posteriorer Strahlengang)

- 1 Fixateur-Grundkörper
- 2 Osteotomiespalt

3.2.5 Applikation von Expansionsmedium

Zwei Tage post operationem erfolgte bei sämtlichen Tieren der Versuchsgruppe die Applikation des Zellnährmediums (Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM), Fa. Invitrogen, Cambrex, Walkersville, USA) in den Osteotomiespalt (Punkt 3.2.1). Hierzu wurden die Tiere, wie unter Punkt 3.2.1 beschrieben, narkotisiert. Während der Medium-Applikation wurde die Narkose über die Gesichtsmaske aufrechterhalten. Zunächst wurden Gewicht und Körpertemperatur der Ratten ermittelt. In einer 1 ml Einmalspritze mit aufgesetzter Kanüle (24 G, Fa. BD Microlance™3, Irland) befanden sich 150 µl des Mediums. Nach gründlicher Desinfektion des gesamten Femurs und des Fixateursystems wurde der Femur in Höhe der Osteotomie mit der Kanüle punktiert. Zur Orientierung diente die sich im Fixateur-Querbalken mittig befindende Kerbe (Abb. 3.1). Mit der Kanülenspitze konnte der Osteotomiespalt vorsichtig ertastet und das Medium direkt in den Spalt injiziert werden. Nach erneuter Desinfektion wurden die Tiere wieder in ihren Käfig verbracht und bis zum Erwachen beobachtet.

3.3 Kontrolluntersuchungen der Versuchstiere

Während der Standzeit von acht Wochen erfolgte im wöchentlichen Abstand eine klinische Untersuchung, welche eine Beurteilung des Allgemeinzustandes der Ratten, eine Pflege der Operationswunde und eine röntgenologische Verlaufskontrolle mit einbezog.

Zur adspektorischen Prüfung des Allgemeinzustandes wurde das Verhalten im Käfig beobachtet, sowie das äußere Erscheinungsbild begutachtet. Anschließend wurden die Tiere per Inhalationsnarkose (Punkt 3.2.1) anästhesiert. Es folgte eine Gewichtskontrolle sowie die Pflege der Operationswunde und des Fixateursystems. Hierbei galt es zunächst Größe und Aussehen der Wunde zu beurteilen und zu notieren. Ebenso wurde dokumentiert, ob ggf. klinische Anzeichen für Entzündungen, wie Schwellung, Exsudation, Rötung oder lokale Hyperthermie an den Eintrittsstellen der Kirschner-Drähte auftraten, welcher Draht evtl. betroffen war und in welchem Ausmaß. Nach Sprühdesinfektion des Bereiches mit Iodlösung fand eine Reinigung des Wundbereiches mittels eines in Desinfektionslösung getränkten Wattestäbchens statt. Lose Exsudatkrusten wurden entfernt. Um jede noch so geringe Beweglichkeit des Osteotomiespalt auszuschließen, wurde der feste Sitz der Fixateur-Querbalken auf den Drähten sowie ihrer Schrauben geprüft. 14 Tage post operationem wurden die nichtresorbierbaren Einzelknopfhette der Hautnaht entfernt. Nach jeder Behandlung eines Tieres erfolgte die Desinfektion der verwendeten Instrumente und Geräte. Sämtliche erhobenen Daten wurden im Laborbuch, auf der entsprechenden Tierkarteikarte sowie in der elektronischen Datenbank gespeichert.

Eine weitere Kontrolle des Heilungsverlaufes fand mit Hilfe von Röntgenaufnahmen statt. Hierbei wurde der Fixateur auf korrekten Sitz überprüft und eine Dislokation der Knochenfragmente ausgeschlossen. Auch auf sich evtl. entwickelnde Osteolysen um die

Bohrdrähte herum musste geachtet werden. Stärkere Osteolysen führen zu einer Lockerung der Kirschner-Drähte, woraus Bewegung im Osteotomiespalt resultiert. Betroffene Tiere waren, auch aus Tierschutzgründen, aus der Studie auszuschließen und wurden euthanasiert (Punkt 5.2.1). Die Anfertigung der Röntgenbilder erfolgte während der Standzeit ebenfalls wöchentlich (analog zu Punkt 3.2.4). Da es technisch nicht möglich war, die Tiere bei diesem Vorgang weiterhin per Gesichtsmaske zu narkotisieren, mussten die Aufnahmen schnellstmöglich, solange noch die Narkosewirkung aus der Kontrolluntersuchung gegeben war, durchgeführt werden. Nach Beendigung der Aufnahmen wurden die Ratten wieder in ihre Käfige zurückgelegt, wo sie unter Beobachtung innerhalb weniger Minuten ihr Bewusstsein wiedererlangten.

3.4 Gewinnung des Untersuchungsmaterials

Nach der achtwöchigen Standzeit erfolgte im Zuge der achten wöchentlichen Kontrolle die Euthanasie der Versuchstiere. Die Kontrolle des Allgemeinzustandes und des Gewichtes sowie die Prüfung des Fixateursystems und der Wundverhältnisse erfolgten teils unter Kurzzeitanästhesie (analog zu Punkt 3.3) am lebenden Tier. Im Anschluss daran wurde den Tieren unter bestehender Isoflurananästhesie 5 ml einer Kaliumchloridlösung (1 M, KCl-Lösung[®], Fa. Fresenius Kabi) intrakardial injiziert, wodurch der sofortige Tod durch Herzstillstand herbeigeführt wurde. Der Atemstillstand wurde per Adspektion, der Herzstillstand per Palpation festgestellt. Eine sofortige post mortale Röntgenaufnahme schloss sich an (Punkt 3.2.4).

Anschließend folgte die Entnahme des linken Oberschenkelknochens mit montiertem Fixateur externe. Hierzu wurden die Hautschichten des linken Oberschenkels entfernt. Die Ligamenti um und in den Articulationes coxa und genus wurden durchtrennt, so dass das Os femoris samt Fixateursystem und umliegender Muskulatur vollständig entnommen werden konnte. Mit einer spitzen Präparierschere erfolgte die vorsichtige Entfernung des Muskelgewebes vom Knochen, so dass eine dünne Muskelschicht auf der Knochenoberfläche verblieb. Dabei war streng darauf zu achten, in Nähe des Osteotomiespalt kein Kallusgewebe zu verletzen. Um das Knochengewebe den sich anschließenden Fixierlösungen gut zugänglich zu machen, wurden die proximalen und distalen Enden des Femurs mit einem Diamantsägeblatt (Fa. Proxxon) abgetrennt. Nach kurzer Spülung des Knochens in steriler isotoner Kochsalzlösung wurde dieser mit einer Mullbinde umwickelt, in welche ein Zettel zur Kennzeichnung des Tieres eingelegt war. Es schloss sich eine viertägige Fixierung des Untersuchungsmaterials in einem ebenfalls mit der Tiernummer gekennzeichneten Glas an. Dieses enthielt ein Lösungsgemisch aus 37 %igem Formaldehyd (Fa. Merck, Darmstadt, Deutschland), 100 %igem Ethylalkohol (Fa. Herbeta-Arzneimittel, Berlin, Deutschland), Barbitol-Natrium-Puffer (pH 7,4, 0,1 M, Apotheke der Charité, Berlin, Deutschland) und Glukose (Fa. Merck). Da sich durch die Fixierung das Gewebe verfestigt, war es sinnvoll, den Fixateur während des gesamten Vorgangs am Knochen zu belassen. So konnte einer

Schädigung des Kallusgewebes durch eventuell bei der Fixatuerentfernung auftretende Kräfte vorgebeugt werden.

3.5 Erstellung der histologischen Präparate

Abhängig vom Auswertungsverfahren waren unterschiedliche Arbeitsabläufe durchzuführen.

3.5.1 Entkalken, Entwässern und Einbetten der Präparate

Zunächst wurde nach der viertägigen Fixierung das gesamte zu untersuchende Material etwa 20 Minuten unter fließendem Leitungswasser gewässert. Anschließend konnte der Fixateur externe vorsichtig entfernt werden, da sich das Gewebe durch die Fixierung soweit gefestigt hatte, dass bei vorsichtigem Umgang keine Schäden am Kallusgewebe zu erwarten waren. Die Verschraubung der Edelstahlplatten wurde gelöst und die Kirschner-Drähte vorsichtig aus dem Knochen herausgedreht.

3.5.1.1 Immunhistologie/ Histologie

Für die immunhistologische und histologische Auswertung war eine Vorbehandlung zur Entkalkung des Materials von drei Wochen notwendig, um die zu bestimmenden Gewebsstrukturen und Zellen optimal anfärben zu können. Zum Schluss erfolgte die Einbettung der Knochen in Paraffin.

Für die Entkalkung wurde der Knochen in Ethylendiamintetraessigsäure-Lösung (EDTA-Lösung, Entkalkungslösung, Herbeta-Arzneimittel, Berlin, Deutschland) verbracht, bis er eine weißliche Färbung annahm und weich wurde. Das sich in der Lösung befindliche EDTA bildet mit den Kalziumionen aus dem Knochen einen Komplex und fällt als EDTA-Kalzium-Präzipitat aus. Um eine möglichst vollständige Entkalkung zu gewährleisten, wurde das Präparat über drei Wochen in der EDTA-Lösung belassen, wobei zweimal wöchentlich ein Wechsel der Lösung vorgenommen wurde. Zur Beschleunigung des Vorgangs fand die Lagerung im Brutschrank bei 37°C statt. Während dieser Einwirkzeit befanden sich die Knochenpräparate mit reichlich Lösung bedeckt in luftdicht verschlossenen und gekennzeichneten Gläsern. Nach erfolgter Entkalkung wurde das Material ausführlich unter Leitungswasser vom EDTA gereinigt. Anschließend folgte eine dreitägige Entwässerung im Entwässerungsautomaten (Leica TP 1020, Fa. Leica Microsystems, Nussloch GmbH, Deutschland) nach dem Tauchprinzip von Romeis (1989)¹⁵⁸. Durch das stufenweise Vorgehen wurde einer Schrumpfung und Zerreißung des Gewebes entgegen gewirkt¹⁵⁸ und das Gewebe konnte sich besser mit dem Material verbinden, in welches es einzubetten war. Folgende Arbeitsschritte wurden, unter Verwendung von Ethanol-Aqua dest.-Mischungen, durchlaufen: 1 x 70 %iger Alkohol, 2 x 80%iger Alkohol, 2 x 96 %iger Alkohol, 3 x 100 %iger Alkohol, 2 x Xylol, 2 x Paraffin. Direkt nach Entnahme aus dem Entwässerungsautomaten musste das Präparat in Paraffin eingebettet werden. Hierzu wurde der entkalkte Oberschenkelknochen vorsichtig auf dem Gefäßboden einer passenden metallenen Gussform platziert, so dass die Längsachse der

Bohrgänge der Kirschner-Drähte parallel zur Ebene des Gefäßbodens zu liegen kam. Im Anschnitt sollte später die gesamte Länge eines Bohrkanals zu sehen sein. Mit in einem Paraffinbad (Leica EG 1120, Fa. Leica Mikrosystems, Wetzlar, Deutschland) erhitztem und verflüssigtem Paraffin (Paraplast Plus Tissue Embedding Medium, Fa. Tyco Healthcare, Mansfield, USA) wurde der Knochen übergossen. Die Kennzeichnung des Materials erfolgte über ein beschriftetes Filterpapier für histologische Techniken, welches auf die Oberfläche des noch flüssigen Paraffins gelegt und bei dessen Aushärtung dort eingeschlossen wurde. Zur Aushärtung wurde die befüllte Gussform auf eine Kühlplatte (- 20°C, Kühlplatte EG 1130, Fa. Leica Mikrosystems Wetzlar, Deutschland) verbracht. War der entstandene Block abgekühlt, konnte die Gussform entfernt werden.

3.5.1.2 Histomorphometrie

Im Rahmen der histomorphometrischen Auswertung wurde u. a. der mineralisierte Knochenanteil eines Präparates bestimmt, daher konnten die entkalkten Knochen für dieses Auswertungsverfahren nicht herangezogen werden. Für dieses Untersuchungsmaterial war das Einbetten in einen polymerisierenden Kunststoff vorgesehen, welcher speziell für die Darstellung von mineralisiertem Gewebe unter dem Lichtmikroskop entwickelt wurde.

Nach der Fixierung und der Spülung unter Leitungswasser fand die Entwässerung manuell in einer aufsteigenden Alkoholreihe¹⁵⁸ statt (7 Tage in 70 %igem Alkohol, 14 Tage in 80 %igem Alkohol, 14 Tage in 96 %igem Alkohol und 21 Tage in 100 %igem Alkohol). Die Alkoholverdünnungen wurden aus 100 %igem Ethanol unter Zumischung von Aqua dest. hergestellt. Da die Alkohollösungen während der Entwässerungsphase durch Rückstände, Wasser und Gewebefett verunreinigt wurden, erfolgte eine wöchentliche Erneuerung der Lösungen.

Als letzter Schritt schloss sich eine vierstündige Entfettung des Präparates in Xylol (Xylene[®], Fa. J. T. Baker, Deventer, Niederlande) an. Um eine optimale Durchtränkung zu erreichen und somit die Gewebe den später folgenden Färbelösungen optimal zugänglich zu machen, wurde das luftdicht verschlossene und beschriftete Glas während der Entwässerung und Entfettung auf einem Schüttler (HS 501 digital, Fa. IKA Labortechnik, Staufen, Deutschland) gelagert.

Es folgte das Einbetten des Materials in einem Polymerisationssystem auf der Basis von Methylmetacrylat (Technovit[®] 9100 NEU, Fa. Haraeus Kulzer GmbH & Co. KG, Wehrheim, Deutschland). Durch ein Katalysatorensystem aus Peroxid und Amin wird unter Ausschluss von Sauerstoff die Polymerisation vorangetrieben. Die Zusatzkomponente PMMA (polymerisiertes Methylmetacrylat) und ein Regler sorgen für einen gesteuerten Ablauf der Polymerisation. Die Anmischung der hierfür benötigten Lösungen erfolgte nach Herstellerangaben. Zunächst musste der Knochen zwei Tage bei Raumtemperatur in Präinfiltrationslösung (Fa. Haraeus Kulzer GmbH & Co. KG, Wehrheim, Deutschland)

eingelegt werden. Anschließend erfolgte für sieben Tage bei 4°C ein Lagern in Infiltrationslösung (Fa. Haraeus Kulzer GmbH & Co. KG, Wehrheim, Deutschland). Diese Schritte waren notwendig, um eine komplette Durchtränkung des Präparates mit dem Kunststoff zu gewährleisten. Erst danach konnte der Knochen in den polymerisierenden Kunststoff eingebettet werden. Nach Anmischen der Technovit-Lösung wurde diese vorsichtig, ohne Blasen zu bilden, in zylinderförmige Einbettförmchen (Durchmesser 5 cm, Höhe 2 cm) gegossen und der Oberschenkelknochen auf dem Gefäßboden so platziert, dass im später folgenden Anschnitt die gesamte Länge eines Bohrkanals zu sehen ist.

Ein kleines, mit der Tiernummer beschriftetes Filterpapier zur Kennzeichnung des Präparates wurde seitlich eingelegt. Nach luftdichtem Verschluss der Förmchen härtete der Kunststoffblock innerhalb von 24 Stunden bei ca. 0°C auf Eis aus. Auf diese Weise konnte die bei der exogenen Reaktion der Polymerisation entstehende Wärme optimal abgeleitet werden. Danach wurde das auspolymerisierte Präparat aus der Form entnommen. Um beim Schneiden am Hartschnittmikrotom den Block besser einspannen und positionieren zu können, erfolgte das Anbringen eines Sockels aus härterem Kunststoff. Hierzu wurde der auspolymerisierte Block mit einem Klebeband ummantelt, welches ca. 1 cm überstand. In diesen entstandenen Hohlzylinder wurde der zweite Kunststoff (Technovit® 3040, Fa. Haraeus Kulzer GmbH & Co. KG) eingegossen und bei Raumtemperatur ausgehärtet.

3.5.2 Schneiden der Präparate

Nach der vollständigen Aushärtung des Paraffins bzw. der Kunststoffe folgte das Schneiden des Gewebeblocks parallel zur Knochenlängsachse. Die längs angeschnittenen Bohrlöcher der Kirschner-Drähte sollten sichtbar sein, so dass im später angefärbten Präparat eine vollständige Einsicht in den Osteotomiespalt gegeben war. Zur Auswertung kamen nur Schnitte, die einen komplett angeschnittenen Markraum aufwiesen.

3.5.2.1 Immunhistologie/ Histologie

An der Schnittseite, sowie den umliegenden Seiten des Paraffinblocks wurde das überschüssige Paraffin mit einem Messer entfernt. So konnten die Präparate auf möglichst schmale Objektträger aufgezogen werden, was das spätere Färben erleichterte. Anschließend musste der Paraffinblock mit der Schnittseite auf einen Eisblock gelegt werden, da sich das Paraffin durch die Kälteeinwirkung etwas zusammenzieht und der Knochen auf diese Weise besser zu schneiden ist. Nach ausreichender Kühlung wurde der Block am Rotationsmikrotom (Leica RM 2125, Fa. Leica Mikrosystems, Wetzlar, Deutschland) eingespannt. Mit Schnitten von ca. 10 µm Dicke arbeitete man sich schrittweise bis zur gewünschten Ebene vor, um dort Serienschnitte mit einer Stärke von 4 µm zu entnehmen. Nach einigen Schneidevorgängen musste der Block erneut auf Eis gekühlt werden. Die entstandenen Schnittpräparate wurden in ein Wasserbad (20°C) verbracht um eventuell entstandene Falten mit Hilfe eines Pinsels zu glätten. In einem

zweiten Wasserbad (45°C) (Leica HI 1210, Fa. Leica Microsystems) konnten auch feinste Fältchen geglättet werden, da sich Paraffin bei höheren Temperaturen etwas ausdehnt. Im Anschluss daran wurden die Schnitte auf Objektträger aufgezogen und bei 37°C für zwei Tage im Brutschrank getrocknet, um sie auf den Objektträgern zu fixieren.

3.5.2.2 Histomorphometrie

Der überschüssige Kunststoff eines Technovit-Blockes wurde mittels einer Schleifmaschine (Phoenix 3000, Fa. EXAKT Apparatebau GmbH, Norderstedt, Deutschland) entfernt. Die Schnittseite musste soweit herunter geschliffen werden, bis die gewünschte Schnittebene erreicht war. Anschließend konnte das Material in das Hartschnittmikrotom (Leica SM 2500S, Fa. Leica Mikrosystems) eingespannt werden. Unter ständiger Benetzung mit einer Wasser-Seifenlösung erfolgte die Anfertigung von 6 µm dicken Schnitten. Diese wurden vorsichtig abgenommen und auf einen mit 70 %igem Ethanol benetzten Objektträger gezogen. Unter Zugabe eines Tropfens Streckflüssigkeit, bestehend aus Alkohol und Butoxyethylacetat im Verhältnis 3:2, konnten die Schnitte mittels eines Pinsels geglättet werden. Danach erfolgte eine luftblasenfreie Abdeckung mit Krisolfolie (Polyethylen-Schutzfolie). Mehrere Schnitte wurden übereinander gestapelt in eine Presse gelegt, wobei Filterpapier die einzelnen Schnitte separierte. Unter Druck fand innerhalb von zwei Tagen die Trocknung der Schnitte im Brutschrank bei 60°C statt.

3.5.3 Histologische Färbungen

Für die Auswertungen der Präparate wurden unterschiedliche Färbungen verwendet:

Immunhistologie:

- a) Nachweis von α -SMA (α -Smooth-Muscle-Actin) mit Hilfe des Vectastain-ABC-Systems zur Darstellung der glatten Muskulatur der Gefäße

Histologie:

- a) Osteoklastendarstellung mit Hilfe der TRAP-Färbung (Tartrate-Resistant Acid Phosphate)
- b) Übersichtsfärbung mit Movat Pentachrom

Histomorphometrie:

- a) Färbung mit Safranin Orange/ von Kossa zur Differenzierung und Quantifizierung von mineralisierten und nichtmineralisierten Bereichen
- b) Färbung mit Movat Pentachrom zur Quantifizierung der Knochen- und Bindegewebsflächen am entkalkten Präparat (Bezugsflächenbestimmung zur Berechnung der Osteoklasten- und Gefäßdichte)

3.5.3.1 Immunhistologie

Nachweis von α -SMA

Mit Hilfe des Vectastain-ABC-Systems (Vectastain ABC Kit®, Fa. Linaris, Wertheim/ Deutschland) (Abb. 3.4) ist es möglich, bestimmte gewünschte Strukturen, wie in diesem Falle α -SMA (Abb. 3.5.a), mit einer intensiven Färbung zu kennzeichnen. Es arbeitet nach dem Prinzip der Antigen-Antikörper-Reaktion. An den zu färbenden Geweben befinden sich bestimmte Oberflächenstrukturen, die Antigene (AG), an welche sich im Zuge der Färbung unkonjugierte Primärantikörper (Primär-AK) binden. Diese Bindung erfolgt nach dem Schlüssel-Schloss-Prinzip, d.h. an ein Antigen kann nur der passende Antikörper binden. Daher war es hier notwendig, einen rattenspezifischen Primärantikörper zu wählen, denn die Verwendung von Primärantikörpern aus anderen Tierspezies hätte zu keinem Färbeergebnis geführt. Auf diese Weise werden die Strukturantigene zunächst markiert. Im Vorversuch musste die optimalste Konzentration des Primär-AK ermittelt werden, wobei die Verdünnung der Lösung mittels eines Puffers erfolgte (Dako Cytomation Antibody Diluent, Fa. Dako Cytomation, Via Real, USA). Die besten Färbeergebnisse entstanden bei einer Konzentration von 1:100 (Primär-AK : Puffer). Nach der Komplexbildung von AG und Primär-AK wurde eine Lösung eines Sekundärantikörpers, welcher mit Biotin (Vitamin H) konjugiert war (biotinylierter Sekundär-AK), zugegeben. Die Bindung dieses Sekundär-AK an den Primär-AK markierte den zuvor entstandenen Komplex. Da die Bindung an den Primär-AK durch das Prinzip der Antigen-Antikörper-Reaktion vonstatten geht, musste der Sekundär-AK einer anderen Tierspezies entstammen. Das Vectastain-ABC-System (ABC = Avidin-Biotin-Complex) ist ein universell einsetzbares, äußerst sensitives Detektionssystem für immunhistologische Verfahren. Hierbei spielt die hohe Affinität von Avidin, ein aus Hühnereiweiß gewonnenes Protein, zu Biotin eine große Rolle. Avidin besitzt vier Bindungsstellen für Biotin, somit lässt sich das Avidin des Nachweissystems (Tertiärreagenz = Avidin + biotinyliertes Enzym) gut an den biotinylierten Sekundär-AK koppeln. An die Tertiärreagenz ist wiederum das Enzym Alkalische Phosphatase gebunden. Nach Zugabe einer Substrat-Chromogen-Lösung, setzt diese Alkalische Phosphatase das Substrat (hier Neufuchsin) zum roten Chromogen um und sorgt auf diese Weise für eine Färbung der markierten Strukturen.

Bevor die eigentliche Markierung der Gewebsantigene mit Hilfe des Vectastain-ABC-Systems erfolgen konnte, musste das Präparat mittels Entparaffinierung und Rehydrierung (Protokoll 1) den Färbelösungen zugänglich gemacht werden. Anschließend folgte eine Behandlung mit einem Spülpuffer, wodurch die elektrostatische Aufladung der Proteine während der immunhistochemischen Reaktion verhindert wurde.

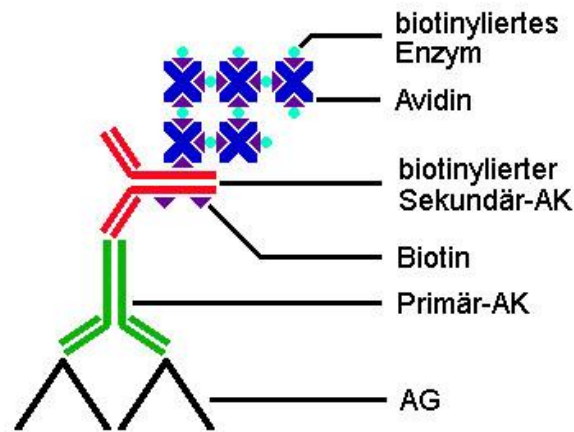


Abb. 3.4: Schematische Darstellung des Vectastain-ABC-Systems

Mittels Zugabe eines Normalserums wurden unspezifische Bindungen an Gewebsproteinen abgesättigt und somit eine Hintergrundfärbung unterdrückt. Dieses Normalserum musste aus derselben Tierspezies stammen wie der sekundäre Antikörper.

Nun konnte die Anwendung des Vectastain-ABC-Systems erfolgen. Um den für die chemische Reaktion der Alkalischen Phosphatase mit dem Substrat notwendigen pH-Wert der Lösung zu erhalten, wurde mit einem Chromogen-Puffer zwischengespült. Anschließend erfolgte die Inkubation in Substrat. Dieser Schritt musste unter sich ständig wiederholender mikroskopischer Kontrolle (Axioskop 2, Fa. Zeiss, Jena, Deutschland) durchgeführt werden, um eine optimale Färbung zu erzielen. Der Hintergrund stellt sich letztendlich braun dar, die gefärbten Strukturen hellrot.

Um sich im Präparat besser orientieren zu können, wurde eine Kern-Gegenfärbung mit Hämalaun nach Mayer (Merck, Darmstadt, Deutschland) durchgeführt.

Zum Schluss wurden die Präparate luftdicht mit dünnen Deckgläsern und einem speziellen Klebstoff (Vitroclud[®], Einschlussmittel für mikroskopische Technik, Fa. R. Langenbrink, Emmendingen, Deutschland) eingedeckelt.

Eine Negativkontrolle erfolgte anhand von Präparaten, welche das nachzuweisende Antigen nicht enthielten. Erwartungsgemäß wiesen diese Präparate keine intensiv rot gefärbten Gewebe auf, eine falsch positive Färbung konnte auf diese Weise ausgeschlossen werden. Weiterhin wurde eine Positivkontrolle mit Hilfe eines Organpräparates vorgenommen, bei welchem offensichtlich war, dass es die gewünschten Strukturen mit dem Antigen enthielt. So wurde sichergestellt, dass die entsprechenden Gewebe angefärbt wurden und die Färbung erfolgreich war.

Protokoll 1: Vorgehensweise α -SMA-Färbung

- | | |
|---|---------------------|
| a) Entparaffinierung in Xylol | 2 x je 10 Minuten |
| b) Rehydrierung in absteigender Alkoholreihe | je 2 Minuten |
| 2 x 100 %iger Alkohol | |
| 1 x 96 %iger Alkohol | |
| 1 x 80 %iger Alkohol | |
| 1 x 70 %iger Alkohol | |
| 1 x Aqua dest. | |
| c) Spülung in PBS-Puffer (90 % Aqua dest. +
10 % Phosphatpuffer-Lösung, pH 7,2,
Fa. Waldeck GmbH, Münster, Deutschland) | 2 x je 5 Minuten |
| d) Inkubation mit 1 %igem Normalserum (Spezies Maus,
Fa. Vector [®] Laboratories, Burlingame, USA) | 20 Minuten bei RT |
| e) Inkubation mit Primär-AK (Spezies Ratte,
Fa. Biologo, Kronshagen, Deutschland) | über Nacht bei 4°C |
| f) Spülung in PBS-Puffer | 2 x je 5 Minuten |
| g) Inkubation mit biotinyliertem Sekundär-AK
(Spezies Maus, Fa. Vector [®] Laboratories) | 30 Minuten bei RT |
| h) Spülung in PBS-Puffer | 2 x je 5 Minuten |
| i) Inkubation mit AB-Komplex
(Alkaline Phosphate Standard Kit AK 5000,
Fa. Vector [®] Laboratories) | 50 Minuten bei RT |
| j) Spülung in PBS-Puffer | 2 x je 5 Minuten |
| k) Spülung in Chromogen-Puffer
(pH 8,2) | 2 x je 5 Minuten |
| l) Inkubation mit Substrat
(Red Alkaline Phosphate Substrat Kit 1,
Fa. Vector [®] Laboratories) | 5-30 Minuten bei RT |
| m) Spülung in PBS-Puffer | kurz |
| n) 1) Spülung in Aqua dest. | kurz |
| 2) Tauchbad in Häkalaun
(Häkalaunlösung, Fa. Merck, Darmstadt,
Deutschland) | 3-6 x kurz |
| 3) Spülung in Aqua dest. | kurz |
| 4) Spülung unter Leitungswasser | 1-2 Minuten |
| 5) Fixierung in aufsteigender Alkoholreihe | max. je 1 Minute |
| 1 x 70 %iger Alkohol | |
| 1 x 80 %iger Alkohol | |
| 1 x 96 %iger Alkohol | |
| 2 x 100 %iger Alkohol | |
| 6) Entfettung in Xylol | 2 x je 5 Minuten |

3.5.3.2 Histologie

TRAP-Färbung

Die TRAP (Tartrate-Resistant Acid Phosphate) -Färbung (Protokoll 2) dient zur Darstellung der Osteoklasten (Abb. 3.5.b). Dabei wird die für die Osteoklasten charakteristische lysosomenständige Tartrat-resistente saure Phosphatase angefärbt. Nach dieser Färbung stellen sich die Zellen positiv dar, d.h. das Zytoplasma färbt sich rosarot, die Zellkerne hellblau. Durch eine Gegenfärbung mit Methylgrün ergab sich ein guter Farbkontrast, wodurch die Osteoklasten hervorgehoben wurden.

Die vor dem Färbevorgang notwendige Entparaffinierung und Rehydrierung der Präparate erfolgte analog zur α -SMA-Färbung im immunhistologischen Verfahren (Protokoll 1). Zur Herstellung des TRAP-Puffers wurde ca. 1 Liter Aqua dest. auf 3,28 g Natrium-Acetat (Fa. Merck, Darmstadt, Deutschland) und 46,01 g Natrium-Tartrat (Fa. Merck) gegeben, bis sich ein pH-Wert von 5,0 einstellte (Messung mit pH-Meter (inoLab[®], pH Level 1, Fa. WTW, Weilheim, Deutschland)). Nach der Spülung folgte eine Inkubation in TRAP-Färbelösung. Diese wurde durch Vermengung von 200 ml TRAP-Puffer mit 40 mg Naphtol AS-MIX Phosphat (N5000, Fa. Sigma-Aldrich, Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland), 4 ml N-N-Dimethylformamid (D4551, Fa. Sigma-Aldrich, Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland), 240 mg Fast Red Violett LB Salt (F3381, Fa. Sigma-Aldrich, Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland) und 2 ml Triton X (Fa. Sigma-Aldrich, Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland) hergestellt. Zur Erzielung des Farbkontrastes folgte eine Gegenfärbung mit Methylgrün (CERTSTAIN[®], Fa. Merck, Darmstadt, Deutschland).

Aufgrund bestehender Unverträglichkeit des Methylgrüns mit dem gängigen Einschlussmittel Vitroclud[®], wurden die Präparate nach mikroskopischer Kontrolle des Färbeergebnisses mit erwärmter Gelatine (Kaisers Glyceringelatine, Fa. Merck) als Verschlussmittel und einem Deckgläschen luftdicht konserviert.

Protokoll 2: Vorgehensweise TRAP-Färbung

- | | |
|-----------------------------------|------------------------|
| a) Entparaffinierung | |
| b) Rehydrierung | |
| c) Spülung in 200 ml TRAP-Puffer | 10 Minuten |
| d) Inkubation in TRAP-Färbelösung | 2 - 4 Stunden bei 37°C |
| e) Spülung in Aqua dest. | kurz |
| f) Eintauchen in Methylgrün | 10 x kurz |
| g) Spülung in Aqua dest. | 2 x kurz |
| h) Eindeckeln mit Gelatine | |

Movat Pentachrom-Färbung

Anhand der Übersichtsfärbung nach Movat Pentachrom (Abb. 3.5.c) (Protokoll 3) erfolgte die quantitative Erfassung des Knochen- und Bindegewebes in der computergestützten Bildanalyse (Punkt 3.6.4.1). Die Movat Pentachrom-Färbung färbt Knochengewebe

leuchtend gelb, nichtmineralisierter Knorpel wird grün angefärbt, das Bindegewebe färbt sich in verschiedenen Blau- und Grüntönen und Zellkerne stellen sich blauschwarz dar. Diese Färbung erfolgte am entparaffinierten Präparat, da die hier computergestützt bestimmte Knochen- und Bindegewebsfläche als Referenz zur Verteilung der Osteoklasten (Punkt 3.6.3.2.) bzw. der Gefäße (Punkt 3.6.3.3.) herangezogen wurde. Die quantitative Bestimmung der Knochen- und Bindegewebsflächen, sowie die Zählungen der Osteoklasten und der Gefäße mussten an Präparaten ein und desselben Tieres erfolgen, um stimmige Werte zu erhalten. Weiterhin diente diese übersichtliche Färbung den deskriptiven Auswertungen.

Die Vorbehandlung der Schnitte erfolgte analog zur α -SMA-Färbung im immunhistologischen Verfahren. Der verwendete alkalische Ethylalkohol wurde durch die Gabe von 10 ml 25 %igem Ammoniak (Fa. Merck) auf 180 ml 96 %igen Ethylalkohol hergestellt. Für Weigerts Eisenhämatoxylin wurden Eisenhämatoxylin A und Eisenhämatoxylin B (Dicision Chroma[®], Fa. Waldeck GmbH) im Verhältnis 1:1 auf eine entsprechende Menge Aqua dest. gegeben, so dass sich eine 1 %ige wässrige Lösung ergab.

Protokoll 3: Vorgehensweise Movat Pentachrom-Färbung

- | | |
|--|------------------|
| a) Entparaffinierung | |
| b) Rehydrierung | |
| c) Spülung in Aqua dest. | 2 Minuten |
| d) Färbung in 1 %iger Alcianblau-Lösung
(8GX, Fa. Sigma-Aldrich) | 10 Minuten |
| e) Spülung unter Leitungswasser | 5 Minuten |
| f) Tauchbad in alkalischem Ethylalkohol | 60 Minuten |
| g) Spülung unter Leitungswasser | 10 Minuten |
| h) Spülung in Aqua dest. | kurz |
| i) Färbung in Weigerts Eisenhämatoxylin | 10 Minuten |
| j) Spülung in Aqua dest. | kurz |
| k) Spülung unter Leitungswasser | 15 Minuten |
| l) Färbung in Brillant Crocein-Säurefuchsin
(Brillantcrocein R, Dicision Chroma [®] ,
Fa. Waldeck GmbH) | 10 Minuten |
| m) Spülung in 0,5 %iger Essigsäure | kurz |
| n) Tauchbad in 5 %iger Phosphormolybdänsäure
(Fa. Sigma-Aldrich, Seelze, Deutschland) | 15 Minuten |
| o) Spülung in 100 %igem Ethylalkohol | 3 x je 5 Minuten |
| p) Färbung in Saffron du Gâtinais
(Dicision Chroma [®] , Waldeck GmbH) | 60 Minuten |
| q) Spülung in 100 %igem Ethylalkohol | 3 x je 1 Minute |
| r) Entfettung in Xylol | 2 x je 5 Minuten |
| s) Eindeckeln mit Vitroclud [®] | |

3.5.3.3 Histomorphometrie

Safranin Orange/ von Kossa-Färbung

Die Färbung mit Safranin Orange/ von Kossa (Abb. 3.5.d) (Protokoll 4) diente in der computergestützten Bildanalyse (Punkt 3.6.4.1.) zur Differenzierung und Quantifizierung von mineralisierten und nichtmineralisierten Geweben. Knochen und mineralisierter Knorpel stellen sich schwarz dar, nichtmineralisierte Gewebe, wie Bindegewebe, Muskulatur und nichtmineralisierter Knorpel, in unterschiedlich intensiven Rottönen.

Nach der zweitägigen Trocknung bei 60°C im Brutschrank mussten die Anschnitte zunächst von der Filterfolie befreit und in 2-Methoxyethylacetat (MEA) entplastet werden, um den Kunststoff aus dem Gewebe zu lösen und dieses den Färbelösungen zugänglich zu machen.

Protokoll 4: Vorgehensweise Safranin Orange/ von Kossa-Färbung

- | | |
|---|-------------------|
| a) Tauchbad in 2-Methoxyethylacetat (MEA)
(Fa. Merck) | 3 x je 30 Minuten |
| b) Rehydrierung in absteigender Alkoholreihe
2 x 100 %iger Alkohol
1 x 96 %iger Alkohol
1 x 80 %iger Alkohol
1 x 70 %iger Alkohol | je 2 Minuten |
| c) Spülung in Aqua dest. | 2 Minuten |
| d) Färbung in 3 %iger wässriger Silbernitratlösung | 5 Minuten |
| e) Spülung in Aqua dest. | 3 x kurz |
| f) Reduktion in Natrium-Formaldehydlösung | 2 Minuten |
| g) Spülung unter Leitungswasser | 10 Minuten |
| h) Fixierung in 5 %igem Natriumthiosulfat | 5 Minuten |
| i) Spülung unter Leitungswasser | 10 Minuten |
| j) Spülung in Aqua dest. | kurz |
| k) Entwässern in aufsteigender Alkoholreihe
2 x 96 %iger Alkohol
2 x 100 %iger Alkohol | kurz |
| l) Entfettung in Xylol | 2 x je 5 Minuten |
| m) Eindeckeln mit Vitroclud® | |

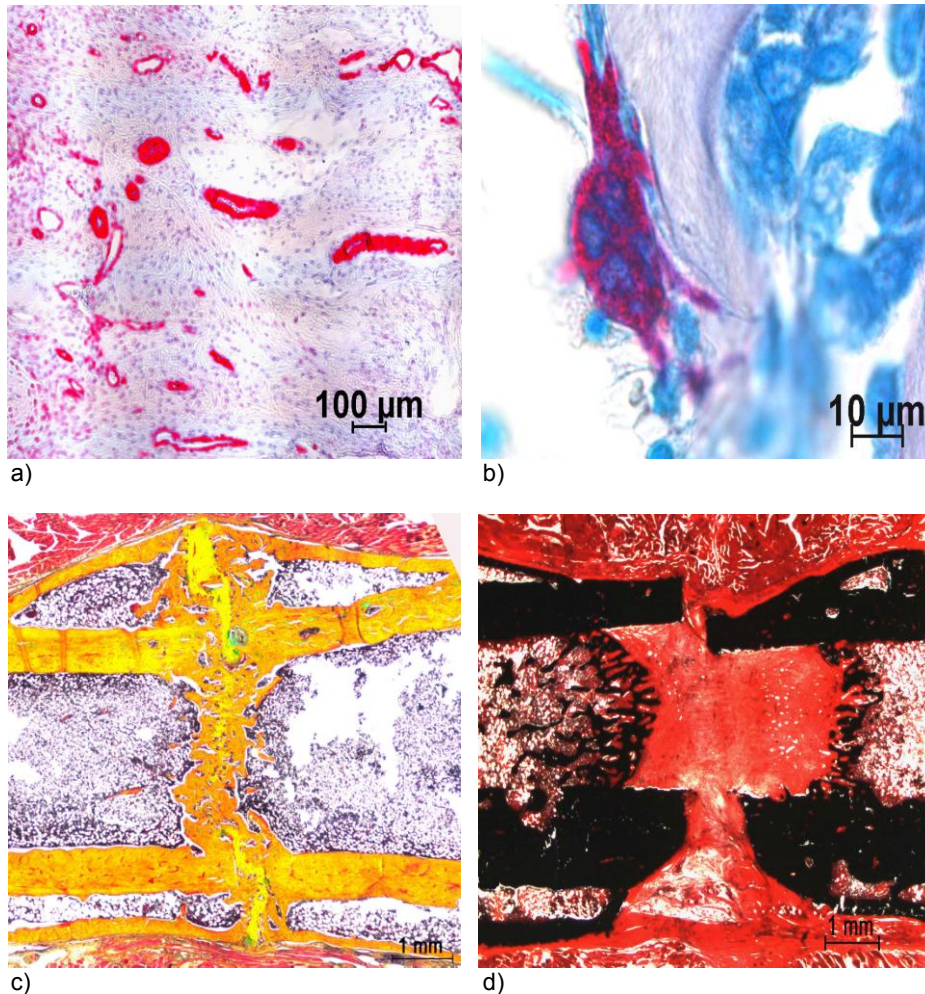


Abb. 3.5: Histologische Färbungen

- a) Darstellung von Gefäßen (leuchtend rot angefärbte Strukturen) mit Hilfe der α -SMA-Färbung
- b) Darstellung eines Osteoklasten (leuchtend violett angefärbte Struktur mit innenliegenden blauen Zellkernen) mit Hilfe der TRAP-Färbung
- c) Movat Pentachrom-Färbung (Übersichtsdarstellung der ROI)
- d) Safranin Orange/ von Kossa-Färbung (Übersichtsdarstellung der ROI)

3.6 Auswertungen

3.6.1 Festlegung einer Region of Interest (ROI)

Bevor mit den Auswertungen begonnen werden konnte, war es notwendig, eine **Region Of Interest** (ROI, Region des Interesses) festzulegen. Nur dieser standardisierte und für jedes Präparat gültige Bereich wurde ausgewertet, um eine Vergleichbarkeit der Präparate zu gewährleisten.

Es handelte sich um die zwischen den beiden inneren Kirschner-Drähten gelegene Osteotomieregion. Durch die bei der Erstellung der Präparate gewählte Schnittrichtung entlang der Knochenlängsachse stellte sich die Kortikalis als vier langgezogene Rechtecke dar. Die sich direkt gegenüber liegenden kurzen Seiten grenzten an den vertikal verlaufenden Osteotomiespalt im Zentrum des Schnittbildes bzw. der ROI. Als Ausgangspunkt wurde eine Gerade senkrecht durch die Mitte des Osteotomiespalts gezogen (Abb. 3.6: gestrichelte Linie). Von dieser ausgehend wurden zwei Parallelen festgelegt, die

die ROI in ihrer Breite begrenzten. Sie befanden sich 3,5 mm proximal bzw. distal der Ausgangsgeraden (Abb. 3.6: gepunktet-gestrichelte Linien), wodurch die Breite der ROI auf 7 mm festgelegt war. So sollte nur der osteotomiespaltnahe Bereich zur Auswertung herangezogen werden. Horizontal verlaufend befand sich zwischen den Kortikalisrechtecken der Knochenmarksraum. Eine in Längsrichtung mittig durch diesen gedachte Linie trennt den Knochen in seine laterale (Kortikalis I und II) und mediale (Kortikalis III und IV) Seite, wobei der Oberschenkelkopf (Caput ossis femoris) als Orientierung zur Kennzeichnung der medialen Seite diente. Die Einteilung in den proximalen (Kortikalis I und III) und distalen (Kortikalis II und IV) Abschnitt des Knochens lieferte der Osteotomiespalt.

So erhielt das proximale, laterale Kortikalisrechteck die Nummer I (Abb. 3.6: K I), das distale, laterale Kortikalisrechteck die Nummer II (Abb. 3.6: K II), das proximale, mediale Kortikalisrechteck (dem Oberschenkelkopf am nächsten) die Nummer III (Abb. 3.6: K III) und das distale, mediale Rechteck die Nummer IV (Abb. 3.6: K IV). Diese Bezeichnungen wurden in sämtliche Auswertungen übernommen, so dass jederzeit eine exakte Zuordnung möglich war. Direkt an die periostalen Kortikalisbereiche angrenzend stellte sich periostales Kallusgewebe dar. Die Höhe der ROI legte sich durch die Breite des weichen, periostalen Kallus fest (Abb. 3.6: gepunktete Linien) und variierte von Tier zu Tier.

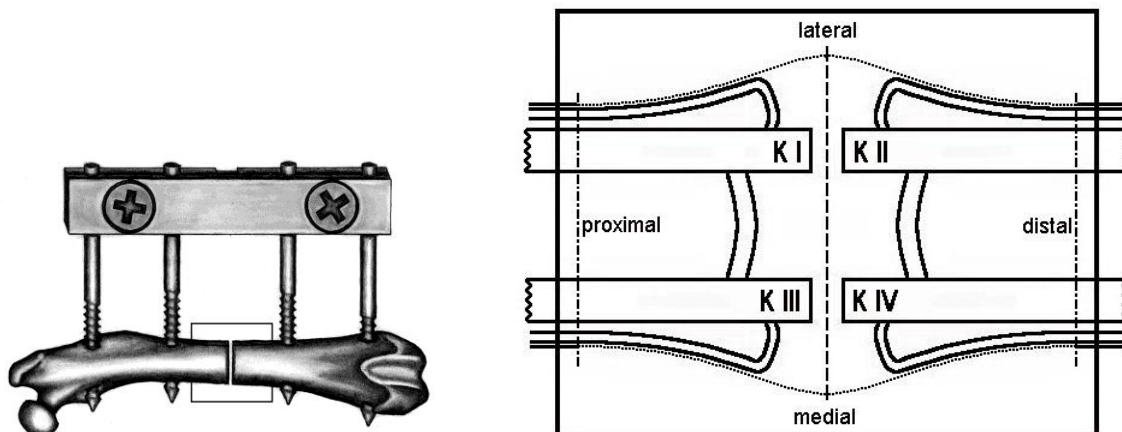


Abb. 3.6: Schematische Darstellung der ROI

Die ROI musste im Rahmen nachfolgender Auswertungen in weitere Teilflächen, die Sub-ROIs, unterteilt werden. Die erste Sub-ROI begrenzte den Osteotomiespalt. Sie zog sich im Spaltbereich von den Außengrenzen des periostalen Gesamtkallus direkt an den Schnittenden der Kortikalis vorbei, welche durch eine Gerade verbunden wurden (Abb. 3.7: gelbe Linien). Für jedes der vier Kortikalisrechtecke wurde eine weitere Sub-ROI definiert, um eine genaue Lagezuordnung (medial, lateral, proximal, distal) zu erhalten. Deren Außenbegrenzung erfolgte durch den periostalen Gesamtkallus und der distalen bzw. proximalen 3,5 mm-Parallele (Abb. 3.6: gepunktet-gestrichelte Linien). Weitere Begrenzungen bildeten die Mittelgerade im Osteotomiespalt (Abb. 3.6: gestrichelte Linie) und die Mittelgerade im Markraum zwischen den beiden gegenüberliegenden

Kortikalisrechtecken (Abb. 3.7: rote Linien). Zum Schluss wurden diese vier Sub-ROIs durch eine längs und mittig in den entsprechenden Kortikalisrechtecken verlaufenden Gerade in einen periostalen und einen endostalen Bereich unterteilt (Abb. 3.7: blaue Linien).

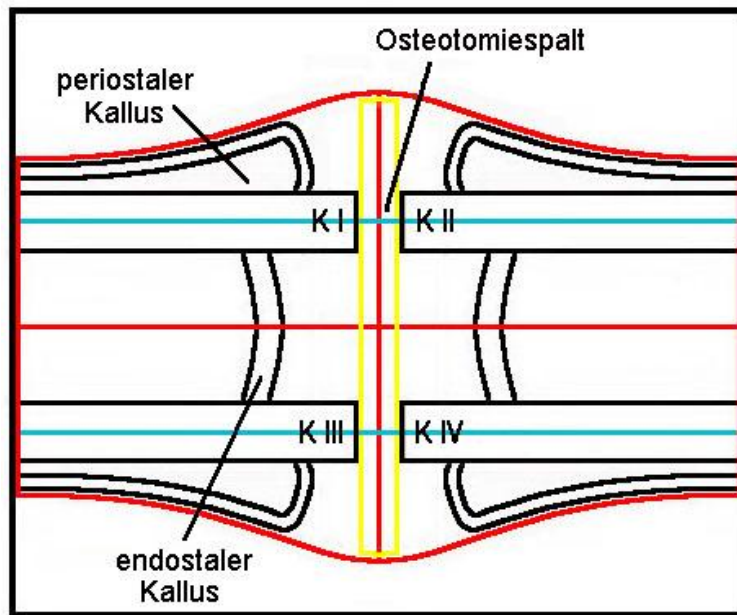


Abb. 3.7: Einteilung der ROI in Teilflächen
 Gelb = Osteotomiespalt
 Rot = je einem Kortikalisrechteck zugeordneter Quadrant
 Blau = Unterteilung der Quadranten in periostale und endostale Bereiche

3.6.2 Radiologische Auswertung

Sämtliche Röntgenbilder, die im Verlauf der wöchentlichen Kontrollen angefertigt worden waren, wurden ausgewertet. Mit dem Oberschenkelkopf (Caput ossis femoris) als Orientierung erfolgte eine Einteilung des Röntgenbildes in vier Quadranten. Die Grenzlinien verliefen senkrecht durch den Osteotomiespalt sowie senkrecht durch den Markraum. Auf diese Weise ergaben sich die Quadranten I, II, III und IV, die jeweils die entsprechenden Kortikalisrechtecke beinhalteten (Abb. 3.8), wobei Quadrant III bzw. Kortikalisrechteck III stets dem Femurkopf am nächsten lagen. Beurteilt wurden u.a. die kortikale Resorption, Erweiterung des Osteotomiespalt, Kallusbildung, Überbrückung des Osteotomiespalt und das Auftreten von Remodeling-Prozessen, wie zunehmende Verdichtung des kortikalen Knochens, Resorption des Kallus und Veränderungen des intramedullären Raumes. Durch den Vergleich aller Röntgenbilder eines Tieres konnten, mit Hilfe dieser Parameter, Aufschlüsse bzgl. des zeitlichen Heilungsverlaufes gewonnen werden. Auch Veränderungen wie kallöse Zubildungen an den Kirschnerdrähten und Osteolysen fanden Beachtung, um das Model im Hinblick auf die Funktionalität des externen Fixateurs beurteilen zu können.

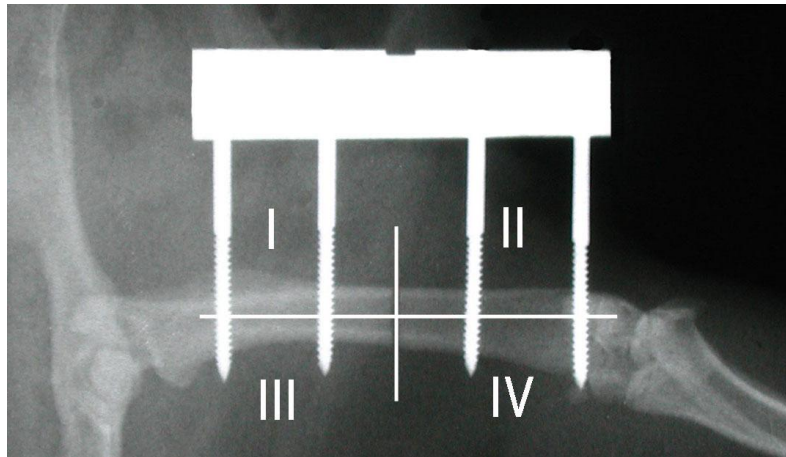


Abb. 3.8: Einteilung des Röntgenbildes in vier Quadranten (antero-posteriore Strahlengang)

3.6.3 Histologische Auswertung

3.6.3.1 Deskriptive Auswertung

Die deskriptive Untersuchung der Movat Pentachrom-Übersichtsfärbungen erfolgte unter dem Lichtmikroskop (Axioskop 2, Fa. Zeiss Jena, Deutschland) mit zunehmender Vergrößerung (2,5-fach, 5-fach, 10-fach, 20-fach, 40-fach) und unter Zuordnung der entsprechenden Sub-ROIs nach folgenden Kriterien: Zusammensetzung und Ausmaße des periostalen und endostalen Kallus, Überbrückung des Osteotomiespalt durch Kallus, kortikale Resorptionen am Osteotomiespalt, Zusammensetzung des Gewebes im Osteotomiespalt, sowie Anzeichen von Remodeling, wie die Rückbildung des periostalen Kallus, Wiederherstellung der originalen Knochenstruktur der Kortikalis und Resorption des endostalen Kallus zur Rekanalisierung des intramedullären Raumes. Weiterhin wurde auf Veränderungen wie Entzündungen oder Osteolysen geachtet.

