

### 3 Material und Methoden

#### 3.1 Tiere



Abb. 1: Merino-Mix-Schafe

In die Untersuchung (Tierversuchsantragsnummer G0224/01, Landesamt für Arbeitsschutz, Gesundheitsschutz und technische Sicherheit Berlin) gingen insgesamt 64 weibliche Merino-Mix-Schafe in einem Alter von 2,5 bis 3,5 Jahren und einem mittleren Gewicht von 63 kg ( $\pm 8\text{kg}$ ) ein, die randomisiert in acht Gruppen zu je acht Tieren eingeteilt wurden (Abb. 1). Die Gruppen unterschieden sich in der Länge der Standzeit, die zwei, drei, sechs oder neun Wochen betrug und in der Art des verwendeten Fixateur externe (rigide oder weich). Insgesamt wurden 32 Tiere mit einem weichen und ebenso viele Tiere mit einem rigiden Fixateur externe versorgt.

#### 3.2 Ankaufsuntersuchung

Die Schafe wurden vor der Einstellung einer klinischen Allgemeinuntersuchung unterzogen, mit Ivomec (Ivermectin) entwurmt (0,3 mg/kg subkutan) und erhielten eine subkutane

Injektion von 2 ml Baypamun als Paraimmunitätsinducer. Sonographisch wurden die Tiere auf Trächtigkeit untersucht und bei unauffälligem Befund vorsorglich zwei Mal im Abstand von einer Woche mit 0,5 ml Pronilen (PG F2 $\alpha$ ) intramuskulär versorgt.

### **3.3 Unterbringung und Ernährung der Tiere**

Auf dem Campus Virchow-Klinikum der Charite stand in der Tierexperimentellen Einrichtung ein Raum für die Haltung von maximal acht Schafen zur Verfügung. Der Stall umfasste eine Fläche von 12 m<sup>2</sup> (pro Tier 1,5 m<sup>2</sup>), wurde mit Spänen und Stroh eingestreut, alle zwei Tage ausgemistet und per Wasserstrahl gereinigt. Die Durchschnittstemperatur betrug 20 °C bei einer Luftfeuchtigkeit von ca. 65 %. Fenster ermöglichten den Einfall von Tageslicht. Heu und Wasser (Selbsttränke) wurden ad libitum angeboten. Pelletiertes Kraftfutter wurde in kleinen Mengen per Hand zugefüttert.

### **3.4 Rigider und weicher Fixateur externe**

Die verwendeten externen Fixateure unterschieden sich lediglich in der Schersteifigkeit, die durch unterschiedliche Konstruktionen zustande kam (Abb. 2). Die verwendeten Einzelelemente (Schanz-Schrauben, Klemmbacken und Stahlrohre) waren dabei jedoch identisch. Beide Fixateure (Abb. 2) wurden medial monoplanar und monolateral an der Tibia montiert. Einheitlich bestanden beide Fixateure aus sechs bikortikal in die Tibia eingebrachten Schanz-Schrauben mit einem Durchmesser von fünf Millimeter, wobei die standardisierte Osteotomie zwischen Schraube 3 und Schraube 4 gesetzt wurde. Des Weiteren wurden zwei Stahlrohre verwendet, die mittels zwölf Klemmbacken in definiertem Abstand an den Schanz-Schrauben fixiert wurden. Der weiche Fixateur unterschied sich von dem rigiden Fixateur hinsichtlich des Abstandes der Klemmbacken zur Haut (10 mm beim weichen und 15 mm beim rigiden Fixateur) und hinsichtlich der Stahlrohre. Das dem Bein zugewandte Stahlrohr war beim weichen Fixateur in zwei Hälften zerteilt, die in der Mitte über ein bewegliches Gleitlager in Verbindung standen. Durch Einbringen des Gleitlagers konnte durch in vitro Testung eine um den Faktor 2 geringere Schersteifigkeit beim weichen Fixateur externe nachgewiesen werden. Der geringere Haut-Fixateur-Abstand beim weichen Fixateur ermöglichte, die axiale Steifigkeit wieder auf das Niveau des rigiden Fixateurs zu bringen, da sich beide Fixateur externe nur hinsichtlich der Scherung unterscheiden sollten.

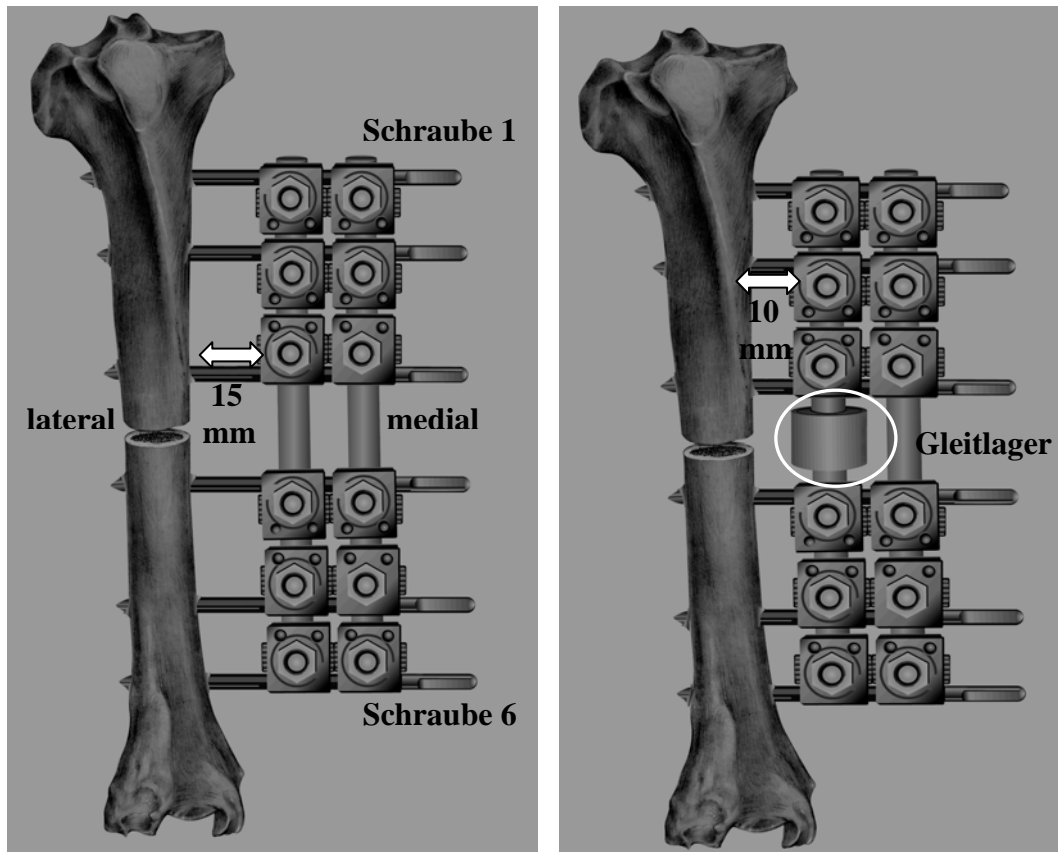


Abb. 2: Links Tibia mit rigidem Fixateur externe, rechts Tibia mit weichem Fixateur externe

### 3.5 OP-Vorbereitung

Zwölf Stunden prae operationem wurde den Schafen das Futter entzogen. Direkt vor der Operation wurde jedem Schaf via Braunüle aus der Vena cephalica antebrachii Blut zur allgemeinen Gesundheitskontrolle entnommen (1 Li-Heparin-Röhrchen und 1 Na-EDTA-Röhrchen).

