

Aus dem  
Institut für Veterinär-Anatomie  
des Fachbereichs Veterinärmedizin  
der Freien Universität Berlin  
und dem  
Julius Wolff Institut und Centrum für Muskuloskeletale Chirurgie der Charité –  
Universitätsmedizin Berlin  
Campus Virchow Klinikum, Berlin

**Analyse der Entwicklung  
des weichen Kallus  
während einer verzögerten Frakturheilung  
im Schafmodell**

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

vorgelegt von  
**Hauke Weber**  
Tierarzt  
aus München

Berlin 2009  
Journal-Nr.: 3341

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin  
der Freien Universität Berlin

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Leo Brunnberg  
Erster Gutachter: Univ.-Prof. Dr. Karl Dietrich Weyrauch  
Zweiter Gutachter: Univ.-Prof. Dr. Georg Duda  
Dritter Gutachter: Univ.-Prof. Dr. Leo Brunnberg

*Deskriptoren (nach CAB-Thesaurus):*

fracture fixation; fractures; surgery; bone fractures; bones; healing;  
experimental surgery; tibia sheep

Tag der Promotion: 14.04.2010

Bibliografische Information der *Deutschen Nationalbibliothek*

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

ISBN: 978-3-86664-832-6

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

Dissertation, Freie Universität Berlin

**D 188**

Dieses Werk ist urheberrechtlich geschützt.

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

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

This document is protected by copyright law.

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

Alle Rechte vorbehalten | all rights reserved

© Mensch und Buch Verlag 2010

Choriner Str. 85 - 10119 Berlin

[verlag@menschundbuch.de](mailto:verlag@menschundbuch.de) – [www.menschundbuch.de](http://www.menschundbuch.de)

## **Meinen Eltern**



**Inhaltsverzeichnis**

**INHALTSVERZEICHNIS.....I**

**1 EINLEITUNG ..... 1**

**2 STAND DES WISSENS..... 3**

**2.1 Knochen..... 3**

    2.1.1 Osteoblasten ..... 3

    2.1.2 Osteozyten ..... 4

    2.1.3 Osteoklasten ..... 5

    2.1.4 Nicht zelluläre Knochenmatrix ..... 5

**2.2 Aufbau langer Röhrenknochen..... 6**

**2.3 Knochenformen ..... 7**

    2.3.1 Geflechtknochen..... 7

    2.3.2 Lamellenknochen ..... 8

    2.3.3 Blutversorgung ..... 9

**2.4 Knochenbruch ..... 10**

**2.5 Knochenheilung..... 11**

    2.5.1 Direkte Frakturheilung ..... 11

    2.5.2 Indirekte Frakturheilung..... 12

        2.5.2.1 Entzündungsphase ..... 13

        2.5.2.2 Phase des weichen Kallus ..... 14

        2.5.2.3 Phase des harten Kallus ..... 15

        2.5.2.4 Remodeling-Phase..... 15

**2.6 Biomechanik der Knochenbruchheilung ..... 16**

    2.6.1 Interfragmentäre Dehnung ..... 18

**2.7 Fixateur externe..... 19**

**2.8 Tiermodell..... 21**

**3 MATERIAL & METHODEN..... 22**

**3.1 Versuchstiere ..... 22**

**3.2 Ankaufuntersuchung ..... 22**

**3.3 Unterbringung und Ernährung der Tiere ..... 23**

**3.4 Fixateur externe..... 23**

**3.5 Operation ..... 24**

    3.5.1 Vorbereitung..... 24

    3.5.2 Operation medialer Fixateur externe ..... 25

<b>3.6 Postoperative Wundversorgung.....</b>	<b>28</b>
<b>3.7 Euthanasie.....</b>	<b>28</b>
<b>3.8 Sägen.....</b>	<b>29</b>
<b>3.9 Histologische Aufarbeitung .....</b>	<b>30</b>
3.9.1 Entkalkung, Entwässerung und Einbettung .....	30
3.9.2 Schneiden der Paraffinpräparate .....	31
3.9.3 ABC-Methode .....	31
3.9.4 Immunhistochemische Färbungen.....	32
3.9.5 Histologische Färbungen.....	37
3.9.5.1 Alcian Blau-Färbung.....	37
3.9.5.2 Movat Pentachrom-Färbung.....	38
3.10 Auswertung der Immunhistochemie und Histologie.....	40
3.10.1 Digitales Einlesen der Präparate .....	40
3.10.2 Definition der Region of Interest (ROI).....	40
3.10.3 Deskriptive Analyse der histologischen Präparate.....	41
3.10.4 Histomorphometrische Auswertung der Präparate .....	41
3.10.5 Gefäßzählung .....	44
3.10.6 Statistische Auswertung .....	44
<b>4 ERGEBNISSE .....</b>	<b>46</b>
<b>4.1 Allgemeines .....</b>	<b>46</b>
<b>4.2 Deskriptive Histologie Movat Pentachrom Färbung .....</b>	<b>46</b>
<b>4.3 Ergebnisse der histomorphometrischen Analyse .....</b>	<b>60</b>
<b>4.4 Ergebnisse der histologischen Analyse der Gefäßdichte im Kallus.....</b>	<b>62</b>
<b>4.5 Deskriptive Histologie CYR61-Färbung .....</b>	<b>64</b>
<b>5 DISKUSSION .....</b>	<b>67</b>
<b>5.1 Diskussion von Material und Methoden .....</b>	<b>68</b>
5.1.1 Tiermodell .....	68
5.1.2 Versuchsaufbau .....	70
5.1.3 Operation.....	71
5.1.4 Präparatentnahme und histologische Aufarbeitung.....	72
5.1.5 Gefäßzählung .....	73
5.1.6 Deskriptive Histologie.....	73
5.1.7 Histomorphometrie.....	74
<b>5.2 Diskussion der Ergebnisse .....</b>	<b>75</b>
5.2.1 Histologie und Histomorphometrie.....	75
<b>5.3 Vergleich mit anderen Studien.....</b>	<b>78</b>
<b>5.4 Schlussfolgerung.....</b>	<b>88</b>

<b>6 ZUSAMMENFASSUNG .....</b>	<b>90</b>
<b>7 SUMMARY.....</b>	<b>92</b>
<b>8 LITERATURVERZEICHNIS .....</b>	<b>94</b>
<b>DANKSAGUNG .....</b>	<b>105</b>
<b>SELBSTÄNDIGKEITSERKLÄRUNG .....</b>	<b>106</b>

## Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen

A.	Arteria
Abb.	Abbildung
Aqua dest	Aqua destillata
bzw.	beziehungsweise
ca.	zirka
cm	Zentimeter
CO <sub>2</sub>	Kohlendioxid
EKG	Elektokardiogramm
etc.	et cetera
et al.	et alii
Fa.	Firma
g	Gramm
i. m.	intramuskulär
i. v.	intravenös
kg	Kilogramm
kg KM	Kilogramm Körpermasse
kV	Kilovolt
m <sup>2</sup>	Quadratmeter
mAs	Milliamperesekunde
mg	Milligramm
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mm Hg	Millimeter Quecksilbersäule
MP	Movat Pentachrom
µm	Mikrometer
o. g.	oben genannte
OP	Operation
p	Signifikanzniveau
resp.	respektive
ROI	Region of Interest
RT	Raumtemperatur
s. c.	subcutan



Tab.	Tabelle
u. a.	unter anderem
z. B.	zum Beispiel
z. T.	zum Teil
Ø	Durchmesser
°C	Grad Celsius
%	Prozent
&	und



# 1 Einleitung

Innerhalb der vergangenen 50 Jahre wurden bedeutende Fortschritte in der Behandlung von Frakturen erzielt. Die heute erreichten Standards konnten durch eine stetige Verbesserung der Osteosynthese-Techniken, der Materialien und Implantate sowie durch Berücksichtigung der Biologie erreicht werden.

Heutzutage halten biologische Osteosynthesen, minimalinvasive Techniken sowie Navigation und robotergestütztes Operieren Einzug in den klinischen Alltag. Trotz aller Fortschritte treten dennoch Heilungsstörungen bei Frakturen auf. Diese Tatsache und der Wunsch des Patienten nach immer schnellerer Rehabilitation ohne Funktionsverlust machen auch weiterhin unfallchirurgische Forschung mit dem Ziel einer Verbesserung der Frakturheilung erforderlich (Haas, 2000).

Der Fixateur externe ist seit Jahren ein etabliertes Osteosyntheseverfahren und findet im Rahmen der Erstversorgung von Unterschenkelfrakturen bei Schwerverletzten Verwendung (Braun 1914, Ilizarov, 1992, Schmickal et al., 1999). Als wesentliche Argumente für den Einsatz des Fixateur externe gelten der Zeitfaktor, einfaches Handling sowie eine große Variabilität des Osteosynthesematerials. Frakturen mit ausgedehnten Weichteilverlusten und Deperiostierung besitzen aufgrund der zu erwartenden Durchblutungsstörung eine hohe Infektgefährdung. Um die Vitalität des Knochens nicht weiter zu beeinflussen, wie dies bei intramedullären Implantaten wie z.B. dem unaufgebohrten Tibianagel der Fall wäre, kann der Fixateur externe eine Stabilisierung in ausreichender Entfernung der geschädigten Region erzielen. Eine weitere Voraussetzung für eine komplikationslose Knochenheilung ist die Bildung neuer Blutgefäße (Lienau et al., 2005). Ist die Zirkulation des Blutes gestört, kommt es zu Nekrosen und einer Sauerstoffunterversorgung des angrenzenden Knochens. Wie aus der Literatur bekannt ist, gibt es zwei entscheidende Elemente, die die zeitliche und korrekte Wiederherstellung von Knochengewebe gewährleisten. Dies sind zum einen die Blutversorgung und zum anderen die Stabilität des Knochens. Es ist weithin bekannt, dass mechanische Instabilität in der Frakturheilungszone zu einer Hemmung der Blutversorgung sowie zu einer exzessiven Knorpelbildung führt.

Eigens für dieses Projekt wurde ein kritisch-scherweicher Fixateur externe konstruiert, der mechanische Bedingungen in einer Größenordnung erzeugt, die zu Heilungsstörungen führt. Im Vergleich zu einer ungestörten, komplikationslosen Frakturheilung, die mit einem rigiden Fixateur externe in einem Vorgängerprojekt erzielt wurde, sollen nun die entscheidenden Faktoren der verzögerten Frakturheilung aufgedeckt werden.

Im Rahmen dieses Projektes wurde eine standardisierte Osteotomie an der rechten Tibia des Schafes durchgeführt. Die Knochenheilung mit Fokussierung auf die Entwicklung des so genannten weichen Kallus wurde nach unterschiedlichen Standzeiten der Tiere histologisch, immunhistochemisch sowie histomorphometrisch untersucht. Als Versuchstier wurde das Schaf gewählt, da die ovine Tibia u.a. anatomische sowie biomechanische Ähnlichkeiten zur menschlichen Tibia aufweist (Finlay et al., 1995, Lanyon et al., 1975).

Folgende Hypothesen bezüglich der Heilung unter mechanisch-kritischer Fixation sollten untersucht werden:

- Der Osteotomiespalt soll nach 2-3 Wochen überwiegend mit Hämatom gefüllt sein.
- Ein voluminöser Kallus soll in der 6. Woche überwiegend bindegewebig, in der 9. Woche hingegen knorpelig ausgebildet sein.
- Die Vaskularisierung des Kallus über den Heilungsverlauf ist verändert im Vergleich zu einer ungestörten Frakturheilung (Lienau et al., 2005).
- Innerhalb der neunwöchigen Heilung soll es zu keiner knöchernen Überbrückung des Osteotomiespaltes kommen.

## 2 Stand des Wissens

### 2.1 Knochen

Alle Veränderungen der Skelettstruktur und der Knochenmasse sind das Resultat von hochspezialisierten Knochenzellen. Dazu gehören die Osteoblasten, die Osteoklasten und die Osteozyten (Amling und Delling, 1998). Weiterhin ist der Knochen aus nichtzellulärer Knochenmatrix aufgebaut, die sich zu 40 % aus organischen und zu 60 % aus anorganischen Bestandteilen zusammensetzt (Remedios, 1999, Webb und Tricker, 2000). Die äußere Form des Skeletts, die Knochenmasse, sowie die trabekuläre Mikroarchitektur werden durch die Regulation unterschiedlicher Leistungen aller Knochenzellen bestimmt (Amling und Delling, 1998). Die wesentlichen Aufgaben, die das Knochengewebe zu erfüllen hat, sind den Körper zu stützen und zu schützen, sowie den Calciumstoffwechsel zu regulieren. Der Knochen stellt ein dynamisches Gewebe dar, das sich zeitlebens an veränderte mechanische und physikalische Beanspruchungen anpassen muss. Im Folgenden werden die wichtigsten zellulären und nichtzellulären Knochenbestandteile bezüglich ihres Auftretens und ihrer Funktion zusammenfassend erläutert.

#### 2.1.1 Osteoblasten

Osteoblasten gehen aus stark teilungsfähigen, osteogenen Stammzellen hervor, die wiederum von multipotenten Mesenchymzellen abstammen (Owen, 1970, Ng et al., 1997, Remedios 1999, Webb und Tricker, 2000). Generell werden aktive von inaktiven Osteoblasten unterschieden. Inaktive Osteoblasten werden als „bone lining cells“ bezeichnet und liegen aneinandergereiht an der Knochenoberfläche. Sie zeichnen sich durch einen spindelartigen Zellkörper aus (Barnes et al., 1999, Noble und Reeve, 2000).

Einige dieser bone lining cells besitzen die Fähigkeit, sich zu aktiven Osteoblasten umzuwandeln (Noble und Reeve, 2000). Aktive Osteoblasten bilden täglich einen etwa 1 µm breiten, unverkalkten Osteoidsaum. Innerhalb von drei bis vier Tagen verkalken 70 % dieses Osteoids und der Rest mineralisiert innerhalb der nächsten sechs Wochen. Die Knochenbildung durch Osteoblasten kann am Periost, Endost, perivaskulär oder auch durch direkte Differenzierung von Knochenzellen aus Bindegewebe (desmale Ossifikation) erfolgen (Liebich, 1999). Osteoblasten besitzen die typischen Merkmale von Zellen mit reicher

Proteinbiosynthese. Sie sind dicht angefüllt mit rauem endoplasmatischem Retikulum (Beck, 2003) und stellen sich als große, plumpe, basophile Zellen mit einem meist exzentrischen Zellkern dar (Webb und Tricker, 2000).

Osteoblasten zeichnen sich durch einen polaren Aufbau aus. Zellfuß und Zellspitze unterscheiden sich in ihren biochemischen Leistungen. Der Zellfuß des Osteoblasten ist gegen die Knochenoberfläche gerichtet, so dass die Zelle seine Syntheseprodukte auf die Oberfläche des wachsenden Knochens sezerniert (Beck, 2003). Die Osteoblasten sind kettenförmig an der Knochenoberfläche aufgereiht (Beck, 2003) und über Zytoplasmafortsätze miteinander verbunden (Shapiro, 1988).

Neues Knochengewebe wird aufgebaut, indem Osteoblasten organische Knochenmatrix (Kollagen Typ I und nicht kollagene Proteine) sezernieren (unmineralisiertes Osteoid). Das Osteoid wird durch die osteoblastische Calziumaufnahme und Wiederabgabe verkalkt. Ermöglicht wird dies durch die Alkalische Phosphatase, die von Osteoblasten synthetisiert und sezerniert wird (Remedios, 1999). Durch die Osteoidsynthese mauern sich die Osteoblasten ein und differenzieren sich zu Osteozyten (Budras, 1996).

### **2.1.2 Osteozyten**

Osteozyten sind in die Grundsubstanz des Knochens eingemauerte Osteoblasten. Nur etwa 10 % der Osteoblasten mauern sich in das Osteoid ein und differenzieren sich anschließend zu Osteozyten (Oni, 1997, Remedios, 1999). Osteozyten besitzen einen großen, meist ovalen Kern und das Zytoplasma schließt nur wenige stoffwechselaktive Organellen ein (Liebich, 1999). Osteozyten liegen als abgeflachte Zellen isoliert in länglichen Lakunen des Knochens (Remedios, 1999). Ihre Zellfortsätze bilden ein dreidimensionales Netzwerk untereinander sowie mit den Osteoblasten der Knochenoberfläche, den Stromazellen des Knochenmarks und den Endothelzellen der Blutgefäße aus (Kaiser und Delling, 2002). Daher erscheinen die Osteozyten morphologisch als sternförmige Zellen (Nijweide und Mulder, 1986). Die Zellfortsätze dienen dem interzellulären Stofftransport von Ionen, niedermolekularen Substanzen sowie Nährstoffen und Abfallprodukten (Liebich, 1999). Sie sind in der Lage, sich zu verlängern und zu verkürzen und besitzen so vermutlich die Fähigkeit, als Ionenpumpe Stoffe aus der Flüssigkeit des extrazellulären Raumes in die Knochenmatrix zu befördern (Remedios, 1999).

### **2.1.3 Osteoklasten**

Die Aufgabe der Osteoklasten ist die Auflösung des Knochengewebes (Teitelbaum, 2000). Osteoklasten sind Riesenzellen, die durch Fusion von Vorläuferzellen aus dem Knochenmark entstehen. Diese wiederum leiten sich von derselben hämatopoetischen Stammzelle ab wie die Monozyten (Roodman, 1996).

Die Anzahl der Zellkerne pro Zelle schwankt je nach Autor erheblich (zwei bis zehn Zellkerne laut Amling und Delling (1998) bis zu 100 Zellkernen laut Liebich (1999)). Ihr Durchmesser beträgt zwischen 10 und 100  $\mu\text{m}$  (Bucher und Wartenberg, 1997). Osteoklasten sind damit mit Abstand die größten knochengewebstypischen Zellen. Sie stellen nur eine kleine Population dar, nur ca. 1 % der gesamten Knochenoberfläche ist von ihnen bedeckt (Amling und Delling, 1998, Miyamoto und Sudo, 2003). Es handelt sich bei den Osteoklasten um terminal differenzierte, nicht proliferierende Zellen (Amling und Delling, 1998), deren Lebenserwartung nur wenige Tage beträgt (Owen, 1970, Amling und Delling, 1998). Im aktiven Zustand wird die Oberfläche der Osteoklasten an der dem Knochen zugewandten Seite durch zahlreiche Falten in der Zellmembran, der so genannten „ruffled border membrane“, stark vergrößert (Beck, 2003). Die Osteoklasten liegen dabei in den so genannten Howship-Lakunen oder Resorptionslakunen auf der Knochenoberfläche (Remedios, 1999). Zur Auflösung der anorganischen Knochenanteile erzeugen die Osteoklasten ein saures Milieu von pH 4-5 zwischen den eingefalteten Zellmembranen und der Knochenoberfläche. Anschließend erfolgt die Lyse der organischen Knochenanteile durch lysosomale und nicht lysosomale Enzyme wie Kathepsin K und Metalloproteinasen (Beck, 2003). Nach erfolgter Knochenresorption lösen sich die Osteoklasten von der Knochenoberfläche und heften sich an anderer Stelle wieder an den Knochen an, um mit erneutem Knochenabbau zu beginnen (Liebich, 1999).

Obwohl Osteoblasten und Osteoklasten scheinbar Widersacher sind, ist ihre Funktion vielfältig miteinander verknüpft. Über das RANKL/RANK/Osteoprotegerin-System sind Osteoblasten an dem Heranreifen und der Aktivität der Osteoklasten maßgeblich beteiligt (Kornak, 2003). Ohne dieses regulatorische System kann die Differenzierung unreifer Osteoklasten nicht erfolgen (Beck, 2003).

### **2.1.4 Nicht zelluläre Knochenmatrix**

Die nicht zelluläre Knochenmatrix setzt sich aus einem organischen und einem anorganischen Anteil zusammen. Die Trockensubstanz eines ausdifferenzierten Knochens besteht zu etwa

einem Drittel aus organischen und zu zwei Dritteln aus anorganischen Bestandteilen (Budras, 1993). Kollagen Typ I bildet mit ca. 90 % den Hauptbestandteil der organischen Knochengrundsubstanz (Liebich, 1999, Wang, 2002). Es dient bei der Mineralisation des Knochens als Leitstruktur für die appositionelle Anlage der kristallinen Calciumphosphatverbindung (Hydroxylapatitbildung). Einen weiteren Bestandteil der organischen Matrix stellt die ungeformte Grundsubstanz dar, bestehend aus Glykosaminoglykanen und Proteoglykanen. Des Weiteren sind Phospholipide, Phosphoproteine sowie das Osteonektin, welches die Mineralien des Knochens mit den Kollagenen verbindet und das Osteopontin, das die Mineralien des Knochens mit den Zellen verbindet, zu finden (Romaowski et al., 1990). Die anorganische Grundsubstanz wird vornehmlich aus Kalziumphosphat, Kalziumkarbonat, Magnesiumphosphat und Kalziumfluorid gebildet. Die Mineralien, hauptsächlich Kalziumphosphatverbindungen, liegen als kristalline Raumgitter (Hydroxylapatit) den Kollagenfasern außen an, umgeben von proteoglykanreicher Grundsubstanz. Die Stabilität des Knochens wird von der Verbindung des Hydroxylapatits mit den Kollagenfasern bestimmt (Liebich, 1999). Nach Entmineralisierung behält der Knochen seine äußere Form. Er hat jedoch seine Druckfestigkeit eingebüßt und ist biegsam geworden. Dagegen ist der vom organischen Anteil befreite Knochenrest spröde und brüchig (Budras, 1993). Nach Rubinacci et al. (2002) besteht ein Ionengradient zwischen der extrazellulären Knochenflüssigkeit und dem extrazellulärem Raum. So kann die extrazelluläre Knochenmatrix auf veränderte Knochenbelastungen wie z.B. Scherbewegung reagieren.

## **2.2 Aufbau langer Röhrenknochen**

Lange Röhrenknochen besitzen einen charakteristischen Aufbau bestehend aus den Epiphysen an beiden Knochenenden und dem dazwischen liegenden Knochenschaft, der Diaphyse. Zwischen den epiphysären Enden der Diaphyse, wo sich der Knochen konisch verdickt, liegt die Metaphyse (Budras, 1993). Sie stellt während der Knochenentwicklung das Wachstumsreservoir für das Längenwachstum der Knochen dar (Bucher und Wartenberg, 1997). Zu den Hartteilen des Knochens gehören die Substantia compacta (Substantia corticalis) sowie die Substantia spongiosa. Diese zwei Knochenstrukturen bestehen bei ausgewachsenen Individuen aus Lamellenknochen (Ng et al., 1997). Die Substantia compacta dient als Ummantelung der Markhöhle und ist im Bereich der Diaphyse stark ausgeprägt. Die Substantia spongiosa liegt innen der Substantia compacta an. Sie lässt einen trabekulären



Aufbau erkennen, da die Spongiosabälkchen, -lamellen oder -tubuli in der Verlaufsrichtung von Druck- und Zuglinien angeordnet sind. Die Weichteile des Knochens werden von dem Periost (Beinhaut), dem Gelenkknorpel, den Gefäßen und dem Knochenmark gebildet. Das Periost besteht aus einem oberflächlichen Stratum fibrosum (äußere Faserschicht) sowie dem anliegenden zellreichen Stratum osteogenicum (innere Cambiumschicht). Das Periost umhüllt, mit Ausnahme der Gelenkknorpel und vieler Muskelansätze, den Knochen vollständig. Dieser Knochenmantel schließt sensible Nervenfasern und ein dichtes Netz von Blut- und Lymphgefäßen zur metabolischen Versorgung des Knochengewebes mit ein (Liebich, 1999). Dies ist der Grund für die hohe Schmerzempfindlichkeit des Periostes. Die sogenannten Sharpeyschen Fasern strahlen aus dem Stratum fibrosum in die Substantia compacta ein und dienen der festen Verankerung des Periostes sowie der einstrahlenden Sehnen und Bänder am Skelett (Bucher und Wartenberg, 1997, Webb und Tricker, 2000). Gleichzeitig kann aus den multipotenten Gewebsschichten des Cambium in kurzer Zeit neues Knochengewebe entstehen, z.B. beim Knochenwachstum, bei sämtlichen physiologischen Knochenumbauvorgängen und nach Knochenbrüchen (Liebich, 1999). In den Markhöhlen langer Röhrenknochen befindet sich das Knochenmark. Es ist im fötalen und juvenilen Organismus als rotes Knochenmark weit verbreitet und dient der Blutbildung. Mit zunehmendem Alter enthalten Röhrenknochen vermehrt gelbes Knochenmark, das sich bei Bedarf wieder in blutbildendes rotes Knochenmark zurückwandeln kann (Budras, 1993).

## **2.3 Knochenformen**

Es werden zwei Arten von Knochen unterschieden: Der Geflecht- bzw. Faserknochen und der Lamellenknochen.

### **2.3.1 Geflechtknochen**

Der Geflecht- oder Faserknochen stellt entwicklungsgeschichtlich die ältere und einfachere Knochenform dar (Liebich, 1999, Ng et al., 1997). Er kann im weitesten Sinne als ein verknöchertes Bindegewebe angesehen werden, das überall dort auftritt, wo über längere Zeit durch Druck und Zug mechanische Kräfte einwirken (Liebich, 1999). Geflechtknochen entsteht sowohl bei der embryonalen und postnatalen Knochenneubildung als auch bei allen Fällen einer Knochenbruchheilung zuerst. Bis auf einige wenige Knochen (das knöcherne Labyrinth des Ohres, der äußere Gehörgang, die Ansatzstellen größerer Sehnen am Knochen

sowie das Stirnbein und Zwischenscheitelbein des Schädeldaches) wird der Geflechtknochen bei der Entwicklung zum Adulten durch Lamellenknochen ersetzt (Liebich, 1999, Bucher und Wartenberg, 1997). Der Geflechtknochen ist zellreich, die Verteilung der Osteozyten in der knöchernen Matrix allerdings ist ohne erkennbare Ordnung (Liebich, 1999). Die geformte Grundsubstanz wird von einem unregelmäßigen Geflecht von Kollagenfaserbündeln durchzogen, was verglichen mit Lamellenknochen zu einer geringeren Stabilität führt (Ng et al., 1997, Ferretti et al., 1999, Noble und Reeve, 2000). Bei der desmalen Ossifikation (direkte Knochenbildung) differenzieren sich embryonale Bindegewebszellen (Mesenchymzellen) zu Osteoblasten, die primäre Knochenbälkchen aus Geflechtknochen bilden. Die Osteoblasten bilden Osteoid, das aus Kollagenfibrillen besteht. Durch die Osteoidsynthese mauern sich die Osteoblasten bei Umwandlung zu Osteozyten in die primären Knochenbälkchen aus Geflechtknochen ein. Das Osteoid wird anschließend durch Einlagerung von Kalziumionen und organischem Phosphat zu Knochenmatrix mineralisiert (Budras, 1993).

### **2.3.2 Lamellenknochen**

Der Geflechtknochen entwickelt sich in der Regel unter dem Einfluß der auf ihn einwirkenden Kräfte in Lamellenknochen. Nur in einigen Organen wie z.B. dem knöchernen Labyrinth des Ohrs, dem äußeren Gehörgang sowie den Ansatzstellen größerer Sehnen am Knochen bleibt der Geflechtknochen zeitlebens erhalten. Der Lamellenknochen ist durch eine typische, parallele oder konzentrisch geschichtete Anordnung der Kollagenfasern gekennzeichnet. Die strukturelle Grundlage des Lamellenknochens in der Substantia compacta ist das Osteon, das nach seinem Entdecker auch als „Havers'sches System“ bezeichnet wird (Liebich, 1999). Die Osteone, die überwiegenden Baueinheiten des Lamellenknochens befinden sich zwischen der äußeren Generallamelle an der Oberfläche der Substantia compacta und der inneren Generallamelle an der Grenze zur Markhöhle (Budras, 1993). Das Osteon ist ein konzentrisches Gebilde, das aus einem gefäß- und nerventragenden Zentralkanal (Durchmesser 20 – 100 µm) und fünf bis 20 ringförmig darum angeordneten Knochenlamellen, den so genannten Speziallamellen, besteht (Beck, 2003, Liebich, 1999). Die Osteone sind bis zu 2 cm lang und werden durch mineralisierte Knochenmatrix gebildet, die sich konzentrisch um den Zentralkanal ablagert (Ng et al., 1997, Webb und Tricker, 2000). Zwischen den Lamellen liegen die eingemauerten Osteozyten, die untereinander mit langen Zellausläufern in Kontakt treten (Beck, 2003). Durch diese Knochenkanälchen

(Canaliculi ossei) wird ein Stoffaustausch aus dem Havers-Gefäß zu jeder Stelle der Knochenmatrix ermöglicht (Liebich, 1999).

Die Osteone wiederum sind mit quer verlaufenden Gefäßen, den so genannten Volkmanschen Kanälen miteinander verbunden und besitzen so Zugang zum äußeren Periost und inneren Endost. Durch dieses kommunizierende Netz von Gefäßen wird der Knochen zu einem stark vaskularisierten Gewebe.

Jede Änderung der statisch-mechanischen Belastung des Knochens führt zu einer funktionellen Anpassung der Knocheninnenstruktur (Liebich, 1999). Von funktioneller Bedeutung ist, dass die Kollagenfasern in ihrer Verlaufsrichtung von Speziallamelle zu Speziallamelle in rechts- und linksgerichteten, flach und steil verlaufenden Schraubenwindungen wechseln (gemäß dem Bauprinzip einer Sperrholzplatte mit unterschiedlich gerichteter Holzmaserung in aneinander geklebten Einzellagern) (Budras, 1993). Osteone ohne funktionelle Aufgaben werden z. T. abgebaut und ihre Reste werden dann als Schaltlamellen bezeichnet (Liebich, 1999).

Nach Eitel und Mitarbeiter (1981) unterscheidet man primäre von sekundären Osteonen. Primäre Osteone entstehen als Appositionsosteone durch konzentrische Anlagerung von Knochengrundsubstanz um ein zentrales Gefäß herum. Sie werden nur an präformierten Oberflächen gebildet. Primärosteone, die nur fötal und unmittelbar postnatal bei höher entwickelten Spezies, wie Mensch und Hund, vorhanden sind, werden in der Wachstumsphase durch Sekundärosteone ersetzt. Ein weiteres wichtiges Unterscheidungsmerkmal zwischen Primär- und Sekundärosteonen ist die Zementlinie. Der Knochenaufbau von Schafen und Ratten weist eine überwiegende Primärosteonenstruktur auf, erst ab einem Alter zwischen sieben und neun Jahren ist eine sekundäre Osteonenstruktur auch bei Schafen zu finden (Pearce et al., 2007).

### **2.3.3 Blutversorgung**

Die Blutversorgung des Knochens erfolgt über drei Gefäßsysteme. Die A. nutricia tritt meist im proximalen Drittel des Knochens in den Markraum ein und bildet die sich verzweigende Markraumarterie. Von der periostalen Seite erfolgt die Ernährung des Knochens über segmental abgehende periostale Arterien (Penning, 1990). Im metaphysären Bereich des Knochens liegt ein metaphysäres arterielles System vor, das beim Adulten allerdings von untergeordneter Bedeutung ist (Mac Nab et al., 1974).

Weiterhin kann man die Blutversorgung des Knochens in ein afferentes, ein efferentes und ein gemischtes Gefäßsystem einteilen.

Die inneren zwei Drittel der Kortikalis und die Markhöhle werden durch die afferenten, also zuführenden Gefäße versorgt. Das äußere Drittel der Kortikalis wird durch periostale Arteriolen versorgt. Den ableitenden Weg der Blutversorgung stellt das efferente System dar, während die Kapillaren die beiden Seiten miteinander verbinden (Shim, 1968). Die Haverschen Gefäße stellen das Bindeglied zwischen der afferenten und der efferenten Blutversorgung dar und übernehmen die Aufgabe des Kapillarsystems des Knochens. In diesem Kapillarsystem findet der Stoffaustausch zur Ernährung der im Knochen beheimateten Zellen statt (Remedios, 1999).

Jede Knochenreparation ist extrem stoffwechselaktiv und erfordert die Neubildung von Gefäßen. Diese Gefäße stammen aus der Markhöhle, dem Periost oder den angrenzenden Weichgeweben. Wenn eine dieser Gefäßquellen zerstört ist, können die anderen die Versorgung bis zu einem bestimmten Grad kompensieren. Sind allerdings alle Gefäßquellen zerstört, kann keine Heilung eintreten. Ersatzweise erfolgt die Revaskularisation des geschädigten Knochens aus der vitalen Grenzschicht über Haverschen Umbau. Erreicht dieser die Fraktur, kann die Heilung verspätet eingeleitet werden (Stürmer et al., 1996).

Um eine Frakturheilung zu erzielen wird ein gewisses Maß an mechanischer Stabilität und eine adäquate Blutversorgung benötigt (Lienau et al., 2005). Claes et al. (2002, 2003) bewiesen in ihren Studien, dass ein höheres Maß an axialer Bewegung und eine größere Osteotomiespaltweite eine größere Menge nicht vaskularisierten Faserknorpels und eine kleinere Anzahl an Blutgefäßen zur Folge hat, als kleinere Axialbewegungen und kleinere Osteotomiespaltweiten.

Hingegen der gängigen Meinung, dass atrophe Pseudarthrosen nicht vaskularisiert sind, kamen Reed et al. (2002) in einer klinischen Studie zu dem Schluss, dass sowohl bei hypertrophen Pseudarthrosen als auch bei atrophen Pseudarthrosen kein signifikanter Unterschied in der Anzahl der Gefäße zu finden ist.

## **2.4 Knochenbruch**

Ein Knochenbruch ist die Folge einer mechanischen Belastung, die im Knochen zu Spannungen führt, die die mechanische Festigkeit des Knochens übersteigen. Der Knochen kann dabei unter einer einmaligen Überlastung akut brechen, oder er kann unter zyklischer Belastung ermüden und brechen (Perren, 1992). Der Funktionsverlust infolge einer Fraktur beruht auf einer Diskontinuität der mechanischen Eigenschaften des Knochens mit pathologischer Beweglichkeit und Verlust der Stützfunktion (Perren und Cordey, 1977). Man

unterscheidet unterschiedliche Arten der Fraktur (spiralig, quer, schräg, gestaucht etc.), die von der auf den Knochen einwirkenden Kraft abhängen (Torsion, Scherung, Biegung, Spannung, Kompression) (Autefage, 2000). Im Rahmen dieser Arbeit wurde anstelle einer Fraktur eine standardisierte Distraktionsosteotomie unter Schonung des Weichteilgewebes an der rechten Tibia vorgenommen.

## **2.5 Knochenheilung**

Die Frakturheilung ist die biologische Stabilisierung des durch Überlastung geschädigten Knochens, der seine Stützfunktion nicht mehr erfüllen kann (Perren und Cordey, 1977). Dabei stellt die Frakturheilung einen sehr komplexen Vorgang dar, der anfänglich über Gewebsschädigung, Chemotaxis, Proliferation und Differenzierung verläuft und letztlich dazu führt, dass das neu gebildete Gewebe in eine biomechanisch kompetente Struktur umgewandelt wird (Klaushofer und Peterlik, 1994). Im Gegensatz zu anderen Geweben (z.B. Binde- oder Muskelgewebe) verläuft die Frakturheilung ohne Narbenbildung, man spricht deshalb von Regeneration (Braun und Ruter, 1996, Brighton, 1984, McKibbin, 1978, Remedios, 1999). Ziel der Regeneration ist es, die ursprüngliche Knochenstruktur und -funktion im Laufe der Heilung wiederherzustellen (Brighton, 1984, Einhorn und Lee, 2001, McKibbin, 1978, Remedios, 1999). Abhängig von der Methode der Knochenbruchbehandlung und damit in enger Korrelation zur Stabilität und Blutversorgung des Knochens lassen sich zwei Formen der Frakturheilung beobachten:

Die direkte Frakturheilung ohne Kallusbildung und die indirekte Frakturheilung mit Kallusbildung (Müller M.E. et al., 1992).

### **2.5.1 Direkte Frakturheilung**

Die Bezeichnung primäre Frakturheilung geht sehr wahrscheinlich auf Lane (1914) zurück, der postuliert hat, in Ermangelung eines röntgenologisch sichtbaren Kallus von einer Frakturheilung per primam intentionem zu sprechen (Willenegger, 1971). Die direkte Frakturheilung wird auch als primäre Frakturheilung bezeichnet (Perren, 1979, Stürmer, 1996, Chao und Inoue, 2003). Sie kann nur unter der Voraussetzung erfolgen, dass die Bruchflächen exakt reponiert und stabil fixiert sind, so dass keine Bewegung der Fraktarenden gegeneinander möglich ist (Schenk und Willenegger, 1977, McKibbin, 1978, Schebitz et al., 1993). Man unterscheidet abhängig von der absoluten Frakturspaltweite (kleiner oder größer ca. 0,2 mm) Kontaktheilung von der Spaltheilung (Lungershauser und Schulz, 2000). Bei der

Kontaktheilung verhindert der direkte Flächenkontakt der Kortikalis ein Eindringen von Blutgefäßen und Gewebselementen in den Frakturspalt (Willenegger, 1971). Entsprechend einer Verzäpfung erfolgt die Vereinigung der Frakturrenden durch direktes Vordringen Haverscher Systeme von einem Fragment in das andere. Im Einzelnen geschieht dies durch Vordringen von kegelförmig angeordneten Osteoklasten, die einen Kanal in das benachbarte Fragment bohren, die so genannten „cutter-heads“. Auf die Osteoklasten folgen unmittelbar kapilläre Gefäßschlingen und Begleitzellen, aus denen sich dann Osteoblasten formieren. Diese Osteoblasten reihen sich anschließend entlang der Wandung des Resorptionskanals auf und übernehmen das konzentrische Auffüllen des Kanals mit Knochenmatrix (Braun und Rüter, 1996). Es kommt zu einer osteogenen Verzäpfung mit einer Geschwindigkeit von 50 bis 80  $\mu\text{m}$  pro Tag (Palmer et al., 1992). Die Spaltheilung ist bei einer Spaltbreite von ca. 0,2 mm zu beobachten (Schenk und Perren, 1977) und ist überall dort zu finden, wo sich die kortikalen Fragmentflächen nicht direkt berühren (Willenegger, 1971). Der Spalt wird dabei zunächst mit in Spaltrichtung orientiertem Knochen aufgefüllt, der erst Wochen später durch längsaxial angeordnete Osteone ersetzt wird (Braun und Rüter, 1996). Laut Stürmer gibt es eine dritte Form der direkten Knochenheilung, die neben der Kontakt- und der Spaltheilung auftritt und als Brückenheilung bezeichnet wird. Sie ist dadurch definiert, dass der Frakturspalt an zahlreichen Stellen nur punktuell durch schmale Knochenbrücken direkt überbrückt wird, wobei Resorption und Kallusbildung fehlen.

### **2.5.2 Indirekte Frakturheilung**

Die indirekte Knochenheilung ist im Gegensatz zur direkten Form durch das Vorkommen eines Füll- oder Ersatzgewebes charakterisiert, das zu einer provisorischen Auffüllung des mehr als 0,5 mm großen Frakturspalt führt (Schenk und Willenegger, 1977, Schebitz et al., 1993). Später wird dieses Ersatzgewebe durch Knochengewebe ersetzt (Chao et al., 1989, Chao und Inoue, 2003). Die indirekte oder auch sekundäre Frakturheilung entspricht der natürlichen Form der Knochenheilung, da sie auch ohne spezifische Bruchbehandlung den nachfolgend dargestellten Ablauf nimmt (Braun und Rüter, 1996). Sie wird bei Frakturen mit geringer interfragmentärer Stabilität sowie bei der Behandlung langer Röhrenknochen mit flexiblen Osteosyntheseverfahren wie z.B. Fixateur externe, Marknagelung oder auch Cast-Verbänden beobachtet, welche mit einem relativ großen Frakturspalt und somit großen interfragmentären Bewegungen einhergehen (Goodship, 1992). Durch Mikrobewegungen zwischen den Frakturrenden wird eine vermehrte Kallusbildung induziert. Das Kallusgewebe dient zur Überbrückung und Fixation der Fragmente (DeLacure, 1994, Bonath und Wolf,

1998). Je nach Bildungsort unterscheidet man periostalen, endostalen sowie interfragmentären Kallus (Penning, 1990, Perren, 1992). Der periostale Kallus bildet sich zuerst von der Knochenbruchstelle entfernt, um dann in Richtung Fraktur hin an Umfang zuzunehmen. Der endostale Kallus ist im Bereich der Markhöhle zu finden und überbrückt dort die Knochenfragmente. Ausmaß und Stabilisierungswirkung sind aufgrund der intramedullären Lage deutlich geringer als beim periostalen Kallus. Zuletzt wird der interfragmentäre Kallus gebildet. Er stellt die kortikale Einheit wieder her (Perren, 1992). Die indirekte Frakturheilung lässt sich in vier fließend ineinander übergehende Phasen einteilen: Entzündungsphase, Phase des weichen Kallus, Phase des harten Kallus und Remodeling-Phase (Brighton, 1984, Cruess et al. 1975, Frost, 1989).