3.6.3.2 Zählung der Osteoklasten

Die Durchmusterung der Präparate nach knochenresorbierenden Osteoklasten erfolgte mäanderförmig bei 40-facher Vergrößerung unter dem Lichtmikroskop (Axioskop 2, Fa. Zeiss). Rosarot angefärbte Zellen mit mindestens zwei Kernen, die sich in unmittelbarer Nähe des Knochens aufhielten, konnten eindeutig als an Knochenumbau- oder Abbauprozessen beteiligte, aktive Osteoklasten identifiziert und gezählt werden⁹⁷. Die Kennzeichnung der ROI am Schnittpräparat erfolgte mit Hilfe eines eigens zu diesem Zweck konstruierten rechteckigen Plexiglasses. Dies wies in der Mitte eine Linie für das Zentrum des Osteotomiespalt auf, seine Breite wurde durch die zwei 3,5 mm-Parallelen begrenzt. Nach exaktem Auflegen des Plexiglasses auf das Schnittpräparat wurden die ROI-Grenzen durch Entlangfahren mit einem wasserfesten dünnen Stift an den 3,5 mm-Parallelen auf das Präparat übertragen.

Die Zählung unter dem Lichtmikroskop wurde dreifach durchgeführt mit anschließender Ermittlung des Mittelwertes, um die Fehlerquote möglichst gering zu halten. Mit Hilfe der in der Movat Pentachrom-Färbung bestimmten Knochenflächen [mm²] (Punkt 3.6.4.1) wurde

die Osteoklastendichte, definiert als die Anzahl der Osteoklasten pro mm^2 Knochengewebe [OC/mm^2], innerhalb der Sub-ROIs bestimmt.

3.6.3.3 Zählung der Gefäße

Anhand der α -SMA-Nachweis-Färbungen erfolgte die Zählung der Gefäße. Hierfür wurden die Präparate mit Hilfe eines mit einem Computer verbundenen Mikroskops und einer speziellen Software (Axio-Vision Version 4.5) bei 20-facher Vergrößerung eingescannt. Auf diesem Bild wurde ein Maßstabsbalken eingefügt, welcher im späteren Verlauf der Bearbeitung als Skalierung diente. Mit Hilfe des Bildbearbeitungsprogramms (Adobe Photoshop Version 7.0) erfolgte das Einzeichnen der Grenzlinien der Sub-ROIs. Weiterhin wurde ein Kreis als Maßstab eingefügt, welcher eine Größe von $40\ \mu\text{m}$ aufwies. So konnten im Adobe Photoshop bei mäanderförmiger Durchmusterung die Gefäße gezählt werden, wobei zwischen Gefäßen mit einem Außendurchmesser kleiner bzw. größer als $40\ \mu\text{m}$ unterschieden wurde. Als Gefäß wurden alle Strukturen gewertet, die eine intensiv-rote Färbung und/ oder unter dem Lichtmikroskop Endothelzellen erkennen ließen. Sichtbare Gefäßlumina dienten als Hilfestellung, galten aber nicht als Kriterium zur Identifizierung. Um eine Mehrfachzählung zu verhindern, wurde jedes gezählte Gefäß im Adobe Photoshop als gezählt gekennzeichnet. Die Gefäßdichte wurde mit Hilfe der über die Movat Pentachrom-Färbung berechneten Bindegewebsflächen [mm^2] (Punkt 3.6.4.1) berechnet und definierte sich als die Anzahl der Gefäße pro mm^2 Bindegewebe [$\text{Gefäße}/\text{mm}^2$].

3.6.4 Histomorphometrische Auswertung

3.6.4.1 Computergestützte Bildanalyse

Die Präparate der Movat Pentachrom-Färbung wurden in der unter Punkt 3.6.3.3 beschriebenen Vorgehensweise eingescannt und mit einem Maßstabsbalken versehen. Für die Auswertung der Safranin Orange/ von Kossa-Färbung wurden die Präparate auf einem Leuchttisch liegend mit der Digitalkamera (D70S, Fa. Nikon, Japan) abfotografiert. Mit abgebildet waren auch ein Millimetermaß zur späteren Skalierung, sowie ein Orientierungspunkt an der Seite des Oberschenkelkopfes für die korrekte Einteilung der ROI. Nach Übertragung der Bilder auf einen Computer wurden diese mit Hilfe eines Computerprogramms (KS Run 400 Version 3.0, Fa. Carl Zeiss Vision GmbH, Eching, Deutschland) analysiert. Zu beachten war, dass sich die Bilder in korrekter Position befanden. Der Markierungspunkt musste sich stets oben rechts im Bild befinden, damit die Software die Einteilung der Schnitte in die proximalen, distalen, medialen und lateralen Bereiche vornehmen konnte, um so die spätere Vergleichbarkeit der Präparate miteinander zu gewährleisten. Um Fehler in der Darstellung durch das Abfotografieren sowie den Computer auszuschließen und um die verschiedenen Gewebetypen genau differenzieren zu können, erfolgten alle Schritte unter gleichzeitiger mikroskopischer Kontrolle des Originalpräparats.

Schritt für Schritt wurden die Anweisungen der Software befolgt. Zunächst erfolgte eine Kalibrierung des Bildes anhand des abgebildeten Millimetermaßes. Der Durchmesser des Oberschenkelknochens wurde anhand der Außenkanten der Kortikalis bestimmt. Diese wurden sowohl proximal als auch distal in Nähe des Osteotomiespaltes markiert. Es folgte die Kennzeichnung des Durchmessers des Gesamtkallus mittels dessen Außengrenzen lateral und medial. Ebenso war der Durchmesser des knöchernen Kallus festzulegen. Lateral und medial wurde die Osteotomiespaltbreite zwischen den Enden der Kortikalisrechtecke markiert um die Mitte der ROI zu berechnen. Weiterhin wurde der Markraum mittig zwischen der lateralen und medialen Kortikalis unterteilt, ebenso die Kortikalisrechtecke, zur Unterscheidung in periostale und endostale Bereiche. Mit diesen Markierungen berechnete die Software die Grenzlinien der ROI (Abb. 3.9.a) und unternahm eine Zuordnung in medial, lateral, proximal und distal. Von vornherein im Makro vorgegeben war, dass die proximale und distale Grenzlinie der ROI im Abstand von 3,5 mm zur Mitte des Osteotomiespaltes lag, die laterale und mediale Begrenzung orientierte sich hingegen individuell am Gesamtkallus-Durchmesser. Aus dem entstandenen Rechteck mussten die anliegenden Muskelanteile ausgeblendet werden, welche per definitionem nicht zur ROI gehörten. Sie wurden als Leerräume markiert, ebenso wie durch die Schnitttechnik bedingte Artefakte, da diese keinem Gewebetyp zugeordnet werden konnten (Abb. 3.9.b). Diese Leerräume wurden von der Software von den errechneten Flächen subtrahiert. Es folgte das Markieren der einzelnen Kortikalisrechtecke (Abb. 3.9.c) und des Osteotomiespaltes (Abb. 3.9.d). Anschließend wurden die je nach Färbung zu berechnenden Gewebetypen sequenziert. Aus der Safranin Orange/ von Kossa-Färbung waren pro Tier vier Schnitte zu analysieren, um die Fehlerquote möglichst gering zu halten. Aus diesen vier Präparaten gelangte der Medianwert der entsprechenden Berechnung zur Auswertung. Mineralisiertes Gewebe stellte sich schwarz dar, Bindegewebe in unterschiedlichen Rottönen, Knorpel intensiv rot. Die Software war anhand der Schwarzfärbung in der Lage, die mineralisierten Bereiche zu erkennen und zu kennzeichnen (Abb. 3.9.e). Rotgefärbte Bereiche wurden als nichtmineralisiertes Gewebe erkannt (Abb. 3.9.f). Die Differenzierung des Bindegewebes und des Knorpelgewebes erfolgte unter Berücksichtigung weiterer morphologischer Kriterien durch manuelle Korrektur, indem die Knorpelflächen markiert wurden (Abb. 3.9.g). Diese wurde von der vorher markierten Fläche der nichtmineralisierten Gewebe abgezogen um so die Bindegewebsfläche zu berechnen. Von der Movat Pentachrom-Färbung gelangte ein Schnitt pro Tier in die Auswertung. Der Knochen zeigte sich in der Movat Pentachrom-Färbung leuchtend gelb, Knorpel und Bindegewebe war bläulich-grün angefärbt. Hier war eine manuelle Markierung der Knochenflächen und des Bindegewebes notwendig. Nach erfolgter Sequenzierung wurden durch den Computer fälschlicherweise gekennzeichnete Bereiche, wie z.B. markiertes Knochenmark, stets unter lichtmikroskopische Kontrolle manuell korrigiert. Anschließend konnten die periostalen und endostalen Kallusbereiche

gekennzeichnet werden, um eine differenzierte Berechnung der Flächen und der Zusammensetzung zu ermöglichen (Abb. 3.9.h).

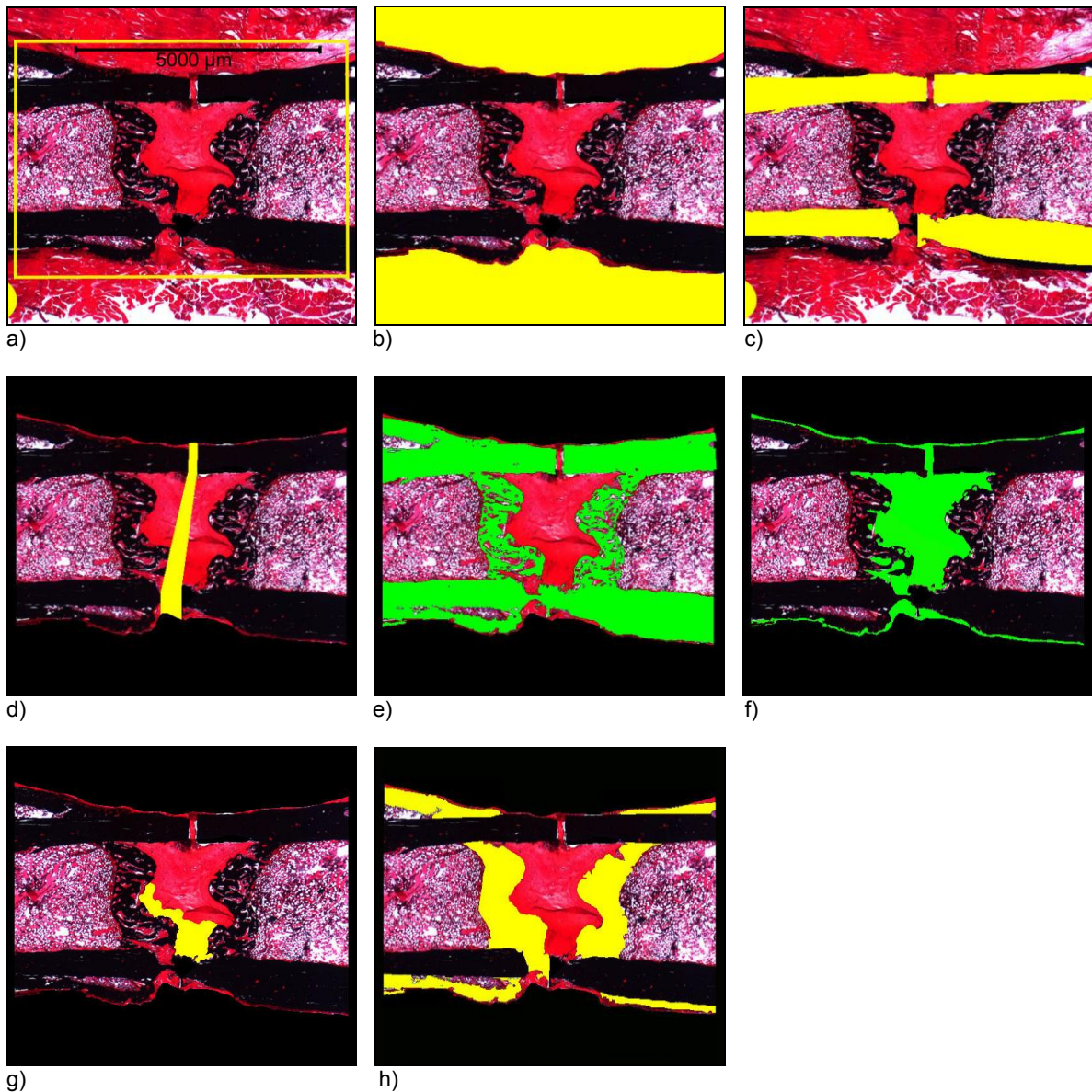


Abb. 3.9: Die Vorgehensweise bei der computergestützten Bildanalyse am Beispiel der Safranin Orange/ von Kossa-Färbung

- a) Festlegung der ROI durch die Software (gelber Rahmen)
- b) Ausschluss der nicht zu berechnenden Weichteilgewebe (Leerräume, gelbe Markierung)
- c) Kennzeichnung der Kortikalisrechtecke (gelbe Markierung)
- d) Kennzeichnung des Osteotomiespaltes (gelbe Markierung)
- e) Sequenzierung der mineralisierten Bereiche (grüne Markierung)
- f) Sequenzierung der nichtmineralisierten Bereiche (Bindegewebe + Knorpelgewebe) (grüne Markierung)
- g) Kennzeichnung des Knorpelgewebes (gelbe Markierung)
- h) Kennzeichnung der periostalen und endostalen Kalli (gelbe Markierung)

Von den gemessenen Werten der Safranin Orange/ von Kossa-Färbung gelangten folgende Parameter als Absolutwerte [mm²] und/ oder Relativwerte [%] zur Auswertung:

- Die Gesamtfläche
 - o der ROI [mm²]
 - o des periostalen und endostalen Kallus [mm² und %]
 - o des Osteotomiespaltes [mm² und %]
 - o der Kortikalis [mm² und %]
- Die Flächen bzw. Flächenanteile des Knochen-, Knorpel- und Bindegewebes
 - o In der ROI [mm²]
 - o im periostalen und endostalen Kallus [mm² und %]
 - o im Osteotomiespalt [mm² und %]
 - o in der Kortikalis [mm² und %]

Folgende aus der Movat Pentachrom-Färbung stammende quantitative Daten wurden in die Auswertungen als Referenz zur Bestimmung der Osteoklasten- und Gefäßdichte (Punkt 3.6.3.2 und 3.6.3.3) einbezogen:

- die Knochen- und Bindegewebsflächen
 - o der ROI [mm²]
 - o des periostalen und endostalen Kallus [mm²]
 - o des Osteotomiespaltes [mm²]

Sämtliche hier aufgeführte Gewebevorkommen wurden auch hinsichtlich ihrer lateralen und medialen Verteilung untersucht.

3.6.4.2 Statistische Analysen

Die statistischen Analysen wurden mit Hilfe der Software SPSS 14.0 für Windows (SPSS Deutschland GmbH, München, Deutschland) durchgeführt. Zunächst erfolgte die Angabe der Mediane und der Minimal- und Maximalwerte sämtlicher erhobener Parameter jeder Gruppe in tabellarischer Form. Aufgrund der kleinen Tierzahl pro Gruppe wurden die Mediane der Daten bestimmt, um so eventuellen Extremwerten an Gewicht zu nehmen.

Ihre graphische Darstellung erfolgte mittels eines Box-Whisker-Plots (Abb. 3.10). Das Grundgerüst eines Boxplots besteht aus der Box und zwei Whiskern. Die Box umfasst die mittleren 50% der Werte, wobei die obere Grenze das 75%-Quartil, die untere Grenze das 25%-Quartil kennzeichnet. Eine horizontal verlaufende schwarze Linie innerhalb der Box markiert den Median (50%-Quartil). Die Länge eines Whiskers beträgt maximal das 1,5-fache der Boxenhöhe. In diesem Bereich befinden sich die unteren bzw. oberen 25% der Werte. Die Grenzstriche der Whisker kennzeichnen den kleinsten bzw. größten Wert innerhalb dieses Bereichs, jedoch ohne Extremwerte. In einem Bereich, welcher das 1,5- bis 3-fache der Boxenhöhe umfasst, werden Extremwerte in Form eines kleinen Kreises mit nebenstehender Nummer des entsprechenden Tieres angezeigt. Werte, welche über die

3-fache Boxenhöhe hinausgehen, so genannte Ausreißer, werden als Sterne mit nebenstehender Tiernummer aufgeführt. Unter der Verwendung des Mann-Whitney-U-Tests, bei dem es sich um einen nicht-parametrischen statistischen Test zweier unabhängiger Stichproben handelt, konnte die Überprüfung der Signifikanz der Übereinstimmung der Parameter zweier unabhängiger Gruppen durchgeführt werden. Die obere Grenze der Signifikanz wurde bei $\alpha < 0,05$ festgelegt, die Irrtumswahrscheinlichkeit des Tests betrug somit $< 5\%$.

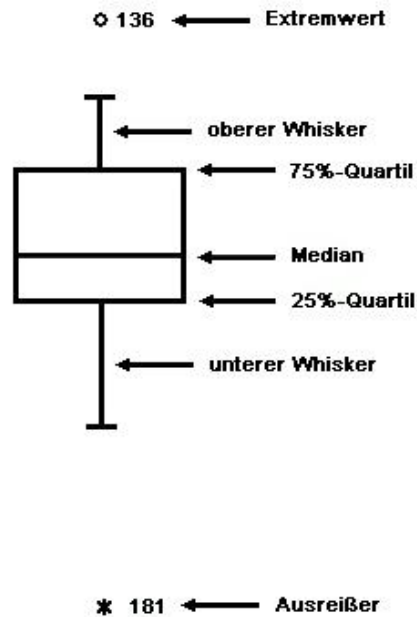


Abb. 3.10: Darstellung eines Boxplots

4 Ergebnisse

4.1 Postoperatives Befinden der Versuchstiere

Nach der Osteotomie kamen die 16 Tiere der Kontrollgruppe und die 16 Tiere der Versuchsgruppe schnell zu Bewusstsein. Spätestens nach zwei Tagen zeigten sie einen guten Allgemeinzustand. Die osteotomierte Gliedmaße wurde sofort post operationem belastet und die Wundheilung der Hautnaht verlief in den meisten Fällen physiologisch. Lediglich an P1 und P4 waren nach der achtwöchigen Standzeit häufig noch Verkrustungen (59 % der Tiere) und/ oder Granulationsgewebe (34 % der Tiere) unterschiedlichen Ausmaßes (1 - 5 mm) aufzufinden, wobei diese vornehmlich in der Versuchsgruppe auftraten. Bei einigen Tieren (12,5 %) waren Verletzungen um die Pindräfte durch Automutilation festzustellen. Bzgl. des Körpergewichtes gab es kaum signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen, außer am Tag der Osteotomie. Hier wiesen die Kontrolltiere etwas mehr Gewicht auf. Auffällig war auch das leichte Absinken des Gewichtes der Kontrolltiere nach der ersten Standwoche. Im weiteren Versuchsverlauf jedoch nahmen alle Tiere stetig an Gewicht zu (Tab. 4.1).

Tab. 4.1: Körpergewichte zu den Untersuchungszeitpunkten im Rahmen der wöchentlichen Nachsorge

Körpergewicht		Median		Minimum-Maximum		p-Wert
		Kontroll-Gruppe	Versuchs-Gruppe	Kontroll-Gruppe	Versuchs-Gruppe	
Tag der Osteotomie d ₀	g	438,0	423,5	410 - 460	402 - 455	0,004
1. Standwoche d ₇	g	428,0	427,5	417 - 458	401 - 444	0,381
2. Standwoche d ₁₄	g	444,0	439,5	425 - 488	415 - 477	0,647
3. Standwoche d ₂₁	g	448,0	448,5	415 - 494	416 - 501	0,868
4. Standwoche d ₂₈	g	451,0	448,0	414 - 503	433 - 512	0,884
5. Standwoche d ₃₅	g	452,0	454,0	423 - 516	431 - 523	0,704
6. Standwoche d ₄₂	g	459,0	459,5	418 - 526	437 - 536	0,564
7. Standwoche d ₄₈	g	457,5	465,0	428 - 535	435 - 538	0,545
8. Standwoche d ₅₆	g	472,0	472,5	414 - 535	443 - 543	0,889

Ein Kontrolltier musste eingeschlafert und ersetzt werden, da es eine eitrige Osteitis mit umfassenden Osteolysen aufwies. Ein Tier der Versuchsgruppe entwickelte eine systemische Infektion und wurde ebenfalls eingeschlafert und ersetzt. Nur Tiere mit einem ungestörten Allgemeinbefinden, wurden in die Auswertungen einbezogen. Auch durfte die osteotomierte Extremität keine entzündliche Schwellung aufweisen. Vier Kontrolltiere sowie 15 Tiere der Versuchsgruppe wurden nach der achtwöchigen Standzeit ausgeschlossen und ersetzt, da sie massive Kallusbildungen und/ oder starke Osteolysen um die Pins herum aufwiesen. Als Ausschlusskriterien galten röntgenologisch sichtbare Kalli um einen Pin mit einer Höhe von mehr als sechs Pindurchmessern (> 7,5 mm) oder Osteolysen mit einer Ausbreitung von mehr als 1,5 Pindurchmessern (> 1,875 mm). Lag eine kleinere Osteolyse vor, so durfte am zweiten Kortikaliskontakt des Pins keine weitere vorliegen. Weiterhin musste am histologischen Schnitt ersichtlich sein, dass Kallusbildungen an den an die Osteotomie angrenzenden Pins P2 und P3 keine direkte Auswirkung auf die Frakturheilung

haben. Die Größenverhältnisse wurden post mortem am Röntgenbild anhand des Pindurchmessers von 1,25 mm nachvollzogen.

4.2 Radiologische Auswertung

In diese Auswertung wurden die vorliegenden Röntgenbilder der wöchentlichen Nachsorge (Punkt 3.3) der 16 Tiere der Kontrollgruppe und der 16 Tiere der Versuchsgruppe, beginnend mit dem Tag der Osteotomie d_0 und endend mit dem Tag der Euthanasie d_{56} , einbezogen. Anhand dieser Bilder konnte der Heilungsverlauf eingeschätzt werden. Hauptaugenmerk lag auf den Veränderungen im Bereich der ROI (Punkt 3.6.1), die an d_{56} in Erscheinung traten. Knöcherne Zubildungen sowie Osteolysen wurden an sämtlichen Pindrähten, auch außerhalb der ROI, beurteilt, um Aussagen über die Funktionalität des externen Fixateurs in diesem Modell zu gewinnen. Die Bewertung der Größenverhältnisse erfolgte im Verhältnis zum Pindurchmesser auf dem jeweiligen Röntgenbild (Tab. 4.2).

Tab. 4.2: Umsetzung der anhand des Pindurchmessers gemessenen Werte in mm und die sprachliche Ausdrucksweise

Erläuterungen der Größenverhältnisse	Messung anhand des Pindurchmessers	Umrechnung in mm	Sprachlicher Ausdruck
Ausdehnung der Kalli	$\leq 0,5$	$\leq 0,625$	sehr dünn
	0,51 - 1	0,626 - 1,25	dünn
	1,01 - 1,5	1,26 - 1,875	mäßig stark
	1,51 - 2	1,876 - 2,5	stark
	2,01 - 3	2,51 - 3,75	sehr stark
	> 3	$> 3,75$	übermäßig stark
Entfernung der Kalli vom Osteotomiespalt	0	0	am Spalt
	$\leq 0,5$	$\leq 0,625$	sehr nah
	0,51 - 1	0,626 - 1,25	nah
	1,01 - 1,5	1,26 - 1,875	weit
	$> 1,5$	$> 1,875$	sehr weit
Ausdehnung der Osteolysen vom Pin	$\leq 0,5$	$\leq 0,625$	gering
	0,51 - 1	0,626 - 1,25	stark
	> 1	$> 1,25$	sehr stark

Direkt post operationem saß der Fixateur externe bei sämtlichen Tieren korrekt und es war keine wesentliche Verschiebung der Knochenfragmente erkennbar (Abb. 3.3).

4.2.1 Periostaler Kallus

Kontrollgruppe:

Standzeit 2 Wochen: Die Kontrolltiere zeigten auf allen Kortikalisoberflächen aufliegende diffuse, sehr dünne ($\leq 0,625$ mm) periostale Kalli (100 %) (Abb. 4.1).

Standzeit 4 Wochen: Fast die Hälfte der Tiere (44 %) wies lateral eine radiologisch deutlich erkennbare Überbrückung des Osteotomiespalt durch periostalen Kallus auf (Abb. 4.1), wenige (12,5 %) auch medial. Die nicht-überbrückenden Kallusenden ragten in den Osteotomiebereich hinein oder befanden sich in dessen Nähe (Entfernung $\leq 0,625$ mm).

Standzeit 6 Wochen: Nun zeigte fast die Hälfte der Tiere (38 %) sowohl lateral als auch medial eine Überbrückung. Viele Kalli (50 %) haben auf ganzer Länge leicht an Stärke

zugenommen (0,626 - 1,25 mm). Mehrere (38 %) nahmen auch nur in Spaltnähe leicht an Stärke zu.

Standzeit 8 Wochen: Zehn von 16 Tieren (63 %) waren nun beidseits überbrückt (Union), ein Tier nur medial, zwei weitere nur lateral. Die nicht-überbrückenden Kallusenden ragten meist in den Spalt hinein oder lagen diesem direkt an. Zwei Kallusenden befanden sich in geringer Entfernung (< 1,25 mm). Vornehmlich (48 %) maßen die Kalli zwischen 0,626 und 1,25 mm, mehrere (41 %) waren dünner ($\leq 0,625$ mm), nur wenige (5 %) zeigten sich stärker (1,26 - 2,5 mm). Lateral waren vier periostale Kalli verschwunden (6 %). Inzwischen verliefen sehr viele Kalli (63 %) parallel zur zugehörigen Kortikalisoberfläche, nur wenige (15 %) nahmen zur Osteotomie hin an Stärke zu. Die übrigen Kalli (22 %) verringerten ihre Stärke zum Osteotomiespalt hin.

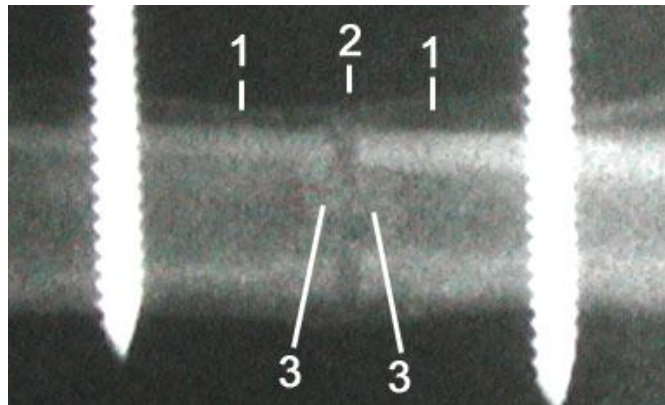


Abb. 4.1: Röntgenaufnahme eines Kontrolltieres im Bereich der ROI nach der achten Standwoche; Kontrollgruppe, Tier 174

Verstärkte Röntgendichte durch

- 1 periostale Kalli an Kortikalis I und Kortikalis II
- 2 Überbrückung der periostalen Kalli lateral
- 3 querverlaufende endostale Kalli proximal und distal

Versuchsgruppe:

Standzeit 2 Wochen: Nur drei Viertel (75 %) der Kortikalisrechtecke wiesen einen diffus erscheinenden periostalen Kallus auf. Diese endeten außerhalb oder knapp innerhalb des gekauterten Bereiches von 2 mm.

Standzeit 4 Wochen: Beinahe alle Kortikalisrechtecke (96 %) zeigten nun einen periostalen Kallus. Medial traten nur dünne Kalli auf ($\leq 1,25$ mm), lateral war etwa ein Drittel (31 %) der Kalli stärker als 1,875 mm. Überwiegend (60 %) verliefen die Kallusoberflächen parallel zur Kortikalisoberfläche und endeten abrupt in Form einer Abrundung. Mehrere Kallusenden (30 %) nahmen auch zum Spalt hin an Stärke zu, einige (10 %) liefen zum Spalt hin spitz an der Kortikalisoberfläche anliegend aus. Die meisten Kalli (80 %) endeten innerhalb des gekauterten Bereiches, jedoch mit einer Mindestentfernung von der Osteotomiekannte von 0,626 mm. Nur wenige reichten direkt an den Spalt heran (7 %) oder endeten sehr weit (> 1,875 mm) entfernt (10 %). Ein Kallus (3 %) überragte die Osteotomiekannte.

Standzeit 6 Wochen: Nun zeigten sämtliche Kortikalisrechtecke periostale Kalli (100 %). Erstmals trat eine Überbrückung der Osteotomie auf (medial). Auch konnte ein leichter Trend zur Annäherung der Kallusenden an die Osteotomie festgestellt werden.

Standzeit 8 Wochen: Letztendlich blieb es bei einer medialen Überbrückung. Die freien Kallusenden befanden sich meist (70 %) 0,626 – 1,875 mm von der Osteotomiekante entfernt (Nonunion). Nur wenige überragten den Spalt (5 %), lagen diesem direkt an (5 %), befanden sich in dessen Nähe ($\leq 0,625$ mm) (12 %) oder lagen sehr weit entfernt ($> 1,875$ mm) (8 %). Viele mediale (93 %) und laterale (53 %) Kalli blieben dünn ($\leq 1,25$ mm). Die übrigen lateralen Kalli (47 %) wiesen gleichermaßen Stärken von 1,25 - 3,75 mm auf. Knapp drei Fünftel (58 %) der Kalli verliefen parallel zur Kortikalisoberfläche, zwei Fünftel (39 %) liefen zum Spalt hin spitz aus. Nur ein Kallus (3 %) verdickte sich zur Osteotomie hin.

4.2.2 Endostaler Kallus

Kontrollgruppe

Standzeit 2 Wochen: Proximal und distal der Osteotomie traten einige (20 %) dünne (0,626 - 1,25 mm), diffuse Verschattungsfronten im Knochenmarksraum auf. Diese endostalen Kalli spannten sich zwischen den parallelen Kortikalisrechtecken auf, lagen am Osteotomiespalt und grenzten diesen so vom Knochenmarksraum ab (Abb. 4.1).

Standzeit 4 Wochen: Nun zeigten sich viele dünne, diffuse und der Osteotomie sehr nahe ($\leq 0,625$ mm) anliegende endostale Kalli (80 %). Bei einem Tier waren vorher vorhandene Kallusverschattungen medial wieder verschwunden und der gesamte mediale Bereich wies die knochenmarkstypische Röntgendichte auf.

Standzeit 6 Wochen: Alle Kontrolltiere zeigten nun deutlich sichtbare endostale Kalli (100 %), vornehmlich (65 %) in Form von zwei dünnen Fronten. Diese waren im Osteotomiespalt sehr nah zusammen gerückt, zum Teil (28 %) so weit, dass sie zu einem zentralen Kallus verschmolzen.

Standzeit 8 Wochen: Nun waren viele Kalli (62 %) wieder verschwunden und das vorliegende Gewebe wies röntgenologisch die dem Knochenmark ähnliche Dichte auf. So zeigten vier Tiere keine endostalen Kalli (25 %), sechs Tiere (38 %) wiesen inselähnliche Reste der Kalli (38 %) auf. Die weiterhin bestehenden Kalli traten als sich gegenüberstehende dünne ($\leq 1,25$ mm) Fronten (37 %) auf, welche sich vornehmlich am oder im Spalt (84 %) oder in dessen Nähe ($< 0,625$ mm) (16 %) befanden.

Versuchsgruppe:

Standzeit 2 Wochen: Hier zeigte sich noch kein endostaler Kallus.

Standzeit 4 Wochen: Nun hatte sich mehr als die Hälfte der endostalen Kalli ausgebildet (56 %). Sie traten ebenfalls in Form zweier gegenüberliegender Fronten auf, manchmal (12,5 %) war nur eine Front zu sehen, und sie waren etwas stärker (1,25 – 1,875 mm) als bei

den Kontrolltieren. Überwiegend (80 %) traten sie im gekauterten Bereich auf (≤ 2 mm), einige davon (20 %) sehr nah am Spalt ($\leq 0,625$ mm). Einige Kalli (20 %) lagen sehr weit vom Spalt entfernt ($> 1,875$ mm).

Standzeit 6 Wochen: Alle Tiere der Versuchsgruppe wiesen endostale Kalli auf, überwiegend (73 %) in Form zweier gegenüberstehender deutlicher Fronten. Bei vier Tieren war nur eine Front proximal oder distal nachweisbar.

Standzeit 8 Wochen: Nun waren beinahe alle endostalen Kalli in Form zweier Fronten ausgebildet (94 %), bei einem Tier fehlte der distale Kallus. Die Stärke der Kalli hatte abgenommen, so dass sich viele (77 %) dünn ($\leq 1,25$ mm) darstellten. Einige (16 %) waren mäßig stark (1,26 – 1,875 mm) und wenige (7 %) stark ($> 1,875$ mm) ausgeprägt. Tendenziell waren die Kalli näher an den Spalt herangerückt. So befand sich etwa ein Drittel (34 %) im oder am Spalt und knapp die Hälfte (44 %) in einer Entfernung bis 1,25 mm. Einige (22 %) lagen weiter entfernt (1,26 – 2 mm), wenige (6 %) auch außerhalb des gekauterten Bereiches (> 2 mm).

4.2.3 Intrakortikaler Spaltbereich

Kontrollgruppe:

Standzeit 2 Wochen: Die Osteotomiespalte in der Kortikalis (Abb. 4.2) waren sehr gut zu erkennen und wiesen keine Verschattungen auf.

Standzeit 4 Wochen: Nun zeigten mehrere (31 %) Intrakortikalspalte diffuse Verschattungen.

Standzeit 6 Wochen: Viele (75 %) Intrakortikalspalte waren teils diffus, teils deutlich verschattet. Ein Tier wies am lateralen und medialen Intrakortikalspalt (6 %) eine dem kortikalen Knochen entsprechende Röntgengichte auf.

Standzeit 8 Wochen: Letztendlich zeigten mehrere (47 %) Intrakortikalspalte eine dem kortikalen Knochen entsprechende Röntgengichte. Die übrigen Spalte (50 %) ließen, bis auf einen medialen (3 %), deutliche Verschattungen erkennen.

Versuchsgruppe:

Standzeit 2 und 4 Wochen: Es waren keine röntgengichten Gewebe im intrakortikalen Osteotomiebereich auszumachen.

Standzeit 6 Wochen: Nun war bei einem Tier im medialen Spalt (3 %) deutlich röntgengichtes Gewebe auszumachen. Dieser Spalt wies auch die einzige periostale Überbrückung innerhalb der Versuchsgruppe auf (Punkt 4.2.1).

Standzeit 8 Wochen: Letztendlich zeigten zwei mediale Intrakortikalspalte (6 %) die dem kortikalen Knochen entsprechende Röntgendichte. Alle übrigen Intrakortikalspalte (94 %) der Tiere der Versuchsgruppe wiesen keinerlei röntgendichtes Gewebe in diesem Bereich auf.

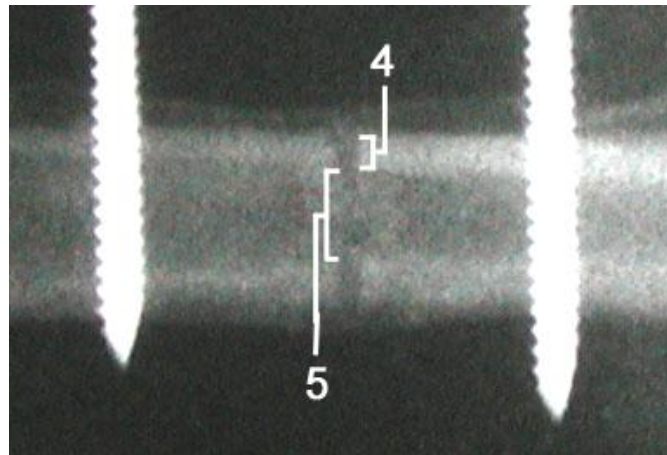


Abb. 4.2: Röntgenaufnahme eines Kontrolltieres im Bereich der ROI nach der achten Standwoche; Kontrollgruppe, Tier 138

Deutlich sichtbarer Osteotomiebereich durch geringe Röntgendichte im

4 Intrakortikalen Spaltbereich lateral

5 Intramedullären Spaltbereich

4.2.4 Intramedullärer Spaltbereich

Kontrollgruppe:

Standzeit 2 Wochen: Zwei intramedulläre Osteotomiespaltbereiche (12 %) zeigten diffus röntgendichtes Gewebe (Abb. 4.2), die Osteotomie stellte sich deutlich dar.

Standzeit 4 Wochen: Inzwischen wiesen viele Spalte (70 %) diffuses bzw. deutlich sichtbares röntgendichtes Gewebe auf.

Standzeit 6 Wochen: Nun zeigten fast alle Spalte (94 %) deutlich sichtbare Verschattungen.

Standzeit 8 Wochen: Letztendlich verschwanden bei mehreren Spalten (44 %) die Verschattungen wieder, das vorliegende Gewebe glich röntgenologisch dem umliegenden Knochenmark. Die übrigen Spalte (50 %), welche weiterhin deutlich sichtbare Verschattungen zeigten, ließen die Osteotomie nicht mehr erkennen. Das Tier welches schon medial im Intrakortikalspalt keine Verschattung aufwies (Punkt 4.2.3), stellte sich auch intramedullär röntgenbildnegativ (6 %) dar, die Osteotomie war deutlich abgrenzbar.

Versuchsgruppe:

Standzeit 2 Wochen: Kein Tier (0 %) wies im intramedullären Spaltbereich Verschattungen auf. Die Osteotomie war als röntgenbildnegative Zone deutlich auszumachen.

Standzeit 4 Wochen: Knapp die Hälfte der Spalte (44 %) stellte sich diffus verschattet dar.

Standzeit 6 Wochen: Mehrere Spalte (63 %) zeigten diffuses, gut ein Viertel (27 %) deutlich sichtbares röntgendichtes Gewebe.

Standzeit 8 Wochen: Letztendlich zeigten zwei Spalte (12 %) keine Verschattungen und zehn (63 %) stellten sich diffus verschattet dar wobei die Osteotomie deutlich erkennbar blieb. Beim übrigen Viertel (25 %) wurden die Abgrenzungen der Osteotomie undeutlicher, hier lag deutlich röntgendichtes Gewebe vor.

4.2.5 Integrität der Kortizes

Kontrollgruppe:

Standzeit 2, 4 und 6 Wochen: Es waren keine Auffälligkeiten am kortikalen Knochen festzustellen (Abb.4.3).

Standzeit 8 Wochen: Letztendlich trat an der Osteotomieschnittkante der Kortikalis eine kleine Abrundung ($\leq 0,625$ mm) einer endostal liegenden Knochenecke auf (1,5 %). Erweiterungen des Osteotomiespaltes im Bereich der Kortikalis waren nicht festzustellen.

Versuchsgruppe:

Standzeit 2 Wochen: Es traten keine Veränderungen am kortikalen Knochengewebe auf.

Standzeit 4 Wochen: An wenigen Kortikalisrechtecken (3 %) traten flache Vertiefungen direkt vor den periostalen Kallusenden auf. Ebenso zeigten sich an den periostalen Kortikalisecken an der Osteotomieschnittkante wenige (3 %), leichte ($\leq 0,625$ mm) Abrundungen (Abb. 4.3). Zwischen zwei durchtrennten Kortikalisenden trat eine Erweiterung des Osteotomiespaltes um ca. 1,25 mm auf (Abb. 4.3).

Standzeit 6 Wochen: Die Zahl der Kortikalisrechtecke (10,5 %) mit Vertiefungen vor den periostalen Kallusenden nahm zu. Ebenso die der periostalen Kortikalisecken mit Abrundungen (13,5 %), vornehmlich lateral. Diese hatten sich teilweise vergrößert (0,626 - 1,25 mm). Endostal kamen einige (10,5 %) leichte Abrundungen ($\leq 0,625$ mm) hinzu, ebenso zwei geringe ($\leq 0,625$ mm) Osteotomiespalterweiterungen. Einige Kortikalisenden (12 %) wiesen eine verringerte Röntgendichte auf.

Standzeit 8 Wochen: Durch Vergrößerung bestehender Abrundungen und Vertiefungen hatten sich mehrere Kortikalisenden (36 %) um 0,626 – 1,25 mm verkürzt bzw. hatte sich der Spalt entsprechend erweitert. Periostal kamen wenige neue Kortikalisrechtecke mit Vertiefungen hinzu, insgesamt änderte sich deren Anzahl nicht (10,5 %). Allerdings nahmen periostal die Abrundungen (25,5 %) deutlich zu, teils mit großen Ausmaßen. Vor den endostalen Kalli lagen keine kortikalen Vertiefungen. Durch die Spalterweiterungen nahm die Zahl der leichten Abrundungen an den endostalen Kortikalisecken etwas ab (7,5 %).

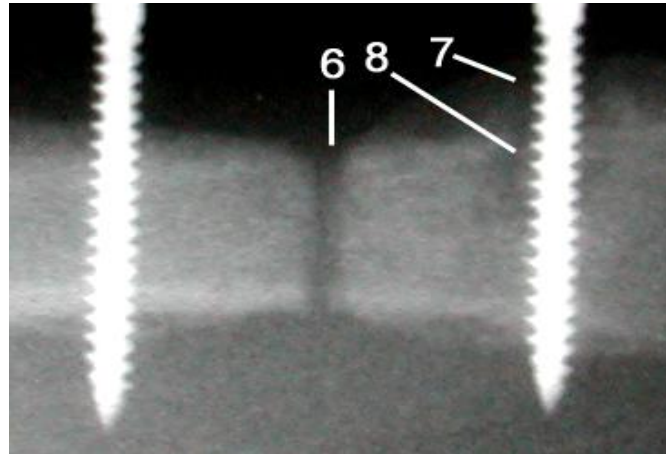


Abb. 4.3: Röntgenaufnahme einer Nonunion im Bereich der ROI nach der achten Standwoche; Versuchsgruppe, Tier 97

- 6 Osteotomiespalterweiterung lateral mit Abrundungen der kortikalen Osteotomieschnittkanten
- 7 Deutliche kallöse Zubildung an der Pineintrittsstelle von P 3 (lateral) = Pinkallus
- 8 Deutliche Abnahme der Röntgendichte des kortikalen Knochens um P 3 (lateral) = Osteolyse

4.2.6 Umgebung um die Kirschner-Drähte

Kontrollgruppe:

Standzeit 2 Wochen: An einem P4 zeigte sich lateral eine dünne, wolkenartige Kalluszubildung (Pinkallus) (Abb. 4.3).

Standzeit 4 Wochen: Mehrere Pinein- und -austrittsstellen (20 %) wiesen deutliche Pinkalli mit einer Größe von 0,626 - 1,875 mm auf. Sie verteilten sich gleichmäßig auf der lateralen Femurseite. An einigen Kontaktstellen der Pins mit der Kortikalis (10 %) stellte sich der kortikale Knochen, mit einer Entfernung von 0,626 - 1,25 mm vom Pin, nicht mehr röntgenologisch dar (Osteolysen) (Abb. 4.3), besonders lateral an P3 und P4.

Standzeit 6 Wochen: Die Zahl der Pinkalli (30 %) und ihre Ausdehnungen nahmen leicht zu, wobei die meisten (61 %) kleiner als 1,875 mm blieben. Sie traten hauptsächlich lateral auf. Pinkalli übermäßigen Ausmaßes (39 %) (> 1,875 mm) kamen besonders lateral an P1 und P4 vor. Auch die Zahl der Pin-Kortikalis-Kontaktstellen mit Osteolysen erhöhte sich leicht (12 %), sie kamen ebenfalls vornehmlich lateral an P1 und P4 vor. Erstmals trat auch medial (P1) eine Osteolyse auf. Vormals kleinere Osteolysen zeigten einen Trend zur Vergrößerung, wobei sie nicht größer als 1,25 mm wurden. Eher gegenteilig wiesen zwei große Osteolysen wieder röntgendichteres Gewebe auf.

Standzeit 8 Wochen: Letztendlich zeigten etwa 30 % aller Pinein- oder -austrittsstellen einen Pinkallus, vornehmlich lateral. Sie verteilten sie sich mit zwei Dritteln (66 %) auf P3 und P4 und einem Drittel (33 %) auf P1 und P2. Lediglich zwei Pinkalli waren medial (P3) zu sehen. Bis auf die ausschließlich an P1 auftretenden übermäßig starken (> 2,5 mm) Pinkalli (11 %), welche keine Größenveränderung aufwiesen, war eine Tendenz zur Größenabnahme erkennbar. Dadurch stieg die Zahl der Kalli zwischen 0,625 und 1,875 mm deutlich an (71 %). Die Anzahl der osteolytischen Pin-Kortikalis-Kontaktstellen veränderte sich nicht

(12 % aller Kontaktstellen). Sie lagen nur lateral, besonders an P1 (23 %) und P4 (54 %). Meist (69 %) blieben sie kleiner als 1,25 mm, einige (31 %) waren größer. Einerseits war festzustellen, dass einige Osteolysen an Ausdehnung zunahmen, andererseits nahm knapp ein Viertel (24 %) der Osteolysen wieder an Röntgendichte zu.

Versuchsgruppe:

Standzeit 2 Wochen: Hier wiesen bereits 21 % aller Pinein- oder -austrittsstellen diffuse, wolkige Pinkalli auf ($\leq 1,875$ mm), vermehrt lateral. Zwei Pineintrittsstellen (1,5 %) hatten beginnende Osteolysen.

Standzeit 4 Wochen: Die Zahl der nun deutlichen Pinkalli hatte stark zugenommen (62 %). Drei Viertel (72 %) davon verteilten sich gleichmäßig lateral, ein Viertel (28 %) lag medial an P2 und P3. Die meisten Pinkalli (65 %) waren eher klein ($\leq 1,25$). Jedoch traten an P1 lateral einige (13 %) sehr große ($> 2,5$ mm) Pinkalli auf. Etwa 20 % der Pin-Kortikalis-Kontaktstellen zeigten hauptsächlich lateral Osteolysen, wobei je ein Drittel auf P1 und P4 entfiel, P2 und P3 teilten sich das verbleibende Drittel. Über die Hälfte (52 %) der Osteolysen hatten eine leicht verringerte Röntgendichte oder starke Dichteabnahmen mit kleinen Ausdehnungsbereichen ($\leq 0,625$ mm). Die Übrigen ließen größere Ausdehnungsbereiche (0,626 - 1,25 mm) erkennen, vorwiegend an P1. Zwei Kontaktbereiche (P2 und P4 lateral) fielen auf, da sie zuvor deutliche Osteolysen hatten, nun aber wieder röntgenologisch dichteres Gewebe in diesem Bereich zeigten.

Standzeit 6 Wochen: Die Anzahl (66 %) und die Verteilung der Pinkalli sowie der Osteolysen (20 %) änderte sich nur wenig. Jedoch war eine Größenzunahme der Pinkalli und Osteolysen festzustellen. Inzwischen wiesen nun 16 % der vormals osteolytischen Areale wieder deutlich röntgendichteres Gewebe auf.

Standzeit 8 Wochen: Letztendlich wiesen 64 % aller Pinein- oder -austrittsstellen einen Pinkallus auf. Davon befanden sich mehr als zwei Drittel (70 %) lateral. An P1 (15 %) waren sie besonders ausgeprägt (1,875 – 3,5 mm). P2, P3 und P4 (85 %) zeigten gleiche Kallusgrößen die meist (80 %) kleiner als 1,875 mm waren. Die medialen Pinkalli (30 %) traten hauptsächlich (60 %) an P2 und P3 auf und waren eher klein ($\leq 1,25$ mm) auf (50 %).

Die Zahl der Osteolysen sank leicht (19 %). Dies war sowohl auf die wiederkehrende vollständige Verdichtung betroffener Bereiche (16 %), als auch auf das Ausbleiben neu auftretender Dichteverringeringen zurückzuführen. Von den Osteolysen zeigten einige (15 %) eine diffus verringerte Dichte. Die Übrigen hatten eine deutliche verringerte Röntgendichte mit einer geringen ($\leq 0,625$ mm) (19 %), großen (0,626 – 1,25 mm) (30 %) oder sehr großen Ausdehnung ($> 1,25$ mm) (15 %). Größere Zonen folgten weiterhin dem Trend zur Dichtezunahme, wodurch einige (21 %) leichte Verschattungszone vorlagen. Sie verteilten sich gleichmäßig auf die vier Pins, hauptsächlich lateral (82 %).

4.3 Histologische Auswertung

4.3.1 Deskriptive Auswertung nach der achtwöchigen Standzeit

Die deskriptive Auswertung erfolgte nach der achten Standwoche anhand der Movat Pentachrom-Übersichtsfärbungen von jeweils acht Tieren der Kontroll- und Versuchsgruppe. Sie wurden unter dem Lichtmikroskop (Vergrößerung 2,5-fach, 5-fach, 10-fach, 20-fach, 40-fach) untersucht, wobei als Orientierung die Einteilung des Schnittbildes in die bereits erwähnten Sub-ROIs (Punkt 3.6.1 + Abb. 3.7) diente. Abb. 3.5.c + 4.4 zeigen Movat Pentachrom gefärbte Präparate wie sie sich im Lichtmikroskop darstellen.

In der Übersicht ist die Kortikalis in Form von vier horizontal liegenden Rechtecken zu sehen. Im Zentrum der ROI befindet sich die vertikal verlaufende Osteotomie. Direkt an die periostalen Kortikalisbereiche angrenzend ist das periostale Kallusgewebe zu erkennen. Zwischen den Kortikalisrechtecken befindet sich der horizontal verlaufende Knochenmarksraum. Dieser beinhaltet in Nähe des Osteotomiespaltes den endostalen Kallus.

4.3.1.1 Der periostale Kallus

Kontrollgruppe:

An sämtlichen Kortikalisrechtecken war ein periostaler Kallus festzustellen, welcher streifenförmig vom Pin bis zum Rand des Osteotomiespaltes verlief (Abb. 4.4). Zwischen allen sich gegenüberliegenden Kallusenden hatte sich eine knöcherne Überbrückung der Osteotomie (Union) gebildet (Abb. 4.4 + 4.5).

Überwiegend (72 %) waren die Kalli dünn (0,626 – 1,25 mm), viele wurden jedoch zum Spalt hin etwas dicker (56,5 %) und bildeten eine wellenförmige Erhebung über der Osteotomie (Abb. 4.4). Andere (37,5 %) verliefen parallel zur zugehörigen Kortikalis (Abb. 4.4) und nur wenige (6 %) wurden am Pin dicker (Abb. 4.5). Die Kalli bestanden aus kompaktem Geflechtknochen. Stets waren die inliegenden Osteozyten (Abb. 4.7) und häufig gelb oder hellgrün angefärbte Bereiche frisch mineralisierten, hyalinen Knorpels mit degenerierten oder selten hypertrophen Chondrozyten (Abb. 4.7) erkennbar. Zur Osteotomie hin war der Geflechtknochen mit mehreren kleinen ($\leq 0,625$ mm), selten größeren (0,626 – 1,25 mm) Kavernen durchsetzt, welche mesenchymales Gewebe mit vielen Gefäßen enthielten, vor allem, wenn das benachbarte Brückengewebe frisch mineralisierten Knorpel enthielt (Abb. 4.6 + 4.7). An den Kalli anliegend fanden sich häufig Osteoblasten (Abb. 4.7 + 4.11), Osteoklasten kamen selten vor (Abb. 4.7 + 4.22).

Innerhalb der periostalen Kalli hatte sich meist (91 %) ein zweiter Knochenmarksraum mit mesenchymalem Gewebe gebildet. Er zog vom angrenzenden Pin bis hinter das Kallusende, welches Kontakt mit der Kortikalis hatte (Abb. 4.4). Periostal erfolgte die Abgrenzung durch einen dünnen Geflechtknochenstreifen des Kallus, endostal durch die Kortikalis. Bei einem Tier hatten sich die gegenüberliegenden Kallusenden zu einer schmalen, durchgehenden

Ergebnisse

Geflechtknochenlinie verbunden. Unter dieser „Außenschale“ konnten die zweiten Knochenmarksräume durchgehend über die Osteotomie hinweg ziehen (Abb. 4.5).