### 3.6 Operation

#### 3.6.1 OP-Einleitung

Via Braunüle (Vena cephalica antebrachii) und Injektionsnarkose mit Trapanal (Durchstechflasche mit 0,5 g Thiopental-Natrium als Trockensubstanz) wurde das Schaf im Stall niedergelegt (je nach Wirkung wurden bis zu 1,5 g, gelöst in Aqua ad injectabile, verwendet). Das Schaf wurde intubiert (Trachealtubus Größe 8,5 oder 9) und an das Inhalationsgerät angeschlossen. Zur Narkoseeinleitung wurden Isofluran, Lachgas und Sauerstoff verwendet. Es folgte das Schieben der Schlund-Sonde zum Abgasen des Pansens,

das Freischeren der rechten Tibia und deren Enthaarung mittels Enthaarungscreme. Zum Anlegen des EKG-Kabels wurden an den Gliedmaßen über den Karpal-/ Tarsalgelenken kleine Flächen frei geschoren und mit den nötigen Aufklebern versehen. Die Klauen wurden mit sauberen Binden umwickelt, um eine Verschmutzung des Operationssaals zu vermeiden. Die Augen wurden prophylaktisch mit Panthenol-Augensalbe behandelt. Anschließend wurde das Schaf auf einem fahrbaren Tisch in den OP überführt und währenddessen mittels Atemalg beatmet.

### 3.6.2 OP-Ablauf

Im Operationssaal wurde das Schaf wieder an ein Inhalationsnarkosegerät angeschlossen, wobei jetzt ein expiratorischer und inspiratorischer Isoflurananteil von 1,5 % angestrebt wurde, das Verhältnis Lachgas zu Sauerstoff lag bei eins. Die expiratorische CO<sub>2</sub>-Konzentration sollte zwischen 30 und 40 mm HG liegen. Die Sauerstoffsättigung betrug 100 %, die Herzfrequenz lag zwischen 80 und 120 Schlägen pro Minute. Die Überwachung der Narkose erfolgte per Monitor (EKG, Kapnograph, Sauerstoffpartialdruckmessung, N<sub>2</sub>O, Isofluran) und durch Kontrolle der Reflexe am Auge sowie durch Auskultation durch den Anästhesisten. Über die Braunüle erhielt das Schaf insgesamt 2,2 g Augmentan gelöst in 100 ml Aqua ad injectabile (Wirkstoff: Amoxicillin und Clavulanat), 500 ml Vollelektrolytlösung und über einen Perfusor Fentanyl (Wirkstoff: Fentanyl Dihydrogen Citrat, 50 µg/ml; Laufgeschwindigkeit: durchschnittlich 7 ml/h). Die rechte Tibia wurde gereinigt und desinfiziert. Im Anschluss daran wurden das rechte Hinterbein mit Ausnahme der Tibia sowie das ganze Schaf mittels steriler Tücher abgedeckt. Um eine möglichst standardisierte Vorgehensweise zu gewährleisten, wurde beim Einbringen der Schrauben mit einer Bohrschablone gearbeitet, die durch den Assistenten manuell auf der medialen Seite der Tibia fixiert wurde (distal am Malleolus medialis und proximal an der Tuberositas tibiae). Die Bohrschablone (Metallplatte mit acht Löchern) wurde plan auf den Knochen gelegt. Per Stichinzision mittels Skalpell wurde die Haut an sechs Löchern der Schablone perforiert. Die Schablone wurde entfernt und die Hautschnitte dann bis zum Knochen vertieft. Erneut wurde die Schablone angelegt, gut vom Assistenten fixiert und das erste Loch bikortikal gebohrt. Zu Beginn wurde das Loch für die Schanz-Schraube 3 gebohrt. Verwendet wurde ein Bohrer der Stärke 3,5 mm, der zur sicheren Positionierung und zum Zwecke des Gewebeschutzes durch eine Bohrhülse angesetzt wurde. Um Hitzeentwicklung im Gewebe zu vermeiden, wurde während des Bohrvorganges mit steriler Kochsalzlösung gespült. Nach Durchbohren beider

Kortikales wurde der Durchmesser der Tibia mittels Tiefenmessgerät ausgemessen, eine passende Schanz-Schraube ausgewählt (Schraube mit 28 mm oder 32 mm Gewindelänge, beide mit einem Durchmesser von 5 mm) und unter Verwendung eines Gewebeschutzes mit dem Handbohrfutter eingebracht (Abb. 3). Nach gleichem Schema wurden nacheinander Schraube 4 sowie Schraube 1, 2, 5 und 6 eingebracht. Die Schrauben 3 und 4 wurden zur Stabilisierung der Schablonenlage immer als erstes eingebracht, gefolgt von den restlichen Schrauben. Nach Einbringen aller sechs Schrauben wurde der Gewebeschutz jeder Schraube entfernt und die Schablone abgehoben (Abb. 4). Anschließend wurden zwei Stahlrohre mit insgesamt 12 Klemmbacken aufgesetzt. Die Muttern der Klemmbacken wurden angezogen. Nun wurde die Sägeschablone positioniert, ein standardisierter Hautschnitt zwischen Schraube 3 und 4 angelegt, das Weichteilgewebe in diesem Gebiet stumpf von der Tibia abpräpariert und nach Entfernen der Schablone die Tibia durchsägt. Zwei Großzehenheber nach Hohmann wurden während des Sägens dicht um die Tibia gelegt, so dass von lateral, anterior und posterior keine unnötige Weichteilschädigung erfolgen konnte. Während des Sägens (oszillierende Säge mit einer Schnittdicke von 1 mm) wurde das Gewebe zum Schutz vor Überhitzung mit steriler isotoner Kochsalzlösung gespült. Nach Durchsägen der Tibia wurden die Muttern der Klemmbacken distal der Osteotomie gelöst, so dass der Frakturspalt distrahiert werden konnte. Zur Distraction wurde ein Hebel in den Frakturspalt eingebracht, der die Knochenenden auseinander schob und somit Platz zum Einbringen des Abstandhalters (drei Millimeter) schuf (Abb. 5). Die Muttern wurden nun wieder angezogen, so dass der Osteotomiespalt genau drei Millimeter breit war. Der Abstandhalter wurde dann aus dem Frakturspalt entfernt und die Stahlrohre mit den Klemmbacken nach Lockern der Muttern an den Schrauben bis zu einem definierten Abstand an die Haut gerückt (Abb. 6). Der definierte Abstand betrug beim rigiden Fixateur 15 Millimeter, beim weichen Fixateur zehn Millimeter (Abb. 7 und 8). Bei der Montage wurde dem weichen Fixateur externe zur Stabilisierung des Sägevorganges noch ein drittes Stahlrohr mit sechs Klemmbacken aufgesetzt, das jedoch nach dem Sägen und der Distraction wieder entfernt wurde. Der Hautschnitt im Bereich der Osteotomie wurde mit einem Hautfaden (Prolene 3/0) in Form von Einzelheften verschlossen. Anschließend wurde der Fixateur mit zwei sterilen Binden umwickelt und ein anteroposteriores Röntgenbild angefertigt (konventionell: 70 KV und 2,5 mA). Laterolaterale Aufnahmen waren aufgrund der medialen Lage des röntgendichten Fixateurs nicht aussagekräftig. Nach dem Ausleiten der Narkose wurde das Schaf mit Einsetzen der Spontanatmung zurück in den Stall gebracht, extubiert und etwa eine halbe Stunde bis zu ersten Aufstehversuchen bewacht.