### **2.5.2.1 Entzündungsphase**

Bei einem Trauma, das eine Fraktur verursacht, wird die auftreffende Energie vom Gewebe absorbiert und führt zu einer Beschädigung des Knochens samt Knochenmark, Periost sowie des umgebenden Weichteilgewebes (McKibbin, 1978, Klaushofer und Peterlik, 1994). Die Entzündungsphase als erste Phase der indirekten Frakturheilung dauert nach Braun und Rüter (1996) ein bis drei, nach Simmons (1985) sogar fünf Tage. Unmittelbar nach Eintreten der Fraktur kommt es durch die Gefäßzerreißung im Knochen, Knochenmark und umgebenden Weichteilen zur Nekrose der Fraktarenden sowie zum Auftreten eines Frakturhämatoms (Braun und Rüter, 1996). Das Frakturhämatom fungiert als Quelle für hämatopoetische Zellen, Thrombozyten und Mediatoren (Webb und Tricker, 2000). Das nekrotische Material aus dem beschädigten Weichteilgewebe, Periost und Markraum löst eine starke Entzündungsreaktion hervor. Entzündungsmediatoren überschwemmen daraufhin die lokale Entzündungszone und locken Entzündungszellen an, so dass Enzymkaskaden proteolytischer Enzyme aktiviert werden. Dadurch werden eine Koagulation des Blutes und somit weitere Entzündungsreize hervorgerufen (Remedios, 1999). An den Fraktarenden kommt es zum Absterben von Osteozyten. Es werden lysosomale Enzyme freigesetzt, welche zur Zerstörung der organischen Matrix führen (Brighton, 1984, Remedios, 1999). Phagozyten sorgen für den Abbau nekrotischen Materials (Webb und Tricker 2000). Frühzeitig in der Entzündungsphase findet man Osteoklasten, die mit dem Resorptionsprozess beginnen und toten Knochen entfernen (Simmons und Kahn, 1974, Gothlin und Ericsson, 1976). Das Frakturhämatom wird durch Thrombozytenaggregation stabilisiert und durch deren Degranulation werden gleichzeitig Wachstumsfaktoren freigesetzt. Wachstumsfaktoren sorgen zusammen mit Cytokinen für den Anstieg gefäßbildender Faktoren (Webb und Tricker, 2000). Gleichzeitig

kommt es zur Proliferation vorwiegend polymorphkerniger Granulozyten, Makrophagen und Mastzellen sowie multipotente mesenchymale Stammzellen, die einerseits mit dem Abbau nekrotischen Materials beginnen und andererseits als Vorläufer der Osteoblasten anzusehen sind. Die Rolle der Mastzellen ist nicht gänzlich geklärt. Sie enthalten Heparin und nehmen offensichtlich Einfluss auf die lokale Vaskularisation und Zellwanderung (Braun und Rüter, 1996). Das Frakturhämatom wird durch Granulationsgewebe ersetzt. Es besteht aus Entzündungszellen, Fibroblasten, die Kollagen synthetisieren und eindringenden Kapillaren (Brighton, 1984). Die verstärkte Vaskularisation führt zu einer besseren Sauerstoffversorgung ortsansässiger Zellen und bringt zusätzlich eine große Menge neuer Zellen mit sich, die nicht nur aus dem strömenden Blut, sondern auch aus der Gefäßwand selbst hervorgehen (Braun und Rüter, 1996). Die restlichen Blutgerinnsel unterliegen der Resorption durch Makrophagen und Riesenzellen (Klaushofer und Peterlik, 1994). Bereits in diesem frühen Stadium finden sich Mineraldepots zwischen den Kollagenfibrillen in der Nähe der Fibroblasten (Brighton, 1984). Die Entzündungsphase endet mit der Bildung von Bindegewebe oder Knorpel (Brighton, 1984, Remedios, 1999).

### **2.5.2.2 Phase des weichen Kallus**

Die Kallusbildung ist der natürliche Weg der Stabilisierung von Knochenfragmenten (McKibbin, 1978). Sie ist die charakteristische Form der Frakturheilung bei konservativer Therapie wie der Gips- oder Brace-Fixation (Sarmiento, 1981) und auch heute die dominierende Heilungsform bei der operativen Therapie durch flexible Fixationsverfahren wie der Marknagelung oder dem Fixateur externe (Kenwright, 1986, Rahn, 1982). Die biomechanische Funktion der Kallusbildung besteht in der temporären mechanischen Überbrückung der Fragmente (Claes, Wolf und Augat, 2000). Mit dem Auftauchen von Bindegewebe oder Knorpel beginnt die Phase des weichen Kallus und endet, wenn die Knochenfragmente über Bindegewebe oder Knorpel miteinander verbunden sind (Brighton, 1984). Das Granulationsgewebe führt zur ersten Brückenbildung zwischen den Knochenfragmenten, dem so genannten weichen Kallus (Braun und Rüter, 1996). Die Differenzierung des Granulationsgewebes und somit der weitere Verlauf der Heilung hängen von den vorherrschenden Gegebenheiten im Frakturgebiet ab (Schebitz et al., 1993). Maßgeblich dafür verantwortlich ist die Blutversorgung und damit zusammenhängend die Sauerstoffspannung. So ist die Bildung von Granulationsgewebe in Form von Bindegewebe am Rand des Kallus zu beobachten, wo die Blutversorgung durch einsprossende Gefäße aus dem Periost sehr gut ist (Palmer et al. 1992). Eine limitierte Blutzufuhr und somit niedrige



Sauerstoffspannung begünstigt die Ausprägung stoffwechsellärmeren Faserknorpels, wie er zum Kalluszentrum hin gefunden wird (Palmer et al., 1992, Willenegger et al., 1971). Der weiche Kallus besitzt nicht die mechanischen Eigenschaften, um die Bewegung im Frakturspalt so weit zu verringern, wie sie für das Überleben der Osteoblasten nötig wäre. Deshalb muss die Stabilität erhöht werden. Gewährleistet wird dies, indem der weiche Kallus durch die Einlagerung von Kalksalzen sukzessive immer stärker mineralisiert wird (Braun et al., 1996, Brighton, 1984, Radasch, 1999), was eine Bildung von Knochen letztendlich erst ermöglicht.

### **2.5.2.3 Phase des harten Kallus**

Die zunehmende Mineralisierung der zwischen den Kollagenfasern gelegenen Grundsubstanz sowie des vorhandenen Knorpelgewebes führt zur Aushärtung des Kallus und dauert ca. drei bis vier Monate. (Braun und Rüter, 1996). Die eigentliche knöcherne Stabilisierung und Überbrückung der Fraktur leistet eine starke periostale und endostale Kallusmanschette (Stürmer, 1988). Durch Querschnittsvergrößerung und zunehmende Verknöcherung des jungen Kallus gewinnt der reifere Kallus stetig an Steifigkeit und führt damit zu einer Reduktion der interfragmentären Bewegung (Claes, Wolf und Augat, 2000). Im Zuge der enchondralen Ossifikation wird Osteoid an das Gerüst aus mineralisiertem Knorpel und Geflechtknochen abgelagert und anschließend sukzessive durch Geflechtknochen ersetzt (Bucher, 1997). Der Geflechtknochen ist relativ primitiv angeordnet und lässt strukturelle und belastungsabhängige Orientierungen vermissen. Die Architektur richtet sich nach der Lage der neu gebildeten Kapillaren von denen aus die primitiven Knochenanteile ernährt werden. Zu diesem Zeitpunkt hat die Frakturheilung ein Stadium erreicht, das aufgrund der Stärke und Härte einer vorsichtigen Belastung bereits standhält. (Klaushofer und Peterlik, 1994). Eine Fragmentüberbrückung ist zwar erreicht, allerdings unterscheidet sich der Frakturbereich noch strukturell vom ursprünglichen Knochen (Remedios, 1999).

### **2.5.2.4 Remodeling-Phase**

Das Skelettsystem unterliegt zeitlebens einem Umbauprozess (Remodeling), der durch ein komplexes Zusammenspiel von Osteoblasten und Osteoklasten gekennzeichnet ist. Die von den Osteoklasten resorbierte Menge mineralisierten Knochens wird durch die nachfolgende Bautätigkeit der Osteoblasten wieder hergestellt (Kornak, 2003). Durch das Remodeling werden jährlich etwa 10 % der gesamten Knochenmasse erneuert (Russel, 2001). Die Phase

des Remodelings dauert Monate bis Jahre und ist durch den An-, Ab- und Umbau von Knochen gekennzeichnet, mit dem Ziel, die ursprüngliche Knochenstruktur und die Kontinuität des Markraumes wiederherzustellen (Braun und Rüter, 1996, Brighton, 1984, Owen, 1970, Palmer et al., 1992). In den Umbauprozessen bilden Osteoklasten, Osteoblasten, Osteozyten, Interzellulärsubstanzen und vaskuläre Zellen eine als BMU („basic multicellular units“) bezeichnete Einheit (Frost, 1983, Klaushofer und Peterlik, 1994). BMU befinden sich unter dem Periost, entlang des Endostes in den Markräumen sowie in den Gefäßkanälen und enthalten alle an den Umbauvorgängen beteiligte Zelltypen bzw. deren undifferenzierte Vorläuferzellen. Die Umbauvorgänge laufen auf der Basis der BMU ab und erfüllen im Wesentlichen vier Funktionen: 1. Mineralisierter Knorpel wird durch Geflechtknochen und 2. Geflechtknochen durch regelmäßig angeordneten Lamellenknochen ersetzt, so dass die ursprüngliche Knochensubstanz und die volle Belastbarkeit wieder hergestellt werden (Greenbaum und Kanat, 1999). 3. Kallus, der die Frakturrenden der Kompakta verbindet, wird durch neue Osteone ersetzt. 4. Durch Resorption von Kallus wird die ursprüngliche Knochenmarkshöhle wiederhergestellt (Frost, 1989, Klaushofer und Peterlik, 1994). Die BMU sind zeitlich und örtlich organisiert und kommunizieren miteinander. Primär wird eine bestimmte Menge von den Osteoklasten resorbiert. Der entstandene Defekt wird im Anschluss von Osteoblasten mit neuem Knochen aufgefüllt (Klaushofer und Peterlik, 1994.) In geringem Ausmaß findet internes Remodeling lebenslang statt. Der Knochen hat so die Möglichkeit, sich zu erneuern und nekrotische Areale durch Umbau funktionell wieder herzustellen (McKibbin, 1978, Alliston und Derynck, 2002, Perren, 2002) und der Knochen hat die Möglichkeit, sich mechanischen Bedingungen anzupassen.

## **2.6 Biomechanik der Knochenbruchheilung**

Schon seit dem nach Wolff (1892) benannten Gesetz der Transformation der Knochen ist bekannt, dass sich die knöchernen Architektur mit wechselnder mechanischer Belastung ändert. So beeinflussen die mechanischen Rahmenbedingungen der Osteosynthese den Frakturheilungsprozess (Chao et al., 1989). Die Stabilität einer Osteosynthese wird im Wesentlichen durch die Steifigkeit des Osteosynthesematerials und durch die Qualität der Implantat-Knochenverbindung bestimmt (Claes, Wolf und Augat, 2000). Findet ein Fixateur externe bei der Wahl der Osteosyntheseart Verwendung, so hat die Größe der Schrauben, ihr Abstand zueinander und zur Fraktur sowie die Steifigkeit des Fixateurs selber großen Einfluss (Claes et al., 1979, Gerngroß und Claes, 1983). Den größten Einfluss auf die Steifigkeit hat

jedoch der Abstand des Fixateurs von der Achse des zu stabilisierenden Knochens (Gerngroß und Claes, 1983). Die Steifigkeit des Fixateurs wird durch eine Vergrößerung des Schraubendurchmessers erhöht. Selbiges gilt für die Anzahl der Schrauben als auch für eine Verringerung des Knochen-Stangen-Abstandes und des Schraubenabstandes untereinander zur Fraktur (Claes, 1990, Palmer et al., 1992). Laut Duda et al. (2000) kann die Fixationssteifigkeit in Axial-, Torsions-, Biege- und Schersteifigkeit unterteilt werden. Im Vergleich zu einem monolateralen Fixateur mit nur einer Stange erhöht eine zweite Stange die Biegefestigkeit um ca. 20 % (Palmer et al., 1992). Ein bilateraler Fixateur besitzt gegenüber einer unilateralen Fixation ca. 50 % mehr Steifigkeit. Damit ist der Fixateur externe das einzige Osteosynthesystem, bei dem intra- und postoperativ die Stabilität verändert werden kann (Claes, Wolf und Augat, 2000). Allgemein reduzieren steifere Fixateure interfragmentäre Bewegungen, wohingegen weichere Systeme größere interfragmentäre Bewegungen zulassen (Goodship, 1992). Laut Goodship und Kenwright (1985) fördert eine minimale Beweglichkeit die Heilung, eine zu starre Art der Fixation hingegen stört die Regeneration des Knochens, da die Phase der Entzündung verkürzt oder gar völlig unterbunden wird (Cornell und Lane, 1992). Nach Hulth (1989) ist die Entzündung im Heilungsverlauf eine bedeutende Phase, da in dieser Phase viele Zellen angelockt werden, die wichtige Wachstumsfaktoren für die Knochenheilung und Angiogenese produzieren. Die Ausbildung eines periostalen Kallus wird verhindert, wenn jegliche interfragmentäre Bewegung ausbleibt (Park et al., 1998). Laut Stürmer (1988) sind die während der Frakturheilung auftretenden interfragmentären Bewegungen der Reiz für die Kallusbildung. Tierexperimentelle Studien haben gezeigt, dass eine axiale Bewegung der Fragmente zwischen 0,2 mm und 1 mm als ideal gelten und dass diese Größe an Axialbewegung nicht nur förderlich, sondern auch essentiell für eine schnelle und komplikationslose Heilung ist (Claes et al., 1998, Wolf et al., 1998). Sehr große interfragmentäre Bewegungen können zwar viel Kallusvolumen produzieren, müssen jedoch nicht zu einem qualitativ guten und damit mechanisch belastbaren Kallus führen (Augat et al., 1996). Als heilungsfördernd gelten sowohl eine axiale Kompression (Kenwright und Goodship, 1989, Larsson et al., 2002) als auch eine axiale Distraction (Claes et al., 1998, Park et al., 1998, Wolf et al., 1998). Die Kompression allerdings ist der Distraction überlegen (Hente et al., 2004). Rigide Fixationen führen zu einer kleineren Menge an Kallus, weichere Fixationen hingegen zu einem größeren Kallus (Wu et al., 1984, Goodship und Kenwright, 1985, Claes et al., 1995). Je größer die Instabilität, desto größer ist der Kallusdurchmesser (Palmer et al., 1992). Die Steifigkeit des Knochens nimmt mit der 4. Potenz des Kallusdurchmessers zu (Perren, 1992). Der Einfluss

der Scherbewegung auf die Frakturheilung wird allgemein kontrovers diskutiert. Aus klinischer Sicht wird der axialen Bewegung eher eine positive und der Scherbewegung eher eine negative Wirkung zugeschrieben. Es gibt experimentelle Arbeiten, die der Ansicht sind, dass axiale Bewegung positiv (Claes et al., 1995, Kenwright et al., 1986) und Scherbewegungen ungünstig sind (Yamagishi und Yoshimura, 1955). Park und Mitarbeiter (1998) vertreten hingegen die Meinung, dass sich auch die Scherbewegung positiv auf die Frakturheilung auswirkt. Große interfragmentäre Bewegungen und Frakturspalten lassen häufig trotz erheblicher Kallusbildung eine Kallusüberbrückung nicht zu, was zur Bildung einer Pseudarthrose führt (Müller et al., 1968). Auch Scherbewegungen sind für eine Hemmung der Heilung sowie für die Ausbildung einer Pseudarthrose verantwortlich (Yamagishi und Yoshimura, 1955, Goodship und Kenwright, 1985, Kenwright und Goodship, 1989). Mit zunehmendem Frakturspalt kommt es zu einer signifikanten Verzögerung der Kallusheilung (Claes et al., 1997). Studien von Claes et al. (1993) zum Einfluss der Frakturspaltbreite auf die Frakturheilung zeigten, dass Frakturspalten von 1 mm sehr schnell überbrückten und größere interfragmentäre Bewegungen bis zu einer Größe von 31 % der Spaltbreite die Kallusbildung und die Biegefestigkeit verbesserten. Bereits bei einer Spaltbreite von 2 mm und flexibler Fixation war eine geringere Biegefestigkeit des Heilungsgebietes zu beobachten. Unter der Frakturversorgung mit einem Fixateur externe scheint eine Spaltbreite von 3 mm die Heilung zu verzögern (Claes et al., 1993). Nach allgemeiner klinischer Erfahrung besitzen Patienten, die früher eine volle Belastung der operierten Extremität erreichen, häufiger eine schnellere Knochenheilung (Sarmiento et al., 1981). Eine frühe Dynamisierung wird zwar generell empfohlen, aber eine zu frühe Vollbelastung kann ebenfalls zu einer Heilungsverzögerung führen (Augat et al., 1996). Das optimale Fenster der biomechanischen Bedingungen ist bis heute noch nicht allgemeingültig definiert (Aro et al., 1990, Goodship et al., 1993).

### **2.6.1 Interfragmentäre Dehnung**

Die Bewegungen der Frakturrenden gegeneinander und die damit zusammenhängende Dehnung des interfragmentären Gewebes scheint der entscheidende Triggermechanismus für die Heilung zu sein (Stürmer, 1996). Perren und Cordey (1977) beschrieben die Frakturbeweglichkeit bezüglich ihrer mechanischen Dehnungswirkung auf das interfragmentäre Gewebe. Die Dehnung ergibt sich aus dem Quotienten der Frakturspaltbreite (L) und der interfragmentären Bewegung (=Dislokation) ( $\delta L$ ):  $\varepsilon = L/\delta L$ . Unterschiedliche

Gewebe tolerieren unterschiedlich große interfragmentäre Dehnungen (Chao et al., 1989). Interfragmentäre Bewegungen führen zu einer Verformung des Gewebes zwischen den Fragmenten und im Kallus. Die in diesem Gewebe eingebetteten Zellen erfahren diese Gewebeerformung durch Gewebedehnung und hydrostatischen (allseitig gleichen) Druck (Claes et al., 1998, Claes et al., 1999). Wenn die Gewebedehnung größer als die Dehnungsfähigkeit des momentan vorliegenden Kallusgewebes ist, kommt es zur Kalluszerreißung und die Heilung bleibt aus (Perren und Cordey, 1980). Bleibt die Gewebedehnung durch eine stabile Fixation der Fraktur unter diesem kritischen Wert, kann es durch zelluläre Aktivität zur Proliferation oder zur weiteren Differenzierung des Kallusgewebes kommen (Claes, Wolf und Augat, 2000). Claes und Mitarbeiter (1998) sowie Kaspar und Mitarbeiter (2000) führten Untersuchungen an Zellkulturen durch, mit dem Resultat, dass es sowohl für die Dehnung als auch für den hydrostatischen Druck Amplitudenbereiche gibt, die für die knochenbildenden Osteoblasten günstig erscheinen. So scheinen Dehnungsamplituden bis zu 5 % und hydrostatische Drücke bis 0,15 MPa die Proliferation der Osteoblasten positiv zu beeinflussen (Claes, Wolf und Augat, 2000). Moderate Dehnungswerte induzieren die Kallusbildung,  $\epsilon$ -Werte um 2 % werden von kortikalem Knochen, Werte von bis zu 10 % von spongiossem Knochen toleriert. Wenn der  $\epsilon$ -Wert 10 % übersteigt, dominiert die Resorption des der Dehnung ausgesetzten Knochengewebes (Perren, 2002). Ist die Dehnungsbelastung im Kallusgewebe sehr groß ( $\epsilon$ -Werte  $\geq 30$  %) wird die Ossifikation verzögert (Yamagishi und Yoshimura, 1955). Perren und Cordey (1977) haben postuliert, dass Knochengewebe sich nur unterhalb eines bestimmten Schwellenwertes der dynamischen Gewebsdehnung bilden kann. Es zeigte sich, dass der Bruchspalt zuerst durch Granulationsgewebe, später durch lockeres Bindegewebe und weiter über Knorpel mit zunehmend kapseligem Anteil zu Knochen bildete.

## **2.7 Fixateur externe**

Das Prinzip der äußeren Frakturstabilisierung ist nicht neu. Es wurde bereits vor 150 Jahren von Malgaigne erprobt (Brug und Winckler, 1991). Das Prinzip der externen Fixation ist die Verlegung der Frakturstabilisatoren außerhalb der Fraktur und ihrer umgebenden Weichteile ohne deren zusätzliche Schädigung (Brug und Winckler, 1991). Der Fixateur externe findet Verwendung bei geschlossenen und offenen Frakturen mit erheblichem Weichteilschaden, wobei die Weichteilschädigung im Vordergrund steht. Des Weiteren wird der Fixateur externe bei Korrekturbehandlungen und Behandlungen von Pseudarthrosen und bei der

Einstellung von Gelenken zur Arthrodeese eingesetzt (Jukema und Hierholzer, 1997). Laut Schmickal (1999) gilt der Wert der externen Fixation großer Röhrenknochen im Rahmen der Erstversorgung von Schwerverletzten als unbestritten. Der Einsatzbereich des Fixateur externe erstreckt sich vor allem auf offene Tibiafrakturen (Ong et al., 2002), aber auch auf Frakturen des Os femoris, des Beckens und des Unterarmes (Wu et al., 1984). Von ausschlaggebender Bedeutung für die erfolgreiche Durchführung einer Fixation externe-Osteosynthese sind neben der Beherrschung der chirurgischen Technik und der Berücksichtigung der topographischen Anatomie der verletzten Gliedmaße auch die strenge Beachtung der Regeln der Asepsis (Hierholzer et al., 1982). Die Vorteile für den Einsatz eines Fixateur externe sind mannigfaltig. So wird mit dem Fixateur externe die Gefäßversorgung des Knochens optimal geschont, eine Grundvoraussetzung für eine schnelle Regeneration. Stürmer (1988) berichtet über eine Reanastomisierung der Ateria nutricia nach Querosteotomie der Schafstibia unter unilateraler Fixation mittels eines Fixateur externe. Als wesentliches Argument für den Behandlungsbeginn von Unterschenkelfrakturen mittels Fixateur externe gelten unverändert der kurze Zeitfaktor, einfaches Handling und große Variabilität des Osteosynthesematerials sowie die Möglichkeit der gering invasiven und komplikationsarmen, vorübergehenden Fixation mit der Option zur Dauerbehandlung. Bei Frakturen mit ausgedehnten Weichteilverletzungen und Deperiostierung besteht das Risiko einer hohen Infektgefährdung aufgrund der zu erwartenden Durchblutungsstörungen der betroffenen Knochenareale. Der Fixateur kann in einer derartigen Situation eine Stabilisierung der Fraktur in ausreichender Entfernung der geschädigten Region erzielen (Schmickal, 1999). Als weiterer Vorteil ist die Anpassung der Fixationsteifigkeit an den individuellen Heilungsverlauf und die sich ändernden Belastungsverhältnisse zu verzeichnen. Die Montageebene kann an die individuelle Patientensituation angepasst werden und das Implantat kann z.B. im Vergleich zur Plattenosteosynthese leicht entfernt werden. Zu den Nachteilen gehört vor allem der geringe Patientenkomfort bei der Versorgung mit einem Fixateur externe (Stürmer, 1984, Runkel, 1999), indem die Bewegungsfreiheit stark eingeschränkt ist, welches eine Einschränkung der Lebensqualität zur Folge hat (Schandelmaier et al., 1997, Runkel, 1999). Eine weitere unangenehme Folge stellen die so genannten Pinalkanal Infektionen dar. Eine Entzündung entlang der Pins kann schnell in den Knochen vordringen (Claes, 1990, Krischak et al., 2002). Deshalb benötigen die Pinaustrittsstellen eine tägliche, gründliche Pflege, um einer Infektion vorzubeugen (Mayr, 2002). Dank modernen Konstruktionen konnten sowohl die Ausbehandlungszeiten verkürzt als auch die Pininfektraten deutlich reduziert werden (Schmickal, 1999).

Nach Lewis et al. (2001) unterscheidet man generell lineare externe Fixateure von Ringfixateuren. In Abhängigkeit davon, ob die Schanzschrauben nur eine oder aber beide Hautseiten perforieren unterscheidet man monolaterale von bilateralen Systemen. Ebenso ist eine uni- bzw. biplanare Montage möglich, je nachdem, ob sich alle Bestandteile des Fixateurs auf einer bzw. zwei Seiten befinden (Lewis et al., 2001). Eine Sonderform mit vielen Konfigurationsmöglichkeiten stellt der Ringfixateur nach Ilizarow dar (Duda et al., 2000, Lewis et al., 2001). Laut Duda et al. (2000) finden zusätzlich zu den Schanz-Schrauben vermehrt Krischner-Drähte Verwendung.

## 2.8 Tiermodell

In dieser Studie wurde eine verzögerte Frakturheilung untersucht. Dazu sollte der Knochen post operationem zu verschiedenen Zeitpunkten histologisch/ immunhistochemisch analysiert werden. Aus diesem Grund war eine klinische Studie nicht möglich. Auf der Suche nach einem geeigneten Versuchstier fiel die Wahl aus diversen Gründen auf das Schaf. Die Schafstibia ist funktionell gut mit der Tibia des Menschen zu vergleichen, da sie als englumiger Röhrenknochen ebenfalls in der Tragachse des Beines steht. Form und Funktion der Tibia ähneln der des Menschen und das Regenerationsverhalten des Knochens beim Schaf ist dem des Menschen ähnlich (Stürmer und Schuchardt, 1980 a). Nach dem Wolffschen Gesetz (1870) kann man aus einer ähnlichen Form zweier Knochen auf eine ähnliche Belastungsfunktion schließen. Wie Lanyon und Turner durch *in vivo* Messungen herausfanden, sind die Zug- und Druckverhältnisse an der Schafstibia exakt bekannt (Lanyon et al., 1970, Lanyon et al., 1979, Turner et al., 1975). Im Jahre 1975 konnte Lanyon durch eine *in vivo* Messung an einer freiwilligen Versuchsperson den Beweis für die Vergleichbarkeit der Schafstibia mit der menschlichen Tibia herbeiführen. Das Schaf wurde auch von anderen Arbeitsgruppen hinsichtlich der Knochenheilung eingesetzt (Augat et al., 1996, Claes et al., 1998, Goodship et al., 1993, Klein et al., 2002, Schell et al., 2002, Stürmer, 1988). Ein weiterer Vorteil für den Einsatz von Schafen ist, dass sie vom ersten postoperativen Tag an vollständig alle Gliedmassen belasten (Stürmer, 1988). Vorteilshalber sei auch erwähnt, dass sich die Schafe völlig unbeeindruckt von den äußerlich angebrachten Fixationssystemen sowie Wundverschlüssen zeigen. Als einziger Nachteil ist lediglich die Größe der Tiere zu nennen, die aufgrund der Unterbringungsmöglichkeit zur Einschränkung der Gruppengröße führen kann (Nunamaker, 1998).

## 3 Material & Methoden

### 3.1 Versuchstiere



Abb. 1: Merino-Mix Schafe

Bei den Versuchstieren handelte es sich insgesamt um 32 weibliche Merino-Mix Schafe. Die Schafe wiesen ein mittleres Alter von 3 Jahren und ein mittleres Gewicht von 75,2 ( $\pm$  7) kg auf und wurden randomisiert in 4 Gruppen zu je acht Tieren eingeteilt (Abb. 1). Die Gruppen unterschieden sich in der Länge der Standzeit, die zwei, drei, sechs oder neun Wochen betrug. Insgesamt wurden alle 32 Tiere mit einem kritischen Fixateur externe versorgt. Haltung und Versorgung der am Versuch beteiligten Tiere erfolgte während der gesamten Versuchsdauer in der FEM (Forschungseinrichtung für Experimentelle Medizin) der Charité. Die Genehmigung des Tierversuchvorhabens erteilte das Landesamt für Arbeitsschutz, Gesundheitsschutz und technische Sicherheit, Berlin (Genehmigungsnummer: G 0172-04).

### 3.2 Ankaufuntersuchung

Nach der Anlieferung vom Schäfer (Schäferei Bildt, Gutshof Langerwisch, Langerwisch, Deutschland) wurden die Schafe einer klinischen Allgemeinuntersuchung unterzogen. Die



Tiere waren weiblich, nicht tragend und laut Zahnalterbestimmung ca. 3 Jahre alt. Sie wurden mit 2 ml Ivermectin s.c. (Ivomec, Biokema SA, Crissier, Schweiz) entwurmt, erhielten als Paraimmunitätsinducer 1 ml Baypamun® s.c. (Bayer AG, Leverkusen, Deutschland), sowie vorsorglich 0,5 ml Luprostiol® i.m. (Pronilen, Intervet Deutschland GmbH, Unterschleißheim, Deutschland), um eine evtl. frühe Trächtigkeit abzubrechen.

### 3.3 Unterbringung und Ernährung der Tiere

Den Tieren stand ein Raum für maximal acht Schafe zur Verfügung, in dem sie über den gesamten Versuchszeitraum artgerecht in einer variierenden Gruppenanzahl gehalten wurden. Der Stall umfasste eine Fläche von 12 m<sup>2</sup> (1,5 m<sup>2</sup> pro Tier). Die Schafe standen auf einer Einstreu aus Holzspänen und Stroh und der Stall wurde zwei Mal wöchentlich ausgemistet sowie mit einem Wasserstrahl gereinigt. Durch eine Klimaanlage erfolgte die Belüftung und Klimatisierung des Raumes. Hierdurch konnte eine Durchschnittstemperatur von 20 °C bei einer Luftfeuchtigkeit von ca. 65 % aufrechterhalten werden. Der Stall war mit Fenstern versehen und ermöglichte so den Tieren einen natürlichen Tag-Nacht-Rhythmus. Als Grundfutter wurde Heu morgens und abends ad libitum angeboten. Pelletiertes Kraftfutter wurde unoperierten Tieren zu Trainingszwecken und operierten Tieren während der Ganganalyse und postoperativen Pinpflege in kleinen Mengen per Hand zugefüttert. Wasser stand den Schafen jederzeit per Selbsttränke zur Verfügung.

### 3.4 Fixateur externe

Der Rotationsfixateur (Abb. 2) entsprach technisch einem monolateralen Fixateur mit einer Fixationsstange (Ø 20 mm). Er bestand des Weiteren aus einer oberen Klemme, zwei Klemmplatten, einem Untergehäuse, einem Gehäusedeckel sowie sechs Schanzschrauben (Ø 5 mm, Synthes, Bochum, Deutschland). Der Abstand zwischen den Schanzschrauben betrug 2,1 cm, 3,4 cm, 3 cm, 3,4 cm und 2,1 cm, die Distanz zwischen der Haut und der Fixationsstange 20 mm.

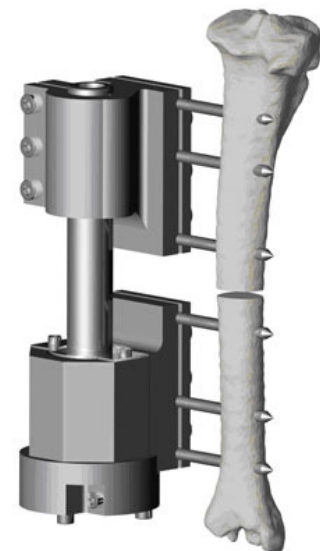


Abb. 2: Rotationsfixateur, montiert an einer ovinen Tibia (kaudolaterale Ansicht)

Die Pinkanäle wurden von proximal nach distal von eins bis sechs durchnummeriert. Die obere Klemme war fest an die Fixationsstange montiert und ermöglichte über das Klemmsystem die axiale Einstellung des Osteotomiespaltes. Das untere Gehäuse beinhaltete zwei übereinander liegende Kegelrolllager. Diese nahmen die axialen Kräfte auf und ermöglichten so eine leichtgängige Rotation. Der untere Gehäusedeckel beinhaltete den aus der Funktion gesetzten Anschlag für die Rotation und fungierte als Druckstück für die Anstellung der Lager.

Der Fixateur war so konzipiert, dass die axialen Bewegungen auf ein Minimum reduziert wurden. Die Rotation hingegeben war komplett freigegeben und wurde lediglich durch die Muskeldehnung und die Weichteilflexion in der Bewegung begrenzt.

### **3.5 Operation**

#### **3.5.1 Vorbereitung**

Die Versuchstiere blieben vor der Operation 12 Stunden nüchtern, Wasser wurde ad libitum angeboten. Im Stall wurde ein venöser Zugang in die Vena cephalica antebrachii gelegt und anschließend 10 mg Thiopental-Natrium (Trapanal® 2,5 g, Altana Pharma Deutschland GmbH, Konstanz, Deutschland) pro kg Körpergewicht als Injektionsnarkose verabreicht.

Das sedierte Schaf wurde mit Hilfe eines Laryngoskopes mit einem Tracheltubus der Größe 9 intubiert und an das Inhalationsnarkosegerät angeschlossen, wobei die Beatmung mit einem Isofluran-Lachgas-Sauerstoffgemisch erfolgte. Als Schutz vor Aspiration wurde der Cuff des Tubus hinter dem Kehlkopf geblockt und das obere Tubusende mit Klebeband um die Maulspalte befestigt. Die Tiere erhielten eine Schlundsonde, um das Abgasen des Pansens während der Operation zu ermöglichen. Auf beide Augen wurde Bepanthen Augensalbe (Jenapharm®, Deutschland) aufgetragen, um ein Austrocknen der Cornea zu vermeiden. Zur Aufzeichnung des EKG's während der Operation wurde an den Gliedmaßen eine kleine Fläche freigeschoren zur Befestigung der Klebeelektroden.

Die Schafe wurden auf dem Operationstisch in rechte Seitenlage verbracht und das linke Hinterbein mit Hilfe einer Mullbinde nach cranio-dorsal ausgebunden. Zur Vermeidung einer Verschmutzung des Operationssaales wurden die Klauen mit sauberen Binden umwickelt. Die rechte Hintergliedmaße wurde vom Tarsalgelenk bis zum Kniegelenk freigeschoren und die Haut über der Tibia großflächig mittels Enthaarungscreme enthaart. Anschließend wurde das Schaf auf einem fahrbaren Operationstisch in den Operationssaal überführt.

### 3.5.2 Operation medialer Fixateur externe

Das Schaf wurde im Operationssaal sofort wieder an ein Inhalationsnarkosegerät angeschlossen. Während der Narkose erfolgte die Überwachung der Vitalfunktionen, indem ein Kapnograph, das EKG sowie die Sauerstoffpartialdruckmessung an die Narkoseeinheit angeschlossen wurden. Die Tiere wurden mit einem Isofluran-Lachgas-Sauerstoff-Gemisch beatmet (1,5 Vol% Isofluran in 33 % Sauerstoff und 66 % Lachgas). Das Atemminutenvolumen wurde zu Beginn der Narkose mit 10 ml pro kg KM und die Atemfrequenz mit 10-12 Atemzügen pro Minute eingestellt und gegebenenfalls unter Kontrolle des respiratorischen CO<sub>2</sub>-Wertes korrigiert. Dieser sollte sich zwischen 37 und 39 mm Hg befinden. Die Herzfrequenz betrug zwischen 80 und 120 Schlägen pro Minute.

Als Antibiotikum erhielten die Tiere perioperativ 100 ml Amoxicillin/Clavulansäure (Augmentan®, 2,2 g, GlaxoSmithKline GmbH & Co Kg, München, Deutschland) als Schussinfusion i.v. sowie 500 ml einer plasmaisotonen Vollelektrolytlösung (Elektrolyt-Infusionslösung 153, Berlin Chemie AG, Deutschland) als Infusion. Zur Analgesie wurde ein Bolus von 0,25 mg Fentanyl-dihydrogencitrat (Fentanyl-Janssen®, 0,5 mg, Janssen-Cilag GmbH, Neuss, Deutschland) ca. 20 Minuten vor dem ersten schmerzhaften Eingriff i.v. verabreicht. Die rechte Tibia wurde mit Braunol getränkten, sterilen Tupfern desinfiziert. Anschließend wurde das gesamte Schaf mit sterilen Tüchern abgedeckt, lediglich die rechte Hintergliedmaße blieb vom Knie abwärts frei, wobei die Klaue mit sterilen Mullbinden eingewickelt wurde (Abb. 3A). Bevor die Osteotomie im diaphysären Bereich der rechten Tibia durchgeführt werden konnte, fixierte ein Assistent eine Schablone auf der medialen Seite der Tibia. Dazu wurde die Bohrschablone standardisiert distal am Malleolus medialis und proximal an der Tuberositas tibiae der Anatomie der Tibia angepasst. Die Haut wurde an sechs Stellen durch die Schablone hindurch per Stichinzision mit einem Skalpell eröffnet. Nach Entfernung der Schablone wurden die Hautschnitte bis auf das Periost vertieft. Die Schablone wurde erneut aufgelegt und durch diese wurde eine Bohrhülse durch die darunter liegende Hautinzision dem Periost der Tibia aufgesetzt (Abb. 3B). Die Bohrhülse fungierte zum einen als Richtungsweiser und zum anderen als Gewebeschutz. Um der Hitzeentwicklung während des Bohrens entgegen zu wirken, erfolgte während des Bohrvorgangs permanent eine Spülung mit steriler Kochsalzlösung. Die Tibia wurde bikortikal mittels eines druckluftbetriebenen Spiralbohrers der Stärke 3,5 mm durchbohrt. Anschließend wurden 6 Schanzschrauben in die zuvor gebohrten Löcher mit Hilfe eines Handbohrfutters bikortikal eingedreht (Abb. 3C). Der dabei verwendete Gewebeschutz wurde entfernt und die Schablone abgenommen.

Dann wurde der kritische Fixateur externe in einem Stück auf die Schanzschrauben aufgeschoben, die Muttern mit einem Imbusschlüssel festgezogen, nachdem mittels eines Abstandshalters der Fixateur standardisiert auf 20 mm Abstand zur Hautoberfläche justiert worden war (Abb. 3D).

Eine Stabilisierung durch den Fixateur vor der Osteotomie war nötig, um einer Rotation und somit einem seitlichen Abknicken des Beines während des Sägevorganges vorzubeugen sowie um mögliche unstandardisierte Splitterfrakturen zu vermeiden. Anschließend wurde eine Sägeschablone mittig zwischen den Schanzschrauben drei und vier positioniert. Dort erfolgten die Inzision der Haut und das Markieren des Periostes mit Hilfe eines Skalpells. Die Tibia wurde nun stumpf mit einer Metzenbaum Präparierschere von subkutanem Bindegewebe und umgebenen Muskelfaszien freipräpariert. Als weiterer Weichteilgewebeschutz wurden zwei Großzehenheber nach Hohmann unter die Tibia eingeführt. Die Osteotomie erfolgte mit einer druckluftbetriebenen, oszillierenden Säge, wobei die Schnittdicke 1 mm betrug. Zum Schutz vor Überhitzung wurde während des Sägevorganges kontinuierlich mit isotoner, steriler Kochsalzlösung gespült. Die Muttern des Fixateur externe wurden mit einem Imbusschlüssel gelöst, so dass die Osteotomie distrahiert werden konnte. Die Distraction erfolgte mit einem Meißel, wobei die Knochenenden so weit auseinander geschoben wurden, dass die als Abstandshalter fungierende Sägeschablone in den Frakturspalt eingeführt und so der Osteotomiespalt standardisiert auf 3 mm eingestellt werden konnte. Nach dem Feststellen sämtlicher Muttern wurde der Fixateur abschließend auf seinen korrekten Sitz hin überprüft und erst dann der Abstandshalter entfernt (Abb. 3E). Die Haut wurde im Bereich der Osteotomie mit nicht resorbierbarem Nahtmaterial (Prolene® 3/0, Ethicon GmbH, Norderstedt, Deutschland) in Form von Knopfheften verschlossen (Abb. 3F) und die Tibia mit zwei sterilen Mullbinden verbunden. Noch im Operationssaal erfolgte eine Röntgenaufnahme bei 73 kV und 2 mAs mit cranio-caudalem Strahlengang. Kontrolliert wurden auf diesen Röntgenaufnahmen die Weite des Frakturspaltes, der korrekte Sitz des Fixateurkonstruktes sowie die Eindringtiefe der einzelnen Schanzschrauben. Die Dokumentation etwaiger Besonderheiten erfolgte in einem OP-Protokoll.