Auch das kallöse Brückengewebe zwischen den zwei sich gegenüberliegenden Kallusenden bestand aus Geflechtknochen. Dennoch ließ sich das „ältere“ Kallusgewebe meist (75 %) strukturell vom „jüngeren“ Überbrückungsgewebe abgrenzen (Abb. 4.4). Bei einigen Kalli (25 %) war diese Abgrenzung nicht möglich, da diese und das Brückengewebe histologisch die gleiche Struktur aufwiesen (Abb. 4.5). Meist (69 %) enthielt das Brückengewebe größere Areale an gelb oder hellgrün gefärbtem, somit frisch mineralisiertem, hyalinem Knorpel (Abb. 4.6) mit zugrunde gehenden oder degenerierten Chondrozyten. Einige (31 %) Brücken wiesen auch wenige kleine, dunkelgrün gefärbte Knorpelhöfe mit hypertrophen Chondrozyten auf (Abb. 4.7). Wenn überhaupt, dann lagen innerhalb des Brückengewebes nur wenige und kleine Kavernen vor, meist leer oder mit einem Gefäß (Abb. 4.6). Zwei Überbrückungen eines Tieres zeigten ansatzweise schon die erwähnte durchgehende Geflechtknochenlinie der äußeren Kallusbereiche. Unterhalb dieser wies das Brückengewebe teils große Kavernen mit mesenchymalem Gewebe und nur noch wenige, kleine Geflechtknochenreste auf (Abb. 4.5).

Beim Vergleich der Kalli an den Kortizes I, II, III und IV waren keine nennenswerten Unterschiede festzustellen.

Ergebnisse

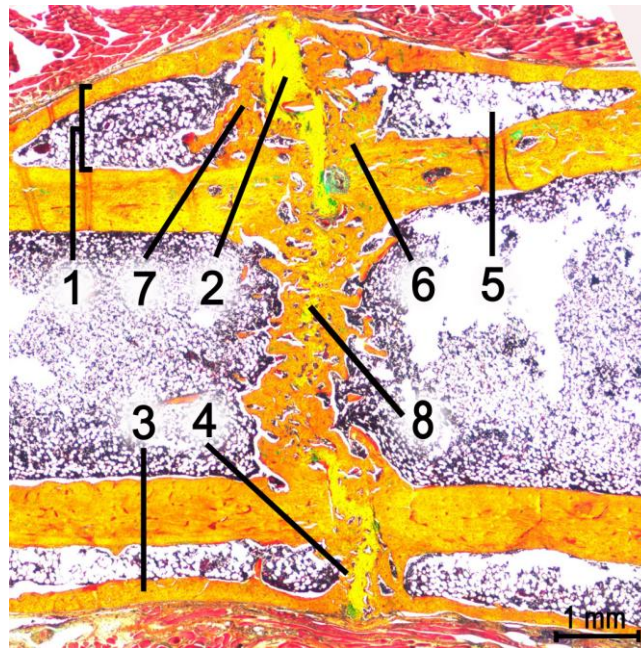


Abb. 4.4: Übersichtsdarstellung einer Überbrückung (Union) des Osteotomiespalt; die periostalen und endostalen Kalli sowie die Kortizes sind knorpelig-knöchern miteinander verbunden; Kontrollgruppe, Tier 181; Movat-Pentachrom Färbung

- 1 Periostaler Kallus (proximo-lateral)
- 2 Überbrückung (Union) mit knöchern-knorpeligem, spaltfüllendem Brückengewebe und zum Spalt hin an Stärke zunehmendem periostalen Kallus, wodurch eine wellenförmige Erhebung entsteht
- 3 Zur Kortikalis parallel verlaufender periostaler Kallus mit längsorientiertem, äußerem Kallusstreifen
- 4 Strukturell deutlich abgrenzbares Kallusende, hier in den Osteotomiespalt hinein ragend
- 5 Neu gebildeter zweiter Knochenmarkraum innerhalb des periostalen Kallus
- 6 Kallus-Kortikalis-Kontaktstelle
- 7 Vom Osteotomiespalt entfernt liegendes Kallusende
- 8 Knöchern miteinander verbundene endostale Kalli

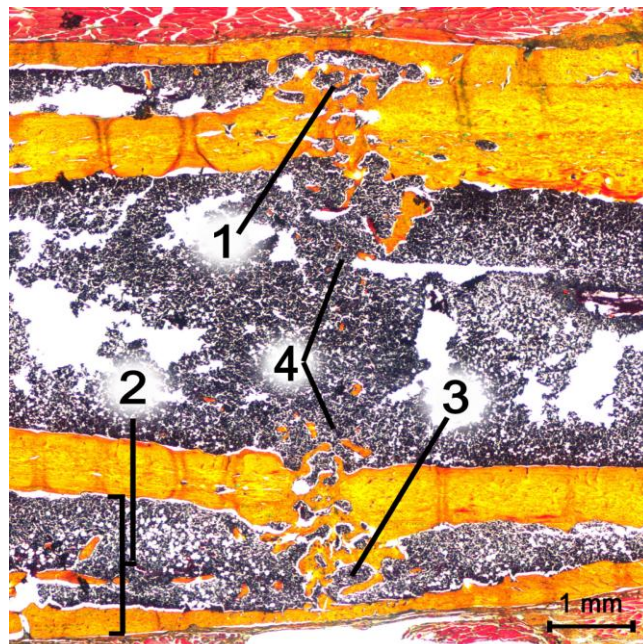


Abb. 4.5: Übersichtsdarstellung einer knöchernen Überbrückung (Union) des Osteotomiespalt kortikal und periostal, sowie durchgehendem Knochenmarkskanal geschaffen im Zuge des Remodeling; Kontrollgruppe, Tier 209; Movat-Pentachrom Färbung

- 1 Knöcherne Überbauung des Osteotomiespalt, wobei die Kallusenden strukturell vom spaltfüllenden Gewebe nicht mehr zu differenzieren sind
- 2 Periostaler Kallus zum Pin hin an Stärke zunehmend
- 3 Weitgehend durchgängiger 2. Knochenmarkskanal; im Osteotomiebereich noch mit einigen verbliebenen Geflechtknochenbalken durchbaut, wodurch sich große Kavernen mit mesenchymalem Gewebe bilden; kein direkter Kallus-Kortikalis-Kontakt mehr sichtbar
- 4 Vom endostalen Kallus sind nur noch wenige, kleine Geflechtknochenbalken zu sehen

Ergebnisse

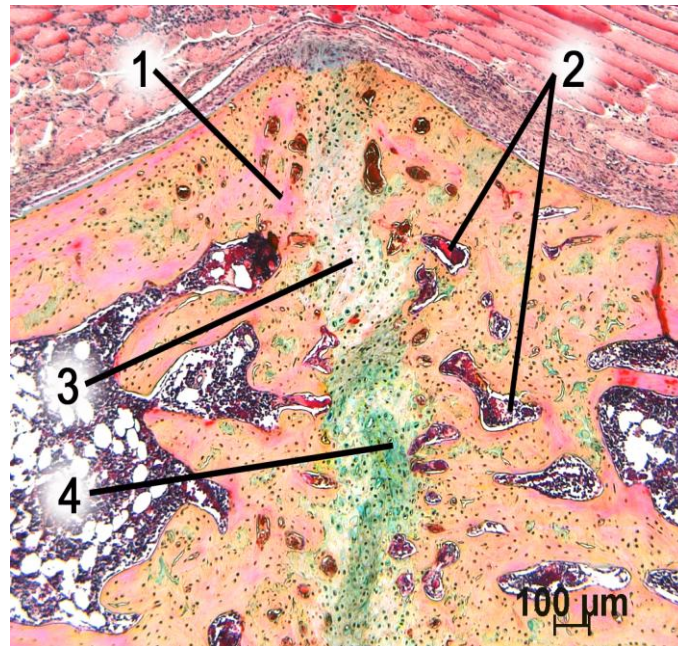


Abb. 4.6: Ausschnitt aus der lateralen Osteotomie-Überbrückung des periostalen Kallus; nachdem die Kallusfronten vom jeweiligen Kortikalisrechteck ausgehend aufeinander zugewachsen sind, verbinden sie sich über eine zunächst knorpelige Verbindung; Kontrollgruppe, Tier 187; Movat-Pentachrom Färbung

- 1 Proximo-laterales Kallusende aus Geflechtknochen
- 2 Kavernen mit Gefäßen und mesenchymalem Gewebe
- 3 Überbrückung mit frisch mineralisiertem, knorpeligem Brückengewebe
- 4 Hyaline Knorpelbereiche im Brückengewebe

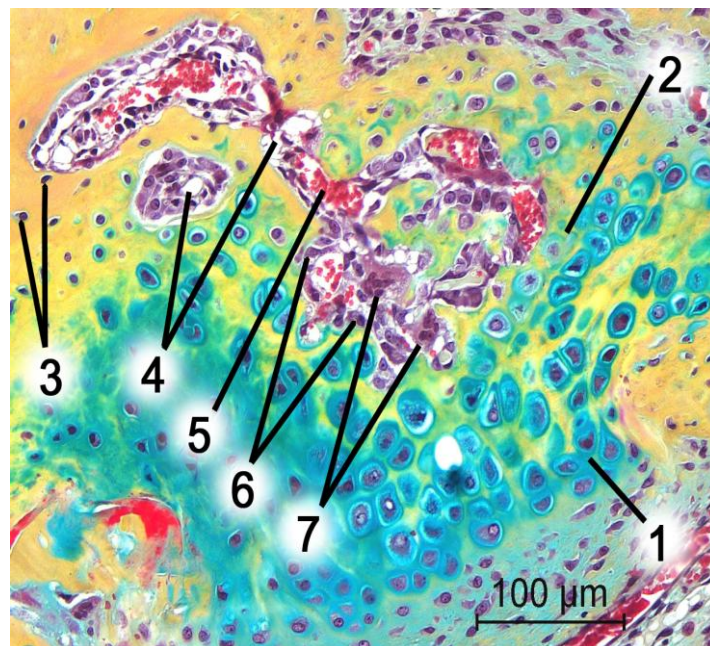


Abb. 4.7: Ausschnitt aus einem verknöchernden Bereich; Versuchsgruppe, Tier 231; Movat-Pentachrom Färbung

- 1 Dunkelgrün angefärbter, hyaliner Knorpel mit seinen großblasigen Chondrozyten
- 2 Gelb angefärbte Bereiche innerhalb des Knorpels beginnen zu kalzifizieren und beinhalten degenerierende Chondrozyten
- 3 Osteozyten im Geflechtknochen
- 4 Kaverne mit :
- 5 Gefäßen
- 6 Osteoblasten
- 7 Osteoklasten

Versuchsgruppe:

Auch in dieser Gruppe wies jedes Kortikalisrechteck einen periostalen Kallus auf. Allerdings bildete sich nur in einem Fall eine knöcherne und in einem weiteren Fall eine knorpelige Überbrückung (Union) (beide medial) (Abb. 4.6). Die übrigen Tiere wiesen keine Überbrückung (Nonunion) durch die periostalen Kalli auf (Abb. 4.8).

Auch hier waren die meisten Kalli (75 %) dünn (0,626 – 1,25 mm). In dieser Gruppe wurden nur wenige Kalli (9 %) am Spalt dicker. Viele verliefen parallel zur Kortikalis (41 %) (Abb. 4.4) oder verdickten sich am Pin (50 %), teilweise bis zu Ausmaßen von 2,5 mm, aufgrund vorliegender Pinkalli (Abb. 4.8). Die nicht überbrückenden Kalli liefen zum Osteotomiespalt hin spitz an der Kortikalis anliegend aus (47 %) oder endeten abrupt (44 %) wobei sie eine Art Front bildeten, wenige (9 %) bildeten eine lawinenförmige Nase (Abb. 4.8). Im Geflechtknochen der Kallusenden waren ebenfalls stets die innliegenden Osteozyten und häufig (37,5 %) kleine ($\leq 0,625$ mm) Areale mit frisch mineralisiertem, hyalinen Knorpel festzustellen. Selten (6 %) saß an den frontenbildenden Kallusenden zum Spalt gerichtet eine schmale Kappe aus dunkelgrünem, hyalinem Knorpel mit hypertrophen Chondrozyten auf. Die frontenbildenden Kallusenden beinhalteten in Spaltnähe oft kleine ($\leq 0,625$ mm) Kavernen mit Gefäßen, mesenchymalem Gewebe oder Bindegewebe. Das kompakte Knochengewebe der spitz auslaufenden Kallusenden enthielt dagegen selten Kavernen, meist mit kleinen Gefäßen (Abb. 4.7). Die Kallusenden befanden sich stets (100 %) in der Kauterzone von 2 mm. Dabei lagen einige Kalli (25 %) sehr nah ($\leq 0,625$ mm) an der Osteotomie, viele (41 %) endeten in dessen Nähe (0,626 - 1,25 mm) und einige (34 %) weiter entfernt (1,25 - 1,875 mm) (Abb. 4.8 + 4.9).

Beinahe alle periostalen Kalli (97 %) wiesen einen zweiten Knochenmarksraum mit mesenchymalem Gewebe auf (Abb. 4.8). Jedoch waren die Knochenmarksräume dieser Gruppe oft (53 %) kleiner oder durch knöcherne Kallus-Kortikalis-Kontakte geteilt, teilweise stellten sich diese Kontaktbereiche recht breit dar (Abb. 4.8).

Die eine knöcherne Überbrückung entsprach histologisch denen der Kontrolltiere, wobei sie vereinzelt grüne, nicht mineralisierte Bereiche enthielt. Die hyalin-knorpelige Überbrückung zeigte viele gelbe, mineralisierende Knorpelhöfe. Sie war völlig frei von Kavernen und enthielt viele hypertrophe und einige degenerierte Chondrozyten (Abb. 4.6).

Insgesamt ließen die Kalli an den Kortizes I, II, III und IV keine Unterschiede untereinander erkennen.

Ergebnisse

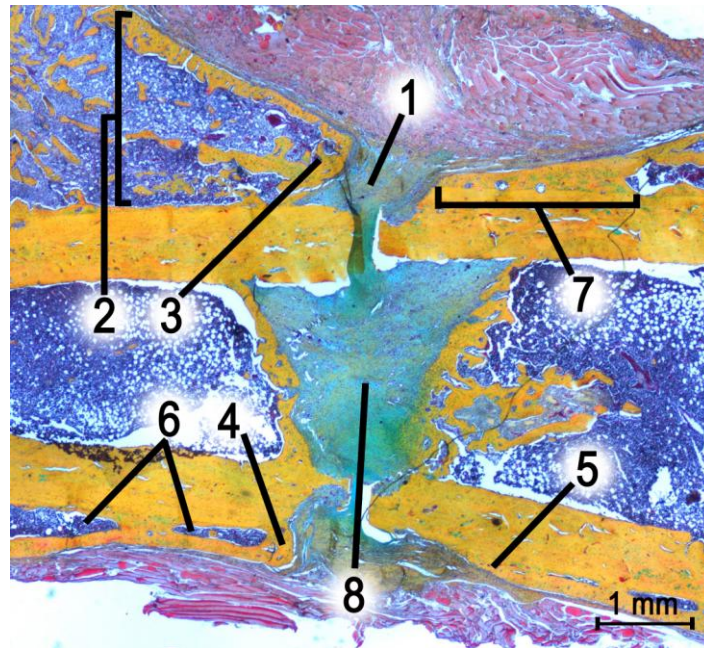


Abb. 4.8: Übersichtsdarstellung einer ausbleibenden Überbrückung (Nonunion) des Osteotomiespalt; die periostalen und endostalen Kalli liegen weit vom Osteotomiespalt entfernt und sind nicht miteinander verbunden; Versuchsgruppe, Tier 198; Movat-Pentachrom Färbung

- 1 Nicht überbrückter Osteotomiebereich, zwischen den Kallusenden hat sich Bindegewebe gebildet
- 2 Zum Pin hin ansteigender periostaler Kallus, hier aufgrund eines ausgeprägten Pinkallus
- 3 Lawinenförmig auslaufendes periostales Kallusende
- 4 In Form einer Front endendes periostales Kallusende
- 5 Spitz auslaufendes periostales Kallusende, weit vom Osteotomiespalt entfernt liegend
- 6 Unterteilter zweiter Knochenmarkraum
- 7 Breiter Kallus-Kortikalis-Ansatz
- 8 Im endostalen Spaltbereich liegt viel Bindegewebe vor

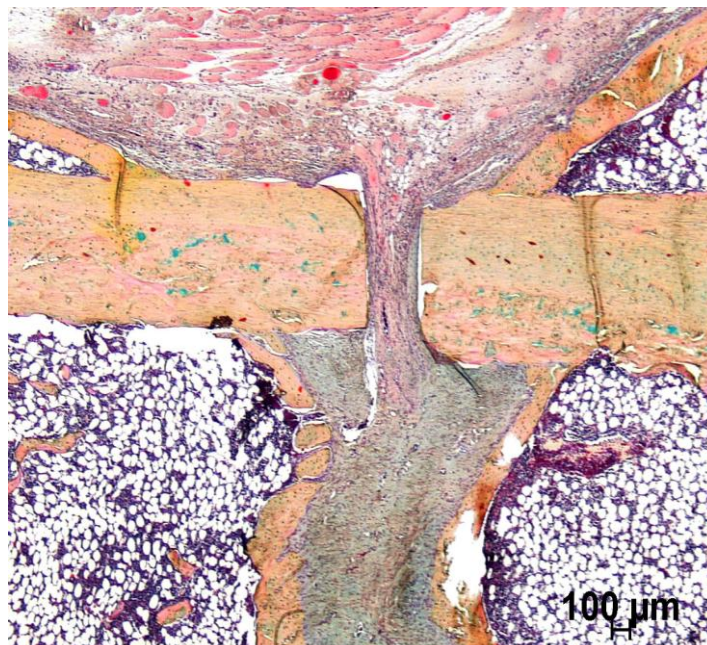


Abb. 4.9: Ausschnitt aus dem lateralen Osteotomiespaltbereich einer Nonunion; Versuchsgruppe, Tier 249; Movat-Pentachrom Färbung

Zwischen den Kortikalisenden und den endostalen Kalli liegt viel lockeres Bindegewebe vor

4.3.1.2 Das Periost

Kontrollgruppe:

Das dem periostalen Kallus aufliegende Periost zeigte deutlich ein mehrschichtiges, bindegewebiges Stratum fibrosum. Auffallend war, dass es sich ab den Schnittkanten der Osteotomie verdickte. Dann zog es, auf dem spaltfüllenden Brückengewebe liegend, über den Spalt hinweg (Abb. 4.10).

Dem Knochen anliegend waren die etwa ein bis drei Progenitorzellschichten des Stratum osteogenicum sive cambium zu erkennen. Auch dieses nahm im Osteotomiebereich häufig (62,5 %) an Stärke zu. Dessen Zellschichten endeten jedoch am frisch mineralisierten oder knorpeligen Brückengewebe, so dass das Str. fibrosum über die Osteotomie ohne das Str. cambium über die Osteotomie verlief. Bestand das Brückengewebe jedoch aus „älterem“ Geflechtknochen, so zog das Str. cambium ebenfalls kontinuierlich darüber hinweg (Abb. 4.10). Auf der Oberfläche des periostalen Kallus und dem Brückengewebe lagen häufig einzelne Osteoblasten, welche manchmal auch kleine, perlschnurartige Aneinanderreihungen bildeten (Abb. 4.11). Nur wenige Kallusenden und Brücken (9 %) wiesen keine Osteoblasten auf.

Im Periost waren nur wenige Gefäße, vornehmlich in Spaltnähe, zu finden. Auffällig waren die vielen großen Gefäße im Muskel- und Fettgewebe um die Osteotomie herum (Abb. 4.10).

Versuchsgruppe:

Hier verdickte sich das mehrschichtige Str. fibrosum in größerer Entfernung vom Osteotomiespalt, auf Höhe des zugehörigen Kallusendes (Abb. 4.13). Die Orientierung der Bindegewebsschichten war dabei abhängig von den Prozessen am Osteotomiebereich. Zunächst folgte das Str. fibrosum der Kallusoberfläche. Bei einem Teil (62,5 %) der ausbleibenden Überbrückungen, vornehmlich bei den frontenbildenden Kallusenden, löste es sich am Kallusende und die außen liegenden Bindegewebsschichten zogen durchgehend über die Osteotomie hinweg, während sich die inneren Schichten fächerförmig im spaltfüllenden Gewebe verteilten (Abb. 4.12). Bei den übrigen ausbleibenden Überbrückungen (37,5 %), meist bei den spitz auslaufenden Kallusenden, fächerte sich das gesamte Str. fibrosum im spaltfüllenden Gewebe oder im umliegenden Muskel- bzw. Fettgewebe auf (Abb. 4.13). Im Fall der beiden Überbrückungen (12,5 %) verliefen die Schichten des Str. fibrosum, der Kontrollgruppe entsprechend, über das spaltfüllende Gewebe hinweg (Abb. 4.10).

Bei den ausbleibenden Überbrückungen der Versuchsgruppe nahm das ein- bis dreischichtige Str. cambium v.a. an den frontenbildenden Kallusenden meist zum Spalt hin an Stärke zu (41 %) (Abb. 4.12) oder änderte seine Stärke nicht (25 %). Dabei waren die Kallusenden und deren angrenzende gekauterte und kallusfreie Kortikalisoberflächen vom Str. cambium mit seinen Progenitorzellen bedeckt (50 %) (Abb. 4.13). Allerdings zogen die

Schichten des Str. cambium nicht über den Osteotomiespalt hinweg, sondern verloren sich in diesem. An einigen, vor allem spitz auslaufenden, periostalen Kalli traten jedoch sich verjüngende Zellschichten auf (34 %), welche an den Kallusenden stets ausliefen, so dass auch die angrenzenden Kortikalisoberflächen nicht bedeckt waren (Abb. 4.13). Im Falle der knorpeligen Überbrückung stoppten diese Progenitorzellschichten bei Erreichen des Brückengewebes, über die knöcherne Brücke liefen sie kontinuierlich hinweg.

Auf der Oberfläche des periostalen Kallus waren ebenfalls meist einzelne Osteoblasten und Osteoblastensäume zu erkennen (Abb. 4.11). An einigen Kallusenden (28 %) konnten jedoch keine Osteoblasten festgestellt werden. Auf den kallusfreien Kortikalisoberflächen befanden sich, im Falle der Weiterführung einzelner Schichten des Str. cambium, nur sehr wenige Progenitorzellen und Osteoblasten. Ansonsten lagen hier keine entsprechenden Zellen vor (Abb. 4.13).

Gefäße wies das Periost der Versuchsgruppe in ähnlichem Maße auf wie die Kontrollgruppe. Allerdings waren bei den ausbleibenden Überbrückungen wesentlich weniger Gefäße im umliegenden Muskel- und Fettgewebe herum zu finden.

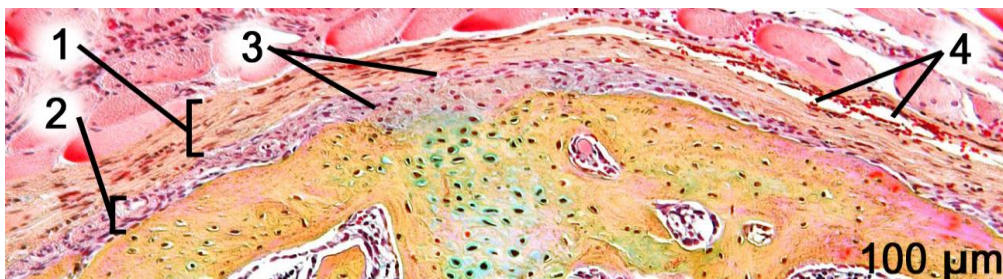


Abb. 4.10: Ausschnitt vom periostalen Kallus mit aufliegendem Periost auf Höhe des Osteotomiebereiches; Kontrollgruppe, Tier 193; Movat-Pentachrom Färbung

- 1 Über das spaltfüllende Brückengewebe hinweg ziehendes Stratum fibrosum
- 2 Stratum cambium, zum Osteotomiebereich an Stärke zunehmend
- 3 hier teilweise vor dem spaltfüllenden Brückengewebe endend, wenige Schichten ziehen über das spaltfüllende Gewebe hinweg
- 4 Gefäße

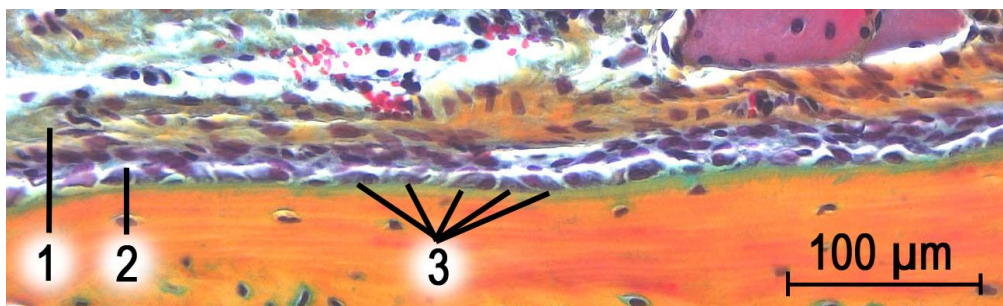


Abb. 4.11: Ausschnitt aus dem Periost; Kontrollgruppe, Tier 181; Movat-Pentachrom Färbung

- 1 Stratum fibrosum
- 2 Stratum cambium
- 3 Perlschnurartig aneinander gereihte Osteoblasten auf der Knochenoberfläche der Kortikalis

Ergebnisse

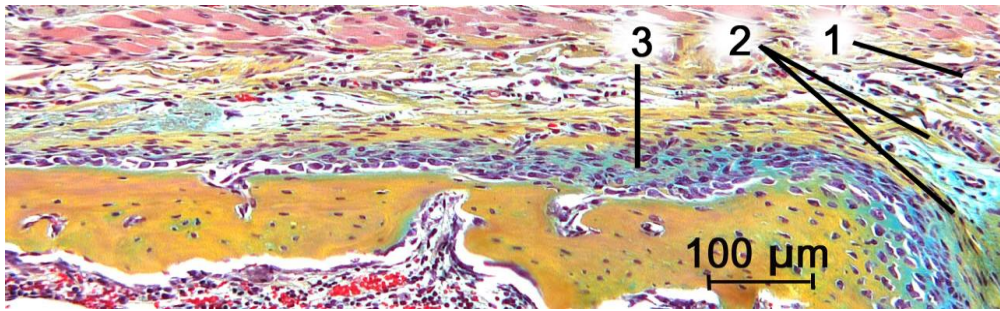


Abb. 4.12: Ausschnitt von einem Kallusende mit aufliegendem Periost bei einer Nonunion; der Osteotomiespalt befindet sich rechts im Bild; Versuchsgruppe, Tier 198; Movat-Pentachrom Färbung

- 1 Die außen liegenden Bindegewebsfasern des Stratum fibrosum ziehen über den Spaltbereich hinweg
- 2 Die innen liegenden Fasern verteilen sich fächerförmig im spaltfüllenden Binde- und Knorpelgewebe
- 3 Deutlich zu sehen ist hier die zum Osteotomiespalt hin zunehmende Stärke der Zellschichten des Stratum cambium

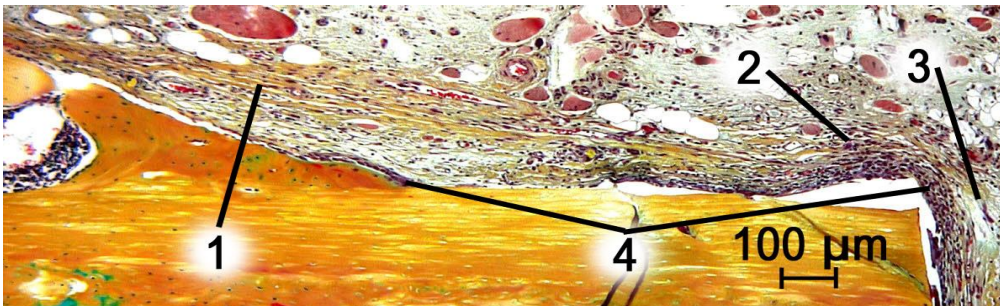


Abb. 4.13: Ausschnitt von einem Kortikalisrechteck mit periostalem Kallus und aufliegendem Periost bei einer Nonunion; Versuchsgruppe, Tier 249; Movat-Pentachrom Färbung

- 1 Das Stratum fibrosum verdickt sich am Kallusende und hebt sich leicht ab
- 2 Es verliert sich größtenteils vor Erreichen des Osteotomiespalt
- 3 Einzelne bindegewebige Fasern ziehen in den Osteotomiespalt hinein
- 4 Das Stratum cambium stellt sich hier sehr dünn dar und ist teilweise gar nicht vorhanden; an einzelnen Lokalisationen sind Progenitorzellen und Osteoblasten zu sehen

4.3.1.3 Der endostale Kallus

Kontrollgruppe:

Alle Tiere wiesen einen proximalen und distalen endostalen Kallus (100 %) auf. Meist (62,5 %) erstreckten sich diese quer durch den Knochenmarkskanal von einer Kortikalis zur anderen und grenzten das Knochenmark von der Osteotomie ab (Abb. 4.14). Während der Standzeit hatten sich der proximale und distale Kallus im Osteotomiebereich verbunden, so dass eine zentrale, meist ausmineralisierte, Geflechtknochenbrücke entstand (Abb. 4.4). Diese war an den Kortizes etwa 1,25 mm breit, zum Zentrum des Knochenmarksraumes hin verjüngte sie sich (Abb. 4.14). Durch fortgeschrittene Remodelingprozesse wiesen drei Tiere nur noch Reste der endostalen Kalli (37,5 %) auf (Abb. 4.5).

Innerhalb der endostalen Kalli traten selten kleine, grün angefärbte, hyaline Knorpelareale mit hypertrophen oder degenerierten Chondrozyten (Abb. 4.17) auf. Kleine Kavernen ($\leq 0,625$ mm) kamen häufig vor (Abb. 4.14). Lagen diese im Bereich der kallösen Verschmelzungslinie, so enthielten sie meist Bindegewebe, viele Gefäße und Osteoblasten. Befanden sich die Kavernen in Knochenmarksnähe, so beinhalteten sie gefäßreiches mesenchymales Gewebe und vornehmlich Osteoklasten. Zwei Tiere zeigten nur leicht ver-

schmolzene Kalli. Zwischen den Kallusfronten lagen lange, quer verlaufende Kavernen, mit einer Breite von ca. 0,625 mm und viel Bindegewebe bzw. etwas Faserknorpel (Abb. 4.14).

Insgesamt waren endostal um die Kalli herum sehr viele Blutgefäße zu erkennen. Eine Ausnahme bildeten die zwei Tiere, welche innerhalb der Kalli noch viel Bindegewebe aufwiesen. Dieses enthielt nur wenige Gefäße. Im Geflechtknochen selbst waren wenige, kleine Gefäße zu erkennen, im Faser- oder hyalinen Knorpel kamen sehr selten Gefäße vor.

Versuchsgruppe:

Auch hier besaßen alle Tiere endostale Kalli, einem Tier fehlte dieser jedoch distal. Die Kalli erstreckten sich ebenfalls quer durch den Knochenmarksraum von einer Kortikalis zur anderen, allerdings standen sich der proximale und distale Kallus meist (75 %) in Form zweier Fronten gegenüber (Abb. 4.15). Meist waren die Kalli gleichbleibend 0,32 – 0,625 mm breit. Ein Tier trug einen Kallus mit Geflechtknochenausläufern tief in den Knochenmarksraum hinein, ein weiteres Tier präsentierte distal zwei hintereinander liegende Fronten. Bei nur zwei Tieren verschmolzen die Kallusfronten (25 %) im Osteotomiebereich und bildeten knöcherne Brücken (Abb. 4.4). Diese waren etwa 1,25 mm breit. Die eine Brücke bestand aus ausmineralisiertem Geflechtknochen mit wenigen degenerierten Chondrozyten, die andere Brücke wies teils frisch mineralisiertes, hyalines Knorpelgewebe mit vielen hypertrophen und degenerierenden Chondrozyten auf.

Die endostalen Kalli setzten stets innerhalb der kürettierten Zone an der Kortikalis an (Abb. 4.15). Häufig (37,5 %) wiesen sie eine zentrale Biegung auf deren Scheitelpunkt sich zur Osteotomie zog und daher meist in den Spalt hineinragte. Auf diesem Scheitelpunkt trugen einige Kalli (25 %) eine dünne, hyaline Knorpelkappe. Wenige Kalli verliefen parallel zur Osteotomie (12,5 %), standen schräg (12,5 %), oder verliefen in kleinen Schleifen (6 %) (Abb. 4.15). Auch im Spaltbereich in der Nähe der Kortikalis zeigten einige Kalli (24 %) hyaline Knorpelbereiche.

Im Geflechtknochen der endostalen Kalli waren häufig kleine, grün angefärbte Knorpelareale mit hypertrophen, zugrundegehenden oder -gegangenen Chondrozyten und in Spaltnähe viele Osteoblasten enthalten. Kavernen (\leq 0,625 mm) traten häufiger auf als bei der Kontrollgruppe und zeigten ebenso lageabhängig eine entsprechende Füllung, jedoch wesentlich häufiger Bindegewebe. Stellenweise waren fein granulierte, ungeordnete Hämatomreste mit enthaltenen Entzündungszellen oder kleine amorph-beige Serumtropfen erkennbar. Ein Tier wies spaltnah etwas Faserknorpel auf. Häufig traten schmale Unterbrechungen der Kalli auf, so dass der Übergang vom Markgewebe zum spaltfüllenden Gewebe fließend war (Abb. 4.15).

Blutgefäße waren, wie bei der Kontrollgruppe beschrieben, aufzufinden. Allerdings stellten sich die knöchernen Kalli der Versuchsgruppe insgesamt weniger kompakt dar und es lagen mehr Blutgefäße vor.

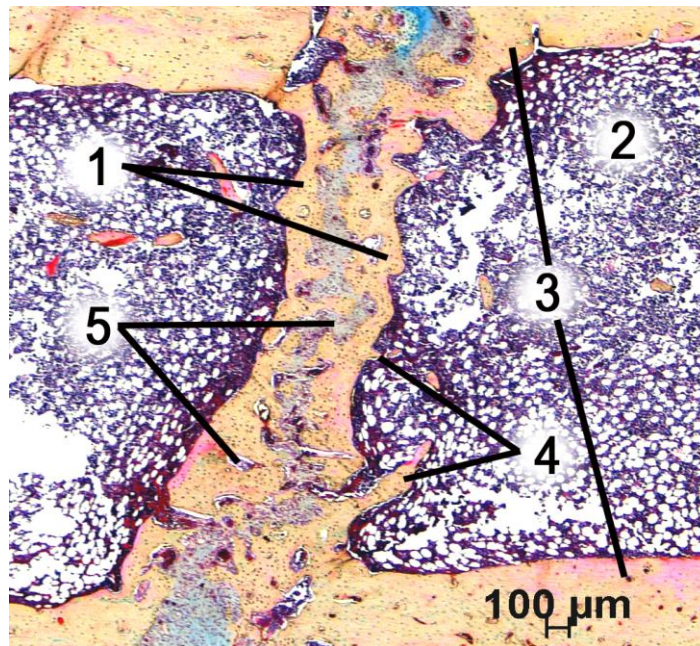


Abb. 4.14: Übersichtsdarstellung einer knöchern-knorpeligen Überbrückung (Union) des Osteotomiespaltes im Bereich des endostalen Kallus; Kontrollgruppe, Tier 181; Movat-Pentachrom Färbung

- 1 Quer durch den Knochenmarkskanal verlaufende endostale Kalli, zentral im Bereich des Osteotomiespaltes miteinander verbunden; An den Kortikalisansätzen ist diese Brücke breiter, zum Zentrum hin verjüngt sich diese
- 2 Vom Osteotomiebereich abgegrenztes Knochenmark
- 3 An das Knochenmark angrenzende Bereiche der Kortikalis
- 4 Fingerförmige Geflechtknochenbalken meist längs orientiert
- 5 Kavernen innerhalb des endostalen Kallus enthalten in der Nähe des Osteotomiespaltes Bindegewebe und Faserknorpel und in der Nähe des Knochenmarks mesenchymales Gewebe; hier liegen mehrere große, sich quer erstreckende Kavernen vor, da die endostalen Kalli an vielen Bereichen nicht verbunden sind

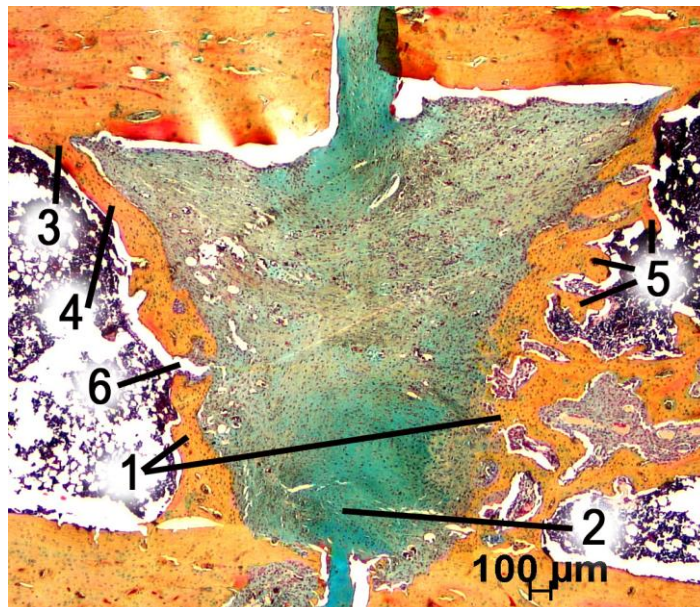


Abb. 4.15: Übersichtsdarstellung bei einer ausbleibenden Überbrückung (Nonunion) im Bereich des endostalen Kallus; Versuchsgruppe, Tier 198; Movat-Pentachrom Färbung

- 1 Der proximale und distale endostale Kallus stehen sich in Form zweier Fronten gegenüber und bilden einen zum Osteotomiespalt gelegenen kappenförmigen Verschluss des Knochenmarks; die Kalli verlaufen hier leicht schräg und bilden eine Biegung mit zentralem Scheitelpunkt zum Osteotomiespalt hin; hier ragen die endostalen Kalli nicht in den Osteotomiebereich hinein und es sind keine größeren hyalinen Knorpelbereiche sichtbar
- 2 Im Spaltbereich ist keine Verbindung der endostalen Kalli festzustellen; es liegt viel Bindegewebe vor
- 3 Ansatzstelle des endostalen Kallus an der Kortikalis (proximo-lateral)
- 4 Orientierung des endostalen Kallus quer zur Femurlängsachse
- 5 Orientierung des endostalen Kallus in Längsachse mit fingerförmigen Ausstülpungen
- 6 Schmale Unterbrechungen der endostalen Kalli, so dass an dieser Stelle keine Abgrenzung zum Knochenmark erfolgt

4.3.1.4 Der Osteotomiespalt

Kontrollgruppe:

Der periostale und endostale Osteotomiebereich wies durch die Überbrückungen häufig Kallusgewebe auf, welches bereits im Zuge der Schilderung der periostalen und endostalen Kalli beschrieben wurde (Punkt 4.3.1.1 + 4.3.1.3).

Zwischen den gegenüberliegenden Kortikalisenden war die Osteotomie ebenfalls bei allen Tieren durch Kallusgewebe überbrückt. Dieses bestand meist aus Geflechtknochen (56 %), in einigen Fällen (25 %) aus hyalinem Knorpelgewebe, manchmal aus beidem (19 %) (Abb. 4.4 + 4.5). Häufig waren Kavernen ($\leq 0,625$ mm) mit mesenchymalem Gewebe, selten auch mit Bindegewebe, enthalten.

Versuchsgruppe:

In dieser Gruppe existierten zwei periostale und zwei endostale Kallusbrücken, deren Beschreibung ebenfalls schon erfolgte (Punkt 4.3.1.1 + 4.3.1.3).

Der periostale Spaltbereich lag bei den ausbleibenden Überbrückungen, bei denen die Kallusenden spitz ausliefen (47 %), außerhalb der ROI (Abb. 4.9). Denn das Periost lag den Kallusenden zunächst auf um anschließend auf der Kortikalisoberfläche zur gegenüberliegenden Seite zu ziehen. Daher befand sich der periostale Spaltbereich außerhalb des Periosts und enthielt umliegendes Muskel- oder Fettgewebe. Zwischen den sich gegenüberliegenden frontenförmigen Kallusenden (53 %) befand sich teils lockeres, teils dichtes gefäßarmes Bindegewebe (Abb. 4.19). Selten war hyaliner Knorpel (3 %) oder zellarmer, hellgrün angefärbter Faserknorpel (3 %) zu sehen.

Die Intrakortikalspalte beinhalteten überwiegend Bindegewebe (Abb. 4.9). Die Fasern des Bindegewebes zogen meist vom periostalen Spaltbereich kommend in den Intrakortikalspalt hinein (Abb. 4.19 + 4.21). Ein Tier zeigte medial und lateral knorpelige bzw. teils frisch mineralisierte Überbrückungen, welche viele kleine ($\leq 0,32$ mm), bindegewebshaltige Kavernen enthielten, ein weiteres Tier wies eine mediale Überbrückung auf.

Das spaltfüllende Gewebe im endostalen Osteotomiebereich der ausbleibenden Überbrückungen (75 %) erstreckte sich häufig über die Osteotomiegrenzen hinaus bis zu den endostalen Kallusfronten und wurde als eine Einheit betrachtet (Abb. 4.8 + 4.9). Meist zeigten die endostalen Spaltbereiche (75 %) lockeres, teils etwas dichteres Bindegewebe. Dieses enthielt besonders in Kallusnähe neben Fibrozyten und Fibroblasten auch Osteoblasten (Abb. 4.16). Deutlich waren gelbe Kollagenfasern zu differenzieren, die longitudinal ausgerichtet vor allem zentral an mehreren Stellen übergangslos in den Geflechtknochen des endostalen Kallus einstrahlten, wobei nicht zu erkennen war, ab wo eine Mineralisierung der Kollagenfasern begann (Abb. 4.16). Stellenweise waren wenige kleine ($\leq 0,32$ mm) Hohlräume mit einer amorph-beigen Füllung zu sehen welche freiliegende, rot gefärbte Erythrozyten, verbliebene Blutreste, beinhaltete (Abb. 4.16). Ebenso waren im lockeren

Bindegewebe stets einige ($\leq 0,625$ mm) Gefäße verteilt, im dichten Bindegewebe lagen weniger Gefäße vor. Das Tier mit der endostalen Knorpelbrücke (Punkt 4.3.1.3) ließ, an die Intrakortikalspalte grenzend, ebenfalls noch bindegewebige Areale erkennen.

In der Versuchsgruppe traten zwei Ausnahmefälle auf. Der erste Fall wies distal einen doppelten endostalen Kallus auf. Hier waren im spaltfüllenden Bindegewebe nur extrem wenige Gefäße zu finden. Allerdings lagen viele kleine ($\leq 0,32$ mm) Hohlräume mit einer deutlich rot bzw. rosarot gefärbten, fein granulierten Substanz, wobei es sich um Hämatomreste handelte, vor. Diese zogen sich distal zwischen die doppelten endostalen Kallusfronten. In dieser Zone herrschten viele frei liegende Erythrozyten und Entzündungszellen vor. Medial befand sich ein Entzündungszellgemisch, welches in eine hell-beige Grundsubstanz eingebettet war mit vielen, teils sehr großen Gefäßen (0,625 - 1,25 mm). An den Knochengrenzen saßen sehr viele Osteoklasten. Hinter der zweiten Kallusfront lag bis zum Pin reichend ein homogenes Entzündungsgewebe mit wenigen Gefäßen und sehr vielen Entzündungszellen vor. Angrenzend zeigte sich lateral an Pin 3 ein überdimensional großer Pinkallus (5 mm) mit Osteolyse (1,25 mm).

Beim zweiten auffälligen Tier fehlte der distale endostale Kallus. Es lag lediglich eine kleine Kallusinsel lateral und sehr weit distal in Pinnähe vor. Der osteotomiespaltnahe Knochenmarksbereich enthielt lockeres Bindegewebe. Dieses zeigte distal eine schmale Zone mit Hämatomresten. Stellenweise waren Zellansammlungen mit Erythrozyten und Entzündungszellen zu sehen. Die Zahl der Entzündungszellen war wesentlich geringer als beim vorher beschriebenen Versuchstier, wenngleich immer noch sehr hoch. Die endostalen Ränder der Kortizes zeigten ausgeprägte Resorptionen. Pinkalli konnten hier nicht festgestellt werden.

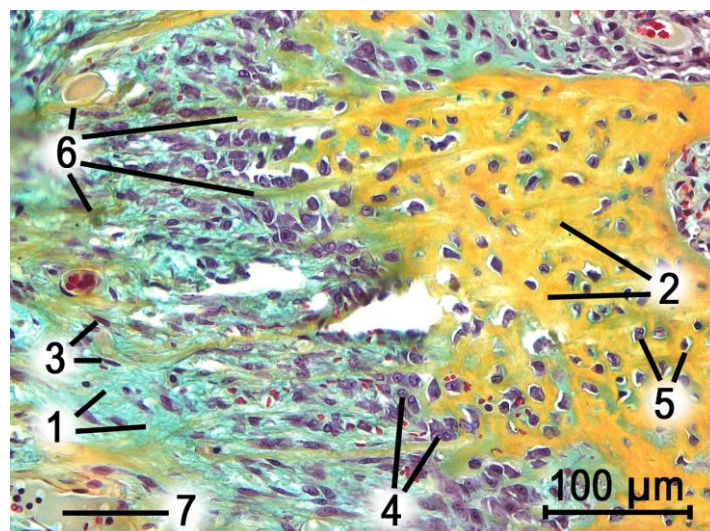


Abb. 4.16: Ausschnitt aus dem endostalen Osteotomiespaltbereich; Kontrollgruppe, Tier 273; Movat-Pentachrom Färbung

- 1 Grün angefärbtes Bindegewebe
- 2 Gelb angefärbtes mineralisiertes Knochengewebe, hier endostaler Kallus
- 3 Im Bindegewebe vorliegende Fibrozyten
- 4 An den Knochengrenzen anliegende Osteoblasten
- 5 Im Knochengewebe vorliegende Osteozyten
- 6 Im Bindegewebe verlaufende, gelb angefärbte Kollagenfasern
- 7 Beige angefärbter Blutropfen

4.3.1.5 Die Kortikalis

Kontrollgruppe:

Das gelb angefärbte Knochengewebe der Kortikalis zeigte häufig (60 %) eine längsorientierte, kompakte und wellenförmige Struktur. In kleinen Lakunen lagen die länglichen, schwarz gefärbten Osteozyten. Im Zentrum der Kortikalis stellte sich das Knochengewebe aufgelockerter dar mit einer meist ungeordneten, wirbelförmigen Struktur und rundlichen Osteozyten (Abb. 4.17). Diese traten im lockeren Knochengewebe häufiger auf als im kompakten. Einige Kortikalisbereiche wiesen auch eine ausschließlich längsorientierte, kompakte (20 %) oder ungeordnete, wirbelförmige (20 %) Knochenstruktur auf (Abb. 4.20).

Die gesamte dem Periost zugewandte Seite der Kortikalis zeigte meist (91 %) schwarz gefärbte Osteozyten. Selten enthielt das an der Osteotomie gelegene vordere Drittel (6 %) oder die gesamte Länge (3 %) des Kortikalisrechtecks blasse Zellen oder leere Osteozytenlakunen (Abb. 4.18). Endostal wiesen die gesamten Kortikalisrechtecke weniger häufig (22 %) schwarz gefärbte Osteozyten auf. Oft (44 %) blieb das spaltnahe Drittel blass bzw. leer oder aber es zeigten sich blasse Zellen auf gesamter Länge (34 %). Stets waren die Kortikalisrechtecke mit vielen sehr kleinen ($\leq 0,15$ mm) Hohlräumen mit Gefäßen durchsetzt, wobei diese im kompakteren Knochen häufiger aufzufinden waren als im aufgelockerten. In Spaltnähe traten gelegentlich (9 %) größere Hohlräume (0,32 - 0,625 mm) mit mesenchymalem Gewebe auf (Abb. 4.21).

Die Oberflächen der Kortikalis waren meist gut zu erkennen und zeigten sich vornehmlich (81 %) glattrandig oder leicht gewellt. Flache, breite Einbuchtungen von geringer Größe ($\leq 0,15$ mm) waren gelegentlich (19 %) periostal im Bereich der zweiten Knochenmarkshöhle oder selten (periostal 6 %, endostal 3 %) vor den Kallusenden feststellbar (Abb. 4.20). An den Knochengrenzen lagen hier gelegentlich Osteoklasten (Abb. 4.22). Die Kortikalisecken an der Schnittkante stellten sich mehr oder weniger abgerundet dar (90,5 %) ($\leq 0,625$ mm). Meist erfolgte ein Ersatz durch Geflechtknochen (69 %), selten durch mesenchymales Gewebe oder Bindegewebe. Nur wenige Kortikalisecken (9,5 %) waren noch vollständig vorhanden.

An Pin 2 und 3 ließen sich sehr selten (1,5 %) Osteolysen feststellen. Hier war die Kontinuität der Kortikalis unterbrochen und Bindegewebe mit vielen Entzündungszellen herrschte vor.

Versuchsgruppe:

Viele Tiere (68 %) zeigten die längsorientierte, kompakte Knochenstruktur der Kortikalis, die sich zum Zentrum hin auflockerte (Abb. 4.20). Einige Kortikalisbereiche wiesen jedoch ausschließlich kompaktes (16 %) oder aufgelockertes (17 %) Knochengewebe auf.

Periostal und endostal befanden sich im spaltnahen Drittel der Kortikalisrechtecke vornehmlich leere Osteozytenlakunen auf (50 %) oder auf ganzer Länge lagen blasse Zellen oder leere Lakunen vor (19 %) (Abb. 4.18). Einige (31 %) Rechtecke waren vollständig mit schwarzen Osteozyten gefüllt (Abb. 4.17). Im kortikalen Knochen gab es viele sehr kleine ($\leq 0,15$ mm) Hohlräume. Große Kavernen (0,32 - 0,625 mm) traten in größerer Anzahl im gesamten gekauterten Bereich auf. Befand sich im Osteotomiebereich des Kortikalisrechtecks knöcherner Kallus, so waren die Kavernen mit mesenchymalem Gewebe gefüllt (6 % der Kortikalisrechtecke). Enthielt der Osteotomiespalt Knorpel- oder auch Bindegewebe befand sich in den Kavernen gefäßarmes Bindegewebe (25 % der Kortikalisrechtecke). Insgesamt zeigten sich häufiger Osteoklasten an den Knochengrenzen der Kavernen (Abb. 4.22).

Die Oberflächen der Kortikalis waren vornehmlich (72 %) glattrandig oder leicht gewellt. Periostal ließen sich häufiger flache, breite Einbuchtungen erkennen, nur wenige waren etwas tiefer (Abb. 4.20). Endostal im Knochenmarksbereich wiesen wenige Kortikalisrechtecke (9 %) große (0,625 - 1,25 mm) Einbuchtungen auf. Aufgrund entzündlicher Prozesse im Knochenmarksraum stellten sich die distalen endostalen Kortikalisoberflächen (6 %) eines Tieres völlig zerklüftet dar. Vor den Kallusenden waren häufig Einbuchtungen zu finden. So zeigten mehrere (34 %) periostale Kortikalisoberflächen breite, flache Einbuchtungen (Abb. 4.19), einige (28 %) ließen gar kein Knochengewebe vor dem Kallusende mehr erkennen, wobei der Ersatz des Gewebes stets durch Bindegewebe erfolgte. Auch endostal fehlten einige (25 %) Kortikalisenden völlig (Abb. 4.21) oder wiesen Buchten vor der Kallusfront auf (22 %) (Abb. 4.20). Die Kortikalisecken an der Schnittkante waren, neben den bereits erwähnten völlig fehlenden Bereichen, abgerundet (16 %) ($\leq 0,625$ mm) oder in größerem Umfang (0,625 - 1,25 mm) nicht mehr vorhanden (19 %). Ein Gewebeersatz erfolgte durch Bindegewebe oder knorpelzellhaltigen Geflechtknochen. Insgesamt waren in dieser Gruppe 41 % aller Kortikalisecken vorhanden (Abb. 4.19 + 4.20). Osteolysen an den Pins 2 und 3 waren selten (6 %).

