

Aus dem Centrum für Muskuloskeletale Chirurgie (CMSC)
- Klinik für Unfall- und Wiederherstellungschirurgie -
der Medizinischen Fakultät der Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Einfluss des geschlossenen traumatischen Weichteilschadens
auf die Frakturheilung:
eine histomorphometrische Analyse im Tiermodell der Ratte

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät der Charité – Universitätsmedizin
Berlin

von

Markus Appel

aus Gummersbach

Gutachter: 1. Priv.-Doz. Dr. med. K.-D. Schaser
2. Prof. Dr. med. T. Mittlmeier
3. Priv.-Doz. Dr. med. K.-H. Frosch

Datum der Promotion: 11.07.2008

Inhaltsverzeichnis

1 . Einleitung	5
1.1 Pathophysiologie der Frakturheilung	5
1.2 Histo- und Zytomorphologie der Kallusbildung	6
1.2.1 Chondroblastäre Zellen	6
1.2.2 Osteoblasten und Osteoklasten	6
1.3 Regulation der Frakturheilung durch Mediatoren und Wachstumsfaktoren ..	8
1.4 Biomechanische Rahmenbedingungen der Frakturheilung	9
1.5 Bedeutung des traumatischen Weichteilschadens	9
2 . Ziele und Hypothesen.....	12
3 . Material und Methoden.....	14
3.1 Studiendesign.....	14
3.1.1 Gruppe A (Kontrolle).....	15
3.1.2 Gruppe B (geschlossener Weichteilschaden ohne Fraktur)	15
3.1.3 Gruppe C (isolierte Fraktur).....	16
3.1.4 Gruppe D (Weichteilschaden mit Fraktur)	16
3.2 Tiermodell und chirurgische Präparation	18
3.2.1 Anästhesie.....	18
3.2.2 Kontrolltiere	18
3.2.3 Standardisierte Erzeugung des geschlossenen Weichteilschadens mittels Controlled Impact-Injury-(CII-)Technik.....	18
3.2.4 Frakturmodell	19
3.2.5 Kombination von geschlossenem traumatischem Weichteilschaden und geschlossener Fraktur	21
3.2.6 Postoperative Kontrollen	21
3.2.7 Tötung der Tiere und Prozessierung der Tibiae	21
3.3 In-vivo-Fluorochrommarkierungen und histochemische Färbungen	23
3.3.1 Sequenzielle in-vivo-Fluorochrommarkierung	23
3.3.2 Histochemische Färbungen.....	24
3.3.2.1 <i>Masson-Goldner</i>	25
3.3.2.2 <i>Von Kossa/ Safranin O</i>	25
3.3.2.3 <i>Safranin O/ Lichtgrün</i>	26

3.4	Quantitative histomorphometrische Analyse mittels PC-gestütztem Bildanalysesystem.....	26
3.4.1	Histomorphometrische Parameter zur Analyse des Kallus.....	26
3.4.2	Quantitative Analyse der Fluorochrommarkierung	27
3.5	Statistik.....	28
3.6	Geräte, Chemikalien und Verbrauchsmaterialien	28
4	Ergebnisse	30
4.1	Quantitative Histomorphometrie der Kallusparameter	30
4.1.1	Kallusflächen (gesamt – periostal – endostal).....	30
4.1.2	Kallusfläche nach Verletzungsschwere	32
4.1.3	Mineralisierte Kallusfläche (gesamt – periostal – endostal).....	34
4.1.4	Mineralisierte Kallusfläche nach Verletzungsschwere	36
4.1.5	Kallusdichte (gesamt – periostal – endostal).....	38
4.1.6	Kallusdichte nach Verletzungsschwere	40
4.1.7	Kortikalisdichte	42
4.2	Planimetrische Analyse der Fluorochrommarkierungen	43
4.2.1	Fluoreszenzfläche (gesamt – periostal – endostal).....	43
4.2.2	Xylenolorange (gesamt – periostal – endostal)	46
4.2.3	Calceingrün (gesamt – periostal – endostal)	48
4.2.4	Tetracyclin (gesamt – periostal – endostal).....	50
5	Diskussion.....	52
6	Zusammenfassung	59
7	Literatur	61
8	Abbildungsverzeichnis.....	70
9	Erklärung und Lebenslauf.....	71
10	Danksagung	74

1. Einleitung

Die breite klinische Erfahrung zeigt, dass komplexe Frakturen mit gleichzeitigem Weichteilschaden sowohl in der Akut- als auch in der langfristigen Behandlung hinsichtlich der Knochenheilung problematisch sind und einen verzögerten Verlauf zeigen. In diesen Fällen besteht ein deutlich erhöhtes Risiko an Wundheilungsstörungen, Entwicklung von Pseudarthrosen und postoperativen Komplikationen wie Infekten [1, 2]. Hierbei gibt es Hinweise auf eine enge Interaktion zwischen traumatisiertem Weichteilmantel, Periost einerseits und frakturiertem Knochen andererseits als potentielle Ursachen für die verzögerte Frakturheilung.