Die Narkose wurde ausgeleitet und die Tiere bei selbständiger Atmung zurück in den Stall gebracht. Dort wurden sie extubiert und solange betreut, bis sie selbständig stehen konnten. Anschließend wurde als Analgetikum 2 ml Flunixin-Meglumin (Finadyne® RP, Essex, Pharma GmbH, München, Deutschland) subkutan injiziert.

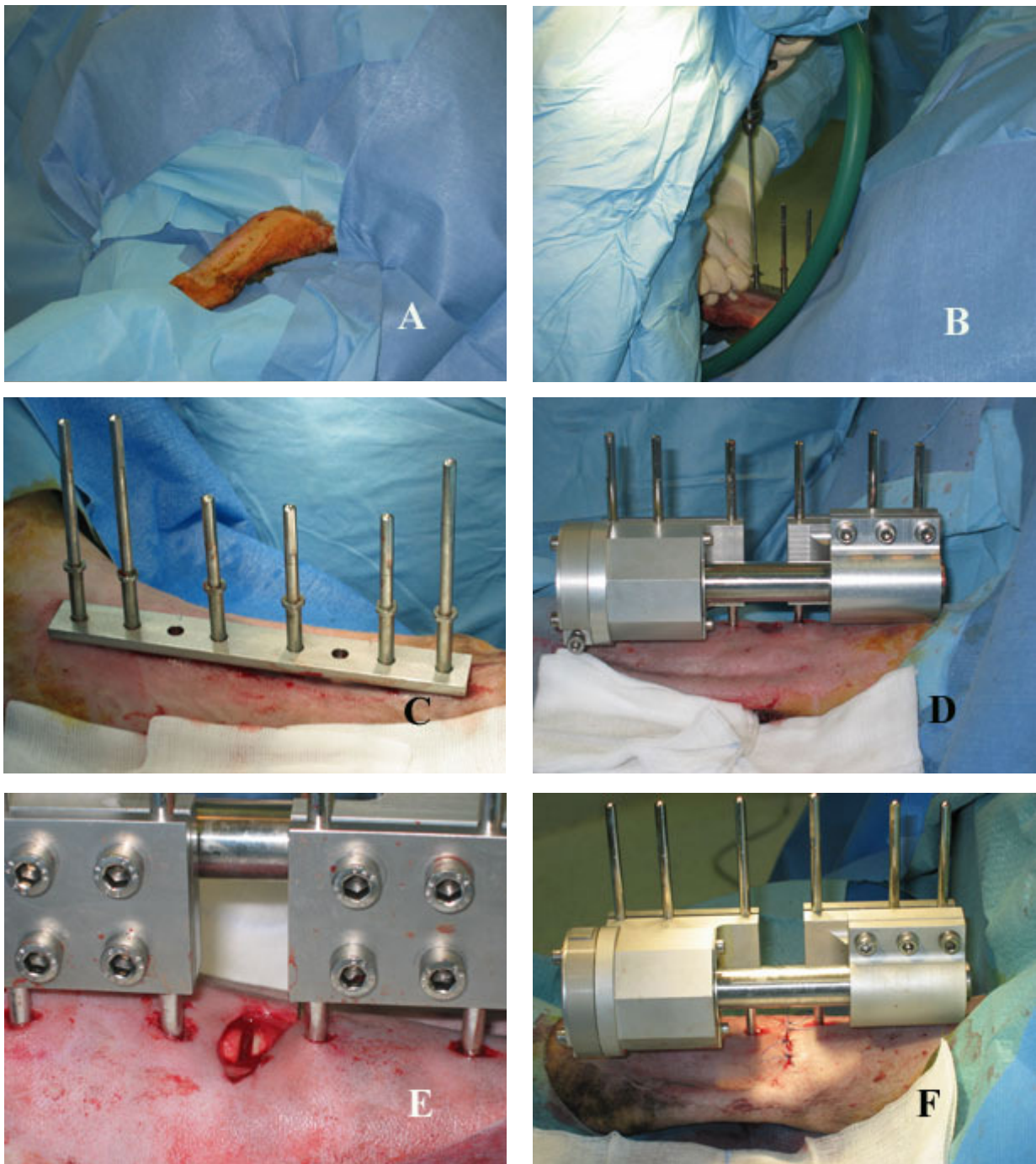


Abb. 3:

- A) Schafstibia steril abgedeckt und desinfiziert
- B) Bohren der Pins
- C) Pins in situ mit aufgelegter Schablone
- D) Montierter Rotationsfixateur externe
- E) Montierter Rotationsfixateur nach erfolgter Osteotomie
- F) Wundverschluss durch Hautnaht

### 3.6 Postoperative Wundversorgung

Zur Schmerzprophylaxe erhielten die Schafe bis einschließlich dem 5. Tag post operationem 2 ml Flunixin-Meglumin s.c. (Finadyne® RP, Essex Pharma GmbH, München, Deutschland). Täglich erfolgte eine Pinpflege, bei der man zuerst die Schanzsschrauben auf Lockerungserscheinungen und anschließend die Haut an den Pineintrittsstellen auf Entzündungserscheinungen untersuchte. Krusten wurden mit einer sterilen Pinzette entfernt. Es folgte eine Spülung der Pins an den Eintrittsstellen mit Ethacridinlactat (Rivanol®, Riedel-de Haen AG, Seelze, Deutschland) mit einer 20er Spritze und aufgesetzter Knopfkanüle. Anschließend wurden die Pineintrittsstellen mit sterilen Kompressen trocken getupft und die Tibia mit einem Mullbindenverband verbunden. Pinlockerungen und Entzündungen an den Eintrittsstellen wurden in einem Pinpflegeprotokoll vermerkt. Die Pinpflege wurde aufgrund der Kontinuität monatlich von derselben Person durchgeführt.

In Anlehnung an den Pin-Haut-Reaktionsscore nach Mahan und Mitarbeitern (1991) wurden die Pineintrittsstellen folgendermaßen beurteilt:

- 0 keine Entzündungserscheinungen, Eintrittsstelle trocken und sauber
- 1 leichte Entzündungserscheinungen, Eintrittsstelle vermehrt warm oder schmerzhaft, wenig seröses Exsudat
- 2 mäßige Entzündungserscheinungen, Eintrittsstelle vermehrt warm und schmerzhaft, mäßig bis viel seröses oder wenig eitriges Exsudat
- 3 starke Entzündungserscheinungen, Eintrittsstelle vermehrt warm und schmerzhaft, gerötet, mäßig bis viel eitriges Exsudat

### 3.7 Euthanasie

Den Schafen wurde am Ende der jeweiligen Standzeit mittels einer Braunüle ein venöser Zugang in die Vena cephalica antebrachii gelegt. In diesen wurden zur Narkotisierung 2,5 g Thiopental-Natrium (Trapanal®, Altana Pharma Deutschland GmbH, Konstanz, Deutschland) intravenös injiziert. Unmittelbar danach verabreichte man den Tieren zur Euthanasie ebenfalls intravenös 100 ml 1M-Kaliumchlorid-Lösung (7,5 %, Fresenius Kabi Deutschland GmbH, Bad Homburg, Deutschland). Der Herzstillstand wurde auskultatorisch festgestellt. Im Anschluss an die Tötung wurde die Tibia mit dem Fixateur externe abgesetzt und über ca. 48 Stunden in eine Fixierlösung eingelegt. Ein Liter dieser Lösung bestand aus 324 ml 36%igem Formaldehyd (Merck KgaA, Darmstadt, Deutschland), 540 ml 100 %igem Alkohol (Herbeta-Arzneimittel, Berlin, Deutschland), 130 ml Barbitol-Natrium-Puffer (0,1 molar,

pH=7,4, Apotheke Charité, Berlin, Deutschland) und 6 g Glucose (Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland). Durch die Formalinfixierung wurde eine Aushärtung des Gewebes erzielt, was somit zu einer deutlichen Erleichterung des Sägevorganges führte.

### **3.8 Sägen**

Bevor mit den Sägearbeiten zur Gewinnung der Präparate begonnen werden konnte, wurde der Fixateur samt der Pins von der Tibia entfernt. Der in einer Formalinlösung eingelegte Knochen musste anschließend eine halbe Stunde unter fließendem Wasser gespült werden. Die Tibia wurde mittels einer Einspannvorrichtung an dem Schlitten des Makrotrennschleifsystems (Exakt Apparatebau GmbH, Norderstedt, Deutschland) verschraubt und mittels Klebeband stabilisiert. Um einer thermischen Schädigung der Präparate vorzubeugen, erfolgten die Sägearbeiten unter ständiger Wasserkühlung. Mit der Bandsäge (ein Millimeter Bandstärke) wurde die Tibia distal des Pinkanals drei transversal in zwei Hälften zersägt. Der distale Teil der Tibia wurde nun so eingespannt, dass die Säge den Markraum mittig in mediolateraler Richtung bis zum Pinkanal vier durchteilte. Von dem mittigen Schnitt durch den Markraum, der senkrecht zur Längsachse der Tibia geführt wurde, erfolgten nun insgesamt noch vier weitere Schnitte. Zwei Sägeschnitte erfolgten nach links, d.h. in craniale Richtung und zwei Schnitte wurden nach rechts in caudale Richtung durchgeführt (Abb. 4). Die Seitwärtsverschiebung wurde durch eine Schlittenmechanik ermöglicht, wodurch eine seitliche Verschiebung in Zehntelmillimeterschritten gewährleistet war. Die vier gewonnenen 3 mm dicken Knochenpräparatscheiben wurden mit einem Bleistiftpunkt jeweils an der proximomedialen Seite markiert. Anschließend versah man die vier Präparate zur Identifizierung mit einem Zettel, auf dem die Schafnummer und Schnittnummer (S1 bis S4) vermerkt waren, und wickelte sie mit einer Mullkompressen ein. Zur Entkalkung wurden zwei der vier Präparate (S2 nahe der Knochenlängsachse und S4 fern der Knochenlängsachse) in eine Ethylendiamintetraessigsäure-Lösung (EDTA-Lösung) eingelegt und anschließend in Paraffin eingebettet. Die anderen zwei Knochenpräparatscheiben (S1 und S3) wurden zur histologischen Aufarbeitung von anderen Doktoranden verwendet.

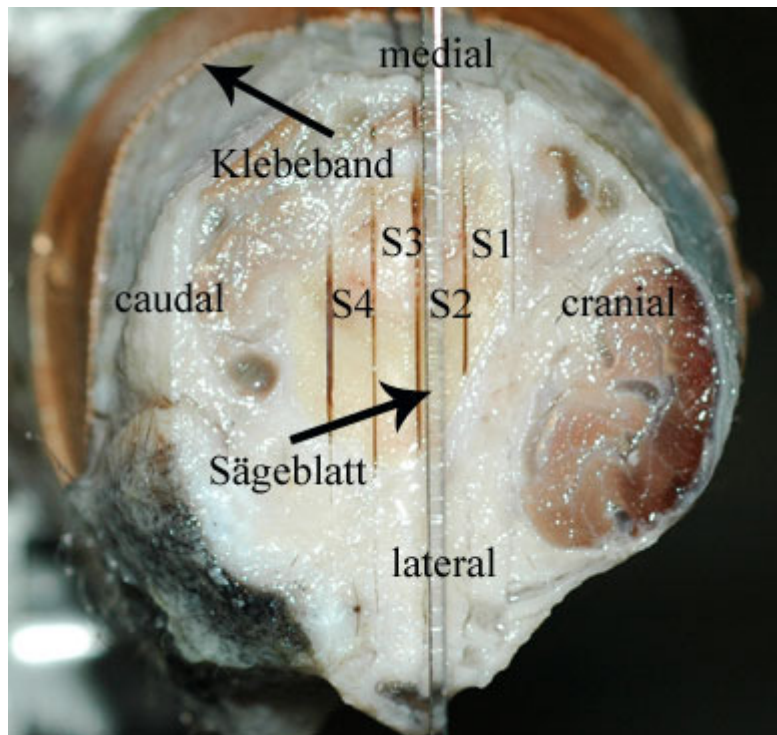


Abb. 4: Sägeschema der Tibia. Aufsicht auf die Transversalebene des Knochens. Die Präparate S1 bis S4 sind jeweils 3 mm stark.

### 3.9 Histologische Aufarbeitung

#### 3.9.1 Entkalkung, Entwässerung und Einbettung

Für die histologische Aufarbeitung wurden die Knochenpräparatscheiben S2 und S4 verwendet. Anfänglich mussten die Präparate entkalkt werden. Dazu wurden sie zunächst für ca. 30 Minuten unter fließendem Leitungswasser gespült, um das Formalin herauszuwaschen. Um eine möglichst effektive Entkalkung zu gewährleisten, wurden die Proben im Anschluss für ca. 2 Monate in EDTA (Ethyldiamintetraessigsäure) (Herbeta-Arzneimittel, Berlin, Deutschland) eingelegt. Bei EDTA handelt es sich um einen Komplexbildner, der mit seinen freien Bindungsstellen eine Verbindung mit Calciumionen eingeht. Es entstehen EDTA-Calcium-Präzipitate. Die EDTA Lösung wurde wöchentlich erneuert. Um den Entkalkungsprozess zu beschleunigen, erfolgte die Lagerung der Knochen während des gesamten Zeitraumes in einem Brutschrank bei 37 °C. Nach abgeschlossener Entkalkung wurden die Präparate in einem Gewebeeinfiltrationsautomaten (Leica TP 1200, Leica Microsystems Nussloch GmbH, Nussloch, Deutschland) nach einem standardisierten Schema mit einer aufsteigenden Alkoholreihe entwässert (1 x 70 %, 2 x 80 %, 2 x 96 %, 3 x 100 %iger Alkohol, 2 x Xylol). Anschließend wurden die Knochenpräparate in 60 °C warmes Paraffin (Paraplast Plus Tissue Embedding Medium, Tyco Healthcare, Mansfield, USA)



eingebettet. Hierfür wurde mit Hilfe eines Paraffinspenders (Leica EG 1120, Leica Microsystems Nussloch GmbH, Nussloch, Deutschland) das warme Paraffin in eine Gussform gegossen. Der Knochen wurde mit der Bleistiftmarkierung nach unten auf das bereits eingegossene Paraffin verbracht, um im Anschluss erneut mit Paraffin übergossen zu werden. Die Kennzeichnung der Blöcke erfolgte auf Filterpapier, welches auf die Oberfläche des noch flüssigen Paraffins gelegt wurde. Die Paraffinblöcke wurden zur Aushärtung auf einer Kälteplatte (Leica EG 1130, Leica Microsystems Nussloch GmbH, Nussloch, Deutschland) bei -20 °C abgekühlt und anschließend aus der Gussform genommen.

### **3.9.2 Schneiden der Paraffinpräparate**

Das Schneiden der Paraffinblöcke erfolgte mit einem manuellen Rotationsmikrotom (Leica RM 2125, Leica Microsystems Nussloch GmbH, Nussloch, Deutschland). Da Paraffin die Eigenschaft besitzt, sich bei höheren Temperaturen auszudehnen und dies zu einer Reduzierung der Schneidefähigkeit des Knochens führt, wurden die Paraffinblöcke vor und zwischen den Schneidevorgängen immer wieder auf einem Eisblock abgekühlt. Zuerst wurde der jeweilige Paraffinblock so in das Gerät eingespannt, dass die Schnittebene des Blockes parallel zum Schneidmesser ausgerichtet war. Danach wurden 4 µm dicke Paraffinschnitte gewonnen, die man zunächst in ein ca. 20 °C warmes Wasserbad, das mit destilliertem Wasser gefüllt war, überführte. Mit einem Pinsel wurden etwaige Falten geglättet und das Präparat auf einen Objektträger (Paul Marienfeld GmbH & Co KG, Lauda-Königshafen, Deutschland) aufgebracht. Der Objektträger wurde anschließend in ein ca. 49 °C warmes Wasserbad getaucht, so dass sich durch die Ausdehnung des Paraffins das Präparat voll entfalten konnte. Der beschriftete Objektträger wurde für mindestens zwei Tage in einem Brutschrank bei 37° C getrocknet, um die Haftung der Paraffinschnitte auf dem Objektträger zu erhöhen (Owen, 1970, Ng et al., 1997).

### **3.9.3 ABC-Methode**

Die ABC-Methode (Avidin-Biotin-Complex) gehört zu den indirekten immunhistochemischen Methoden zum Nachweis von zellulärem Antigen, wobei die hohe Affinität von Avidin zu Biotin (Vitamin H) eine große Rolle spielt. Avidin ist ein aus Hühnereiweiß gewonnenes Protein mit vier Bindungsstellen für Biotin. Für die ABC-Methode findet zuerst ein unkonjugierter Primärantikörper Verwendung, spezifisch gerichtet gegen das nachzuweisende Antigen. Anschließend kommt ein biotinylierter

Sekundärantikörper (oder so genannter Brückenantikörper) zum Einsatz, an dessen Biotinkomponente der AB-Komplex kovalent bindet. Er ist mit einem Enzym markiert (z.B. alkalische Phosphatase). Die alkalische Phosphatase wiederum setzt ein Chromogen um, wodurch das Antigen sichtbar gemacht wird. Als Substrat wurde Vector Red® (DakoMate, Dako A/S, Dänemark) verwendet, welches im Rahmen der enzymatischen Reaktion zum roten Chromogen reduziert wird. Um die gewünschten Strukturen besser differenzieren zu können, fand zuletzt eine Kerngegenfärbung mit dem bläulichen Farbstoff Hämalaun statt.

Findet ein Primärantikörper aus beispielsweise Kaninchen oder Maus Verwendung, muss der aus einer anderen Spezies stammende Sekundärantikörper gegen die dieselbe Spezies gerichtet sein, aus der der Primärantikörper stammt.

### **3.9.4 Immunhistochemische Färbungen**

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die glatte Muskulatur sowie Perizyten von Gefäßen durch immunhistochemische Färbung von  $\alpha$ -SMA ( $\alpha$ -smooth muscle actin) dargestellt (Abb. 6 und 7). Bei CYR61 (Cystein-rich angiogenic protein 61) handelt es sich um ein Protein, das cytoplasmatisch gebildet wird und sich sowohl cytoplasmatisch als auch extrazellulär darstellen lässt. CYR61 wird von diversen Zellen wie z.B. Osteoblasten, Fibrozyten sowie Chondrozyten exprimiert (Abb. 5). Die Färbungen von  $\alpha$ -SMA und CYR61 erfolgten nach einer modifizierten ABC Methode unter der Verwendung eines ABC-Elite-Kits von Vektor (Vectastain Elite ABC Kit, Linaris Biologische Produkte GmbH, Wertheim, Deutschland), wobei alkalische Phosphatase als gekoppeltes Enzym verwendet wurde.

Im Vorfeld wurde zunächst an Präparaten, die nicht in die Auswertung eingingen, die jeweils optimale Verdünnung des jeweiligen primären Antikörpers, unter Verwendung eines Puffers (Dako Cytomation Antibody Diluent, Dako Cytomation, Via Real, USA) ermittelt (Tab. 1).

Präparatschnitte, die ohne den Primärantikörper und Fall von CYR61 mit Präimmenserum inkubiert wurden, dienten als Negativkontrolle.

<b>Antigen</b>	<b>Herkunft / Spezifität</b>	<b>Konzentration des Primär-Ak</b>
CYR61 (polyklonal)	Maus / anti-human	1 : 400
$\alpha$ -SMA (monoklonal)	Maus / anti human	1 : 175

Tab. 1: Herkunft und Verdünnung der jeweiligen Primärantikörper mit dem anti Human Puffer.

Die im Folgenden beschriebene Vorgehensweise gilt für alle Antikörper.

Durchführung:

1. a) Entparaffinieren in Xylol 2 x 10 Minuten  
b) Rehydrieren 2 x 100-96-80-70 %igem Alkohol und 2 x Aqua dest. je 2 Minuten
2. Spülen im Puffer (pH 7,2) bestehend aus 1 Teil Chroma-Phosphatpufferkonzentrat (Waldeck GmbH, Münster, Deutschland) und 9 Teilen Aqua dest. 2 x 5 Minuten
- 2.1 Während des Spülvorganges wurden die Schnittpräparate mit einem Fettstift (Pap Pen, The Bining Site, Birmingham, England) umrandet.
3. Spülen im Puffer 2 x 5 Minuten
4. Inkubation mit Normalserum (Vektor Laboratories, Burlingame, USA) bei RT 20 Minuten
5. Inkubation mit dem Primärantikörper (Dako Cytomation, Glostrup, Denmark ( $\alpha$ -SMA)); (Prof. Jakob, Orthopädisches Zentrum für Musculoskeletale Forschung Universität Würzburg (CYR61)) bei 4 ° C über Nacht
6. Spülen im Puffer 2 x 5 Minuten
7. Inkubation mit dem biotinylierten Zweitantikörper (Vektor Laboratories, Burlingame, USA) bei RT 30 Minuten
8. Spülen im Puffer 2 x 5 Minuten
9. Inkubation mit dem AB-Komplex (Alkaline Phosphatase Standard Kit AK 5000, Vektor Laboratories, Burlingame, USA) 50 Minuten
10. Spülen im Puffer 2 x 5 Minuten
11. Inkubation mit dem Chromogenpuffer (pH 8,2) bei RT 2 x 5 Minuten
12. Inkubation mit dem AP-Substrat (Vector Red Alkaline Phosphatase

Substrat Kit 1, Burlingame, USA) bei RT, Entwicklung unter mikroskopischer Sichtkontrolle (Axioskop 2, Zeiss, Jena, Deutschland)

- |     |   |                  |
|-----|---|------------------|
| 13. | Spülen im Puffer  | kurz             |
| 14. | Kerngegenfärbung mit Hämatoxylin nach Mayer (Verhältnis 1:2):               |                  |
|     | a) Spülen in Aqua dest.   | kurz             |
|     | b) Hämatoxylin (Mayer´s Hämalaunlösung, Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland) | 3-6 x eintauchen |
|     | c) Spülen in Aqua dest.   | kurz             |
|     | d) Spülen in warmem Leitungswasser  | 1-2 Minuten      |
|     | e) Aufsteigende Alkoholreihe (70-80-96-2 x 100 %)                           | je 1 Minute      |
|     | f) Entfetten in Xylol   | 2 x 1 Minute     |
|     | g) Eindeckeln in Vitro-Clud® (R. Langenbrinck, Emmendingen, Deutschland)    |                  |

Für die immunhistochemische Färbung von CYR61 wurde Methylgrün als Gegenfärbung verwendet. Dazu wurden sämtliche Schnittpräparate nach der immunhistochemischen Entwicklung 1-2 min. in Methylgrün gefärbt. Anschließend erfolgte eine kurze Spülung in 70 %igem Alkohol, wonach sie zwei Mal kurz in 100 %igen Alkohol getaucht wurden. Abschließend fand eine Entfettung in Xylol statt und die Präparate wurden in Vitro-Clud eingedeckelt.

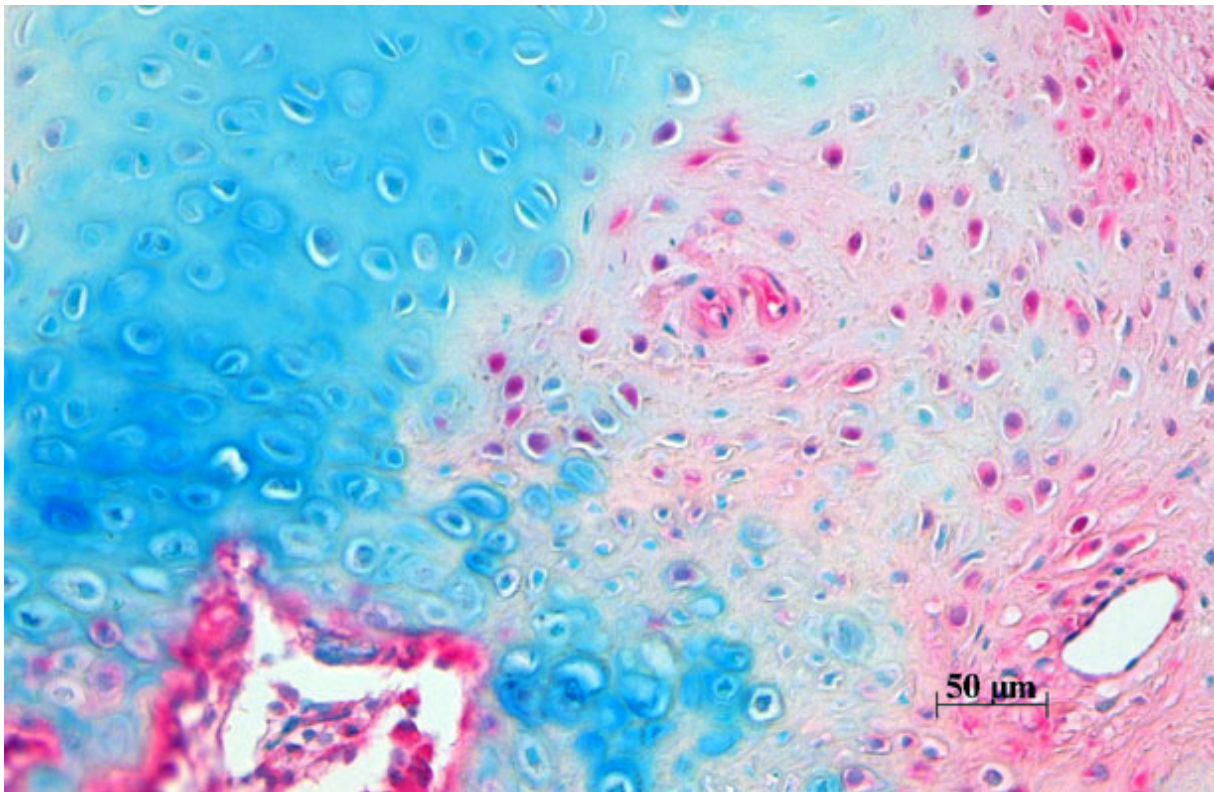


Abb. 5: Immunhistochemische Darstellung des matrixzellulären Proteins (dunkelrot) CYR61 im periostalen Kallus.

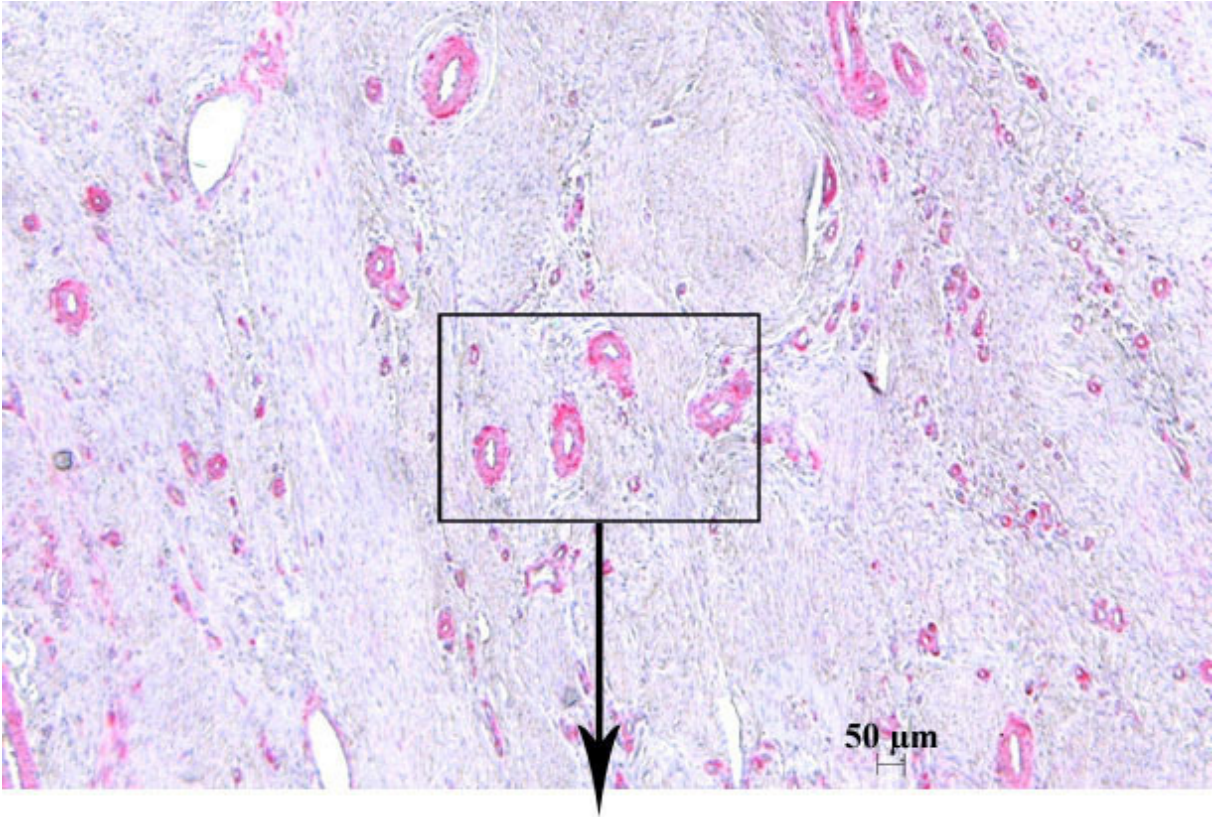


Abb. 6:  $\alpha$ -SMA-Färbung zur Darstellung der Gefäße (rot).

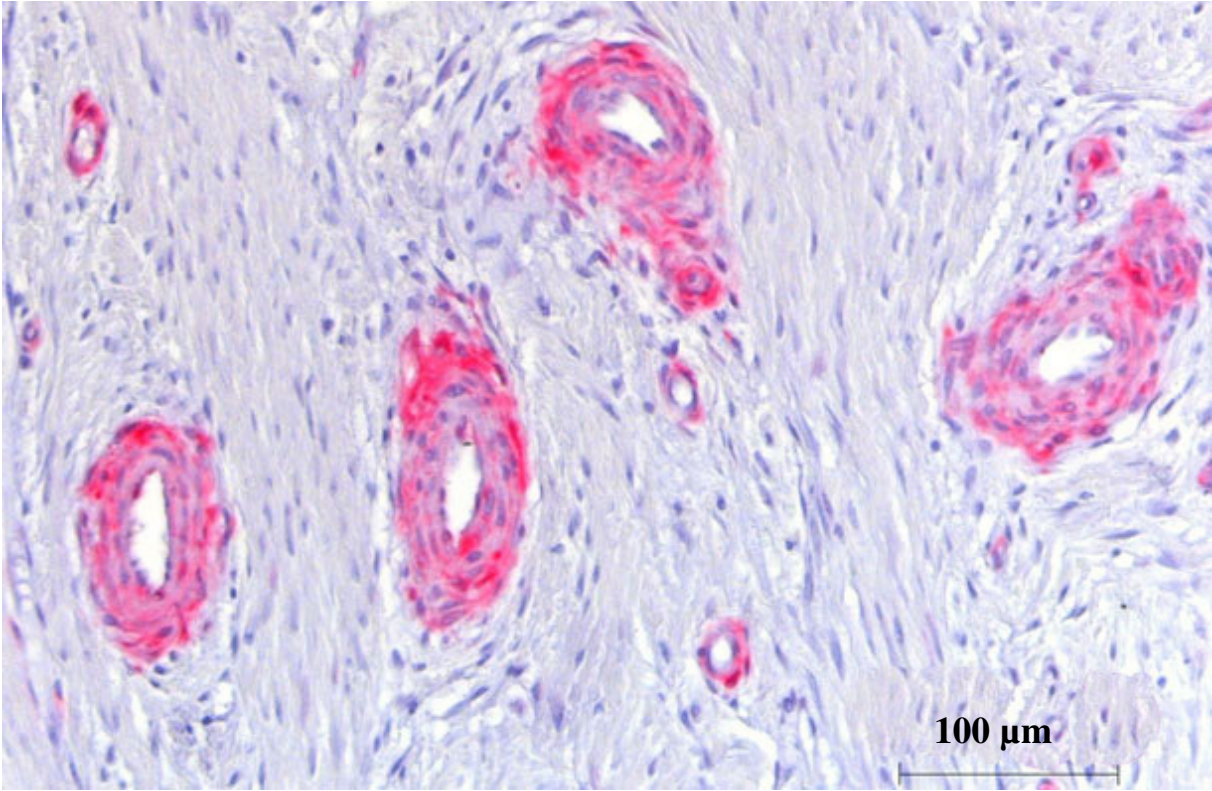


Abb. 7: Ausschnittsvergrößerung der Abb.6,  $\alpha$ -SMA-Färbung zur Darstellung der Gefäße (rot).

### 3.9.5 Histologische Färbungen

Neben den immunhistochemischen Färbungen wurden an den entkalkten und in Paraffin eingebetteten Färbungen eine Alcian Blau-Färbung sowie eine Movat Pentachrom-Färbung durchgeführt.

#### 3.9.5.1 Alcian Blau-Färbung

Diese Färbung dient der Unterscheidung zwischen Faserknorpel und hyalinem Knorpel anhand der Farbintensität und der Struktur. Der Faserknorpel wird hellblau angefärbt und ist durch seine faserige Struktur erkennbar. Der hyaline Knorpel hingegen stellt sich in einem intensiveren blau dar (Abb. 8). Der Hintergrund färbt sich zartrosa an, die Zellkerne hellrot.

Durchführung:

- |     |   |                |
|-----|---|----------------|
| 1.  | a) Entparaffinieren in Xylol  | 2 x 10 Minuten |
|     | b) Rehydrieren mit 100-96-80-70 %igem Alkohol und Aqua dest.                          | je 2 Minuten   |
| 2.  | Essigsäure (3 %)  |                |
| 3.  | 1 %ige Alcianblaulösung (8GX, Fa. Sigma-Aldrich, Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland) | 30 Minuten     |
| 4.  | Abspülen in Essigsäure (3 %)  | kurz           |
| 5.  | Waschen in Aqua dest.   | kurz           |
| 6.  | Färbung mit Kernechtrot (Waldeck GmbH & Ko KG, Division Chroma, Münster, Deutschland) | 5 Minuten      |
| 7.  | Waschen in Aqua dest.   | kurz           |
| 8.  | Aufsteigende Alkoholreihe (70-80-96-2 x 100 %)  | je 1 Minute    |
| 9.  | Entfetten in Xylol  | 2 x 5 Minuten  |
| 10. | Eindeckeln in Vitro-Clud® (R. Langenbrinck, Emmendingen, Deutschland)                 |                |

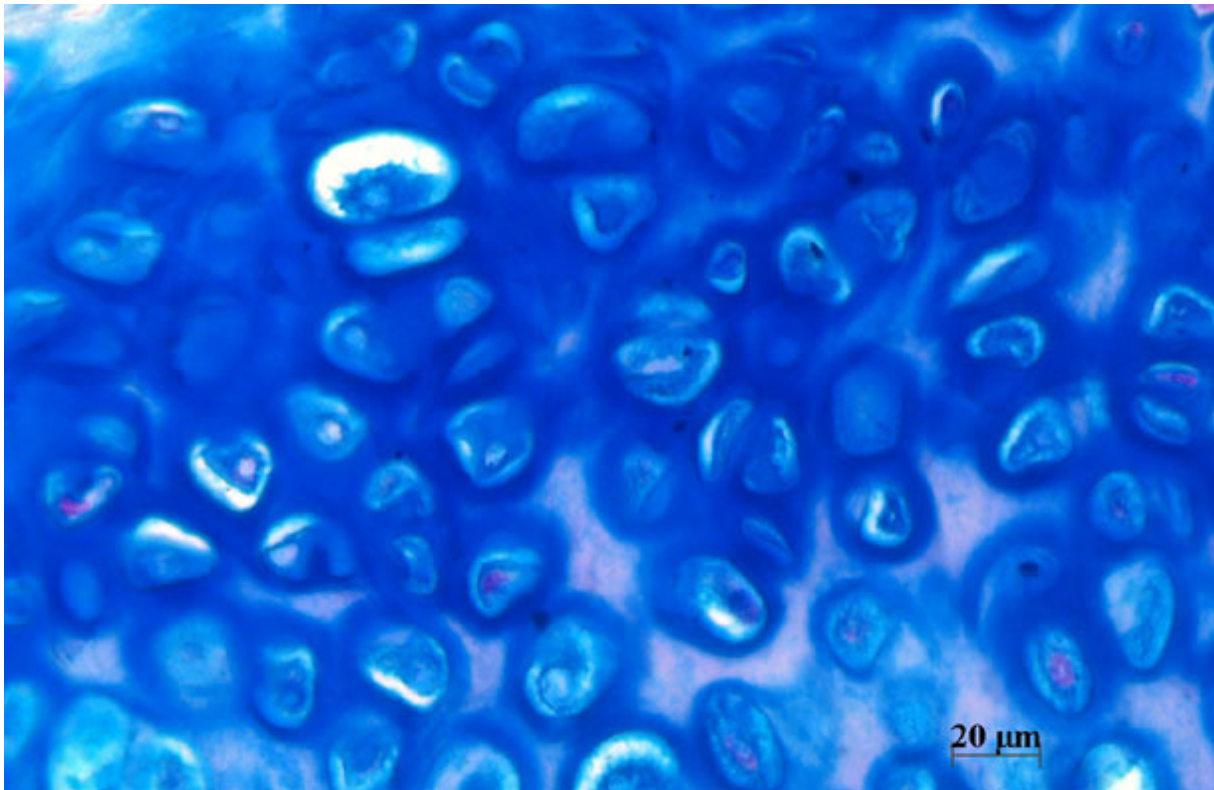


Abb. 8: Alcian Blau-Färbung, Hyaliner Knorpel intensiv blau gefärbt.

### 3.9.5.2 Movat Pentachrom-Färbung

Diese Färbung ermöglicht die Unterscheidung der Hart -und Weichteilkomponenten durch ihren Farbreichtum (Abb. 9). Knochengewebe erscheint leuchtend gelb, während Knorpel grün-blau dargestellt wird. Das Bindegewebe stellt sich in unterschiedlichen grün-blauen Farbtönen dar. Erythrozyten erscheinen leuchtend rot, wohingegen Zellkerne blauschwarz angefärbt werden.

Um eine genaue Aussage über die Gefäßdichte im Kallus treffen zu können, wurde die Bindegewebsfläche quantitativ bestimmt. Eine eindeutige Unterscheidung der einzelnen Gewebe ist aufgrund des Kontrastreichtums dieser Färbung leicht möglich. Das Bindegewebe konnte mit Hilfe der computergestützten Bildanalyse quantitativ histomorphometrisch bestimmt werden. Des Weiteren fand die Movat Pentachrom-Färbung Verwendung als Übersichtsfärbung, anhand derer die histologische Beschreibung des Osteotomiebereiches erfolgte.