Ergebnisse

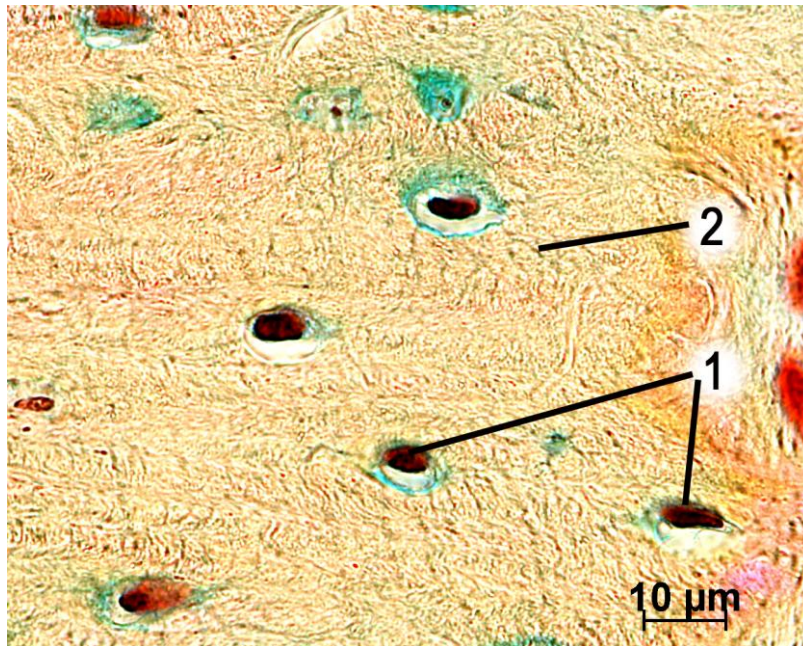


Abb. 4.17: Ausschnitt aus dem kortikalen Knochengewebe; Versuchsgruppe, Tier 198; Movat-Pentachrom Färbung

- 1 Rundliche Osteozyten in ihren Lakunen liegend
- 2 Von den Lakunen ausgehend sind die feinen Linien der Kanalikuli zu erkennen

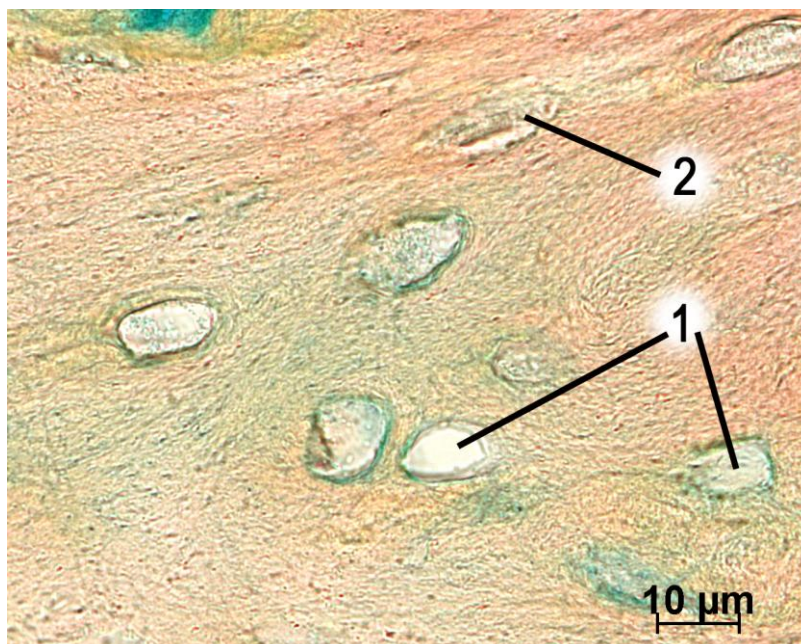


Abb. 4.18: Ausschnitt aus dem kortikalen Knochengewebe; Versuchsgruppe, Tier 198; Movat-Pentachrom Färbung

- 1 Leere Osteozytenlakunen
- 2 Blasser, degenerierter Osteozyt in seiner Lakune

Ergebnisse

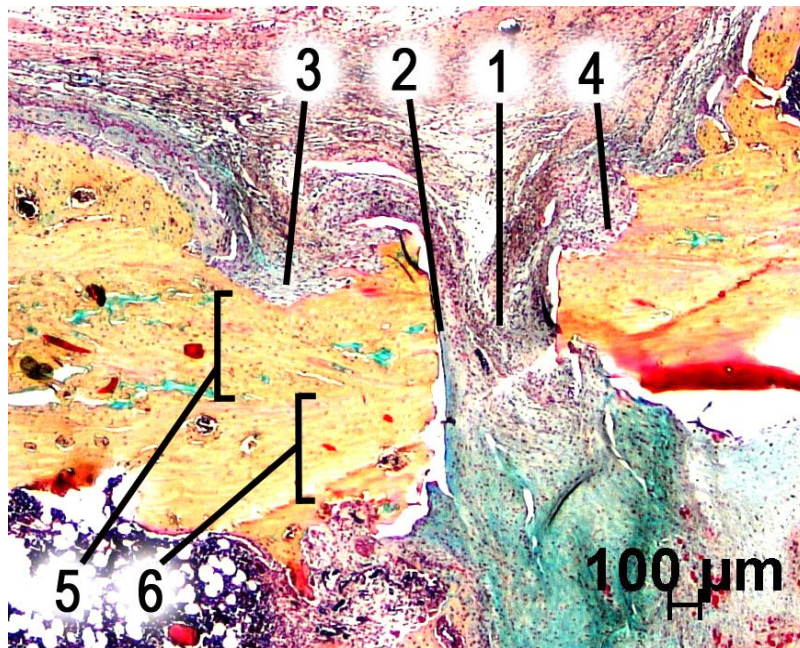


Abb. 4.19: Darstellung des lateralen Osteotomiespaltes im Bereich der Kortikalis bei einer Nonunion, Versuchsgruppe, Tier 190; Movat-Pentachrom Färbung

- 1 Der kortikale Zwischenspalt ist mit gefäßarmem Bindegewebe angefüllt
- 2 Die Schnittträger der Kortikalis stellen sich teils glatt, teils gefurcht dar
- 3 Resorptive Einbuchtung vor dem Kallusende
- 4 Resorptive Einbuchtung an der Ecke des kortikalen Schnitttrandes
- 5 Aufgelockerte kortikale Struktur
- 6 Kompakte kortikale Struktur

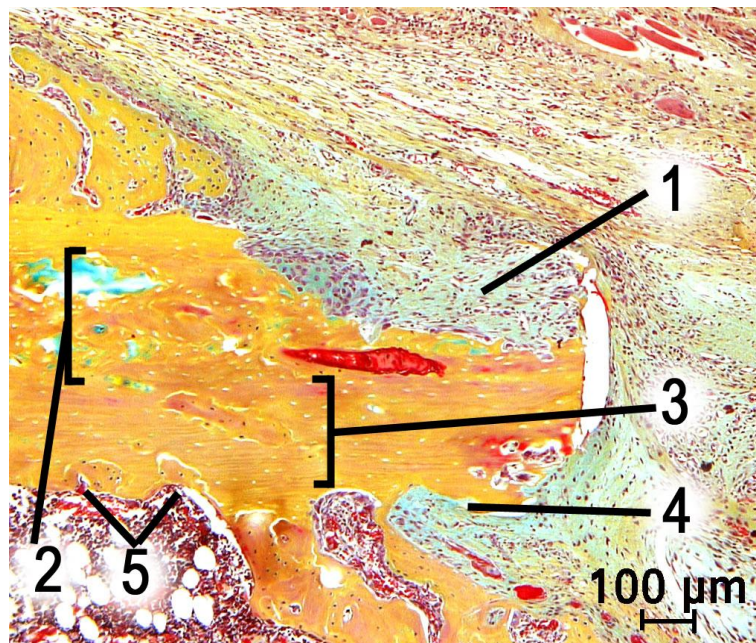


Abb. 4.20: Darstellung des lateralen Osteotomiespaltes im Bereich der Kortikalis bei einer Nonunion; Versuchsgruppe, Tier 198; Movat-Pentachrom Färbung

- 1 Durch Resorptionen fehlende Ecke großen Ausmaßes am Osteotomiespalt vor dem Kallusende
- 2 Aufgelockerte kortikale Knochenstruktur
- 3 Kompakte kortikale Knochenstruktur
- 4 Flache Einbuchtung vor dem endostalen Kallus
- 5 Kleine Einbuchtung auf der kortikalen Oberfläche endostal

Ergebnisse

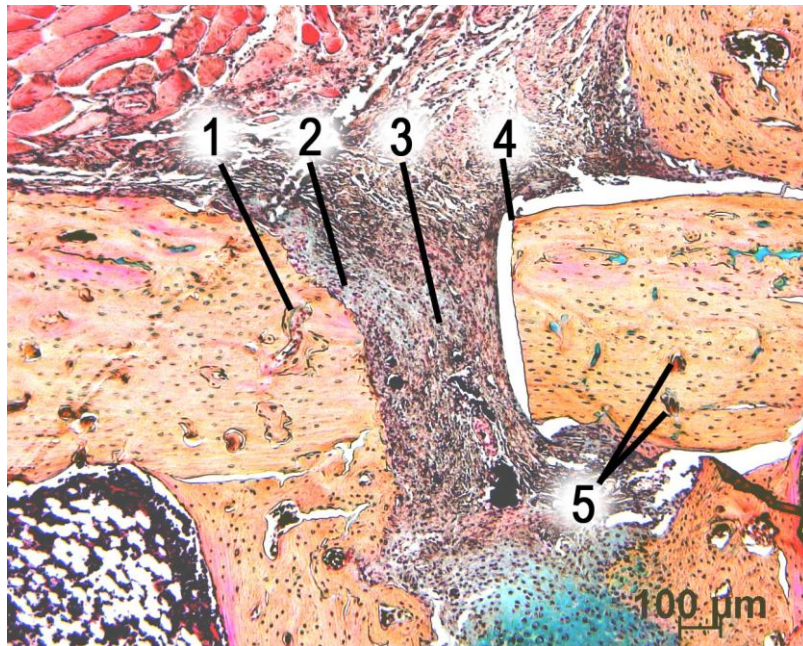


Abb. 4.21: Darstellung des lateralen Osteotomiespaltes im Bereich der Kortikalis bei einer Nonunion; Versuchsgruppe, Tier 250; Movat-Pentachrom Färbung

- 1 Kaverne innerhalb der Kortikalis in Nähe des Osteotomiespaltes
- 2 Vollständig resorbiertes Kortikalisende
- 3 Bindegewebe im Intrakortikalspalt
- 4 Glatter Schnitttrand der Kortikalis
- 5 Kleine Hohlräume innerhalb der Kortikalis mit Gefäßen

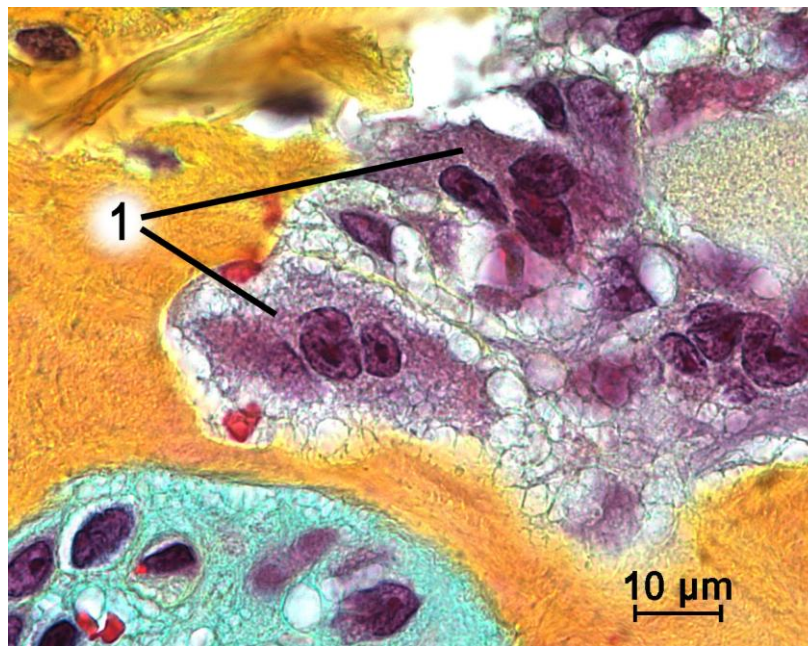


Abb. 4.22: Ausschnitt aus dem endostalen Kallus; Movat-Pentachrom Färbung
1 Osteoklasten an der Knochengrenze in ihren Resorptionslakunen liegend

4.3.2 Dichte der Osteoklasten (OC)

Die Osteoklastendichte wird aus der absoluten Zahl der Osteoklasten pro Quadratmillimeter Knochenfläche [OC/ mm²] berechnet. Je ein Schnittpräparat von je acht Tieren aus der Kontroll- und Versuchsgruppe wurde untersucht. Die errechneten Daten sind als Medianwerte angegeben und graphisch (Abb. 4.23) bzw. tabellarisch (Tab. 4.3) aufgeführt. Bei Betrachtung der gesamten Fläche der ROI (**Gesamtfläche**), welche sämtliche vorliegende Gewebearten umfasste, ließ sich kein signifikanter Unterschied bezüglich der Osteoklastendichte zwischen beiden Gruppen feststellen ($p=0,556$). Nach Untersuchung der Sub-ROIs zeigte sich in der Kontrollgruppe im **periostalen Kallus** eine signifikant höhere Anzahl von 27 OC/ mm² Knochenfläche im Vergleich zu 10 OC/ mm² in der Versuchsgruppe ($p=0,007$). Dieser Unterschied beruhte auf einer ausgeprägten Abweichung der Osteoklastendichte auf der medialen Femurseite ($p=0,007$), während sich die Dichte lateral nur tendenziell unterschied ($p=0,065$). Am **endostalen Kallus** waren mit Zellzahlen von 18 OC/ mm² bei den Kontrolltieren und 19 OC/ mm² bei den Tieren der Versuchsgruppe ($p=0,741$), lateral ($p=0,366$) und medial ($p=0,592$) keine Unterschiede auszumachen. Die **Kortikalis** wies in der Kontrollgruppe mit 6 OC/ mm², im Gegensatz zum periostalen Kallus, eine geringere Osteoklastendichte gegenüber der Versuchsgruppe mit 12 OC/ mm² auf ($p=0,028$). Dieser Unterschied war vornehmlich auf die Differenzen an der lateralen Femurseite zurück zu führen ($p=0,016$).

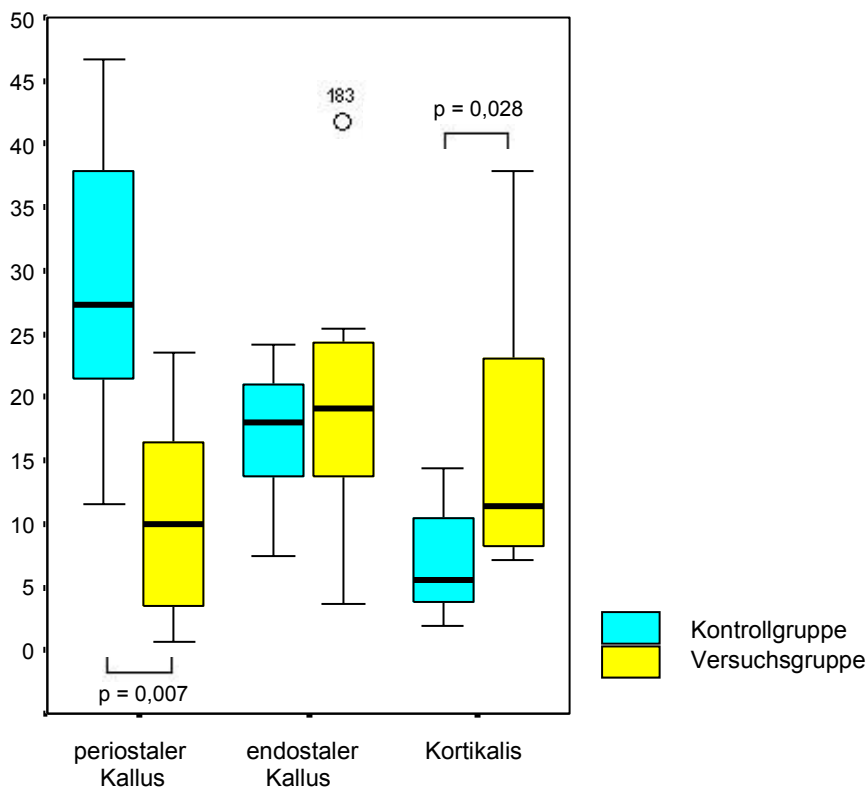


Abb. 4.23: Anzahl der Osteoklasten pro mm² Knochenfläche im periostalen und endostalen Kallus, sowie in der Kortikalis. Auffällig ist die signifikant höhere Osteoklastendichte in der Versuchsgruppe im kortikalen Knochen, wohingegen diese im periostalen Kallus signifikant niedriger ist.

Tab. 4.3: Dichte der Osteoklasten auf der Gesamtfläche, im periostalen und endostalen Kallus, sowie in der Kortikalis

Dichte der Osteoklasten		Median		Minimum-Maximum		p-Wert
		Kontroll-Gruppe	Versuchs-Gruppe	Kontroll-Gruppe	Versuchs-Gruppe	
Gesamtfläche	OC/mm ²	54	51	25 - 70	14 - 62	0,556
Periostaler Kallus	OC/mm ²	27	10	12 - 47	1 - 24	0,007
- lateral	OC/mm ²	15	6	3 - 24	0 - 22	0,065
- medial	OC/mm ²	14	2	6 - 22	0 - 10	0,001
Endostaler Kallus	OC/mm ²	18	19	8 - 24	4 - 42	0,741
- lateral	OC/mm ²	8	10	3 - 14	2 - 16	0,366
- medial	OC/mm ²	9	7	5 - 17	1 - 28	0,592
Kortikalis	OC/mm ²	6	12	2 - 14	7 - 38	0,028
- lateral	OC/mm ²	3	7	1 - 5	2 - 17	0,016
- medial	OC/mm ²	4	6	0 - 10	0 - 21	0,203

4.3.3 Dichte der Gefäße

Nach Zählung der kleinen ($\varnothing \leq 40 \mu\text{m}$) und großen ($\varnothing > 40 \mu\text{m}$) Gefäße konnte mit Hilfe der erhaltenen Absolutzahlen sowie der berechneten Bindegewebsfläche die Gefäßdichte pro Quadratmillimeter Bindegewebsfläche [Gefäße/ mm²] ermittelt werden (Abb. 4.24 + Tab. 4.4). Auch hier gelangten von jeder Gruppe acht Tiere mit je einem Schnittpräparat in die Auswertung, die Daten werden entsprechend der Analyse der Osteoklastendichte aufgeführt. Insgesamt lag in allen Sub-ROIs eine recht hohe Gefäßdichte vor. Es waren stets wesentlich mehr kleine Gefäße als große vorhanden. Auffällig war auch die breite Streuung der Daten innerhalb beider Gruppen, vor allem in der Kontrollgruppe. Bzgl. der **Gesamtfläche** ließ sich kein signifikanter Unterschied zwischen der Kontroll- und der Versuchsgruppe feststellen ($p=0,328$). Dies bezog sich sowohl auf die kleinen ($p=0,234$) als auch auf die großen ($p=0,111$) Gefäße. Im Bereich des **periostalen Kallus** war ein statistischer Unterschied bei den großen Gefäßen ersichtlich ($p=0,047$), wonach in der Kontrollgruppe mehr große Gefäße auftraten. Bei der Einzelbetrachtung des lateralen und medialen periostalen Kallus zeigten sich keine signifikanten Unterschiede (lateral $p=0,798$, medial $p=0,593$). Im **endostalen Kallus** war allgemein eine geringere Gefäßdichte als im periostalen Kallus feststellbar. Signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen waren hier in keinem Bereich auszumachen ($p=0,326$). Der Bereich des **Osteotomiespaltes** wies ähnlich viele Gefäße pro Quadratmillimeter auf wie der endostale Kallus und stellte sich bei beiden Gruppen annähernd gleich dar. Hierbei ist zu beachten, dass die Fläche des Osteotomiespaltes eine Teilfläche der periostalen und endostalen Bindegewebsfläche darstellt. Es gab keine Unterschiede zwischen den Gruppen.

Ergebnisse

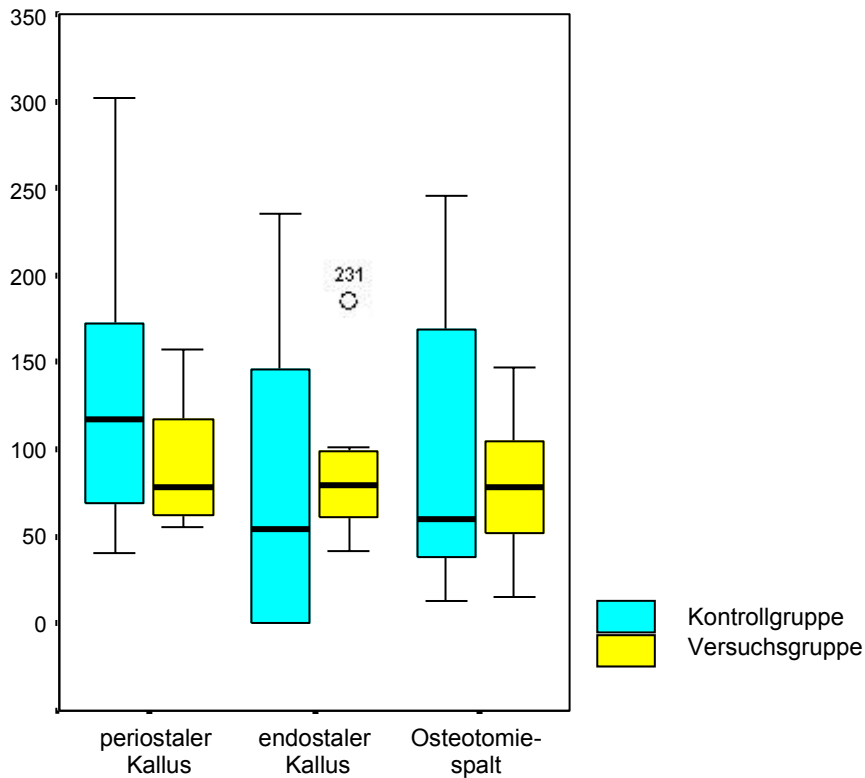


Abb. 4.24: Anzahl der Gefäße pro mm² Bindegewebsfläche im periostalen und endostalen Kallus, sowie im Osteotomiespalt. Hier waren keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen der Kontroll- und der Versuchsgruppe festzustellen.

Tab. 4.4: Dichte der Gefäße mit Unterteilung in kleine und große Gefäße auf der Gesamtfläche, im periostalen und endostalen Kallus, sowie im Osteotomiespalt

Dichte der Gefäße		Median		Minimum-Maximum		p-Wert
		Kontroll-Gruppe	Versuchs-Gruppe	Kontroll-Gruppe	Versuchs-Gruppe	
Gesamtfläche	n/mm ²	123	76	48 - 193	55 - 138	0,328
< 40 µm	n/mm ²	119	73	47 - 179	50 - 129	0,234
> 40 µm	n/mm ²	5	2	2 - 17	1 - 10	0,111
Periostaler Kallus	n/mm ²	118	78	40 - 302	55 - 158	0,442
< 40 µm	n/mm ²	115	78	38 - 277	54 - 150	0,442
> 40 µm	n/mm ²	4	1	1 - 25	0 - 8	0,047
- lateral	n/mm ²	148	99	55 - 470	76 - 212	0,798
< 40 µm	n/mm ²	134	97	53 - 420	76 - 207	0,878
> 40 µm	n/mm ²	4	1	0 - 2	0 - 15	0,129
- medial	n/mm ²	83	69	26 - 295	28 - 134	0,593
< 40 µm	n/mm ²	82	69	26 - 41	27 - 134	0,574
> 40 µm	n/mm ²	1	0	0 - 5	0 - 11	0,530
Endostaler Kallus	n/mm ²	54	79	0 - 236	42 - 187	0,326
< 40 µm	n/mm ²	46	77	0 - 221	39 - 187	0,277
> 40 µm	n/mm ²	4	4	0 - 54	0 - 13	1,000
- lateral	n/mm ²	41	79	0 - 233	58 - 187	0,440
< 40 µm	n/mm ²	41	75	0 - 217	54 - 187	0,440
> 40 µm	n/mm ²	0	5	0 - 40	0 - 15	0,166
- medial	n/mm ²	70	69	0 - 250	0 - 110	0,973
< 40 µm	n/mm ²	57	59	0 - 225	0 - 107	0,892
> 40 µm	n/mm ²	8	5	0 - 63	0 - 11	0,442
Osteotomiespalt	n/mm ²	60	79	13 - 246	16 - 147	0,959
< 40 µm	n/mm ²	60	76	13 - 239	15 - 145	1,000
> 40 µm	n/mm ²	0	2	0 - 11	0 - 17	0,184

4.3.4 Ergebnisse der histomorphometrischen Auswertung

Die histomorphometrische Auswertung erfolgte nach der achten Standwoche anhand der Safranin Orange/ von Kossa-Färbungen von jeweils acht Tieren der Kontroll- und Versuchsgruppe. Von jedem Tier wurden vier Schnitte untersucht, wobei pro Tier und Parameter aus den vier erhaltenen Werten der Medianwert bestimmt wurde. Auf diesen Werten basiert die gesamte nachfolgende Darstellung. Für einen objektiveren Vergleich wurden aus den gemessenen Absolutwerten der zu untersuchenden Flächen [mm²] die Relativwerte [%] gebildet.

4.3.4.1 Analyse der Gesamtflächen

Aus histomorphometrischer Sicht berechnete sich die Gesamtfläche der ROI aus der Addition aller enthaltenen Knochen-, Bindegewebs- und Knorpelanteile (Abb. 4.25 + Tab. 4.5). Der Bereich des Knochenmarks wurde ausgegrenzt, da hieraus für diese Untersuchung keine informativen Daten abzuleiten waren.

Die **Gesamtfläche** der Kontrollgruppe (16,3 mm²) war tendenziell kleiner als die der Versuchsgruppe (21,8 mm²) (p=0,083). Dabei ergaben sich statistisch signifikante Unterschiede bzgl. der periostalen und endostalen Kalli. Absolut wies die Kontrollgruppe (6,2 mm²) keinen wesentlich größeren **periostalen Kallus** auf (Versuchsgruppe 5,0 mm²) (p=0,195), allerdings war anteilig auf die Gesamtfläche bezogen ein signifikanter Unterschied festzustellen (Kontrollgruppe 38,2 %; Versuchsgruppe 21,2 %) (p=0,001). Umgekehrt zeigte die Versuchsgruppe absolut (7,9 mm²) und relativ (35,6 %) einen wesentlich größeren **endostalen Kallus** (Kontrollgruppe 0,7 mm²; 4,2 %) (beides p<0,001). Bzgl. der Ausdehnung der **Osteotomiespalte** ergaben sich keine signifikanten Unterschiede (absolut p= 0,083, relativ p=0,279). Diese waren jedoch relativ gesehen im Hinblick auf die **kortikalen Flächen** feststellbar. So betrug ihr Anteil in der Kontrollgruppe 59,9 % (9,1 mm²) und war damit deutlich höher als in der Versuchsgruppe mit 38,2 % (8,1 mm²) (relativ p=0,010, absolut p=0,279).

Eine Übersicht aus welchen für diese Studie relevanten Gewebetypen sich die Gesamtfläche zusammensetzte, liefern Abb. 4.26 und Tab. 4.6 in absoluter und relativer Form. Bei einem Vergleich der Werte waren beim Knochen- und Bindegewebe im Hinblick auf ihre Ausprägung statistisch bedeutsame Unterschiede festzustellen, nicht jedoch beim Knorpelgewebe. Die Werte des gesamten **Knochengewebes** bezogen sowohl die Kortikalis als auch die knöchernen Kalli ein. Hier ergaben sich Medianwerte von 13,9 mm² in der Kontrollgruppe und 12,8 mm² in der Versuchsgruppe, somit unterschieden sich die Absolutwerte nicht (p=0,234). In Relation zur Gesamtfläche ergab sich jedoch mit den höheren Anteilen von 89,2 % bei der Kontrollgruppe im Gegensatz zu 60,1 % bei der Versuchsgruppe ein signifikanter Unterschied (p=0,001). Die Ausdehnung des gesamten **Bindegewebes** war in der Kontrollgruppe mit 1,8 mm² (10,8 %) wesentlich geringer als in

Ergebnisse

der Versuchsgruppe mit 8,5 mm² (37,5 %). Der statistisch signifikante Unterschied wurde sowohl bei den Absolut- als auch bei den Relativwerten ersichtlich (beides p=0,001). Bzgl. des gesamten **Knorpelgewebes** war sowohl absolut als auch relativ eine starke Tendenz, jedoch kein statistisch signifikanter Unterschied festzustellen (beides p=0,054). So war nach den ermittelten Medianwerten in der Kontrollgruppe kein Knorpelgewebe vorhanden. Die Versuchsgruppe wies mit 0,3 mm² (1,7 %) geringe Anteile auf.

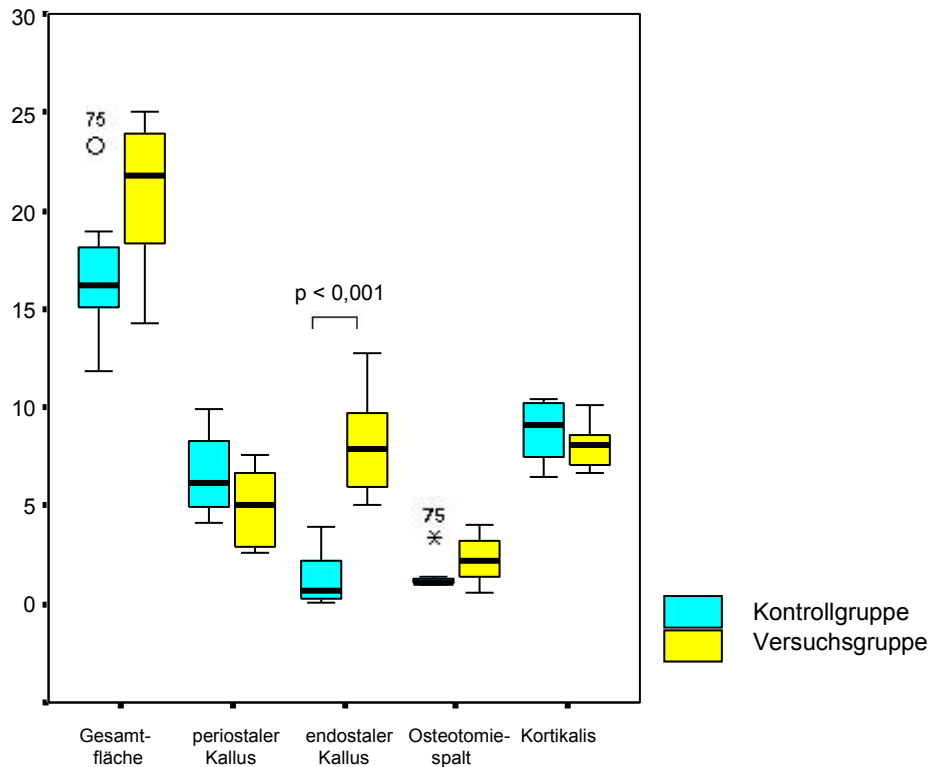


Abb. 4.25: Darstellung der Gesamtfläche und ihrer Teilflächen in Absolutwerten. Sehr deutlich stellt sich der endostale Kallus der Versuchsgruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe größer dar.

Tab. 4.5: Gegenüberstellung der absoluten und relativen Größenwerte der Gesamtfläche und ihrer Teilflächen. Hier wird neben dem signifikanten Unterschied im Bereich des endostalen Kallus auch der Unterschied beim periostalen Kallus nach Bezugsetzung zur Gesamtfläche deutlich. Hiernach nimmt der periostale Kallus der Kontrollgruppe einen wesentlich größeren Anteil an der Gesamtfläche ein als dies bei der Versuchsgruppe der Fall ist.

Ausmaße der Gesamtfläche und ihrer Teilflächen		Median		Minimum-Maximum		p-Wert
		Kontroll-Gruppe	Versuchs-Gruppe	Kontroll-Gruppe	Versuchs-Gruppe	
Gesamtfläche	mm ²	16,3	21,8	11,9 - 23,3	14,3 - 25,1	0,083
Periostaler Kallus	mm ²	6,2	5,0	4,1 - 9,9	2,6 - 7,6	0,195
	%	38,2	21,2	25,2 - 52,7	11,6 - 35,1	0,001
Endostaler Kallus	mm ²	0,7	7,9	0,1 - 3,9	5,0 - 12,8	<0,001
	%	4,2	35,6	0,8 - 16,9	31,5 - 55,1	<0,001
Osteotomiespalt	mm ²	1,1	2,2	1,0 - 3,4	0,5 - 4,1	0,083
	%	7,1	10,7	6,2 - 14,8	3,6 - 17,8	0,279
Kortikalis	mm ²	9,1	8,1	6,5 - 10,4	6,6 - 10,1	0,279
	%	59,9	38,2	34,7 - 62,9	31,7 - 51,8	0,010

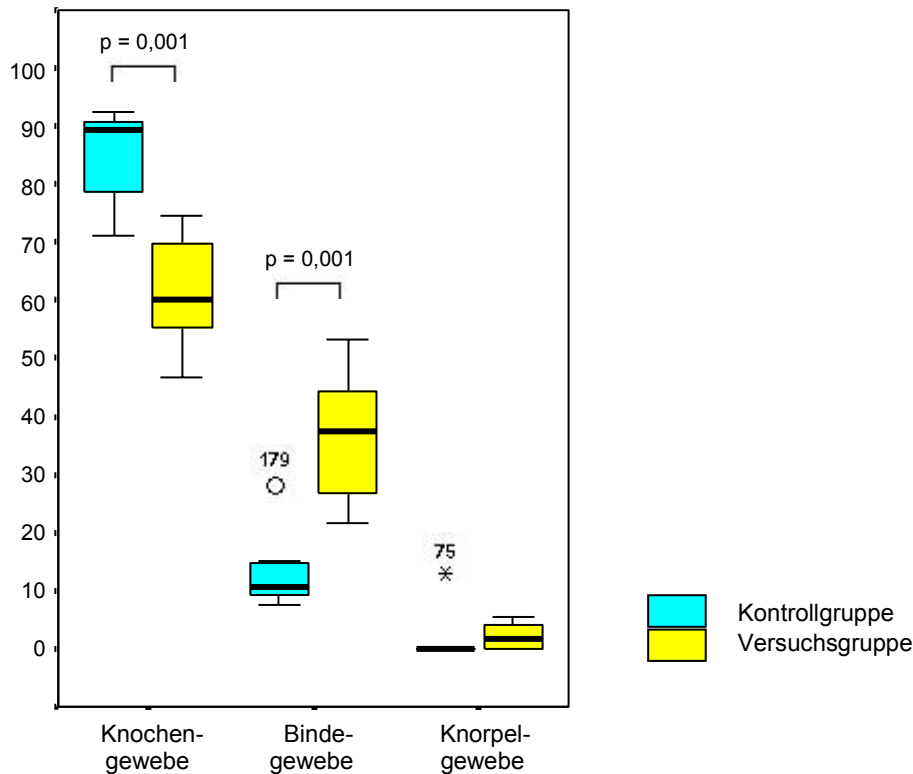


Abb. 4.26: Darstellung der Anteile der untersuchten Gewebetypen an der Gesamtfläche. Hier wird der höhere Anteil des Knochengewebes sowie der geringere Anteil des Bindegewebes in der Kontrollgruppe im Gegensatz zur Versuchsgruppe deutlich.

Tab. 4.6: Gegenüberstellung der absoluten und relativen Größenwerte der untersuchten Gewebetypen in der Gesamtfläche. Hier werden die nach Bezugsetzung zur Gesamtfläche größeren Knochenanteile und kleineren Bindegewebsanteile der Kontrollgruppe im Gegensatz zur Versuchsgruppe deutlich. Auch nach den absoluten Zahlen ist der geringere Bindegewebsanteil der Kontrollgruppe festzustellen.

Zusammensetzung der Gesamtfläche		Median		Minimum-Maximum		p-Wert
		Kontroll-Gruppe	Versuchs-Gruppe	Kontroll-Gruppe	Versuchs-Gruppe	
Gesamtfläche	mm ²	16,3	21,8	11,9 - 23,3	14,3 - 25,1	0,083
Knochengewebe	mm ²	13,9	12,8	10,9 - 16,2	9,7 - 15,7	0,234
	%	89,2	60,1	71,0 - 92,5	46,6 - 74,5	0,001
Bindegewebe	mm ²	1,8	8,5	1,0 - 5,3	4,1 - 12,2	0,001
	%	10,8	37,5	7,5 - 28,2	21,7 - 53,4	0,001
Knorpelgewebe	mm ²	0,0	0,3	0,0 - 3,0	0,0 - 1,2	0,054
	%	0,0	1,7	0,0 - 12,9	0,0 - 5,7	0,054

4.3.4.2 Analyse des periostalen Kallus

Bei der detaillierten Untersuchung der einzelnen Teilflächen kristallisierten sich im Bereich des periostalen Kallus deutliche Unterschiede bzgl. der Ausmaße des Knochengewebes und des Bindegewebes heraus (Abb. 4.27 + Tab. 4.7). Bezogen auf die Gesamtfläche des periostalen Kallus (pK-Gesamtfläche) enthielt die Kontrollgruppe mit Anteilen von 75,5 % (4,7 mm²) mehr **Knochengewebe** als die Versuchsgruppe mit 48,6 % (2,1 mm²) (p=0,001).

Umgekehrt enthielt die Versuchsgruppe mit 51,4 % (2,6 mm²) mehr **Bindegewebe** in den periostalen Kalli als die Kontrollgruppe mit 23,4 % (1,4 mm²) (relativ p<0,001). **Knorpelgewebe** war in beiden Gruppen mit 0,0 % (Kontrolltiere (0,0 mm²)) und 0,2 % (Tiere

der Versuchsgruppe (0,0 mm²) kaum im periostalen Kallus enthalten, nennenswerte Unterschiede ergaben sich nicht (p=0,119).

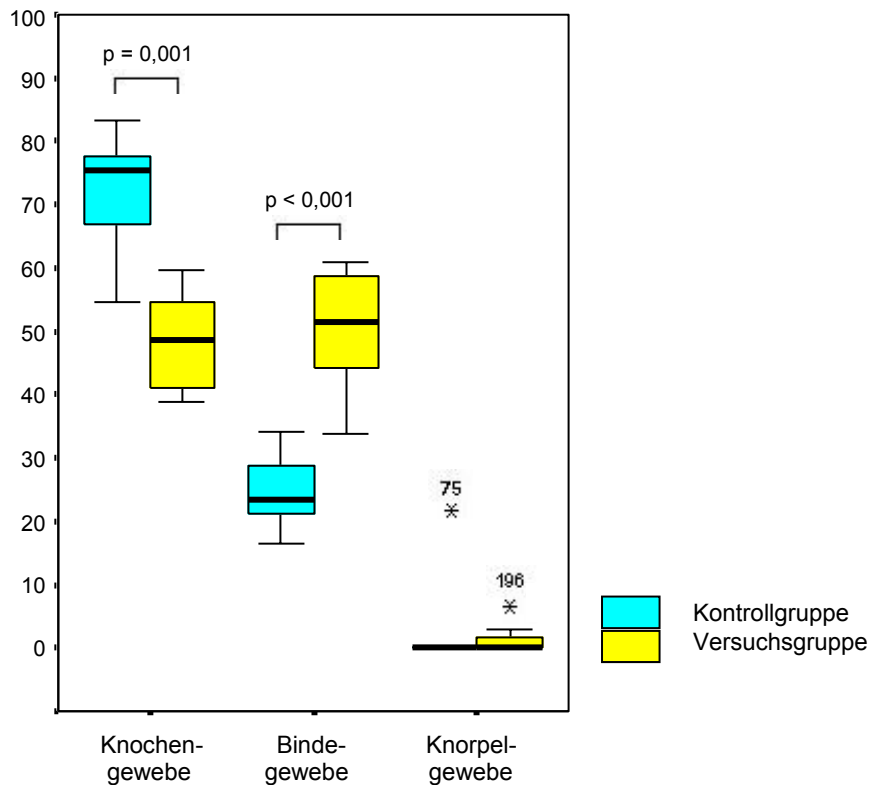


Abb. 4.27: Darstellung der Anteile der untersuchten Gewebetypen im periostalen Kallus. Hier werden der höhere Anteil des Knochengewebes sowie der geringere Anteil des Bindegewebes in der Kontrollgruppe im Gegensatz zur Versuchsgruppe deutlich.

Tab. 4.7: Gegenüberstellung der absoluten und relativen Größenwerte der untersuchten Gewebetypen im periostalen Kallus. Hier werden die nach Bezugsetzung zur pK-Gesamtfläche größeren Knochenanteile und kleineren Bindegewebsanteile der Kontrollgruppe im Gegensatz zur Versuchsgruppe deutlich. Auch nach den Absolutwerten ist der größere Knochengewebsanteil der Kontrollgruppe festzustellen.

Zusammensetzung des periostalen Kallus		Median		Minimum-Maximum		p-Wert
		Kontroll-Gruppe	Versuchs-Gruppe	Kontroll-Gruppe	Versuchs-Gruppe	
pK-Gesamtfläche	mm ²	6,2	5	4,1 - 9,9	2,6 - 7,6	0,195
Knochengewebe	mm ²	4,7	2,1	2,5 - 6,8	1,3 - 4,3	0,003
	%	75,5	48,6	54,6 - 83,4	38,4 - 59,8	0,001
Bindegewebe	mm ²	1,4	2,6	1,0 - 3,2	1,4 - 4,6	0,138
	%	23,4	51,4	16,6 - 34,2	33,7 - 60,9	<0,001
Knorpelgewebe	mm ²	0,0	0,0	0,0 - 2,2	0,0 - 0,4	0,119
	%	0,0	0,2	0,0 - 21,7	0,0 - 6,6	0,119

4.3.4.3 Analyse des endostalen Kallus

Auch der endostale Kallus wies ausgeprägte Gruppenunterschiede bzgl. der Ausmaße des Knochen- und Bindegewebes auf, wobei das Verteilungsmuster dem des periostalen Kallus ähnelte (Abb. 4.28 + Tab. 4.8). Der Anteil des **Knochengewebes**, bezogen auf die endostale Kallusfläche (eK-Gesamtfläche), lag in der Kontrollgruppe mit 78,3 % (0,5 mm²) wesentlich höher als in der Versuchsgruppe mit 30,6 % (2,1 mm²) (relativ p=0,020, absolut p=0,001). Umgekehrt war der **Bindegewebsanteil** in der Versuchsgruppe signifikant höher (67,5 % (5,2 mm²)) (Kontrollgruppe 13,8 % (0,2 mm²)) (relativ p=0,028, absolut p<0,001). Auch hier

Ergebnisse

zeigte sich kaum **Knorpelgewebe** (Kontrollgruppe 0,0 % (0,0 mm²); Versuchsgruppe 0,7 % (0,2 mm²)) ohne signifikante Unterschiede (relativ p=0,119, absolut p=0,100).

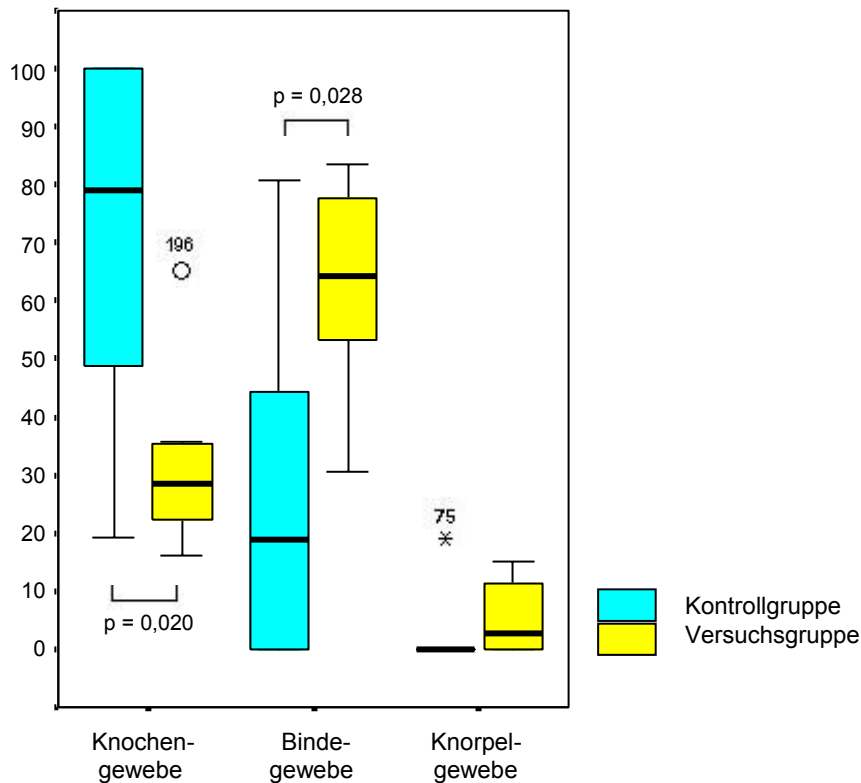


Abb. 4.28: Darstellung der Anteile der untersuchten Gewebetypen im endostalen Kallus. Auch hier werden der höhere Anteil des Knochengewebes sowie der geringere Anteil des Bindegewebes in der Kontrollgruppe im Gegensatz zur Versuchsgruppe deutlich.

Tab. 4.8: Gegenüberstellung der absoluten und relativen Größenwerte der untersuchten Gewebetypen im endostalen Kallus. Hier werden die nach Bezugsetzung zur eK-Gesamtfläche größeren Knochenanteile und kleineren Bindegewebsanteile der Kontrollgruppe im Gegensatz zur Versuchsgruppe deutlich. Auch anhand der Absolutwerte ist der größere Knochengewebsanteil und geringere Bindegewebsanteil der Kontrollgruppe feststellbar.

Zusammensetzung des endostalen Kallus		Median		Minimum-Maximum		p-Wert
		Kontroll-Gruppe	Versuchs-Gruppe	Kontroll-Gruppe	Versuchs-Gruppe	
eK-Gesamtfläche	mm ²	0,7	7,9	0,1 - 3,9	5,0 - 12,8	<0,001
Knochengewebe	mm ²	0,5	2,1	0,1 - 1,9	1,8 - 4,4	0,001
	%	78,3	30,6	21,2 - 100,0	15,5 - 55,7	0,020
Bindegewebe	mm ²	0,2	5,2	0,0 - 1,9	2,0 - 10,8	<0,001
	%	13,8	67,5	0,0 - 78,8	41,8 - 84,3	0,028
Knorpelgewebe	mm ²	0,0	0,2	0,0 - 0,8	0,0 - 1,0	0,100
	%	0,0	0,7	0,0 - 36,5	0,0 - 2,4	0,119

4.3.4.4 Analyse des Osteotomiespaltes

Relativ betrachtet stellten sich die Gesamtausmaße der Osteotomiespalte (O-Gesamtfläche) recht ähnlich dar (p=0,279). Absolut zeigte die Versuchsgruppe tendenziell eine größere O-Gesamtfläche (p=0,083). Bzgl. der Zusammensetzung dieser Fläche waren eklatante Unterschiede erkennbar. Diese fanden sich ebenfalls beim Knochen- und Bindegewebe und entsprachen auch in ihrem Verteilungsmuster dem der periostalen und endostalen Kalli (Abb. 4.29 + Tab. 4.9). So hatte die Kontrollgruppe sowohl absolut (p=0,014) als auch relativ (p=0,001) einen signifikant höheren Anteil an **Knochengewebe** (81,5 % (0,9 mm²))

Ergebnisse

verglichen mit der Versuchsgruppe (3,2 % (0,0 mm²)). Die Versuchsgruppe hatte die höheren **Bindegewebsanteile** (70,8 % (1,5 mm²)) gegenüber der Kontrollgruppe (18,5 % (0,2 mm²)) (beides p=0,001) aufzuweisen. Die Versuchsgruppe (5,5 %, 0,1 mm²) zeigte tendenziell (p=0,054) mehr **Knorpelgewebe** als die Kontrollgruppe (0,0 %, 0,0 mm²).

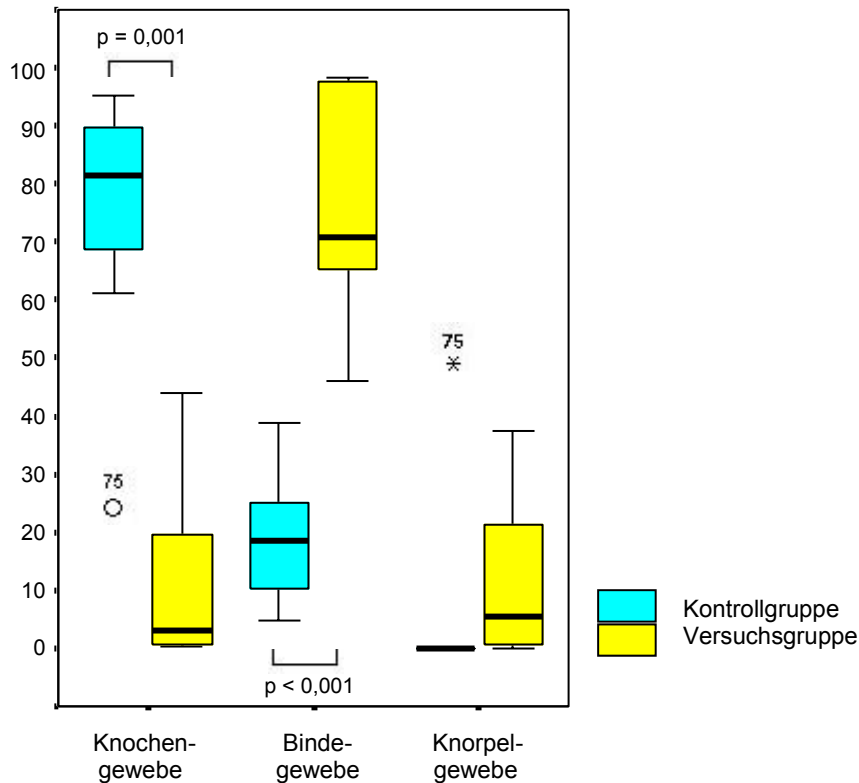


Abb. 4.29: Darstellung der Anteile der untersuchten Gewebetypen im Osteotomiespalt. Hier werden wiederum der höhere Anteil des Knochengewebes sowie der geringere Anteil des Bindegewebes in der Kontrollgruppe im Gegensatz zur Versuchsgruppe deutlich.

Tab. 4.9: Gegenüberstellung der absoluten und relativen Größenwerte der untersuchten Gewebetypen im Osteotomiespalt. Hier werden die nach Bezugsetzung zur O-Gesamtfläche größeren Knochenanteile und kleineren Bindegewebsanteile der Kontrollgruppe im Gegensatz zur Versuchsgruppe deutlich. Auch nach den Absolutwerten ist der größere Knochengewebsanteil und geringere Bindegewebsanteil der Kontrollgruppe feststellbar.