1.1 Pathophysiologie der Frakturheilung

Prinzipiell kann die Frakturheilung sowohl enchondral über knorpelige Vorstufen oder aber intermembranöse (ohne chondralen Kallus, direkte Knochenheilung) ablaufen. Die desmale Ossifikation spielt hingegen bei Frakturheilungen keine Rolle.

Der erste Schritt zur Wiederherstellung der Knochenintegrität ist die Reorganisation des im Frakturgebiet entstandenen Hämatoms. Dieses wird zunächst durch eingewanderte Makrophagen resorbiert und bald – ausgehend vom angrenzenden Periost und Markraum - von einsprossenden Fibroblasten durchzogen, welche die Rekonstruktion des ossären Gewebes einleiten. Um eine schnelle primäre Stabilität der Frakturbestandteile zu erreichen, kommt es zu einer Umdifferenzierung von Fibroblasten in Knorpelzellen. In der Folgezeit beginnt das Knorpelgewebe zu mineralisieren und den sogenannten „Kalkknorpel“ zu bilden. Hierbei geht ein Teil der Chondrozyten durch Apoptose unter, während die übrigen Zellen osteoblastär sich differenzieren und Osteoid anlagern. Der entstehende Geflechtknochen enthält bindegewebige Faserzüge, die sich in der weiteren Entwicklung des Knochens entsprechend der biomechanischen Belastungsverhältnisse gruppieren und schließlich der reife, voll belastbare Lamellenknochen entsteht.

1.2 Histo- und Zytomorphologie der Kallusbildung

1.2.1 Chondroblastäre Zellen

Durch die Differenzierung der genannten Fibroblasten im Frakturspalt zu stabileren Chondroblasten und weiter zu Chondrozyten, entsteht eine erste Kallusverbindung der Frakturrenden. Bei der anschließenden Kallusreifung gehen jedoch einige Chondrozyten in den Zelltod durch Apoptose. Hierbei scheint der Einfluss von vascular endothelial growth factor (VEGF) eine entscheidende Rolle zu spielen. Ferner wird die anstehende Kapillarisation des Gebietes eingeleitet [3]. Die zusätzliche aktive Knorpeldegradation durch Chondroklasten trägt ebenfalls zur Gefäßeinsprossung bei [4].

Die verbleibenden Chondrozyten proliferieren und hypertrophieren besonders im Bereich der Frakturrenden. Im Finalstadium der hypertrophen Chondrozyten zeigt sich dann bereits eine vermehrte mitochondriale und membranäre Ca^{++} -Beladung bei gleichzeitig abnehmender ATP-Synthese als erster Ausdruck beginnender Mineralisierung des Gewebes [5]. Dieser Prozess der Kalzifizierung beginnt dabei etwa gegen Ende der ersten Woche nach der Fraktur [6]. Darüber hinaus sind im Umbauareal auch saure Mukopolysaccharide und u.a. desaggregierte Proteoglycane histochemisch nachweisbar, die die weitere Verkalkung unterstützen [5]. Zusätzlich werden von den Chondrozyten alkalische Phosphatase-reiche Matrixvesikel abgegeben, die über einen Pyrophosphat-Abbau ebenfalls die lokale Calciumkonzentration anheben [5].

Diese erst noch amorphen Calciumphosphat-Ablagerungen organisieren sich dann im weiteren Verlauf der Frakturheilung zunehmend in Form von Hydroxylapatit-Kristallen. Die so weiter erhöhte Stabilität des Konstrukts führt aber auch zu einer Diffusionsminderung im Umbaugebiet, was ebenfalls als Ursache einer Apoptose terminaler Chondrozyten diskutiert wird [7].