Durchführung:

1. a) Entparaffinieren in Xylol 2 x 10 Minuten  
b) Rehydrieren mit 100-96-80-70 %igem Alkohol und Aqua dest. je 2 Minuten
2. Färbung in 1 %iger Alcianblaulösung (8GX, Fa. Sigma-Aldrich,



	Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland)	10 Minuten
3.	Spülen in Leitungswasser	5 Minuten
4.	Stabilisieren in alkalischem 96 %igem Alkohol	60 Minuten
5.	Spülen in fließendem Leitungswasser	10 Minuten
6.	Waschen in Aqua dest.	kurz
7.	Kernfärbung in Weigert`s Eisenhämatoxylin (Eisen-Hämatoxylin A & B, Waldeck GmbH & Co KG, Division Chroma, Münster, Deutschland)	10 Minuten
8.	Spülen in Aqua dest.	kurz
9.	Spülen in Leitungswasser	15 Minuten
10.	Färben in Brillant Crocein-Säurefuchsin (Brilliantcrocein R, Waldeck GmbH & Co KG, Division Chroma, Münster, Deutschland)	12 Minuten
11.	Spülen in 0,5 %iger Essigsäure	kurz.
12.	Differenzieren in 5 %iger Phosphorwolframsäure (Waldeck GmbH & Co KG, Division Chroma, Münster, Deutschland)	20 Minuten
13.	Spülen unter Bewegung in 0,5 %iger Essigsäure	2 Minuten
14.	3 x Spülen in 100 %igem Alkohol	je 5 Minuten
15.	Färben in Saffron du Gâtinais (Waldeck GmbH, Division Chroma, Münster, Deutschland) in 100 %igem Ethanol	60 Minuten
17.	3 x Spülen und Entwässern in 100 %igem Alkohol	je 3 Minuten
18.	Entfetten in Xylol	2 x 5 Minuten
19.	Eindeckeln in Vitro-Clud® (R. Langenbrinck, Emmendingen, Deutschland)	

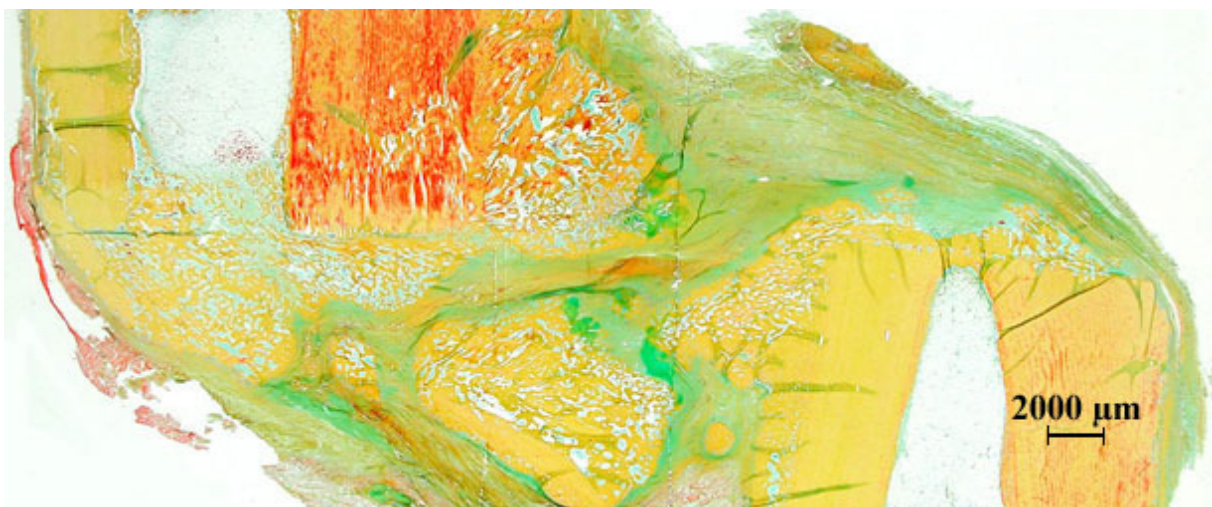


Abb. 9: Movat Pentachrom-Färbung des Osteotomiegebietes sechs Wochen post OP.

### **3.10 Auswertung der Immunhistochemie und Histologie**

#### **3.10.1 Digitales Einlesen der Präparate**

Vorraussetzung für die Bearbeitung und Auswertung der histologischen und immunhistochemischen Präparate ist deren digitales Einlesen. Dieses Einlesen erfolgte mittels eines Hochleistungsmikroskops (Carl Zeiss, Jena, Deutschland), welches zusätzlich mit einer hochauflösenden Spiegelreflex-Digitalkamera (Nikon D70 digitalcamera, Nikon Corporation, Tokyo 100-8331, Japan) sowie einem mechanisch verschiebbarem Objektisch ausgestattet war.

Die Digitalisierung der Daten erfolgte unter Zuhilfenahme der Computersoftware Axio Vison Rel. 4.0 (Carl Zeiss, Jena, Deutschland). Das digitale Einlesen erfolgte bei den  $\alpha$ -SMA-gefärbten Präparaten bei 50-facher, bei den Movat-Pentachrom-gefärbten Präparaten bei 25-facher Vergrößerung. Zuerst wurde die einzuscannende Region mit einem wasserfesten Stift in Form eines Rechteckes umrandet. Anschließend erfolgte das Einscannen mittels der Mosaix-Funktion des Programms in Form von Einzelbildern. Im anschließenden Sticking-Modus wurden diese Einzelbilder zu einem Gesamtbild zusammengefügt. Im letzten Arbeitsschritt des Programms erfolgte die Kachelbildkonvertierung, wobei etwaige Helligkeitsunterschiede der Einzelbilder ausgeglichen sowie das Bild letztlich noch einmal beschnitten werden konnte. Abschließend wurde ein Maßstabsbalken in das Bild eingefügt, um später eine genaue Größenangabe gewährleisten zu können.

#### **3.10.2 Definition der Region of Interest (ROI)**

Vorraussetzung für die Gefäßzählung und deren Auswertung war die Definition der Region of Interest, also des Gebietes von Interesse. Dies erfolgte, um eine einheitliche und möglichst standardisierte Auswertung der Präparate zu gewährleisten sowie den direkten Vergleich der Präparate bzw. Gruppen untereinander zu ermöglichen. Eine schematische Darstellung der ROI ist in Abb. 10 ersichtlich.

Der Ausgangspunkt für die Erstellung der ROI war die kortikale Schnittkante. Von dort wurde eine horizontale Linie entlang des Osteotomiespaltes über die gesamte Breite des Präparates gezogen. Es wurde jeweils die kortikale Schnittkante gewählt, auf deren Seite sich zwei Kortizes befanden. Um die Höhe der ROI zu definieren, wurde von dieser Schnittkante jeweils eine weitere horizontale Linie 3 mm proximal sowie 3 mm distal gezogen. Die Gesamthöhe der ROI betrug insgesamt 6 mm.

Die Breite der ROI richtete sich nach der maximalen Breite des periostalen Kallus innerhalb der zuvor festgelegten Höhe der ROI.

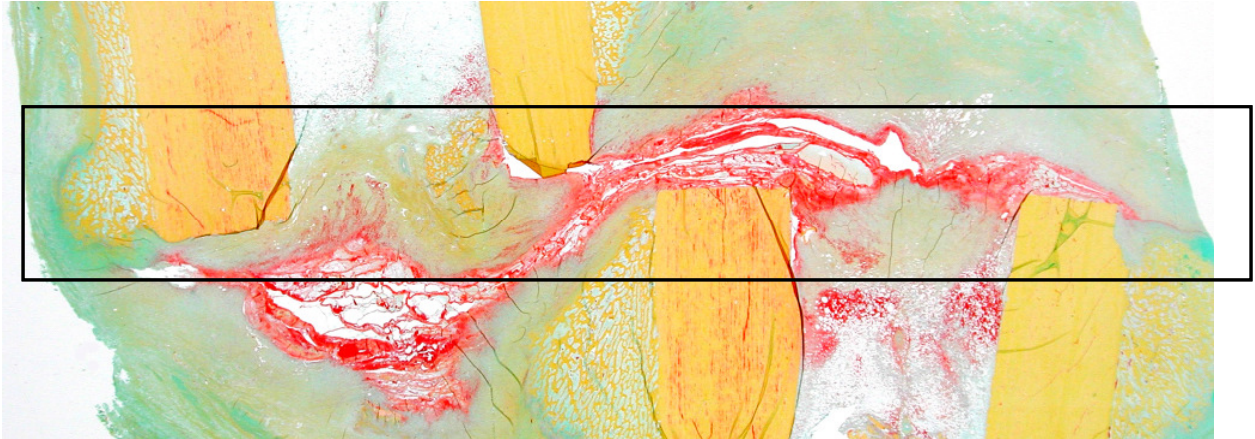


Abb. 10: MP-Färbung, Darstellung der Region of Interest (ROI).

### 3.10.3 Deskriptive Analyse der histologischen Präparate

Die deskriptive Analyse der Movat-Pentachrom Präparate erfolgte gruppenweise zu den unterschiedlichen Untersuchungszeitpunkten. In jeder Gruppe befanden sich acht Tiere.

Die histologische Analyse erfolgte bei allen Präparaten nach dem gleichen Schema. Beurteilt wurden die Fragmentverschiebung, die Knorpelverteilung, das Hämatomvorkommen, die knöcherne Überbrückung des Osteotomiespaltes, der Osteotomiespalt und -rand, das Kallusvorkommen und die Kalluszusammensetzung sowie die Geflechtknochen trabekel.

### 3.10.4 Histomorphometrische Auswertung der Präparate

Die histomorphometrische Auswertung der Präparate erfolgte mit Hilfe der computergestützten Bildanalyse mit dem Programm (KS 400 Run Version 3.0, Carl Zeiss Vision GmbH Eching, Deutschland) und ermöglichte die quantitative und qualitative Erfassung einzelner Gewebetypen. Die Auswertung erfolgte mittels eines speziellen Makros für die mit Movat-Pentachrom gefärbten Präparate. Dieses Makro ermöglichte eine Flächenberechnung verschiedener Gewebearten anhand bestimmter Farbpixel.

Nachdem das Programm geöffnet und der auszuwertende Schnitt aufgerufen wurde, erfolgte die Kalibrierung anhand des zuvor im digitalen Bild eingefügten Maßstabalkens.

Die Kalibrierung stellte die Grundlage für alle nachfolgend durchgeführten Messungen dar. Anschließend erfolgte die Definition der ROI, wie unter 3.10.2 beschrieben.

Zuerst erfolgte die Markierung des unteren Randes des Osteotomiespaltes. Dieser Rand stellte die Mittellinie und den Ausgangspunkt der ROI dar. Ausgehend von dieser Linie wurde die Höhe der ROI bestimmt, indem die Linie jeweils 3 mm nach proximal resp. distal verschoben wurde. Um eine weitere Unterteilung in periostal und endostal vornehmen zu können, wurden zwei senkrecht zum Osteotomiespalt verlaufende Linien jeweils durch die laterale bzw. mediale Kortikalis gezogen (Abb. 11).

Im folgenden Schritt erfolgte die Markierung der Leerräume, die keinen Eingang in die Auswertung finden sollten (Abb. 12). Zu den Leerräumen gehörten z.B. schneidebedingte Artefakte, die keine Gewebeanteile beherbergten oder Muskulatur aus dem Randbereich des Präparates. Anschließend wurden die Kortizes manuell umfahren, um die Fläche des kortikalen Knochens von der Auswertung auszuschließen.

Abschließend erfolgte die Segmentierung der unterschiedlichen Gewebetypen anhand einer Farbmaske.

Folgende vom Computer errechneten Daten wurden ausgewertet:

- Fläche der ROI abzüglich der Kortikalisfläche (mm<sup>2</sup>)
- Fläche des Bindegewebes in der ROI
- Fläche des Hämatoms sowie Knorpels in der ROI

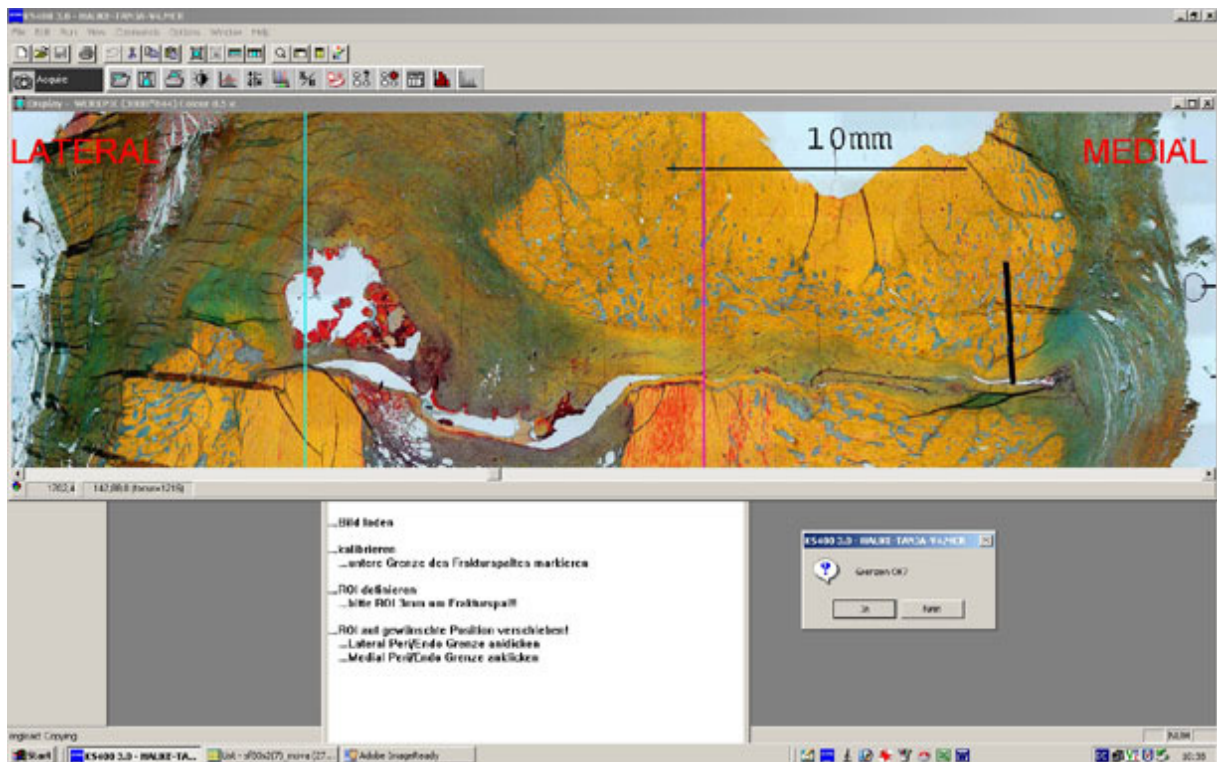


Abb. 11: Einteilung des Präparates in den lateralen, medialen, endostalen und periostalen Raum durch Markierung der Osteotomiespaltmitte, der Kortikalismitte sowie der Grenzen der ROI.

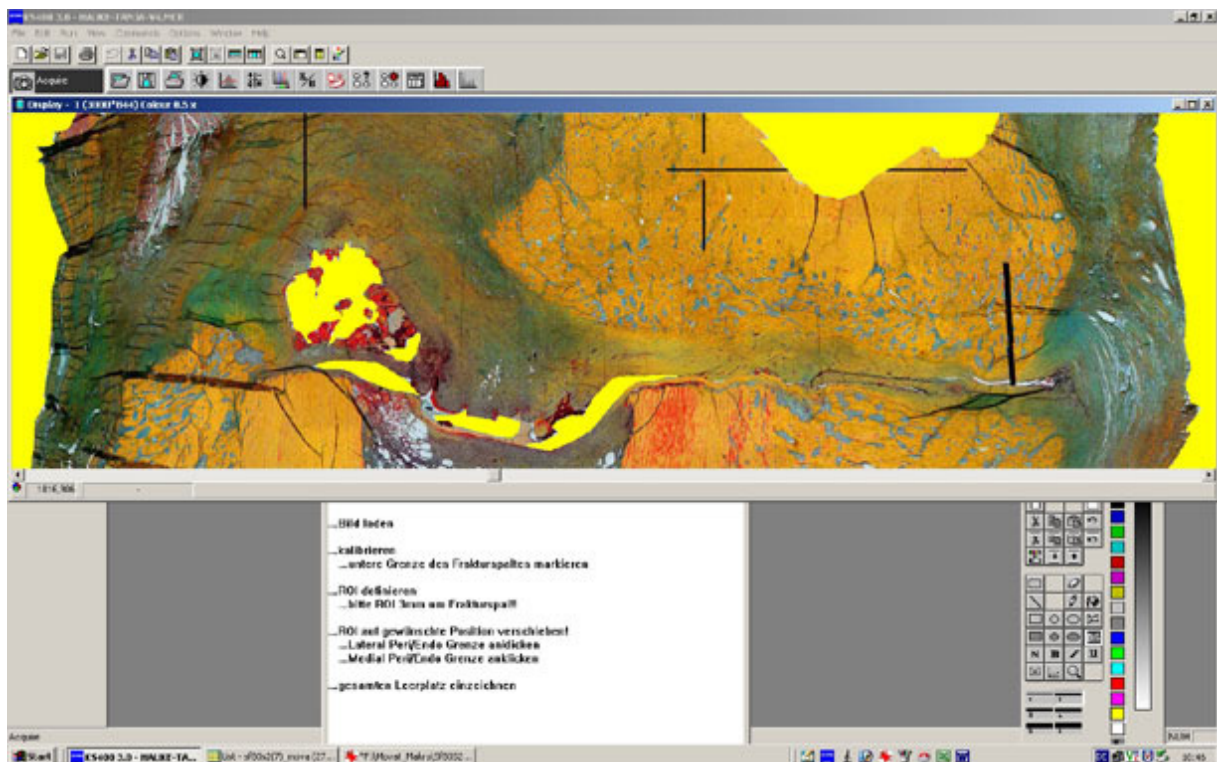


Abb. 12: Markierung des Leerraums in gelb.

### 3.10.5 Gefäßzählung

Die  $\alpha$ -SMA gefärbten Präparate wurden unter Zuhilfenahme einer computergesteuerten Software Axio Vision Rel. 4.0 (Carl Zeiss, Jena, Deutschland), die mit einem Mikroskop gekoppelt war, digitalisiert, um die Zählung der Gefäße zu vereinfachen und zu standardisieren. Anschließend erfolgte die Erstellung der ROIs, wie unter 3.10.2 beschrieben, mit Hilfe eines Fotobearbeitungsprogrammes (Adobe Photoshop Version 7.0). Während der Digitalisierung der Präparate mit Hilfe eines Bildbearbeitungsprogramms (Mosaix, Carl Zeiss Microimaging GmbH, Jena) wurde abschließend ein Maßstabsbalken in das Bild eingefügt. Dadurch war es möglich, die standardisierte Höhe der ROI festzulegen, sowie die zu zählenden Gefäße in kleine und große Gefäße zu unterteilen. Als kleine Gefäße galten definitionsgemäß solche, deren Außendurchmesser  $< 40 \mu\text{m}$  betrug. Große Gefäße wiesen einen Außendurchmesser von  $\geq 40 \mu\text{m}$  auf. Das Fotobearbeitungsprogramm hatte den großen Vorteil, dass die nach zwei Größen unterteilten Gefäße mit unterschiedlichen Farben markiert werden konnten, so dass eine Mehrfachzählung vermieden werden konnte. Als Gefäß galten alle Strukturen, deren Tunica media oder Perizyten in der  $\alpha$ -SMA-Färbung eine rote Färbung aufwiesen. Die Gefäßzählung erfolgte innerhalb der unter 3.10.2 beschriebenen ROI. Die Gefäße außerhalb der ROI blieben für die Zählung unberücksichtigt. Um die Gefäßdichte bestimmen zu können, benötigte man die histomorphometrisch ermittelte Bindegewebsfläche der ROI, die anhand der Movat-Pentachrom-Färbung bestimmt wurde. Die Gefäßdichte ergab sich durch Division der Gefäßzahl durch die Bindegewebsfläche.

### 3.10.6 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung der erhobenen Daten erfolgte mit Hilfe des Statistikprogramms SPSS für Windows 11.0 (SPSS Deutschland GmbH, München, Deutschland). Die zuvor in Excel (Microsoft Excel 2000, Microsoft Corporation, USA) gesicherten histomorphometrischen Daten wurden zur grafischen Darstellung in das Datenverarbeitungsprogramm SPSS übertragen. Die grafische Darstellung erfolgte in Einzelpunktdarstellungen sowie in Boxplots.

Die Boxplotdarstellung beinhaltet folgende Parameter:

Den Median (50 %-Perzentil, dargestellt durch eine horizontale, schwarze Linie innerhalb des Körpers der Box, das 25 %-Perzentil (gekennzeichnet durch die untere Grenze der Box), das 75 %-Perzentil (gekennzeichnet durch die obere Grenze der Box) sowie den Minimum -und Maximumwert. Der Körper des Boxplots vereint 50 % der mittleren Werte in sich. Ober- und

unterhalb schließen sich T-förmige Markierungen (die so genannten Whisker) an den Boxplotkörper an. Diese Whisker umfassen jeweils die Werte die sich ober- bzw. unterhalb des 75 % bzw. 25 %-Perzentils befinden und umfassen maximal die 1,5 – fache Boxenbreite. Werte außerhalb dieses Bereiches werden als Ausreißer und Extremwerte bezeichnet und in Form eines Kreises und Sterns dargestellt. In der statistischen Auswertung wurden die vier Untersuchungszeitpunkte miteinander durch einen nichtparametrischen Test, den Mann-Whitney-U-Test, verglichen. Es wurde eine Irrtumswahrscheinlichkeit von unter 5 % angenommen, das Signifikanzniveau ( $p$ ) also bei 0,05 festgelegt. Aufgrund der vielen Vergleiche zwischen den einzelnen Untersuchungszeitpunkten und der damit verbundenen Verknüpfung der Daten, musste das Signifikanzniveau nach Bonferroni-Holm korrigiert werden. Beim Vergleich der einzelnen Gruppen wurden die  $p$ -Werte der Größe nach in absteigender Reihenfolge notiert. Dem niedrigsten Wert wurde ein Signifikanzniveau von  $p < 0,0167$ , dem mittleren Wert ein Signifikanzniveau von  $p < 0,025$  und dem größtem Wert letztendlich ein Signifikanzniveau von  $p < 0,05$  zugeordnet.

## **4 Ergebnisse**

### **4.1 Allgemeines**

Für die deskriptiven histologischen sowie die histomorphometrischen Untersuchungen gingen alle 32 Tiere in die Auswertung ein. Für die Ermittlung der Gefäßdichte gingen zum Zweiwochenzeitpunkt drei Tiere, zum Dreiwochenzeitpunkt fünf Tiere und zum Sechswochen- sowie zum Neunwochenzeitpunkt jeweils alle acht Tiere in die Auswertung ein. Aufgrund von technischen Gründen gingen zum Zweiwochen- sowie zum Dreiwochenzeitpunkt nicht alle Tiere in die Auswertung der Gefäßzählung ein. Die fehlenden Tiere wiesen eine zu starke Hintergrundfärbung auf, weshalb eine Differenzierung der Gefäße unmöglich war.

Sämtliche Schafe belasteten unmittelbar post operationem die operierte Gliedmaße. Im Rahmen der täglichen Wundkontrolle erfolgte eine Pinpflege und alle Tiere wurden als gesund eingestuft. Den Schafen stand zu jeder Zeit Futter und Wasser ad libitum zur Verfügung. Hinsichtlich der Futteraufnahme sowie des Allgemeinbefindens zeigten die Tiere über den gesamten Untersuchungszeitraum ein ungestörtes Verhalten.

### **4.2 Deskriptive Histologie Movat Pentachrom Färbung**

#### **2 Wochen post operationem**

##### **1. Fragmentverschiebung**

Histologisch zeigte sich zwei Wochen post OP eine seitliche Verschiebung der Kortikalisfragmente unterschiedlichen Ausmaßes. Drei Tiere wiesen eine Fragmentverschiebung von ca.  $\frac{1}{2}$  Kortikalisbreite in lateraler Richtung auf, bei einem Tier war es eine gesamte Kortikalisbreite. Bei einem Tier verschob sich die mediale Kortikalis des distalen Fragmentes soweit nach lateral, dass sie sich auf der Höhe der lateralen Kortikalis des proximalen Fragmentes befand, bei zwei Tieren verschob sich die mediale Kortikalis des distalen Fragmentes sogar soweit nach lateral, dass sie sich über der Höhe der lateralen Kortikalis befand. Nur bei einem Tier war eine Fragmentverschiebung nach lateral zu beobachten, die weniger als  $\frac{1}{4}$  der Kortikalisbreite betrug. Zusätzlich fand, wie makroskopisch beim Sägevorgang



beobachtet, auch eine Verschiebung der Kortikalisfragmente in craniale bzw. caudale Richtung statt.

## **2. Knorpelverteilung**

In einem Präparate konnte Knorpel in hyaliner Form nachgewiesen werden. Dieser war inselartig im periostalen Bereich zu finden.

## **3. Hämatomvorkommen**

Das Hämatom füllte bei allen Präparaten den Osteotomiespalt über die gesamte Breite, bis in den periostalen Raum hin, aus (Abb. 15 und 16). Dazwischen zeigten sich allerdings Risse unterschiedlicher Größe. Sie stellten sich teils inselartig, teils auch als Aussackung nach proximal oder distal dar.

## **4. Knöcherne Überbrückung des Osteotomiespaltes**

Kein Präparat zeigte eine knöcherne Überbrückung des Osteotomiespaltes.

## **5. Osteotomiespalt und -rand**

Im Osteotomiespalt dominierten Hämatom und Bindegewebe. In sechs der acht Präparate waren meist solitäre, kleine, teils längliche Geflechtknocheninseln bzw. Geflechtknochenzubildungen an den Kortizes zu sehen. Die kortikale Oberfläche im Bereich des Osteotomiespaltes stellte sich überwiegend eben dar, ausgenommen der Bereiche, an denen sich trabekulärer Geflechtknochen fand.

## **6. Kallusvorkommen und -zusammensetzung**

In allen Präparaten bestand der Kallus überwiegend aus Bindegewebe. Im Osteotomiespalt dominierten Hämatom und Bindegewebe. Auch der periostale Raum wurde zum Zweiwochenzeitpunkt durch Hämatom und Bindegewebe geprägt. Knöcherner Kallus entwickelte sich meist periostal mit einigem Abstand zum Osteotomiespalt und zeigte lateral eine wesentlich deutlichere Ausprägung als medial. Auffällig war, dass die Kortizes, die einen engen Kontakt zueinander aufwiesen, einen wesentlich voluminöseren Kallus zeigten als die Kortizes, die durch die Fragmentverschiebung weiter auseinander lagen. Im Bereich dieser Kortizes wurde kaum oder nur sehr wenig Geflechtknochen vorgefunden. Zwischen den feinen Geflechtknochenbälkchen befand sich Bindegewebe.

### **7. Geflechtknochen trabekel**

Die feinen Geflechtknochenbälkchen hatten eine filigrane Gestalt, zeigten keine eindeutige Orientierung und waren nicht zusammenhängend. Die Oberfläche war meist dicht mit Osteoblasten besetzt.

## **3 Wochen post operationem**

### **1. Fragmentverschiebung**

Im Vergleich zum Zweiwochenzeitpunkt war die Verschiebung der Fragmente derart stark ausgeprägt, dass sich die Kortizes bei keinem Tier mehr regulär gegenüberlagen (Abb. 14). Bei drei Tieren war die Dislokation der Fragmente so stark ausgeprägt, dass nur die proximale (bei einem Tier) bzw. die distale Kortikalis (bei zwei Tieren) in der histologischen Schnittebene lag.

### **2. Knorpelverteilung**

Hyaliner Knorpel konnte bei sieben von acht Tieren nachgewiesen werden. Er fand sich meist periostal am Osteotomiespaltrand, bei zwei Tieren auch direkt im Osteotomiespalt. Generell wurde hyaliner Knorpel in unmittelbarer Nachbarschaft bzw. inselartig zwischen neu gebildeten Geflechtknochenbälkchen gefunden.

### **3. Hämatomvorkommen**

Im Osteotomiespalt befand sich viel Hämatom, welches sich bei der Hälfte der Präparate über die gesamte Frakturspaltbreite erstreckte. Auch endostal sowie insbesondere periostal zeichneten sich ausgedehnte Hämatomreste ab. Die Fibrinfäden des Hämatoms waren entgegen der Längsrichtung des Knochens orientiert.

### **4. Knöcherner Überbrückung des Osteotomiespalt**

Kein Präparat zeigte eine knöcherner Überbrückung des Osteotomiespalt.

### **5. Osteomiespalt und -rand**

Das Gewebe im Osteotomiespalt bestand überwiegend aus Bindegewebe und Hämatom. In sechs von acht Präparaten waren Geflechtknocheninseln bzw. schmale Streifen von Geflechtknochenzubildungen zu sehen. In vier Präparaten fand sich

hyaliner Knorpel im Osteotomiespalt. Die kortikalen Osteotomiespaltränder stellten sich überwiegend wellenförmig, teilweise eben dar.

## **6. Kallusvorkommen und -zusammensetzung**

Der Kallus hatte in allen Präparaten einen überwiegend bindegewebigen Charakter. Im Vergleich zum Zweiwochenzeitpunkt zeigten sich größere Areale von Geflechtknochen und hyalinem Knorpel, vor allem periostal. Der periostale knöcherne Kallus zeigte sich deutlich voluminöser. Der Kallus der Kortizes, die einen engen Kontakt zum gegenüberliegenden Fragment aufwiesen nahm stärker an Volumen zu als der Kallus der Kortizes, die durch die Fragmentverschiebung weiter auseinander lagen.

## **7. Geflechtknochen trabekel**

Die Geflechtknochen trabekel wiesen eine kompaktere Form im Vergleich zum Zweiwochenzeitpunkt auf und waren meist dicht mit Osteoblasten besetzt. Sie waren kortikalisnah meist entsprechend der Längsachse des Knochens, kortikalisfern hingegen entgegen der Längsachse des Knochens orientiert.

# **6 Wochen post operationem**

## **1. Fragmentverschiebung**

Die Fragmentverschiebung der Kortizes war derart stark ausgeprägt, dass sich nun selbst die kontralateralen Kortizes nicht mehr gegenüberlagen. Aufgrund der massiven Dislokation konnte bei sechs Tieren je ein Kortikalisfragment nicht dargestellt werden.

## **2. Knorpelverteilung**

Hyaliner Knorpel konnte bei sieben Tieren nachgewiesen werden. Auffallend war das Vorkommen hypertropher Chondrozyten (Abb. 19 und 20). Erstmals konnte bei sechs Tieren auch Faserknorpel beobachtet werden. Dieser fand sich meist im Osteotomiespalt, selten auch periostal. Faserknorpel kam stets in Distanz zur Kortikalis bzw. zu neu gebildetem Geflechtknochen vor, wohingegen hyaliner Knorpel stets unmittelbar an die Kortizes bzw. den neu gebildeten Geflechtknochen angrenzte. Hyaliner Knorpel konnte aber auch zwischen intakter Kortikalis und

solitären, meist länglichen knöchernen Fragmenten nachgewiesen werden, die in unmittelbarer Nachbarschaft der periostalen Kortikalis lagen.

### **3. Hämatomvorkommen**

Im Vergleich zu den früheren Zeitpunkten zeigten sich nur noch bei sechs von acht Präparaten Hämatomreste, meist im Osteotomiespalt.

### **4. Knöcherne Überbrückung des Osteotomiespalt**

Kein Präparat zeigte eine knöcherne Überbrückung des Osteotomiespalt.

### **5. Osteomiespalt und -rand**

Im Osteotomiespalt waren Bindegewebe und hyaliner Knorpel die dominierenden Gewebetypen. Hämatomreste waren nur noch vereinzelt zu finden. Die Geflechtknochensynthese war im Vergleich zu den vorherigen Zeitpunkten weiter fortgeschritten und resultierte in einer sichtlichen Verengung des Osteotomiespalt. Es war eine deutliche Zunahme an hyalinem Knorpel zu verzeichnen und zwischen den Geflechtknochenzubildungen konnte Faserknorpel festgestellt werden.

Auffallend war ein gelenkähnlicher Spalt (Abb. 22), der bis in den periostalen Raum parallel durch den Osteotomiespalt zog. Das Lumen dieses Spalt wurde durch eine basallaminaähnliche Membran abgegrenzt. Diese Membran hatte eine rötliche Färbung, die der Färbung des Hämatoms sehr ähnlich war und bestand aus einer ein- bis mehrreihigen Schicht runder Zellen.

Die kortikalen Osteotomiespaltränder waren im Vergleich zu den vorherigen Zeitpunkten aufgelockerter. Bei zwei Tieren stellten sich die Osteotomiespaltränder halbkreisförmig dar.

### **6. Kallusvorkommen und -zusammensetzung**

Der periostale Kallus nahm an den Kortizes, die einen engeren Kontakt zueinander aufwiesen, imposant an Volumen zu. Der Anteil an Geflechtknochen sowie an hyalinem Knorpel nahm weiter zu. Hinzu kam das Auftreten von Faserknorpel. Geflechtknochen bildete sich nicht nur periostal, sondern auch an den kortikalen Osteotomiespalträndern.

## **7. Geflechtknochentrabekel**

Die Geflechtknochentrabekel erschienen nun wesentlich kompakter im Vergleich zu den früheren Zeitpunkten und waren meist mit Osteoblasten besetzt (Abb. 18). Im Vergleich zum Dreiwochenzeitpunkt war die trabekuläre Orientierung bei allen Präparaten sehr inhomogen. Der periostale Kallus der sich an allen kortikalen Seiten bildete, war ab dem Sechswochenzeitpunkt nur noch an den zentralen Seiten vorhanden, wohingegen dieser an den äußeren Kortikalisoberflächen bereits abgebaut wurde.

## **9 Wochen post operationem**

### **1. Fragmentverschiebung**

Generell war die Fragmentverschiebung mit der zum Sechswochenzeitpunkt vergleichbar. Bei fünf Tieren konnte nur ein Kortikalisfragment nachgewiesen werden. Gegenüber diesen Fragmenten befanden sich größere Massen an neu gebildetem Geflechtknochen. Drei Präparate wiesen jeweils nur drei Kortizes in der histologischen Schnittebene auf.

### **2. Knorpelverteilung**

Mit Ausnahme eines Präparates konnte in allen übrigen Präparaten dieser Gruppe sowohl hyaliner als auch Faserknorpel nachgewiesen werden. Auffallend war, dass die Menge an beiden Knorpelarten deutlich im Vergleich zu den früheren Zeitpunkten zunahm. Das Vorkommen von Faserknorpel war allerdings noch ausgeprägter als das des hyalinen Knorpels. Beide Knorpelarten kamen mit Ausnahme eines Präparates ausschließlich im Osteotomiespalt vor. Bei diesem Präparat konnte hyaliner Knorpel periostal am Rand der Kallusfront nachgewiesen werden, die sich in unmittelbarer Nachbarschaft zum Osteotomiespalt befand. Neu hingegen war, dass sich hyaliner Knorpel jetzt häufiger zwischen den neu gebildeten Geflechtknochenbälkchen nah am Osteotomiespalt ausbreitete. Vergleichbar zum Sechswochenzeitpunkt war der Faserknorpel eher mittig im Osteotomiespalt in einiger Entfernung zu den Kortizes, hyaliner Knorpel immer kortikalisnah, zu finden.

### **3. Hämatomvorkommen**

Im Vergleich zu den früheren Zeitpunkten konnten nur noch minimale Hämatomreste im Osteotomiespalt nachgewiesen werden.

### **4. Knöcherne Überbrückung des Osteotomiespalt**

Kein Präparat zeigte eine knöcherne Überbrückung des Osteotomiespalt (Abb. 17). In zwei Präparaten konnte an mehreren kleineren Abschnitten eine knorpelige Überbrückung des Osteotomiespalt in Form von hyalinem Knorpel dokumentiert werden (Abb. 23).

### **5. Osteotomiespalt und -rand**

Zum Neunwochenzeitpunkt war Faserknorpel das vorherrschende Gewebe im Osteotomiespalt. Im Vergleich zu den früheren Zeitpunkten waren der Anteil an hyalinem Knorpel größer und der Anteil an Bindegewebe geringer. Es konnten nur kleinere Hämatomreste nachgewiesen werden. Auffallend war das Erscheinen von neu gebildeten Gefäßen, die diffus verteilt über den gesamten Osteotomiespalt anzutreffen waren. Gehäuft kamen sie jedoch über dem auch hier zu beobachteten Spalt vor. Dieser zog bei vier Tieren durch den Osteotomiespalt, er dehnte sich allerdings nur noch bei einem der vier Tiere bis in den periostalen Raum aus. Die Abrundung der Osteotomiespaltländer war im Vergleich zu den vorherigen Zeitpunkten weiter fortgeschritten, besonders an den Kortizes, die weiter entfernt lagen. Teilweise war die Abrundung der Osteotomiespaltländer derart ausgeprägt, dass diese eine halbkreisförmige Morphologie aufwiesen (Abb. 21).

### **6. Kallusvorkommen und -zusammensetzung**

Der Kallus hatte nun einen überwiegend knorpeligen Charakter, wobei der Anteil an Faserknorpel gegenüber dem an hyalinem Knorpel überwog. Der Anteil an Geflechtknochen nahm weiterhin zu, der an Bindegewebe ab. Eine geringfügige Volumenzunahme des periostalen Kallus war nur noch an seiner Front, die sich in Richtung Osteotomiespalt orientierte, zu verzeichnen. Auffallend war das Auftreten von fettmarkähnlichen Vakuolen, die in großen Lakunen im Kallus vorkamen (Abb. 24). In drei Präparaten waren diese Vakuolen im periostalen, in einem Präparat im

endostalen Kallus zu beobachten. Zwischen diesen Vakuolen verliefen kleine, häufig nicht zusammenhängende Geflechtknochen trabekel.

#### **7. Geflechtknochen trabekel**

Die Geflechtknochen trabekel wirkten bis auf die Bereiche, die mit den fettmarkähnlichen Vakuolen versehen waren, sehr kompakt. Sie waren teilweise zu einer einzigen Masse zusammengelagert.

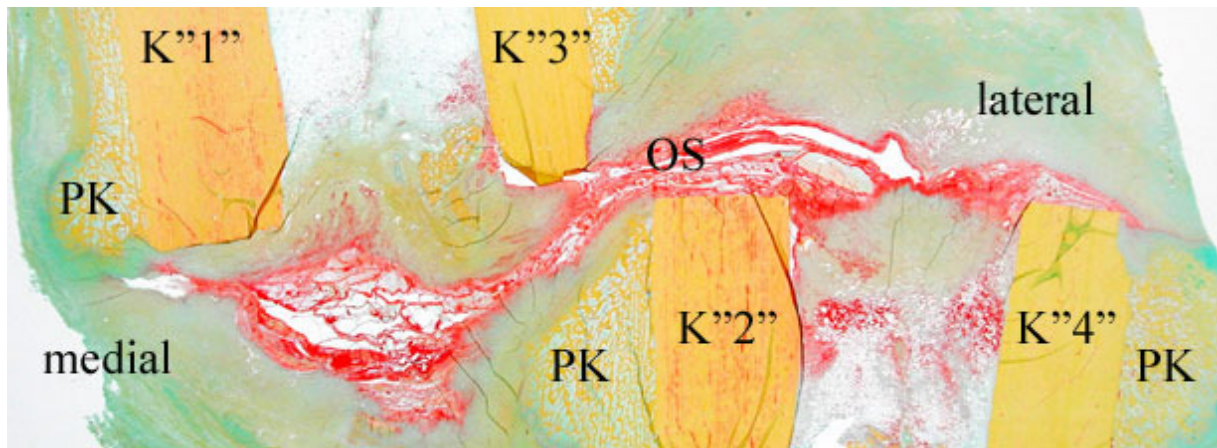


Abb. 13: Übersichtsaufnahme der Osteotomiezone 3 Wochen post OP. K'1'' bis K'4'' markieren die kortikalen Knochenfragmente, PK den periostalen knöchernen Kallus, OS den Osteotomiespalt, Movat- Pentachrom-Färbung (MP-Färbung).