Zusammensetzung des Osteotomiespalt		Median		Minimum-Maximum		p-Wert
		Kontroll-Gruppe	Versuchs-Gruppe	Kontroll-Gruppe	Versuchs-Gruppe	
O-Gesamtfläche	mm ²	1,1	2,2	1,0 - 3,4	0,5 - 4,1	0,083
Knochengewebe	mm ²	0,9	0,0	0,7 - 1,1	0,0 - 1,6	0,014
	%	81,5	3,2	24,4 - 95,3	0,3 - 43,8	0,001
Bindegewebe	mm ²	0,2	1,5	0,0 - 1,0	0,4 - 4,0	0,001
	%	18,5	70,8	4,7 - 38,9	46,0 - 98,3	<0,001
Knorpelgewebe	mm ²	0,0	0,1	0,0 - 1,6	0,0 - 0,7	0,054
	%	0,0	5,5	0,0 - 49,0	0,0 - 37,3	0,054

4.3.4.5 Analyse der Kortikalis

In Bezug auf die Gesamtfläche der ROI ergab sich bei der Gesamtausmaße der kortikalen Flächen (K-Gesamtfläche) im Gruppenvergleich relativ ein bedeutender Unterschied (p=0,010) (Abb. 4.25 + Tab. 4.5), wonach die Kontrollgruppe größere kortikale Anteile an der Gesamtfläche der ROI aufwies. Da die kortikalen Flächen vornehmlich aus

Knochengewebe bestanden (Tab. 4.10), zeigten sich absolut und relativ keine statistisch signifikanten Unterschiede. Daher wird hier auf eine weitere Beschreibung verzichtet.

Tab. 4.10: Gegenüberstellung der absoluten und relativen Größenwerte der untersuchten Gewebetypen in der Kortikalis. Es sind keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen der Kontroll- und der Versuchsgruppe festzustellen.

Zusammensetzung der Kortikalis		Median		Minimum-Maximum		p-Wert
		Kontroll-Gruppe	Versuchs-Gruppe	Kontroll-Gruppe	Versuchs-Gruppe	
Gesamtfläche	mm ²	9,1	8,1	6,5 - 10,4	6,7 - 10,1	0,279
Knochengewebe	mm ²	8,9	8,0	6,3 - 10,2	6,6 - 10,0	0,267
	%	98,4	98,9	96,2-100,0	98,7 - 99,4	0,382
Bindegewebe	mm ²	0,2	0,1	0,0 - 0,4	0,1 - 0,1	0,224
	%	1,6	1,1	0,0 - 3,7	0,6 - 1,4	0,314
Knorpelgewebe	mm ²	0,0	0,0	0,0 - 0,0	0,0 - 0,0	1,000
	%	0,0	0,0	0,0 - 0,1	0,0 - 0,1	0,733

4.4 Zusammenfassung der Ergebnisse

4.4.1 Radiologie

In beiden Gruppen ließen sich bereits nach zwei Wochen Standzeit **periostale Kalli** erkennen. In der Kontrollgruppe führten diese in vielen Fällen zu einer Überbrückung der Osteotomie. An zwei lateralen Spaltbereichen waren die periostalen Kalli nach der Standzeit verschwunden. In der Versuchsgruppe zeigten weniger Kortizes frühen Kallus, nach sechs Wochen alle. Hier bildeten die Kalli meist keine Überbrückungen. Die überwiegend dünnen, freien Kallusenden lagen im gekauterten Bereich relativ nahe am Osteotomiespalt.

Die **endostalen Kalli** waren in der Kontrollgruppe sehr früh festzustellen, in der Versuchsgruppe traten sie etwa zwei Wochen später auf. Sie stellten sich zunächst als gegenüberliegende Fronten proximal und distal des Spaltes dar. In der Kontrollgruppe verschmolzen sie während der Standzeit meist miteinander und überbrückten so die Osteotomie. Nach der Standzeit waren diese Verschmelzungen röntgenologisch nicht mehr feststellbar, es lagen teilweise nur noch einzelne Knocheninseln vor. Einige sich gegenüberliegende Fronten blieben jedoch bis nach der Standzeit bestehen. In der Versuchsgruppe standen sich während der gesamten Standzeit meist zwei Fronten gegenüber, vornehmlich etwas weiter vom Osteotomiespalt entfernt, jedoch innerhalb des kürettierten Bereiches. An wenigen Lokalisationen fehlten die endostalen Kalli.

Nach etwa vier Wochen Standzeit trat in der Kontrollgruppe diffus röntgendichtes Gewebe sowohl **intrakortikal** als auch **intramedullär** im **Osteotomiespaltbereich** auf, in der Versuchsgruppe nach sechs Wochen. In der Kontrollgruppe nahm während der Standzeit das Gewebe in diesen Bereichen deutlich an Röntgendichte zu. Nach der Standzeit wies fast die Hälfte der intrakortikalen Spalte eine dem kortikalen Knochen ähnliche Dichte auf. In den intramedullären Spaltbereichen verschwanden bei fast der Hälfte der Tiere die Verdichtungen. Die Röntgendichte entsprach dem des Knochenmarks und die Osteotomie war nicht mehr abgrenzbar. Die Versuchsgruppe wies nach der Standzeit in nur sehr

wenigen intrakortikalen Spaltbereichen Gewebe auf, welches der Röntgendichte des kortikalen Knochens nahe kam. Meist waren röntgenologisch leichte Verschattungen festzustellen. In den intramedullären Spaltbereichen zeigten sich vorwiegend nur leichte Verschattungen, wodurch die Osteotomie meist deutlich abgrenzbar blieb, in 2 Fällen stellten sich diese Bereiche röntgendichter dar.

Einbuchtungen in der Kortikalis oder eine Abnahme der Röntgendichte des kortikalen Knochens waren zuerst bei der Versuchsgruppe, nach einer Standzeit von vier Wochen, festzustellen. Diese nahmen im Verlauf der Standzeit zahlenmäßig und in ihren Ausmaßen zu, so dass die **Integrität der Kortizes** nach der Standzeit deutlich beeinträchtigt war. Dies hatte in vielen Fällen eine Erweiterung der Osteotomiespalte zur Folge. Dahingegen zeigte sich die Integrität der Kortizes in der Kontrollgruppe nahezu unversehrt, Osteotomiespalterweiterungen ergaben sich hier nicht.

Kallusbildungen um die Pindräfte traten in der Versuchsgruppe nach zwei Wochen Standzeit auf. Sie nahmen im Verlauf der Standzeit zahlenmäßig und in ihren Ausmaßen zu. So waren nach der Standzeit medial an P2 und P3 kleine **Pinkalli** feststellbar, lateral waren sämtliche Pins betroffen, wobei an P1 nur Pinkalli großen Ausmaßes auftraten. Erst nach vier Wochen Standzeit waren auch in der Kontrollgruppe Pinkalli erkennbar. Auch diese nahmen während der Standzeit zunächst zahlenmäßig und in ihren Ausmaßen zu, in den letzten zwei Wochen der Standzeit zeigte sich jedoch eine leichte Tendenz zur Größenabnahme. Letztendlich wiesen halb so viele Pins wie in der Versuchsgruppe Pinkalli auf, ebenfalls vornehmlich lateral.

Zu gleichen Zeitpunkten waren in den Gruppen **Pin-Kortikalis-Kontaktstellen** mit abnehmender Röntgendichte des Knochens erkennbar. Ihre Zahl stieg im Verlauf der Standzeit leicht an und die Ausmaße vergrößerten sich. Nach der Standzeit wies die Versuchsgruppe doppelt so viele dieser Zonen mit Dichteverlusten auf als die Kontrollgruppe. Insgesamt traten sie vornehmlich lateral, mit einer Konzentration an P1 und P4, auf. In beiden Gruppen zeigten sich einige Kontaktbereiche mit vorherigem Dichteverlust, vornehmlich an P1 und P4, welche sich nach der Standzeit wieder röntgendichter darstellten.

4.4.2 Deskriptive Histologie

Auch histologisch waren an allen Kortizes sämtlicher Tiere **periostale Kalli** festzustellen. In der Kontrollgruppe führten sie alle zu einer Überbrückung der periostalen Osteotomiespalte. Die voll ausmineralisierten Kallusenden bestanden aus Geflechtknochen, ebenso das spaltfüllende Brückengewebe zwischen den Kallusenden. In diesem Bereich waren meist frisch mineralisierte und auch einige hyaline Knorpelbereiche zu erkennen. In der Versuchsgruppe war nur in einem Fall eine knöcherne und in einem Fall eine knorpelige Überbrückung (beide medial) des periostalen Osteotomiespaltes erkennbar. Die knöcherne

Brücke entsprach in ihrem Erscheinungsbild denen der Kontrolltiere mit vereinzelt hyalinen Knorpelbereichen. Die zweite Brücke bestand vornehmlich aus hyalinem Knorpel und enthielt zusätzlich viele mineralisierte Knorpelareale. Die freien Kallusenden liefen spitz an der Kortikalis anliegend aus oder endeten abrupt. Zwei Fronten war zum Osteotomiespalt hin eine Kappe aus hyalinem Knorpel aufgesetzt.

Beinahe alle periostalen Kalli enthielten einen zweiten Knochenmarksraum mit mesenchymalem Gewebe. In der Kontrollgruppe stellte sich dieser Raum häufig größer dar als in der Versuchsgruppe. Zwei Kontrolltiere wiesen über die Osteotomie zweite Knochenmarksräume auf, die durchgehend verliefen, so dass der Spalt nicht vollständig kallusgefüllt war.

Übermäßige Kalluszubildungen an den Pins innerhalb der ROI traten in der Kontrollgruppe sehr selten auf. In der Versuchsgruppe waren häufiger Pinkalli an den Pins P2 und P3 festzustellen, vornehmlich lateral, welche teilweise Ausmaße von bis zu 2,5 mm annahmen.

Das **Periost** stellte sich bei beiden Gruppen deutlich dar. In der Kontrollgruppe verlief das Str. fibrosum in mehreren Schichten über das spaltfüllende Gewebe hinweg, wobei die Anzahl der Schichten an der Schnittkante der Osteotomie zunahm. In der Versuchsgruppe hingegen nahm dessen Schichtung schon spaltferner, im Bereich der Kallusenden zu und verlief nur in den Fällen der überbrückten Osteotomiebereiche über diese hinweg. Lag keine Überbrückung vor, verliefen meist nur die äußeren Schichten über den Spalt, die innenliegenden fächerten sich im spaltfüllenden Bindegewebe auf und verloren sich dort. In mehreren Fällen zog sogar das komplette Str. fibrosum fächerförmig in den Spaltbereich oder in das umliegende Muskelgewebe um dort zu enden.

Das Str. cambium beider Gruppen lag meist in ein bis drei Schichten dem spaltfernen kallösen Knochen auf. In der Kontrollgruppe nahm dessen Schichtung zum Spalt hin meist leicht zu, manchmal änderte sie sich nicht. Stets endete das Str. cambium aber bei Erreichen des jungen Brückengewebes. Bei den zwei Tieren, welche durchgehende zweite Knochenmarksräume aufwiesen, zog das Str. cambium kontinuierlich über den Spalt hinweg. Bei den Überbrückungen der Versuchsgruppe verhielt sich das Str. cambium entsprechend der Kontrollgruppe. Etwa ein Drittel der freien, periostalen Kalli dieser Gruppe wies ein sich zum Spalt hin verjüngendes Str. cambium auf, welches auf den Kallusenden oder dem gekauterten Bereich der Kortizes auslief. Bei den Übrigen änderte es seine Stärke nicht oder verdickte sich, überzog jedoch nicht den Osteotomiespalt.

Die **endostalen Kalli** entsprachen histologisch weitgehend dem röntgenologischen Erscheinungsbild. In der Kontrollgruppe war jedoch erkennbar, dass die Kalli im Osteotomiebereich zu einer zentralen Geflechtknochenbrücke verschmolzen waren. Bzw. ließen sich bei einem Drittel der Tiere nur einzelne Inseln des endostalen Kallus erkennen, umgeben von Knochenmark, welches den Spalt durchzog. In der Versuchsgruppe waren bei zwei Tieren die endostalen Kallusfronten zu einer zentralen Brücke verschmolzen, welche

häufig noch viele Knorpelanteile enthielten. Die verbliebenen gegenüberstehenden Fronten wiesen meist eine Biegung mit zentral liegendem Scheitelpunkt in Richtung Osteotomiespalt auf. Einige Kalli trugen im Spaltbereich begrenzte hyaline Knorpelzonen. Insgesamt erschien der endostale Geflechtknochen der Kontrollgruppe etwas kompakter als in der Versuchsgruppe. Ebenso waren in letzterer teilweise Hämatomreste und Entzündungszellen erkennbar.

Aufgrund der unterschiedlichen Kallusausprägungen gab es große Gruppenunterschiede bzgl. des Inhaltes der **Osteotomiespalte**. Bei den Kontrolltieren lag im gesamten Spalt hauptsächlich überbrückender, meist ausmineralisierter Kallus vor. Die einzige ausbleibende Überbrückung enthielt dichtes Bindegewebe. Die Versuchsgruppe hingegen wies nur bei wenigen Tieren kallöses Brückengewebe auf. Ansonsten befand sich periostal zwischen den gegenüberliegenden Kallusfronten lockeres bzw. dichtes Bindegewebe, selten mit hyalinen Knorpelarealen. Zwischen spitz auslaufenden Kallusenden lag Muskel- und Fettgewebe vor. In den Kortikaliszwischenspalten war überwiegend Bindegewebe anzutreffen, häufig mit Anteilen an hyalinem Knorpel, welcher sich in einem Fall ausmineralisiert darstellte, oder manchmal Anteilen an Faserknorpel. Endostal wiesen die ausbleibenden Überbrückungen ebenfalls vornehmlich Bindegewebe auf.

Die **Kortizes** beider Gruppen bestanden überwiegend aus kompaktem, längsorientiertem Geflechtknochen, welcher sich zentral aufgelockert und ungeordnet darstellte. In der Kontrollgruppe enthielten die periostal gelegenen Bereiche der Kortikalis meist vollständig schwarz gefärbte Osteozyten. Die endostalen Bereiche wiesen vornehmlich am spaltnahen vorderen Drittel der Kortikalisrechtecke blasse Zellen oder auch leere Osteozytenlakunen auf. In der Versuchsgruppe hingegen waren sowohl periostal als auch endostal meist am spaltnahen Drittel leere Osteozytenlakunen zu finden, während die Übrigen zwei Drittel schwarz gefärbte Zellen enthielten. Nur einige Kortizes zeigten auf ganzer Länge schwarze Osteozyten oder blasse Zellen bzw. leere Osteozytenlakunen. Bei beiden Gruppen waren innerhalb des kortikalen Knochens stets kleine, regelmäßig verteilte Hohlräume mit Gefäßen zu erkennen. Größere Hohlräume mit mesenchymalem Gewebe zeigten sich bei den Kontrolltieren gelegentlich in Spaltnähe. In der Versuchsgruppe lagen diese vornehmlich im gekauterten Bereich. Lag hier um die Schnittenden knöcherner Kallus vor enthielten sie mesenchymales Gewebe. Lag Knorpel oder Bindegewebe vor, befand sich in ihnen Bindegewebe, häufig mit Osteoklasten an den Knochengrenzen. Die Oberflächen der Kortikalis stellten sich in beiden Gruppen meist glatt oder leicht gewellt dar. Bei den Kontrolltieren waren hier gelegentlich kleine Einbuchtungen zu erkennen. Die Tiere der Versuchsgruppe wiesen diese häufiger auf, wobei sie sich teils etwas größer darstellten. Besonders auffällig waren die vielen Einbuchtungen vor den Kallusenden im gekauterten bzw. kürettierten Bereich. Bei einigen Kortizes war vor den Kallusenden kein kortikaler Knochen mehr vorhanden, ein Gewebeersatz erfolgte durch Bindegewebe. Die

Kortikalisecken an den Osteotomieschnittkanten zeigten in der Kontrollgruppe häufig leichte Abrundungen. In der Versuchsgruppe traten sie wesentlich seltener auf. Denn hier fehlten bereits einige Ecken vollständig bzw. fehlte Knochengewebe in größerem Umfang. Insgesamt waren hier bei weniger als der Hälfte der Kortizes die Ecken an den Schnittkanten noch vorhanden, ein Gewebeersatz erfolgte durch Bindegewebe. Osteolysen traten in beiden Gruppen an den in der ROI liegenden Pins P2 und P3 sehr selten auf. Anstelle des kortikalen Knochens lagen Bindegewebe und viele Entzündungszellen vor.

In der Versuchsgruppe traten zwei **Ausnahmefälle** auf. Sie wiesen im Knochenmarksbereich Bindegewebe und Faserknorpel sowie viele Hämatomreste und Entzündungszellen auf. Das erste Tier zeigte distal eine knöcherne, endostale Doppelfront und an P3 einen übermäßigen Pinkallus mit einhergehender Osteolyse der Kortikalis. Das zweite Tier wies distal keinen endostalen Kallus auf, übermäßige Pinkalli und Osteolysen waren nicht zu erkennen.

4.4.3 Dichte der Osteoklasten

Bei Betrachtung der Gesamtfläche war kein signifikanter Unterschied bzgl. der Osteoklastendichte zwischen den Gruppen erkennbar. Jedoch zeigte die gesonderte Betrachtung der periostalen Kallusflächen einen signifikant höheren Osteoklastenanteil in der Kontrollgruppe, besonders auf der medialen Femurseite. Bzgl. der endostalen Kallusflächen ergab sich kein signifikanter Unterschied. Die kortikalen Flächen betreffend wies die Versuchsgruppe eine signifikant höhere Dichte auf, besonders auf der lateralen Femurseite.

In der Kontrollgruppe waren die meisten Osteoklasten im periostalen Kallus zu finden, in der Kortikalis die wenigsten. Die Versuchsgruppe zeigte die größte Anzahl im endostalen Kallus, die Mengen im periostalen Kallus und in der Kortikalis waren annähernd gleich.

4.4.4 Dichte der Gefäße

Auch bzgl. der Gefäßdichte war bei Betrachtung der Gesamtfläche kein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen feststellbar. Im periostalen Kallus war eine Tendenz zur größeren Gefäßdichte bei der Kontrollgruppe auszumachen, bzgl. der großen Gefäße ergab sich hier eine Signifikanz. Im endostalen Kallus lagen bei beiden Gruppen weniger Gefäße vor, hier wies die Versuchsgruppe eine Tendenz zur höheren Gefäßdichte auf. Im periostalen und endostalen Osteotomiespaltbereich ergab sich bei beiden Gruppen kein signifikanter Unterschied.

Die Kontrollgruppe zeigte deutlich mehr Gefäße im periostalen Kallus. Endostal und im Osteotomiespalt war die Gefäßzahl annähernd gleich. Ebenso ergaben sich in der Versuchsgruppe im periostalen und endostalen Kallus und im Osteotomiespalt weitgehend gleiche Gefäßzahlen.

4.4.5 Ergebnisse der histomorphometrischen Auswertung

4.4.5.1 Analyse der Gesamtflächen

Die **Gesamtflächen** der Kontrollgruppe stellten sich Vergleich zur Versuchsgruppe tendenziell kleiner dar. Die **periostalen Kallusflächen** wiesen anteilig, in Bezug auf die Gesamtfläche, in der Kontrollgruppe signifikant mehr Fläche auf als in der Versuchsgruppe. Diese zeigte jedoch einen signifikant größeren **endostalen Kallus**. Die Ausdehnung der **Osteotomiespalte** ergab keinen Unterschied. Bzgl. der **kortikalen Flächen** war in der Kontrollgruppe, relativ gesehen, eine größere Fläche feststellbar.

An **Knochengewebe** war, in Relation zur Gesamtfläche, ein signifikant höherer Anteil in der Kontrollgruppe feststellbar als in der Versuchsgruppe. Auch die Ausdehnung des gesamten **Bindegewebes** ergab eine Signifikanz, dessen Anteil in der Versuchsgruppe wesentlich höher war. Bzgl. des **Knorpelgewebes** ergab sich kein signifikanter Unterschied. Allerdings war bei der Versuchsgruppe, im Gegensatz zur Kontrollgruppe, etwas Knorpelgewebe aufzufinden.

4.4.5.2 Analyse des periostalen Kallus

Innerhalb der gesamten periostalen Kallusflächen war in der Kontrollgruppe signifikant mehr **Knochengewebe** aufzufinden als in der Versuchsgruppe. Umgekehrt enthielten die periostalen Kalli der Versuchsgruppe signifikant mehr **Bindegewebe**. **Knorpelgewebe** war in beiden Gruppen kaum enthalten, nennenswerte Unterschiede ergaben sich hier nicht.

4.4.5.3 Analyse des endostalen Kallus

Insgesamt ähnelte das Verteilungsmuster der Gewebe im endostalen Kallus dem des periostalen Kallus. So lag der Anteil des **Knochengewebes**, bezogen auf die endostalen Kallusflächen, bei der Kontrollgruppe signifikant höher als bei der Versuchsgruppe. Umgekehrt war der **Bindegewebsanteil** der Versuchsgruppe signifikant höher. Auch im endostalen Kallus zeigte sich kaum **Knorpelgewebe** ohne signifikante Unterschiede.

4.4.5.4 Analyse des Osteotomiespaltes

Bei genauerer Betrachtung dieser Flächen zeigten sich eklatante Unterschiede bzgl. ihrer Zusammensetzung. Diese entsprachen in ihrem Verteilungsmuster wiederum dem der periostalen und endostalen Kalli. So hielt die Kontrollgruppe die signifikant höheren Anteile am **Knochengewebe**, die Versuchsgruppe hatte die signifikant höheren **Bindegewebsanteile** aufzuweisen. Bzgl. des **Knorpelgewebes** waren keine signifikanten Unterschiede festzustellen.

4.4.5.5 Analyse der Kortikalis

Die Kontrollgruppe wies größere kortikale Anteile an der Gesamtfläche der ROI gegenüber der Versuchsgruppe auf. Da die Kortikalis vornehmlich aus **Knochengewebe** besteht, entfällt die Betrachtung der Gewebezusammensetzung.

5 Diskussion

5.1 Diskussion von Material und Methoden

Da ein geeignetes Modell einer experimentellen, atrophen Pseudarthrose in der Literatur zu Projektbeginn nicht beschrieben war, stand als Ziel dieser Studie die Modelletablierung. Das Osteotomiemodell am Rattenfemur sollte einfach und unter standardisierten mechanischen und biologischen Bedingungen reproduzierbar sein. Diese Modelletablierung ist Bestandteil eines Projektes, in welchem nachfolgend die Knochenregenerationspotenz von lokal implantierten mesenchymalen Zellen in einer atrophen Pseudarthrose zu definierten Zeitpunkten erforscht werden sollte^{3,8,127,153,154,200}. Auch weitere Therapieansätze für die humane Forschung könnten mit diesem Modell untersucht werden.

Realisiert wurde das Vorhaben über eine mittel-diaphysäre, transverse Osteotomie am Femur der Ratte. Ein unilateraler Fixateur externe als Stabilisationssystem gewährleistete eine rigide Fixierung, welche eine Vollbelastung erlaubte. Der externe Fixateur minimiert Interaktionen zwischen dem Fixierungssystem und den Heilungsprozessen im Frakturbereich und ermöglicht einen leichten Zugang zum Osteotomiebereich (Punkt 5.1.3).

5.1.1 Das Modell der atrophen Pseudarthrose

Knochendefektmodelle gelten als unverzichtbarer Bestandteil der unfallchirurgischen und orthopädischen Forschung^{24,25,65,81}. Dabei wird versucht die zugrundeliegenden molekularen und zellulären Prozesse der gestörten Frakturheilung besser zu verstehen um geeignete Therapiemodelle entwickeln zu können sowie dem Ruf der Patienten nach schneller Rehabilitation ohne Funktionsverlust nachzukommen^{22,25}.

Gerade im Bereich der atrophen Pseudarthrosen existieren nur wenige wissenschaftliche Studien^{10,33}. In der Klinik ist diese Form der Heilungsstörung nur schwer zu untersuchen, da sie sich individuell sehr unterschiedlich darstellt^{11,14,24,26,27,33,53,123}. In der Literatur sind vergleichsweise wenig Tiermodelle zur Entstehung und den biologischen Abläufen von atrophen Pseudarthrosen, welche mit einer reduzierten regenerativen Kapazität einhergehen, zu finden^{3,8,10,17,19,33,53}. Das zeigt, wie schwierig es ist, eine solche Heilungsstörung experimentell zu erzeugen^{19,55,159}. Zwar gab es in der Vergangenheit eine Vielzahl an Studien die sich mit dem Heilungspotential von Pseudarthrosen beschäftigten^{5,19,21,24,32,33,84}, allerdings lagen hier vornehmlich Modelle mit großen Frakturspalten, auch Defekt kritischer Größe (CSD) genannt (Punkt 2.3.2), zugrunde^{19,21,24,25,27,30,32,40,47,55,57,58,66,70,76,78-82}. Langfristig kann sich hieraus eine atrophe Pseudarthrose entwickeln, dies liegt jedoch allein in der nicht überbrückbaren Spaltbreite begründet^{17,25,38,40,47,58,119}. Letztendlich herrscht bei dieser Heilungsstörung ein mechanisches und biologisches Milieu vor, welches nicht die biologisch inaktive Situation widerspiegelt, aus der sich im klinischen Alltag eine atrophe Pseudarthrose entwickelt^{7,17,27,32,38,40,47,49,53,58}. Diese Studien erlauben aber die Erforschung von Trägerkonstrukten, die, in den Frakturspalt eingebracht, die Heilung stimulieren

sollen^{25,40}. Viele Studien arbeiteten auch mit intramedullären Marknägeln als Fixierungssystem^{7,19,24,29,40,45,49,78,81,84,114,122,160}. Ein bedeutender Nachteil dieser ist aber die fehlende Rotationsstabilität, woraus eine vitale, hypertrophe Pseudarthrose resultiert, deren biomechanische Situation weder genau zu definieren noch zu reproduzieren ist^{17,24,25,33,40,45,84}. Andere Forschungsarbeiten versuchten über die Interposition von Gewebe oder Fremdmaterial^{17,19,29,35,48,53,58,160} eine atrophe Pseudarthrose zu induzieren, was der klinischen Situation nicht entspricht^{3,19,24,48,138}.

In der initialen Phase der Osteogenese werden Präosteoblasten und Osteoblasten in der Kambiumzellschicht des Periosts aktiviert^{90,161}. Die nachfolgende permanente Phase der Osteoinduktion wird mit differenzierten Zellen aus dem mesenchymalen Reservoir bedient¹⁸. Somit wird vorwiegend das Periost als Zellträger und –lieferant vermutet^{3,26,33,83,85}, aber auch das Knochenmark^{16,26,47,66,121,157}. Beide Strukturen sind mit ihren pluripotenten Zellpopulationen für die Knochenheilung unerlässlich^{8,19,26,28,47,49,109}. Der Hypothese folgend, dass eine atrophe Pseudarthrose durch einen Mangel an lokalen mesenchymalen Stammzellen sowie deren Vorläufern bedingt ist^{8,28}, wurde in dieser Studie deren äußerst potentes, osteogenes Potential beeinträchtigt^{3,25,47,109}. Die Induktion der atrophen Pseudarthrose erfolgte über die thermische Zerstörung des Periosts^{3,7,14,17,19,24-27,33,35,36,48,60} und die manuelle Entfernung des Knochenmarks, wobei auch das Endost zerstört wurde^{26,33,36,45,47,48}. Auch die umgebenden Weichgewebe sind in der Lage über Gefäße pluripotente Zellen zur Knochenheilung bereitzustellen^{10,25,28,78,82,112}. Sie migrieren in den Osteotomie-spalt und differenzieren sich zu knorpel- und knochenbildenden Zellen. Daher spielt eine ungestörte Vaskularisation besonders in der frühen Phase der Knochenheilung eine entscheidende Rolle^{7,25,26,50,53,138}. Um die Osteotomie am Femur setzen zu können, musste ein Zugang durch das Muskelgewebe erfolgen. Wie bei einer natürlichen Fraktur auch, entstand dabei ein ausgeprägter Gewebeschaden^{14,19}. Daneben beeinträchtigten auch die Manipulationen an Periost, Knochenmark und Endost die Durchblutung und damit einhergehend dessen Funktionalität immens^{47,83}. Insgesamt simuliert damit dieses Modell die klinische Situation einer Fraktur mit ausgeprägtem Weichteilschaden^{14,33,47}.

5.1.2 Tiermodell

Die Modelletablierung erfolgte an der Ratte. Untersuchungen am Kleintier sind bei der Bearbeitung wissenschaftlicher Fragestellungen in der Medizin weit verbreitet^{14,19,25,26,32,46,70,199}. *In vitro*-Versuche mit Zellkulturen weisen zwar aufgrund der einfachen Standardisierung eine hohe Zuverlässigkeit auf, sind jedoch nicht in der Lage den gesamten Frakturheilungsprozess zu repräsentieren^{54,65,162}. Sowohl das Mikromilieu als auch die dreidimensionalen Abläufe im Skelettsystem lassen sich nur *in vivo* darstellen^{46,81,127}. Eine atrophe Pseudarthrose im menschlichen Organismus wäre das repräsentativste Modell, ist aber ethisch nicht vertretbar³³. Traumatisch bedingte Frakturen zeigen durch ihre individuelle Morphologie und die vielen Begleitfaktoren extreme Variationen zwischen den

Fällen^{11,14,26,27,33,42,65,123}. Daher können biologische Prozesse derzeit nur im *in vivo*-Tierexperiment untersucht werden^{2,14,19,24,25,27,54,65,127,162}, wobei standardisierte Bedingungen gewährleistet sind^{24-26,42,199}. Allerdings sind die komplexen molekularen und zellulären Mechanismen bei der Knochenregeneration nur teilweise bekannt⁷⁶, und es ist schwierig, die im Tierversuch gewonnenen Erkenntnisse auf den Menschen zu übertragen^{24,27,40,54}. Trotz ethischer Bedenken sind angemessene *in vivo*-Versuche in der Knochenforschung weit verbreitet und notwendig^{3,19,24,25,27,32,33,70,162,199}, bis die gegenwärtigen wissenschaftlichen Bemühungen entsprechende Alternativen zum Tierversuch ermöglichen. Das Tierschutzgesetz regelt mit seiner Fassung vom 18. Mai 2006 im fünften Abschnitt genau, wie beim Tierversuch zu verfahren ist. Diese Arbeit wurde streng nach den Vorgaben des Animal Welfare Act, des NHI Guide for Care and Use of Laboratory animals und den National Welfare Guidelines durchgeführt. Eine Prüfung erfolgte über den lokalen Beauftragten des Landesamtes für Gesundheit und Soziales in Berlin.

Paragraf 9, Absatz 2 des TierSchG schreibt vor, dass in einem Experiment mit Wirbeltieren die Wahl auf die sinnesphysiologisch am niedrigsten entwickelte mögliche Tierart fallen muss. Diesen Bedingungen entsprechend wurde für die Modelletablierung die Labormaus, abstammend von der Wanderratte (*Rattus norvegicus*), als Versuchstier gewählt¹⁶³. Am häufigsten werden die Stämme Sprague Dawley (SDR) und Wistar (WR) zu Versuchszwecken verwendet^{8,11,14,21,25-27,31,32,45,46,48,57,58,67,70,76,81,164}. Durch die große Beliebtheit der Labormaus in der Forschung^{5,8,25,40,70,84} existiert ein breites Spektrum von spezifischen Antikörpern und Werkzeugen für molekularbiologische Analysen^{19,25,65,70,76,84,127,162}. *Rattus norvegicus* ist bisher das dritte Säugetier dessen Erbgut entschlüsselt wurde^{165,166}. Aus Aufzuchtstationen stammende Mäuse zeigen eine hohe genetische Ähnlichkeit^{19,25,84,127}, dadurch werden interindividuelle Unterschiede in der Frakturheilung minimiert. Die anatomischen Größenverhältnisse der Maus stellen jedoch eine kritische untere Grenze für Operationen am Knochen dar^{40,84}. Die in dieser Arbeit vorgenommenen technisch anspruchsvollen Eingriffe und post mortalen Untersuchungen am Oberschenkelknochen waren noch gut durchzuführen^{3,8,25,127,199}.

Kleine Tiere, besonders Mäuse, besitzen ein großes Frakturheilungs-Potential^{7,19,25}. So heilen Frakturen der langen Röhrenknochen innerhalb von vier bis sechs Wochen^{17,25,27,40,70,84,114,122}. In jungen Mäusen ist die Heilung einer Femurfraktur normalerweise nach vier Wochen abgeschlossen^{84,114,122}, die mechanischen Eigenschaften werden aber schon nach wesentlich kürzerer Zeit wiedererlangt^{46,122}. Ein pathologischer Heilungsverlauf kann daher schnell erkannt werden. So ist die Entwicklung einer atrophischen Pseudarthrose bei der Maus bereits nach acht Wochen sicher vorhersagbar^{7,17,21,36,45,53,57,70}. Beim Menschen kann frühestens nach sechs Monaten eine Manifestierung nachgewiesen werden^{17,19,21,25,34,38,128,167}. Dieser „Zeitraffer“ kommt dem Forscher sehr entgegen, lassen sich doch

Untersuchungen in wesentlich kürzerer Zeit durchführen als dies beim menschlichen Modell der Fall wäre ¹⁶².

Ein weiterer Vorteil von Ratten ist das einfache Handling, was den Umgang mit ihnen sehr unkompliziert gestaltet. Bei Erwerb, Unterbringung und Materialien für Osteosynthesysteme oder pharmakologische Substanzen verursachen sie relativ geringe Kosten verglichen mit Großtieren ^{24,25,35,40,46,70,84,95,127,138,162,163}. Dies ermöglicht, wie hier notwendig, den Einsatz auch größerer Tierzahlen ^{19,25,84}.

Es galt interindividuelle Unterschiede möglichst zu vermeiden. So kamen nur Tiere einer Rasse sowie gleichen Alters, Gewichts und Geschlechts zum Einsatz. Um eine atrophe Pseudarthrose mit einer möglichst geringen osteogenen Aktivität zu erzeugen, ist es sinnvoll, über das Alter der Tiere Einfluss auf die Knochenheilungspotenz zu nehmen, denn ausgewachsene adulte Ratten entwickeln häufiger Pseudarthrosen als junge Tiere ^{17,25,40,70,84}. Letztere weisen wachstumsbedingt einen höheren Knochenstoffwechsel auf, welcher auch ihre Heilungspotenz steigert ^{21,40,84}. Ab dem Zeitpunkt der Geschlechtsreife mit ca. acht Wochen gelten die Tiere als adult ⁷⁶. Um ein ausreichendes Alter der Tiere zu Versuchsbeginn sicherzustellen, mussten die Tiere mindestens 410 g wiegen ¹⁶⁸. Die Altersspanne lag somit zwischen 10 - 20 Wochen. Obwohl der physiologische Frakturheilungsprozess im adulten Tier erst nach etwa zwölf Wochen vollständig abgeschlossen ist ^{32,40,84,122,168}, gilt der hier vorliegende Untersuchungszeitraum mit acht Wochen Standzeit als aussagekräftig bzgl. einer Vorhersage ^{7,17,53}. Das Höchstgewicht der Tiere wurde aus Gründen der Standardisierung auf 460 g festgelegt. Um geschlechtsbedingt unterschiedliche hormonelle Wirkungen auf die Knochenheilung zu verhindern ^{21,25,40,73,84}, kamen nur männliche Tiere zum Einsatz. Letztendlich wurden die Ratten randomisiert in zwei Gruppen eingeteilt.

Die prä- und post-operativen Haltungsbedingungen, die Standzeit, das operative Verfahren und das Osteosynthesystem waren standardisiert. Nicht vermeidbare Unterschiede ergaben sich zwischen den Tiergruppen nur durch die modellbedingten zusätzlichen chirurgischen Manipulationen in der Versuchsgruppe (Punkt 3.2 + 5.1.3).

Wie bereits erwähnt, stellt sich die Übertragung der im Tierversuch gewonnenen Erkenntnisse auf die humane Situation häufig schwierig dar. Besonders die direkte Übertragung von Rattenexperimenten auf den Menschen darf aufgrund der großen Unterschiede zwischen den Spezies nicht vollzogen werden ^{24,27,32,35,40,54,127,162,169}. Der Femur der Ratte unterscheidet sich im Vergleich zum Menschen durch seine Größe, Anatomie, Biomechanik, Knochenzusammensetzung und den Knochenmetabolismus ^{24,40,46,162}. Die Anatomie und die Biomechanik entsprechen den Belastungen, die der Gang der Vierfüßer mit sich bringt. Bzgl. der histologischen Zusammensetzung ist besonders der Aufbau des Rattenknochens über Primärosteone hervorzuheben, welche von ungerichteten

Geflechtknochen umschlossen sind. Primärosteone treten bei höher entwickelten Tieren nur fetal oder postnatal auf, werden anschließend durch Sekundärosteone ersetzt und von Lamellenknochen umschlossen, wodurch sich eine gerichtete Struktur ergibt. Weiterhin fehlt der Ratte das Havers-System, wodurch sich der Remodeling-Prozess ändert^{40,84,127,169}. Auf den in seiner Geschwindigkeit gegenüber dem Menschen wesentlich erhöhten Knochenmetabolismus wurde bereits eingegangen. Da diese Arbeit jedoch der Grundlagenforschung sowie der Erprobung neuer Therapien dient und sich die in der Frakturheilung vorkommenden Zellmechanismen bei allen Säugetierarten sehr ähneln, sind Rückschlüsse auf die Abläufe beim Menschen durchaus möglich^{14,19,24-27,54,70,84,199}.

5.1.3 Versuchsaufbau

Das vorliegende Modell ist an die Pseudarthrose-Modelle von Hietaniemi und Mitarbeiter (1995)¹⁷ und Kokubu und Mitarbeiter (2003)⁷ angelehnt. Beide Arbeitsgruppen versuchten am Rattenfemur eine Heilungsstörung zu erzeugen, die dem Trauma einer natürlichen Fraktur möglichst nahe kommen sollte. Dies realisierten sie durch das Setzen einer geschlossenen Fraktur bzw. Osteotomie und das Kautern des Periosts zwei Millimeter proximal und distal des Frakturspalt. Allerdings erwies sich die dort eingesetzte intramedulläre Marknagelung in Bezug auf die Rotationsstabilität nicht als rigide genug um eine standardisierte biomechanische Situation zu gewährleisten^{7,17,18,25,33,37,40,81,84,122,127,134,140,170}. Weiterhin befindet sich bei diesem Fixierungssystem Fremdmaterial im Frakturspalt, was den Heilungsverlauf erheblich beeinflussen kann und Untersuchungen an dieser Lokalisation einschränkt^{3,53}. Dennoch gelang es beiden Autoren eine atrophe Pseudarthrose zu erzeugen, wenn auch beim Team um Hietaniemi (1995)¹⁷ erst nach mehr als einem Jahr Standzeit.

Wie bereits erwähnt, versuchten viele Studien eine atrophe Pseudarthrose über die Schaffung eines kritischen Defektes zu erzeugen^{19,21,24,25,27,30,32,40,46,47,57,58,70,76,78,80-82,149}. Diese resultierten jedoch aufgrund der Defektgröße und nicht aufgrund der veränderten Biologie in einer verzögerten oder ausbleibenden Heilung. Wegen dieses ätiologischen Unterschiedes ist es falsch anzunehmen, diese Heilungsstörungen könnten die genaue klinische Situation der atrophen Pseudarthrosen repräsentieren⁷, nur weil bei beiden die Wiederherstellung der Funktionalität ausbleibt. Andere Studien versuchten über das Einbringen von Fremdmaterialien in den Frakturspalt^{19,29,35,48,58,160,171} die Heilung zu verhindern, dies entspricht jedoch nicht dem klinischen Alltag.

Das Problem der adäquaten Frakturfixierung wurde in dieser Studie über die Verwendung eines monolateralen externen Fixateurs gelöst. Dieser stabilisiert durch seinen Aufbau eine Fraktur in allen Ebenen^{3,53,76,81,127,152,170,172}. Die post-mortalen Befunde bestätigen dies durch die anatomisch korrekte Position der Fragmentenden und die geringe Kallusbildung mit einem hohen Anteil an knöchernem Gewebe im Kallus in der Kontrollgruppe^{28,65,82,127}. Auch

die sofortige Belastung der Gliedmaße bei allen Tieren post operationem deutet auf eine weitgehende Schmerzfreiheit durch die vollständige Wiederherstellung der Funktionalität hin⁴⁴. Vor Beginn des Projektes wurde der Fixateur externe einer ausgiebigen biomechanischen Testung *in vitro* unterzogen^{127,152}. Dabei ergaben sich Werte für die Rotationsstabilität von $7,8 \pm 1,7$ Nmm/° und für die axiale Stabilität von $34,3 \pm 6,0$ N/mm. Damit weist dieses Fixierungssystem eine hohe biomechanische Festigkeit auf¹⁵², die kaum eine interfragmentäre Bewegung zulässt und weit über der Festigkeit des intakten Femurs der Ratte während des normalen Ganges liegt¹²⁷. Die damit ausbleibende mechanische Stimulation bietet keine optimalen Heilungsbedingungen^{4,19,152,173,174}, was der Etablierung der atrophen Pseudarthrose in dieser Studie entgegen kommt.

Neben dem Fixateur externe standen als Fixierungsalternativen die intramedulläre Nagelung und osteosynthetische Platten zur Diskussion. Über die Plattenosteosynthese kann eine entsprechende Frakturstabilität erreicht werden⁷⁷ und der Patient kann die Gliedmaße früh belasten⁴¹. Um eine ordnungsgemäße Plattenfixierung sicher zu stellen ist es allerdings notwendig große Knochenareale freizulegen^{40,77}. Dadurch treten Komplikationen wie ausgeprägte Gewebetraumata, Infektionen und Devaskularisationen des Gewebes bzw. des gesamten kortikalen Knochens^{40,41} mit eventuell nachfolgenden Knochennekrosen und Pseudarthrosen^{18,41,77} auf. Auch die Verwendung von Marknägeln bedeutet eine Zerstörung gewisser Gewebestrukturen. Das um die Fraktur befindliche Muskelgewebe sowie das Periost werden geschont, da der Zugang zur Implantation des Marknagels frakturfern erfolgt³². Jedoch wird ein Großteil des intramedullären Gewebes mit der zugehörigen Blutversorgung verdrängt^{32,84,122,175,176}. Inwieweit dies als Hauptfaktor für eine gestörte Frakturheilung angeführt werden kann, wird kontrovers diskutiert^{18,41,122,175}. Insgesamt bietet der Marknagel keine dem Fixateur externe oder Plattensystemen vergleichbare Stabilität^{18,24,25,37,33,40,45,83,84,177}. Marknägel und Platten haben den entscheidenden Nachteil, dass durch ihre Präsenz in der Heilungszone die dort stattfindenden Prozesse^{3,127,140} gestört werden. Die Verwendung des externen Fixateurs hingegen erlaubt es durch die frakturferne Fixierung über Pins die Frakturheilung zu analysieren oder Therapien zu etablieren, ohne dass es im Spalt zu Wechselwirkungen zwischen Implantat und Gewebe kommt^{3,8,40,53,70,81,84,127,140}. So wird der Fixateur externe heutzutage häufig für experimentelle Studien angewendet^{3,6,8,10,21,23,28,30,31,36,47,48,53,57,67,70,76,81,82,97,118,120,127,129,138,145,170,177,178}. In der Humanmedizin gilt er gegenüber anderen Systemen als sehr gewebeschonend⁸¹ und gut verträglich^{70,172}. Neben seiner Effektivität stellt er sich unkompliziert im Aufbau dar. Je nach Tierart kann im Experiment eine komfortable Größe mit entsprechend geringem Gewicht verwendet werden (Punkt 3.2.2). Der Aufbau und das Design des Fixateurs haben eine große Auswirkung auf dessen Steifigkeit⁸⁴. So zeigten rostfreie Stahlpins die größte axiale Steifigkeit. Auch wird ein Fixateurkörper aus Metall im Rattenmodell als am stabilsten bewertet^{40,81,179}. Insgesamt verspricht die Verwendung des Fixateur externe ein leicht

reproduzierbares und biomechanisch gut definiertes Modell^{3,53,70,81,127,152} mit einer niedrigen Versagensrate^{81,152}.

Die wichtigsten chirurgischen Schritte dieses Modells sind nach der Knochendurchtrennung die Deperiostierung und Knochenmarkskürettage, um jegliches biologisches Potential für die Knochenheilung auszuschalten. Das chirurgische Vorgehen erfolgte nach den Knochenbehandlungs-Kriterien der Arbeitsgemeinschaft Osteosynthese (AO) und wurde stets von ein und demselben hochqualifizierten Chirurgen ausgeführt. Die Entwicklung der atrophen Pseudarthrose wurde in dieser Arbeit am Oberschenkelknochen (Femur) durchgeführt. Als geeignete Knochen für Frakturmodelle werden lange Röhrenknochen wie der Femur oder die Tibia angesehen. Zum einen eignen sie sich durch ihren anatomischen Aufbau²⁵, zum anderen treten hier am Menschen die häufigsten Pseudarthrosen auf^{20,23,24,26,27,34,36,40}. Allerdings weist die Tibia durch ihre dreieckige Form und gebogene Längsachse eine Asymmetrie auf. Dies erschwert die Implantation von stabilen Fixationssystemen und biomechanische Testungen²⁵. Der Femur eignet sich aufgrund seiner übersichtlichen Morphologie besonders gut für die Erarbeitung wissenschaftlicher Fragestellungen in der Knochenforschung^{24,40,46,84,199} und wird viel verwendet^{14,19,21,25,32,33,45,58,60,67,74}. Der symmetrische Aufbau erleichtert die chirurgischen Vorgehensweisen, sowie röntgenologische, computertomographische oder histologische Auswertungen²⁵ und ermöglicht somit eine höhere Standardisierung eines Modells. Weiterhin wird der Femur in der Ratte, wie auch beim Menschen, beim Laufen biomechanisch zyklisch belastet^{25,46}.

Kokubu und Mitarbeiter (2003)⁷ setzten in ihrem Modell eine geschlossene Fraktur, welche der natürlichen Situation näher kommt als eine Osteotomie⁴⁰. Allerdings ist das Setzen einer Fraktur mit einhergehender Montage eines Fixateur externe nicht durchführbar, da es dabei zu komplexen Frakturen, besonders um die Pinkanäle herum, kommen kann^{25,40,127}. Eine offene Fraktur mit Osteotomie ist technisch wesentlich leichter zu realisieren und bietet eine bessere Standardisierung der Situation^{25,40,70}. Auch der Fixateur externe wurde standardisiert montiert. Dies erforderte zunächst eine weitreichende Freilegung des Femurs mit einhergehendem großen Weichteilschaden, wie es auch klinisch im Fall einer Fraktur auftreten kann^{7,14,25}. Im Allgemeinen wird angenommen, dass durch das größere Trauma die Heilung beeinträchtigt werden könnte^{7,20,25,27,31,33,42,49,145}. Landry und Mitarbeiter (2000)⁵⁰ haben untersucht, inwieweit sich das Ausmaß der Gewebeerletzung auf die Frakturheilung auswirkt und beobachteten eher Gegenteiliges: die periostale Antwort und damit einhergehende Osteogenese wird von einem großen Weichteiltrauma eher angekurbelt. Auch Kokubu und Mitarbeiter (2003)⁷ stellten in ihren Vorversuchen mit Osteotomien keinen wesentlichen Heilungsunterschied zu geschlossenen Frakturen fest. Für diese Studie wurde der gewebeschonendste Zugang von lateral gewählt⁸¹, der eine stumpfe Präparation zwischen den Muskelbäuchen bis auf den Femur erlaubt. Um die Operation standardisiert

und reproduzierbar durchzuführen, wurde der Fixateur externe vor der Osteotomie komplett montiert^{3,81,127}. So konnte einer Fragmentdislokationen durch Bänderzug und Muskelkräfte vorgebeugt werden^{3,81}. Dazu mussten zunächst die Pins des Fixateurs gesetzt werden. Hier wurde ein größerer Pindurchmesser (1,25 mm) im Vergleich zum Bohrloch (1 mm) gewählt, da dieses Übermaß den Verbund mit dem Knochen und somit die Stabilität des Fixateurs verbessert^{7,76,83,170}. Ebenso verringert ein größerer Pindurchmesser das Risiko von Pinbrüchen während der Tragezeit¹⁷⁰. Der Querbalken des externen Fixateurs wies vier Nuten für die Pins auf. So ließ er sich als Bohrschablone nutzen, was das parallele Setzen der Bohrlöcher in einem definierten Abstand erheblich vereinfachte und standardisierte¹²⁷. Da beim Bohren leicht thermische Nekrosen des Knochens entstehen, wurde darauf geachtet, mit stets scharfen Bohrern nur langsam und ohne großen Druck zu bohren und den Knochen ständig durch Spülungen zu kühlen. Die Kortikalis wurde monokortikal gebohrt und die Pins bikortikal eingedreht. Auf diese Weise sind die Pins besser in der Kortikalis verankert was ebenso die Stabilität des Fixierungssystems steigert. Bei vorsichtiger Operationstechnik zerstören die Pins keine größeren Gefäße und beim langsamem Eindrehen von Hand entstehen keine thermischen Nekrosen⁴¹. Das exakt senkrechte Eindrehen aller Pins, wodurch Lysen-auslösende Spannungen vermieden werden^{32,81,127}, gelang wiederum mit dem Fixateur-Querbalken als Schablone. Nach der vollständigen Montage des Fixateurs wurde mittels einer Trennscheibe die Osteotomie durchgeführt. Auch bei diesem Vorgang musste stetig zur Kühlung gespült werden, um Knochennekrosen zu verhindern⁴¹. Diese würden der Entwicklung der atrophen Pseudarthrose zwar entgegen kommen, lassen sich aber nicht standardisieren. Im Anschluss an die Osteotomie wurde das umliegende Weichgewebe ebenfalls gründlich gespült, um Knochenspäne mit ihrer heilungsfördernden Wirkung oder auch mögliche Metallspäne zu entfernen^{3,81}.

Die zusätzlichen Manipulationen in der Versuchsgruppe erforderten eine anschließende Demontage des Fixateurs. Das Periost wurde im Abstand von zwei Millimetern von der Osteotomie thermisch zerstört, ebenso sämtliche darin enthaltene Zellen. Damit wurde die Knorpel- und Knochenformierung an der Verletzungsstelle sowie die dort vorliegende Blutversorgung nachhaltig inhibiert^{85,114}. Schweiberer und Mitarbeiter (1999)¹⁸ verwiesen auf einen dem Periost innewohnenden Progenitorzelltyp, die präterminierten osteogenen Stammzellen (DOPC). Diese üben vor allem initial eine Schrittmacherfunktion im Heilungsprozess aus und können sich zu sämtlichen für die Osteogenese notwendigen Zellen differenzieren (Punkt 2.2.2). Gleichzeitig wird über die zerstörte Gefäßversorgung verhindert, dass initial osteogene Stammzellen aus dem umliegenden Weichgewebe in die Defektzone einwandern^{10,28,67,78,82,112}. Die Deperiostierung wird in der Literatur als eine sehr effektive Methode angesehen, um erfolgreich eine atrophe Pseudarthrose zu erzeugen^{3,7,17,26,33,36,47,83}. Kokubu und Mitarbeiter (2003)⁷ führten Vorversuche zum Kautern des Periosts durch und konnten bei vorsichtiger Vorgehensweise keine thermischen Nekrosen an

der Kortikalis feststellen. Das für den kortikalen Knochen schonendere Abziehen des Periosts (Strippen) ^{31,47,48,53,138} wurde als Zelleliminationsmethode nicht als ausreichend erachtet, da Teile der Kambiumzellschicht auf der Kortikalis verbleiben können ⁵¹. Durch die Kürettage der Knochenmarkshöhlen im Abstand von vier Millimetern vom Spalt mit anschließender Spülung wurde auch die endostale Regenerationsreaktion gehemmt. Die Manipulationsabstände von der Osteotomie (2 und 4 mm) werden als ausreichend erachtet, um während der nachfolgenden achtwöchigen Standzeit die heilungsbezogenen Zellreaktionen dieser Einheiten zu inhibieren ^{14,24,33,47,60}.

Zur endgültigen Montage des Fixateurs wurde der Fixateur-Querbalken als Maß für einen standardisierten Querbalken-Knochenabstand herangezogen. Der gewählte Abstand von zwei Querbalkenbreiten (10 mm) verhinderte Überlagerungen des röntgendichten Querbalkens mit dem Femur bei den radiologischen Verlaufskontrollen.