1.2.2 Osteoblasten und Osteoklasten

Das Voranschreiten der membranäre Kalzium-Anreicherung und die Gefäßeinsprossung in das Kallusgewebe führt zu einer Differenzierung der Chondrozyten über molekulare Messenger in Chondroklasten und Osteoblasten

differenziert. Sie sind die quantitativ und qualitativ wichtigsten Zellen für den weiteren Knorpelabbau und abschließenden Knochenaufbau und werden ergänzt von Osteoblasten aus medullären Vorläuferzellen. Ihre Stimulation und Proliferation während der Frakturheilung wird unter anderem in Zusammenhang mit platelet derived growth factor (PDGF) diskutiert, der in vitro eine gesteigerte Expression von VEGF als potentem Neoangiogenesefaktor bewirkte [8]. Hierdurch wird die nutritive Versorgung der Osteoblasten und ihre Synthesetätigkeit gesichert.

Die Hauptbestandteile der neu synthetisierten Matrix (Osteoid) sind v.a. Kollagen Typ I sowie nicht-kollagene extrazelluläre Matrixproteine wie Osteonektin, Osteokalzin, Proteolipid und Sialoprotein. Interessant ist, dass Osteoblasten offenbar auch das für Wundverschluss wichtige alpha-smooth-muscle actin (α -SMA) als kontraktilen Element exprimieren [9]. KINNER et al. unterstützten mit einer Untersuchung die Hypothese, dass diese kontraktilen Eigenschaften für eine zusätzliche autonome Annäherung der Frakturrenden im Heilungsprozess genutzt werden [10]. Eine weitere Arbeit von MENARD et al. kommt zu einem ähnlichen Schluss [11]. Der Frakturspalt wird somit verringert und durch Osteoidanlagerung gefüllt. Die Osteoblasten übernehmen neben der Synthese des Osteoids auch die anschließende Integration von Kalzium und leiten damit die entscheidende Phase der Frakturheilung ein.

Der strukturierte Ca^{++} -Einbau in den entstehenden Geflechtknochen wird durch eine Vielzahl an Faktoren koordiniert. Eine entscheidende Rolle spielen hier die bone morphogenic proteins (BMPs; als Vermittler im Remodelling) und neutrale Proteasen von Chondrozyten [7, 12]. Durch sie und neutrale Kollagenase aus den Osteoblasten selbst wird überschüssiges nichtmineralisiertes Osteoid von der Knochenoberfläche entfernt und damit die weitere Degradation durch Osteoklasten und damit das Remodeling der Fraktur erleichtert [13].

In der Endphase der Frakturheilung wird der lockere Geflechtknochen bei optimal fortschreitender Mineralisierung zum vollwertigen tragfähigen Lamellenknochen verdichtet. Parallel werden zunehmend auch Osteoklasten aktiv. Sie sind fähig, bereits mineralisierte Knochenmatrix abzubauen und können so antagonistisch zu den Osteoblasten das Remodelling während des Heilungsprozesses voranbringen [14]. Ihre Resorptionsaktivität hängt dabei eng mit der Präsenz von bone morphogenic protein-2 (BMP-2) zusammen [15]. Über tartrate-resistant acid phosphatase (TRAP) kontrollierten sie zusätzlich den Abbau von Phosphoproteinen wie Osteopontin im kalzifizierten Gewebe, was einer übermäßigen Gewichtszunahme des Knochens beim Wachstum

entgegenwirkt [16]. In Abhängigkeit von Frakturtyp und Lokalisation ist so nach einigen Wochen bis Monaten die Fraktur komplett ausgeheilt.

1.3 Regulation der Frakturheilung durch Mediatoren und Wachstumsfaktoren

Exemplarisch wirken auf das Knochenwachstum und die Frakturheilung stimulierend u.a. PTH, die Vitamine D und C, das Wachstumshormon GH sowie die wichtigen Faktoren insulin like growth factor-1 (IGF-1), transforming growth factor- β (TGF- β) und der Angiogenesefaktor vascular endothelial growth factor (VEGF) [3, 17-19]. Der Abbau ossären Gewebes wird unter anderem stimuliert von thyroid stimulating hormone (TSH), Trijodthyronin (T_3) und Tetrajodthyroxin (T_4), Steroiden und den Interleukinen IL-1 und IL-6 [20, 21].