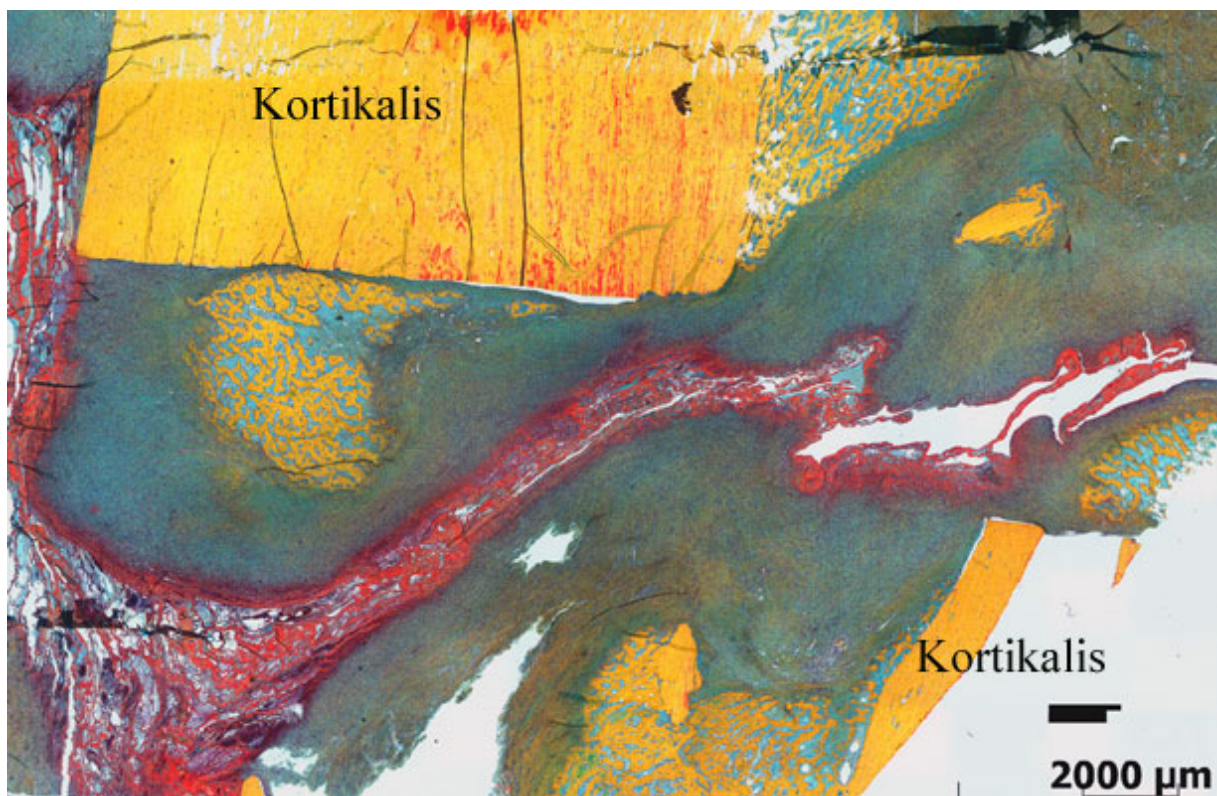


Abb. 14: Übersichtsaufnahme mit extremer Verschiebung der kortikalen Knochenfragmente mit nur 2 Kortizes 3 Wochen post OP, MP-Färbung.





Abb. 15: Übersichtsaufnahme des Hämatomvorkommens 2 Wochen post OP, MP-Färbung.

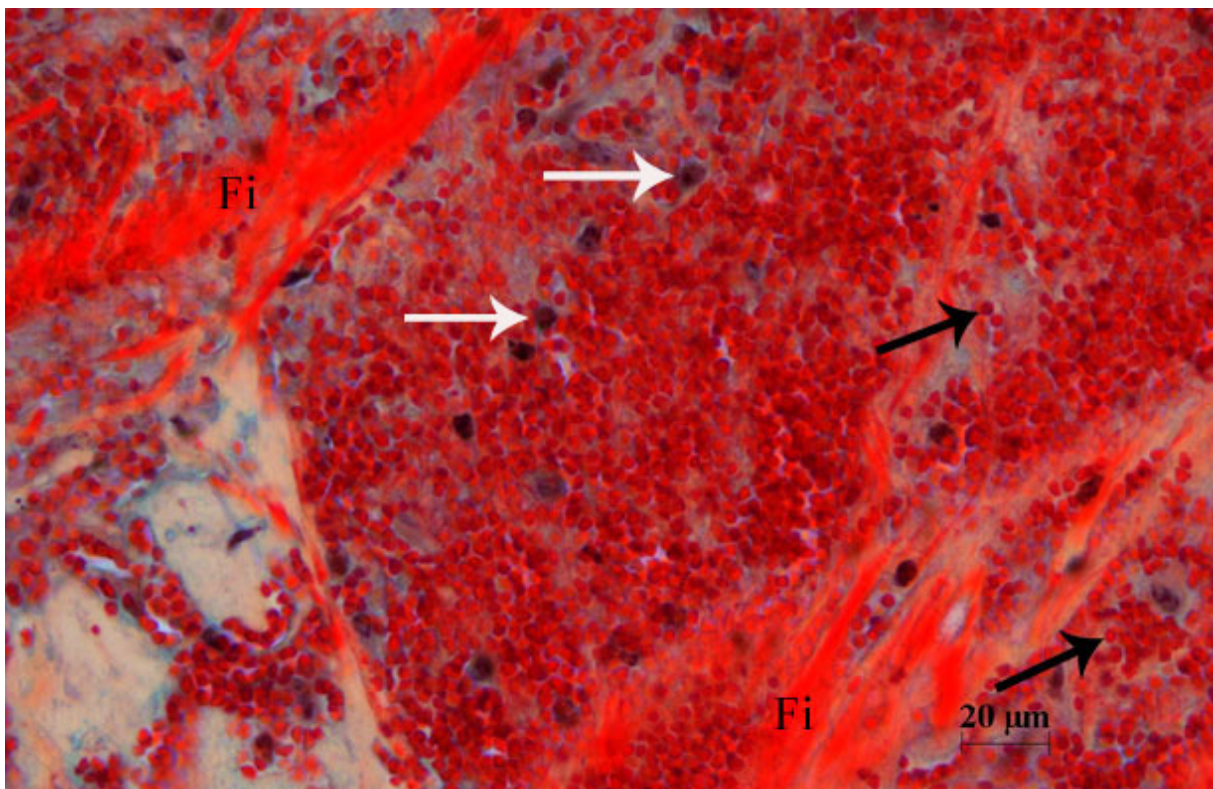


Abb. 16: Ausschnittsvergrößerung des Hämatoms, Erythrozyten (schwarze Pfeile), Leukozyten (weiße Pfeile), Fibrin (Fi), MP-Färbung.



Abb. 17: Fehlende knöcherne Überbrückung des Osteotomiespaltes (OS) 9 Wochen post OP, MP-Färbung.

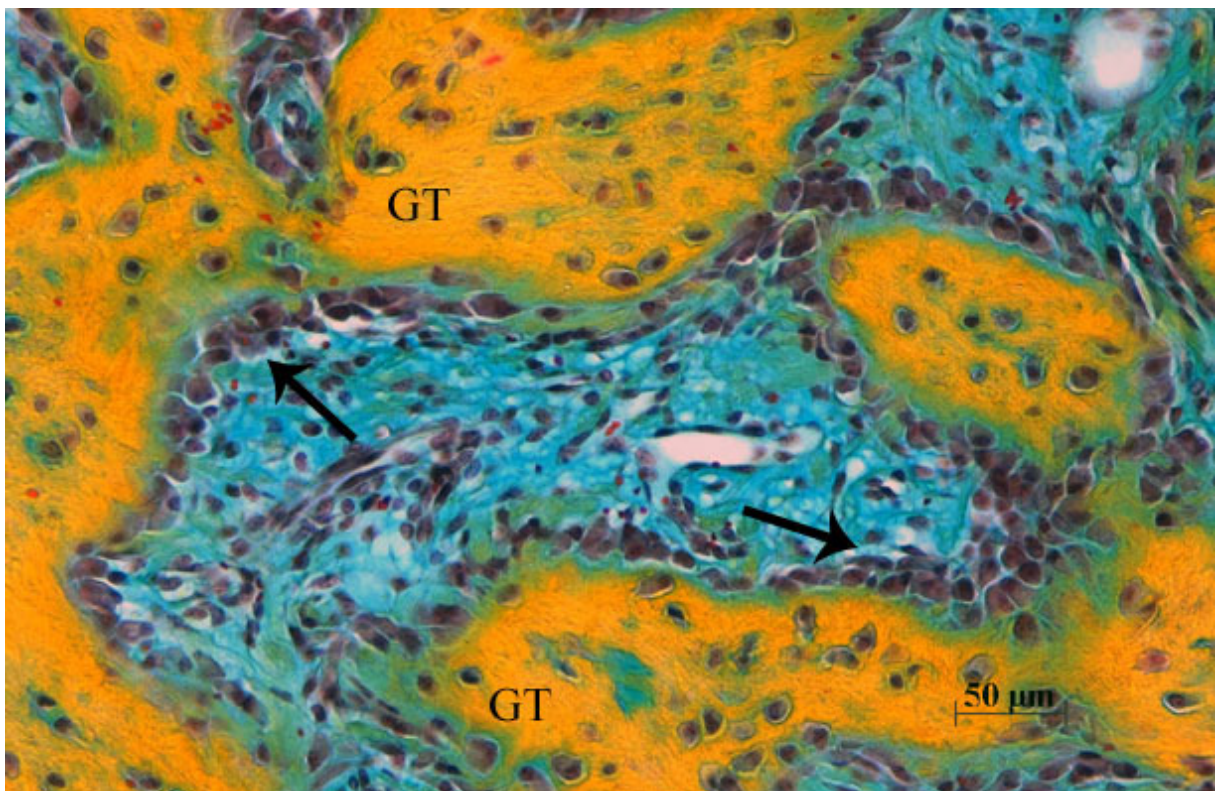


Abb. 18: Geflechtknochentrabekel (GT) mit Osteoblastensaum (Pfeile) 6 Wochen post OP, MP-Färbung.

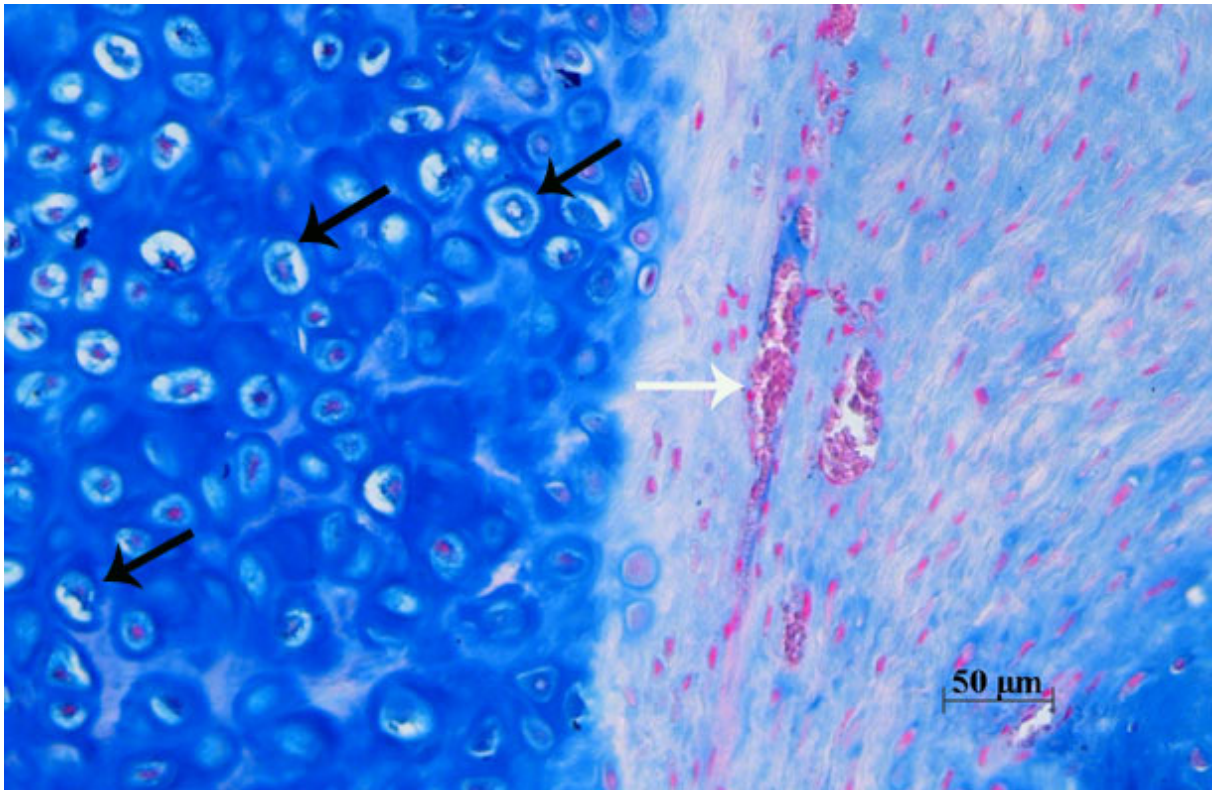


Abb. 19: Hyaliner Knorpel (schwarze Pfeile), Blutgefäß (weißer Pfeil) 6 Wochen post OP, Alcian Blau-Färbung.

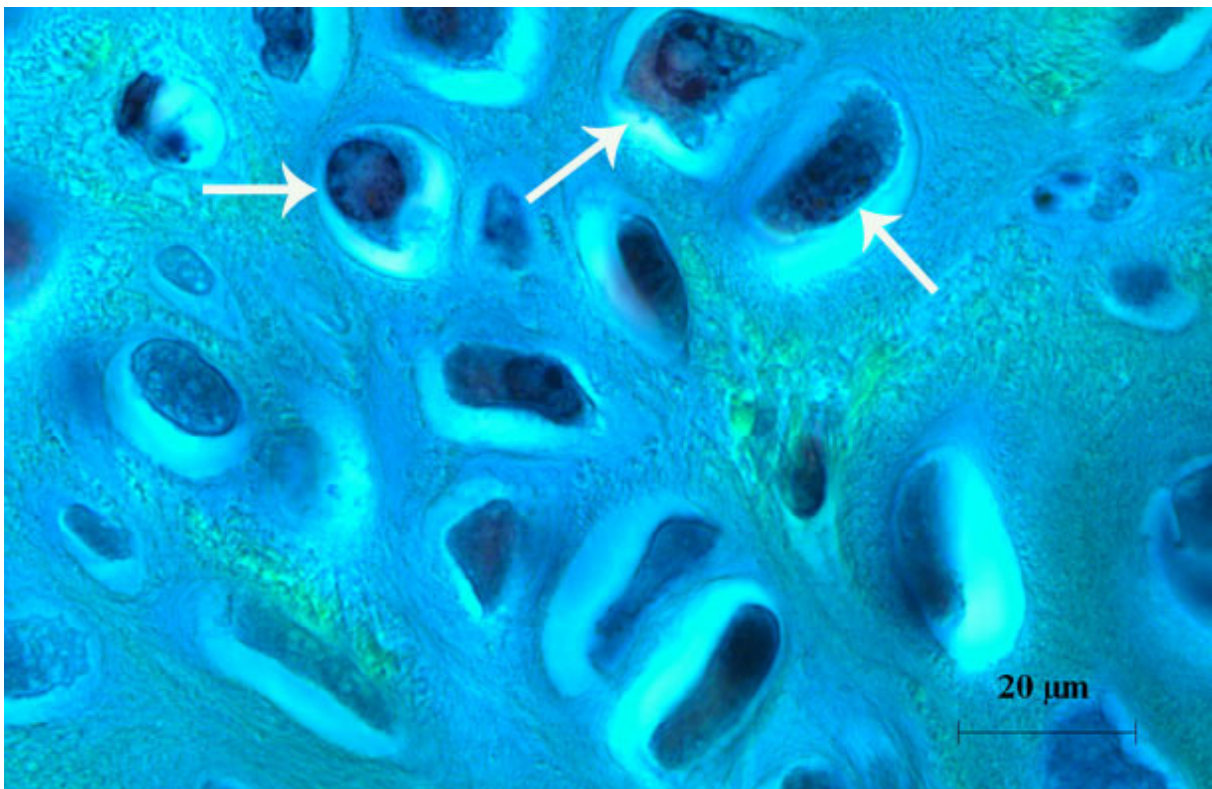


Abb. 20: Hypertrophe Chondrozyten (Pfeile) im periostalen Kallus 6 Wochen post OP, MP-Färbung.

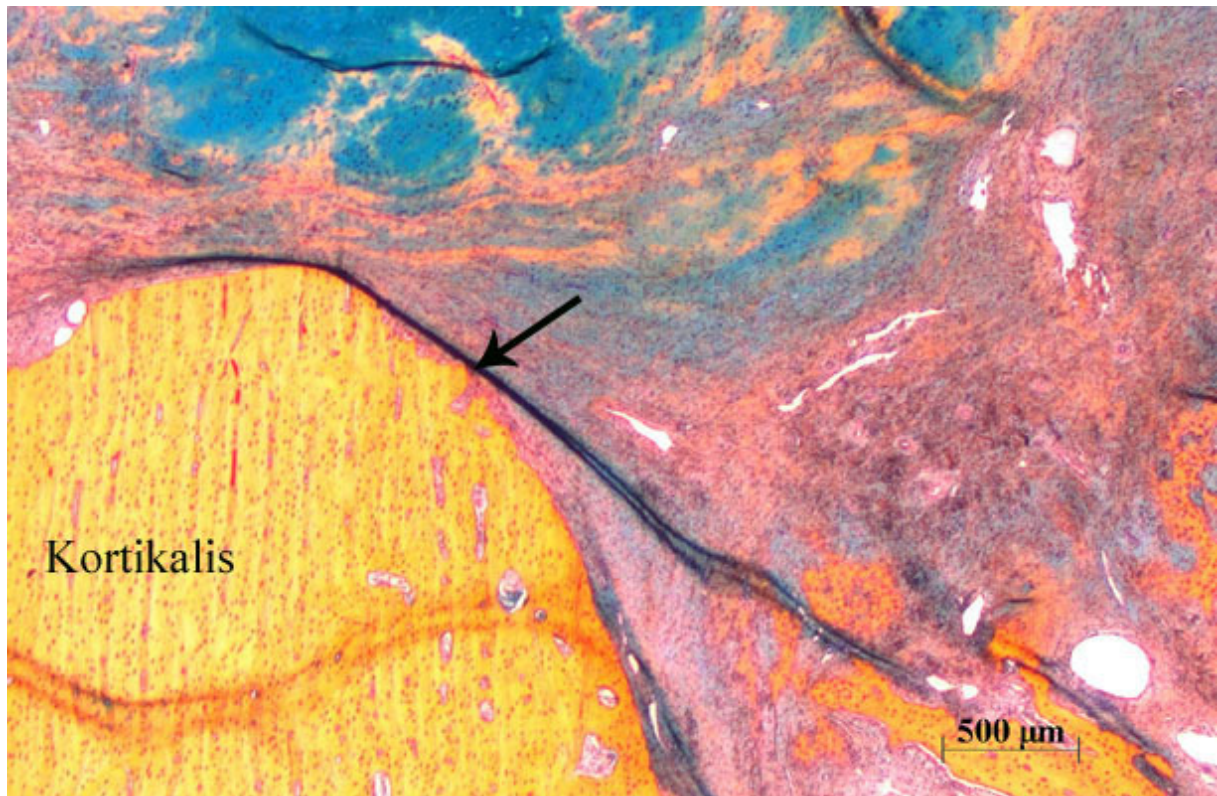


Abb. 21: Halbkreisförmiger Osteotomiespaltrand der Kortikalis (Pfeil) 9 Wochen post OP, MP-Färbung.

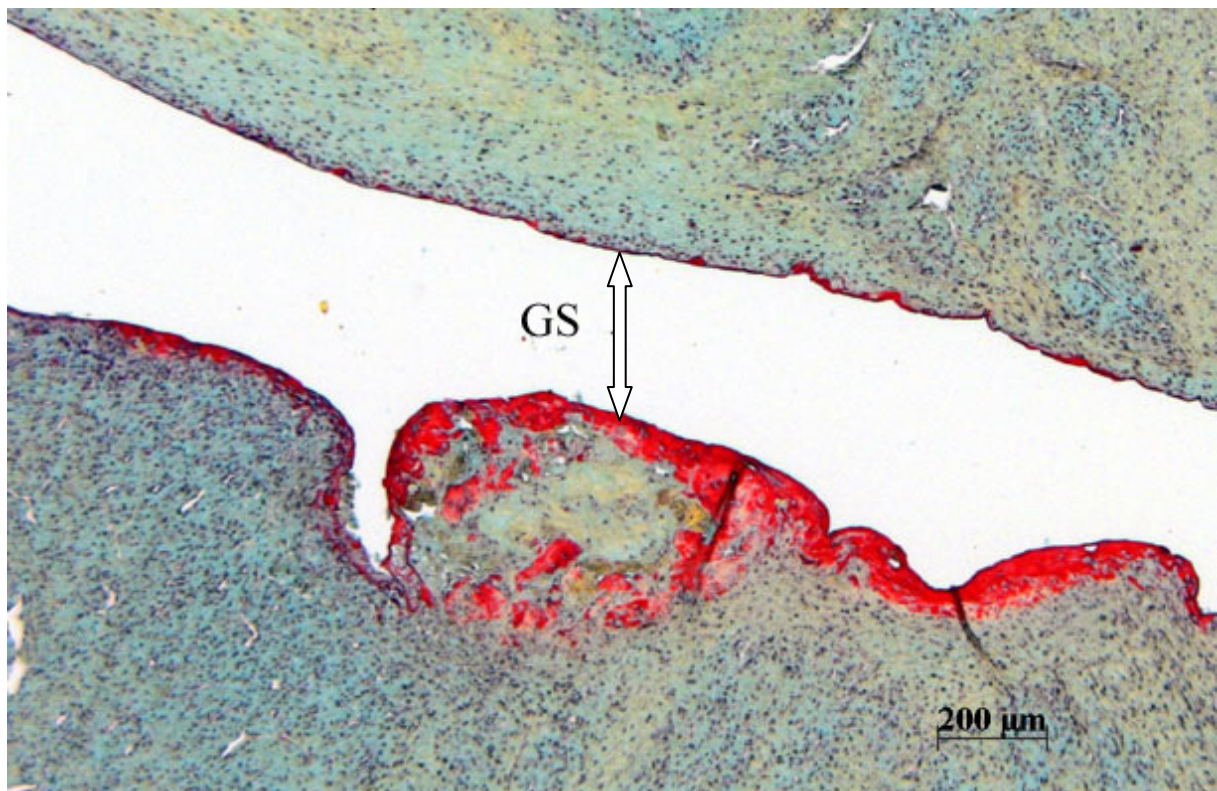


Abb. 22: Gelenkähnlicher Spalt (GS-Doppelpfeil) 9 Wochen post OP, MP-Färbung.

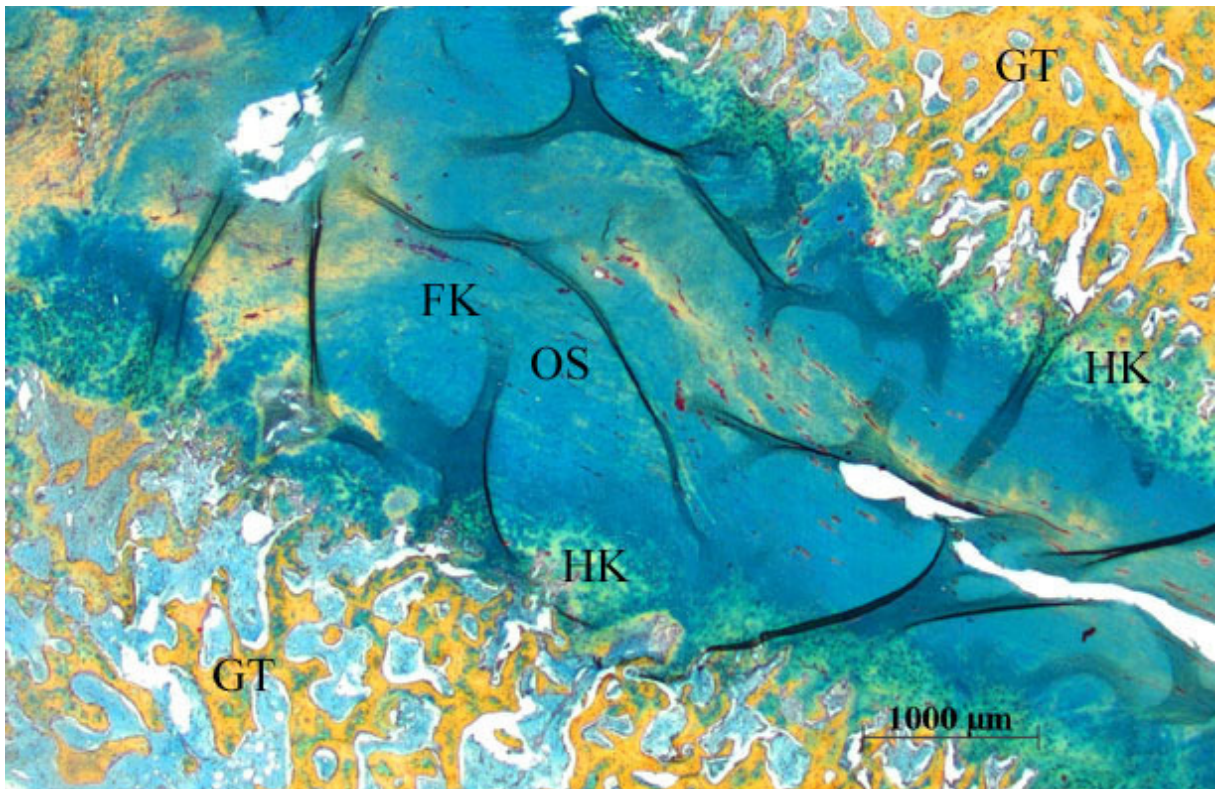


Abb. 23: Knorpelige Überbrückung des Osteotomiespalt (OS) 9 Wochen post OP, GT=Geflechtknochen trabekel, HK=hyaliner Knorpel, FK=Faserknorpel, MP-Färbung.

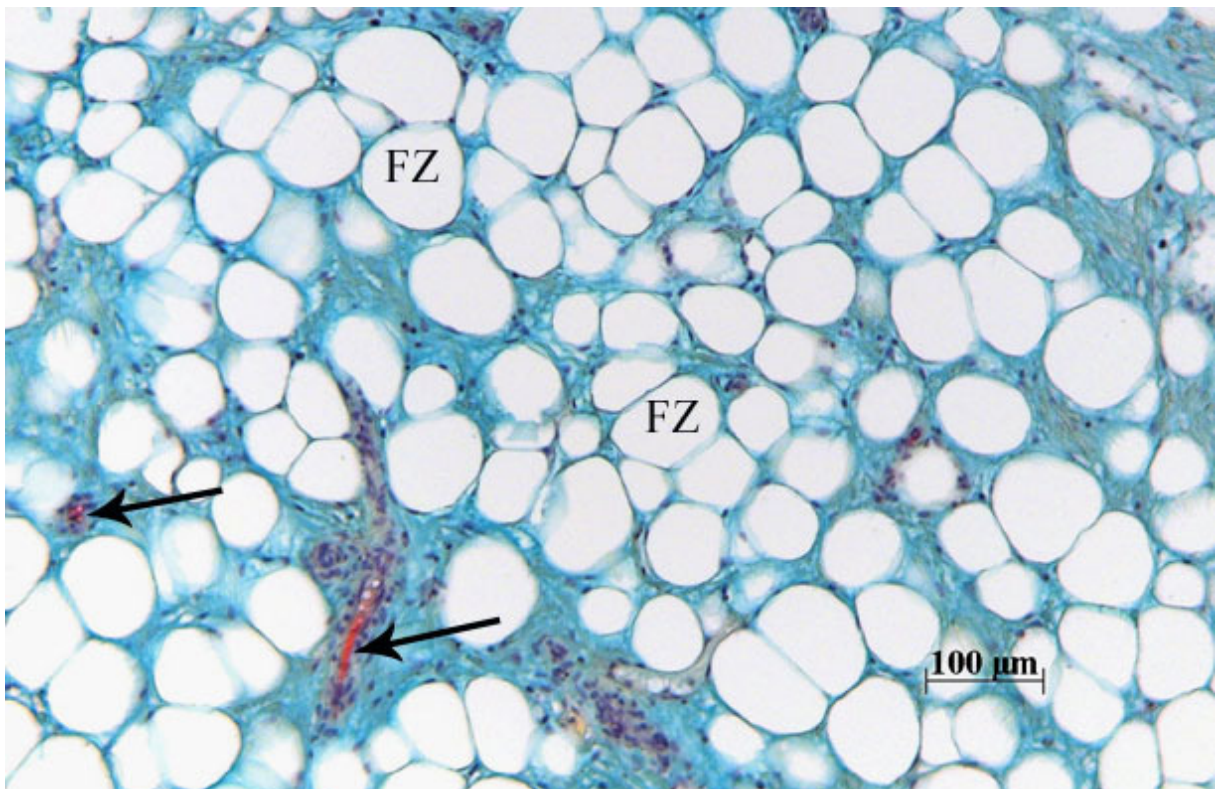


Abb. 24: Fettmarkähnliches Gewebe mit univakulären Fettzellen im periostalen Kallus (FZ), Pfeile=Blutgefäße 9 Wochen post OP, MP-Färbung.

### 4.3 Ergebnisse der histomorphometrischen Analyse

In die bildanalytische Auswertung gingen sämtliche acht Tiere aller vier Untersuchungszeitpunkte ein. Pro Tier wurde ein nach Movat-Pentachrom gefärbtes Präparat analysiert. Untersucht wurde jeweils der prozentuale Anteil an Hämatom und Knorpel im Kallus sowie der Gesamtbindegewebsanteil in mm<sup>2</sup>.

- Histomorphometrische Analyse des Hämatomanteils im Kallus über den Heilungsverlauf (Abb. 25)

Der prozentuale Hämatomanteil im Kallus zeigte sein Maximum zum Zweiwochenzeitpunkt 35,89 [14,88- 46,71] %. Es zeigte sich ein signifikanter Abfall im Hämatomanteil im Kallus von der zweiten bis zur sechsten Woche postoperativ ( $p \leq 0,007$ ). In der sechsten und neunten postoperativen Woche waren nur noch geringe Hämatomreste im Kallus zu finden.

- Histomorphometrische Analyse des Knorpelanteils im Kallus über den Heilungsverlauf (Abb. 26)

Der prozentuale Knorpelanteil im Kallus war zum Anfang der Untersuchung nur geringgradig ausgeprägt und stieg auch bis zum Sechswochenzeitpunkt nur dezent an. Zwischen dem Sechswochenzeitpunkt und dem Neunwochenzeitpunkt war zwar ein deutlicher Anstieg zu verzeichnen, allerdings ohne einen statistisch signifikanten Unterschied. Zum Sechswochen- und Neunwochenzeitpunkt zeigten sich sehr große interindividuelle Unterschiede im knorpeligen Kallusanteil.

- Histomorphometrische Analyse der Gesamtbindegewebsfläche im Kallus über den Heilungsverlauf (Abb. 27)

Die Bindegewebsfläche im Kallus zeigte eine signifikante Zunahme zwischen der zweiten und dritten postoperativen Woche ( $p=0,015$ ), gefolgt von einer signifikanten Abnahme zur sechsten Woche ( $p=0,007$ ). Zwischen dem Sechswochenzeitpunkt und dem Neunwochenzeitpunkt zeigte sich erneut ein Abfall in der Bindegewebsfläche im Kallus.

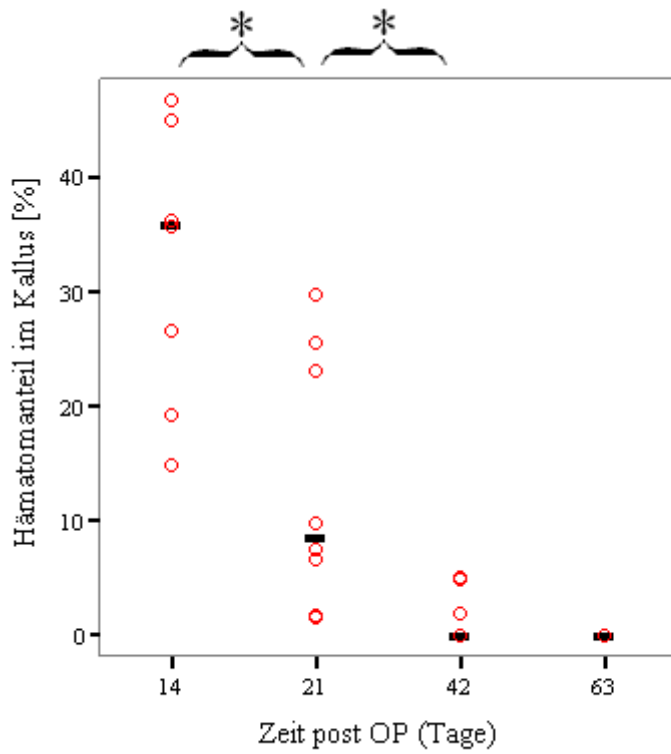


Abb. 25: Darstellung des prozentualen Hämatomanteils im Kallus über den Heilungsverlauf. Statistisch signifikante Unterschiede ergaben sich zwischen zwei und drei Wochen ( $p=0,007$ ) sowie drei und sechs Wochen ( $p=0,004$ ) post OP.

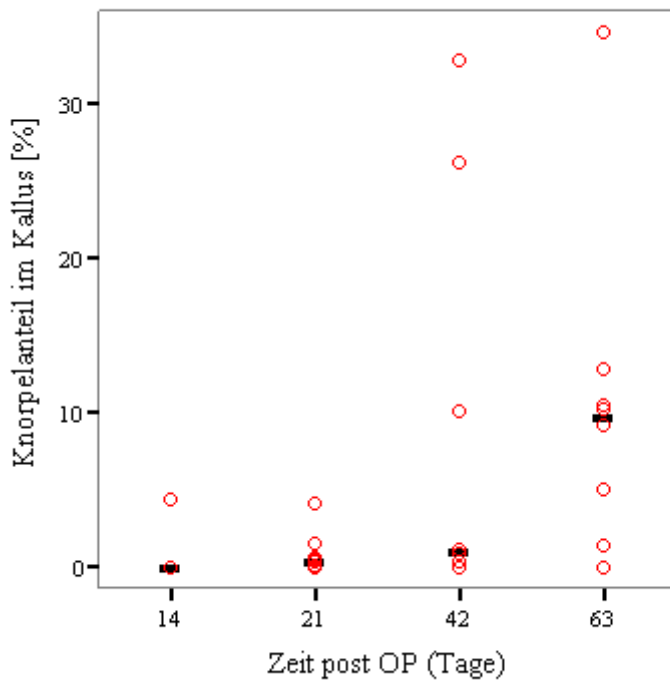


Abb. 26: Darstellung des prozentualen Knorpelanteils im Kallus ( $n=8$ /Gruppe) über den Heilungsverlauf.

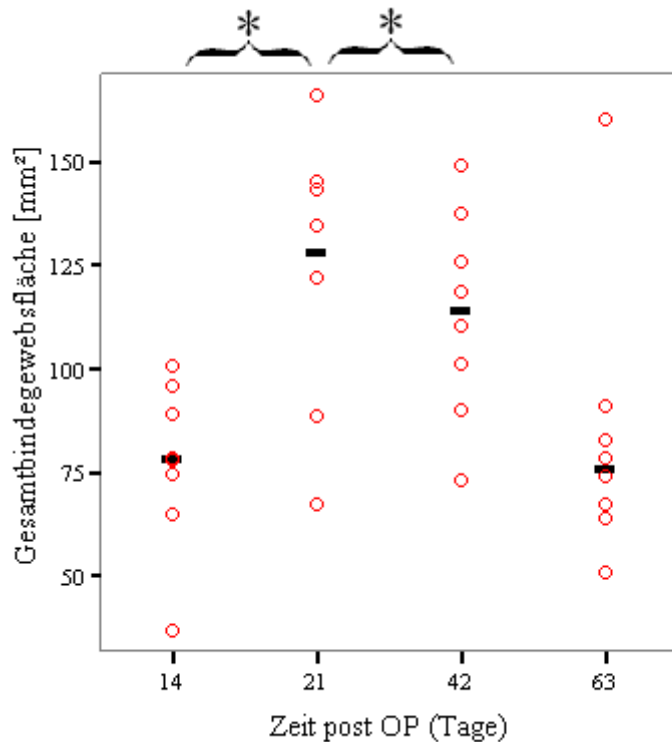


Abb. 27: Darstellung der Gesamtbindegewebsfläche im Kallus über den Heilungsverlauf. Statistisch signifikante Unterschiede ergaben sich zwischen zwei und drei ( $p=0,015$ ) sowie zwischen drei und sechs Wochen ( $p=0,007$ ) post OP. ( $n=8$ /Gruppe).

#### 4.4 Ergebnisse der histologischen Analyse der Gefäßdichte im Kallus

In die folgende histologische Auswertung gingen zum Zweiwochenzeitpunkt drei Tiere, zum Dreiwochenzeitpunkt fünf Tiere und zu den Sechs- als auch Neunwochenzeitpunkten sämtliche acht Tiere ein. Pro Tier wurde ein  $\alpha$ -SMA gefärbtes Präparat analysiert.

Es zeigte sich ein geringer Anstieg der Gefäßdichte im Kallus bis zum Sechswochenzeitpunkt (Abb. 28). Die Gefäßdichte schloss sowohl kleine Gefäße ( $< 40 \mu\text{m}$ ) als auch große Gefäße ( $\geq 40 \mu\text{m}$ ) ein. Die statistische Auswertung ergab keine signifikanten Unterschiede in der Gefäßdichte zwischen den einzelnen Untersuchungszeitpunkten. Die Unterteilung der Gesamtgefäßdichte in kleine und große Gefäße machte deutlich, dass zu allen vier Untersuchungszeitpunkten die Dichte kleiner Gefäße deutlich über der Dichte großer Gefäße lag (Abb. 29). Generell ähnelte der zeitliche Verlauf der Dichte kleiner Gefäße dem zeitlichen Verlauf der Gesamtgefäßdichte.



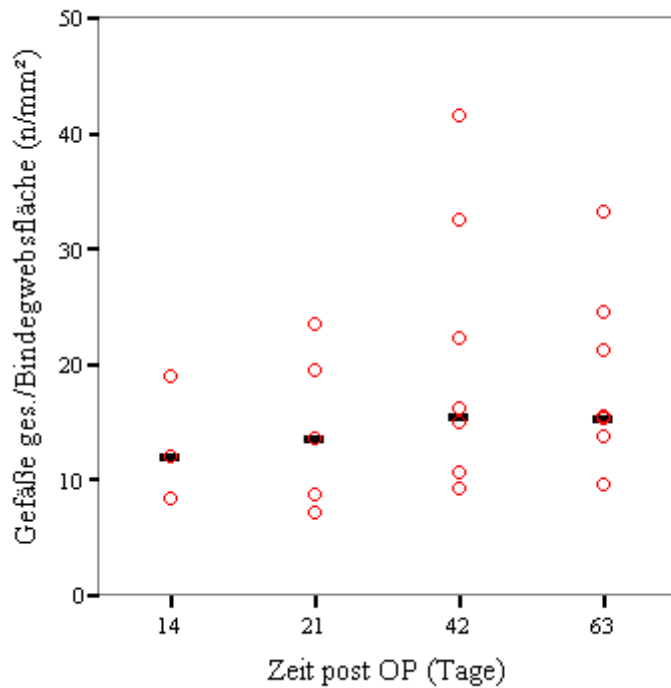


Abb. 28: Darstellung der Gesamtanzahl der Gefäße/Bindegewebsfläche (Gefäßdichte) ohne statistisch signifikante Unterschiede (2 Wo. n=3; 3 Wo. n=5; 6 und 9 Wo. n=8/Gruppe).

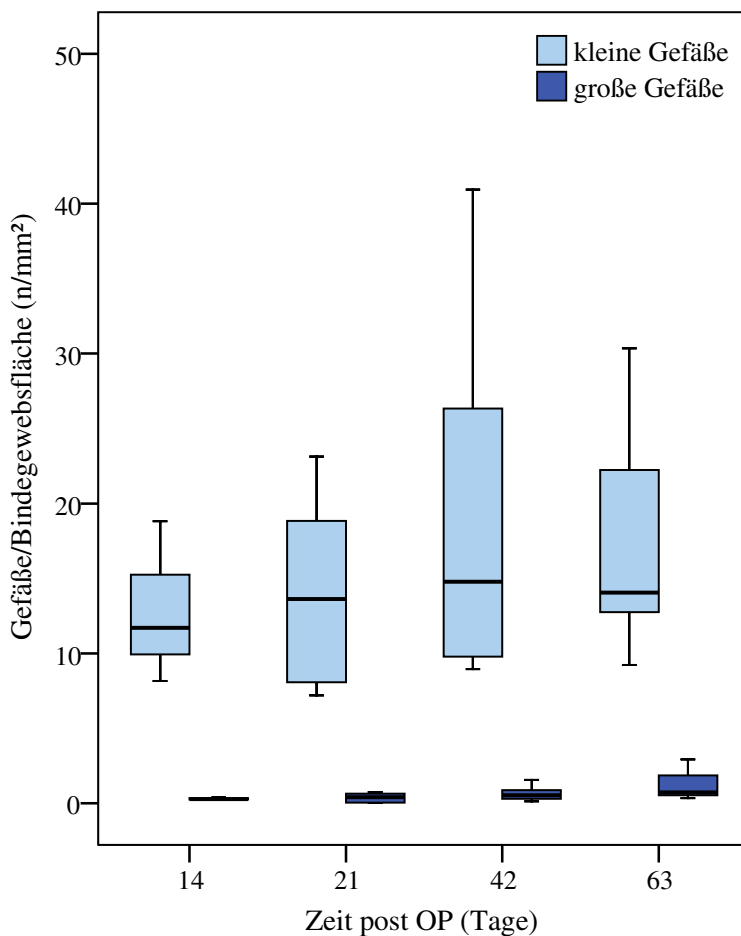


Abb. 29: Darstellung der Gesamtanzahl der kleinen und großen Gefäße/Bindegewebsfläche ohne statistisch signifikante Unterschiede (2 Wo. n=3; 3 Wo. n=5; 6 und 9 Wo. n=8/Gruppe).