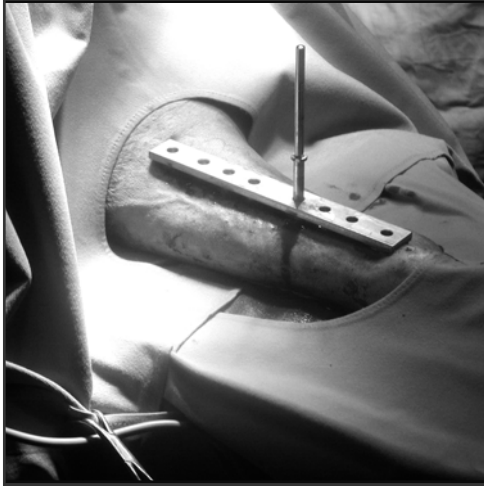


Abb. 3: Tibia (medial) mit aufgesetzter Bohrschablone und eingebrachter Schraube 4 mit Gewebeschutz.



Abb. 4: Tibia mit eingedrehten Schrauben.

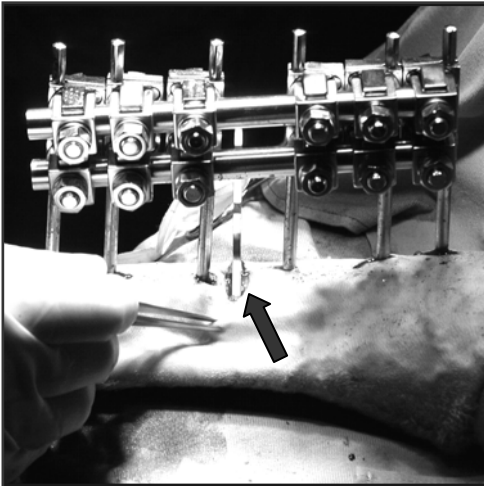


Abb. 5: Tibia-Osteotomie, eingebrachter Abstandhalter (Pfeil), Montage des rigiden Fixateur externe.

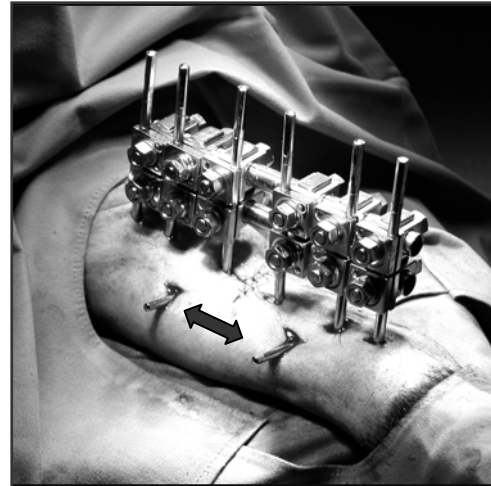


Abb. 6: Rigider Fixateur externe mit zwei zusätzlichen Schanzschrauben (Pfeil) senkrecht zum Fixateur für optische Messungen.

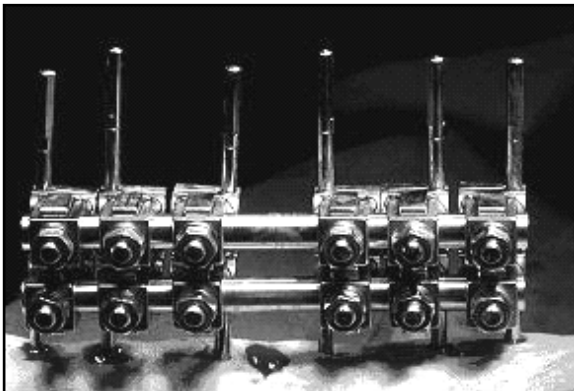


Abb. 7: Rigider Fixateur externe, fertig montiert.

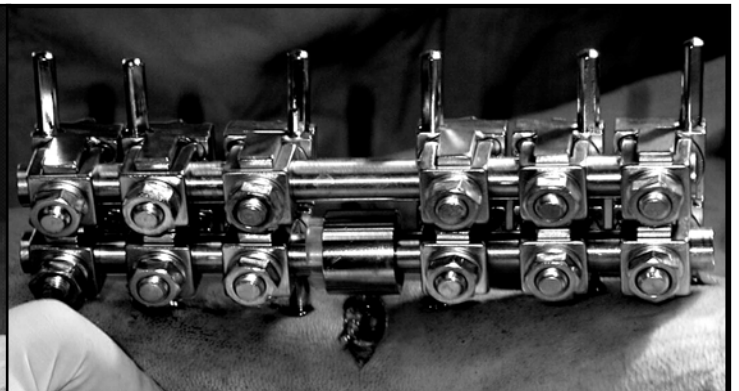


Abb. 8: Weicher Fixateur externe, fertig montiert.

### **3.7 Nachsorge**

Die Tiere erhielten bis zum siebten Tag post operationem täglich eine subkutane Finadyne-Injektion (Wirkstoff: Flunixin-Meglumin, 1,1 mg pro kg KGW). Täglich wurde eine Pinpflege durchgeführt, bei der die Schraubeneintrittsstellen der Haut mit Rivanol-Lösung umspült wurden, um Infekten vorzubeugen. Danach wurde ein neuer Schlauchverband angelegt. Im Rahmen dieser Wundkontrolle wurden die Tiere auch hinsichtlich ihres Allgemeinbefindens kontrolliert. Wöchentlich wurde zur Dokumentation und Kontrolle des Heilungsverlaufes eine posteroantere Röntgenaufnahme angefertigt sowie eine Blutprobe via Kanüle aus der Vena cephalica antebrachii zur Blutbildbestimmung entnommen (Na-EDTA-Röhrchen).

### **3.8 Tötung**

Nach der jeweiligen Standzeit von zwei, drei, sechs oder neun Wochen wurden die Schafe euthanasiert. Dazu wurde mittels Braunüle ein Zugang in die Vena cephalica antebrachii gelegt, 2,5 g Trapanal intravenös injiziert und anschließend bis zur auskultatorischen Diagnose des Herzstillstandes 100 ml Kaliumchlorid (7,5 %) injiziert.

Im Anschluss an die Tötung wurden die Unterschenkel der Hintergliedmaßen präpariert und exartikuliert. Vor Demontage des Fixateurs wurde eine konventionelle laterolaterale Röntgenaufnahme von der rechten Tibia angefertigt. Nach der Demontage des externen Fixateurs wurde die rechte Tibia in zwei Ebenen (l/l und a/p) konventionell geröntgt.

### **3.9 Biomechanische Testung**

Die biomechanische Testung der operierten und kontralateralen Tibia wurde bei allen Tieren mit einer Standzeit von sechs und neun Wochen durchgeführt. Für diesen Vorgang wurde die Muskulatur der zu testenden Tibia straff mit einer Mullbinde umwickelt, die mit physiologischer Kochsalzlösung befeuchtet wurde. Die Tibia wurde am proximalen und distalen Ende vom Weichteilgewebe befreit. Anschließend wurden beide Knochenenden in eine viereckige Form mittels Beracryl (Zwei-Komponenten-Kunststoff / Monomer-Polymer-System) eingebettet. So wurde eine standardisierte Einspannung der Tibia und deren Prüfung ermöglicht (Abb. 9). An beiden Unterschenkeln wurde ein Torsionstest bis zum Versagen des Knochens durchgeführt (Zwick UPM = Universalprüfmaschine 1455). Dabei wurden die

Torsionssteifigkeit [ $\text{Nm}^\circ$ ] und das Torsionsmoment [ $\text{Nm}$ ] bestimmt. Die Ergebnisse der operierten Tibiae wurden auf die Ergebnisse der linken intakten Tibiae bezogen und als prozentualer Anteil dargestellt. Im Anschluss an die biomechanische Testung wurden Röntgenaufnahmen angefertigt (laterolateral und anteroposterior), um die Region des Knochens zu bestimmen, in der es zur Fraktur kam (Abb. 10). Die Auswertung der Röntgenbilder fand nach dem Schema von White und Kollegen (1977) statt. Je nach Lokalisation der Fraktur wurden vier biomechanische Stadien der Frakturheilung unterschieden:

- I Refraktur im Bereich der alten Fraktur, geringe Steifigkeit
- II Refraktur im Bereich der alten Fraktur, hohe Steifigkeit
- III Fraktur teilweise im intakten Knochen und teilweise in der Fraktur, hohe Steifigkeit
- IV Fraktur im Bereich von intaktem Knochen, hohe Steifigkeit

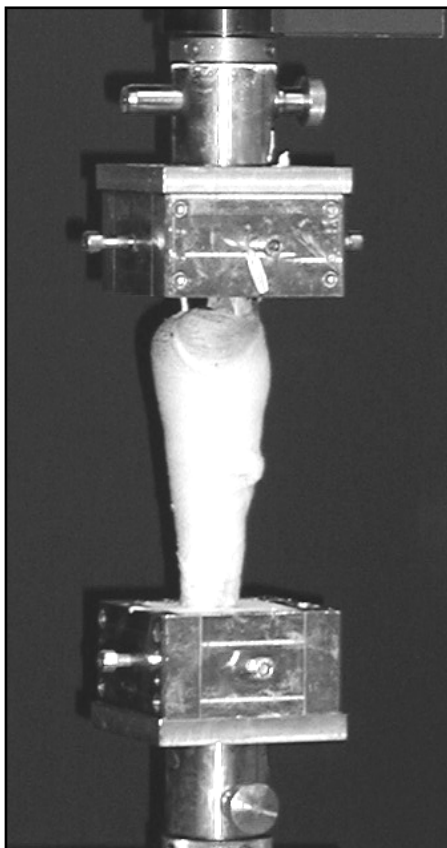


Abb. 9: In die Prüfmaschine eingespannte Tibia.

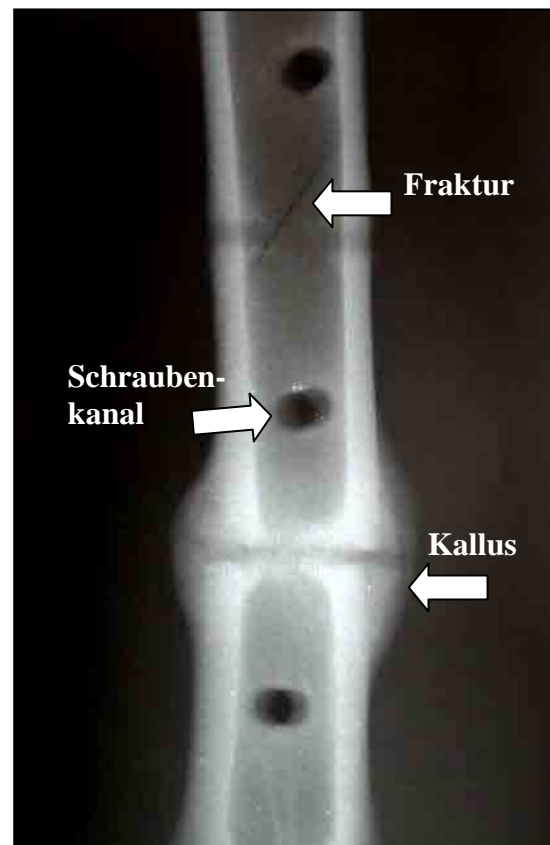


Abb. 10: Röntgenbild (l/l) nach der biomechanischen Testung.



### 3.10 Sägen der Tibia und Präparatfixierung

Mit der Bandsäge (Bandstärke ein Millimeter) wurde die Tibia transversal durch den Schraubenkanal 3 in zwei Teile zersägt. Der distale Teil wurde eingespannt und die Säge so eingestellt, dass sie mittig durch den Markraum lief und die Tibia in der Längsachse zerteilte. Es wurden insgesamt fünf mediolaterale Sägeschnitte angefertigt (Abb. 11). Die vier mittigen Präparate waren drei Millimeter stark. Der posteriore und anteriore Randabschnitt wurden verworfen. Die vier verbliebenen Präparatscheiben (durchnummeriert S1 bis S4) wurden mit einem Bleistift jeweils an der proximomedialen Seite markiert und zur genauen Identifizierung mit einem Zettel mit der jeweiligen Tiernummer und Schnittnummer (S1 bis S4) versehen (Abb. 12). Die Präparate wurden einzeln in Kompressen eingewickelt und für zwei Tage in eine Fixierlösung gegeben (Formaldehyd-Alkohol-Lösung bestehend aus 324 ml Formaldehyd 37 %ig, 540 ml Ethanol 100 %ig, 130 ml Barbitol-Natrium-Puffer 0,1 molar, pH 7,3 und 6 g Glukose). Zwei der vier Schnitte (S2 nahe der Knochenlängsachse und S4 fern der Knochenlängsachse) wurden nach gründlicher Wässerung mit Leitungswasser zur Entkalkung in eine Ethylendiamintetraessigsäure-Lösung (EDTA-Lösung) überführt und anschließend in Paraffin eingebettet. Die anderen zwei Schnitte (S1 nah der Knochenlängsachse und S3 fern der Knochenlängsachse) wurden zur Vorbereitung auf die Einbettung in polymerisiertem Methylmetacrylat mittels aufsteigender Alkoholreihe entwässert.

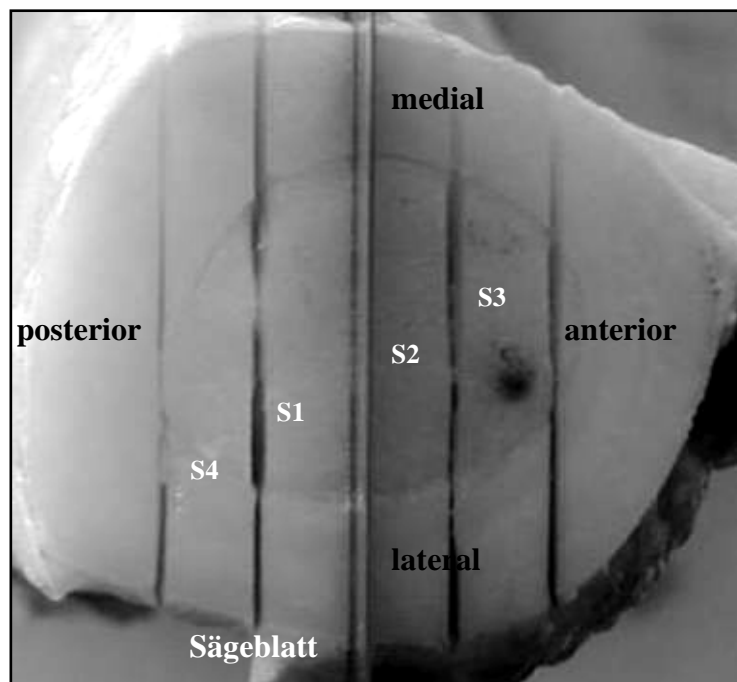


Abb. 11: Sägeschema der Tibia. Aufsicht auf die Transversalebene des Knochens. Fünf Sägeschnitte sind erkennbar. Die Präparate S1 bis S4 sind jeweils drei Millimeter stark.