Herausragend ist die Bedeutung der bone morphogenic proteins (BMPs). Experimentell konnte insbesondere für Subtypen BMP-2, -4 und -7 vielfach ein fördernder Einfluss auf die Knochenbildung nachgewiesen werden [22-26]. Dabei wiesen ZHANG et al. auf ein Konzentrationsmaximum vor allem im Bereich des Frakturspalts hin [27]. ONISHI et al. bestätigten die verstärkte Expression von periostalen BMP-2-Rezeptoren in diesem Areal [28]. Eine Rolle für diese Verteilung könnte dabei mechanischer Stress spielen [29]. Allerdings sind auch Makrophagen zur Synthese von BMP-2 fähig [30]. BMP-2 und BMP-4 befinden sich bereits seit einiger Zeit mit Erfolg in der klinischen Anwendung [31, 32]. Aktuell konnte NORDSTETTEN et al. in einer breiten klinischen Studie zeigen, dass die Anwendung von BMP-2 bei Tibiafrakturen zu deutlich geringeren Reoperationen führte [33]. Dabei scheint eine Immunantwort nicht stattzufinden, sofern rekombinantes humanes anstelle von adenoviralem BMP-2 verabreicht wird [34, 35]. LAITINEN et al. wiesen jedoch darauf hin, dass erhöhte BMP-Konzentration auch v.a. in malignen Knochentumoren zu finden sind [36].

Ebenfalls im Focus stehen TGF- β -1 und IGF-I als wichtige Mediatoren des Knochenstoffwechsels. Diese scheinen synergistisch miteinander zu wirken [37]. ZIMMERMANN et al. konnten signifikant erniedrigte Konzentrationen an TGF- β -1 bei verzögerten Frakturheilungen bzw. non-unions nachweisen [38]. Im Gegenzug wurde tierexperimentell gezeigt, dass eine lokale Anwendung des Faktors die Knochenneubildung deutlich fördern kann [24, 39]. In einer Untersuchung von

WILDEMANN et al. führten entsprechend beschichtete Kraftträger zu deutlich verbesserter Heilung femoraler Osteotomien im Vergleich zu herkömmlichen Stabilisierungen [40]. Die gleiche Arbeitsgruppe konnte auch zeigen, dass keine ektopre Ossifizierung bei lokaler Anwendung auftritt und betont die auch langfristig unbedenkliche Verwendung [41, 42]. RASCHKE et al. bestätigten tierexperimentell das Ausbleiben systemische Effekte bei lokaler Anwendung der Faktoren [43].

1.4 Biomechanische Rahmenbedingungen der Frakturheilung

Trotz der verstärkten Fokussierung auf biologische Abläufe bleibt die biomechanische Stabilität nach wie vor ein zentraler Erfolgsfaktor für eine optimale Frakturheilung. Jedoch konnte auch nachgewiesen werden, dass unkomplizierte Frakturen durch entsprechende Osteosynthesetechniken im Verlauf kontrolliert dynamisiert und damit die Heilungsprozesse durch axiale Minimalbewegungen durchaus beschleunigt werden können [44, 45]. Die so erreichte Diffusionssteigerung wirkt hier offenkundig als Proliferationsstimulus für das Knorpelgewebe. Für Scherkräfte waren bislang schädigende Auswirkungen postuliert; aktuell wird dies jedoch eher kontrovers diskutiert [45, 46].

1.5 Bedeutung des traumatischen Weichteilschadens

Ein grundsätzlich anderer eminent wichtiger Faktor für eine ungestörte Frakturheilung ist neben der direkten Beteiligung der Knochenmatrix die strukturelle Integrität und nutritive Perfusion von Periost und umgebenden Weichteilmantel. Die Erfahrung, dass Frakturen mit ausgeprägtem Weichteilschaden eine verzögerte Frakturheilung aufweisen, deutet auf kausale Interaktionen zwischen Knochenheilung und Weichteilschaden hin.

Der Zustand des Periostes ist für den Heilerfolg bei Frakturen mitentscheidend. Eine Deperiostierung nach einer Femurfraktur resultierte in einer tierexperimentellen Untersuchung von KOKUBU et al. ausschließlich in ossären non-unions über einen Zeitraum von 8 Wochen im Vergleich zu Kontrollfrakturen ohne Deperiostierung (Periost-Stripping) [47]. Dieses Ergebnis ist u.a. durch die fehlende Perfusion des