#### 4.5 Deskriptive Histologie CYR61-Färbung

Das CYR61 Protein konnte bei allen Tieren zu allen vier Untersuchungszeitpunkten durch eine deutliche Rotfärbung in Fibroblasten, Fibrozyten (Abb. 34), Osteoblasten (Abb. 32), Osteoklasten (Abb. 33) sowie in hypertrophen Chondrozyten (Abb. 30) nachgewiesen werden. Die Präimmunsersum-Färbung (Negativkontrolle) zeigte keinerlei rote Färbung o.g. Zellen (Abb. 31).

Aus der reinen Betrachtung der histologischen Schnitte lässt sich keine Aussage über eine mögliche Änderung der CYR61-Expression über den Heilungsverlauf treffen. Ebenfalls erfolgte keine quantitative Auswertung der Immunfärbung.

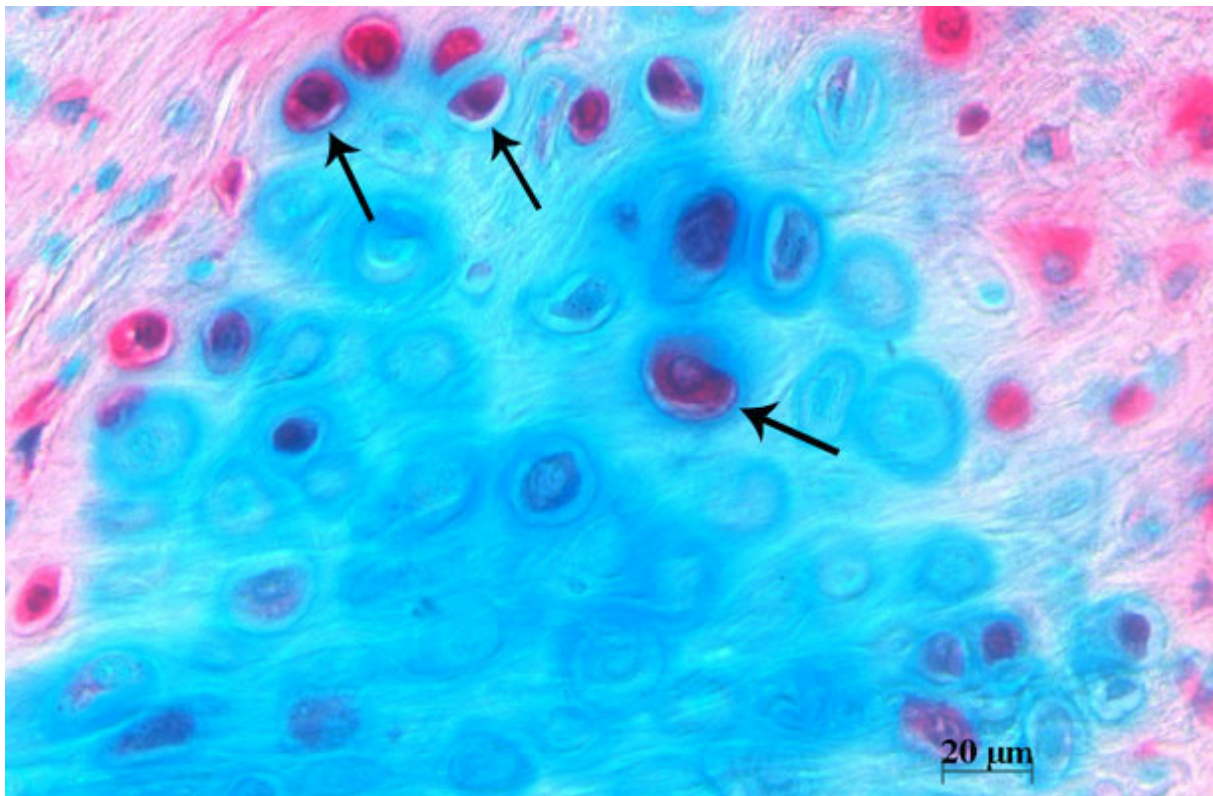


Abb. 30: Hypertrophe Chondrozyten (Pfeile) 9 Wochen post OP, CYR61-Färbung.

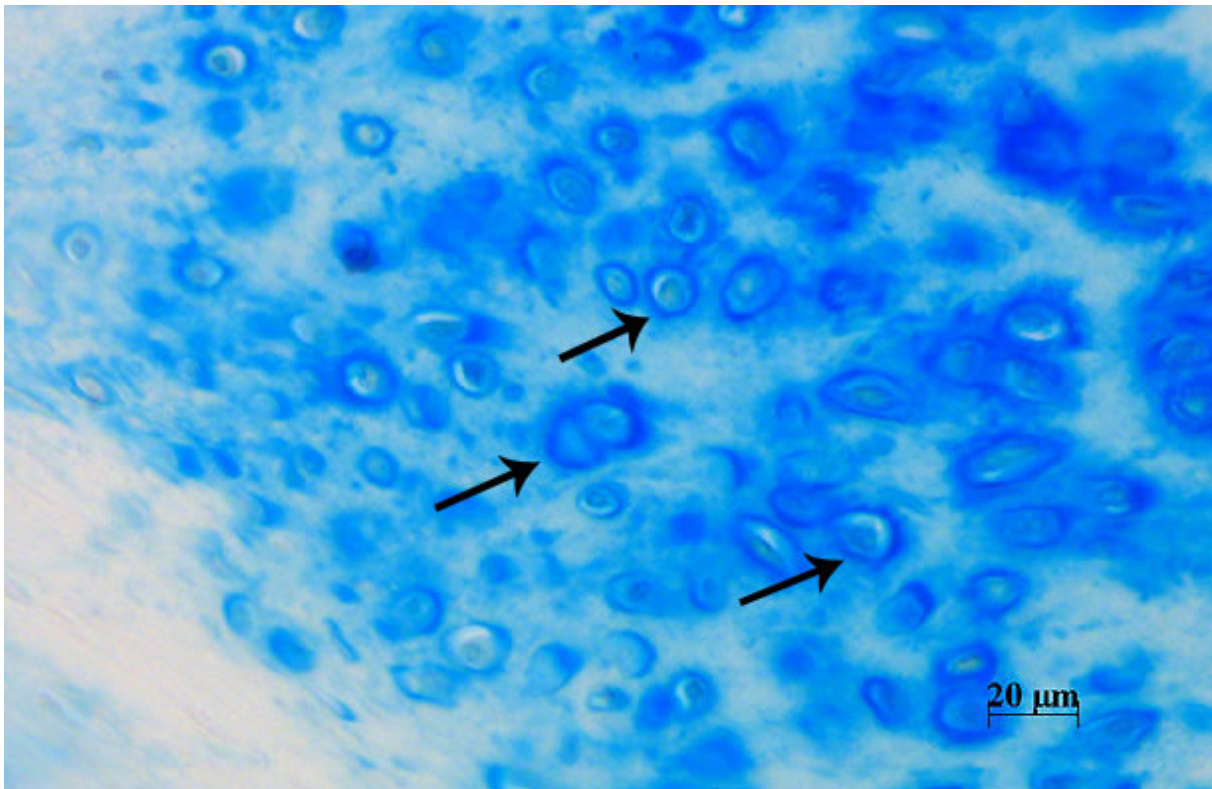


Abb. 31: Hypertrophe Chondrozyten (Pfeile) 9 Wochen post OP, PIS-Färbung (Präimmunserum-Färbung).

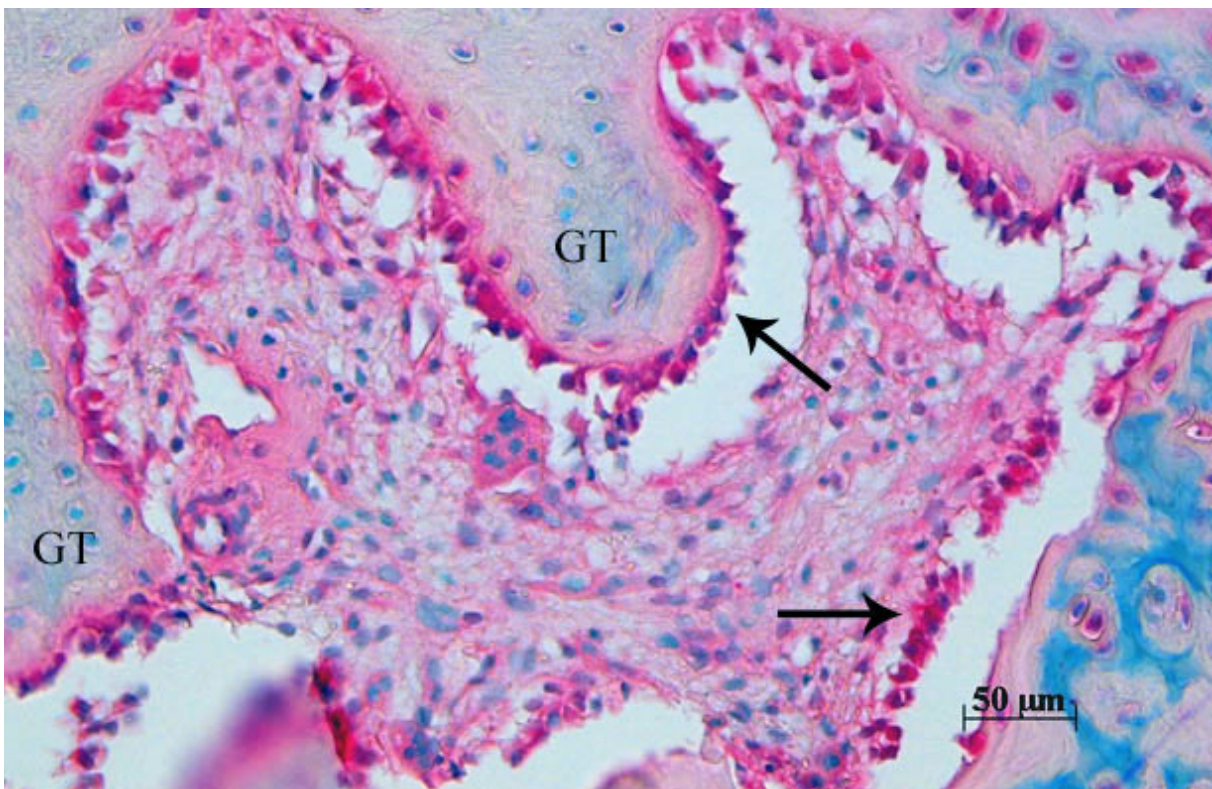


Abb. 32: Geflechtknochen trabekel (GT) mit Osteoblastensaum (Pfeile) 9 Wochen post OP, CYR61-Färbung.

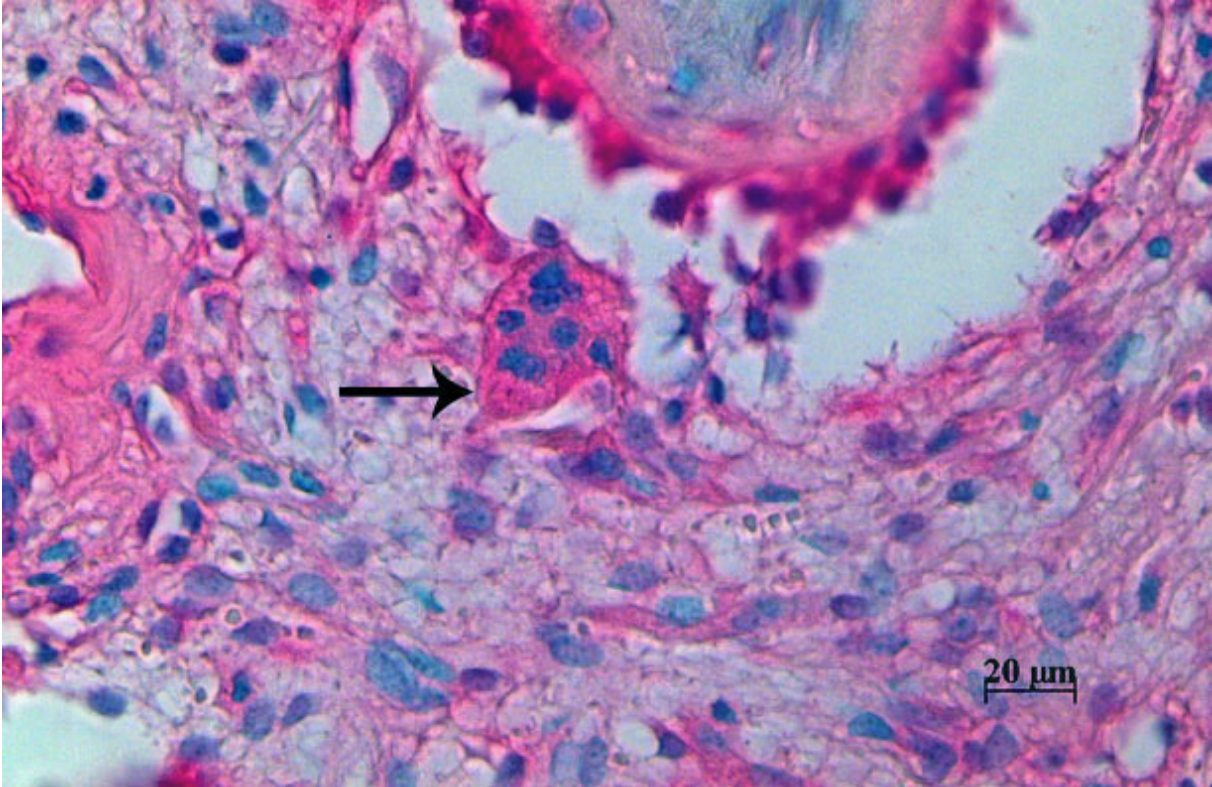


Abb. 33: Osteoklast (Pfeil) 9 Wochen post OP, CYR61-Färbung.

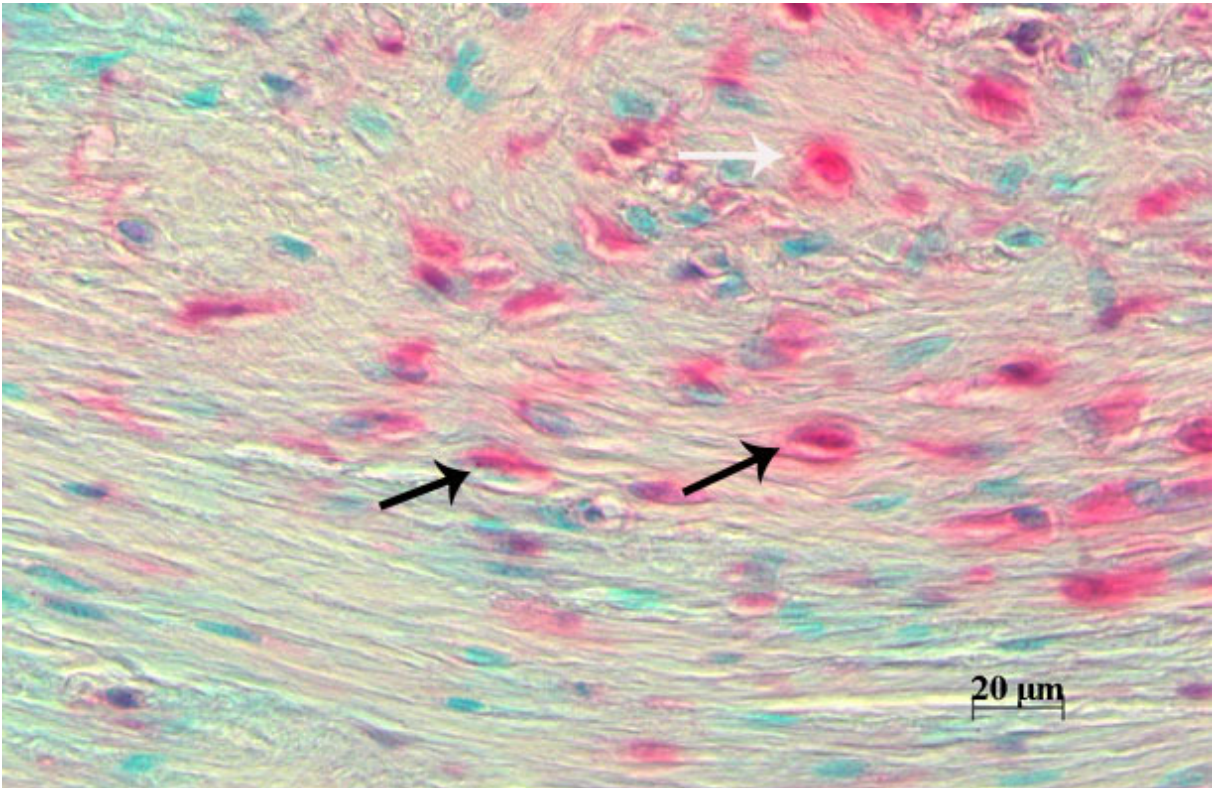


Abb. 34: Fibrozyten (schwarze Pfeile) und ein Fibroblast (weißer Pfeil) im Bindegewebe 9 Wochen post OP, CYR61-Färbung.

## 5 Diskussion

Immer noch weisen einige Patienten trotz aller Fortschritte, die innerhalb der vergangenen 50 Jahre in der Behandlung von Frakturen erzielt wurden, Frakturheilungsstörungen auf. Diese Tatsache und der Wunsch nach immer schnellerer Rehabilitation ohne Funktionsverlust macht auch weiterhin unfallchirurgische Forschung mit dem Ziel einer Verbesserung der Frakturheilung erforderlich (Haas, 2000).

Es gibt zahlreiche Faktoren, die für eine verzögerte Frakturheilung verantwortlich sind. So können Stabilisierungen des Knochens unter übermäßig flexibler oder auch zu rigider Fixation den Heilungsprozess hemmen bzw. verzögern, denn eine überschießende oder auch ungenügende Kallusbildung kann in einer verzögerten oder gar ausbleibenden Heilung resultieren (Claes et al., 1997). Auch die Größe des Frakturspalt hat einen immensen Einfluss auf die Frakturheilung. Aus Studien an Schafen von Claes et al. (1993) ging hervor, dass Frakturspaltweiten von 1 mm sehr schnell überbrücken und interfragmentäre Bewegungen bis zu einer Größe von 31 % der Spaltbreite die Kallusbildung und die Biegefähigkeit des Knochens verbessern. Unter der Frakturversorgung mit einem Fixateur externe im Schafmodell scheint eine Frakturspaltbreite ab 1,8 mm die Heilung zu verzögern (Claes et al., 1993). Auch der Einfluss von Scherbewegungen auf den Heilungsverlauf wird allgemein kontrovers diskutiert. Es gibt experimentelle Arbeiten, die der Ansicht sind, dass axiale Bewegungen einen positiven (Kenwright et al., 1986, Claes et al., 1995) und Scherbewegungen (Rotationsinstabilität) einen schädigenden Einfluss auf die Frakturheilung haben (Yamagishi und Yoshimura, 1955). Andererseits vertreten Park und Mitarbeiter (1988) die Meinung, dass sich auch Scherbewegungen positiv auf die Frakturheilung auswirken.

Ziel dieser Studie war es, die Knochenheilung mit Fokussierung auf die Entwicklung des so genannten weichen Kallus nach standardisierter Tibia-Osteotomie anhand eines neu entwickelten kritisch-scherweichen Fixateur externe histologisch, immunhistochemisch sowie histomorphometrisch zu untersuchen. Anhand der o.g. Methoden wurde der Heilungsverlauf zu unterschiedlich ausgewählten Standzeiten (zwei, drei, sechs und neun Wochen) histologisch charakterisiert.

Die eingangs aufgestellte Hypothese, dass der Osteotomiespalt nach zwei bis drei Wochen post operationem überwiegend mit Hämatom gefüllt sein soll, konnte bestätigt werden. Anfangs füllte das Hämatom den Osteotomiespalt über die gesamte Breite gänzlich aus, aber schon sechs Wochen post operationem waren nur noch bei sechs der acht Tiere Reste des Hämatoms im Osteotomiespalt zu sehen.

Die zweite Hypothese lautete, dass ein voluminöser Kallus in der sechsten Woche überwiegend bindegewebig, in der neunten Woche hingegen knorpelig ausgebildet sein soll. Auch dies konnte histologisch sowie histomorphometrisch bestätigt werden.

Weiterhin wurde erwartet, dass es innerhalb der neunwöchigen Heilung zu keiner knöchernen Überbrückung des Osteotomiespaltes kommt. Auch diese Hypothese konnte verifiziert werden. Nur bei zwei der acht Tiere konnte an mehreren kleinen Abschnitten eine knorpelige Überbrückung des Osteotomiespaltes in Form von hyalinem Knorpel nachgewiesen werden, eine knöcherne Überbrückung hingegen fand nicht statt.

## **5.1 Diskussion von Material und Methoden**

### **5.1.1 Tiermodell**

Für diese Studie zur verzögerten Frakturheilung wurde das Schaf als Versuchstier gewählt. Einerseits hat sich das Schaf als Tiermodell in der orthopädischen Forschung bewährt, andererseits wird mit dem Schaf als Versuchstier auf Vorgängerprojekten aufgebaut und es kann somit an diese Forschungsergebnisse angeknüpft werden (Finlay et al., 1995, Duda et al., 2001, Schell et al., 2003, Klein et al., 2003). Da dieses Projekt der humanen Forschung dient, sollten die im Tierexperiment gewonnen Erkenntnisse möglichst auf Situationen des Menschen übertragen werden können. Aus diesem Grund sollten Tiermodelle gewählt werden, bei denen die zu untersuchenden Parameter denen des Menschen möglichst ähnlich sind (Roach et al., 1989). Stürmer und Schuchardt (1980) postulierten, dass die Tibia des Schafes funktionell gut mit der Tibia des Menschen zu vergleichen wäre, da sie als englumiger Röhrenknochen exakt in der Tragachse steht. Die Tibia des Schafes ähnelt auch in Form und Struktur der des Menschen und laut dem Wolffschen Gesetz kann man aus einer ähnlichen Form zweier Knochen auch auf eine ähnliche Belastung schließen.

Aus histologischer Sicht bestehen laut Eitel und Mitarbeiter (1981 b) systematische Unterschiede in der Osteonentopographie und der Lamellenstruktur des Knochengewebes zwischen Mensch und Schaf. Beim Menschen seien überwiegend Sekundärosteone, beim Schaf hingegen überwiegend Primärosteone, zu beobachten. Laut Pearce et al. (2007) ist bei Schafen erst ab einem Alter zwischen sieben und neun Jahren eine sekundäre Osteonenstruktur zu finden. Hinsichtlich der Sekundärosteone wären Hunde und Primaten besser für dieses Vorhaben geeignet, da sie dem Menschen ähnlich Sekundärosteone, auch schon in früherem Alter, aufweisen (Eitel und Mitarbeiter, 1981 a und b). Aufgrund ethischer Bedenken sowie verstärkten Drängens von Seiten der Tierschutzorganisationen wurde

Abstand von der Verwendung dieser Tierarten genommen (Eitel und Mitarbeiter, 1981 b, Nunamaker, 1998). Hinsichtlich der Knochenzusammensetzung kommen Aerssens und Mitarbeiter (1998) zu dem Schluss, dass Hund und Schwein die größten Ähnlichkeiten zu dem Menschen aufweisen, während die Ratte unter den häufig verwendeten Versuchstieren am weitesten von der humanen Knochenzusammensetzung abweicht. Laut Roach et al. (1989) sind die Geschwindigkeit und das Potential der Knochenheilung umgekehrt proportional zur evolutionären Entwicklung der Tierart. Daher benötigen größere Tiere wie Rind und Pferd eine längere Heilungszeit der Fraktur. Die mechanischen Eigenschaften eines Knochens unterschiedlicher Spezies seien mehr von der Funktion und seiner Größe abhängig, als von der Ähnlichkeit bzw. der Knochenzusammensetzung. Rind und Pferd besitzen zwar eine dem Menschen vergleichbare Heilungszeit, allerdings fanden diese Tiermodelle aufgrund eines sehr hohen finanziellen Aufwandes, im Hinblick auf Unterbringung und Versorgung sowie der hohen Anschaffungskosten, keine Verwendung (Roach et al., 1989). Ein weiterer Nachteil dieser Spezies liegt in ihrer Größe, die eine Verwendung handelsüblicher humanmedizinischer Implantate unmöglich macht.

Für die Wahl des Schafes als Tiermodell spricht weiterhin, dass das Schaf eine ähnlich lange Frakturheilungszeit aufweist wie der Mensch (Stürmer et al., 1980). Kleinere Versuchstiere wie Ratte oder Kaninchen weisen eine knöcherne Durchbauung der Frakturzone schon nach wenigen Wochen auf, während dies beim Schaf in Abhängigkeit der gewählten Frakturversorgung mindestens sechs bis acht Wochen dauert (Wu et al., 1984, Goodship et al., 1993).

Die für diese Studie ausgewählten Schafe entsprachen einander in Rasse, Alter, Geschlecht und Gewicht. Die Tiere wurden randomisiert in vier Gruppen à acht Tieren aufgeteilt. Die prä- und postoperativen Haltungsbedingungen waren für alle Tiere ebenso identisch wie die Operationsmethode sowie das verwendete Fixationssystem. Sämtliche Tiere wurden in Gruppen im selben Stall unter den gleichen Bedingungen gehalten. Ein Unterschied bestand lediglich in der unterschiedlich langen Standzeit. Etwaige Belastungen für die Tiere, die sich negativ auf das Untersuchungsergebnis hätten auswirken können, wurden durch eine Herdenhaltung sowie insbesondere durch ein behutsames Einfangen für die Behandlungen vermieden resp. minimiert.

Demnach wurde gewährleistet, dass die externen Bedingungen, die auf die Heilung der Osteotomie einwirkten und sie beeinflussten, identisch waren.

### 5.1.2 Versuchsaufbau

Der Versuchsaufbau orientierte sich an vorangegangenen Studien, die zwar ebenfalls am Schaf erfolgten, allerdings wurde eigens für dieses Projekt ein spezieller Rotationsfixateur angefertigt. Die Osteotomie erfolgte mit einem Osteotomiespalt von 3 mm im diaphysären Bereich der rechten Tibia. Aufgrund der günstigen anatomischen Gegebenheit wurde die mediale Seite der Tibia als Montageebene gewählt. Diese hatte zum Einen den Vorteil, dass dort der Rotationsfixateur ohne Traumatisierung der Muskulatur montiert werden konnte, zum Anderen konnte auf diese Weise eine standardisierte, komplikationslose Ausheilung der Gliedmaße durch Schonung des Weichteilgewebes erreicht werden. Ein operativer Zugang von lateral und kaudal wäre wegen der dort ausgeprägt vorhanden Muskulatur nicht möglich gewesen. Auch auf der kranialen Seite der Tibia wäre die Montage des Fixateurs mit Schwierigkeiten verbunden gewesen, da sich dort proximal der Margo cranialis befindet, der eine ebene Montage verhindert hätte.

Wie erwähnt, orientierte sich der Versuchsaufbau an diversen Vorläufer- sowie in der Literatur beschriebenen Projekten, die ebenfalls an Schafen durchgeführt wurden. In einem Versuch von Goodship und Kenwright (1985) wurde der Einfluss von kontrollierter axialer interfragmentärer Bewegung auf die Knochenheilung untersucht. Die Osteotomie erfolgte ebenfalls an der rechten Tibia des Schafes mit einer Osteotomiespaltgröße von gleichfalls 3 mm. Die Standzeit der Tiere betrug hingegen 12 Wochen. Studien von Claes et al. (1995, 1997, 2002, 2003) wurden am ovinen rechten Metatarsus durchgeführt. Anders als in diesem Projekt kam dort ein Ringfixateur zum Einsatz. Bei den einzelnen Projekten wurde jeweils ein zeitlicher Rahmen von neun Wochen gewählt. Im Fokus der Untersuchung standen insbesondere die Vaskularisierung sowie die Gewebedifferenzierung während der Knochenheilung. Die Weite des Osteotomiespaltes variierte innerhalb der einzelnen Untersuchungen von 1 mm bis hin zu 5,7 mm. Es wurde insbesondere der Einfluss von unterschiedlich großen axialen interfragmentären Bewegungen erforscht. Augat und Kollegen setzten 1996 ebenfalls einen unilateralen Fixateur externe in einer Studie ein, mit dem Ziel, den Einfluss von kontrollierten axialen interfragmentären Bewegungen auf die Heilung des Knochens zu erforschen. 2003 setzte sich die Arbeitsgruppe von Augat und Kollegen mit dem Einfluss von interfragmentärer axialer sowie von Scherbewegung auf die Knochenheilung auseinander. In beiden Projekten diente ebenfalls das Schaf als Versuchsmodell und es wurde gleichermaßen die rechte Tibia im Rahmen der Untersuchungen mit einer Osteotomiespaltgröße von 3 mm herangezogen.



In einem vorangegangenen Projekt wurde das Heilungsverhalten des Knochens unter einem rigiden sowie einem semirigiden Fixateur externe analysiert (Schell et al., 2002). Die Standzeiten der Tiere betragen wie auch in diesem Projekt zwei, drei, sechs und neun Wochen. Dabei wurden Größenordnungen für Scherbewegungen definiert, die eine optimale sowie eine weniger effektive Heilung zuließen. Gestützt auf dieses validierte muskuloskeletale Modell des Schafshinterlaufes wurde eigens für dieses Projekt ein monolateraler Fixateur externe konstruiert, welcher die mechanischen Rahmenbedingungen der in der Klinik auftretenden Heilungsstörungen imitiert. Dieser Rotationsfixateur war so konzipiert, dass die axiale Bewegung reduziert wurde, die Rotation hingegen war komplett freigegeben und wurde lediglich durch die Muskeldehnung sowie die Weichteilflexion in der Bewegung begrenzt. Gewährleistet wurde dies durch zwei übereinander liegende Kegelrollager des unteren Gehäuses. Diese Kegelrollager nahmen die axialen Kräfte auf und ermöglichten so eine leichtgängige Rotation (Abb. 2). Die auf diese Weise zugelassenen interfragmentären Scherbewegungen übertrafen die Erwartungen bei weitem. Wie die histologischen Untersuchungen zeigten, war selbst nach einer neunwöchigen Standzeit keinerlei knöcherne Überbrückung des Osteotomiespaltes zu verzeichnen.

Anders als in diesem Projekt erfolgten auch Studien zur Knochenheilung an anderen Spezies. So untersuchten Park und Kollegen 1998 die Auswirkungen der Schersteifigkeit auf die Frakturheilung an den Tibiae von Kaninchen. Nach erfolgter Osteotomie, entweder schräg oder quer, erfolgte eine sofortige Fixation der Gliedmaße mittels eines zweirahmigen Fixateur externe, so dass kein Osteotomiespalt entstand. Auch in der Studie von Yamagishi und Yoshimura von 1955 dienten Kaninchen als Versuchsmodell, wobei im Anschluss an die Osteotomie eine Fixation unterschiedlicher Rigidität verwendet wurde. Als Resultat entstanden Osteotomiespalten unterschiedlichen Ausmaßes. Des Weiteren erfolgten auch Studien zur Knochenbruchheilung, in denen Hunde zum Einsatz kamen. In diesen Studien erfolgte ebenfalls eine Osteotomie der Tibia mit anschließender Fixation, allerdings wurden die Frakturrenden anatomisch korrekt fixiert, so dass auch hier kein Osteotomiespalt verblieb (Wu et al., 1984, Williams et al., 1987, Markel et al., 1990).

### **5.1.3 Operation**

Die Operation der Schafe verlief ohne besondere Vorkommnisse. Allerdings kam es bei der Durchführung der Osteotomie bei einigen Tieren zu kleinen Knochenabsplitterungen. Grund hierfür war ein mehrmaliges Ansetzen der oszillierende Säge während des Sägevorganges. Die abgesplitterten Knochenfragmente konnten röntgenologisch unmittelbar post operationem

an den periostalen Kortizes nachgewiesen werden. Auch waren diese Knochenfragmente später in den histologischen Präparaten in Form länglicher Fragmente zu beobachten. In einigen dieser Präparate konnten größere Areale von Knorpel zwischen der intakten Kortikalis sowie dem abgesprengten knöchernen Fragment beobachtet werden. Dies lässt den Schluss zu, dass das Knochenfragment Einfluss auf die Kallusbildung auszuüben scheint.

### **5.1.4 Präparatentnahme und histologische Aufarbeitung**

Die Entnahme der Tibia nach der Euthanasie stellte keine große Herausforderung dar, obwohl selbst nach neunwöchiger Standzeit keine knöcherne Überbrückung der Fragmente stattgefunden hatte und der Osteotomiespalt lediglich mit weichem Gewebe gefüllt war, und abgesehen vom Fixateur, wenig stabilisiert wurde. Der Knochen wurde vor dem Sägevorgang in Formaldehyd fixiert. Dies hatte eine Aushärtung des Gewebes zur Folge, so dass die Pins komplikationslos entfernt werden konnten. Gleichzeitig erleichterte es die Sägearbeiten beträchtlich. Die Pins selbst verblieben bis zum Sägen am Knochen. Auf diese Weise wurde eine Beschädigung des die Osteotomie umgebenden Gewebes verhindert.

Um dieses Projekt mit dem Vorgängerprojekt vergleichen zu können, wurde auch hier die Sägebene standardisiert parallel zur Tibialängsachse gewählt. Da die Tibia trotz der Aushärtung in Formaldehyd-Lösung zu allen Untersuchungszeitpunkten durch die nicht erfolgte knöcherne Heilung sehr labil war, wurde die Tibia vor dem Sägeprozess mittels Klebeband stabilisiert. Nur auf diese Weise konnte eine Anfertigung der vier 3 mm starken Präparate ohne Beschädigung gewährleistet werden. Wie sich nach dem Sägen und insbesondere nach den histologischen Untersuchungen herausstellte, waren durch die Wahl der mediolateralen Schnittebene nicht bei allen Präparaten alle Kortizes vorhanden. Bei einigen wenigen Präparaten konnten nur eine Kortikalis bzw. zwei oder drei Kortizes dargestellt werden. Die Ursache lag in der großen Dislokation der Knochenfragmente, bedingt durch den Rotationsfixateur. So verschoben sich die Knochenfragmente während der Knochenheilung nicht nur in Richtung cranial bzw. caudal, sondern insbesondere auch nach lateral bzw. medial. Hätte man keine standardisierte Sägetechnik verwendet, sondern unter Zuhilfenahme der angefertigten Röntgenaufnahmen die Knochen individuell gesägt, wäre man vermutlich zu besseren histologischen Präparaten gekommen, und man hätte sich die Auswertung erleichtert. Da allerdings bei der Anfertigung der ROI nur zwei der Kortizes benötigt wurden, kam es zu keiner Beeinträchtigung der Ergebnisaussagen.

### 5.1.5 Gefäßzählung

Die Gefäßzählung erfolgte mit einem Antikörper gegen  $\alpha$ -smooth-muscle-actin in Anlehnung an Literaturangaben (Lienau et al., 2005). Das Protein  $\alpha$ -smooth-muscle-actin wird von glatten Muskelzellen sowie Perizyten exprimiert. Dieser Antikörper ist deshalb nicht in der Lage, neu gebildete Gefäße zu erfassen, die nur aus Endothelzellen bestehen, also noch nicht von Perizyten bzw. einer Tunica media umgeben sind. Als Folge dürfte die tatsächliche Anzahl der Gefäße vermutlich höher liegen, was allerdings die Aussagekraft der Ergebnisse nicht beeinflusste, da dieses bei allen Präparaten der einzelnen Gruppen zutraf. Die Gefäßzählung erfolgte innerhalb der unter 3.10.2 beschriebenen ROIs. Die glatte Muskulatur der Gefäße sowie Perizyten wurden in der  $\alpha$ -SMA-Färbung rot dargestellt und konnten somit gut von anderen Gewebestrukturen unterschieden werden. Durch die Markierung der Gefäße nach Größe in unterschiedlichen Farben im Fotobearbeitungsprogramm konnte die Möglichkeit einer Mehrfachzählung vermieden werden. Allerdings bestand die Gefahr einer Mehrfachzählung dadurch, dass einige lange Gefäße quer angeschnitten wurden, wodurch der Eindruck erweckt wurde, es wären mehrere Gefäße vorhanden.

Nicht in allen Präparaten färbten sich die glatten Muskelzellen der Gefäße gleichermaßen stark positiv an. Nach Lienau et al. (2005) wird die Anzahl der nicht gefärbten Gefäße in der Literatur mit unter 10 % angegeben.

Nachteile immunhistochemischer Nachweisverfahren liegen in dem hohen Zeit- und Kostenaufwand. Auch muss angemerkt werden, dass die Färbungen nicht immer gelingen und dass Unterschiede in dem Anfärbungsgrad der Gefäße auch innerhalb eines Färbedurchganges bestehen können. Jedoch wurde in dieser Arbeit nicht die Färbeintensität analysiert.

### 5.1.6 Deskriptive Histologie

Die Beschreibung der histologischen Präparate erfolgte anhand selbst erstellter Kriterien des Untersuchers und ist deshalb rein subjektiv. Eine möglicherweise objektivere Methode wäre die Verwendung eines Scores gewesen. Bei der Verwendung eines Scores werden für das Auftreten bzw. Fehlen bestimmter Merkmale Punkte vergeben. Die daraus resultierende Summe eines Präparates gibt somit Aufschluss über die Qualität der Frakturheilung. Es kommt allerdings zu Schwierigkeiten, wenn dieselbe Punktzahl für Merkmale vergeben wird, die für die Beurteilung der Heilung eine unterschiedliche Wichtigkeit besitzen. Dadurch besteht die Gefahr der Erzielung falsch positiver resp. falsch negativer Ergebnisse. Allerdings

stellt die subjektive deskriptive Analyse der Präparate unter Berücksichtigung der histomorphometrischen Ergebnisse eine objektive Möglichkeit dar, den Heilungsverlauf bestmöglich zu charakterisieren.