Die abschließende Hautnaht wurde um die Pins herum gesetzt. Hierdurch können Hautreizungen auftreten, die Wundheilungsstörungen verursachen und Mikroorganismen einen erleichterten Zugang ermöglichen. Möglicherweise würde der Wundverschluss mittels eines Hautlappens diese Faktoren reduzieren. Dabei werden Stichinzisionen im Hautlappen vorgenommen und über die Pins gezogen. Die endgültige Hautnaht liegt letztendlich weiter von der Operationsstelle entfernt ¹⁷⁸.

Da das Gesamtprojekt auch Tiergruppen mit Therapieversuchen umfasste, die mit autologen Zellen behandelt wurden ^{8,152-154} (Punkt 3.2.1), wurde aus Gründen der Standardisierung sämtlichen Tieren Knochenmark aus der rechten Tibia entnommen. Dies schloss auch die in dieser Arbeit beschriebenen Tiere zur Modelletablierung ein. Diese Entnahme erfolgte an der kontralateralen Tibia um Reizungen am zu osteotomierenden Femur zu vermeiden. Bei diesem einfachen, wenig invasiven Eingriff per kurzer Inhalationsnarkose zwei Wochen pre operationem wurde nur eine kleine Menge Aspirat (1 ml) entnommen. Insgesamt ist nicht davon auszugehen, dass diese Maßnahmen die Heilungsvorgänge am osteotomierten Femur beeinflussten. Ebenso erforderte die Standardisierung die Applikation eines Placebos (Zellmedium) zwei Tage post operationem in den Osteotomiespalt der Tiere der Versuchsgruppe (Punkt 3.2.5). Es handelte sich um ein einfaches, flüssiges Zellmedium ohne weitere Agenzien, somit war ein Einfluss auf den Heilungsprozess nicht zu erwarten ¹⁸⁰⁻¹⁸². Es wird vermutet, dass das Medium im Verlauf der Standzeit resorbiert wird. Dennoch hätte zur besseren Vergleichbarkeit der Tiergruppen in dieser Studie die Kontrollgruppe ebenfalls Zellmedium erhalten müssen, um so einen Einfluss des Mediums konsequent ausschließen zu können.

5.1.4 Entnahme und Aufbereitung des Untersuchungsmaterials

Die Entnahme der zu untersuchenden Femora nach der Standzeit war einfach, der Fixateur externe verblieb zunächst aus Stabilitätsgründen am Knochen. So konnte das Kallusgewebe

durch von außen einwirkende Kräfte keinen Schaden nehmen. Bei der Präparation des Femurs wurde eine dünne Muskelschicht auf der Knochenoberfläche belassen, ebenfalls um das Kallusgewebe zu schonen. Der Fixateur wurde entfernt, sobald die Präparate durch die anschließende Fixierung mittels Formaldehyd ausgehärtet waren.

Das Anfertigen der Serienschnitte aus dem Osteotomiebereich erfolgte am eingebetteten Präparat (Punkt 3.5.1). Die unentkalkten Kunststoffpräparate waren schwierig zu schneiden, da bereits kleinste, nicht ausreichend infiltrierte Knochenareale zu Zerreißen des Schnittes führten. In diesen Fällen war ein Auflösen der Präparate in Methoxyethylacetat (MEA) notwendig. Die Knochen mussten erneut die vollständige Prä- und Infiltrationskaskade durchlaufen und anschließend neu eingebettet werden, was zu optimalen Schnitten führte. Aus den entkalkten Paraffinpräparaten wurden problemlos Serienschnitte angefertigt. Binde- und Knorpelgewebe in Schnittpräparaten können gut mittels Safranin Orange/ Lichtgrün-Färbung differenziert werden. Bei den Färbeversuchen an den unentkalkten Kunststoffpräparaten stellte sich jedoch heraus, dass die Färbung mit Safranin Orange/ von Kossa die beste Übersicht bot.

5.1.5 Auswertungen

Um die Auswertung der Gewebedaten zu standardisieren wurde eine ROI festgelegt (Punkt 3.6.1), die 7 mm breit war und so nur den osteotomiespaltnahen Bereich umfasste. Reaktionen des Knochens und der Weichteile durch die Bohrdrähte wurden dabei nicht in die Auswertung aufgenommen, um eine Verfälschung der Ergebnisse zu vermeiden. Die Höhe der ROI legte sich durch die Höhe des weichen, periostalen Kallus fest, variierte somit von Tier zu Tier. Auf diese Weise konnte sichergestellt werden, dass das im Osteotomiebereich entstandene Gewebe komplett erfasst wurde.

Die Auswertung der Röntgenbilder und die Festlegung der zu untersuchenden Kriterien wurden durch die Autorin durchgeführt. Aus diesem Grund erfolgte deren Beschreibung einschließlich der Größenverhältnisse rein subjektiv. Um dies zu relativieren kamen pro Tier und Untersuchungszeitpunkt Röntgenaufnahmen in drei verschiedenen Ebenen zum Einsatz. So war es möglich, eine vergleichende und aufschlussreiche Übersicht im Hinblick auf den Heilungsvorgang bzw. die Etablierung der atrophen Pseudarthrose zu erhalten. Insgesamt liefern zweidimensionale Röntgenbilder^{14,20,36,125} nur begrenzte Informationen über den Heilungsverlauf^{20,34,84}. In Kombination mit der Histologie, Histomorphometrie und Biomechanik ergibt sich jedoch eine eindeutige Aussage⁸⁴. Die Aufnahmen lassen sich mittels der heutzutage überall verfügbaren Geräte kostengünstig, mit geringem Aufwand und im Tierversuch über eine nur sehr kurze Narkose schnell erstellen. Die Belastung der Tiere und ein eventueller Einfluss auf die Frakturheilung durch zusätzliche Faktoren werden so minimiert.

Im Tierversuch und am Patienten hat in den letzten Jahren die Untersuchung von Heilungsbeeinträchtigungen mittels Mikro-Computertomographie immer mehr zugenommen^{11,25,126}. Die Erstellung dieser dreidimensionalen Aufnahmen^{11,27,36,48,70,73,74,125} ergibt zuverlässigere Serienschnittbilder in allen Ebenen, welche quantitative Messungen der Struktur und Zusammensetzung von Geweben mit einer höheren Auflösung ermöglichen^{11,31,34,36,48,73,74,83,84,125,199}. Mit dieser Alternativmethode können evtl. zusätzliche Informationen abgeleitet werden^{11,25,26,84,199} um vergleichbare oder auch bessere Prognosen stellen zu können¹²⁵. Allerdings stellt es sich teilweise schwierig dar, die entstehende Datenfülle entsprechend zu deuten¹²⁵. Da die kostspieligen Geräte häufig noch nicht zur Verfügung stehen und die Untersuchung für die Patienten eine hohe Strahlenbelastung bedeutet^{11,126}, wird diese Bildtechnik am Patienten derzeit als „Goldstandard“ geführt und vorwiegend zur prä-operativen Planung eingesetzt^{20,34}. Auch ist die Verwendung bei bestehenden Metallimplantaten als kritisch zu werten²⁵ und im Tierversuch zeigt sie sich durch eine lange Aufnahmedauer mit entsprechender Narkosedauer als relativ aufwändig.

Derzeit gilt die Erstellung von Röntgenaufnahmen sowohl am Patienten im klinischen Alltag als auch im Tierversuch als Standard und wird am häufigsten eingesetzt^{11,20}. Die Fragestellungen dieser Studie wurden mit Unterstützung dieses Verfahrens ausreichend beantwortet, daher konnte auf die zusätzliche Auswertung über die Mikro-Computertomographie verzichtet werden.

Die deskriptiv-histologische Untersuchung der Movat Pentachrom-gefärbten Präparate unter aufsteigender lichtmikroskopischer Vergrößerung erfolgte nach einem Schema, in dem die zu untersuchenden Gesichtspunkte selbst zusammengestellt und dem Thema dieser Arbeit entsprechend gewichtet wurden. Diese deskriptiven Beurteilungen wurden durch die histomorphometrisch erhobenen Daten untermauert und ergänzt, wodurch sich die Gesamtbeurteilung des Heilungsverlaufes bzw. der Pseudarthroseentwicklung objektivierte.

Die Bestimmung der Osteoklastenzahl erfolgte unter dem Lichtmikroskop. Gezählt wurden aktive Osteoklasten, die sich rosarot angefärbt darstellten, mindestens zwei Kerne enthielten und sich in unmittelbarer Nähe des Knochens befanden^{11,97}. Bei der TRAP-Färbung wird zur Bestimmung der Osteoklasten die für sie charakteristische, lysosomenständige Tartrat-resistente saure Phosphatase, ein Enzym, angefärbt. Dabei ergaben sich auch innerhalb eines Präparates unterschiedlich abgesättigte Anfärbungen, vermutlich je nach Enzymaktivität. Allerdings könnten diese unterschiedlichen Anfärbungen der Osteoklasten auch durch den vorherigen Aufbereitungsprozess zustande gekommen sein. Enzyme sind sehr hitzeempfindlich. Die entkalkten Knochen mussten zur Einbettung mit teils bis zu 60°C erhitztem Paraffin übergossen werden. Diese Temperaturen könnten teilweise eine Denaturierung der Enzyme hervorgerufen haben. Weiterhin zeigte sich die Markierung der ROI zur Osteoklastenauswertung schwierig, da die eingesetzte Plexiglasschablone leicht

verrutschte. Um Fehler seitens der Untersucherin zu verringern wurde eine Dreifachzählung eines Schnittpräparates mit anschließender Berechnung des Mittelwertes durchgeführt. Die Angabe der Osteoklastendichte, definiert als die Anzahl der Osteoklasten pro mm² Knochen [OC/ mm²], erfolgte mit Hilfe der in der Movat Pentachrom-Färbung bestimmten Knochenflächen [mm²]. Die Bestimmung der Dichte ermöglicht den objektiven Vergleich, denn anhand der Absolutwerte war aufgrund der interindividuell unterschiedlich großen ROI-Gesamtflächen keine gültige Aussage möglich.

Die Darstellung der Blutgefäße in den entkalkten Schnittpräparaten erfolgte anhand der α -SMA-Färbung, welche die glatte Gefäßmuskulatur mit einer intensiven, gut sichtbaren Rotfärbung versah. Da sich neue Kapillaren anfangs nur aus endothelialen Zellen formen, enthalten sie noch nicht die zur Färbung notwendigen Antigene. Auch weitere Versuche, diese Kapillaren mit einer Färbetechnik zu erfassen, z.B. durch Anfärbung des endothelzellständigen von Willebrand-Faktors, führten zu keinem befriedigenden Ergebnis. Daher blieb die Anfärbung der Kapillaren aus¹¹⁸. Die Auszählung der Gefäße erfolgte mittels eines Bildbearbeitungsprogrammes am Computer unter lichtmikroskopischer Kontrolle. Dabei wurde jedes gezählte Gefäß markiert, was eine Mehrfachzählung verhinderte und die Genauigkeit der Ergebnisse erhöhte. Aufgrund dieser computergestützten Untersuchung wurde jedes Präparat nur einmalig ausgewertet. Auch die Gefäßdichte wurde für den objektiveren Vergleich mit Hilfe der über die Movat Pentachrom-Färbung errechneten Flächen, in diesem Fall Bindegewebsflächen, berechnet und definierte sich als die Anzahl der Gefäße pro mm² Bindegewebe [Gefäße/ mm²].

Mit Hilfe der computergestützten Bildanalyse lassen sich histomorphometrische Daten leicht erheben. Dabei können spezielle Programme über die Modifikation von Parametern auf die besonderen Bedürfnisse einer Auswertung zugeschnitten werden. Die Breite der ROI wurde durch das Programm bestimmt, die Festlegung der Höhe erfolgte manuell vom Anwender. Die Berechnungen aller zu untersuchenden Gewebeflächen wurden auf die Größe der ROI-Gesamtfläche bezogen, um die tierspezifischen Flächenunterschiede zu relativieren. Diese prozentuale Anteilsberechnung ermöglichte den objektiven Vergleich. Ebenso können die Bildanalyseprogramme auf bestimmte Färbungen eingestellt werden. Anhand von Farbpixeln werden die zu ermittelnden Gewebetypen automatisch detektiert, was wiederum die Objektivität der Daten sichert. Bei der Safranin Orange/ von Kossa-Färbung ergaben sich einige Probleme. So konnte das Programm ähnlich angefärbte Gewebe nicht ausreichend differenzieren. Daher war es notwendig, einige Gewebebereiche manuell unter lichtmikroskopischer Kontrolle zu korrigieren bzw. zu kennzeichnen, so z.B. bei der Differenzierung der schwarz angefärbten knöchernen Gewebe der Kortikalis und der periostalen und endostalen Hartkalli oder bei der Differenzierung von rötlich angefärbtem Knorpel- und Bindegewebe. Ebenso mussten Artefakte in den Präparaten manuell aus der computergestützten Auswertung entfernt werden (Punkt 3.6.4.1). Um die Fehlerquote und

die Subjektivität zu minimieren, wurden pro Tier vier Schnitte ausgewertet. Aus diesen vier Schnitten wurde der Median berechnet, welcher eventuell auftretenden großen Streuungen der Daten innerhalb eines Tieres weniger Gewicht zukommen lässt. Im Fall der Movat Pentachrom-Färbungen mussten aus gleichen Gründen einige manuelle Markierungen und Korrekturen vorgenommen werden (Punkt 3.6.4.1). An diesem Paraffinschnitt wurden die knöchernen und bindegewebigen Flächen bestimmt, welche wiederum als Berechnungsgrundlage für die Osteoklasten- und Gefäßdichte herangezogen wurden. Die Flächendaten konnten nicht aus der Berechnung der Safranin Orange/ von Kossa-Färbungen stammen, da es sich hier um andere Tiere handelte. Die Osteoklasten-, Gefäß- und Movat Pentachrom-Färbungen erfolgten an dem entkalkten Präparat ein und desselben Tieres.

5.2 Diskussion der Ergebnisse

5.2.1 Operationsverlauf und Kontrolluntersuchungen der Versuchstiere

Die Operation verlief bei sämtlichen Tieren ohne Komplikationen. Der gute postoperative Allgemeinzustand und die sofortige, dauerhafte Belastung der osteotomierten Gliedmaße sind Zeichen für eine durch das Osteosynthesystem wiederhergestellte Funktionalität der Gliedmaße ohne, oder mit anfänglich nur geringem, Schmerz^{44,127}. Beides weist auf eine ausgeprägte interfragmentäre Stabilität hin⁴⁴.

Die Prüfung der Körpergewichte bei den wöchentlichen Kontrolluntersuchungen ergab eine signifikante Differenz am Tag der Osteotomie. Diese resultierte aus der Gewichtsspanne für den Einsatz der Tiere in der Studie. Am Tag der Operation lagen die Gewichte der Tiere der Versuchsgruppe überwiegend im unteren Bereich dieser Gewichtsspanne, die der Kontrolltiere im oberen. Letztendlich blieb die Differenz ohne Bedeutung, da sich die Körpergewichte beider Gruppen nach der zweiten Standwoche wieder angeglichen hatten. Im weiteren Versuchsverlauf nahmen alle Tiere altersgemäß an Gewicht zu.

Zwei Tiere wurden aufgrund von Infektionen während der Standzeit von der Studie ausgeschlossen. Ein Tier zeigte eine tiefe, eitrige Infektion des osteotomierten Femurs mit radiologisch feststellbaren, ausgeprägten Osteolysen. Post mortem erfolgte per Obduktion die Diagnose einer infektiösen Entzündung des Knochens und des Knochenmarks (Osteitis). Das zweite Tier erkrankte an einer systemischen Infektion, gekennzeichnet durch einen schlechten Allgemeinzustand und einem stark geschwellenen, osteotomierten Femur. Es ist unwahrscheinlich, dass bereits vor der Osteotomie Infektionen vorlagen, denn Neuzugänge an Tieren stammen aus renommierten Zuchtlaboren und stehen vor ihrem Studieneinsatz einige Wochen unter Beobachtung. Ebenso verliefen die Eingriffe und Untersuchungen unter möglichst hygienischen Bedingungen. Osteitiden treten sehr häufig nach Operationen am Skelett durch eingedrungene Krankheitserreger auf¹⁸⁴. Diese können auch post operationem über die Pins des Fixateur externe in den Knochen gelangen^{32,70,76,127,185,186}. Als Folge von Infektionen können Pinlockerungen, Osteolysen und Nekrosen auftreten^{32,76,83,186}. In der

Rattenhaltung ist es möglich, dass Kontaminationen der Operationswunde mit Kot vorkommen. Da Pintraktinfektionen als Risikofaktor bei der Verwendung des externen Fixateurs bekannt sind^{32,70,76,127,185,186}, ist dieser Weg der Infektion am wahrscheinlichsten. Eine Antibiotikaphylaxe erfolgte nicht, um die Ergebnisse der nachfolgend durchgeführten Therapiestudien nicht zu beeinflussen (Punkt 3.2.1). Auch werden geringe lokale Infektionen von Ratten gut durch ihre hohe immunologische Kompetenz kompensiert^{35,127}. So wiesen die meisten Pineintrittsstellen eine gute Wundheilung auf, welche nach 14 Tagen abgeschlossen war. Pintraktinfektionen sind vermutlich auch die Ursache für die vorhandenen Verkrustungen und Granulationsgewebe an den Pineintrittsstellen, welche häufig vernehmlich an P1 und P4 mit einem Ausmaß von 1 – 5 mm auftraten. Beim Vergleich der Kontrolluntersuchungsdaten mit den histologischen Schnittpräparaten der entsprechenden Tiere ist eine eindeutige Korrelation dieser Wundverhältnisse zu bestehenden Pinkalli und Osteolysen festzustellen. Allerdings bedeutete das Vorliegen auffälliger Wundverhältnisse keinen Ausschluss aus der Studie, da anhand dieser das Ausmaß eventuell bestehender Pinkalli und Osteolysen nicht abgeschätzt werden konnte.

Vier Kontrolltiere sowie 15 Tiere der Versuchsgruppe mussten aufgrund massiver Kallusbildungen und/ oder starker osteolytischer Veränderungen um die Pins herum nach der achtwöchigen Standzeit ausgeschlossen und ersetzt werden. Dieses Ungleichgewicht zwischen den Gruppen deutet darauf hin, dass die Ursache nicht in dem nahezu identischen Operationsverlauf oder den Haltungsbedingungen liegen kann. Beinahe sämtliche Kontrolltiere entwickelten, im Gegensatz zu den Tieren der Versuchsgruppe, während der Standzeit einen den Spalt überbrückenden Kallus (Punkt 4.3.1.1). Dadurch erfolgte offensichtlich eine Entlastung des Pin-Knochen-Kontaktes. Durch die ausbleibenden Überbrückungen in der Versuchsgruppe waren die Pin-Knochen-Kontakte stärker belastet was teilweise zu einer Nekrose und Lyse des Knochengewebes um die Pins herum führte. Die daraus resultierende Pinlockerung wurde mit einer vermehrten Formierung von stabilisierendem Kallus beantwortet. Die Beeinträchtigungen ebneten den Weg für über den Pin eindringende Bakterien, die tiefe, in diesen Fällen stets vorhandene Entzündungen hervorriefen und ihren Teil zur Osteolyse beitrugen^{32,70,76}. Bestätigt wird diese Vermutung auch über die radiologisch erfasste Lokalisation der Osteolysen und Pinkalli. Sie traten meist auf der lateralen Femurseite (Kortikalis I und II), an der Eintrittsseite der Pins, auf. Auch ist bekannt, dass bei der natürlichen Belastung der Gliedmaße auf der lateralen Femurseite die meiste Kraft auftritt, was die Entwicklung von Osteolysen um die Pinkanäle begünstigt. Die erhöhte Pinkallusbildung an P1 und P4 lässt sich durch die nahe Lokalisation zu den Gelenken erklären. Durch die Gliedmaßenbelastung während der Standzeit wurden auch die Gelenke beansprucht, deren Bewegung sich auf die nahe gelegenen Pins ausweitete. Der Grund für den Ausschluss osteolytischer Tiere liegt in der mit den Osteolysen einhergehenden Pin-Lockerung. Denn diese führen wiederum zu einer vermehrten

Bewegung im Osteotomiespalt^{170,187}. Zur Schaffung der atrophischen Pseudarthrose wurde in diesem Modell jedoch eine biomechanisch möglichst rigide Situation angestrebt (Punkt 2.3.3)^{3,11,19,43,84}. Mikrobewegung im Osteotomiebereich würde die Heilung eher fördern^{4,18,29,37,41,76,118}, übermäßige Bewegung führt zu einer hypertrophen Pseudarthrose^{3,7,17,20,25,34,37,38,40,41,44,45,115}. Die radiologisch festzustellenden Ausschlusskriterien „Pinkallus > 6 Pindurchmesser“ und „Osteolyse > 1,5 Pindurchmesser“ (Punkt 4.1) wurden als Grenzwerte beschlossen, oberhalb derer man in jedem Fall von einem unerwünschten Einfluss auf die Frakturheilung ausgehen kann. Am zweiten Kortikaliskontakt eines osteolysetragenden Pins durfte keine weitere Osteolyse vorliegen. Denn in diesem Fall wäre der Pin nicht mehr fest. Die in der ROI liegenden Pins P2 und P3 zeigten ebenfalls in einigen Fällen Pinkalli (Punkt 4.2.6 + 4.3.1.1). Am histologischen Schnitt konnte anhand der Form des Pinkallus kontrolliert werden, ob das Entstehen dieser kallösen Zubildungen durch Reize von Seiten der Pins zustande kam. In solch einem Fall baut sich der Pinkallus in Form eines kleinen Vulkans um den Pin herum auf. Der Fuß des Vulkans durfte den Spaltbereich nicht tangieren, andernfalls hätte der Ausschluss des Tieres erfolgen müssen.

Der gesamte Fixateur wurde im Rahmen der wöchentlichen Untersuchungen manuell und radiologisch auf korrekten Sitz überprüft. So konnten Schrauben- und Pinlockerungen ausgeschlossen und die anatomisch korrekte Position der knöchernen Osteotomieenden überprüft werden. Post operationem blieben während des gesamten Untersuchungszeitraumes Dislokationen aus, ebenfalls ein Hinweis für eine beständige Knochen-Implantat-Steifheit¹²⁷.

5.2.2 Radiologie

Die Röntgenaufnahmen nach zwei, vier, sechs und acht Wochen Standzeit lassen einen Heilungsprozess in der Kontrollgruppe und die Entwicklung einer deutlichen Heilungsstörung in der Versuchsgruppe erkennen. In der Kontrollgruppe wurde dies durch die mit der Heilung einhergehenden, röntgenologisch feststellbaren Merkmale, wie vollständige röntgenologische Verdichtung des Osteotomiespalt mit periostaler und endostaler Kallusformierung deutlich^{2,4,7,68,77,78,170}. Bei einigen Tieren traten bereits Remodelingserscheinungen auf. Die meisten Tiere der Versuchsgruppe hingegen zeigten deutlich sichtbare Osteotomiespalte, nur wenige enthielten lokal röntgendichteres Gewebe.

So waren die **periostalen Kalli der Kontrollgruppe** bereits zwei Wochen post operationem an sämtlichen Kortizes als wolkige Verschattungen sichtbar. Da das Periost durch die Osteotomie nur durchtrennt und nicht in größerem Umfang vom Knochen abgehoben wurde^{42,85}, war es offensichtlich sehr schnell in der Lage, per intramembranöser Ossifikation auf der Kortikalisoberfläche innerhalb der ROI und direkt am Osteotomiespalt Kallus bilden. Im Verlauf der Standzeit steigerte sich die Röntgendichte der periostalen Kalli und die Kallusenden befanden sich bereits sehr früh direkt am Spalt. Dort verstärkten sie sich durch

die erhöhte Aktivität des Periosts und die zwei gegenüberliegenden Enden wuchsen aufeinander zu bis sie sich miteinander verbinden konnten. So bildete ihre den Knochen ummantelnde Überbrückung eine wellenförmige Erhebung über dem Spalt ¹⁰³. Die schnelle Entwicklung, die röntgenologisch durchgehend darstellbare Mineralisierung und die insgesamt nur geringe Verstärkung der Ausmaße der Kalli weisen auf einen Prozess hin, der unter optimalen Bedingungen störungsfrei ablief ^{19,21,24,35,45,47,127}. Ohne ausreichende Stabilität entstehen übermäßige Kalluszubildungen. Da dabei die Mineralisierung beeinträchtigt ist, wäre der Osteotomiespalt fortwährend im Röntgenbild sichtbar geblieben ^{35,44,76,118}. Nach der Standzeit zeigten mehr als zwei Drittel der Kontrolltiere periostale Überbrückungen. Da 30 – 50 % der Knochenmineralisierungsdichte benötigt werden, um knöchernes Gewebe röntgenologisch darzustellen ¹²⁷, waren vermutlich mehr Überbrückungen vorhanden. Aufgrund mangelnder optischer Sichtbarkeit wurden diese jedoch als „nicht überbrückt“ gewertet. Darauf verwiesen auch die dort sichtbaren Kallusenden, welche sich meist direkt in Osteotomiespaltnähe befanden. Bei manchen Tieren war der periostale Kallus im Verlauf der Standzeit dünner geworden, bei zweien so stark, dass er letztendlich nicht mehr erkennbar war (lateral). Auch war häufig die wellenförmige Erhebung verschwunden. Diese Kallusreduzierungen lassen vermuten, dass bereits der Prozess des Remodeling eingesetzt hat ^{3,35,118,127}. Da die vollständige Integrität des Knochens offensichtlich wiederhergestellt war, konnte der periostale Kallus fortlaufend abgebaut werden ^{35,76,127,188}.

Die **periostalen Kalli der Versuchsgruppe** waren erst nach sechs Wochen Standzeit bei allen Tieren an allen Kortizes darstellbar. Somit zeigte die Versuchsgruppe eine deutliche Heilungsverzögerung. Zum frühen Zeitpunkt waren einige Kalli sehr weit vom Osteotomiespalt entfernt außerhalb des gekauterten Bereiches erkennbar, was auf die Aktivität des verbliebenen Periosts zurückzuführen ist. Nur dieses gesunde Gewebe war per intramembranöser Ossifikation zu einer schnellen Knochenbildung fähig ^{11,16,19,51,70,83,104}. Während der Standzeit näherten sich die meisten Kallusenden dem Spaltbereich nur geringfügig an, so dass diese letztendlich innerhalb des gekauterten Bereiches endeten. Das langsam voranschreitende Wachstum des Kallusenden in Richtung Osteotomiespalt lässt vermuten, dass das Periost über den gekauterten Bereich hinweg wachsen und, im Vergleich zur Kontrollgruppe etwas verspätet, dort ebenfalls wieder Kallus bilden konnte. Dieser war in einem Fall (medial) sogar zu einer Überbrückung fähig. Aber der in den meisten Fällen dennoch bestehende weite Abstand der Kallusenden vom Osteotomiespalt von mindestens 0,5 mm weist eindeutig auf eine Heilungsstörung hin. Weiterhin nahmen, neben vielen zur Kortikalis parallel verlaufenden freien Kallusenden, auch viele zum Spalt hin an Stärke ab. Da hier noch keine Überbrückung aufgetreten war, kann in diesen Fällen kein Kallus abbauender Remodelingprozess zugrunde gelegen haben. Vielmehr ist zu vermuten,

dass die intramembranöse Ossifikation von Seiten des Periosts hier verringert oder zum Stillstand gekommen war.

Die Entwicklungsverzögerung der Versuchsgruppe stellte sich an den endostalen Kalli sehr deutlich dar. Die **endostalen Kalli der Kontrollgruppe** waren nach zwei Wochen Standzeit bei knapp der Hälfte der Tiere feststellbar. Sie traten in Form von zwei diffusen Verschattungsfronten im Knochenmarksbereich proximal und distal der Osteotomie und dieser sehr nahe gelegen auf. Nach sechs Wochen zeigten sämtliche Tiere endostalen Kallus. Da bei den Kontrolltieren das Knochenmark nicht kürettiert worden war, war hier offenbar eine frühe Kallusbildung von Seiten des Endosts bzw. Knochenmarks möglich^{3,11,21,41,42,47,95}, welche das Knochenmark zunächst vom Osteotomiebereich abgrenzte und die interkortikale Stabilität erhöhte^{21,47,57,189}. Während der Standzeit wuchsen die Kalli in den Osteotomiebereich hinein, so dass bereits nach sechs Wochen ein Viertel dieser Kalli den Osteotomiespalt überbrückte. Zwischen der sechsten und der achten Woche kamen vermutlich weitere Überbrückungen zustande. Diese waren jedoch nach der Standzeit teils nicht mehr feststellbar, da die Röntgendichte der Kalli wieder abnahm, einige verschwanden sogar völlig. Diese Reduktion der endostalen Kalli erfolgte vermutlich im Rahmen des Remodeling, wodurch der natürlichen Anatomie entsprechend der Knochenmarkskanal wiedereröffnet wurde^{3,21,127}. Auch die noch feststellbaren, in Form zweier Fronten gegenüberstehenden, endostalen Kalli hatten den Spalt vermutlich schon überbrückt, dies war nur aufgrund mangelnder Röntgendichte des zwischenliegenden jungen Kallusgewebes noch nicht erkennbar.

Die **endostalen Kalli der Versuchsgruppe** traten erst nach vier Wochen Standzeit bei etwa der Hälfte der Tiere auf. Sie befanden sich vornehmlich mindestens 0,5 mm vom Osteotomiespalt entfernt, jedoch meist innerhalb des kürettierten Bereiches. Offenbar nahm der Regenerationsprozess des Endosts bzw. Knochenmarks durch die zusätzlichen Manipulationen mehr Zeit in Anspruch. Insgesamt stellten sich die Kalli etwas dicker dar als bei den Kontrolltieren. Anscheinend wurde durch die Kürettage ein breiterer intramedullärer Gewebereich angeregt, stabilisierenden Knochen zu bilden. Nach sechs und auch acht Wochen wiesen beinahe alle Tiere der Versuchsgruppe endostale Kalli in Form von zwei sich gegenüberstehenden Fronten auf. Wie bei den Kontrolltieren waren sie näher an den Spalt herangerückt. Letztendlich befand sich ein Drittel der Kalli im oder direkt am Spalt. Ein Zusammenhang zu der Entfernung der periostalen Kallusenden vom Spalt war nicht zu erkennen. Die meisten der endostalen Kalli blieben mindestens 0,5 mm vom Spalt entfernt, wenige sogar wesentlich weiter. Das Heranrücken der Kalli an den Spalt geschieht durch Knochen aufbauende Vorgänge zum Spalt hin und durch Knochen abbauende Vorgänge am Knochenmarksbereich. Nach der Standzeit stellten sich die endostalen Kalli der Versuchsgruppe ähnlich dünn dar wie die der Kontrollgruppe. Anscheinend überwogen in der Versuchsgruppe die resorptiven Vorgänge, wodurch die Knochenmarkshöhle sich etwas

erweitern konnte und der Kallus dünner wurde. Da nach acht Wochen Standzeit röntgenologisch noch keine endostale Überbrückung feststellbar war, ist anzunehmen, dass die endostale Ossifikation im Vergleich zur Kontrollgruppe stark verlangsamt ablief oder sogar zum Stillstand gekommen war. Möglicherweise hat das Endost hier, wie für eine atrophe Pseudarthrose typisch, knöcherne Kappen gebildet^{3,21,47,57,76,138}, die das Knochenmark zum Spaltbereich abgrenzen.

Die **intrakortikalen Spaltbereiche der Kontrollgruppe** wiesen ab der vierten Standwoche sich zunehmend verstärkende Verschattungen auf. Nach der Standzeit trat dort bei der Hälfte der Tiere Gewebe auf, welches die dem kortikalen Knochen entsprechende Röntgendichte zeigte. Offensichtlich war der Osteotomiebereich der Kortikalis ebenfalls knöchern überbrückt worden bzw. wurde diese Überbrückung gerade gebildet.

In den **intrakortikalen Spaltbereichen der Versuchsgruppe** waren erste Verschattungen erst nach sechs Wochen erkennbar, und dies auch nur bei sehr wenigen Tieren. Wiederum ist eine zweiwöchige Zeitverzögerung im Vergleich zu den Kontrolltieren zu bemerken, ein weiterer Hinweis für die Heilungsbeeinträchtigung. Auch nach der Standzeit zeigten sich meist keine Verschattungen und die Osteotomiespalte blieben deutlich sichtbar. Nur zwei Tiere hatten medial deutliche Verschattungen. Bei einem dieser Tiere traten röntgenologisch gleichzeitig periostale Überbrückungen auf.

Entsprechend der Entwicklung der endostalen Kalli trat während der Standzeit zunehmend röntgendichtes Gewebe im **intramedullären Spaltbereich der Kontrolltiere** auf. Nach der Standzeit zeigten sich die endostalen Kalli entweder noch in Form zweier Fronten oder sie waren schon im Zuge des Remodelings abgebaut worden. Die deutlichen Verschattungen zwischen zwei gegenüberstehenden Fronten sind hinweisend für eine bevorstehende vollständige Mineralisierung dieser Bereiche. Denn beim physiologischen Heilungsablauf bildet sich im Frakturgranulom per enchondraler Ossifikation zunächst Knorpelgewebe, welches später durch Knochen ersetzt wird^{16,41,76}. So war der ursprüngliche Osteotomiespalt in nahezu allen Fällen nicht mehr erkennbar.

Ganz im Gegensatz dazu stand der **intramedulläre Spaltbereich der Versuchsgruppe**. Hier hatte sich, ebenfalls zeitverzögert, eine leichte Dichtezunahme des Gewebes feststellen lassen, offenbar durch eine Umstrukturierung des Gewebes. Diese änderte sich im Verlauf der Standzeit bei den meisten Tieren nur noch unwesentlich, so dass der Osteotomiespalt auch nach acht Wochen deutlich abgrenzbar blieb. Offenbar war hier die enchondrale Ossifikation durch mangelnde Stimulation zum Erliegen gekommen, so dass eine Aktivierung der Knorpelzellen unterblieb und kein Knorpel gebildet wurde^{3,7,17,42}. So blieb die Kallusbildung aus^{2,4,16,18,95} und es erfolgte langfristig die Bildung von Ersatzgewebe^{7,14,19,21,38,49,60,70,76}.

Die **Integrität der Kortizes der Kontrollgruppe** veränderte sich im Großen und Ganzen nicht. In einem Fall trat direkt an der Osteotomieschnittkante eine kleine Abrundung einer endostalen Kortikalisecke auf. Vermutlich war die Kortikalis an dieser Stelle durch die Osteotomie soweit beeinträchtigt worden, dass sie nekrotisch wurde und anschließend, im Zuge der Heilung, abgebaut und durch neues Knochengewebe ersetzt wurde.

Die **Integrität der Kortizes der Tiere der Versuchsgruppe** war bereits nach vier Standwochen beeinträchtigt. So wiesen die Kortizes diverse Einbuchtungen vor den Kallusenden und Abrundungen der Schnittkantenecken auf. Harrison und Mitarbeiter (2003)⁷⁶ beschrieben diese in ihrer Studie bereits nach drei Wochen. Sie wurden im weiteren Verlauf größer, so dass der intrakortikale Spaltbereich bei vielen Tieren nach der achten Standwoche erweitert erschien. Als Erklärung kommt hier ein Ungleichgewicht der knochenauf- und -abbauenden Prozesse in Frage, eine Folge der stark beeinträchtigten Reparationsvorgänge. Hat die Aktivität des Peri- und Endosts bzw. Knochenmarks abgenommen, bzw. sind diese, wie in diesem Fall, im entsprechenden Knochenbereich gar nicht vorhanden, so können sich keine Chondro- und Osteozyten differenzieren, um Knorpel- oder Kallusgewebe zu formieren^{3,7,17,47,49,53,76,83,128}. Die knochenständigen Osteoklasten behalten ihre Aktivität jedoch bei und resorbieren Knochengewebe, wodurch zunächst Lakunen entstehen, die sich später erweitern. So wurde während der Standzeit viel Knochensubstanz am Spaltbereich abgebaut. Die Kortikalisenden verkürzten sich^{3,7,20,29,34,37,38,49,60,76} bzw. erweiterte sich der Osteotomiespalt was die Voraussetzungen für eine spätere Heilung erschwerte^{2,6,7,14,17,44,48,76,79,122}.

Die **Umgebung um die Kirschner-Drähte** zeigte in beiden Tiergruppen im Laufe der Standzeit Gewebe, welches Pinkalli und osteolytische Veränderungen entwickelte. Diese traten in der Versuchsgruppe jedoch wesentlich häufiger und ausgeprägter auf als in der Kontrollgruppe. Auf die röntgenologische Darstellung, die Entstehung und die Problematik dieser Pinkalli wurde bereits unter Punkt 5.2.1 eingegangen. Die dort gegebene Begründung, nach welcher sich die Pinkalli durch die mangelnde Stabilität im Osteotomiebereich und somit größere Belastung der Pin-Kortikalis-Kontaktstellen entwickelten, kommt in der Kontrollgruppe nur bedingt zum Tragen. Denn durch die dortige schnelle Osteotomieüberbrückung kann eine Instabilität nur anfänglich aufgetreten sein. Offensichtlich werden hier weitere Faktoren deutlich, die beide Gruppen betreffen, wie z.B. Bewegung der Gliedmaße durch das Tier mit einhergehendem lokalen Stress auf die Pindrähte oder Pinkanalinfektionen, die eine Osteolyse nach sich ziehen. Weiterhin fiel ins Auge, dass in der Kontrollgruppe ab der sechsten und in der Versuchsgruppe ab der achten Standwoche die Ausmaße einiger großer Pinkalli abnahmen und einige Osteolysebereiche wieder röntgendichteres Gewebe aufwiesen. Hier wird deutlich, dass die bei stark beanspruchten, osteolytischen Pinkkontaktstellen produzierten exzessiven Pinkalli ihre stabilisierende Funktion erfüllten und dem kortikalen Knochen die Möglichkeit zum Wiederaufbau gaben.

War von Seiten der Kortikalis eine genügende Stabilität geschaffen, wurde der große Pinkallus nicht mehr benötigt und konnte langsam abgebaut werden. Dieser Prozess setzte in der Kontrollgruppe offensichtlich durch die zusätzliche Festigung des Osteotomiebereiches früher ein, als dies in der Versuchsgruppe möglich war.

5.2.3 Histologie und Histomorphometrie

Der radiologisch festgestellte Heilungsunterschied zwischen den Tiergruppen konnte durch die histologischen und histomorphometrischen Analysen untermauert werden.

Die **Gesamtübersicht der deskriptiv-histologischen Analyse** mit Hilfe der Movat Pentachrom-Färbungen bestätigt die Vermutung, dass in der Kontrollgruppe mehr Brückenbildungen vorhanden sind, als radiologisch diagnostiziert wurden. Stets war eine vollständige knöcherne Überbauung der Osteotomie periostal und endostal festzustellen. Auch die vermuteten Remodelingprozesse in der Kontrollgruppe wurden histologisch nachgewiesen³. So bildete die Kortikalis bei allen Tieren strukturell eine durchgehende Einheit und war vollständig wiederhergestellt. Den reduzierten, periostalen Kalli lag das vollständig rekonstruierte Periost auf. Die Knochenmarkshöhle zeigte bei einigen Tieren ihr physiologisch durchgängiges Erscheinungsbild mit enthaltenem Knochenmark.

In der Versuchsgruppe wiesen fünf von acht Tieren deutlich das Bild einer atrophen Pseudarthrose mit den zugehörigen morphologischen Kriterien auf. Aufgrund der ausbleibenden knöchernen Überbrückung zeigte sich ein klar abgrenzbarer Osteotomiespalt, viel spaltfüllendes Bindegewebe, spaltferne areaktive Kalli, abgerundete und verkürzte Kortikalisenden, leere Osteozytenlakunen im Knochengewebe, ein unterbrochenes Periost und intramedullär knöcherne Kappen, die das Knochenmark abgrenzten. Die übrigen drei Tiere wiesen an verschiedenen Lokalisationen innerhalb der ROI in unterschiedlichen Ausmaßen reaktives Gewebe, wie sich entwickelnde periostale, intrakortikale oder endostale Kalli, auf. Ein Tier zeigte eine beinahe vollständige, mediale Überbrückung der Osteotomie periostal, intrakortikal und endostal. Ein weiteres Tier wies eine in Überbrückung begriffene endostale Reaktion auf, ein anderes eine entsprechende periostale/ intrakortikale Reaktion ebenfalls medial. Weiterhin war nur noch eine lokal sehr begrenzte endostale Gewebeaktivität bei einem Tier zu erkennen.

Die **Gesamtanalysen der Osteoklasten- und Gefäßdichte** ergaben keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Gruppen. Die ähnlichen Osteoklastendichten könnten sich durch die remodelingbedingten Resorptionen der Kontrollgruppe und das Ungleichgewicht zwischen Knochenauf- und -abbau der Versuchsgruppe, wobei der Knochenabbau deutlich überwog, erklären. Die ähnliche Gefäßdichte widerspricht scheinbar dem Vorliegen einer atrophen Pseudarthrose, galt bislang doch die Annahme, dass atrophe Pseudarthrosen generell durch eine gestörte Vaskularisierung begründet seien^{10,19,27,33,34,37,115,119,137,138,151} und somit die Gefäßdichte entsprechend geringer sein müsste.

Allerdings existieren jüngere Studien und auch diese Arbeit, die belegen, dass die Gefäßdichte von Ratten mit einer atrophen Pseudarthrose acht Wochen post operationem nicht von denen mit einer physiologisch verlaufenden Heilung abweicht^{14, 19,27,47,48,138,159,190,191}. So stellten Reed und Mitarbeiter (2003)¹³⁸, Geris und Mitarbeiter (2010)⁴⁷, Tawonsawatruk und Mitarbeiter (2014)⁴⁸, Minkwitz und Mitarbeiter (2015)²⁷ sowie Waki und Mitarbeiter (2015)¹⁴ fest, dass zu Beginn der Entwicklung einer atrophen Pseudarthrose, im Vergleich zur ungestörten Frakturheilung, die Gefäßbildung weit zurück bleiben kann. Nach acht Wochen Standzeit hat die Gefäßdichte jedoch wieder aufgeholt, so dass sich kein signifikanter Unterschied zwischen atropher Pseudarthrose und ungestörter Frakturheilung ergibt. Die Pseudarthrosetiere erreichen das entsprechende Dichte-Level nur zu einem späteren Zeitpunkt^{14,27,47,138}. Auch im Studienvergleich an menschlichen atrophen Pseudarthrosen konnte eine gute Durchblutung festgestellt werden^{27,47}.

Auf die Osteoklasten- sowie Gefäßdichte wird in der Ursachenanalyse genauer eingegangen.

Die **Gesamtübersicht der histomorphometrischen Daten** unterstützte die vorangehenden Aussagen.

Sämtliche Kontrolltiere zeigten eine vollständige knöcherne Überbauung der Osteotomie periostal und endostal mit teils einhergehenden Remodelingprozessen³.

Morphologisch wiesen sieben Tiere der Versuchsgruppe eindeutig die Charakteristika einer atrophen Pseudarthrose auf. Ein Tier zeigte Heilungstendenzen, die sich von endostal her entwickelt zu haben schienen. Hier lag auf lateraler Seite endostal bereits mineralisierter chondraler Knorpel vor, der sich bis in den intrakortikalen Spalt hineinzog.

Die signifikant größeren periostalen Kallusflächen der Kontrolltiere wiesen auf eine dem normalen Heilungsprozess entsprechende Kallusbildung hin. In der Versuchsgruppe errechnete sich durch den fehlenden Brückenkallus und die spaltfernen Kalli eine kleinere periostale Kallusfläche.

Die signifikant kleineren endostalen Kallusflächen der Kontrolltiere lassen sich durch die fortgeschrittenen, remodelierenden Heilungsprozesse erklären auf welche bereits in der radiologischen Befunddiskussion hingewiesen wurde (Punkt 5.2.2). Die endostalen Kalli waren im Osteotomiespalt zu einer schmalen, knöchernen Brücke verschmolzen bzw. zeigten einige Tiere histologisch nur noch inselförmige Reste dieser Brücken. Die Tiere der Versuchsgruppe hingegen wiesen, aufgrund der weniger fortgeschrittenen Heilung, vornehmlich zwei sich gegenüberstehende Kallusfronten auf.

Die Flächenberechnung der Osteotomiespalte ergab keine signifikanten Unterschiede, offenbarte jedoch bzgl. der Auswertung eine bedeutende Problematik. Demnach führte die anhand der periostalen Kalli festgelegte Flächenbegrenzung der ROI in der Kontrollgruppe

zu einer breiteren Ausdehnung des Spaltes. In der Versuchsgruppe waren die Verhältnisse im Fall der wenigen Überbrückungen und der sich gegenüberstehenden periostalen Kallusfronten entsprechend. Bei den spitz auf der Kortikalis auslaufenden Kallusenden stellte sich die periostale Ausdehnung der ROI im Osteotomiespaltbereich jedoch geringer dar. Demnach müsste die Versuchsgruppe bei gleicher intrakortikaler Osteotomiespaltweite wie in der Kontrollgruppe insgesamt eine kleinere Osteotomiespaltfläche aufweisen. Da sie aber laut Analyse annähernd gleich groß waren, konnte sich der Ausgleich nur über eine intrakortikale Erweiterung des Osteotomiespaltess in der Versuchsgruppe ergeben, einem weiteren Kriterium der atrophen Pseudarthrose^{3,7,17,42,49}. Diese Spalterweiterungen ließen sich auch histologisch feststellen und anhand der histomorphometrisch bestimmten, signifikant kleineren, kortikalen Fläche der Versuchsgruppe beweisen.

Auch die Gewebeanalyse der ROI-Gesamtfläche deutete auf einen Gruppenunterschied bzgl. des Heilungsfortschritts. So stand der signifikant größere Anteil an Knochengewebe in der Kontrollgruppe dem größeren Bindegewebsanteil in der Versuchsgruppe gegenüber. Mit Hilfe von knöchernem, somit hartem und nicht verformbarem Kallus wird eine Fraktur stabilisiert^{38,192} bis der frakturierte Knochen strukturell und funktional wiederhergestellt worden ist^{1-4,12,41,74,82}. Kann eine zeitgemäße Frakturüberbrückung nicht stattfinden, füllt fibrotisches Bindegewebe als Ersatzmaterial die Osteotomiezone^{7,14,21,25,38,49,60,70,76}. Hyalines Knorpelgewebe konnte in der Kontrollgruppe nicht detektiert werden. Bewegung im Osteotomiebereich triggert die Differenzierung von Chondrozyten^{2,4,16,18,20,34,130}. Bei genügender Stabilität besteht keine Notwendigkeit, über die Phase der Knorpelbildung neues, stabilitätssteigerndes Material bereitzustellen. Offensichtlich war der Heilungsprozess dieser Gruppe so weit fortgeschritten, dass durch das vorhandene, qualitativ hochwertige, knöcherne Kallusgewebe ausreichend Stabilität gegeben war. In der Versuchsgruppe war histomorphometrisch sehr wenig Knorpelgewebe feststellbar. Dies ist als Hinweis auf geringfügige, lokal begrenzte aktive Prozesse zu werten.

Die **deskriptiv-histologische Analyse der periostalen Kalli** beider Gruppen entsprach weitgehend den radiologischen Ergebnissen. Allerdings zeigten hier sämtliche **periostale Kalli der Kontrollgruppe** Überbrückungen. Proliferierende Osteoblasten, zugrundegehende bzw. degenerierte Chondrozyten und teils noch grün angefärbte, hyalinknorpelige Inseln im Brückenkallus lassen auf eine gerade erfolgte bzw. noch stattfindende Mineralisierung schließen. Diese Form der Umwandlung des Knorpels in Knochengewebe erfolgt per enchondraler Ossifikation^{11,35,138}. Röntgenologisch waren diese Brücken aufgrund der noch unvollständigen Dichte nicht sichtbar. Vermutlich migrierten mesenchymale Stammzellen aus dem umliegenden Muskel- und Bindegewebe in den periostalen Osteotomiespalt und differenzierten sich zu knorpel- und knochenbildenden Zellen^{28,74,78,82,112}.

Die Kallusenden selbst sind auf eine Entstehung per intramembranöser Osteogenese von Seiten des Periosts zurückzuführen^{7,11}. Darauf lassen die zahlreichen syntheseaktiven

Osteoblasten auf der Kallusoberfläche und in den intraossären Kavernen schließen, aber auch die schnelle Entstehung dieses Kallus. Die Kombination von enchondralen und intramembranösen Heilungsvorgängen wurde unter den durch den Fixateur externe gegebenen Bedingungen erwartet^{11,27,42,65,84}, wobei die Ossifikation vom Periost aus startete¹¹⁴. Im Stratum cambium differenzierten sich die notwendigen Zellen und bildeten Geflechtknochen parallel zur Knochenoberfläche^{11,35,51}. In den Kallusenden enthaltene Osteozyten, kleine frisch mineralisierte Knorpelareale und spaltnahe Kavernen mit zellreichem Inhalt zeugten von der Vitalität des Gewebes. Die Füllung der Kavernen wies häufig viele Gefäße auf, wenn das angrenzende Brückengewebe Mineralisierungsprozesse durchlief. Der vormals bestehende Knorpel benötigte keine Sauerstoffversorgung über Gefäße, da dieser per Diffusion ernährt wurde und weniger sauerstoffabhängig war^{2,11,99,194}. Das nachfolgende Knochengewebe war jedoch auf eine Sauerstoffversorgung über Blutgefäße angewiesen.

Alle Tiere wiesen im periostalen Kallus einen zweiten Knochenmarksraum auf. Anscheinend entwickelt sich der periostale Kallus an langen Röhrenknochen bei der Ratte in Form eines Neokortex¹²⁷, also einer Ersatzkortikalis. Zwischen dieser und der ursprünglichen Kortikalis lag mesenchymales Gewebe.

Drei Kontrolltiere zeigten strukturell einheitliche, sehr dünne periostale Kalli, die stets parallel zur Kortikalis verliefen. Im ursprünglichen Verschmelzungsbereich dieser Kalli waren im zweiten Knochenmarksraum nur noch wenige Geflechtknochenreste erkennbar. Daher ist anzunehmen, dass die Überbrückung dieser Osteotomien schon längere Zeit zurück lag. Das vollständig ausmineralisierte Kallusgewebe, die große Anzahl an randständigen Osteoklasten und die Abnahme der knöchernen Kallusvolumina wiesen auf fortgeschrittene Remodelingprozesse hin^{18,118}. Somit lassen sich die radiologisch vermuteten Remodelingprozesse im periostalen Bereich histologisch eindeutig belegen.

Das **Periost** spielt bei der Frakturheilung schon initial eine große Rolle. Dabei dient das Str. fibrosum als Leitstruktur für den zu bildenden Kallus¹⁹⁵. Das Str. cambium stellt die gestörte Vaskularisierung rasch wieder her und liefert Zellen für die Osteogenese^{3,7,11,18,37,45,47,51,74,83,85,104,111}. Das **Periost der Kontrollgruppe** schien sich nach der osteotomiebedingten Zerstörung ausreichend rekonstruiert zu haben. So verlief das mehrschichtige Str. fibrosum durchgehend über die ursprünglichen Osteotomiebereiche hinweg. Das Str. cambium bildete in Spaltnähe eine multiple Schichtung aufgrund der dort gesteigerten Aktivität, um die notwendigen Osteoprogenitorzellen und Osteoblasten bereitzustellen^{45,51,83,90,122}. Simon und Mitarbeiter (2003)⁵¹ stellten fest, dass sich das aktivierte Str. cambium um bis zu 300 % seines ursprünglichen Ausmaßes verdicken kann. Allerdings stoppte das Str. cambium bei Erreichen des spaltfüllenden, frischmineralisierten oder knorpeligen Brückengewebes. Diese Gegebenheit weist darauf hin, dass die Kallusbrücken nicht den Zellen des Periosts entstammten. Lag im Spalt älteres, ausmineralisiertes Kallusgewebe vor, zog das Str. cambium gemeinsam mit dem Str.

fibrosum darüber hinweg. Vermutlich ist das vollständige Überwachsen der Osteotomie mit Periost als eine der letzten Phasen der Frakturheilung zu werten.