Kallusgebietes durch transiente periostale Kapillaren erklärbar, die später von Gefäßstrukturen aus dem Markraum mit einer engen morphologischen Relation zu Osteoblasten und mineralisiertem Knorpel im Frakturspalt ergänzt werden [48]. Umgekehrt ist das Periost auf eine suffiziente Versorgung durch seine jeweilig umgebenden Strukturen angewiesen. So führt ein isoliertes Weichteiltrauma ohne Fraktur zu einer intravitalmikroskopisch nachweisbaren periostalen kapillären Dysregulation bzw. Entzündungsreaktion im Periost [49]. In einer Studie von SVINDLAND et al. bewirkte eine transiente Ischämie einer Gesamtextremität eine periostale Hypertrophie sowie Hyperplasie mit osteogener Differenzierung [50]. Damit ruft eine solche Perfusionsstörung ohne direkte ossäre Schädigung bereits eine periostale Reaktion hervor, die der einer Fraktur bzw. ihrem Heilungsprozess entspricht und die Relevanz des Periosts verdeutlicht.

Neben Knochenmatrix und Periost übt die umgebende Skelettmuskulatur einen erheblichen Einfluss auf den Ablauf der Frakturheilung aus. Zahlreiche Voruntersuchungen haben eindrucksvoll gezeigt, dass eine suffiziente Deckung des Knochens mit Weichgewebe ein entscheidender Vorteil für eine Frakturheilung darstellt [51-54]. SCHASER et al. konnten insbesondere zeigen, dass die mit einem Weichteilschaden verbundenen initialen Pathomechanismen maßgeblich auf mikrozirkulatorischer Ebene stattfinden und betonten deutlich ihre potentiell negativen Auswirkungen auf die Frakturheilung [55]. Umgekehrt konnten ZHANG et al. nachweisen, dass eine geschlossene Fraktur auch mikrozirkulatorische Störungen des Skelettmuskels zur Folge hat [56]. Eine mechanische Trennung der muskulo-periostale Verbindung bewirkt ebenfalls eine deutlich reduzierte Frakturheilung im Vergleich zu Kontrollfrakturen [57].

Zusätzlich zur initialen Ischämie ist jedoch auch die folgende posttraumatische Reperfusionphase des Weichgewebes ein kritischer prognostischer Faktor. Hier bewirkt und verstärkt sie eine inflammatorischen Reaktion, die durch Xanthinoxidase und andere Enzyme freigesetzte Sauerstoffradikale ausgelöst wird [58]. Darüberhinaus lösen sie eine verstärkte Leukozyten-Endothelzell-Interaktion über Adhäsionsmoleküle sowohl auf der Leukozytenmembran als auch auf der Endothelzelloberfläche aus. Intravasal auftretenden Perfusionsscherkräften tragen hierzu ebenfalls bei [59]. Die Folge ist eine Selektin-vermittelte Anheftung der Leukozyten an das Endothel in Form des „rolling“. Im weiteren Verlauf kommt es zur permanenten Anheftung der Leukozyten an die Endothelmembranen in postkapillären Venulen, dem so genannten „sticking“.

Der molekulare Mechanismus wird mit der Expression von endotheliale intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) und einem CD11/CD18 bezeichneten leukozytären Glycoproteinkomplex erklärt [60]. Von JEROME et al. wurde eine Beteiligung vor allem neutrophiler Granulozyten am Reperfusionsschaden belegt. Hingewiesen wird hier auf die Fähigkeit der neutrophilen Granulozyten, die Gefäßmyozyten direkt anzugreifen und somit die vaskuläre Dysregulation zu verstärken [61]. Unter diesen Voraussetzungen erfolgt dann die Diapedese der Leukozyten nach extravasal; durch Ausschüttung zytotoxischer Oxidantien und hydrolytischer Enzyme der Neutrophilen wird die mikrovaskuläre Permeabilität gesteigert und ein Ödem bildet sich aus [60, 62]. Auch in diesem Zusammenhang gibt es Hinweise auf eine kausale Rolle der Sauerstoffradikale [63, 64].

Als Ausdruck dieser entstehenden interstitiellen Mikroödeme und postulierten Endothelanschwellungen tritt das sogenannte „no-reflow“-Phänomen auf und führt in starker Ausprägung klinisch zur Bildung des Kompartmentsyndroms. Hierbei liegt der intrakompartimentale Druck über dem kapillären Perfusionsdruck und die resultierende Ischämie sowie mikrovaskuläre Thrombosen führen zur Nekrose des Areals.

Zusammenfassend zeigt sich damit die entscheidende Bedeutung, die dem Weichteilschaden für eine erfolgreiche Frakturheilung zukommt. Die therapeutischen Behandlungsalgorithmen in der Traumatologie richten sich entsprechend seit Jahren verstärkt an dieser prognostisch entscheidenden Bedeutung aus. Konkret bedeutet dies eine Akuttherapie mit Priorität auf biologischer Rekonstruktion des Weichteilmantels als essentielle Voraussetzung für die ungestörte Knochenheilung.