### **5.1.7 Histomorphometrie**

Für die histomorphometrischen Untersuchungen gingen jeweils acht in Paraffin eingebettete und nach Movat Pentachrom angefärbte Präparate aus allen vier Gruppen in die Auswertung ein. Ziel der Untersuchung war die quantitative Bestimmung der Bindegewebsfläche, um anschließend die Gefäßdichte, der in der  $\alpha$ -SMA-Färbung dargestellten und gezählten Gefäße, ermitteln zu können. Wie Hunt und Williams (1995) feststellten, erleichtert die computergestützte Bildanalyse die Auswertung der histomorphometrisch zu erhebenden Daten. Die computergestützte Quantifizierung bestimmter Parameter bietet die Möglichkeit, repräsentative Messungen auch von mehreren Untersuchern vornehmen zu lassen. Der Vorteil dieses Computerprogramms (Makro) liegt darin, dass es sich je nach Anforderung leicht modifizieren lässt und somit eine relative schnelle und einfache Auswertung unterschiedlicher Fragestellungen ermöglicht. Die histomorphometrische Auswertung erfolgte anhand eines hierfür erstellten Makros. Hierfür wurden sämtliche Strukturen innerhalb der ROI herangezogen, wobei der Fokus eindeutig auf der Bestimmung der Bindegewebsfläche lag. Strukturen wie Muskulatur oder schneidebedingte Artefakte wurden als Leerräume markiert, die Fläche der Kortizes wurde separat erfasst, so dass diese Strukturen keinen Eingang in die Auswertung fanden. Die ROI umfasste eine Gesamthöhe von 6 mm und wurde bei allen Präparaten einheitlich gewählt. Im Gegensatz zur Höhe der ROI wurde die Breite manuell an die Breite des jeweiligen Kallusdurchmessers angepasst. So war es möglich die unterschiedlichen Kallusdurchmesser individuell erfassen zu können. Dieses Vorgehen birgt allerdings eine potentielle, vom Untersucher abhängige Fehlerquelle, indem beispielsweise Muskelgewebe versehentlich zum Kallus gezählt werden kann. Allerdings war durch die histologischen Kenntnisse des Untersuchers eine Zuordnung zu den jeweiligen Gewebearten ohne weiteres möglich. Zusätzlich wurde diese Fehlerquelle weiter minimiert, da das Prinzip des Programms darauf beruht, unterschiedliche Gewebe anhand ihres Farbtons zu erkennen und anschließend die entsprechenden Flächen anhand der Sequenzierung berechnen zu können. Generell sollte man sich stets der Einschränkungen bewusst sein, die mit einer solchen automatischen Methode verbunden ist, und diese bei der Bewertung der Messergebnisse berücksichtigen (Hunt und Williams, 1995). Da die Movat Pentachrom-Färbung aufgrund ihres Farbreichtums die Unterscheidung der einzelnen Gewebearten wie

Knochen, Knorpel oder Bindegewebe relativ leicht ermöglicht, wurde ihr gegenüber z.B. der Alcian Blau-Färbung der Vorzug gegeben. Die Movat-Pentachrom-Färbung eignet sich deshalb nicht nur für die deskriptive Histologie, sondern auch für die computergestützte Bildanalyse (Olah et al., 1977).

Bei einigen der Präparate kam es während des Schneidens der Paraffinblöcke sowie des Färbevorganges zur Bildung von Artefakten. Aus diesem Grund bedarf es einer manuellen Nachbearbeitung dieser Areale im Rahmen der bildanalytischen Bearbeitung der Präparate.

Die computergestützte Bildanalyse findet zunehmend Einsatz in der Grundlagenforschung sowie in der Diagnostik bestimmter Knochenerkrankungen (Flygare et al., 1997).

## **5.2 Diskussion der Ergebnisse**

### **5.2.1 Histologie und Histomorphometrie**

Insgesamt konnte histologisch selbst nach neunwöchiger Standzeit bei keinem der Tiere eine knöcherne Überbrückung des Osteotomiespaltes beobachtet werden. Einzig zum Neunwochenzeitpunkt war an mehreren kleinen Abschnitten eine knorpelige Überbrückung des Osteotomiespaltes in Form von hyalinem Knorpel zu verzeichnen. Aus der Literatur ist bekannt, dass mehrere Faktoren existieren, die die Bildung von Knorpel während der Frakturheilung begünstigen. Knorpel bildet sich vor allem dort, wo die Blut- und damit einhergehend die Sauerstoffversorgung reduziert sind (Willenegger et al., McKibbin, 1978). Knorpel war allerdings in dieser Studie auch in gut vaskularisierter Umgebung nachweisbar. Daher erscheint die Theorie, dass Hypoxie ein geeignetes Milieu für die Knorpelbildung sei, wie sie u.a. Probst und Spiegel (1997) vertreten, fraglich zu erscheinen. Vielmehr ist ein Zusammenspiel unterschiedlicher physikalischer als auch biomechanischer Faktoren wie z.B. Sauerstoffversorgung, Vaskularisierung, pH-Wert sowie Scherbewegungen für die Entstehung resp. Hemmung der Knorpelbildung denkbar. Hyaliner Knorpel zeigte sich zwar schon in einem Präparat zwei Wochen post operationem, allerdings nur in Form eines kleinen inselartigen Areals im periostalen Kallus. Erst zum Dreiwochenzeitpunkt war er bei sieben von acht Tieren vor allem periostal zu beobachten. Erst sechs Wochen post operationem war das Erscheinen von Faserknorpel zu verzeichnen, der sich direkt im Osteotomiespalt zeigte. Zum Neunwochenzeitpunkt erreichte das Knorpelvorkommen sein Maximum, wobei ein ausgewogenes Verhältnis zwischen Faserknorpel und hyalinem Knorpel vorlag, wobei beide Knorpelarten mit einer Ausnahme nur innerhalb des Osteotomiespaltes zu sehen waren. Auch Palmer et al. (1992) und Willenegger et al. (1971) machten die Beobachtung, dass eine

limitierte Blutzufuhr und somit niedrige Sauerstoffspannung die Ausprägung stoffwechsellärmeren Faserknorpels begünstigt, wie er zum Kalluszentrum hin gefunden wurde. Im Gegensatz zum vergleichsweise zellarmen Faserknorpel, der überall dort vorkommt, wo Scherkräfte auftreten, ist hyaliner Knorpel hauptsächlich dort anzutreffen, wo überwiegend Druckbelastungen vorliegen.

Über den gesamten Heilungsverlauf hinweg war anfänglich ein starkes Hämatomvorkommen über die gesamte Breite des Osteotomiespalt zu beobachten, zum späteren Untersuchungszeitraum hingegen waren nur noch Reste des Hämatoms vorhanden. Diese in der deskriptiven Histologie gemachten Beobachtungen stimmten mit den Untersuchungsergebnissen der Histomorphometrie überein. Ein möglicher Grund für das anfänglich starke Hämatomvorkommen könnte eine immer wiederkehrende Ruptur der neu gebildeten Blutgefäße durch die immense Instabilität der Fixation sein. Aus der Literatur ist bekannt, dass das Frakturhämatom als Quelle für hämatopoetische Zellen, Thrombozyten und Mediatoren fungiert (Webb und Tricker, 2000). Das Hämatom ist somit essentiell für die Frakturheilung, da es durch die Aussendung von Mediatoren ein osteogenes Potential besitzt (Probst et al., 1997). Es wird unmittelbar nach dem Auftreten einer Fraktur gebildet und anschließend allmählich innerhalb der ersten Wochen resorbiert (McKibbin, 1978). Die Folgen der Hämatomentnahme können verheerend für den weiteren Verlauf der Heilung sein. Diese Folgen wurden von Grundnes und Kollegen (1993) näher untersucht, indem das Hämatom zwei und vier Tage post operationem entfernt wurde. Unmittelbar post OP blieb die Knochenheilung durch Entfernung des Hämatoms unbeeinflusst. Eine deutliche Beeinflussung der Knochenheilung konnte allerdings bei einer Entnahme zwei bzw. vier Tage post operationem festgestellt werden. Das sehr frühe Hämatom kann schnell nachgebildet werden und steht somit mitsamt seinen Mediatoren der Heilung wieder zur Verfügung, wohingegen sich das spätere Hämatom bereits in Organisation befindet und in dieser Qualität bei Entnahme nicht wieder erneuert werden kann. Wird das Hämatom vier Tage post OP entfernt entfällt auch der osteogene Stimulus und es kommt zu einer Verzögerung der Heilung (Grundnes et al., 1993). Gerade zu dem frühen Zeitpunkt dieser Untersuchung erhält man den Eindruck, als ob das Hämatom den Osteotomiespalt ähnlich einer Membran vollständig abdichte. Innerhalb des Hämatoms erstreckten sich Risse über die gesamte Breite des Osteotomiespalt. Diese Risse könnten zum Einen präparationsbedingter Natur sein, das heißt beim Säge- oder Schneidevorgang entstanden sein oder aber durch die erhebliche interfragmentäre Bewegung entstanden sein. Allgemein reduzieren steifere Fixateure interfragmentäre Bewegungen, wohingegen weichere Systeme größere interfragmentäre

Bewegungen zulassen (Goodship, 1992). Beste Indizien für die außergewöhnlich große interfragmentäre Bewegung sind, wie bereits erwähnt, das Ausbleiben einer knöchernen Überbrückung des Osteotomiespalt und zum anderen die zum Teil erhebliche Verschiebung der Fragmente zueinander. Bereits zum Zweiwochenzeitpunkt zeigte sich eine drastische Dislokation der Kortikalisfragmente und zwar nicht nur in laterale, sondern auch in cranio-caudale Richtung. Das Maximum der Fragmentverschiebung wurde zum Sechswochenzeitpunkt erreicht und blieb anschließend bis zum Abschluss der Untersuchungen weitgehend konstant. Die Fragmentverschiebung der Kortizes zu diesen Zeitpunkten war teilweise derart stark ausgeprägt, dass sich selbst die kontralateralen Kortizes nicht mehr gegenüberlagerten. Wie sich später herausstellte führte die massive Verschiebung der Kortikalisfragmente zu Problemen hinsichtlich der Auswertung der histologischen Präparate. Generell war nach neunwöchiger Standzeit keine Konsolidierung der Fraktur festzustellen, zumindest nicht soweit, wie dies unter optimaleren Bedingungen zu diesem Zeitpunkt zu erwarten gewesen wäre. Im Osteotomiespalt kam es neun Wochen post OP zwar zu einem deutlichen Anstieg des knorpeligen Kallus im Vergleich zu den früheren Zeitpunkten, allerdings nur bei zwei Tieren zu einer filigranen knorpeligen Überbrückung des Osteotomiespalt. Der Kallus hatte zum Anfang der Untersuchung einen überwiegend bindegewebigen Charakter und nahm bis zum Sechswochenzeitpunkt imposant an Volumen zu. Ein besonders starker Zuwachs des periostalen Kallus war an den Kortizes zu beobachten, die einen engeren Kontakt zueinander hatten. Sehr große interfragmentäre Bewegungen können zwar viel Kallusvolumen produzieren, müssen jedoch nicht zu einem qualitativ guten und damit belastbaren Kallus führen (Augat et al., 1996). Zum Abschluss der Untersuchung konnte lediglich eine geringfügige Volumenzunahme des periostalen Kallus an seiner Front, die sich in Richtung Osteotomiespalt orientierte, beobachtet werden. Wie Perren und Cordey (1980) herausfanden, kommt es zu einer Kalluszerreißung, wenn die Gewebedehnung größer als die Dehnungsfähigkeit des momentan vorliegenden Kallusgewebes ist. Resultat ist das Ausbleiben der Heilung, wie es in diesem Projekt zu beobachten war.

Eine Auffälligkeit der histologischen Untersuchung stellte der gelenkähnliche Spalt dar, der sechs Wochen post OP bei sechs Tieren zu beobachten war und der sich bis in den periostalen Raum parallel zum Osteotomiespalt zog. Dieser gelenkähnliche Spalt war auch noch zum Neunwochenzeitpunkt zu beobachten mit dem Unterschied, dass er nur noch bei vier der acht Tiere anzutreffen war und nur noch bei einem dieser Tiere eine wie oben erwähnte räumliche Ausdehnung aufwies. Dieser Spalt könnte als eine beginnende Pseudarthrose, also einem Ausbleiben der Fraktureinigung (Rüter et al., 1999) interpretiert werden. Bei dem Spalt

handelte es sich auch nicht, wie evtl. anzunehmen, um ein Artefakt, da das Lumen des Spaltes durch eine basallaminaähnliche Membran abgesetzt wurde. Diese Membran bestand aus einer ein- bis mehrreihigen Schicht runder, unversehrter Zellen. Würde es sich um ein Artefakt handeln, würde diese Zellschicht Spuren von Zerreißung aufweisen.

Eine erfolgreiche Frakturheilung setzt eine intakte Durchblutung des Knochens voraus. Dazu triggert eine hohe interfragmentäre Bewegung die Bildung eines kräftigen Kallus. Kommt es zu einer Reduzierung der Bewegung auf mikroskopischer Ebene, so dass neu gebildeter Faserknochen nicht über seine Elastizitätsreserven gedehnt wird, hat dies eine Überbrückung des Frakturspaltes zur Folge und der Knochen heilt (Stürmer, 1996). Wenn allerdings der heilende Knochen zur falschen Zeit überbelastet wird oder das Fixationssystem zu viel Bewegung zulässt, wie in dieser Studie provoziert, hat das zur Folge, dass die neu gebildeten Knochenbälkchen und Kapillaren immer wieder zerreißen und anschließend neu gebildet werden müssen. Es würde zwar ein ausgeprägter knorpeliger, periostaler Kallus entstehen, allerdings würde es zu keiner Überbrückung der Fraktur kommen (Kuner et al., 1996, Stürmer, 1996). Da der beobachtete gelenkähnliche Spalt nicht bei allen Tieren vorkam und dessen Auftreten über den Beobachtungszeitraum abnahm, ist es fraglich, ob die Frakturheilung bei einem länger gewählten Untersuchungszeitraum wirklich in einer Pseudarthrosenbildung resultieren würde. Um dies herauszufinden, bedarf es weiterer wissenschaftlicher Untersuchungen. Erste Ergebnisse hinsichtlich dieser Thematik lieferte eine Folgestudie von Schell et al. (2008), bei der ebenfalls acht Schafe mit dem gleichen Fixateur externe, wie er in dieser Studie verwendet wurde, operiert wurden, mit dem Unterschied, dass die Standzeit nunmehr auf 6 Monate erweitert wurde. Die radiologischen Ergebnisse zeigten bei fünf der acht Tiere eine vollständige knöcherne Überbrückung des Osteotomiespaltes. Die verbleibenden drei Tiere entwickelten eine hyperthrophe Pseudarthrose.

Erwähneswert ist auch das Auftreten von fettmarkähnlichen Vakuolen, die bei drei Tieren zum Neunwochenzeitpunkt im Kallus zu beobachten waren. Zu vermutet wäre, dass der Knochen zu diesem späten Zeitpunkt der Untersuchung aufgrund ausbleibender Heilung mit der Bildung von Knochemark reagiert.

### **5.3 Vergleich mit anderen Studien**

Aufgrund des großen Spielraumes an Variationen, die der Fixateur externe bietet, ist es nicht möglich, konkret vergleichbare Literaturangaben zu einem Fixateur mit einer in dieser Studie



entsprechenden Konfiguration zu finden. Deshalb werden Studien, die ähnliche Rahmenbedingungen besitzen, wie etwa einen monolateralen Fixateur externe, eine ähnliche Steifigkeit des Fixationssystems oder eine ähnliche Frakturspaltweite, diskutiert.

Augat und Mitarbeiter (1996) verglichen in ihrer Frakturheilungsstudie den Heilungsverlauf einer Osteotomie an der ovinen Tibia unter früher Vollbelastung der operierten Gliedmaße mit dem Verlauf der Heilung unter einer verzögerten, dafür aber stetig ansteigenden Belastung. Insgesamt fanden 15 männliche Merinoschafe Verwendung, die ein vergleichbares Gewicht und Alter besaßen, wie die in dieser Studie verwendeten Tiere.

Es erfolgte eine Distraktionsosteotomie der rechten Tibia mit einer Osteotomiespaltweite von 3 mm mit anschließender Montage eines monolateralen Fixateur externe, bestehend aus zwei Karbonstangen und sechs Schanz-Schrauben ( $\varnothing$  4,5 mm). Die Tiere wurden in zwei Gruppen unterteilt mit dem Unterschied, dass in der ersten Gruppe, bestehend aus zehn Tieren, eine Achillessehnen-Tenotomie eine frühe Vollbelastung der operierten Gliedmaße verhinderte, wohingegen die Tiere der zweiten Gruppe mit nur fünf Tieren die Gliedmaße von Anfang an voll belasten konnten.

Auch wenn der in dieser Studie verwendete Fixateur zu den monolateralen Fixateuren zu zählen ist, ist er sowohl vom Design als auch der Funktion völlig verschieden. Auch der Durchmesser der von Augat und Kollegen gewählten Schanzschrauben war um 0,5 mm größer. Auf den Abstand der Karbonstangen zur Haut wurde nicht näher eingegangen.

Der Untersuchungszeitraum wurde auch in dieser Studie mit neun Wochen festgelegt. Anschließend erfolgten radiologische, biomechanische sowie histologische Untersuchungen.

Die biomechanische Untersuchung der rechten Tibia ergab eine signifikant niedrigere Steifigkeit der Gruppe mit Frühbelastung im Vergleich zur spätbelasteten Gruppe.

Aus den radiologischen Untersuchungen war zu entnehmen, dass alle Osteotomien durch die Bildung eines periostalen Kallus heilten. Aus dieser Gruppe zeigten 20 % der Tiere eine vollständige Überbrückung des Osteotomiespaltes sowie des periostalen Kallus wohingegen bei 40 % der Tiere nichts dergleichen zu beobachten war. Im Gegensatz dazu war in der Gruppe mit erfolgter Tenotomie bei 80 % der Tiere eine vollständige Überbrückung des Osteotomiespaltes und des periostalen Kallus nachweisbar.

Histologisch zeigte sich bei den Tieren, die die operierte Gliedmaße früh belasteten, eine deutlich größere Menge an Knorpel und Bindegewebe sowohl im periostalen Kallus als auch im Osteotomiespalt. Die tenotomierten Tiere hingegen wiesen in beiden Bereichen eine deutlich größere Menge an Knochen auf.

Letztendlich schlussfolgerten Augat und Mitarbeiter (1996) aus ihren Untersuchungen, dass eine frühe Vollbelastung die Frakturheilung verzögert. Aus einer Studie von Park und Mitarbeitern (1998) ist bekannt, dass interfragmentäre Scherbewegungen die Bildung von Knorpelgewebe im Kallus stimulieren. Überträgt man diese Aussage auf die Ergebnisse von Augat und Kollegen (1996), so erklärt es sich, dass die Gruppe der Tiere mit Tenotomie die Gliedmaße bis zur vierten Woche entlasteten und somit die interfragmentären Bewegungen auf ein Minimum reduzierten. Resultat war eine geringere Knorpelbildung im Kallus sowie eine Förderung der knöchernen Kallusbildung. Folglich bildeten die Tiere mit frühzeitiger Vollbelastung weniger knöchernen Kallus, dafür umso mehr Knorpel und die Frakturheilung verzögerte sich. Nur bei 20 % dieser Tiere zeigte sich eine vollständige Überbrückung des Osteotomiespalt. Parallelen lassen sich also durchaus hinsichtlich der interfragmentären Scherbewegungen auch auf diese Studie ziehen, wobei der Rotationsfixateur mit großer Wahrscheinlichkeit weniger stabil war, als der von Augat und Mitarbeiter (1996) verwendete Fixateur, auch wenn genaue Aussagen die Steifigkeit betreffend fehlen.

In einer ovinen Studie untersuchten Augat und Kollegen (2003) den Einfluß von Axial- und Scherbewegungen auf die Frakturheilung. Die Untersuchung fand an insgesamt zehn weiblichen Merinoschafen statt, die einer Distraktionsosteotomie der rechten Tibia mit einer Frakturspaltweite von 3 mm unterzogen wurden. Die Tiere wurden vor Beginn der OP in zwei Gruppen à fünf Tiere unterteilt. Die erste Gruppe erhielt einen Fixateur externe der ausschließlich axiale Bewegungen von maximal 1,5 mm Amplitude zuließ. Für die zweite Gruppe war wiederum ein externer Fixateur vorgesehen mit dem einzigen Unterschied, dass diesmal ausschließlich Scherbewegungen gleicher Amplitude zugelassen wurden. Diese unterschiedliche Art der Bewegung wurde durch die spezielle Konstruktion des Fixateurs vorgegeben, der äußerlich dasselbe Erscheinungsbild bei beiden Gruppen bot.

Von allen diskutierten Studien hatte der eben besprochene Fixateur hinsichtlich des Designs die größte Ähnlichkeit mit dem in dieser Studie verwendeten Fixateur. Die Anzahl der verwendeten Schanz-Schrauben stimmte mit der in dieser Studie verwendeten Schraubenanzahl überein. Die Untersuchung erstreckte sich über einen Zeitraum von acht Wochen. Anschließend wurde die Heilung der Osteotomie radiologisch, biomechanisch sowie histologisch ausgewertet.

Die Ergebnisse zeigten, dass die Gewichtsbelastung in beiden Gruppen bis zur vierten Woche eingeschränkt war. Im direkten Vergleich zeigte die Gruppe mit interfragmentärer Scherbewegung eine verzögerte Heilung. Dies spiegelte sich vor allem darin wieder, dass

radiologisch bei zwei Tieren keinerlei Überbrückung des Osteotomiespaltes ersichtlich war und auch bei den restlichen drei Tieren konnte nur eine teilweise Überbrückung nachgewiesen werden. Auch nach einer Standzeit von acht Wochen konnte bei der Gruppe mit Scherbewegung ein deutlicher Osteotomiespalt nachgewiesen werden.

Die Gruppe mit axialer interfragmentärer Bewegung zeigte hingegen eine einheitliche Überbrückung an mindestens zwei Stellen des Osteotomiespaltes. Bei selbiger Gruppe stellte sich radiologisch ein signifikant größerer periostaler Kallus dar als in der Vergleichsgruppe. Auch die Menge an neugebildetem Knochen war in dieser Gruppe im Bereich des Osteotomiespaltes und des periostalen Kallus größer. Hinsichtlich der Knorpelmenge waren histologisch keine nennenswerten Unterschiede zwischen beiden Gruppen nach achtwöchiger Standzeit auszumachen. Bindegewebe als ein Indikator für ineffektive Heilung tauchte bei den Tieren, die der Scherbewegung unterlagen, in größeren Mengen auf (Augat et al., 2003).

Auffallend bei der Studie von Augat und Kollegen (2003) war zum einen, dass der Knochen unter axialer Bewegung deutlich besser heilte als unter Scherbewegung und zum anderen die deutlich geringere Menge periostalen Kallus, die unter Scherbewegung entstand.

Nach allgemeiner Übereinstimmung fördert eine limitierte axiale Bewegung die Knochenheilung, während exzessive interfragmentäre Bewegungen den Heilungsverlauf verlängern (Goodship, 1992, Claes et al., 1998). Ein unvoreilhafter Aspekt der Scherbewegung für die Knochenheilung ist ihr Effekt auf die Blutversorgung. Exzessive interfragmentäre Bewegungen reduzieren die Blutgefäßformation und erschweren das Wachstum von Blutgefäßen über den Frakturspalt (Gerber et al., 1997, Claes et al., 2002). Dies kann zu einer verzögerten Frakturheilung beitragen. Diese unzureichende Blutversorgung könnte das Ausmaß an Knorpelgewebe und das Defizit an enchondraler Knochenformation in der Heilungszone erklären (Augat et al., 2003).

Verglichen mit der hier vorliegenden Studie gibt es Ähnlichkeiten zu der Studie von Augat und Kollegen (2003) bezüglich des Auftretens von Bindegewebe, des stets vorhandenen Osteotomiespaltes sowie dessen mangelnde knöcherne Überbrückung zum Achtwochenzeitpunkt als Indiz für eine verzögerte Knochenheilung.

Bezüglich des Vorkommens an Knorpel fällt es schwer, Vergleiche zu ziehen, da bei Augat und Mitarbeitern (2003) generell eine Untersuchung hinsichtlich des Knorpels oder auch der anderen Gewebearten zu unterschiedlichen Zeitpunkten unterblieb. Ein weiterer Nachteil ist die fehlende Angabe über die tatsächlich vorliegende Scherbewegung. Diese könnte somit zwischen einer Amplitude von Null bis 1,5 mm liegen. Nachteilig ist sicherlich auch die

kleine Anzahl der Tiere zu sehen, da individuelle Unterschiede keine Berücksichtigung fanden.

Park und Kollegen (1998) setzten sich u.a. das Ziel, den Einfluß der Scherbewegung auf die Knochenheilung zu erforschen. Untersucht wurden insgesamt 64 Kaninchen, die in vier Gruppen eingeteilt wurden. Es erfolgte eine Osteotomie der linken Tibia, allerdings im Gegensatz zu dieser Studie ohne Distraction, sondern mit exakter Reposition der Knochenfragmente. Für alle Gruppen fand ein bilateraler Fixateur externe Verwendung, bestehend aus zwei Stangen sowie vier bikortikalen Schanz-Schrauben.

Neben der unterschiedlichen Tiermodellwahl und der anderen Art des Designs des Fixateur extern ist noch die schräge Osteotomie zu erwähnen, die für die Scherbewegung verantwortlich ist. Im Gegensatz zu Park und Mitarbeitern (1998) bedingt in dieser Studie alleinig die besondere Konstruktion des externen Fixateurs die erhöhte Scherbewegung.

Die Ergebnisse aus den histologischen Untersuchungen zeigten eine signifikant größere Menge an Kallus in der Gruppe mit Schrägfraktur zu den Zwei- und Vierwochenuntersuchungszeitpunkten verglichen zu den restlichen drei Gruppen. Der Torsionstest deckte zum frühen Untersuchungszeitpunkt eine deutliche Instabilität des Knochens bei dieser Gruppe im Gegensatz zu den Vergleichsgruppen auf. Diese Instabilität relativierte sich allerdings vier Wochen post OP in dem Maße, dass bei allen vier Gruppen eine stabile Fraktur vorlag. Desweiteren zeigten die Tiere mit Scherbewegung zum Zweiwochenzeitpunkt größere Mengen an periostalem Knorpel, der mit Bindegewebe überzogen war. Der Anteil an Geflechtknochen hingegen war wesentlich geringer als bei den Vergleichsgruppen. Ein weiteres Indiz für die anfangs verzögerte Frakturheilung war die deutliche Verschiebung des proximalen Knochenfragmentes nach laterodistal in einer Größenordnung von 0,5 bis 1,5 mm.

Park und Kollegen schlußfolgerten aus ihren Ergebnissen, dass Scherbewegung eine größere Differenzierung von Knorpel hervorruft und dass sie letztendlich zu einer größeren Produktion von Knorpel und periostalem Kallus führt. Um so überraschender ist das Resultat der Studie, da der Knochen, der unter Scherbewegung ausheilte, zum Abschluß der Untersuchung eine höhere Stabilität zeigte, obwohl diese Art der Fixation bei der biomechanischen Testung zum Zweiwochenzeitpunkt schlechter abschloß als die der Vergleichsgruppen. Park und Kollegen (1998) widersprachen somit der weitverbreiteten Meinung, dass sich Scherbewegung nachteilig auf die Heilung diaphysärer Frakturen ausübe und dass die opulente Menge an Knorpel, die unter Scherbewegung entsteht, nicht als

Hauptgrund für eine verzögerte bzw. nicht erfolgte Heilung anzusehen ist. Allerdings ist hierzu anzumerken, dass Park und Kollegen keine histomorphometrischen Untersuchungen in ihrer Studie vornahmen und nur das Ausmaß der Kallusmenge nicht entscheidend für eine erfolgreiche Heilung ist.

Schell und Kollegen (2005) untersuchten den Einfluß der Rigidität eines Fixateur externe auf die Osteotomieheilung. An 64 weiblichen Merino-Mix Schafen, die hinsichtlich des Alters und des Gewichtes den Tieren dieser Studie entsprachen, erfolgte eine standardisierte Distractionsosteotomie der rechten Tibia mit einer Frakturspaltweite von 3 mm.

Es wurden zwei identische monolaterale externe Fixateure mit unterschiedlicher Schersteifigkeit eingesetzt, weshalb eine Unterteilung der Tiere in zwei Gruppen stattfand. Die beiden Fixateure bestanden aus identischen Einzelementen (Schanz-Schrauben  $\varnothing$  0,5 mm, Klemmbacken und 2 Stahlrohren). Der weiche Fixateur, also der mit größerer Scherbewegung, unterschied sich von dem rigiden Fixateur hinsichtlich des Abstandes der Klemmbacken zur Haut (10 mm beim weichen und 15 mm beim rigiden Fixateur externe) sowie dem Stahlrohr, welches dem Bein zugewandt war. Dieses besaß mittig ein bewegliches Gleitlager, welches eine größere Scherbewegung ermöglichte. Der geringere Abstand des weichen Fixateur zur Haut regulierte die axiale Steifigkeit auf das Niveau des rigiden Fixateurs, so dass sich die beiden Fixateure nur noch in der Schersteifigkeit unterschieden.

Die Knochenheilung wurde nach zwei, drei, sechs und neun Wochen post operationem biomechanisch, radiologisch, histologisch sowie histomorphometrisch untersucht.

Den Ergebnissen nach konnten zwei Wochen post OP nur geringgradige Unterschiede zwischen den beiden Gruppen hinsichtlich der Kallusgewebezusammensetzung festgestellt werden. Die maximale Gesamtkallusfläche wurde bei der Gruppe unter rigider Fixation nach drei Wochen bei der Gruppe unter weicher Fixation erst nach sechs Wochen erreicht. Über den gesamten Heilungsverlauf hinweg blieb die Gesamtkallusfläche in der Gruppe mit dem weichen Fixateur größer. Das Bindegewebe befand sich bei beiden Gruppen anfangs bis zur dritten Woche post OP auf einem ähnlichen Level. Es blieb in der Gruppe unter weicher Fixation auch bis zur sechsten Woche post OP nach wie vor auf einem hohen Niveau während es in der rigiden Gruppe nach dem Dreiwochenzeitpunkt deutlich abfiel. Die Menge an Knorpelgewebe erreichte bei beiden Gruppen drei Wochen post OP das Maximum, blieb allerdings bei der Gruppe unter weicher Fixation bis zur sechsten Woche auf einem ähnlich hohen Niveau, wohingegen die Gesamtknorpelgewebemenge zum Sechswochenzeitpunkt bei der rigiden Gruppe signifikant kleiner war. Neun Wochen post OP näherten sich die

histologischen Ergebnisse beider Gruppen an, wobei sowohl der knöcherne Kallusdruchmesser als auch die Gesamtkallusfläche der weichen Gruppe noch deutlich größer war als unter rigider Fixation. Radiologisch konnte zur sechsten und neunten Woche post OP bei allen Tieren beider Gruppen eine köcherne Überbrückung des Osteotomiespaltes nachgewiesen werden. Gestützt auf Aussagen von Krettek et al. (1991) galten sie somit als klinisch geheilt. Abgesehen von den Tieren mit dem rigiden Fixateur blieb der Osteotomiespalt bei allen anderen Tieren zum Neunwochenzeitpunkt noch zu erkennen.

Die Ergebnisse von Schell und Kollegen (2005) zeigten, dass die anfängliche Stabilität des Fixateurs den Heilungsverlauf beeinflusste, auch wenn die Knochenheilung innerhalb der ersten zwei Wochen davon unberücksichtigt blieb. Dies wurde vor allem zwischen der dritten und sechsten Woche deutlich. Dort führte die Fixation unter größerer interfragmentärer Scherbewegung zu einer verzögerten Heilung mit schlechterer Kallusqualität was sich in den biomechanischen Tests widerspiegelte, bei denen die Gruppe mit rigider Fixation trotz geringerem Kallusdruchmesser eine höhere Stabilität aufwies. Die anfänglich aufgestellte Hypothese, dass die Fixation mit größerer interfragmentärer Scherbewegung zu einer verzögerten Heilung führen sollte, konnte somit nicht bestätigt werden, da es zu einer Ausheilung der Osteotomie neun Wochen post operationem kam. Offen blieb hingegen die Frage in welcher Größenordnung die Obergrenze der Stabilität der Fixation liegen muß, damit eine erfolgreiche Knochenheilung überhaupt stattfinden kann. Es wurde allerdings eine Obergrenze der Stabilität gefunden, bei der die Heilung weniger optimal verläuft. Bei einer moderaten Axialbewegung von (~ 0,5 mm) und einer Osteotomiespaltweite von 3 mm scheint es, dass interfragmentäre Scherbewegungen unter 0,8 mm eine optimale Heilung bedingen.

Dieselben 64 Schafe wie in der zuvor beschriebenen Studie von Schell und Kollegen (2005) waren auch Gegenstand der Untersuchungen von Lienau et al. (2005). Die OP sowie die vier Untersuchungszeitpunkte waren daher identisch.

Die Hypothese der Studie von Lienau und Kollegen (2005) lautete, dass eine erhöhte interfragmentäre Scherbewegung zu einer reduzierten initialen Vaskularisierung und zu einer verlängerten Heilung führen sollte. Ziel der Studie war es, eine quantitative Analyse der Vaskularisation und Gewebedifferenzierung in Hinblick auf die Stabilität der Fraktur während des Heilungsverlaufes durchzuführen.

Es erfolgten histomorphometrische Untersuchungen zur Bestimmung der Menge von Knorpel, Bindegewebe sowie von mineralisiertem Knochen. Desweiteren schlossen sich immunhistochemische Untersuchungen zur Bestimmung der Gefäßdichte an. Verwendung

fand die  $\alpha$ -SMA-Immunfärbung. Die Gefäße wurden ausschließlich innerhalb einer definierten ROI gezählt, deren horizontaler Ausgangspunkt das Zentrum des Osteotomiespaltes war. Von hieraus wurden jeweils zwei Linien 6 mm proximal und distal gezogen. Die seitliche Begrenzung der ROI stellte die breiteste Ausdehnung des Kallus dar.

Die Ergebnisse der Gefäßzählung ergaben bei der Gruppe mit rigidem Fixateur die größte Gefäßdichte 2 Wochen post OP. Es folgte ein deutlicher Abfall bis zum Sechswochenzeitpunkt, der gleichzeitig das Minimum markierte. Anschließend erfolgte ein deutlicher Anstieg bis zum Neunwochenzeitpunkt.

Die semirigide Gruppe hingegen zeigte über den Heilungsverlauf hinweg eine relativ konstante Gefäßdichte. Das Maximum war auch hier zum Zweiwochenzeitpunkt zu beobachten. Das Minimum lag 3 Wochen post OP vor, anschließend erfolgte ein Anstieg der Gefäßdichte bis zum Neunwochenzeitpunkt.

Lienau und Kollegen (2005) beobachteten eine höhere Dichte an kleinen Gefäßen im periostalen Kallus in der einleitenden Phase der Frakturheilung unabhängig von der Art des Fixateurs. Dies bedeutete eine starke Bildung von Gefäßen, die vom Periost oder dem umgebenden Gewebe stammte. Nach sechs und neun Wochen war eine höhere Gefäßdichte im endostalen Kallus zu beobachten. Dies deutete auf einen Anstieg der Rekanalisierung der Knochenmarkshöhle hin (Rhineland, 1974, Claes et al., 2002). Das Resultat der Studie war, dass eine höhere interfragmentäre Scherbewegung die Invasion von Blutgefäßen verzögerte. Bis zum Dreiwochenzeitpunkt war die Gewebeverteilung unabhängig von der Art der Fixation. Die größten Unterschiede bezüglich der Gewebezusammensetzung waren 6 Wochen post OP festzustellen. Die semirigide Gruppe zeigte dort eine signifikant größere Kallusmenge mit einem deutlich größeren Bindegewebsanteil. Die anfängliche Heilungsverzögerung der semirigiden Gruppe wurde später durch ein größeres Kallusgewebe kompensiert, so dass letztendlich in beiden Gruppen die gleiche Kallussteifigkeit nach neunwöchiger Standzeit nachgewiesen wurde.

Der Verlauf der Vaskularisation zeigte trotz der unterschiedlichen Steifigkeit des Fixationssystems beider Gruppen einen ähnlichen Verlauf mit dem Maximum zum Zweiwochenzeitpunkt und mit einem deutlichen Anstieg der Gefäßdichte zwischen der sechsten und neunten Woche post OP. Völlig anders stellte sich der Verlauf der Vaskularisation in der hier vorgestellten Studie dar. Bis zum Sechswochenzeitpunkt war ein stetiger Anstieg der Gefäßdichte im Kallus zu beobachten, der auch zu diesem Zeitpunkt deutlich verzögert, verglichen mit der Vorgängerstudie, sein Maximum erreichte. Ein

möglicher Zusammenhang zwischen dem Anstieg der Gefäßdichte bis zur sechsten Wo post OP und dem langen Hämatomvorkommen im Kallus wäre denkbar.

Das Vorkommen an Bindegewebe mit dem Maximum zum Dreiwochenzeitpunkt verbunden mit einem nachfolgenden Abfall bis zum Neunwochenzeitpunkt zeigt hingegen zwischen beiden Studien deutliche Parallelen. Völlig anderes ist dagegen der Knorpelanteil im Kallus beider Studien zu bewerten, der bei der Studie von Lienau et al. (2005) bei der semirigiden Gruppe schon 3 Wochen post OP sein Maximum erreichte. Bei der hier vorgestellten Studie stellte sich das Maximum an Knorpel erst zum Ende der Untersuchung ein, wohingegen bei Lienau und Kollegen (2005) zu diesem Zeitpunkt nur noch Spuren von Knorpelgewebe nachgewiesen werden konnten.

Verantwortlich für das deutlich spätere Maximum der Gefäßdichte dieser Studie, verglichen mit der von Lienau et al. (2005), ist die hohe interfragmentäre Bewegung. So können große Gewebedrücke zum Zerreißen von neugebildeten Blutgefäßen führen und ein hoher hydrostatischer Druck kann in einem Zusammenbruch der Blutgefäße resultieren und somit deren weitere Ausbreitung verhindern (Carter et al., 1998). Mielau et al. (2000) konnten nachweisen, dass die Stabilität der Frakturfixation einen deutlichen Einfluß auf die Expression von Genen der Angiogenese in mesenchymalen Zellen hat.

In einer völlig anderen Art von Studie untersuchten Kaspar und Kollegen (2008) den Prozeß der Knochenregeneration, indem sie ein neues atrophes Pseudarthrosemodell etablierten. Die Untersuchung fand an 80 männlichen Ratten statt. Es erfolgte eine Osteotomie des linken Femurs, wobei die Besonderheit dieser Studie darin lag, dass eine atrophe Pseudarthrose nicht wie sonst üblich durch einen kritischen Defekt in Form eines großen interfragmentären Osteotomiespaltes herbeigeführt wurde, sondern durch Kauterisierung des Periostes 2 mm proximal und distal der Osteotomie sowie durch Entfernung des angrenzenden Knochenmarks. Die Tiere wurden in zwei Gruppen á 40 Tiere unterteilt. Daraus ergaben sich zum einen die Gruppe mit zerstörtem Periosts und entferntem Knochenmark (Nonunion-Gruppe) und zum anderen die Kontrollgruppe, bei der lediglich die Osteotomie erfolgte. Die Tiere beider Gruppen wurden mit einem monolateralen Fixateur externe versorgt, bestehend aus zwei Stahlplatten, die über zwei Schrauben miteinander verbunden waren sowie vier Kirschner-Drähten. Anders als in der hier vorgestellten Studie, ließ der Fixateur von Kaspar et al. keinerlei Beweglichkeit zu. Jede Gruppe wurde weiterhin in fünf Untergruppen zu je acht Tieren unterteilt.



Es erfolgten histologische, histomorphometrische sowie radiologische Untersuchungen nach zwei und acht Wochen sowie eine biomechanische Testung nach acht Wochen post operationem.

Die Ergebnisse der radiologischen Untersuchungen ergaben zwei Wochen post OP einen deutlichen periostalen Kallus der Kontrollgruppe, der über den Heilungsverlauf stetig abnahm. Bis auf eines dieser Tiere zeigten alle anderen Tiere dieser Gruppe zum Achtwochenzeitpunkt eine vollständige Überbrückung des Osteotomiespalt. Ganz anders die Tiere der Nonunion-Gruppe. Nur bei 25 % dieser Tiere stellte sich mit Ausnahme des kauterisierten Bereiches eine dünne Schicht periostalen Kallus dar. Acht Wochen post operationem konnte bei dieser Gruppe keine Überbrückung der Osteotomie nachgewiesen werden, tatsächlich vergrößerte sich die Osteotomiespaltweite sogar bei 71 % der Tiere beträchtlich.

Die Ergebnisse der histomorphometrischen Untersuchungen machten deutlich, dass der Kallus der Nonunion-Gruppe zu beiden Untersuchungszeitpunkten aus weniger neugebildetem Knochen, allerdings aus einer signifikant höheren Menge an Bindegewebe bestand. Zum Zweiwochenzeitpunkt konnten bei der Kontrollgruppe dicke Schichten hyalinen Knorpels in unmittelbarer Nähe des Osteotomiespalt nachgewiesen werden, wohingegen bei den Tieren der Nonunion-Gruppe nur geringe Mengen an Knorpel gefunden wurde. Acht Wochen post OP fand man in der Nonunion-Gruppe nur eine kleine, aber signifikant größere Menge an unmineralisiertem Knorpel im Vergleich zur Kontrollgruppe. Die Ergebnisse der biomechanischen Untersuchung untermauerten die bereits genannten Ergebnisse. Dort hatte der osteotomierte Femur der Nonunion-Gruppe eine signifikant geringere Torsionssteifigkeit als der Femur der Kontrollgruppe.