### 3.11 Entwässerungsschema

70%iger Alkohol für 3 d  
 80%iger Alkohol für 7 d  
 80%iger Alkohol für 7 d  
 96%iger Alkohol für 7 d  
 96%iger Alkohol für 7 d  
 100%iger Alkohol für 7 d  
 100%iger Alkohol für 7 d  
 100%iger Alkohol für 7 d  
 Xylol für 4 h  
 Präinfiltrationslösung für 1 d  
 Infiltrationslösung bei 4 °C für 6 d

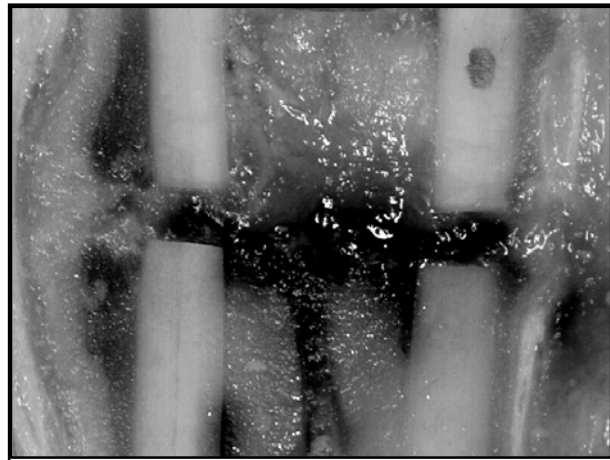


Abb. 12: Präparat nach dem Sägen, weicher Fixateur externe, drei Wochen post operationem; Bleistiftmarkierung proximomedial auf der Kortikalis.

Während der Entwässerung in Alkohol, der Entfettung in Xylol und der Infiltration in Präinfiltrationslösung (Technovit 9100 NEU) wurden die Gläser mit enthaltenen Präparaten auf einen Schüttler (HS 501 digital, IKA Labortechnik) gestellt. So wurde eine bestmögliche Durchtränkung der Präparate mit den Medien erreicht. Das verwendete Einbettmedium Technovit 9100 NEU ist laut Hersteller ein Polymerisationssystem auf der Basis von Methylmethacrylat und wurde speziell zur Einbettung von mineralisierten Geweben für die Lichtmikroskopie entwickelt. Die chemische Polymerisation erfolgt dabei unter Sauerstoffausschluss mit Hilfe eines Katalysatorsystems aus Peroxyd und Amin. Weitere Komponenten wie PMMA-Pulver und Regler ermöglichen eine gesteuerte Polymerisation bei Kälte. Nach Überführen der Präparate in die Infiltrationslösung (Technovit 9100 NEU) wurden die Gläser in den Kühlschrank (4°C) gestellt, um die Haltbarkeit der Lösung zu gewährleisten. Die entwässerten Präparate wurden anschließend in polymerisiertem Methylmetacrylat (PMMA; Technovit 9100 NEU) eingebettet. Dafür wurde jedes Präparat einzeln in ein rundes Kunststoffgefäß gelegt, mit dem Polymerisationsgemisch (Technovit 9100 NEU) übergossen, luftdicht verschlossen, beschriftet und in einen eisgefüllten Styroporbehälter gestellt (Polymerisation bei Kälte). Nach 24 h konnten die ausgehärteten Kunststoffblöcke aus den Gefäßen herausgelöst werden. An einer Tischschleifmaschine (Phoenix 3000) wurden die runden Blöcke so angeschliffen, dass sie für die weitere Bearbeitung am Mikrotom eine optimale Form und Größe zum Einspannen hatten.

### 3.12 Anfertigen der Schnitte am Mikrotom

Zur Herstellung von sechs Mikrometer dünnen Serienschnitten wurde der Kunststoffblock mit enthaltenem drei Millimeter starken Präparat in das Mikrotom (Leica SM 2500S) eingespannt (Abb. 13). Vorher wurden 15 Objektträger mit der jeweiligen Schafnummer, der Schnittnummer (S1 oder S3) und der fortlaufenden Nummer (1-15) mittels Gravur beschriftet. Die erstellten Präparate wurden mit einer Pinzette

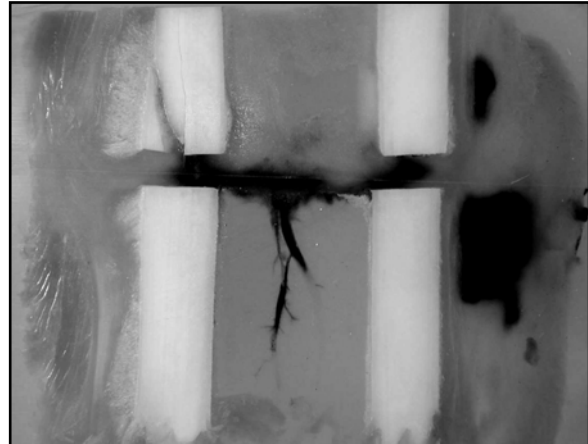


Abb. 13: Kunststoffblock mit enthaltenem Präparat

auf die Objektträger gelegt, mit 70 % igem Alkohol benetzt und anschließend mit einer Streckflüssigkeit (bestehend aus 30 Teilen 70 % igem Alkohol und 70 Teilen 2-Butoxyethylacetat) beträufelt. Dann wurden die Präparate zum Schutz möglichst luftblasenfrei mit einer Krisolfolie abgedeckt und mit einem Filterpapier zum Absaugen der Flüssigkeiten versehen. Alle Objektträger wurden in einer Presse im Brutschrank bei 60° C getrocknet. Die Presse sorgte durch Druck für die Haftung der Präparate an den Objektträgern.

### 3.13 Färben der Präparate

Von jeder Tibia wurde ein MMA-Präparat nach Safranin Orange / Lichtgrün und eines nach Safranin Orange / von Kossa gefärbt (Abb. 14 und 15).

#### *Safranin Orange / Lichtgrün zur Knorpeldarstellung*

- färbt Knorpel und Osteoidsäume intensiv rot
- färbt Zellkerne rot
- färbt Bindegewebe und mineralisierten Knochen grün

#### *Safranin Orange / von Kossa zur Darstellung von Mineralisation*

- färbt mineralisiertes Knorpel- und Knochengewebe schwarz
- färbt Mineralisationsfronten schwarz granuliert
- färbt Bindegewebe, hyalinen Knorpel und nicht mineralisierten Knochen intensiv rot

### 3.14 Färbemethoden

#### Safranin Orange / Lichtgrün

1. Schnitte in MEA (Methoxyethylacetat) entplasten (3 x 30 Minuten) und in
  - a) 100-96-80-60-40 % iger Alkohol (je zwei Minuten)
  - b) Aqua dest. bringen
2. Safranin Orange 10 Minuten
3. Spülen in Aqua dest. kurz
4. Pikrinsäure 20-25 Minuten
5. Spülen in Aqua dest. kurz
6. Spülen in 1 %iger Essigsäure kurz
7. Lichtgrün 10 Minuten
8. Spülen in 1 %iger Essigsäure kurz
9. Entwässern: 2 x 96 % Alkohol kurz  
2 x 100 % Alkohol kurz
10. Xylol 10 Minuten
11. Eindeckeln mit Vitroclud



Abb. 14: Safranin Orange / Lichtgrün Färbung, drei Wochen post operationem, weicher Fixateur externe.

**Safranin Orange / von Kossa**

1. Schnitte in MEA (Methoxyethylacetat) entplasten (3 x 30 Minuten) und in
  - a) 100-96-80-60-40 %igen Alkohol (je zwei Minuten)
  - b) Aqua dest. bringen
2. Färben in 3 %iger wässriger Silbernitratlösung 5 Minuten
3. Spülen in Aqua dest. 3 x kurz
4. Reduzieren in Natrium-Formaldehydlösung 2 Minuten
5. Wässern in Leitungswasser 10 Minuten
6. Natriumthiosulfat 5 % 5 Minuten
7. Wässern in Leitungswasser 10 Minuten
8. Spülen in Aqua dest. kurz
9. Färben in Safranin Orange 8 Minuten
10. Spülen in Aqua dest. kurz
11. Entwässern: 2 x 96 % Alkohol kurz  
2 x 100 % Alkohol kurz
12. Xylol 10 Minuten
13. Eindeckeln mit Vitroclud



Abb. 15: Safranin Orange / von Kossa Färbung, drei Wochen post operationem, weicher Fixateur externe.