Die **periostalen Kalli der Versuchsgruppe** zeigten histologisch eine knöcherne und eine knorpelige Überbrückung. Letztere enthielt viel chondrogenes Gewebe, was auf eine frühere Phase im enchondralen Ossifikationsprozess hinweist. Im Fall dieser Überbrückungen nahmen die Ausmaße der periostalen Kalli aufgrund der ausgeprägten Gewebeaktivität in Spaltnähe zu.

Auch die nicht überbrückenden, frontenbildenden Kallusenden ließen etwas aktives Gewebe erkennen. Sie waren stets in Spaltnähe lokalisiert und zeigten flächenmäßig reichlich Kallusgewebe mit vielen gefäßreichen Kavernen. Nur wenige dieser Kallusenden bildeten eine lawinenförmige Nase in Spaltrichtung, teilweise waren sehr dünne Knorpelkappen aufgesetzt. Der Großteil der nicht überbrückenden Kallusenden endete jedoch spitz auf der Kortikalis auslaufend und zeigte ein inaktives Erscheinungsbild. Dieses bestätigte die Vermutung der zum Stillstand gekommenen intramembranösen Ossifikation aus der radiologischen Befunddiskussion (Punkt 5.2.2). Diese Kallusenden blieben spaltferner, wiesen insgesamt weniger Kallusfläche auf und bestanden aus kompaktem Geflechtknochen mit wenigen Kavernen. Auffällig war, dass beinahe jedes Versuchstier beide Formen der Kallusenden aufwies, wobei die frontenbildenden Kallusenden vornehmlich proximal und die spitz auslaufenden distal auftraten. Die Ursache für den deutlichen Unterschied der Gewebeaktivität ist vermutlich in der Vaskularisation zu suchen. Offenbar waren durch die von proximal erfolgende Durchblutung diese Knochenabschnitte besser versorgt als die distalen Abschnitte, welche durch die Osteotomie initial eine stärkere Durchblutungsstörung erfuhren¹⁸. Allerdings ist sehr fraglich, ob diese geringen Gewebeaktivitäten bei anhaltender mangelnder Stimulation in der Lage gewesen wären, sich auszuweiten.

Sämtliche periostale Kalli der Versuchsgruppe bildeten ebenfalls einen Neokortex mit innenliegendem mesenchymalem Gewebe. Auch Kaspar und Mitarbeiter (2007)¹²⁷ stellten fest, dass diese Kallusformierung vom Entwicklungsgrad der Überbrückung unabhängig zu sein scheint. Daher ist anzunehmen, dass es sich um eine rattenspezifische Erscheinung handelt.

Der Verlauf des thermisch zerstörten **Periosts der Versuchsgruppe** glich nach der Standzeit im Fall der Überbrückungen dem der Kontrolltiere. Endeten die Kalli jedoch abrupt als Front, verlief das Str. fibrosum nur teilweise über die Osteotomie hinweg. Das Str. cambium bedeckte die Kallusenden und auch einen kleinen Bereich der freiliegenden Kortikalisenden. Hier wird das immense Heilungspotential des Periosts deutlich. Denn um seinen Aufgaben als Leitstruktur, sowie der Vaskularisierung und Osteogenese nachkommen zu können, ist eine äußerst schnelle Eigenregeneration notwendig. Das

Periost war stets in der Lage, die Kalli bis in den gekauterten Bereich hinein zu bilden, manche endeten sogar sehr nahe an der Osteotomie.

Dennoch ist ersichtlich, dass die Heilung von Seiten des Periosts stark beeinträchtigt ist. Denn etwa die Hälfte der periostalen Kalli verjüngte sich zum Spalt hin, das aufliegende Periost mit seinen Schichten ebenso. Dabei überbrückte keine der Periostschichten die Osteotomie. Hierbei waren spaltfern auf den periostalen Kallusoberflächen Progenitorzellen und Osteoblasten erkennbar, die Kallusenden und freiliegenden Kortikalisabschnitte zeigten sich weitgehend zellfrei. Somit entsprach das Erscheinungsbild der periostalen Kalli und des Periosts dem bei einer atrophen Pseudarthrose erwarteten. Fern vom Spalt konnte vom intakten Periost noch Kallus gebildet werden. Zum Spalt hin wurde dieser immer dünner, da sich das zerstörte Periost nicht ausreichend regenerieren und das zur Osteogenese notwendige Zellmaterial nicht bereitstellen konnte. Die Kallusenden lagen spaltfern und ohne Anzeichen von Aktivität. Dennoch wiesen im Geflechtknochen liegende Osteozyten auf die Vitalität des Kallusgewebes hin.

Auch die Analysen der periostalen Gefäß- und Osteoklastendichte bestätigten die bisherigen Feststellungen. Die **Gefäßdichte im periostalen Kallus** war bzgl. der zahlreich auftretenden kleinen Gefäße nicht signifikant. Große Gefäße waren nur sehr wenige darstellbar, wobei sie in der Kontrollgruppe signifikant häufiger auftraten. Sie konnten sich hier durch die geringere Gewebebeeinträchtigung des Periosts vermutlich schneller entwickeln um rasch eine adäquate Durchblutung, bedingt durch die erhöhte biologische Aktivität, zu gewährleisten.

Im Falle der spitz auslaufenden, inaktiv erscheinenden Kallusenden der Versuchsgruppe rekonstruierte sich das Periost vermutlich nicht schnell genug um die essentielle Vaskularisierung zum frühen Zeitpunkt bereitzustellen.

Die **Osteoklastendichte im periostalen Kallus** zeigte sich in der Kontrollgruppe signifikant erhöht. Wie bereits oben erwähnt, waren ausgeprägte Remodelingprozesse ursächlich, wobei überschüssiges Kallusgewebe abgebaut wurde.

In der Versuchsgruppe fanden augenscheinlich deutlich weniger knochenabbauende oder -umbauende Prozesse am periostalen Kallus statt. Im Fall der wenigen Überbrückungen überwog zum Achtwochenzeitpunkt vermutlich der Knochenaufbau. An den frontenbildenden Kallusenden ist fraglich ob ein weiterer Aufbau des Knochens zukünftig stattgefunden hätte, zumindest lag hier kein größerer Knochen- oder -abbau vor. Bei den spitz auslaufenden Kallusenden fand kein Knochenaufbau statt und der aktuelle Umbau des Knochens war vermutlich stark reduziert bzw. bezog sich nur auf eine relativ kleine Kallusfläche.

Die **histomorphometrischen Analysen der periostalen Kalli** festigen die zuvor gestellten Vermutungen bzgl. der ossären und fibrösen Strukturen. Der signifikant höhere Anteil an Knochengewebe in der Kontrollgruppe stand dem höheren Bindegewebsanteil in der

Versuchsgruppe gegenüber. Die größeren Knochenareale der Kontrollgruppe sind hauptsächlich auf die ausgeprägte Zellaktivität des Periosts zurückzuführen. Der hohe Knochen- und geringe Bindegewebsanteil lassen auf eine qualitativ hochwertige Zusammensetzung des Kallusgewebes schließen, welches eine gute Stabilität aufweist¹⁰⁷.

Die hohen Bindegewebs- und niedrigen Knochenanteile der periostalen Kalli der Versuchsgruppe zeugen von einem qualitativ minderwertigen Gewebe. Durch die Störungen im Heilungsvorgang wurde viel fibrotisches Ersatzmaterial gebildet.

Knorpelgewebe konnte in der Kontrollgruppe keines detektiert werden, da es bereits mineralisiert worden war. Die Versuchsgruppe zeigte periostal sehr wenig Knorpel. Die Bildung des periostalen Kallus erfolgte im Fall der wenigen Überbrückungen vorwiegend per knorpelfreier, intramembranöser Osteogenese.

Auch die **deskriptiv-histologischen Analysen des endostalen Kallus** untermauerten die in der radiologischen Ergebnisdiskussion gestellten Vermutungen (Punkt 5.2.2). So zeigte sich der **endostale Kallus der Kontrollgruppe** nach acht Wochen bei mehr als der Hälfte der Tiere intramedullär als eine im Osteotomiespalt verschmolzene Geflechtknochenbrücke, bei den Übrigen war diese im Zuge des Remodeling bereits abgebaut worden. Die Bildung des frühen endostalen Kallus geht vom osteogenen Zellmaterial des Endosts/ Knochenmarks aus und erfolgt vornehmlich per desmaler Ossifikation. Im Geflechtknochen häufig auftretende, kleine Kavernen mit enthaltenen Gefäßen und Osteoblasten sowie viele umliegende Blutgefäße sind als Zeichen ausgeprägter Gewebeaktivität zu werten. An das Knochenmark angrenzende Kavernen im Kallus enthielten häufig Osteoklasten. Dies erklärt sich durch den allmählichen Abbau des Kallusgewebes im Zuge des Remodeling. Die Resorption des Kallus vollzog sich vom Knochenmarkskanal ausgehend in Richtung der Osteotomie, ebenso wie zuvor in den früheren Heilungsphasen der Kallusaufbau.

Drei Kontrolltiere zeigten durch fortgeschrittene Remodelingprozesse eine Rekanalisierung des gesamten Knochenmarkraumes entsprechend der ursprünglichen, physiologischen Anatomie. Dabei waren nur noch einzelne verbliebene Kallusinseln und eine vollständige Reorganisation des Knochenmarks feststellbar. Diese drei Tiere zeigten auch periostal ausgeprägte Remodelingserscheinungen.

Die **endostalen Kalli der Versuchsgruppe** stellten sich auch in den histologischen Präparaten vorwiegend in Form zweier gegenüberliegender Fronten dar. Bei zwei Tieren waren diese zentral überbrückt. Eines dieser Tiere besaß ausschließlich diese endostale Brücke, das zweite Tier war zusätzlich periostal überbrückt. Die endostalen Brücken waren noch im Mineralisierungsprozess begriffen und enthielten viele hyalinknorpelige Anteile sowie Kavernen, daher waren sie röntgenologisch nicht sichtbar.

Drei weitere Tiere wiesen osteotomieseitig an einem endostalen Kallus kleine, hyaline Knorpelkappen vornehmlich am Scheitelpunkt auf. Hier traten die desmale und enchondrale Ossifikation kombiniert auf⁷⁸, was den Vorgängen im Rahmen einer frühen endostalen Ossifikation entspricht^{2,78}. Ob im Vergleich zur Kontrollgruppe mehr Knorpelgewebe vorlag, ist aufgrund der unterschiedlichen Entwicklungsstufen nicht nachzuvollziehen und wegen der geringen Anteile wenig relevant. Histomorphometrisch waren nach acht Wochen keine signifikanten Unterschiede feststellbar. Auch hier ist fraglich, ob sich diese Gewebeaktivitäten im weiteren Verlauf per früher endostaler Ossifikation ausweiten würden. Oder ob sie dem Vorgang der knochenmarkabgrenzenden Kappenbildung bei atropen Pseudarthrosen zuzuordnen sind, wobei sich ein osteotomiegerichteter Scheitelpunkt bildet²¹, und die Ossifikation letztendlich zum Erliegen kommen. Dies erscheint hier wahrscheinlicher und erklärt ebenfalls das Auftreten syntheseaktiver Osteoblasten und Chondrozyten am Osteotomiespalt. Mehr als die Hälfte der endostalen Kalli zeigte sich histologisch eindeutig dem Erscheinungsbild der atropen Pseudarthrose entsprechend als knochenmarkabdichtende, reaktionslose, knöcherne Kappe^{3,21,47,57,76,138}. Sklerosierungen des Kallus, die als Kriterium für eine atrophe Pseudarthrose gewertet werden, waren hier nicht feststellbar⁴², vermutlich war dafür noch nicht genug Zeit verstrichen.

Die **Osteoklastendichte im endostalen Kallus** beider Gruppen zeigte keine signifikanten Unterschiede. In der Versuchsgruppe saßen diese resorptiven Zellen ebenfalls vornehmlich an den knochenmarksseitigen Kallusgrenzen. Dies unterstützt die Theorie des Knochenauf- und -abbaus in Spaltrichtung, bei den Versuchstieren jedoch, wie bereits erwähnt, vermutlich zu einem anderen Zweck.

Die Analyse der **Gefäßdichte im endostalen Kallus** wies keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen auf. Dies entspricht auch den Vermutungen anderer Autoren^{14,19,27,47,48,53,138}, welche besagen, dass atrophe Pseudarthrosen nicht avaskulär sind (s.o.).

Auch per **histomorphometrischer Analyse des endostalen Kallus** konnte der signifikant höhere Bindegewebsanteil in der Versuchsgruppe und entgegengesetzt der höhere Knochenanteil in der Kontrollgruppe festgestellt werden. Somit wiesen auch die endostalen Kalli der Versuchsgruppe eine geringere Qualität auf, einhergehend mit einer geringeren Stabilität. Dies untermauert die Vermutung, dass der endostale Kallus eher im Zuge der atropen Pseudarthrose zum Zweck der Knochenmarksabgrenzung gebildet wurde.

Die **deskriptiv-histologische Analyse** zeigte, wie bereits erwähnt, sämtliche **Osteotomiespaltbereiche der Kontrolltiere** vollständig überbaut. Periostal lag stets knöcherner Kallus vor. Drei Tiere wiesen jedoch endostal aufgrund der Remodelingprozesse lediglich Kallusreste auf, wobei Knochenmarksgewebe den Spalt füllte. Der intrakortikale Spaltbereich war ebenfalls stets mit Geflechtknochen überbaut. Dort vereinzelt enthaltene, hyaline Knorpelareale lassen auf die Entstehung per enchondraler Ossifikation schließen.

Die **Osteotomiespaltbereiche der Versuchsgruppe** enthielten periostal, intrakortikal und endostal überwiegend teils lockeres, teils dichtes Bindegewebe, welches dem natürlichen Heilungsverlauf einer Fraktur entsprechend gebildet worden war und vereinzelt Hämatomreste enthielt. Im Fall einer Heilungsverzögerung erfolgt der Ersatz durch Knochengewebe nur sehr langsam, bei einer atrophen Pseudarthrose wird dieses Bindegewebe nie abgebaut und nur geringfügig umorganisiert, so dass es als Narbengewebe bestehen bleibt ^{7,14,17,19,21,38,49,60,70,76,78,138}. Endostal waren häufig gelb angefärbte Kollagenfasern zu erkennen die in die endostalen Kalli einstrahlten. Ab welcher Stelle eine Mineralisierung dieser Fasern begann, war aufgrund der ähnlichen Anfärbung des Knochengewebes nicht feststellbar. Viele aufsitzende Osteoblasten schienen für die Mineralisierung dieser Fasern per desmaler Ossifikation zu sorgen. Möglicherweise dienen diese Fasern als Leitstruktur bei der endostalen Ossifikation. Bleibt diese dann aufgrund mangelnder Stimulation aus, würde sich über die zentralen Kollagenfasern auch die für atrophe Pseudarthrosen typische Kappenbildung des endostalen Kallus erklären, welche häufig eine, in den Spalt hineinragende, zentrale Biegung aufweist ²¹. An zwei Intra-kortikalspalten war ein knöcherner Gewebeersatz ähnlich der Kontrollgruppe erfolgt. Die periostalen bzw. endostalen Überbrückungen hatten sich bis in den intrakortikalen Zwischenraum entwickelt und die fehlenden Kortikalisbereiche durch Kallusgewebe ersetzt.

Die Analyse der **Gefäßdichte in den Osteotomiespaltbereichen** ergab eine gleichwertige Vaskularisierung in den Gruppen welche ebenfalls auf eine bestehende Vaskularität der atrophen Pseudarthrose hindeutet.

Die **histomorphometrischen Analysen der Osteotomiespaltbereiche** festigten das histologische Bild. Die Gewebeverteilung entsprach der der periostalen und endostalen Kalli.

Die **deskriptiv-histologische Analyse der Kortikalis** zeigte in beiden Gruppen den physiologischen, strukturellen Geflechtknochenaufbau des Rattenfemurs. Das kombinierte Auftreten von gerichtetem und ungerichtetem Geflechtknochen ist Ausdruck des fortwährend stattfindenden Knochenumbaus. Auffällig waren die vielen leeren oder mit blassen, degenerierten Osteozyten gefüllten Osteozytenlakunen im kortikalen Knochen. In der **Kortikalis der Kontrollgruppe** traten diese vornehmlich endostal auf und erstreckten sich teilweise über den gesamten Kortikalisbereich innerhalb der ROI. Das Absterben der Osteozyten verweist auf eine Minderversorgung der Zellen zu einem bestimmten Zeitpunkt. Da die degenerierten Zellen vornehmlich in „älterem“, gerichtetem und die vitalen Zellen in „jüngerem“, nicht nach den Zugkräften ausgerichtetem Knochengewebe vorkamen, ist eine länger zurückliegende Minderversorgung anzunehmen. Diese wäre durch die Unterbrechung der Blutzufuhr bei Setzen der Pins erklärbar. Schweiberer und Mitarbeiter (1999) ¹⁸ erklärten, dass jede Gewebeverletzung den komplizierten zentrifugalen Blutstrom im Knochen zeitweise blockiert, wovon der gesamte kortikale Knochen betroffen ist. Rhineland (1974) ⁴¹

beschrieb thermale Kortikalisnekrosen durch den Trennschnitt bei einer Osteotomie, wodurch Osteozytenschädigungen in einer Entfernung von 0,8 – 1,5 mm vom Osteotomie-schnitt entstehen können. Letztlich schien sich dies nicht nachteilig auf die Heilung auszuwirken. Vermutlich wären die avitalen Knochenbereiche zukünftig schrittweise durch vitalen Knochen ersetzt worden ^{2,95,120}. Die Kortikalistränder zeigten in der Kontrollgruppe selten resorptionsbedingte Einbuchtungen. Die Kortikalisecken an der Osteotomie-schnittkante hingegen wiesen häufig Abrundungen durch Resorptionen auf. Entstandene Knochenlücken waren meist nach der Standzeit durch kallöses Gewebe ersetzt worden.

Die **Kortikalis der Versuchsgruppe** zeigte endostal und periostal wesentlich häufiger leere oder mit degenerierten Zellen gefüllte Osteozytenlakunen. Dies ist sowohl auf das Setzen der Osteotomie, als auch auf die zusätzlichen Manipulationen an Peri- und Endost zurückzuführen, wodurch postoperativ der Blutfluss stark beeinträchtigt war. In Folge trat, entgegen der Feststellung von Kokubu und Mitarbeitern (2003) ⁷, eine tiefe Nekrose des Knochens auf ^{3,18,29,49}. Auch waren in dieser Gruppe wesentlich häufiger ausgeprägte Einbuchtungen im kortikalen Knochen, Abrundungen der Kortikalisecken und bindegewebig gefüllte Kavernen im gekauterten/ kürettierten Bereich der Kortikalis zu bemerken. Diese Erscheinungen sind auf ein Ungleichgewicht zwischen knochenbauenden Osteoblasten und knochenabbauenden Osteoklasten zurückzuführen ^{7,42}. Letztendlich überwog der Knochenabbau und führte in einigen Fällen zu Verkürzungen der Kortikalisenden, so dass sich der Osteotomiespalt erweiterte.

Die Analyse der **Osteoklastendichte in der Kortikalis** lieferte die Bestätigung für ein signifikant höheres Aufkommen dieser Zellen in der Versuchsgruppe. Auch andere Studien beschrieben das vermehrte Auftreten von Osteoklasten an der Kortikalis und die Folgen bei der Entwicklung von atropen Pseudarthrosen ^{3,7,17,29,49,76,159}. Dabei wird der resorbierte Knochen durch Bindegewebe ersetzt, wodurch sich letztendlich das für atrophe Pseudarthrosen typische Bild der Syndesmosis ergibt ^{25,28,76,114}. In der Kontrollgruppe ist die geringe Anzahl an resorptiven Zellen in der Kortikalis vermutlich dem physiologischen Knochenumbau zuzuordnen.

Die **Ursachenanalyse** liefert bzgl. der verzögerten Heilungssituation der Versuchsgruppe mehrere Aspekte. Vergangene Frakturheilungsstudien betonen die Bedeutsamkeit der Stabilisation, Vaskularisation und Anwesenheit des osteogenen Materials (Punkt 2.3.3).

In dieser Studie werden die notwendigen Bedingungen der Osteotomiestabilisierung durch den Fixateur externe erfüllt. Beide Tiergruppen zeigten röntgenologisch und histologisch keine exzessiven Kallusbildungen, keine Verschiebungen der Knochenenden und nur wenig hyalinen Knorpel am Osteotomiebereich. Dies lässt auf eine hohe biomechanische Rigidität des Fixateurs und eine sehr geringe interfragmentäre Bewegung im Spalt schließen ^{28,127}.

Die Osteovaskularisation wurde durch die zusätzlichen Manipulationen an Peri- und Endost in der Versuchsgruppe initial erheblich beeinträchtigt mit folglich negativen Auswirkungen auf den Heilungsverlauf. Insgesamt konnte sich die Blutversorgung soweit erholen, dass sich die Gefäßzahlen der Kontroll- und Versuchsgruppe nach acht Wochen Standzeit nahezu glichen, was die Theorie, bei atropen Pseudarthrosen sei eine gestörte Durchblutung ursächlich ^{119,137,138}, widerlegt. Das Auftreten vieler kleiner Blutgefäße weist auf eine intensive Gefäßsprossung hin ¹¹⁸, die die Initiierung der Knochenheilung unterstützt ^{190,196}. Kann das Periost bei einer Knochenfraktur die Blutversorgung nicht kompensieren, da es selbst massiv geschädigt ist, erfolgt die Versorgung mittels einsprießender Gefäße aus dem umliegenden Weichgewebe. In diesem Fall kam wahrscheinlich eine Kombination aus periostaler, endostaler und umgebender Blutversorgung zum Tragen. Die Gefäßstrukturen des Peri- und Endosts in den nicht gekauterten Bereichen blieben erhalten und konnten so osteotomiefern entsprechend reagieren ¹⁹⁴. Reed und Mitarbeiter (2003) ¹³⁸ sowie Garcia und Mitarbeiter (2008) ¹⁹ stellten fest, dass eine gestörte Durchblutung zu einem frühen Zeitpunkt der Reparatur eine Überbrückung verhindert. Ist der Spaltbereich dann zu einem späteren Zeitpunkt ausreichend vaskularisiert, scheint allein dies die Heilung nicht genügend triggern zu können und eine atrophe Pseudarthrose kann bestehen bleiben ^{19,138}.

Einige Studien, die mit intramedullären Marknagelungen arbeiteten, kamen ebenfalls zu dem Schluss, dass der initial extrem beeinträchtigte, endostale Blutfluss sehr schnell wieder restauriert werden kann. Sie zweifelten an, dass dieser Faktor allein die Frakturheilung nachhaltig stören könnte ^{17,175}. Damit wären die hier v.a. endostal vorliegenden Heilungstendenzen erklärbar. Insgesamt erschien die Gefäßdichte und damit die Blutversorgung in der hier präsentierten Studie bei beiden Tiergruppen nach der Standzeit hoch genug um die Heilung adäquat unterstützen zu können, so dass angenommen werden kann, dass andere Störfaktoren den Frakturheilungsprozess schwächen ⁴⁸.

Somit gilt es, die eingangs gestellte Hypothese, eine atrophe Pseudarthrose wäre bedingt durch einen Mangel an osteogen reaktionsfähigem Substrat, zu prüfen. Dieses wird zur Reparatur des Knochens vornehmlich durch lokale mesenchymale Stammzellen sowie deren Vorläufer gestellt ^{3,8,18,28,49,66,85}. In dieser Studie wurden in der Versuchsgruppe die entsprechenden Zellquellen Periost und Knochenmark/ Endost zerstört. Durch diese Manipulationen gelang es offensichtlich, die Progenitorzellen, die präterminierten osteogenen Stammzellen (DOPC) ¹⁸, zu eliminieren, was ihre Aktivierung in der initialen Heilungsphase verhinderte. Auch nach acht Wochen Standzeit erschien das Periost der Versuchsgruppe histologisch in vielen Fällen nicht ausreichend rekonstruiert um osteotomiespaltnah als Zellquelle fungieren zu können. Einige Tiere zeigten eine vollständige Unterbrechung des Periosts, bei mehreren Tieren waren durchgehende, dünne Faserschichten des Str. fibrosum erkennbar. Auch Ito und Mitarbeiter (2001) ¹⁶¹ beschrieben die Bildung einer dünnen zellarmen Faserschicht in der frühen Phase der Frakturheilung, die

vermutlich als Leitstruktur dient. Eine intramembranöse Kallusbildung erfolgte bei ihnen und in dieser Studie nur an Periostbereichen mit bestehendem Str. cambium. Ito und Mitarbeiter (2001)¹⁶¹ nahmen an, dass die Restauration des Str. cambium nur an Stellen erfolgen kann, die durch Kallusgewebe abgestützt werden, also fortschreitend vom gesunden Periost aus in Richtung der Osteotomie. In dieser Studie verwies das Stoppen des Str. cambium vor dem spaltfüllenden Brückenkallus der Überbrückungen auf einen anderen Zellursprung dieses Kallus. Bestand dieser jedoch eine Weile, schien sich das Str. cambium aufliegend soweit restaurieren zu können, dass sich eine durchgehende Periosteinheit bilden konnte. Daher scheint die vollständige Rekonstruktion des Periosts tatsächlich von der knöchernen Kallusbildung abzuhängen, eine zeitlich exakte Abfolge der Periostrekonstruktion kann jedoch nur schwer definiert werden¹⁶¹. Das gekauterte Periost ist somit in der Lage sich nach einer Verletzung langsam zu regenerieren. Fraglich ist, ob es zu einer vollständigen Regeneration fähig ist, sollte die periostfremde Kallusbildung im Überbrückungsbereich ausbleiben. Dabei könnte das Str. fibrosum als Leitstruktur dienen. Nach Schweiberer und Mitarbeiter (1999)¹⁸ sind die DOPCs des Periosts allein nicht in der Lage die Frakturheilung zu vollbringen, bzw. würde dies extrem viel Zeit in Anspruch nehmen. Eine vollständige Regeneration des Periosts ist daher keine Voraussetzung für eine fortschreitende Knochenheilung¹⁶¹. Da sich dieser Vorgang aber mit den übrigen Knochenregenerationsvorgängen überschneidet, ist die heilungsfördernde Bedeutung unübersehbar. Eine Aussage über die Rekonstruktion des Endosts kann nicht getroffen werden, da es histologisch nicht darstellbar war. Das spaltferne Knochenmark schien durch das erhaltene biologische Potential nach wie vor in der Lage DOPCs bereitzustellen⁷⁸, wodurch sich weit von der Osteotomie entfernt endostaler Kallus bilden konnte, der im Heilungsverlauf in Richtung Osteotomie wuchs. Bei dem weiteren Progenitorzelltyp, den pluripotenten Mesenchymzellen (IOPC)¹⁸, handelt es sich um ubiquitär im Stützgewebe vorkommende Zellen^{2,4,66,78,197}. Sie werden durch eine initiale Osteoinduktion stimuliert und sind während der Knochenheilung permanent von großer Bedeutung, da sie sich der Notwendigkeit entsprechend differenzieren können. Diese Zellgruppe konnte durch die thermischen Manipulationen nur bedingt eliminiert werden. Außerdem ist es den IOPC möglich, über Blutgefäße in das Verletzungsgebiet einzuwandern^{1,28,78,82,99,112}. Auch Boyan und Mitarbeiter (1999)⁷⁸ konnten in ihrer Nonunion-Studie sieben Tage post operationem undifferenzierte mesenchymale, jedoch keine ausdifferenzierten Progenitorzellen nachweisen, so dass sie eine frühe Inhibierung der Zelldifferenzierung vermuteten. Erhalten die vorliegenden Zellen im weiteren Heilungsverlauf geeignete Signale aus dem Verletzungsbereich, sind sie in der Lage, die Knochenheilung zu induzieren^{18,78}. Über diese Zellen aus dem mesenchymalen Reservoir sind vermutlich die wenigen periostalen/kortikalen Überbrückungstendenzen in der Versuchsgruppe erklärbar. Anhand dieser Studie kann nicht differenziert werden, ob vornehmlich der gestörte Blutfluss oder der Mangel an

osteogenem Material die Heilung beeinträchtigt hat. Beide Faktoren sind vor allem initial maßgeblich an der Entwicklung der hier vorliegenden atrophe Pseudarthrose beteiligt.

Die Frage, warum einzelne Tiere der Versuchsgruppe verschiedene Heilungsphasen aufwiesen, ist nicht präzise zu beantworten. Vermutlich führten kleine Differenzen in der Operationstechnik und die biologische Variation der einzelnen Tiere zu den unterschiedlichen Heilungstendenzen. So war beispielsweise während der OP nicht genau messbar ob der Millimeterabstand der thermischen Zerstörung von Periost und Endost exakt eingehalten wurde. Auch können durch den Aufbau des Fixateur externe leicht Pinkanalinfektionen auftreten (Punkt 5.2.1). Diese haben einen entsprechend störenden Einfluss auf die Heilung. In der Versuchsgruppe kamen vergleichsweise häufig Pinkalli und Osteolysen in verschiedenen Ausprägungen vor, allerdings ergaben die Untersuchungen der Osteolysen in Bezug auf die Fragestellung keine Hinweise.

Die hohe Ausfallquote von 37 % (19 Tiere von insgesamt 51) in der Versuchsgruppe aufgrund übermäßiger Pinkalli und Osteolysen erklärt sich durch die erhöhte Pinkanalbelastung in dieser Gruppe. Weiterhin setzte die Autorin die Ausschlusskriterien diesbzgl. (Punkt 4.1) sehr eng um einen möglichen Einfluss auf die Entstehung der atrophen Pseudarthrose zu verhindern.

5.2.4 Vergleich mit anderen Studien

Die Etablierung eines Tiermodelles mit einer Heilungsstörung, die auf einer reduzierten, regenerativen Kapazität beruht, ist schwierig ^{3,8,25,159}. Viele vergangene Studien versuchten atrophe Pseudarthrosen in direktem Zusammenhang mit einer Therapieetablierung zu schaffen ²⁵. Bei genauerem Hinsehen lagen jedoch meist andere Formen von Heilungsstörungen vor, wie z.B. eine verzögerte Heilung ^{53,113,138}, hypertrophe Pseudarthrosen ^{5,7,17,23,24,27,35,45,78,114,122} oder Critical Size Defects ^{16,25,27,30,32,55,57,58,76,80-82}.

Da die bisherigen Nagetier-Studien verschiedene Designs aufweisen, welche den Prozess der Frakturheilung unterschiedlich beeinflussen ²⁵, ist eine direkte Vergleichbarkeit mit dieser Studie nicht oder nur schwer möglich ²⁵.

Diese Arbeit erfolgte in Anlehnung an die atrophe Pseudarthrose-Experimente von Kokubu und Mitarbeitern (2003) ⁷ sowie Hietaniemi und Mitarbeitern (1995) ¹⁷, an denen sich auch weitere Autoren orientierten ^{14,15,24,26,49}.

Hietaniemi und Mitarbeiter (1995) ¹⁷ schufen in ihrem Pseudarthrosemodell eine offene, schmale Osteotomie am Femur der Ratte. Sie vermieden bewusst einen kritischen Defekt (CSD) und kauterten das Periost jeweils in einem Abstand von zwei Millimetern vom Spalt. Zusätzlich erfolgte eine weitreichende Kürettage des Knochenmarks. Sie wählten eine lockere Stabilisierung mittels intramedullärem Marknagel (Durchmesser 0,7 mm) um über die Rotationsinstabilität eine Pseudarthrose zu erzeugen. Nach sieben Wochen Standzeit

konnten Hietaniemi und Mitarbeiter die Entwicklung einer hypertrophen Pseudarthrose feststellen, deren Heilungsprozess zum Stillstand gekommen war. Sämtliche Voraussetzungen für die Bildung eines kalzifizierten Knochens schienen verloren. Über die folgenden Monate änderte sich dieser Zustand nicht, so dass die Arbeitsgruppe nach einem Jahr eine persistierende Nonunion in Form einer atrophen Pseudarthrose vorweisen konnte.

Kokubu und Mitarbeiter (2003)⁷ modifizierten das Modell von Hietaniemi und Mitarbeitern (1995)¹⁷. Um die klinische, traumatische Situation besser zu repräsentieren, entschieden sie sich für das Setzen einer geschlossenen Fraktur am Femur der Ratte. Anschließend kauterten sie ebenfalls das Periost zwei Millimeter von der Fraktur ausgehend. Um der hohen Rate an Draht-Migration und Systemermüdung entgegen zu wirken und um eine rigidere Fixierung zu erreichen, wählten sie einen Marknagel mit größerem Durchmesser (1,25 mm). Nach acht Wochen Standzeit konnten Kokubu und Mitarbeiter⁷ radiologisch bei den meisten Tieren und histologisch bei allen Tieren die Kriterien einer atrophen Pseudarthrose feststellen, welche ebenfalls teils geringe Mengen an neu gebildetem Knorpel enthielten. Auch andere Studien verwendeten in ihren Pseudarthrose-Modellen intramedulläre Marknägel^{19,24,26,29,32,33,45,49,78,81,83,114,122,160}. Allerdings besteht dabei generell die Gefahr der Rotationsinstabilität mit einer nicht standardisierbaren Situation^{25,33,40,45,84}, direkte Studienvergleiche sind hier somit kaum möglich.

Daher wurden in der vorliegenden Studie die Arbeiten von Hietaniemi und Mitarbeitern (1995)¹⁷ sowie Kokubu und Mitarbeitern (2003)⁷ wiederum modifiziert und ein Fixateur externe eingesetzt. *In vitro* weist er standardisierte biomechanische Eigenschaften mit Abweichungen von +/- 5 % auf, andere Fixierungssysteme haben wesentlich höhere Abweichungsraten⁷⁶. Auch können bei Implantation des externen Fixateurs die Heilungsprozesse im Osteotomiebereich, einschließlich des Knochenmarksbereiches, genauer untersucht werden^{40,70,84}. Das Setzen einer kliniknahen, geschlossenen Fraktur^{14,15,27,60,73,74,84} ist bei dieser Art der Fixierung mit sehr vielen Komplikationen behaftet und nur sehr schwer zu standardisieren⁴⁰. Daher wurde hier eine offene Fraktur per Osteotomie gesetzt. Dieses Vorgehen ist hoch standardisiert durchführbar und kann für Studienvergleiche herangezogen werden^{25,40,70} (Punkt 5.1.3).

In vielen Studien wurde das Periost gekautert^{7,17,24-26,33,49,53,82,114,122,138}, da dies als grundlegender Schritt gilt, der erfolgreich zur Induktion einer atrophen Pseudarthrose führt^{3,26,33,36,47,83}. Zum Zeitpunkt der Modelletablierung wurde das Periostkautern jedoch selten mit der Fixierung über einen Fixateur externe kombiniert³⁶. Als weiterer notwendiger Schritt zur Schaffung einer atrophen Pseudarthrose wird das Zerstören des Knochenmarks/ Endosts angesehen (Punkt 5.1.3)^{17,24-26,33,36,47,53,138}. Denn die alleinige Zerstörung des Periosts erscheint nicht als ausreichend^{19,24-26,33,47}.

Insgesamt kamen Kokubu und Mitarbeiter (2003)⁷ der Entwicklung einer reduziert regenerativen, atrophen Pseudarthrose schon recht nahe, ebenso Brownlow und Mitarbeiter (2000)⁵³ sowie Reed und Mitarbeiter (2003)¹³⁸ an deren Studien sich ebenfalls einige Autoren orientierten^{26,47,48}. Brownlow und Mitarbeiter (2000)⁵³ setzten an der Tibia von Kaninchen eine Osteotomie und fixierten diese mit einem Minifixateur. Zur Eindämmung der osteogenen Potenz kürettierten sie das Knochenmark und strippten das Periost. Letzteres trägt jedoch das Risiko in sich, dass osteogen potente Kambiumzellen auf der Kortikalisoberfläche verbleiben (Punkt 5.1.3). Nach acht und 16 Wochen Standzeit stellten sie zu 100 % die Entwicklung von atrophen Pseudarthrosen fest, welche ebenfalls geringe Mengen an neu gebildetem Knochen und Knorpel aufwiesen. Sie untersuchten die atrophen Pseudarthrosen hinsichtlich ihrer Konzentration an Adenosintriphosphat (ATP), welches als Marker für eine metabolische Aktivität des heilenden Knochens gilt¹⁹⁸. Die detektierte hohe ATP-Konzentration ließ die Arbeitsgruppe ihre Hypothese verwerfen, in welcher sie von einer geringen metabolischen Aktivität der atrophen Pseudarthrosen ausgingen. Diese Art der hier vorliegenden Modelletablierung ist auf symmetrisch aufgebaute Knochen, wie z. B. dem Femur, angewiesen um die notwendige Stabilität und Standardisierung gewährleisten zu können^{25,40,46}. Studienvergleiche zwischen Frakturmodellen unterschiedlicher Knochen sind daher nur bedingt durchführbar, ebenso wie Vergleiche mit Studien unterschiedlicher Tierarten.

Reed und Mitarbeiter (2003)¹³⁸, Geris und Mitarbeiter (2010)⁴⁷ sowie Tawonsawatruk und Mitarbeiter (2014)⁴⁸ brachten nach ihrer Osteotomie bei Ratten teils am Femur, teils an der Tibia einen Fixateur an, strippten das Periost und kürettierten den Knochenmarkskanal. Nach der acht- bzw. 16-wöchigen Standzeit stellten sie alle die 100 %ige Etablierung einer atrophen Pseudarthrose fest. Weiterführende Untersuchungen bei Reed und Mitarbeitern (2003)¹³⁸ ergaben eine hohe Gefäßanzahl in der Pseudarthrosegruppe, welche auf eine bestehende Aktivität des Gewebes hinweist. Möglicherweise muss die bisher in der Literatur bestehende Meinung, eine atrophe Pseudarthrose sei avital, neu überdacht werden, worauf auch andere Autoren hinweisen^{10,14,19,27,47,48}. Letztendlich konnte in der bestehenden Literatur nur ein weiteres Modell gefunden werden, welches ein Studiendesign aufweist anhand dessen ein direkter Vergleich mit dieser Modelletablierung möglich ist. Dickson und Mitarbeiter (2007)³⁶ osteotomierten den Oberschenkel von 62 Ratten, kauterten das Periost, strippten das Endost und brachten einen Fixateur externe an. Bei ihren Untersuchungen nach acht und 16 Wochen Standzeit stellten sie bei nur einem Tier eine spontane Heilung fest, die übrigen 61 Tiere wiesen atrophe Pseudarthrosen auf.

Aber auch einige Studien mit nur ähnlichen Designs (z. B. Periost gestrippt^{31,48}, an der Tibia^{28,29,31,47,48}, an Hasen²⁹ oder Mäusen^{24,28}) waren erfolgreich im Hinblick auf die Schaffung einer atrophen Pseudarthrose.

5.2.5 Schlussfolgerung und Ausblick

Das Ergebnis dieser Studie zeigt einen deutlichen Unterschied zwischen dem physiologischen Heilungsverlauf der Kontrollgruppe, welcher sich nach acht Wochen sehr weit fortgeschritten bzw. in einigen Fällen weitgehend abgeschlossen zeigte, und der Heilungsbeeinträchtigung der Versuchsgruppe. Das Ziel, ein Modell einer experimentellen, atrophen Pseudarthrose am Femur der Ratte zu schaffen, konnte erreicht werden. Fünf von acht Versuchstieren aus der histologischen Auswertungsgruppe zeigten eindeutig das erwartete Bild der atrophen Pseudarthrose, in der Gruppe der histomorphometrischen Auswertung waren es sieben von acht Tieren, insgesamt wiesen damit 12 von 16 Tieren eine atrophe Pseudarthrose auf.

Die übrigen Tiere der Versuchsgruppe hatten mehr oder weniger ausgeprägte Heilungstendenzen. Die Morphologie der beinahe vollständigen Überbrückung aus der histologischen Auswertungsgruppe und die halbseitige knöcherne Überbrückung aus der histomorphometrischen Auswertungsgruppe lassen darauf schließen, dass sie sich überwiegend von endostaler Seite entwickelten, somit im Rahmen der „späten endostalen Heilung“ entstanden sein könnten^{2,42}. Denn stimmen die Bedingungen um die kritische Phase der Osteogeneseinduktion zu überwinden, so werden die weniger störanfälligen, nachfolgenden Prozesse dieser Ossifikationsform durch signalgebende Faktoren immer weiter vorangetrieben. Auch fördert die Rigidität des Fixateur externe die Entwicklung dieses endostalen Kallus^{2,41}. In der Vergangenheit wurde auch von anderen Autoren über Fälle von spontaner Heilung berichtet^{36,171}. Die lokal begrenzten, endostalen Überbrückungstendenzen bei wenigen Versuchstieren könnten ebenfalls dieser Ossifikationsform zuzuordnen sein oder dienten der Bildung einer knochenmarksabgrenzenden Kappe, wie sie für atrophe Pseudarthrosen typisch ist. Ob diese Tiere oder auch die mit nur geringen Bereichen an periostalem, reaktivem Gewebe zukünftig eine atrophe Pseudarthrose entwickelt hätten, ist schwer vorhersagbar. Um die Vorhersagegenauigkeit der atrophen Pseudarthroseentwicklung in dieser Studie zu verbessern, wäre es günstig gewesen, eine weitere Versuchsgruppe mit einer längeren Standzeit zu integrieren. Bei diesem Vorgehen stellten einige Autoren fest, dass nach z.B. 16 Wochen Standzeit ein wesentlich höherer Prozentsatz der Tiere aufgrund der mangelnden Stimulierung eindeutig eine atrophe Pseudarthrose entwickelt hat^{36,47,53,138}. So ist anzunehmen, dass auch hier die lokalen Heilungstendenzen noch zum Erliegen gekommen wären. Einige Autoren betonen, dass nach entsprechender Stimulation einer atrophen Pseudarthrose bei Vorliegen von Heilungstendenzen vermutlich eine Heilung möglich wäre^{47,53,138}.

Die Tiere der Versuchsgruppe die eine Pseudarthrose entwickelt haben zeigen, dass die Vorgehensweise dieser Studie das Ziel der Pseudarthroseinduktion erreicht hat. Die in dieser Studie vorgenommenen Manipulationen wirkten sich offensichtlich so stark aus, dass die Heilung verhindert werden konnte.

Die eingangs gestellte Hypothese, eine atrophe Pseudarthrose wäre durch einen Mangel an osteogen reaktionsfähigem Substrat bedingt, welches unter physiologischen Bedingungen vornehmlich durch lokale mesenchymale Stammzellen sowie deren Vorläufer gestellt wird^{3,8,28,49,66,85}, kann anhand dieser Studie weder verworfen noch bestätigt werden. Sie bleibt jedoch, besonders unter Beachtung der aktuellen Literatur, weiterhin als sehr wahrscheinliche Vermutung bestehen.

Insgesamt wäre das Ergebnis dieser Studie nach der achtwöchigen Standzeit eventuell deutlicher ausgefallen, wenn die ergriffenen Maßnahmen zur Minimierung des gesamten osteogenen Potentials weitreichender gewesen wären. Ein ausgedehnteres Kautern des Periosts könnte hierbei unterstützend wirken. Denn einige Tiere der Versuchsgruppe wiesen regenerierte Periostbereiche auf, viele zeigten aber auch große beeinträchtigte Periostanteile die gänzlich an Aktivität und Mineralisierungskapazität verloren zu haben schienen.

Die eingangs gestellte Hypothese, dass die Integrität des Periosts als Leitstruktur essentiell für die Heilung eines Defektes am langen Röhrenknochen ist, muss verworfen werden. Eher gegenteilig scheint das Periost allein nicht zur vollständigen Regeneration fähig zu sein, solange eine knöcherne Überbrückung fehlt¹⁶¹. Dennoch spielt das Periost für eine schnelle Knochenbruchheilung eine sehr große Rolle.

In dieser Studie zeigten sich die Heilungstendenzen der Versuchsgruppe vorwiegend im endostalen Bereich. Eine periostale Überbrückung dieser Gruppe schien ebenfalls von endostal erfolgt zu sein und sich progressiv nach periostal entwickelt zu haben. Vermutlich wäre das Studienergebnis eindeutiger gewesen, wenn der Knochenmarkskanal über einen ausgedehnteren Bereich kürettiert worden wäre. Denn vermutlich wurden die mesenchymalen Zellen vornehmlich aus dem Knochenmark rekrutiert. Aber auch über Möglichkeiten der Abschirmung des umliegenden Weichgewebes von der Verletzungsstelle muss nachgedacht werden um ein Einwandern der Zellen von dort zu verhindern. Denn auf diese Art und Weise schienen sich zwei periostale Überbrückungen gebildet zu haben.

Weiterhin nahm man bisher an, ausgeprägte Weichteilsverletzungen können über den gestörten Blutfluss eine Heilungsstörung induzieren. Allerdings stellten Landry und Mitarbeiter (2000)⁵⁰ fest, dass diese eher gegenteilig die Osteogenese zusätzlich ankurbeln. Daher ist nicht geklärt, ob eine weitreichendere Weichgewebezestörung der Pseudarthrose-etablierung entgegenkommen würde. Ob es möglich wäre, über eine ausgeprägtere Einschränkung der Blutzufuhr das gewünschte Ziel zu erreichen, ist schwer zu sagen. Wie festgestellt, erholt sich die Blutversorgung auch im Fall einer atrophischen Pseudarthrose sehr rasch^{138,159,190,191}. Möglicherweise könnte über eine dauerhafte Obliteration der Markarterien mit einhergehender ausgeprägterer Kürettage des Knochenmarks die späte endostale Ossifikation verhindert werden. Dabei würde neben der Entfernung des lokalen, osteogenen Materials auch die Migration der Zellen durch die starke Beeinträchtigung der Vaskularisation

extrem eingeschränkt, mit dem Ziel auch hier die Mineralisierungskapazität vollständig zu inhibieren.

Insgesamt wurde hier ein standardisiertes und gut reproduzierbares Modell einer atrophen Pseudarthrose etabliert, welches dem klinischen Bild einer atrophen Pseudarthrose entspricht. Vermutlich sind die wenigen Heilungsdifferenzen der Versuchsgruppe im chirurgischen Vorgehen bzgl. der Zerstörung des osteogenen Materials begründet. Daher müsste für die exakte Messung der Ausmaße der Gewebeerstörung ein standardisiertes Vorgehen integriert werden. Die mangelnden periostalen Reaktionen verweisen auf die angestrebte absolute Rigidität des externen Fixateurs. Dies verhinderte die heilungsfördernde Mikrostimulation durch mechanische und physikalische Belastungsreize¹⁹⁴ und somit die periostale Kallusbildung. Weiterhin trat kein Pinversagen oder dauerhafter Fixationsverlust auf und die Knochenfragmente verblieben in anatomisch korrekter Position. Allerdings ist eine hohe Ausfallquote von 37 % (19 Tiere von insgesamt 51) in der Versuchsgruppe aufgrund der Bildung von übermäßigen Pinkalli und Osteolysen zu bemängeln, bedingt durch erhöhte Pinkanalbelastungen und damit einhergehenden Pinkanalinfektionen.

Insgesamt weist das Modell eine gute Zuverlässigkeit und Reproduzierbarkeit auf. Sämtliche Gesamtergebnisse dieser Studie bestätigen sich ebenfalls in der zugehörigen Veröffentlichung von Kaspar und Mitarbeitern (2008)³ unter Mitbeteiligung der Autorin.

Dieses Modell kann für nachfolgende Untersuchungen im Rahmen der Therapieetablierung bei atrophen Pseudarthrosen angewendet werden und wurde von einigen Autoren bereits zu diesem Zweck erfolgreich eingesetzt^{8,152-154,200}.

6 Zusammenfassung

Im Verlauf einer Frakturheilung können vielfältige Störungen auftreten, woraus im schlimmsten Fall eine atrophe Pseudarthrose resultieren kann. Diese Heilungsstörung sind gekennzeichnet durch eine reduzierte regenerative Kapazität^{3,8,26,34,38} ohne erkennbare Heilungstendenzen in Form von intramembranösen oder enchondralen Ossifikationen angrenzend an die Fraktur^{3,14,19-21,27,31,33,37,46}. Die Unkenntnis über die genauen Mechanismen, die der Entwicklung einer atrophen Pseudarthrose zugrunde liegen, erschwert die Suche nach einem erfolgreichen therapeutischen Ansatz^{11,12,19,21,23,31,33,43,54,56}. Bisher konnte kein Konsens über die optimale Therapiestrategie erreicht werden^{5,12,19,25,26}. Der derzeitige therapeutische „Goldstandard“ umfasst ein aufwändiges chirurgisches Debridement^{8,9,11,20,34,38,41,45,56,128,139,144} mit einhergehender Optimierung der biomechanischen Situation mittels eines geeigneten Osteosynthesystems^{5,9,20,22,23,34,35,37,38,43,65,139,144}, z.B. eines Ring-Fixateurs nach Ilizarov^{20,143,144} sowie der Bereitstellung von osteogen reaktionsfähigem Substrat^{8,9,11,34,38,45,82} über den Transfer von autologem Spongiosagewebe^{8,20,21,25,31,34,36,37,41,43,45,58-60,66,73,82,112,120,139,144,146,155}. Häufig bleibt der gewünschte Erfolg aus und erfordert Wiederholungsbehandlungen. Neben den hohen volkswirtschaftlichen Kosten bedeutet dies eine enorme physische und psychische Belastung für den Patienten^{5,11,14,15,20,24,25,27-36}. Aufgrund dessen ist die medizinische Forschung bestrebt, ein optimales Therapiemodell zu entwickeln. Dies setzt jedoch voraus, die einer atrophen Pseudarthrose zugrundeliegenden, komplexen Mechanismen zu ergründen. Aufgrund der Fallvariabilität in der Klinik am Menschen sind atrophe Pseudarthrosen nur schwer zu untersuchen^{11,14,26,27,33,53,123}, weshalb Tiermodelle angewandt werden müssen. Zu Projektbeginn waren in der Literatur jedoch keine geeigneten Tiermodelle mit dem Ziel der Entwicklung einer atrophen Pseudarthrose beschrieben. Somit war es Ziel dieser Studie, ein leicht reproduzierbares und standardisiertes Modell der atrophen Pseudarthrose zu etablieren, welches die klinische Situation realistisch darstellt und für die Grundlagenforschung und therapeutische Fragestellungen herangezogen werden kann.

Realisiert wurde dieses Vorhaben anhand eines *in vivo*-Modells an 32 Ratten, welche randomisiert in zwei Gruppen eingeteilt wurden. Sämtliche Tiere erhielten eine standardisierte Osteotomie an der Diaphysenmitte des Femurs. Während der sich anschließenden achtwöchigen Standzeit ließ sich in der Kontrollgruppe der physiologische Heilungsverlauf verfolgen. Die Versuchsgruppe sollte vergleichend die Entwicklung einer atrophe Pseudarthrose liefern. Als wichtigste Schritte zur Induktion der atrophen Pseudarthrose galten die thermische Zerstörung des Periosts 2 mm und die Kürettage des Knochenmarks 4 mm proximal und distal um den Osteotomiespalt, um jegliches biologisches Potential für die Knochenheilung auszuschalten. Die biomechanische Versorgung der Osteotomie erfolgte durch einen Fixateur externe. Dieser ermöglicht einen freien Zugang

zum Osteotomiebereich um Analysen oder Therapieetablierungen durchzuführen, ohne dass es im Spalt zu Wechselwirkungen zwischen Implantat und Gewebe kommt^{3,8,40,53,70,81,84,127,140}. Zur Auswertung kamen radiologische Verlaufskontrollen die während der Standzeit angefertigt wurden sowie im Anschluss an die Standzeit die histologische, histomorphometrische und immunhistologische Auswertung der post mortem entnommenen, osteotomierten Femora.