Zusammenfassend zeigten die Ergebnisse einen typischen physiologischen Heilungsverlauf der Kontrollgruppe, während die Nonunion-Gruppe laut Marsh (1998) und Harrison (2003) alle charakteristischen Anzeichen einer atrophischen Pseudarthrose aufwies, nämlich die Resorption des kortikalen Knochens mit einhergehender Abrundung der Knochenenden und signifikanter Weitung des Osteotomiespalt kombiniert mit einer Sklerose und einer knöchernen Kappe, die den Knochenmarkkanal abdichtete.

Trotz der unterschiedlichen Gegebenheiten bezogen auf die völlig andere Funktion und das andere Design des Fixateur externe sowie die unterschiedlichen biologischen und biomechanischen Voraussetzungen (Zerstörung der Periosts versus Distractionsosteotomie mit großem interfragmentärem Spalt und großer interfragmentärer Bewegung) gibt es deutliche Parallelen zwischen der Studie von Kaspar und Mitarbeitern (2008) und der hier

vorgestellten Studie. Parallelen zeigten sich z.B. bei der nicht vorhandenen Überbrückung des Osteotomiespaltes.

Während sich eine atrophe Pseudarthrose dadurch auszeichnet, dass sie biologisch inaktiv ist, ist dort auch bei einem längeren Untersuchungszeitraum keine Heilung im Sinne einer Überbrückung der Frakturenenden zu erwarten. In der hier vorgestellten Studie hingegen ist bei zwei Tieren zum Neunwochenzeitpunkt zumindest eine knorpelige Überbrückung des Osteotomiespaltes zu beobachten. Dass es auch zu einer vollständigen knöchernen Überbrückung des Osteotomiespaltes kommen kann, zeigten die vorläufigen Ergebnisse einer Folgestudie mit dem gleichen Versuchsaufbau, bei dem ein Untersuchungszeitpunkt von sechs Monaten gewählt wurde (Schell et al., 2008). Ähnlichkeiten ergaben sich bezogen auf das Knorpel- und Bindegewebsaufkommen. Die Ergebnisse von Kaspar et al. (2008) ergaben zum Abschluß der Untersuchungen nach acht Wochen eine größere Menge an Knorpel als zum Anfang der Untersuchung. Auch die Menge an Bindegewebe die sowohl am Anfang als auch zum Ende der Untersuchung auf einem ähnlich hohen Niveau lagen, zeigt einen ähnlichen Heilungsverlauf wie in der hier dargestellten Studie. Interessant wäre es allerdings gewesen, etwas über den Entwicklungsverlauf beider Gewebearten zwischen den dargestellten Untersuchungszeitpunkten zu erfahren.

### **5.4 Schlussfolgerung**

Der Fixateur externe stellt seit Jahren ein etabliertes Osteosyntheseverfahren dar und findet im Rahmen der Erstversorgung von Unterschenkelfrakturen von Schwerverletzten Verwendung (Braun, 1914, Ilizarov, 1992, Schmickal et al., 1999). Des Weiteren wird der Fixateur externe bei Korrekturbehandlungen und Behandlungen von Pseudarthrosen sowie bei der Einstellung von Gelenken zur Arthrodesese eingesetzt (Jukema und Hierholzer, 1997).

Über die biomechanischen Gegebenheiten, wie z.B. die interfragmentäre Bewegung, die Frakturspaltweite als auch generell die Stabilität des Fixationssystems, die für eine optimale Frakturheilung erforderlich sind, liegen bereits zahlreiche Studien vor. Ziel dieser Studie war es, die histologischen Veränderungen, die während einer mechanisch-bedingt verzögerten Frakturheilung auftraten, zu charakterisieren. Die Osteotomie-Stabilisierung mittels eines kritisch-scherweichen Fixateur externe führte zu einer ausbleibenden knöchernen Überbrückung des Osteotomiespaltes innerhalb der neunwöchigen Heilungszeit, was aber eine unbedingte Voraussetzung für eine klinische Heilung darstellt (Krettek et al., 1991). Auch das deutlich verzögerte Auftreten an Knorpelgewebe sowie die veränderte

Vaskularisierung des Frakturkallus im Vergleich zu einer ungestörten Frakturheilung (Lienau et al., 2005) sind deutliche Anzeichen für eine verzögerte Frakturheilung.

Weitere Studien sind nötig, um die genaue Ursache einer verzögerten Frakturheilung aufzudecken. Ein möglicher Ansatz wäre die molekularbiologische Untersuchung zur Identifikation einer differentiellen Expression verschiedener Wachstumsfaktoren im Kallusgewebe im Verlauf einer verzögerten Frakturheilung verglichen mit einer Heilung, die einen ungestörten Verlauf zeigt.

Weiterhin könnten biologische Maßnahmen, wie z.B. der Einsatz von beschichteten Pins, die Heilung von Frakturen erfolgversprechend verbessern oder sogar signifikant beschleunigen. Auch die direkte Applikation von Wachstumsfaktoren o.ä. direkt in den Osteotomiespalt stellt eine vielversprechende Möglichkeit dar, um den Heilungsverlauf positiv zu beeinflussen.

## 6 Zusammenfassung

### **Histologische Analyse der Entwicklung des weichen Kallus während einer verzögerten Frakturheilung im Schafmodell**

Trotz verbesserter medizinischer Versorgung und intensiver Forschungsarbeit weisen auch heutzutage noch einige Patienten Heilungsstörungen bei Frakturen auf (Haas, 2000). Im Rahmen dieses Projektes wurde ein kritisch-scherweicher Fixateur externe entwickelt, der mechanische Bedingungen erzeugt, deren Größenordnung in der Klinik zu Heilungsstörungen führt. Ziel des vorliegenden Projektes war es, die histologischen Veränderungen im Verlauf einer verzögerten Frakturheilung zu charakterisieren. Es wurde erwartet, dass es innerhalb der neunwöchigen Heilung zu keiner knöchernen Überbrückung des Osteotomiespaltes kommt und dass die Vaskularisierung des Kallus im Vergleich zu einer ungestörten Heilungssituation verändert ist. Die Knochenheilung wurde mit Fokussierung auf die Entwicklung des sogenannten weichen Kallus, bestehend aus Binde- und Knorpelgewebe nach unterschiedlichen Standzeiten der Tiere histologisch, immunhistochemisch sowie histomorphometrisch untersucht. Hierzu erfolgte an 32 Schafen eine standardisierte Tibiaosteotomie der rechten Hintergliedmaße mit Distraction der Fragmente um 3 mm. Die Tiere wurden randomisiert in vier Gruppen zu je acht Tieren eingeteilt. Am Ende der jeweiligen Standzeiten (zwei, drei, sechs und neun Wochen post operationem) erfolgte die Euthanasierung der Schafe.

Wie erwartet konnte innerhalb des neunwöchigen Untersuchungszeitraumes histologisch bei keinem der Tiere eine knöcherne Überbrückung des Osteotomiespaltes festgestellt werden. Der Kallus hatte bis zum Dreiwochenzeitpunkt einen überwiegend bindegewebigen Charakter, was nach Aussagen von Augat et al. (2003) als Indikator für eine ineffektive Heilung gilt, und stellte sich erst sechs Wochen post OP überwiegend knorpelig dar.

Die histomorphometrischen Ergebnisse zeigten eine verzögerte und verlängerte chondrale Phase. Das Vorkommen an Hämatom war zum Anfang der Untersuchung über die gesamte Breite des Osteotomiespaltes stark ausgeprägt und erreichte sein Maximum zum Zweiwochenzeitpunkt. Grund hierfür war wahrscheinlich die immer wiederkehrende Ruptur der neu gebildeten Blutgefäße bedingt durch die immense Instabilität der Fixation. Zu den späteren Untersuchungszeitpunkten hingegen waren nur noch spärliche Reste dieses Hämatoms vorhanden.

Die Gefäßdichte im Kallus zeigte einen stetigen Anstieg bis zum Sechswochenzeitpunkt. Im Vergleich zu den Ergebnissen einer vorangegangenen Studie mit optimalen

Heilungsbedingungen (Lienau et al., 2005) trat die maximale Gefäßdichte im Kallus deutlich verzögert auf. Die hohen interfragmentären Bewegungen, induziert durch die Osteotomie-Stabilisierung mittels des scherweise Fixateur externe, scheinen also die Vaskularisierung des Kallus zu behindern, welches zu einer verzögerten Frakturheilung führt.

Für die Zukunft wäre es interessant, das sich bildende Kallusgewebe im Verlauf einer verzögerten Frakturheilung molekularbiologisch zu untersuchen, um eine differentielle Expression von Wachstumsfaktoren im Vergleich zu einer ungestörten Frakturheilung zu identifizieren. Desweiteren wäre es denkbar, eine mechanisch induziert verzögerte Frakturheilung durch biologische Maßnahmen zu stimulieren, wie etwa durch eine Beschichtung der Pins oder das Applizieren von Wachstumsfaktoren o.ä. direkt in den Osteotomiespalt, um den Heilungsverlauf der Osteotomie positiv zu beeinflussen.

## 7 Summary

### **Histological analysis of the development of the soft callus during delayed bone healing in a sheep osteotomy model**

Despite advances in the field of orthopaedic research, delayed healing and non-union still occur (Haas, 2000). In this study, an unstable external fixator with high rotational instability was used that allowed interfragmentary movements for a 3 mm gap comparable to those in patients showing compromised bone healing. The aim of the present study was to histologically characterize the different stages of bone healing that occur in this mechanically induced delayed healing model. The hypothesis was that there would be no complete bony bridging of the osteotomy gap after a nine weeks healing period. Furthermore, it was expected that there would be a difference in the vascularization of the callus in comparison to a standard healing situation. Therefore, 32 sheep received a mid-shaft osteotomy of the right tibia (3 mm gap) which was stabilized with the mechanically unstable external fixator. The animals were randomly divided into four groups (n=8 each) with different healing time periods (2, 3, 6 and 9 weeks). After sacrifice, the callus tissue was analyzed by histology/histomorphometry and immunohistochemistry with focus on the development of the soft callus composed of fibrous and cartilaginous tissue.

According to the hypothesis, no complete bony bridging of the osteotomy gap was observed by week 9. Three weeks after surgery, the callus was mainly composed of fibrous tissue which may be an indicator for an ineffective healing process (Augat et al., 2003), whilst cartilage was one of the main tissue components at week 6 and 9. Histomorphometrical analysis demonstrated a delayed and prolonged chondral phase. Furthermore, there was a prolonged presence of large remnants of the hematoma in the osteotomy region until day 21 which may have been caused by a rupture of newly formed blood vessels due to the instability.

The blood vessel density (number/mm<sup>2</sup> fibrous tissue) showed a steady increase over the healing period. The maximum density was clearly lower when compared to the blood vessel density of the callus in a standard healing situation of a previous study (Lienau et al., 2005). The high interfragmentary movements induced by the rotationally unstable external fixator in this study may have disturbed the vascularisation of the callus and therefore the healing progress.

In future studies it would be interesting to analyze the callus tissue during delayed and standard bone healing on a molecular level in order to identify differential expression patterns

of e.g. cytokines and growth factors. Further studies may also clarify if the local application of biological mediators in this mechanically induced compromised bone healing model would lead to an enhancement of the healing process.

## 8 Literaturverzeichnis

**Aerssens J., Boonen S., Lowetand G. and Dequeker J.** (1998). "*Interspecies differences in bone composition, density, and quality: potential implications for in vivo bone research.*" *Endocrinology* 139(2):663-670.

**Alliston T. and Derynck R.** (2002). "*Medicine: interfering with bone remodelling.*" *Nature*. 416: 686-687.

**Amling M. und Delling G.** (1998). "*Osteoklastenbiologie; Bedeutung im Rahmen von Knochenmetastasen.*" *Orthopäde*; 27:214-223.

**Aro H.T., Wippermann B.W., Hodgson S.F. and Chao E.Y.** (1990). "*Internal remodeling of periosteal new bone during fracture healing.*" *J Orthop Res* 8(2): 238-246.

**Augat P., Burger J., Schorlemmer S., Henke T., Peraus M. und Claes L.** (2003). "*Shear movement at the fracture site delays healing in a diaphyseal fracture model.*" *J Orthop Res* 21(6): 1011-1017.

**Augat P., Merk J., Ignatius A., Margevicius K., Bauer G., Rosenbaum D. and Claes L.** (1996). "*Early, full weightbearing with flexible fixation delays fracture healing.*" *Clin Orthop* (328): 194-202.

**Autefage A.** (2000). "*The point of view of the veterinary surgeon: bone and fracture.*" *Injury* 31(Suppl 3): C50-55.

**Barnes G.L., Kostenuik P.J., Gerstenfeld L.C. und Einhorn T.A.** (1999). "*Growth factor regulation of fracture repair.*" *J Bone Miner Res* 14(11): 1805-1815.

**Beck T.** (2003). "*Der Knochen – lebendig und stoffwechselaktiv.*" *Pharm. Ztg* –148. Jahrgang-2769-(PZ)

**Bonath K.H. und Wolf D.P.** (1998). "*Kleintierkrankheiten Band 3 – Orthopädische Chirurgie und Traumatologie.*" Verlag Eugen Ullmer, Stuttgart, S. 46-53.

**Braun H.** (1914). "*Allgemeine Operationslehre, Knochenoperationen, Vereinigung getrennter Knochen.*" In: Bier A.H., Braun H., Kümmel (Hrsg.): *Chirurgische Operationslehre*, Bd. I, Barth, Leipzig, S. 136.

**Braun W., and Rüter A.** (1996). "*Fracture healing. Morphologic and physiologic aspects.*" *Unfallchirurg* 99(1):59-67.

**Brighton C.T.** (1984). "*The biology of fracture repair.*" *Instr Course Lect* 33: 60-82.



- Brug E. und Winckler St.** (1991). "*Zurück zur Kallusheilung durch dynamisierbare Osteosyntheseverfahren.*" Radiologe, Springer Verlag, 31: 165-171.
- Bucher O. und Wartenberg H.** (1997). "*Cytologie, Histologie und mikroskopische Anatomie des Menschen.*" Verlag Hans Huber, Bern.
- Budras K., Fricke W. und Richter R.** (1996). "*Atlas der Anatomie des Hundes: Lehrbuch für Tierärzte und Studierende.*" Schlütersche Verlagsanstalt, Hannover.
- Carter D.R., Beaupre G.S., Giori N.J. and Helms J.A.** (1998). "*Mechanobiology of skeletal regeneration.*" Clin Orthop 355 :41-55.
- Chao E.Y., Aro H.T., Lewallen D.G. and Kelly P.J.** (1989). "*The effect of rigidity on fracture healing in external fixation.*" Clin Orthop(241): 24-35.
- Chao E.Y. and Inoue N.** (2003). "*Biophysical stimulation of bone fracture repair, regeneration and remodelling.*" Eur Cell Mater 6: 72.84; discussion 84-85.
- Claes L.** (1990). "*[The biomechanics of osteosynthesis].*" Aktuelle Probl Chir Orthop 34: 32-38.
- Claes L., Augat P., Suger G. and Wilke H.J.** (1997). "*Influence of size and stability of the osteotomy gap on the success of fracture healing.*" J Orthop Res 15(4): 577-584.
- Claes L., Burri C., Heckmann C. und Rüter A.** (1979). "*Biomechanische Untersuchungen zur Stabilität von Tibiaosteosynthesen mit dem Fixateur externe und einer Minimalosteosynthese.*" Aktuelle Traumatol. 9:185.
- Claes L., Eckert-Hübner K. and Augat P.** (2002). "*The effect of mechanical stability on local vascularization and tissue differentiation in callus healing.*" J Orthop Res 20(5): 1099-1105.
- Claes L., Eckert-Hübner K. and Augat P.** (2003). "*The fracture gap size influences the local vascularization and tissue differentiation in callus healing.*" Langenbecks Arch Surg 388: 316-322.
- Claes L.E. and Heigele C.A.** (1999). "*Magnitudes of local stress and strain along bony surfaces predict the course and type of fracture healing.*" J Biomechanics 32: 255.
- Claes L.E., Heigele C.A., Neidlinger-Wilke C., Kaspar D., Seidl W., Margevicius K.J. and Augat P.** (1998). "*Effects of mechanical factors on the fracture healing process.*" Clin Orthop (355 Suppl): S132.147.

**Claes L.E., Wilke H.J., Augat P., Rubenacker S. and Margevicius K.J.** (1995). "*Effect of dynamization on gap healing of diaphyseal fractures under external fixation.*" Clin Biomech 10(5): 227-234.

**Claes L., Wilke H.J., Augat P., Suger G. and Fleischmann W.** (1993). "*Influence of fracture gap size on bone healing.*" J Biomech. 26, Seite 813.

**Claes L., Wolf S. und Augat P.** (2000). "*Mechanical modification of callus healing.*" Chirurg 71(9): 989-994.

**Cornell C.N. and Lane J.M.** (1992). "*Newest factors in fracture healing.*" Clin Orthop (277): 297-311.

**Cruess R.L. and Dumont J.** (1975). "*Fracture healing.*" Can J Surg 18(5):403-413.

**DeLacure M.D.** (1994). "*Physiology of bone healing and bone grafts.*" Otolaryngol. Clin. North Am. 27(5), 859-874.

**Duda G.N., Kassi J.P., Hoffmann J.E., Riedt R., Khodadadyan C. and Raschke M.** (2000). "*Mechanical behavior of Ilizarov ring fixators. Effect of frame parameters on stiffness and consequences for clinical use.*" Unfallchirurg 103(10): 839-845.

**Duda G.N., Klein P., Schell H., Heller M., Kandziora F., Haas N.P. and Claes L.** (2001). "*Analysis of mechanical boundary conditions during fracture healing.*" J Biomech 34: 51-52.

**Einhorn T.A. and Lee C.A.** (2001). "*Bone regeneration: new findings and potential clinical applications.*" J Am Acad Orthop Surg 9(3): 157-165.

**Eitel F., Klapp F., Jacobson W. and Schweiberer L.** (1981). "*Bone regeneration in animals and in man. A contribution to understanding the relative value of animal experiments to human pathophysiology.*" Arch Orthop Trauma Surg 99(1): 59-64.

**Eitel F., Seiler H. and Schweiberer L.** (1981 a). "*Morphological examination of animal-experiment results: comparison with regeneration of the human bone-structure.I. Research methods.*" Unfallheilkunde 84(6): 250-254.

**Eitel F., Seiler H. and Schweiberer L.** (1981 b). "*Morphological examination of animal-experiment results: comparison with regeneration of the human bone-structure.II. Research results.*" Unfallheilkunde 84(6): 255-264.

- Ferretti M., Muglia M.A., Remaggi F., Cane V. and Palumbo C.** (1999). "*Histomorphometric study on the osteocyte lacuno-canalicular network in animals of different species. II. Parallel-fibred and lamellar bones.*" Ital J Anat Embryol 104(3):121-131.
- Finlay J.B., Hurtig M.B., Hardie W.R., Liggins A.B. and Batte S.W.** (1995). "*Geometrical properties of the ovine tibia: a suitable animal model to study the pin-bone interface in fracture fixation?*" Proc Inst Mech Eng [H] 209(1): 37-50.
- Flygare L., Hosoki H., Rohlin M. and Petersson A.** (1997). "*Bone histomorphometry using interactive image analysis. A methodological study with application on the human temporomandibular joint.*" Eur J Oral Sci, 105(1): 67-73.
- Frost H.M.** (1989). "*The biology of fracture healing. An overview for clinicians. Part I.*" Clin Orthop (248): 283-293.
- Gerber H.P., Vu T.H., Ryan A.M., Kowalski J., Werb Z., Ferrara N.** (1999). "*VEGF couples hypertrophic cartilage remodeling, ossification and angiogenesis during endochondral bone formation.*" Nat Med 5: 623-8.
- Gerngross H. und Claes L.** (1983). "*Grundlagen der Stabilität von Fixateur-externe-Osteosynthesen.*" Wehrmed Monatschr.: 364.
- Goodship A.E. and Kenwright J.** (1985). "*The influence of induced micromovement upon the healing of experimental tibial fractures.*" J Bone Joint Surg [Br] 67(4):650-655.
- Goodship A.E.** (1992). "*Mechanical stimulus to bone.*" Ann Rheum Dis 51(1): 4-6.
- Goodship A.E., Watkins P.E., Rigby H.S. and Kenwright J.** (1993). "*The role of fixator frame stiffness in the control of fracture healing. An experimental study.*" J Biomech 26(9): 1027-1035.
- Gothlin G. and Ericsson J.L.E.** (1974). "*The osteoclast: Review of ultra structure, origin and structure-function relationship.*" Clin Orthop. 120, 201-231.
- Greenbaum M. and Kanat I.** (1993). "*Current concepts in bone healing. Review of the literature.*" J Am Podiatr Med Assoc 83: 123-129.
- Grundnes O. and Reikeras O.** (1993). "*The importance of the hematoma for fracture healing in rats.*" Acta Orthop Scand., 64(3): 340-342.
- Haas N.P.** (2000). "*Callus modulation-fiction or reality?*" Chirurg 71(9): 987-988.

- Harrison L.J., Cunningham J.L., Strömberg L. and Goodship A.E.** (2003). "*Controlled induction of a pseudarthrosis: a study using a rodent model.*" J Orthop Trauma 17:11-21.
- Hente R., Fuchtmeier B., Schlegel U., Ernstberger A. and Perren S.M.** (2004). "*The influence of cyclic compression and distraction on the healing of experimental tibial fractures.*" J. Orthop. Res. 22(4), Seite 709-715.
- Hierholzer G. and Kleining R.** (1982). "*Theoretical principles and biomechanics of external fixateur osteosynthesis.*" Langenbecks Arch Chir 358: 105-112.
- Hulth A.** (1989). "*Current concepts of fracture healing.*" Clin Orthop Relat Res 265-284.
- Hunt J.A., Williams D.F.** (1995). "*Quantifying the soft tissue response to implanted materials.*" Biomaterials, 16(3): 167-70.
- Ilizarow G.A.** (1992). "*Transosseous Osteosynthesis. Theoretical and clinical aspects of the regeneration and growth of tissue.*" Springer, Berlin
- Jukema G.N. und Hierholzer G.** (1997). "*Geschichte und Entwicklung der Fixateur-externe-Osteosynthese.*" OP-Journal 13(1): 4-9.
- Kaiser E., Delling G.** (2002). "*Osteozyten – ein Organ im Aufwind morphologischer und zellbiologischer Forschung!*" Osteologie 11/4:219-236.
- Kaspar D., Seidl W., Neidlinger-Wilke C., Ignatius A. and Claes L.** (2000). "*Dynamic cell stretching increases human osteoblast proliferation and CICP synthesis but decreases osteocalcin synthesis and alkaline phosphatase activity.*" Journal of Biomechanics 33:45.
- Kapar K., Matziolis G., Strube P., Sentürk U., Dormann S., Bail H.J. und Duda G.N.** (2008). "*A new model for bone atrophic nonunion: Fixation by external fixator.*" J Ortop Res
- Kenwright J. and Goodship A.E.** (1989). "*Controlled mechanical stimulation in the treatment of tibial fractures.*" Clin Orthop (241): 36-47.
- Kenwright J., Richardson J.B., Goodship A.E. and Ewans M. et al.** (1986). "*Effect of controlled axial micromovement on healing of tibial fractures.*" Lancet 2:1185.
- Klaushofer K. and Peterlik M.** (1994). "*Pathophysiology of fracture healing.*" Radiologe 34(12): 709-714.
- Klein P., Schell H., Streitparth F., Heller M., Kassi J.P., Kandziora F., Bragulla H., Haas N.P. and Duda G.N.** (2003). "*The initial phase of fracture healing is specifically sensitive to mechanical conditions.*" J Orthop Res 21(4): 662-669.

- Kornak U., Delling G. und Mundlos S.** (2003). "*Molekulare Mechanismen der Regulation der Knochendichte durch Osteoklasten.*" Deutsches Ärzteblatt 100, Ausgabe 19, Seite A-1258.
- Krischak G.D., Janousek A., Wolf S., Augat P., Kinzl L. and Claes L.E.** (2002). "*Effects of one-plane and two-plane external fixation on sheep osteotomy healing and complications.*" Clin Biomech 17(6): 470-476.
- Kuner E.H., Berwarth H. and Lucke S.V.** (1996). "*Treatment principles in aseptic pseudarthrosis.*" Orthopäde 25 (5): 394-404.
- Kusuzaki K., Kageyama N., Shinjo H. Takeshita H., Murata H., Hashiguchi S., Ashihara T. and Hirasawa Y.** (2000). "*Development of bone canaliculi during bone repair.*" Bone 27(5): 655-659.
- Lane W.A.** (1914). "*The Operative Treatment of Fractures.*" 2<sup>nd</sup> ed. London: The Medical Publishing Co.
- Lanyon L.E. and Bourn S.** (1979). "*The influence of mechanical function on the development and remodeling of the tibia.*" J Bone Joint Surg (Am) 61, 263.
- Lanyon L.E., Hampson W.G., Goodship A.E. and Shah J.S.** (1975). "*Bone deformation recorded in vivo from strain gauges attached to the human tibial shaft.*" Acta Orthop. Scand. 41, 238-268.
- Lanyon L.E. and Smith R.N.** (1970). "*Bone strain in the tibia during normal quadrupedal locomotion.*" Acta Orthop. Scand. 41, 238.
- Larrsson S., Kim W., Caja V.L., Egger E.L., Inoue N. and Chao E.Y.** (2001). "*Effect of early axial dynamization on tibial bone healing: a study in dogs.*" Clin Orthop 388: 240-251.
- Lewis D.D., Cross A.R., Carmichael S. and Anderson M.A.** (2001). "*Recent advances in external skeletal fixation.*" J Small Anim Pract 42(3): 103-112.
- Liebich H.-G.** (1999). "*Funktionelle Histologie: Histologie der Haussäugetiere.*" Schattauer Verlagsgesellschaft, Stuttgart; New York, S.46-64.
- Lienau J., Schell H., Duda G.N., Seebeck P., Muchow S., Bail H.J.** (2005). "*Initial vascularization and tissue differentiation are influenced by fixation stability.*" J Orthop Res, 23(3): 639-45.
- Lungeshausen W. und Schulz F.** (2000). "*Regelmäßige und gestörte Frakturheilung.*" Zentralbl. Chir 125: 57-62.

- Mac Nab I. and De Haas W.G.** (1974). "*The role of the periosteal blood supply in the healing of fractures of the tibia.*" Clin Orthop 105: 27-34.
- Markel M.D., Wikenheiser M.A., Morin R.L., Lewallen D.G. and Chao E.Y.** (1990). "*Quantification of bone healing. Comparison of QCT, SPA, MRI and DEXA in dog osteotomies.*" Acta Orthop Scand 61(6): 487-498.
- Marsh D.** (1998). "*Concepts of fracture union, delayed union, and non-union.*" Clin Orthop Relat Res 355: S22-S30.
- Mayr E.** (2002). "*Tibial fractures.*" Chirurg 73(6): 642-661; quiz 662-663.
- McKibbin B.** (1978). "*The biology of fracture healing in long bones.*" J Bone Joint Surg Br 60-B(2): 150-162.
- Menton D.N., Simmons D.J., Chang S.L. and Orr B.Y.** (1984). "*From bone lining cell to osteocyte-an SEM study.*" Anat Rec 209(1): 29-39.
- Mielau T., Thompson Z., Colnot C. et al.** (2000). "*The effect of fracture stability on the expression of angiogenetic factors during fracture repair.*" Orthop Trauma Assoc., San Antonio 16: 1210.
- Miyamoto T. and Suda T.** (2000). "*Differentiation and function of osteoclasts.*" Keio J Med 52(1): 1-7.
- Müller J., Schenk R. und Willenegger H.** (1968). "*Experimentelle Untersuchungen über die Entstehung reaktiver Pseudarthrosen am Humeradius.*" Helv Chir Acta 35: 301.
- Müller M.E., Allgöwer M., Schneider R.** (1992). "*Manual der Osteosynthese. AO-Technik.*" 3., überarb. u. erw. Aufl. 1992, Springer, Berlin.
- Ng K.W., Romas E., Donnan L. und Findlay D.M.** (1997). "*Bone biology.*" Baillieres Clin Endocrinol Metab 11(1): 1-22.
- Nijweide P.J. and Mulder R.J.** (1986). "*Identification of osteocytes in osteoblast-like cell cultures using a monoclonal antibody specifically directed against osteocytes.*" Histochemistry 84(4-6): 342-347.
- Noble B.S. and Reeve J.** (2000). "*Osteocyte function, osteocyte death and bone fracture resistance.*" Mol Cell Endocrinol 159(1-2): 7-13.
- Nunamaker D.M.** (1998). "*Experimental models of fracture repair.*" Clin Orthop (355 Suppl): 56-65.

- Olah A.J., Simon A., Gaudy M., Herrmann W. and Schenk R.K.** (1977): "*Differential staining of calcified tissues in plastic embedded microtome sections by a modification of Movat's pentachrom stain.*" *Stain Technol*, 52 (6): 331-337.
- Ong C.T., Choon D.S., Cabrera N.P. and Maffulli N.** (2002). "*The treatment of open tibial fractures and of tibial non-union with a novel external fixator.*" *Injury* 33(9): 829-834.
- Oni O.A.** (1997). "*The bony callus.*" *Injury* 28(9-10): 629-631.
- Owen M.** (1970). "*The origin of bone cells.*" *Int Rev Cytol* 28: 213-238.
- Palmer R.H., Hulse D.A., Hyman W.A. und Palmer D.R.** (1992). "*Principles of bone healing and biomechanics of external skeletal fixation.*" *Vet Clin North Am Small Anim Pract* 22(1): 45-68.
- Park S.H., O'Connor K., McKellop H. and Sarmiento A.** (1998). "*The influence of active shear compressive motion on fracture-healing.*" *J Bone Joint Surg Am* 80(6): 858-878.
- Pearce A.I., Richards R.G., Milz S., Schneider E. and Pearce S.G.** (2007). "*Animal models for implant biomaterial research in bone: A review.*" *European Cells and Materials* Vol. 13: 1-10.
- Penning D.** (1990). "*The biology of bones and of bone fracture healing.*" *Unfallchirurg* 93(11): 488-491.
- Perren S.M.** (1979). "*Physical und biological aspects of fracture healing with special reference to internal fixation.*" *Clin Orthop* (138): 175-196.
- Perren S.M.** (1992). "*Biomechanical basis of fracture treatment.*" *Orthopade* 21(1): 3-10.
- Perren S.M.** (2002). "*Evolution of the internal fixation of long bone fractures. The scientific basis of biological internal fixation: choosing a new balance between stability and biology.*" *J Bone Joint Surg Br* 84(8): 1093-1100.
- Perren S.M. and Cordey J.** (1977). "*Tissue differences in fracture healing (author's transl).*" *Unfallheilkunde* 80(5): 161-164.
- Perren S.M. and Cordey J.** (1980). "*The concept of interfragmentary strain: In: Uthoff HK (ed) Current concept of internal fixation of fractures.*" 1<sup>st</sup> edn, vol 1. Springer, Berlin, Heidelberg, New York, p. 63
- Probst A. and Spiegel H.U.** (1997). "*Cellular mechanisms of bone repair.*" *J Invest Surg.*, 10 (3):77-86.

- Radasch R.M.** (1999). "*Biomechanics of bone and fractures.*" *Vet Clin North Am Small Anim Pract* 29(5): 1045-1082, V-VI.
- Rahn B.A.** (1982). "*Bone healing: histologic and physiologic concepts. Bone in clinical orthopaedics: a study in comparative osteology.*" W.B. Saunders, Philadelphia, p 335.
- Reed A.A.C., Joyner C.J., Brownlow H.C. and Simpson A.H.R.W.** (2001). "*Human atrophic fracture non-unions are not avascular.*" *Journal of Orthopaedic Research* 20:593-599.
- Remedios A.** (1999). "*Bone and bone healing.*" *Vet Clin North Am Small Anim Pract* 29(5): 1029-1044, V.
- Rhineland F.W.** (1974). "*Tibial blood supply in relation to fracture healing.*" *Clin Orthop* 105: 34-81.
- Roach H.I., Shearer J.R. and Archer C.** (1989). "*The choice of an experimental model. A guide for research workers.*" *J Bone Joint Surg Br* 71(4): 549-553.
- Romanowski R., Jundt G., Termine J.D., von d. Mark K. and Schulz A.** (1990). "*Immunoelectron microscopy of osteonectin and Type I collagen in osteoblasts and bone matrix.*" *Calcif Tissue Int* 46(6): 353-360.
- Roodman G.D.** (1996). "*Advances in bone biology; the osteoclast.*" *Endocr Rev*; 17:308-332
- Rubinacci A., Covini M., Bisogni C., Villa I., Galli M., Palumbo C., Ferretti M., Muglia M.A. and Marotti G.** (2002). "*Bone as an ion exchange system: evidence for a link between mechanotransduction and metabolic needs.*" *Am J Physiol Endocrinol Metab* 282(4):E861-864.
- Rüter A. and Mayr E.** (1999). "*Pseudarthrosis.*" *Chirurg*, 70 (11): 1239-45.
- Runkel M. und Klepsch M.** (1999). "*Wandel bei der Behandlung der Unterschenkelschaftfraktur.*" *Trauma Berufskrankh* 1: 229-239.
- Russel G., Mueller G., Shipman C. and Croucher P.** (2001). "*Clinical disorders of bone resorption.*" *Novartis Found Symp.*; 232: 251-267.
- Schandelmaier P., Krettek C., Rudolf J., Kohl A. and Tscherne H.** (1997). "*Advantages of the unreamed tibial nail in comparison with external fixator in treatment of grade 3 B open tibial shaft fractures.*" *Unfallchirurg* 100(4): 286-293.
- Sarmiento A. and Latta L.L.** (1981). "*Closed functional treatment of fractures.*" Springer, Berlin, Heidelberg, New York.



- Schebitz H., Brass W. und Wintzer H.J.** (1993). "*Allgemeine Chirurgie für Tierärzte u. Studierende.*" Verlag Paul Parey, Berlin, Hamburg, 2. Auflage, S. 165-168.
- Schenk R. und Perren S.** (1977). "*Biology and biomechanics of fracture healing in long bones as a basis for osteosynthesis.*" Hefte Unfallheilkd. 29-41.
- Schenk R.K. und Willenegger H.R.** (1977). "*Zur Histologie der primären Knochenheilung.*" Hefte Unfallheilk. 80, 155-160.
- Schell H., Epari D.R., Kassi J.P., Bragulla H., Bail H.J. and Duda G.N.** (2005). "*The course of bone healing is influenced by the initial shear fixation stability.*" J of Orthopaedic Research 23(5): 1022-8.
- Schell H., Klein P., Opitz M., Kandziora F., Bragulla H., Bail H. and Duda G.N.** (2002). "*Influence of unreamed nailing and external fixation on the mechanical conditions during fracture healing.*" Trans Orthop Res Soc, Dallas.
- Schmickal T., Hochstein P., Wentzensen A.** (1999). "*Behandlung von Unterschenkelschaftfrakturen im Fixateur externe.*" Trauma Berufskrankh(1): 240-246.
- Shapiro F.** (1988). "*Cortical bone repair. The relationship of the lacunar-canicular system and intercellular gap junctions to the repair process.*" J Bone Joint Surg Am 70(7): 1067-1081.
- Shim S.S.** (1968). "*Physiology of blood circulation of bone.*" J Bone Joint Surg Am 50(4): 812-824.
- Simmons D.J.** (1985). "*Fracture healing perspectives.*" Clin Orthop (200): 100-113.
- Simmons D.J. and Kahn A.J.** (1974). "*Cell lineage in fracture healing in chimeric bone grafts.*" Calcif. Tissue Res. 27, 247-253.
- Stürmer K.M.** (1984). "*Histologic finding of fracture healing using external fixation and its clinical significance.*" Unfallchirurgie 10(3): 110-122.
- Stürmer K.M.** (1988). "*Histologie und Biomechanik der Frakturheilung unter den Bedingungen des Fixateur externe.*" Hefte Unfallheilkd Heft 200: 233-242.
- Stürmer K.M.** (1996). "*Pathophysiology of disrupted bone healing.*" Orthopäde 25(5): 386-393.
- Stürmer K.M. and Schuchardt W.** (1980). "*New aspects of closed intramedullary nailing and marrow cavity reaming in animal experiments. I. The tibia of the sheep, as a model for intramedullary nailing (author`s transl).*" Unfallheilkunde 83(7): 341-345.

**Teitelbaum S.L.** (2000). "*Bone resorption by osteoclasts.*" *Science* 289(5484): 1504-1508.

**Turner A.S., Mills E.J. and Gable A.A.** (1975). "*In vivo measurement of bone strain in the horse.*" *Am J. Vet. Res.* 36, 1573.

**Wang X., Shen X., Li X., Agrawal M.** (2002). "*Age related changes in Collagen vs. the toughness of bone.*" Orthopaedic Research Society, 48<sup>th</sup> annual meeting. Dallas, USA.

**Webb J.C.J., Tricker J.** (2000). "*Bone biology - A review of fracture healing.*" *Current Orthopaedics* 14: 457-463.

**Willenegger H., Perren S.M. and Schenk R.** (1971). "*Primary and secondary healing of bone fractures.*" *Chirurg* 42(6) 241-252.

**Williams E.A., Rand J.A., An K.N., Chao E.Y. and Kelly P.J.** (1987). "*The early healing of tibial osteotomies stabilized by one-plane or two-plane external fixation.*" *J Bone Joint Surg Am* 69(3): 355-365.

**Wolf S., Janousek A., Pfeil J., Veith W., Haas F., Duda G. and Claes L.** (1998). "*The effects of external mechanical stimulation on the healing of diaphyseal osteotomies fixed by flexible external fixation.*" *Clin Biomech (Bristol, Avon)* 13(4-5): 359-364.

**Wolff J.** (1892). "*Das Gesetz der Transformation der Knochen.*" Hirschwald, Berlin, Germany, S. 1-152.

**Wu J.J., Shyr H.S., Chao E.Y. and Kelly P.J.** (1984). "*Comparison of osteotomy healing under external fixation devices with different stiffness characteristics.*" *J Bone Joint Surg Am* 66(8): 1258-1264.

**Yamagishi M. and Yoshimura Y.** (1955). "*The Biomechanics of Fracture Healing.*" *J Bone Joint Surg* 37-A(5): 1035-1068.

## Danksagung

Hanna Schell und insbesondere Jasmin Lienau möchte ich für die Überlassung des Themas, die stets nette, sowie intensive Betreuung meiner Doktorarbeit danken.

Prof. Dr. K.D. Weyrauch danke ich an dieser Stelle für die Betreuung und Durchsicht dieser Doktorarbeit.

Mein Dank gilt auch Prof. Dr.-Ing. G.N. Duda, an dessen Institut mir die Durchführung dieser Arbeit vergönnt war.

Der Dank gilt darüber hinaus Gabriele Hardung, Camilla Bergmann und Martin Wolny für die tatkräftige Unterstützung im Labor. Martin, danke für die Unterstützung und Lösung jedweder diverser Probleme, die immer wieder auftauchten sowie die nette Gesellschaft in so mancher Mittagspause.

Ein herzliches Dankeschön auch an meine Mitdoktorandinnen, insbesondere Tanja Schumann für die gute Zusammenarbeit im Labor und Anne Fischer, mit der ich mich von Anfang an „durchgeschlagen“ habe, und die mir immer mit Rat und Tat zur Seite stand.

Nicht zuletzt danke ich Anja Peters für ihre selbstlose Unterstützung und so manche Denkanstöße.

Frau Dr. G. Arndt sowie insbesondere Frau Dr. A. Lüdecke danke ich für die Betreuung des statistischen Teils dieser Arbeit.

Ein Dankeschön auch an Dr. Claudia Pastor sowie Dr. Bernhard Sörensen, die mir den Einstieg in den praktischen tierärztlichen Beruf erst ermöglichten.

Zum Schluss möchte ich meinen Eltern von ganzem Herzen danken, die mir dieses lange Studium und diese Doktorarbeit erst ermöglicht haben, sowie meiner Freundin Tina, die immer ein offenes Ohr für mich hatte.

## **Selbständigkeitserklärung**

Hiermit erkläre ich, dass die vorliegende Arbeit ohne unzulässiger Hilfe Dritter und ausschließlich von mir selbst verfasst wurde. Ich versichere, dass ich keine anderen außer den genannten Literaturquellen und Hilfsmittel verwendet habe.

Stade, den 28.08.09

Hauke Weber