### 3.15 Deskriptive Analyse der Präparate

Anhand des folgenden Scores wurden alle 64 Präparate (gefärbt nach Safranin Orange / Lichtgrün und Safranin Orange / von Kossa) ausgewertet. Die Punkte (1) bis (3) wurden quantitativ ausgewertet, die Punkte (4) und (5) lediglich beschreibend dargestellt. Die Score-Punkte wurden so vergeben, dass eine höhere Punktzahl gleichzusetzen ist mit einer weiter fortgeschrittenen knöchernen Heilung.

<b>(1) Kalluszusammensetzung</b>	<b>Score-Punkte</b>
Überwiegend Bindegewebe	0
Bindegewebe, Knorpel und Knochen	1
Überwiegend Knochen	2
 <b>(2) Knöcherne Überbrückung des Osteotomiespaltes</b>	
Keine Überbrückung	0
Diskontinuierliche Überbrückung periostal	1
Kontinuierliche Überbrückung periostal	2
Interkortikale Überbrückung mit Trabekelbildung quer zur Kortikalis	3
Interkortikale Überbrückung mit Trabekelbildung längs zur Kortikalis	4
 <b>(3) Dichte der spaltnahen Kortikalis</b>	
Kortikale Dichte unverändert	0
Kortikale Dichte moderat reduziert	1
Kortikale Dichte stark reduziert (fließender Übergang von Kortikalis und Kallus)	2
 <b>(4) Knorpelverteilung und Hämatomvorkommen</b>	
Die Lokalisation von Knorpel und Hämatom (endostal, interkortikal, periostal medial und / oder periostal lateral) auf Höhe des Osteotomiespaltes bzw. außerhalb dieses Bereiches wird beschreibend vorgenommen.	
 <b>(5) Fragmentbildung</b>	
Da eine Fragmentabsprengung während der Tibia-Osteotomie nicht immer verhindert werden konnte, werden zur Vollständigkeit der histologischen Angaben vorhandene Fragmente mit aufgeführt.	

### 3.16 Histomorphometrische Auswertung der Präparate

Durch die histomorphometrische Auswertung der Präparate (computergestützte Bildanalyse mit dem Programm KS Run 400, Zeiss) ist es möglich, die Anteile einzelner Gewebetypen am Gesamtpräparat quantitativ und qualitativ zu erfassen. Mit diesem Verfahren lassen sich Präparate aus verschiedenen Gruppen gut miteinander vergleichen. Zur Auswertung der histologischen Schnitte wurden pro Schaf zwei gefärbte Präparate (Safranin Orange / von Kossa und Safranin Orange / Lichtgrün) mit einer Digitalkamera fotografiert. Die Präparate wurden immer in derselben Ausrichtung fotografiert. Zusätzlich wurde für die spätere Kalibrierung ein Lineal an den lateralen Bildrand angelegt und mit abfotografiert.

Als erstes wurde der nach Safranin Orange / von Kossa gefärbte Schnitt ausgemessen. Zur Kalibrierung wurde auf dem Präparat ein 10 x 10 mm großes Quadrat ausgemessen. An dieser Kalibrierung orientierten sich später sämtliche Messungen. Als nächstes erfolgte die Definition der Region Of Interest (ROI) anhand mehrerer Distanzmessungen. Die ROI stellte den rechteckigen Ausschnitt des Präparates dar, der für diese Studie von größtem Interesse war und ausgewertet wurde, der Rest des Präparates blieb unberücksichtigt. Manuell wurde die individuelle maximale Gesamtkallusweite auf Höhe des Osteotomiespaltes bestimmt, wozu sowohl Bindegewebe und Knorpel als auch Knochen zählten. Diese Gerade entsprach der Breite der ROI. Von dieser Linie ausgehend, wurden durch den Computer nach oben und unten jeweils sechs Millimeter ausgemessen und so die ROI in Form eines zwölf Millimeter hohen Rechtecks erstellt (Abb. 16). Es folgte die manuelle Festlegung des Mittelpunktes im Markraum. Eine vom Computer erstellte Senkrechte durch diesen Punkt unterteilte die ROI in einen lateralen und medialen Bereich. Als nächstes wurde die laterale Kortikalis manuell in der Mitte geteilt, um die periostale und endostale Grenze festzulegen. Das Gleiche erfolgte auf der medialen Seite. Damit war die Einteilung der ROI in laterale, mediale, periostale und endostale Bezirke erfolgt, was für die spätere Präparatauswertung wichtig war (Abb. 17). Weitere manuelle Messungen erfolgten mit der Bestimmung der maximalen knöchernen Kallusbreite auf Höhe des Osteotomiespaltes und der zweifachen Bestimmung der maximalen Kortikalisweite (Außenkante lateral bis Außenkante medial). Der nächste Arbeitsschritt bestand darin, die Kortikalis manuell zu markieren (Abb. 18). Es folgte die Segmentierung von Knochen und Bindegewebe im Kallus (Abb. 19). Dabei wurden alle im Safranin Orange / von Kossa schwarz angefärbten Bereiche vom Computer als mineralisierter Knochen und alle rot angefärbten Bereiche als Bindegewebe erfasst. Diese Darstellungen konnten manuell korrigiert werden.

Danach wurde der nach Safranin Orange / Lichtgrün gefärbte Schnitt desselben Tieres ausgemessen. Als erstes wurde wieder der Messrahmen kalibriert (10 x 10 mm). Es folgte die Bestimmung der Gesamtkallusbreite auf Höhe des Osteotomiespalt und die Festlegung der ROI anhand gleicher Messungen wie beim ersten Schnitt. Als nächstes erfolgte die Segmentierung von Knorpelgewebe. Dabei wurden alle Bereiche innerhalb der ROI erfasst, in denen das Präparat rot angefärbt war. Auch hier konnte die Darstellung manuell korrigiert werden. Alle Messungen wurden von zwei unabhängigen, histologisch geschulten Untersuchern durchgeführt.

Folgende Parameter wurden ausgewertet:

- Der gesamte Kallusdurchmesser [mm], welcher auch Bindegewebe beinhaltete
- Der rein knöcherne Kallusdurchmesser [mm]
- Der relative knöcherne Kallusdurchmesser [%] bezogen auf den jeweils individuellen Durchmesser der Kortikalis
- Die Gesamtkallusfläche [mm<sup>2</sup>]
- Die Gesamtfläche mineralisierten Knochens im Kallus [mm<sup>2</sup>]
- Die Gesamtbindegewebsfläche im Kallus [mm<sup>2</sup>]
- Die Gesamtknorpelfläche im Kallus [mm<sup>2</sup>]
- Die prozentuale Kalluszusammensetzung bestehend aus Bindegewebe, Knorpel und mineralisiertem Knochen
- Die knöcherne Dichte [%] des Kallus, die Dichte der Kortikalis [%] und die relative knöcherne Dichte [%], d.h. die knöcherne Dichte des Kallus bezogen auf die individuelle Dichte der Kortikalis

### **3.17 Statistische Auswertung der Daten**

Die Daten beider Untersucher wurden gemittelt und für die statistische Auswertung in eine SPSS-Tabelle überführt. Grafisch wurden die Ergebnisse in Form von Boxplots präsentiert. Die statistische Analyse erfolgte durch einen nichtparametrischen Test, dem Mann-Whitney-U-Test.