2. Ziele und Hypothesen

Ziele der vorliegenden Untersuchung waren die histomorphometrische Analyse der

- **Kallusqualität** nach isoliertem geschlossenem Weichteilschaden, isolierter Unterschenkelfraktur und kombinierter Verletzung durch geschlossenen Weichteilschaden mit geschlossener Fraktur
- **Kallusquantität** nach isoliertem geschlossenem Weichteilschaden, isolierter Unterschenkelfraktur und kombinierter Verletzung durch geschlossenen Weichteilschaden mit geschlossener Fraktur

am Tiermodell der Ratte zu den Zeitpunkten 3 Wochen und 6 Wochen. Folgende Hypothesen wurden aufgestellt:

- *Ein isolierter geschlossener Weichteilschaden führt zur Bildung eines Kallus.*
- *Ein zusätzlicher geschlossener Weichteilschaden zu einer geschlossenen Fraktur führt zu einer reduzierten Kallus-Bildung im Vergleich zur isolierten geschlossenen Fraktur. Dies betrifft den Gesamtkallus, den periostalen Kallus und den endostalen Kallus.*
- *Ein zusätzlicher geschlossener Weichteilschaden zu einer geschlossenen Fraktur führt zu einer reduzierten Bildung des mineralisierten Kallusanteils im Vergleich zur isolierten geschlossenen Fraktur. Dies betrifft den Gesamtkallus, den periostalen Kallus und den endostalen Kallus.*
- *Ein zusätzlicher geschlossener Weichteilschaden zu einer geschlossenen Fraktur führt zu einer reduzierten Kallus-Dichte (als Relation von Kalkknorpel, „hard callus“, und bindegewebigem Kallus, „soft callus“) im Vergleich zur isolierten geschlossenen Fraktur. Dies betrifft die Dichte des Gesamtkallus, des periostalen Kallus und des endostalen Kallus.*

- *Ein zusätzlicher geschlossener Weichteilschaden zu einer geschlossenen Fraktur führt zu einer reduzierten Osteoblastenaktivität im Vergleich zur isolierten geschlossenen Fraktur.*
- *Ein zusätzlicher geschlossener Weichteilschaden zu einer geschlossenen Fraktur führt zu einem gestörten zeitlichen Profil der Kallus-Bildung im Vergleich zur isolierten geschlossenen Fraktur.*

3. Material und Methoden

3.1 Studiendesign

Für alle Versuche wurden erwachsene männliche Sprague-Dawley-Ratten mit einem Körpergewicht von 250-300g verwendet. Alle Tierversuchsvorhaben wurden durch die Senatsverwaltung für Gesundheit und Soziales des Landes Berlin (G 0278/00 vom 16.11.2000) genehmigt. Sowohl vor als auch nach Behandlung waren alle Tiere unter tierärztlicher und tierpflegerischer Aufsicht in der Tierexperimentellen Einrichtung des Campus Virchow-Klinikum untergebracht.

Zu beiden Untersuchungszeitpunkten (3 und 6 Wochen) dienten Tiere der Gruppe A als unverletzte Kontrollen (Sham). Bei Tieren der Gruppe B wurde ein standardisiertes geschlossenes Weichteiltrauma in CII-(*Controlled Impact Injury*-) Technik am linken Unterschenkel des Hinterlaufs induziert (ohne Fraktur). In Gruppe C wurde den Tieren standardisiert der linke Unterschenkel frakturiert (Drop-Weight-Technique). In Gruppe D erfolgte die kombinierte Verletzung von Weichteilen und Knochen durch sequentielle Weichteilschädigung und Unterschenkelfraktur in eben beschriebener Technik (Tab. 1).

n = 6 pro Gruppe	A	B	C	D
3 Wochen	Kontrolle	Weichteil- schaden	Fraktur	Weichteilschaden + Fraktur
6 Wochen	Kontrolle	Weichteil- schaden	Fraktur	Weichteilschaden + Fraktur

Tabelle 1: Zuordnung der Versuchstiere entsprechend dem jeweiligen Protokoll in die Gruppen