Das gesamte Untersuchungsmaterial der Kontrollgruppe verwies auf einen sich teilweise in der Endphase befindenden, physiologischen Heilungsverlauf. Bei der Versuchsgruppe war hingegen eine deutliche Heilungsbeeinträchtigung festzustellen. So demonstrierten zwölf von 16 Tieren der Versuchsgruppe eindeutig das Erscheinungsbild einer reaktionsunfähigen, atrophen Pseudarthrose. Die übrigen Tiere der Versuchsgruppe zeigten in und am Osteotomiespalt lokale Bereiche mit möglichen Heilungstendenzen. Das Periost hatte sich meist nicht vollständig rekonstruiert und den Osteotomiespalt nicht überwachsen. Offensichtlich muss zur Knochenheilung nicht erst die Phase der periostalen Rekonstruktion durchlaufen werden, da die Heilung auch von endostaler Seite aus möglich ist.

Das in der Studie angestrebte Ziel der Etablierung einer atrophen Pseudarthrose wurde erreicht. Die vorgenommenen Manipulationen reichten aus, um die Heilung massiv zu beeinträchtigen. Insgesamt weist das Modell eine gute Zuverlässigkeit und Reproduzierbarkeit auf. Sämtliche Gesamtergebnisse dieser Studie bestätigen sich ebenfalls in der zugehörigen Veröffentlichung von Kaspar und Mitarbeitern (2008)³ unter Mitbeteiligung der Autorin. Dieses Modell kann für nachfolgende Untersuchungen im Rahmen der Therapieetablierung bei atrophen Pseudarthrosen angewendet werden und wurde hierzu bereits erfolgreich von einigen Autoren eingesetzt^{8,152-154,200}.

7 Summary

Establishment of an atrophic non-union-model in the femur of rats

During fracture healing manifold disorders are possible, resulting in atrophic non-unions in worst case. This healing-disorder is characterized by a reduced regenerative capacity^{3,8,26,34,38} without any noticeable evidence of healing in terms of intramembraneous or endochondral ossification near the osteotomy side^{3,14,19-21,27,31,33,37,46}. The unknown mechanisms of atrophic nonunion development complicate the finding of successful treatments^{11,12,19,21,23,31,33,43,54,56}. Up to now it was not possible to find a consensus for optimal strategy of therapy^{5,12,19,25,26}. The actual therapeutic “golden standard” enfold a complex chirurgical debridement^{8,9,11,20,34,38,41,45,56,128,139,144} along with the optimization of the biomechanical situation by means of an applicative osteosynthesis-system^{5,9,20,22,23,34,35,37,38,43,65,139,144}, such as an Ilizarov ring-fixator^{20,143,144}, and the contribution of competent osteoinductive substrate^{8,9,11,34,38,45,82} via the transfer of autologous spongiosa tissue^{8,20,21,25,31,34,36,37,41,43,45,58-60,66,73,82,112,120,139,144,146,155}. Therapies fail frequently and repeated more invasive therapies are necessary. Apart from the high economic costs this stresses both physically and mentally^{5,11,14,15,20,24,25,27-36}. Therefore researchers are seeking to develop optimal therapy-models. However this implies to investigate the complex mechanisms underlying an atrophic non-union. Due to the variability of patients, atrophic non-unions are difficult to examine^{11,14,26,27,33,53,123}, so animal models has to be applied. However, to beginning of this project in literature no practical animal models with atrophic non-unions were available. The aim of this study was to establish a simply reproducible and standardized model of an atrophic non-union, which simulates the clinic situation in a realistic way and can be used for basic and therapeutic research.

This proposition was implemented on the basis of an *in vivo*-model with 32 rats, which were randomized in two groups. All animals received a standardized, mid-diaphyseal osteotomy at the femur. During the following eight-weeks life-time the control group showed the course of physiological healing, which could be compared to the test group, which was expected to develop an atrophic non-union. The most important steps to induce an atrophic non-union are thermal destruction of the periosteum 2 mm and curettage of bone marrow 4 mm proximally and distally of the osteotomy side for deactivating the full potential of bone healing. The osteotomy was supplied by an external fixator which allows to analyse the osteotomy site or therapy effects without any interactions between implant and tissue^{3,8,40,53,70,81,84,127,140}. For evaluation a radiological follow-up was performed during the time post operation. And post mortal sampling of the osteotomized femora was performed for the histological, histo-morphometrical and immunhistological evaluation.

Summary

The control group showed a physiological healing course, partially in the final stage of healing. Whereas the test group showed a clearly negative impact of healing. Twelve of 16 animals in this group demonstrated the expected appearance of an atrophic non-union. The remaining animals showed small regions with possible healing-tendencies in and around the osteotomy site. The periosteum was not totally reconstructed. Obviously for bone-healing it is not necessary to complete the phase of periosteal reconstruction, because endosteal healing is feasible as well.

By means of this model it was possible to create an atrophic pseudarthrosis. Obviously the performed manipulations were sufficient to impair healing gravely. All together this model shows a good reliability and reproducibility. All overall results of this study are ratified in the associated publication of Kaspar and und colleagues (2008) ³ by assistance of the author. This model can be used for following evaluations of new therapies for atrophic pseudarthrosis and was already successful constituted for this by some authors ^{8,152-154,200}.

8 Literaturverzeichnis

1. Bolander ME. Regulation of fracture repair by growth factors. *Proc Soc Exp Biol Med* 1992; 200 (2): 165-70.
2. McKibbin B. The biology of fracture healing in long bones. *J Bone Joint Surg Br* 1978; 60 - B (2): 150-62.
3. Kaspar K, Matziolis G, Strube P, Sentürk U, Dormann S, Bail HJ, Duda GN. A new animal model for bone atrophic nonunion: fixation by external fixator. *J Orthop Res* 2008; 26 (12): 1649-55.
4. Pennig D. The biology of bones and of bone fracture healing. *Unfallchirurg* 1990; 93 (11): 488-91.
5. Ferreira ML, Silva PC, Pereira LeP, Franco RS, Mello NB, Amaral AC, Schanaider A. Experimental model in rats for the development of pseudoarthrosis. *Rev Col Bras Cir* 2009; 36 (6): 514-8.
6. Duda GN, Sporrer S, Sollmann M, Hoffmann JE, Kassi JP, Khodadadyan C, Raschke M. Interfragmentary movements in the early phase of healing in distraction and correction osteotomies stabilized with ring fixators. *Langenbecks Arch Surg* 2003; 387 (11-12): 433-40.
7. Kokubu T, Hak DJ, Hazelwood SJ, Reddi AH. Development of an atrophic nonunion model and comparison to a closed healing fracture in rat femur. *J Orthop Res* 2003; 21 (3): 503-10.
8. Peters A, Toben D, Lienau J, Schell H, Bail HJ, Matziolis G, Duda GN, Kaspar K. Locally applied osteogenic predifferentiated progenitor cells are more effective than undifferentiated mesenchymal stem cells in the treatment of delayed bone healing. *Tissue Eng Part A* 2009; 15 (10): 2947-54.
9. Wedemeyer C, Peppmüller R, Bredendiek T. Therapieresistente, atrophe und infizierte femorale Pseudarthrose. *Orthopäde* 2011; 5: 440-4.
10. Lienau J, Schmidt-Bleek K, Peters A, Haschke F, Duda GN, Perka C, Bail HJ, Schütze N, Jakob F, Schell H. Differential regulation of blood vessel formation between standard and delayed bone healing. *J Orthop Res* 2009; 27 (9): 1133-40.
11. Hak DJ, Fitzpatrick D, Bishop JA, Marsh JL, Tilp S, Schnettler R, Simpson H, Alt V. Delayed union and nonunions: epidemiology, clinical issues, and financial aspects. *Injury* 2014; 45 Suppl 2: 3-7.
12. Schlundt C, Schell H, Goodman SB, Vunjak-Novakovic G, Duda GN, Schmidt-Bleek K. Immune modulation as a therapeutic strategy in bone regeneration. *J Exp Orthop* 2015; 2 (1): 1.
13. Schmidt-Bleek K, Petersen A, Dienelt A, Schwarz C, Duda GN. Initiation and early control of tissue regeneration - bone healing as a model system for tissue regeneration. *Expert Opin Biol Ther* 2014; 14 (2): 247-59.
14. Waki T, Lee SY, Niikura T, Iwakura T, Dogaki Y, Okumachi E, Kuroda R, Kurosaka M. Profiling microRNA expression in fracture nonunions: Potential role of microRNAs in nonunion formation studied in a rat model. *Bone Joint J* 2015; 97 - B (8): 1144-51.
15. Gao F, Zhang CQ, Chai YM, Li XL. Lentivirus-mediated Wnt10b overexpression enhances fracture healing in a rat atrophic non-union model. *Biotechnol Lett* 2015; 37 (3): 733-9.
16. Einhorn TA. The cell and molecular biology of fracture healing. *Clin Orthop Relat Res* 1998; 355 (Suppl): 7-21.
17. Hietaniemi K, Peltonen J, Paavolainen P. An experimental model for non-union in rats. *Injury* 1995; 26 (10): 681-6.
18. Schweiberer L, Baumgart R, Deiler S. The biological reaction in atrophic and hypertrophic pseudoarthrosis of diaphysis of long bone. Causes and forms of appearance. *Chirurg* 1999; 70 (11): 1193-201.
19. Garcia P, Holstein JH, Maier S, Schaumlöffel H, Al-Marrawi F, Hannig M, Pohlemann T, Menger MD. Development of a reliable non-union model in mice. *J Surg Res* 2008; 147 (1): 84-91.
20. Schmidmaier G, Moghaddam A. Long Bone Nonunion. *Z Orthop Unfall* 2015; 153 (6): 659-74.

21. Mehta M, Schell H, Schwarz C, Peters A, Schmidt-Bleek K, Ellinghaus A, Bail HJ, Duda GN, Lienau J. A 5-mm femoral defect in female but not in male rats leads to a reproducible atrophic non-union. *Arch Orthop Trauma Surg* 2011; 131 (1): 121-9.
22. Haas NP. Callus modulation--fiction or reality?. *Chirurg* 2000; 71 (9): 987-8.
23. Tzioupis C, Giannoudis PV. Prevalence of long-bone non-unions. *Injury* 2007; 38 Suppl 2: 3-9.
24. Oetgen ME, Merrell GA, Troiano NW, Horowitz MC, Kacena MA. Development of a femoral non-union model in the mouse. *Injury* 2008; 39 (10): 1119-26.
25. Garcia P, Histing T, Holstein JH, Klein M, Laschke MW, Matthys R, Ignatius A, Wildemann B, Lienau J, Peters A and others. Rodent animal models of delayed bone healing and non-union formation: a comprehensive review. *Eur Cell Mater* 2013; 26: 1-14.
26. Fassbender M, Strobel C, Rauhe JS, Bergmann C, Schmidmaier G, Wildemann B. Local inhibition of angiogenesis results in an atrophic non-union in a rat osteotomy model. *Eur Cell Mater* 2011; 22: 1-11.
27. Minkwitz S, Faßbender M, Kronbach Z, Wildemann B. Longitudinal analysis of osteogenic and angiogenic signaling factors in healing models mimicking atrophic and hypertrophic non-unions in rats. *PLoS One* 2015; 10 (4): e0124217.
28. Choi P, Ogilvie C, Thompson Z, Miclau T, Helms JA. Cellular and molecular characterization of a murine non-union model. *J Orthop Res* 2004; 22 (5): 1100-7.
29. Lattermann C, Baltzer AW, Zelle BA, Whalen JD, Niyibizi C, Robbins PD, Evans CH, Gruen GS. Feasibility of percutaneous gene transfer to an atrophic nonunion in a rabbit. *Clin Orthop Relat Res* 2004 (425): 237-43.
30. Markel MD, Bogdanske JJ, Xiang Z, Klohnen A. Atrophic nonunion can be predicted with dual energy x-ray absorptiometry in a canine osteotomy model. *J Orthop Res* 1995; 13 (6): 869-75.
31. Tawonsawatruk T, West CC, Murray IR, Soo C, Péault B, Simpson AH. Adipose derived pericytes rescue fractures from a failure of healing-non-union. *Sci Rep* 2016; 6: 22779.
32. Pérez Núñez MI, Ferreño Blanco D, Alfonso Fernández A, Casado de Prado JA, Sánchez Crespo M, De la Red Gallego M, Pascual Carra A, Rodríguez López T, Diego Cavia S, Garcés Zarzalejo C and others. Comparative study of the effect of PTH (1-84) and strontium ranelate in an experimental model of atrophic nonunion. *Injury* 2015; 46 (12): 2359-67.
33. Roberto-Rodrigues M, Fernandes RM, Senos R, Scoralick AC, Bastos AL, Santos TM, Viana LP, Lima I, Guzman-Silva MA, Kfoury-Júnior JR. Novel rat model of nonunion fracture with vascular deficit. *Injury* 2015; 46 (4): 649-54.
34. Steinhausen E, Glombitza M, Böhm HJ, Hax PM, Rixen D. Non-unions. From diagnosis to healing. *Unfallchirurg* 2013; 116 (7): 633-49.
35. Ferreira ML, Silva PC, Alvarez Silva LH, Bonfim DC, Conilho Macedo Müller LC, Espósito CC, Schanaider A. Heterologous mesenchymal stem cells successfully treat femoral pseudarthrosis in rats. *J Transl Med* 2012; 10: 51.
36. Dickson GR, Geddis C, Fazzalari N, Marsh D, Parkinson I. Microcomputed tomography imaging in a rat model of delayed union/non-union fracture. *J Orthop Res* 2008; 26 (5): 729-36.
37. Weber BG, Cech O. Pseudarthrosen. Pathophysiologie, Biomechanik, Therapie, Ergebnisse. Verlag Hans Huber, Bern 1973; 1.Auflage: 15-45.
38. Frölke JP, Patka P. Definition and classification of fracture non-unions. *Injury* 2007; 38 Suppl 2: 19-22.
39. Einhorn TA. Breakout session 1: Definitions of fracture repair. *Clin Orthop Relat Res* 1998; 355 (Suppl): 353.
40. Mills LA, Simpson AH. In vivo models of bone repair. *J Bone Joint Surg Br* 2012; 94 (7): 865-74.
41. Rhinelander FW. Tibial blood supply in relation to fracture healing. *Clin Orthop Relat Res* 1974 (105): 34-81.
42. Marsh D. Concepts of fracture union, delayed union, and nonunion. *Clin Orthop Relat Res* 1998 (355 Suppl): 22-30.

43. Funk JF, Matziolis G, Krockner D, Perka C. Promotion of bone healing through clinical application of autologous periosteum derived stem cells in a case of atrophic non-union. *Z Orthop Unfall* 2007; 145 (6): 790-4.
44. Kaspar K, Schell H, Seebeck P, Thompson MS, Schütz M, Haas NP, Duda GN. Angle stable locking reduces interfragmentary movements and promotes healing after unreamed nailing. Study of a displaced osteotomy model in sheep tibiae. *J Bone Joint Surg Am* 2005; 87 (9): 2028-37.
45. Nakamura A, Akahane M, Shigematsu H, Tadokoro M, Morita Y, Ohgushi H, Dohi Y, Imamura T, Tanaka Y. Cell sheet transplantation of cultured mesenchymal stem cells enhances bone formation in a rat nonunion model. *Bone* 2010; 46 (2): 418-24.
46. Jäger M, Sager M, Lensing-Höhn S, Krauspe R. The critical size bony defect in a small animal for bone healing studies (I): Comparative anatomical study on rats' femur. *Biomed Tech (Berl)* 2005; 50 (4): 107-10.
47. Geris L, Reed AA, Vander Sloten J, Simpson AH, Van Oosterwyck H. Occurrence and treatment of bone atrophic non-unions investigated by an integrative approach. *PLoS Comput Biol* 2010; 6 (9): e1000915.
48. Tawonsawatruk T, Kelly M, Simpson H. Evaluation of native mesenchymal stem cells from bone marrow and local tissue in an atrophic nonunion model. *Tissue Eng Part C Methods* 2014; 20 (6): 524-32.
49. Makino T, Hak DJ, Hazelwood SJ, Curtiss S, Reddi AH. Prevention of atrophic nonunion development by recombinant human bone morphogenetic protein-7. *J Orthop Res* 2005; 23 (3): 632-8.
50. Landry PS, Marino AA, Sadasivan KK, Albright JA. Effect of soft-tissue trauma on the early periosteal response of bone to injury. *J Trauma* 2000; 48 (3): 479-83.
51. Simon TM, Van Sickle DC, Kunishima DH, Jackson DW. Cambium cell stimulation from surgical release of the periosteum. *J Orthop Res* 2003; 21 (3): 470-80.
52. Tonna EA, Cronkite EP. The periosteum. Autoradiographic studies on cellular proliferation and transformation utilizing tritiated thymidine. *Clin Orthop Relat Res* 1963; 30: 218-33.
53. Brownlow HC, Simpson AH. Metabolic activity of a new atrophic nonunion model in rabbits. *J Orthop Res* 2000; 18 (3): 438-42.
54. Roach HI, Shearer JR, Archer C. The choice of an experimental model. A guide for research workers. *J Bone Joint Surg Br* 1989; 71 (4): 549-53.
55. Schmitz JP, Hollinger JO. The critical size defect as an experimental model for craniomandibulofacial nonunions. *Clin Orthop Relat Res* 1986 (205): 299-308.
56. Moghaddam A, Breier L, Haubruck P, Bender D, Biglari B, Wentzensen A, Zimmermann G. Non-unions treated with bone morphogenetic protein 7: introducing the quantitative measurement of human serum cytokine levels as promising tool in evaluation of adjunct non-union therapy. *J Inflamm (Lond)* 2016; 13: 3.
57. Schwarz C, Wulsten D, Ellinghaus A, Lienau J, Willie BM, Duda GN. Mechanical load modulates the stimulatory effect of BMP2 in a rat nonunion model. *Tissue Eng Part A* 2013; 19 (1-2): 247-54.
58. Skaliczki G, Schandl K, Weszl M, Major T, Kovács M, Skaliczki J, Szendrői M, Dobó-Nagy C, Lacza Z. Serum albumin enhances bone healing in a nonunion femoral defect model in rats: a computer tomography micromorphometry study. *Int Orthop* 2013; 37 (4): 741-5.
59. Vögelin E, Brekke JH, Jones NF. Heterotopic and orthotopic bone formation with a vascularized periosteal flap, a matrix and rh-BMP-2 (bone morphogenetic protein) in the rat model. *Mund Kiefer Gesichtschir* 2000; 4 Suppl 2: 454-8.
60. Qu Z, Guo S, Fang G, Cui Z, Liu Y. AKT Pathway Affects Bone Regeneration in Nonunion Treated with Umbilical Cord-Derived Mesenchymal Stem Cells. *Cell Biochem Biophys* 2015; 71 (3): 1543-51.
61. Ortak T, Ozdemir R, Uysal A, Ulusoy MG, Sungur N, Sahin B, Koçer U, Sensöz O. Osteogenic capacities of periost grafts, periost flaps and prefabricated periosteal flaps: experimental study. *J Craniofac Surg* 2005; 16 (4): 594-600.
62. Prantl L, Pfeifer C, Geis S, Gosau M, Jung EM. Osteocutaneous free flaps: a critical analysis of quantitative evaluation of bone microcirculation with contrast-enhanced

- high resolution ultrasound (hrCEUS) and TIC analysis. *Clin Hemorheol Microcirc* 2011; 49 (1-4): 251-9.
63. Arnold U, Lindenhayn K, Perka C. In vitro-cultivation of human periosteum derived cells in bioresorbable polymer-TCP-composites. *Biomaterials* 2002; 23 (11): 2303-10.
64. Haberstroh K, Ritter K, Kuschnierz J, Bormann KH, Kaps C, Carvalho C, Mülhaupt R, Sittlinger M, Gellrich NC. Bone repair by cell-seeded 3D-bioplotted composite scaffolds made of collagen treated tricalciumphosphate or tricalciumphosphate-chitosan-collagen hydrogel or PLGA in ovine critical-sized calvarial defects. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 2010; 93 (2): 520-30.
65. Connolly CK, Li G, Bunn JR, Mushipe M, Dickson GR, Marsh DR. A reliable externally fixated murine femoral fracture model that accounts for variation in movement between animals. *J Orthop Res* 2003; 21 (5): 843-9.
66. Breitbart AS, Grande DA, Kessler R, Ryaby JT, Fitzsimmons RJ, Grant RT. Tissue engineered bone repair of calvarial defects using cultured periosteal cells. *Plast Reconstr Surg* 1998; 101 (3): 567-76.
67. Preininger B, Duda G, Gerigk H, Bruckner J, Ellinghaus A, Sass FA, Perka C, Schmidt-Bleek K, Dienelt A. CD133: enhancement of bone healing by local transplantation of peripheral blood cells in a biologically delayed rat osteotomy model. *PLoS One* 2013; 8 (2): e52650.
68. Einhorn TA, Majeska RJ, Mohaideen A, Kagel EM, Bouxsein ML, Turek TJ, Wozney JM. A single percutaneous injection of recombinant human bone morphogenetic protein-2 accelerates fracture repair. *J Bone Joint Surg Am* 2003; 85- A (8): 1425-35.
69. Horas U, Schnettler R, Pelinkovic D, Herr G, Aigner T. Osteochondral transplantation versus autogenous chondrocyte transplantation. A prospective comparative clinical study. *Chirurg* 2000; 71 (9): 1090-7.
70. Preininger B, Gerigk H, Bruckner J, Perka C, Schell H, Ellinghaus A, Schmidt-Bleek K, Duda G. An experimental setup to evaluate innovative therapy options for the enhancement of bone healing using BMP as a benchmark--a pilot study. *Eur Cell Mater* 2012; 23: 262-72.
71. Wildemann B, Lange K, Strobel C, Fassbender M, Willie B, Schmidmaier G. Local BMP-2 application can rescue the delayed osteotomy healing in a rat model. *Injury* 2011; 42 (8): 746-52.
72. Wulsten D, Glatt V, Ellinghaus A, Schmidt-Bleek K, Petersen A, Schell H, Lienau J, Sebald W, Plöger F, Seemann P and others. Time kinetics of bone defect healing in response to BMP-2 and GDF-5 characterised by in vivo biomechanics. *Eur Cell Mater* 2011; 21: 177-92.
73. Ghodasra JH, Nickoli MS, Hashmi SZ, Nelson JT, Mendoza M, Nicolas JD, Bellary SS, Sonn K, Ashtekar A, Park CJ and others. Ovariectomy-Induced Osteoporosis Does Not Impact Fusion Rates in a Recombinant Human Bone Morphogenetic Protein-2-Dependent Rat Posterolateral Arthrodesis Model. *Global Spine J* 2016; 6 (1): 60-8.
74. Toben D, Schroeder I, El Khassawna T, Mehta M, Hoffmann JE, Frisch JT, Schell H, Lienau J, Serra A, Radbruch A and others. Fracture healing is accelerated in the absence of the adaptive immune system. *J Bone Miner Res* 2011; 26 (1): 113-24.
75. Banwart JC, Asher MA, Hassanein RS. Iliac crest bone graft harvest donor site morbidity. A statistical evaluation. *Spine (Phila Pa 1976)* 1995; 20 (9): 1055-60.
76. Harrison LJ, Cunningham JL, Strömberg L, Goodship AE. Controlled induction of a pseudarthrosis: a study using a rodent model. *J Orthop Trauma* 2003; 17 (1): 11-21.
77. Kowalski MJ, Schemitsch EH, Kregor PJ, Senft D, Swiontkowski MF. Effect of periosteal stripping on cortical bone perfusion: a laser doppler study in sheep. *Calcif Tissue Int* 1996; 59 (1): 24-6.
78. Boyan BD, Caplan AI, Heckman JD, Lennon DP, Ehler W, Schwartz Z. Osteochondral progenitor cells in acute and chronic canine nonunions. *J Orthop Res* 1999; 17 (2): 246-55.
79. Claes L, Eckert-Hübner K, Augat P. The fracture gap size influences the local vascularization and tissue differentiation in callus healing. *Langenbecks Arch Surg* 2003; 388 (5): 316-22.

80. Heckman JD, Ehler W, Brooks BP, Aufdemorte TB, Lohmann CH, Morgan T, Boyan BD. Bone morphogenetic protein but not transforming growth factor-beta enhances bone formation in canine diaphyseal nonunions implanted with a biodegradable composite polymer. *J Bone Joint Surg Am* 1999; 81 (12): 1717-29.
81. Jäger M, Sager M, Lensing-Höhn S, Krauspe R. The critical size bony defect in a small animal for bone healing studies (II): implant evolution and surgical technique on a rat's femur. *Biomed Tech (Berl)* 2005; 50 (5): 137-42.
82. Tiedeman JJ, Connolly JF, Strates BS, Lippiello L. Treatment of nonunion by percutaneous injection of bone marrow and demineralized bone matrix. An experimental study in dogs. *Clin Orthop Relat Res* 1991 (268): 294-302.
83. Nicholls F, Ng AH, Hu S, Janic K, Fallis C, Willett T, Grynopas M, Ferguson P. Can OP-1 stimulate union in a rat model of pathological fracture post treatment for soft tissue sarcoma? *J Orthop Res* 2014; 32 (10): 1252-63.
84. Histing T, Garcia P, Holstein JH, Klein M, Matthys R, Nuetzi R, Steck R, Laschke MW, Wehner T, Bindl R and others. Small animal bone healing models: standards, tips, and pitfalls results of a consensus meeting. *Bone* 2011; 49 (4): 591-9.
85. Eyre-Brook AL. The periosteum: its function reassessed. *Clin Orthop Relat Res* 1984 (189): 300-7.
86. König HE, Liebich H-G. Anatomie der Haussäugetiere. Verlag Schattauer, Stuttgart-New York 1999; 1.Auflage: 4-14.
87. Seeman E. Periosteal bone formation--a neglected determinant of bone strength. *N Engl J Med* 2003; 349 (4): 320-3.
88. Remedios A. Bone and bone healing. *Vet Clin North Am Small Anim Pract* 1999; 29 (5): 1029-44
89. Schenk R, Willenegger H. On the histological picture of so-called primary bone healing of pressure osteosynthesis in experimental osteotomies in the dog. *Experientia* 1963; 15 (19): 593-5.
90. Junqueira LC, Carneiro J, Gratzl MH. Histologie. Verlag Springer, Berlin-Heidelberg 2005; 6.Auflage: 92-105.
91. Liebich H-G, Böck P, Budras K-D. Funktionelle Histologie der Haussäugetiere. Verlag Schattauer, Stuttgart-New York 2003; 4.Auflage: 69-89.
92. Trostle SS, Markel MD. Fracture biology, biomechanics, and internal fixation. *Vet Clin North Am Food Anim Pract* 1996; 12 (1): 19-46.
93. Budras K-D, Fricke W, Richter R. Atlas der Anatomie des Hundes. Schlütersche Verlagsgesellschaft, Hannover 2000; 6.Auflage: 140-1.
94. Thews G, Mutschler E, Vaupel P. Anatomie, Physiologie, Pathophysiologie des Menschen. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart 1980; 1.Auflage: 43-6.
95. Probst A, Spiegel HU. Cellular mechanisms of bone repair. *J Invest Surg* 1997; 10 (3): 77-86.
96. Matziolis G, Erli HJ, Rau HM, Klever P, Bosserhoff AK, Paar O. Heparin facilitates proliferation of human osteoblasts in vitro. *Orthopäde* 2002; 31 (6): 575-81.
97. Schell H, Lienau J, Epari DR, Seebeck P, Exner C, Muchow S, Bragulla H, Haas NP, Duda GN. Osteoclastic activity begins early and increases over the course of bone healing. *Bone* 2006; 38 (4): 547- 54.
98. Ono I, Gunji H, Suda K, Kaneko F, Murata M, Saito T, Kuboki Y. Bone induction of hydroxyapatite combined with bone morphogenetic protein and covered with periosteum. *Plast Reconstr Surg* 1995; 95 (7): 1265-72.
99. Willenegger H, Perren SM, Schenk R. Primary and secondary healing of bone fractures. *Chirurg* 1971; 42 (6): 241-52.
100. Wolf JH. Julius Wolff und sein Gesetz der Transformation der Knochen. *Orthopäde* 1995; Springer Verlag (24): 378-86.
101. Wolff J. Das Gesetz der Transformation der Knochen. Hirschwald, Berlin 1892.
102. Murakami H, Emery MA. Elastic fibers in the periosteum in fracture healing. *Surg Forum* 1966; 17: 452-4.
103. Webb JCJ, Tricker J. Bone biology – a review of fracture healing. *Current Orthopaedics* 2000; 12: 457-63.

104. Whiteside LA, Lesker PA. The effects of extraperiosteal and subperiosteal dissection. II. On fracture healing. *J Bone Joint Surg Am* 1978; 60 (1): 26-30.
105. Gruber HE, Phieffer LS, Wattenbarger JM. Physeal fractures, part II: fate of interposed periosteum in a physeal fracture. *J Pediatr Orthop* 2002; 22 (6): 710-6.
106. Kostopoulos L, Karring T. Role of periosteum in the formation of jaw bone. An experiment in the rat. *J Clin Periodontol* 1995; 22 (3): 247-54.
107. Randolph M. Tissue engineered bone repair of calvarial defects using cultured periosteal cells (discussion). *Plast Reconstr Surg* 1998; 101 (3): 575-6.
108. Redlich A, Perka C, Schultz O, Spitzer R, Häupl T, Burmester GR, Sittlinger M. Bone engineering on the basis of periosteal cells cultured in polymer fleeces. *J Mater Sci Mater Med* 1999; 10 (12): 767-72.
109. Nakahara H, Bruder SP, Goldberg VM, Caplan AI. In vivo osteochondrogenic potential of cultured cells derived from the periosteum. *Clin Orthop Relat Res* 1990 (259): 223-32.
110. Carranza-Bencano A, García-Paino L, Armas Padrón JR, Cayuela Dominguez A. Neochondrogenesis in repair of full-thickness articular cartilage defects using free autogenous periosteal grafts in the rabbit. A follow-up in six months. *Osteoarthritis Cartilage* 2000; 8 (5): 351-8.
111. Ishida H, Tamai S, Yajima H, Inoue K, Ohgushi H, Dohi Y. Histologic and biochemical analysis of osteogenic capacity of vascularized periosteum. *Plast Reconstr Surg* 1996; 97 (3): 512-8.
112. Lane JM, Tomin E, Bostrom MP. Biosynthetic bone grafting. *Clin Orthop Relat Res* 1999 (367 Suppl): 107-17.
113. Lu C, Miclau T, Hu D, Marcucio RS. Ischemia leads to delayed union during fracture healing: a mouse model. *J Orthop Res* 2007; 25 (1): 51-61.
114. Ekholm EC, Hietaniemi K, Määttä A, Vuorio E, Paavolainen P, Penttinen RP. Extended expression of cartilage components in experimental pseudoarthrosis. *Connect Tissue Res* 1995; 31 (3): 211-8.
115. Schenk RK, Müller J, Willenegger H. Experimental histological contribution to the development and treatment of pseudoarthrosis. *Hefte Unfallheilkd* 1968; 94: 15-24.
116. Schenk RK. Histology of primary bone healing. *Fortschr Kiefer Gesichtschir* 1975; 19: 8-12.
117. Schenk R, Willenegger H. On the histology of primary bone healing. *Langenbecks Arch Klin Chir Ver Dtsch Z Chir* 1964; 308: 440-52.
118. Lienau J, Schell H, Duda GN, Seebeck P, Muchow S, Bail HJ. Initial vascularization and tissue differentiation are influenced by fixation stability. *J Orthop Res* 2005; 23 (3): 639-45.
119. Stürmer KM. Pathophysiology of disrupted bone healing. *Orthopade* 1996; 25 (5): 386-93.
120. Braun W, Rüter A. Fracture healing. Morphologic and physiologic aspects. *Unfallchirurg* 1996; 99 (1): 59-67.
121. Cancedda R, Bianchi G, Derubeis A, Quarto R. Cell therapy for bone disease: a review of current status. *Stem Cells* 2003; 21 (5): 610-9.
122. Hietaniemi K. Retarded mineralization cascade in an experimental nonunion--a sequential polyfluorochrome labeling study in rats. *Ann Chir Gynaecol* 1998; 87 (3): 236-9.
123. Calori GM, Phillips M, Jeetle S, Tagliabue L, Giannoudis PV. Classification of non-union: need for a new scoring system? *Injury* 2008; 39 Suppl 2: 59-63.
124. Richardson JB, Cunningham JL, Goodship AE, O'Connor BT, Kenwright J. Measuring stiffness can define healing of tibial fractures. *J Bone Joint Surg Br* 1994; 76 (3): 389-94.
125. Morgan EF, Mason ZD, Chien KB, Pfeiffer AJ, Barnes GL, Einhorn TA, Gerstenfeld LC. Micro-computed tomography assessment of fracture healing: relationships among callus structure, composition, and mechanical function. *Bone* 2009; 44 (2): 335-44.

126. Ahn S, Kim WY, Lim KS, Ryoo SM, Sohn CH, Seo DW, Kwak MK, Yoon JC. Advanced radiology utilization in a tertiary care emergency department from 2001 to 2010. *PLoS One* 2014; 9 (11): e112650.
127. Kaspar K, Schell H, Toben D, Matziolis G, Bail HJ. An easily reproducible and biomechanically standardized model to investigate bone healing in rats, using external fixation. *Biomed Tech (Berl)* 2007; 52 (6): 383-90.
128. Rüter A, Mayr E. Pseudarthrosis. *Chirurg* 1999; 70 (11): 1239-45.
129. Schell H, Epari DR, Kassi JP, Bragulla H, Bail HJ, Duda GN. The course of bone healing is influenced by the initial shear fixation stability. *J Orthop Res* 2005; 23 (5): 1022-8.
130. Probst A, Jansen H, Ladas A, Spiegel HU. Callus formation and fixation rigidity: a fracture model in rats. *J Orthop Res* 1999; 17 (2): 256-60.
131. Claes L, Eckert-Hübner K, Augat P. The effect of mechanical stability on local vascularization and tissue differentiation in callus healing. *J Orthop Res* 2002; 20 (5): 1099-105.
132. Klein P, Schell H, Streitparth F, Heller M, Kassi JP, Kandziora F, Bragulla H, Haas NP, Duda GN. The initial phase of fracture healing is specifically sensitive to mechanical conditions. *J Orthop Res* 2003; 21 (4): 662-9.
133. Mølster A, Gjerdet NR, Raugstad TS, Hvidsten K, Alho A, Bang G. Effect of instability of experimental fracture healing. *Acta Orthop Scand* 1982; 53 (4): 521-6.
134. Grundnes O, Reikerås O. Effects of instability on bone healing. Femoral osteotomies studied in rats. *Acta Orthop Scand* 1993; 64 (1): 55-8.
135. Hulth A. Current concepts of fracture healing. *Clin Orthop Relat Res* 1989 (249): 265-84.
136. Kutscha-Lissberg F, Hopf KF. [Why do osteosyntheses fail? The problem with biomechanics and biology]. *Unfallchirurg* 2003; 106 (9): 708-21.
137. Runkel M, Rommens PM. [Pseudarthrosis]. *Unfallchirurg* 2000; 103 (1): 51-63..
138. Reed AA, Joyner CJ, Isefuku S, Brownlow HC, Simpson AH. Vascularity in a new model of atrophic nonunion. *J Bone Joint Surg Br* 2003; 85 (4): 604-10.
139. Bosch U, Skutek M, Kasperczyk WJ, Tscherne H. Nonunion of the humeral diaphysis - operative and nonoperative treatment. *Chirurg* 1999; 70 (11): 1202-8.
140. Heiner DE, Meyer MH, Frick SL, Kellam JF, Fiechtl J, Meyer RA. Gene expression during fracture healing in rats comparing intramedullary fixation to plate fixation by DNA microarray. *J Orthop Trauma* 2006; 20 (1): 27-38.
141. Gebauer GP, Lin SS, Beam HA, Vieira P, Parsons JR. Low-intensity pulsed ultrasound increases the fracture callus strength in diabetic BB Wistar rats but does not affect cellular proliferation. *J Orthop Res* 2002; 20 (3): 587-92.
142. Macey LR, Kana SM, Jingushi S, Terek RM, Borretos J, Bolander ME. Defects of early fracture-healing in experimental diabetes. *J Bone Joint Surg Am* 1989; 71 (5): 722-33.
143. Cho TJ, Choi IH, Lee SM, Chung CY, Yoo WJ, Lee DY, Lee JW. Refracture after Ilizarov osteosynthesis in atrophic-type congenital pseudarthrosis of the tibia. *J Bone Joint Surg Br* 2008; 90 (4): 488-93.
144. Choi IH, Cho TJ, Moon HJ. Ilizarov treatment of congenital pseudarthrosis of the tibia: a multi-targeted approach using the Ilizarov technique. *Clin Orthop Surg* 2011; 3 (1): 1-8.
145. Park SH, O'Connor K, Sung R, McKellop H, Sarmiento A. Comparison of healing process in open osteotomy model and closed fracture model. *J Orthop Trauma* 1999; 13 (2): 114-20.
146. Connolly JF, Guse R, Tiedeman J, Dehne R. Autologous marrow injection for delayed unions of the tibia: a preliminary report. *J Orthop Trauma* 1989; 3 (4): 276-82.
147. Brighton CT, Shaman P, Heppenstall RB, Esterhai JL, Pollack SR, Friedenber ZB. Tibial nonunion treated with direct current, capacitive coupling, or bone graft. *Clin Orthop Relat Res* 1995 (321): 223-34.
148. Weber BG, Brunner C, Kägi F. Femoral shaft fracture in the growth age. Conservative treatment-indication and results. *Hefte Unfallheilkd* 1982; 158: 97-102.

149. Ohgushi H, Goldberg VM, Caplan AI. Repair of bone defects with marrow cells and porous ceramic. *Experiments in rats. Acta Orthop Scand* 1989; 60 (3): 334-9.
150. Kuner EH, Berwarth H, Lücke SV. Treatment principles in aseptic pseudarthrosis. *Orthopade* 1996; 25 (5): 394-404.
151. Rhinelander FW. The normal microcirculation of diaphyseal cortex and its response to fracture. *J Bone Joint Surg Am* 1968; 50 (4): 784-800.
152. Toben D. Dissertation: Einfluss pluripotenter mesenchymaler Zellen auf die Knochenheilung im atrophischen Pseudarthrosemodell der Ratte - Biomechanische Untersuchung. Berlin 2008.
153. Ertelt A. Dissertation: Einfluss von autologen mesenchymalen Stammzellen auf eine Pseudarthrose unter besonderer Beachtung der periostalen Rekonstruktion. Eine immunhistologische und histomorphometrische Studie im Rattenmodell. Berlin 2011; Journal-Nr.: 3488.
154. Bach B. Dissertation: Einfluss autologer osteogen prädifferentzierter mesenchymaler Stammzellen auf die Knochenheilung im atrophischen Pseudarthrose-Modell der Ratte. Berlin 2008; Journal-Nr.: 3234.
155. Arrington ED, Smith WJ, Chambers HG, Bucknell AL, Davino NA. Complications of iliac crest bone graft harvesting. *Clin Orthop Relat Res* 1996 (329): 300-9.
156. Kon E, Muraglia A, Corsi A, Bianco P, Marcacci M, Martin I, Boyde A, Ruspantini I, Chistolini P, Rocca M and others. Autologous bone marrow stromal cells loaded onto porous hydroxyapatite ceramic accelerate bone repair in critical-size defects of sheep long bones. *J Biomed Mater Res* 2000; 49 (3): 328-37.
157. Petite H, Viateau V, Bensaïd W, Meunier A, de Pollak C, Bourguignon M, Oudina K, Sedel L, Guillemin G. Tissue-engineered bone regeneration. *Nat Biotechnol* 2000; 18 (9): 959-63.
158. Romeis B. *Mikroskopische Technik*. 1989; 17. Auflage (Urban und Fischer Verlag, München): Kapitel 1-4.
159. Volpon JB. Nonunion using a canine model. *Arch Orthop Trauma Surg* 1994; 113 (6): 312-7.
160. Oni OO. A non-union model of the rabbit tibial diaphysis. *Injury* 1995; 26 (9): 619-22.
161. Ito Y, Fitzsimmons JS, Sanyal A, Mello MA, Mukherjee N, O'Driscoll SW. Localization of chondrocyte precursors in periosteum. *Osteoarthritis Cartilage* 2001; 9 (3): 215-23.
162. Aerssens J, Boonen S, Lowet G, Dequeker J. Interspecies differences in bone composition, density, and quality: potential implications for in vivo bone research. *Endocrinology* 1998; 139 (2): 663-70.
163. Zutphen LFM, Baumans V, Beynen AC. *Grundlagen der Versuchstierkunde*. Verlag G. Fischer, Stuttgart-Jena-New York 1995 (1. Auflage): 27-31.
164. Hedrich HJ. *History, strains and models*. Academic Press, London, San Diego 1999: 3-17.
165. Rat-Genome-Sequencing-Project-Consortium. Genome sequence of the Brown Norway rat yields insights into mammalian evolution. *Nature* 2004; 428: 493-521.
166. Lindblad-Toh K. Genome sequencing: three's company. *Nature* 2004; 428 (6982): 475-6.
167. Jones CB, Mayo KA. Nonunion treatment: iliac crest bone graft techniques. *J Orthop Trauma* 2005; 19 (10 Suppl): 11-3.
168. Ekeland A, Engesoeter LB, Langeland N. Influence of age on mechanical properties of healing fractures and intact bones in rats. *Acta Orthop Scand* 1982; 53 (4): 527-34.
169. Nunamaker DM. Experimental models of fracture repair. *Clin Orthop Relat Res* 1998 (355 Suppl): 56-65.
170. Mark H, Bergholm J, Nilsson A, Rydevik B, Strömberg L. An external fixation method and device to study fracture healing in rats. *Acta Orthop Scand* 2003; 74 (4): 476-82.
171. Schmidhammer R, Zandieh S, Mittermayr R, Pelinka LE, Leixnering M, Hopf R, Kroepfl A, Redl H. Assessment of bone union/nonunion in an experimental model using microcomputed technology. *J Trauma* 2006; 61 (1): 199-205.
172. Zacherl M, Kdolsky R, Erhart J, Boeckmann D, Radler C, Vecsei V. Unplanned 10-year retention of an external fixator for a proximal tibial fracture. *J Orthop Trauma* 2006; 20 (10): 715-8.

173. Reikerås O, Reigstad A. Healing of stable and unstable osteotomies in rats. *Arch Orthop Trauma Surg* 1985; 104 (3): 161-3.
174. Wu JJ, Shyr HS, Chao EY, Kelly PJ. Comparison of osteotomy healing under external fixation devices with different stiffness characteristics. *J Bone Joint Surg Am* 1984; 66 (8): 1258-64.
175. Indrekvam K, Lekven J, Engesaeter LB, Langeland N. Effects of intramedullary reaming and nailing on blood flow in rat femora. *Acta Orthop Scand* 1992; 63 (1): 61-5.
176. Danckwardt-Lillieström G, Lorenzi GL, Olerud S. Intramedullary nailing after reaming. An investigation on the healing process in osteotomized rabbit tibias. *Acta Orthop Scand Suppl* 1970; 134: 1-78.
177. Klein P, Opitz M, Schell H, Taylor WR, Heller MO, Kassi JP, Kandziora F, Duda GN. Comparison of unreamed nailing and external fixation of tibial diastases--mechanical conditions during healing and biological outcome. *J Orthop Res* 2004; 22 (5): 1072-8.
178. Cullinane DM, Fredrick A, Eisenberg SR, Pacicca D, Elman MV, Lee C, Salisbury K, Gerstenfeld LC, Einhorn TA. Induction of a neoarthrosis by precisely controlled motion in an experimental mid-femoral defect. *J Orthop Res* 2002; 20 (3): 579-86.
179. Einhorn TA, Lane JM, Burstein AH, Kopman CR, Vigorita VJ. The healing of segmental bone defects induced by demineralized bone matrix. A radiographic and biomechanical study. *J Bone Joint Surg Am* 1984; 66 (2): 274-9.
180. Liu TM, Martina M, Hutmacher DW, Hui JH, Lee EH, Lim B. Identification of common pathways mediating differentiation of bone marrow- and adipose tissue-derived human mesenchymal stem cells into three mesenchymal lineages. *Stem Cells* 2007; 25 (3): 750-60.
181. Shao Z, Liu B, Peng Q, Liu W, Liu Y, Liu R, Xu Y, Liu L. Transplantation of osteoblast-like cells to the distracted callus in the rabbit mandible. *Plast Reconstr Surg* 2007; 119 (2): 500-7.
182. Takushima A, Kitano Y, Harii K. Osteogenic potential of cultured periosteal cells in a distracted bone gap in rabbits. *J Surg Res* 1998; 78 (1): 68-77.
183. Ewringmann A, Glöckner B. Leitsymptome bei Hamster, Ratte, Maus und Rennmaus: Diagnostischer Leitfaden und Therapie. Georg Thieme Verlag, Stuttgart 2007; 1. Auflage: 1-3.
184. Schneider U, Hierholzer G, Böhm HJ. Bone and joint infections. *Unfallchirurg* 1996; 99 (10): 789-800.
185. Smith TJ, Galm A, Chatterjee S, Wells R, Pedersen S, Parizi AM, Goodship AE, Blunn GW. Modulation of the soft tissue reactions to percutaneous orthopaedic implants. *J Orthop Res* 2006; 24(7): 1377-83.
186. Bradley RL, Rouse GP. "External skeletal fixation using the through-and-through Kirschner splint." *J Am Anim Hosp Assoc* 1980; 16: 523-30.
187. Pettine KA, Chao EY, Kelly PJ. Analysis of the external fixator pin-bone interface. *Clin Orthop Relat Res* 1993 (293): 18-27.
188. Schindeler A, McDonald MM, Bokko P, Little DG. Bone remodeling during fracture repair: The cellular picture. *Semin Cell Dev Biol* 2008; 19(5): 459-66.
189. Brighton CT. The biology of fracture repair. *Instr Course Lect* 1984; 33: 60-82.
190. Brownlow HC, Reed A, Simpson AH. The vascularity of atrophic non-unions. *Injury* 2002; 33(2): 145-50.
191. Utvåg SE, Grundnes O, Reikeraos O. Effects of periosteal stripping on healing of segmental fractures in rats. *J Orthop Trauma* 1996; 10(4): 279-84.
192. Aro HT, Wippermann BW, Hodgson SF, Chao EY. Internal remodeling of periosteal new bone during fracture healing. *J Orthop Res* 1990; 8(2): 238-46.
193. Bianco P, Riminucci M, Gronthos S, Robey PG. Bone marrow stromal stem cells: nature, biology, and potential applications. *Stem Cells* 2001; 19(3): 180-92.
194. Carter DR, Beaupré GS, Giori NJ, Helms JA. Mechanobiology of skeletal regeneration. *Clin Orthop Relat Res* 1998 (355 Suppl): 41-55.
195. O'Driscoll SW, Fitzsimmons JS. The role of periosteum in cartilage repair. *Clin Orthop Relat Res* 2001; 391(Suppl): 190-207.

196. Schaser KD, Zhang L, Haas NP, Mittlmeier T, Duda G, Bail HJ. Temporal profile of microvascular disturbances in rat tibial periosteum following closed soft tissue trauma. *Langenbecks Arch Surg* 2003; 388(5): 323-30.
197. Saris DB, Sanyal A, An KN, Fitzsimmons JS, O'Driscoll SW. Periosteum responds to dynamic fluid pressure by proliferating in vitro. *J Orthop Res* 1999; 17(5): 668-77.
198. Leung KS, Sher AH, Lam TS, Leung PC. Energy metabolism in fracture healing. Measurement of adenosine triphosphate in callus to monitor progress. *J Bone Joint Surg Br* 1989; 71(4): 657-60.
199. Vashishth D. Small animal bone biomechanics. *Bone* 2008 Nov; 43(5): 794-7
200. Peters A. Dissertation: Einfluss autologer pluripotenter mesenchymaler Stammzellen auf die Knochenheilung im Modell der atrophien Pseudarthrose der Ratte unter Berücksichtigung der periostalen Rekonstruktion. Berlin 2008; Journal-Nr.: 3154
201. Zeichnung: Eigene
202. Fotos: Dormann, Peter

9 Publikationsverzeichnis

1. Kaspar K, Matziolis G, Strube P, Sentürk U, Dormann S, Bail HJ, Duda GN. A new animal model for bone atrophic nonunion: fixation by external fixator. J Orthop Res 2008; 26 (12): 1649-55.

Danksagung

Bei Herrn Prof. Dr.-Ing. Georg Duda bedanke ich mich für die Vergabe dieses wissenschaftlichen Themas am Julius Wolff Instituts der Charité sowie für die Unterstützung bei dieser Studie!

Sehr herzlich danke ich Herrn Prof. Dr. Karl Dietrich Weyrauch für sein kurzfristiges Engagement und die Erstbegutachtung meiner Arbeit!

Ein herzliches Dankeschön auch an alle beteiligten Kollegen aus dem Julius-Wolff-Institut der Charité! Da wäre zunächst Frau Dr. Katharina Kaspar zu nennen, die mich anfangs betreut und vorwiegend in die praktischen Tätigkeiten eingeführt hat. Anschließend übernahmen Frau Dr. Anja Peters, Frau Dr. Anne-Marie Pobloth, Frau Dr. Katharina Schmidt-Bleek und Frau Dr. Hanna Schell die Betreuung dieser Arbeit, wobei letztere den Löwenanteil zu tragen hatte – ein ganz besonders herzliches Dankeschön dafür! Natürlich auch ein dickes Danke an die Mitarbeiter und Mitarbeiterinnen im Labor sowie in der computergestützten Bildanalyse für die tatkräftige Unterstützung und immer schnelle und freundliche Hilfe und auch an viele weitere Beteiligte, die hier aus Platzgründen leider nicht alle namentlich genannt werden können.

Ein großer Dank geht auch an die beteiligten Mitarbeiter der veterinärmedizinischen Fakultät der Freien Universität Berlin, besonders an das Promotionsbüro und das Institut für Biometrie und Informationsverarbeitung.

Sehr dankbar bin ich meinen ehemaligen Kommilitoninnen und Mitdotorandinnen Frau Dr. Anja Peters, Frau Dr. Barbara Bach, Frau Dr. Antonia Ertelt, Frau Susanne Höhne und Frau Jeanette Neumann für die tolle Zusammenarbeit. Es hat mir immer sehr viel Spaß mit Euch gemacht!!!

Mein ganz persönlicher Dank geht an meinem Mann Peter für seine unsagbare Geduld, die zwischendurch doch sehr auf die Probe gestellt wurde, und seinen Rückhalt. Er hat es mir letztendlich überhaupt ermöglicht, diese Arbeit schreiben zu können.

Dabei haben mich auch meine zwei Mädels, Paulina und Isabel, sehr unterstützt, haben sie doch oft die Mama arbeiten lassen (müssen).

Ein großes Dankeschön geht weiterhin an meine Eltern und Geschwister, sowie die Schwiegermama. Danke dass ihr immer zu mir gehalten, immer an mich geglaubt und mich in schweren Zeiten motiviert habt. Vielen Dank Mutti für deine ausführlichen Rechtschreib- und Grammatik-Korrekturen!

Selbständigkeitserklärung

Ich, Svenja Dormann, versichere durch meine eigene Unterschrift, dass ich die vorstehende Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe angefertigt und alle Stellen, die wörtlich oder annähernd wörtlich aus Veröffentlichungen entnommen sind, als solche unter Angabe des Literaturzitats kenntlich gemacht habe. Die Versicherung bezieht sich auch auf in der Arbeit gelieferte Zeichnungen, Skizzen, bildliche Darstellungen und dergleichen.

Des weiteren versichere ich, dass diese Arbeit in gleicher oder ähnlicher Fassung noch keiner Prüfungsbehörde vorgelegen wurde, dass sie noch nicht veröffentlicht ist sowie dass ich mich noch nicht anderweitig um einen Doktorgrad beworben habe bzw. einen solchen bereits besitze.

Die vorgelegte Arbeit wurde mit Fördermitteln des AO Biotechnology Advisory Board, AO Foundation, Davos, Switzerland unterstützt.

Berlin, den 08.07.2017

Svenja Dormann



mbvberlin mensch und buch verlag

49,90 Euro | ISBN: 978-3-86387-851-1