Jeder Boxplot umfasst eine Box und zwei Whiskers. In diesem Rahmen sollten 100 % der Daten liegen, was jedoch nur ohne Ausreißer oder Extremwerte der Fall ist. Die Medianlinie liegt im Bereich der Box, von der Medianlinie bis zum oberen Whisker (höchster Wert) liegen 50 % der Werte, ebenso von der Medianlinie bis zum unteren Whisker (niedrigster Wert). Ein Boxplot lässt sich auch in Quartile einteilen (Q1 = 25%, Q2 = 50% = Median, Q3 = 75 %).



Zwischen Q1 und Q3 (im Körper des Boxplots) liegen 50 % aller Werte. Die maximal 1,5 - fache Boxbreite nach oben bzw. nach unten ergeben die Whisker. Ausreißer befinden sich zwischen 1,5 und drei Boxlängen vom Ende der Box entfernt und werden als Kreis dargestellt. Extremwerte sind mehr als drei Boxlängen vom Ende der Box entfernt und werden als Sternchen dargestellt. Die Zahlen an den Extremwerten und Ausreißern stellen die zugehörigen Tiernummern dar.

Das Signifikanzniveau ( $p$ ) ist bei 0,05 festgelegt. Da es aufgrund der vielen Vergleiche zwischen den Gruppen zu Verknüpfungen der Daten kommt, muss das Signifikanzniveau nach Bonferroni-Holm korrigiert werden. Zur Übersicht der histomorphometrischen Ergebnisse und zur eigenen Interpretation werden die asymptotischen Signifikanzen (Mann-Whitney-Test) jeder Boxplotdarstellung angefügt. Dabei stellt  $p_1$  die asymptotische Signifikanz zwischen den Zeitpunkten zwei und drei Wochen,  $p_2$  die Signifikanz zwischen den Zeitpunkten drei und sechs Wochen und  $p_3$  die Signifikanz zwischen den Zeitpunkten sechs und neun Wochen dar.

Im direkten Vergleich des rigiden und weichen Fixateur externe zu nur einem Zeitpunkt wird die Signifikanz mit  $p$  bezeichnet und neben der Grafik dargestellt.

Die Skalierung der Grafiken wurde zur einfacheren Vergleichbarkeit bei rigidem und weichem Fixateur externe einheitlich gewählt. Die im Text erwähnten Ergebnisse zu den einzelnen Parametern stellen immer den Median der jeweiligen Messung dar.

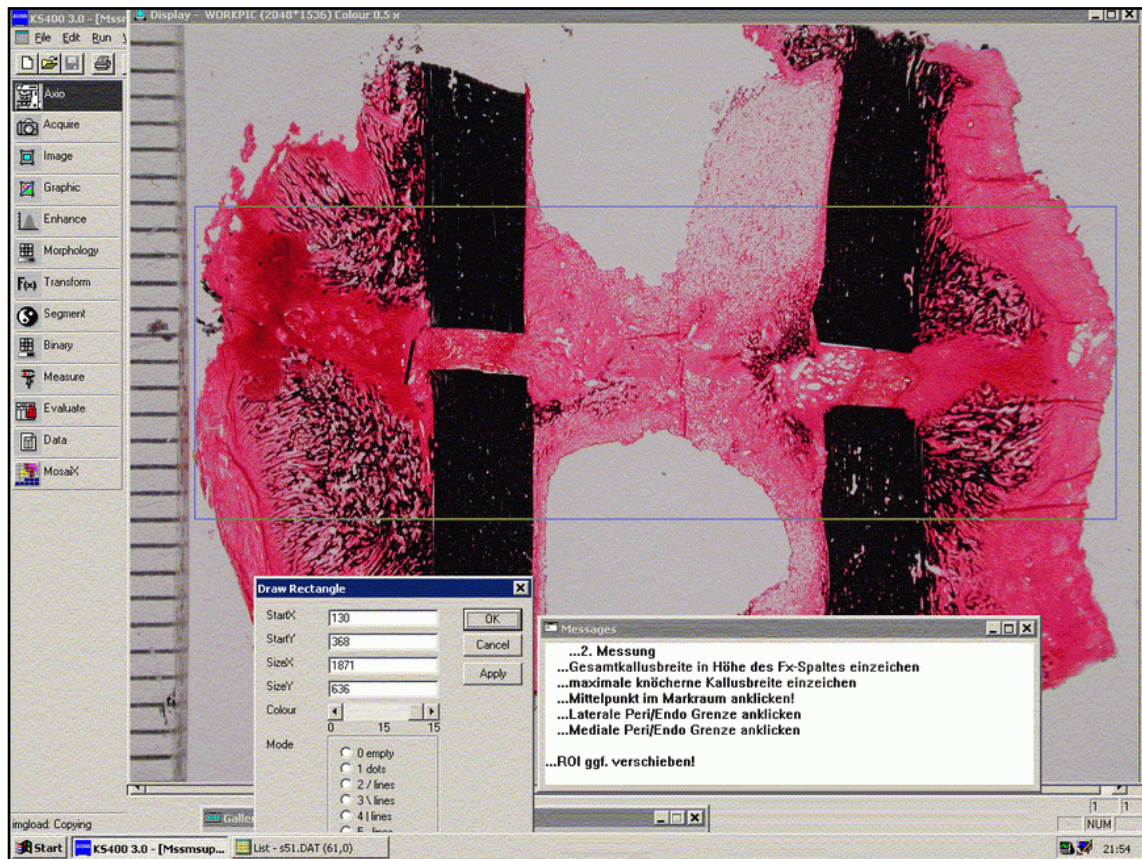


Abb. 16: Festlegung der rechteckigen ROI (Region Of Interest) nach Distanzmessungen.

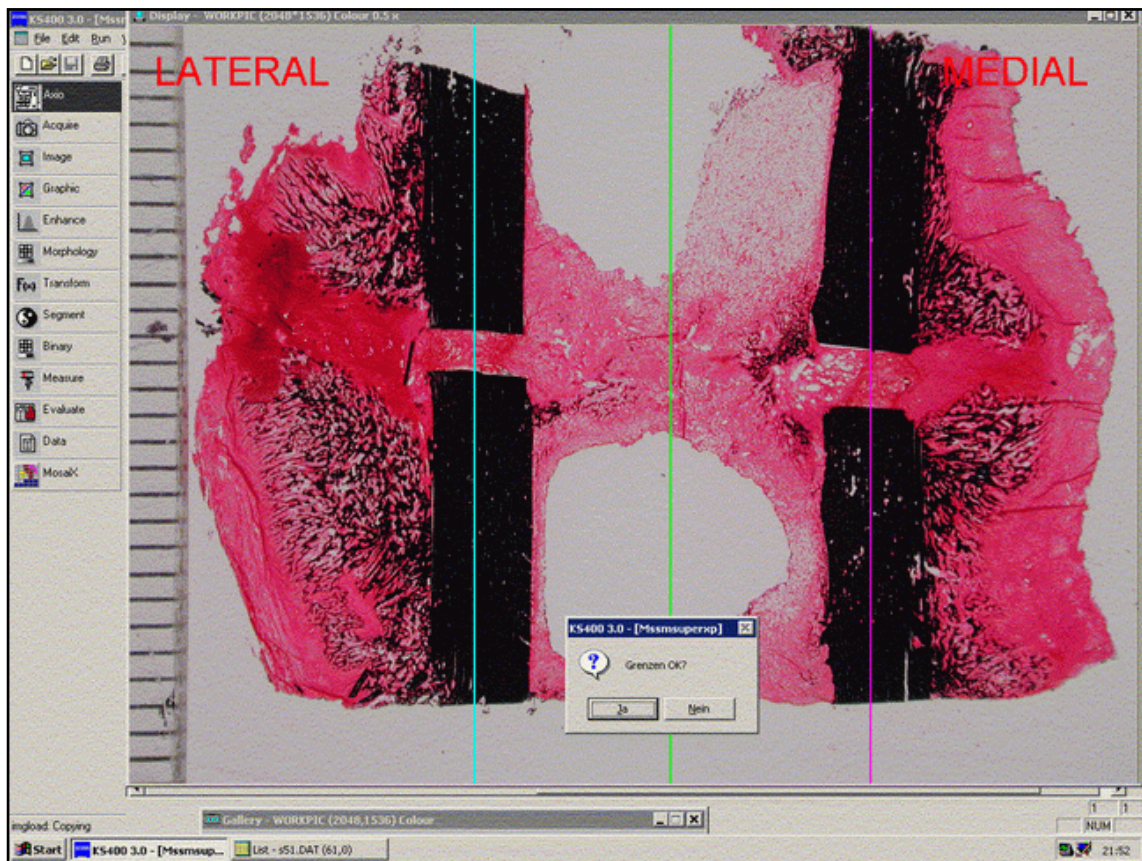


Abb. 17: Einteilung des Präparates in den lateralen, medialen, endostalen und periostalen Anteil durch Bestimmung des Mittelpunktes im Markraum und durch zwei Senkrechte, die die Kortikales längs halbieren.