A bis D mit je n = 6 pro Gruppe

3.1.1 Gruppe A (Kontrolle)

- 3 Wochen: - Tötung am 21. Tag
- Histomorphometrische Aufarbeitung zur Beurteilung der Kallusqualität und –quantität durch histochemische Verfahren
- 6 Wochen: - Polychrome Sequenzmarkierung:
- Xylenolorange 90 mg/ml/kg KG i.p., 6.Tag
- Calceingrün 15 mg/ml/kg KG i.p., 20. Tag
- Tetracyclin 50 mg/ml/kg KG i.p., 40. Tag
- Tötung am 42. Tag
- Histomorphometrische Aufarbeitung zur Beurteilung der Kallusqualität und –quantität durch histochemische Verfahren
- Anfertigung von Knochenschliffen zur Beurteilung der Osteoblastenaktivität durch Fluorochrommarkierungen

3.1.2 Gruppe B (geschlossener Weichteilschaden ohne Fraktur)

- 3 Wochen: - Traumatisierung Hinterlauf links/ lateraler Unterschenkel
- Tötung am 21. Tag
- Histomorphometrische Aufarbeitung zur Beurteilung der Kallusqualität und –quantität durch histochemische Verfahren
- 6 Wochen: - Traumatisierung Hinterlauf links/ lateraler Unterschenkel
- Polychrome Sequenzmarkierung :
- Xylenolorange 90 mg/ml/kg KG i.p., 6.Tag
- Calceingrün 15 mg/ml/kg KG i.p., 20. Tag
- Tetracyclin 50 mg/ml/kg KG i.p., 40. Tag
- Tötung am 42. Tag
- Histomorphometrische Aufarbeitung zur Beurteilung der Kallusqualität und –quantität durch histochemische Verfahren
- Anfertigung von Knochenschliffen zur Beurteilung der Osteoblastenaktivität durch Fluorochrommarkierungen

3.1.3 Gruppe C (isolierte Fraktur)

- 3 Wochen:
- Fraktur Unterschenkel links/ Reposition/ geschlossene Marknagelung der Tibia durch K-Draht-Osteosynthese (intramedullär)
 - Röntgenkontrolle nach 10 bzw. 21 Tagen
 - Tötung am 21. Tag
 - Histomorphometrische Aufarbeitung zur Beurteilung der Kallusqualität und –quantität durch histochemische Verfahren

- 6 Wochen:
- Fraktur Unterschenkel links/ Reposition/ geschlossene Marknagelung der Tibia durch K-Draht-Osteosynthese (intramedullär)
 - Röntgenkontrolle nach 20 bzw. 42 Tagen
 - Polychrome Sequenzmarkierung :
 - Xylenolorange 90 mg/ml/kg KG i.p., 6.Tag
 - Calceingrün 15 mg/ml/kg KG i.p., 20. Tag
 - Tetracyclin 50 mg/ml/kg KG i.p., 40. Tag
 - Tötung am 42. Tag
 - Histomorphometrische Aufarbeitung zur Beurteilung der Kallusqualität und –quantität durch histochemische Verfahren
 - Anfertigung von Knochenschliffen zur Beurteilung der Osteoblastenaktivität durch Fluorochrommarkierungen

3.1.4 Gruppe D (Weichteilschaden mit Fraktur)

- 3 Wochen:
- Traumatisierung Hinterlauf links/ lateraler Unterschenkel
 - Fraktur Unterschenkel links/ Reposition/ geschlossene Marknagelung der Tibia durch K-Draht-Osteosynthese (intramedullär)
 - Röntgenkontrolle nach 10 bzw. 21 Tagen
 - Tötung am 21. Tag
 - Histomorphometrische Aufarbeitung zur Beurteilung der Kallusqualität und –quantität durch histochemische Verfahren

- 6 Wochen:
- Traumatisierung Hinterlauf links/ lateraler Unterschenkel
 - Fraktur Unterschenkel links/ Reposition/ geschlossene Marknagelung der Tibia durch K-Draht-Osteosynthese (intramedullär)
 - Röntgenkontrolle nach 20 bzw. 42 Tagen
 - Polychrome Sequenzmarkierung :
 - Xylenolorange 90 mg/ml/kg KG i.p., 6.Tag
 - Calceingrün 15 mg/ml/kg KG i.p., 20. Tag
 - Tetracyclin 50 mg/ml/kg KG i.p., 40. Tag
 - Tötung am 42. Tag
 - Histomorphometrische Aufarbeitung zur Beurteilung der Kallusqualität und –quantität durch histochemische Verfahren
 - Anfertigung von Knochenschliffen zur Beurteilung der Osteoblastenaktivität durch Fluorochrommarkierungen

Einen Überblick über den zeitlichen Ablauf gibt Abb. 1.