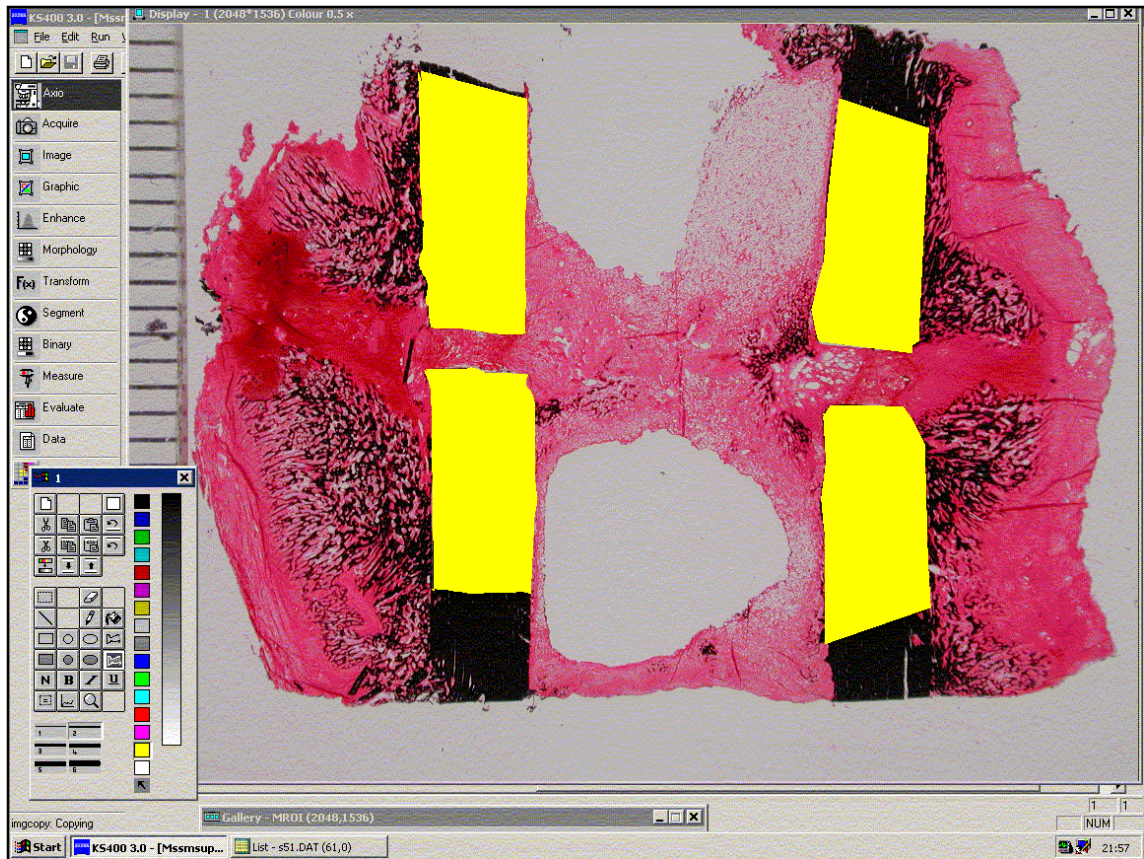


Abb. 18: Markierung der Kortikales in gelb.

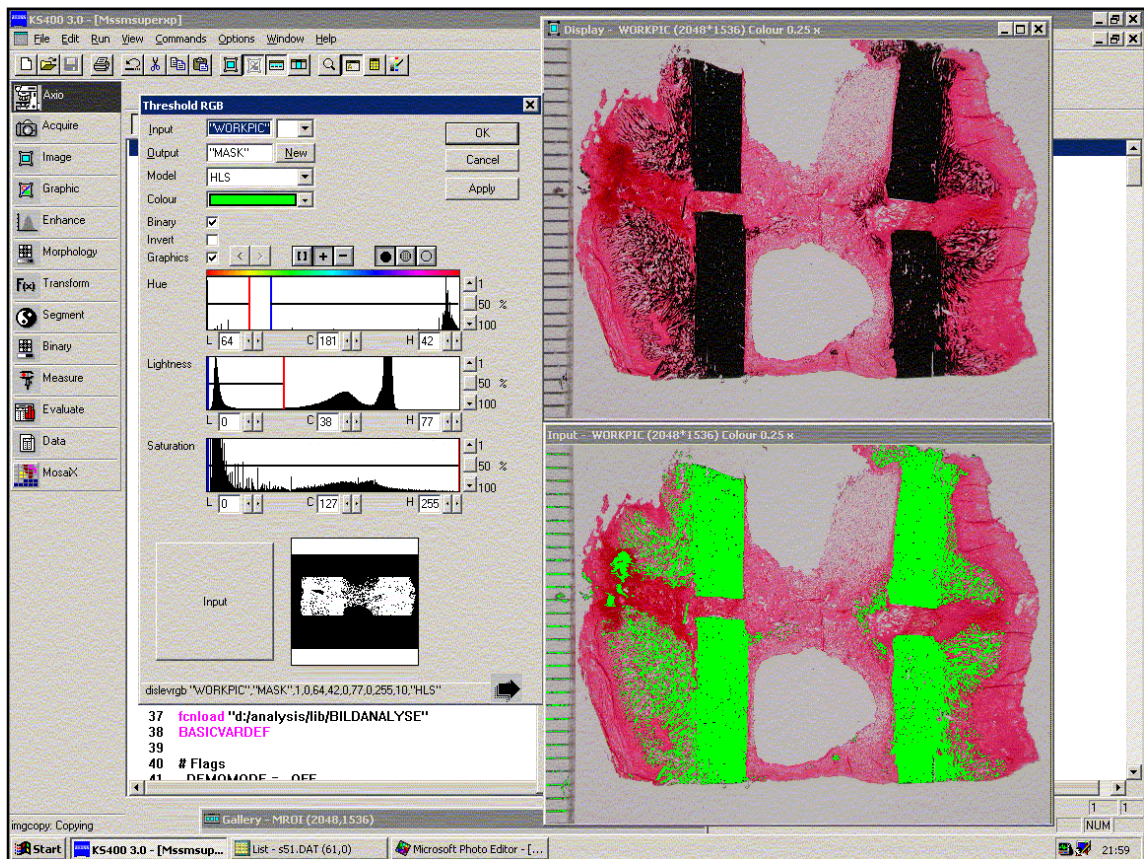


Abb. 19: Knochengsegmentierung; Originalbild oben dargestellt, unten das segmentierte Bild, in dem kalzifizierte Gewebeanteile grün gefärbt sind, spätere manuelle Korrektur war möglich.