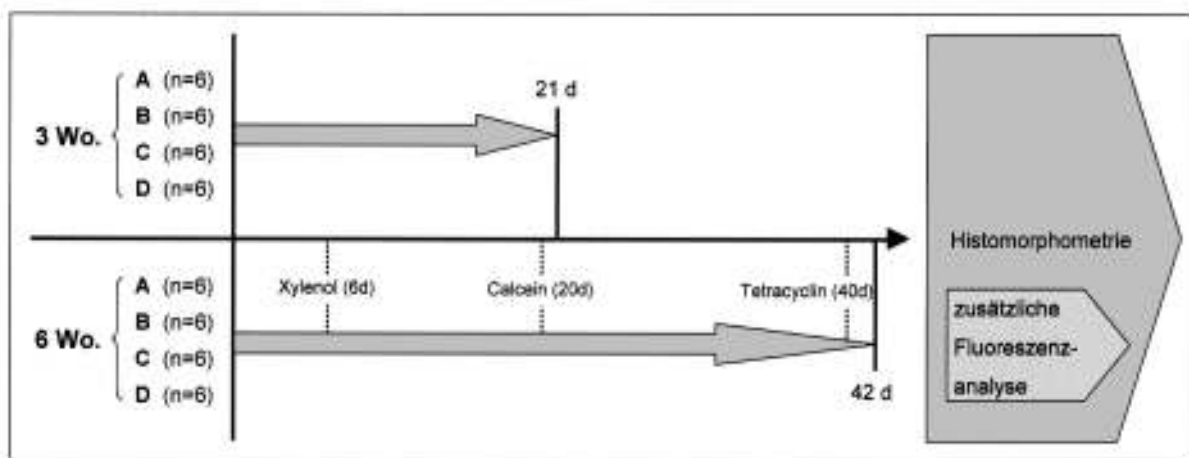


Abb. 1: Protokoll im zeitlichen Überblick mit dem Ablauf der beiden Versuchsgruppen (3 und 6 Wochen)

3.2 Tiermodell und chirurgische Präparation

3.2.1 Anästhesie

Alle mit einem Schmerzreiz verbundenen Behandlungen sowie die Röntgenkontrollen wurden in Analogie zur volatilen Intubationsnarkose beim Patienten in Inhalationsnarkose durchgeführt. Sie wurde stets initial mit 5 Vol.-% Isofluran/ 0,5l/min Sauerstoff/ 1,0l/min Lachgas über 3 Minuten in einer luftdichten Box eingeleitet und anschliessend über eine Kopfmassage mit integrierter Narkosegasabsaugung mit 1,5 – 2,5 Vol.-% Isofluran/ 0,3l/min Sauerstoff/ 0,5l/min Lachgas bedarfsgerecht fortgeführt. Diese Applikation wurde in Vorversuchen mit Blutgasanalysen etabliert. Das Narkose-Gasgemisch wurde über eine spezielle Gasentsorgungsanlage entfernt.

3.2.2 Kontrolltiere

Zur Erfassung von Normwerten der jeweiligen Parameter erfolgte die Präparation unverletzter gesunder Tiere als Kontrollen.

3.2.3 Standardisierte Erzeugung des geschlossenen Weichteilschadens mittels Controlled Impact-Injury-(CII-)Technik

Zur Induktion eines standardisierten geschlossenen Weichteilschadens modifizierten SCHASER et al. eine Methode nach DIXON et al., bei der ein reproduzierbares Hochrasanztrauma mit definierter Gewebeeimpression am lateralen Unterschenkel gesetzt wird [65].



Der enthaarte linke Hinterlauf des narkotisierten Tieres wird in einer anatomisch angepassten Form in Extension verrutschungssicher fixiert und so positioniert, dass die Zylinderaufprallfläche lateral im Bereich des maximalen Unterschenkelumfangs liegt und der Stempel bei maximalem Auszug gerade Hautberührung aufweist (Abb. 2).

Abb. 2: Standardisierte geschlossene Weichteil-schädigung mittels CII-Technik

Die Eindringtiefe des Stempels (Durchmesser 11mm) in die Muskelgruppe betrug 11mm. Die Anprallgeschwindigkeit lag bei 7m/s. Nach einer Kontaktzeit von 0,1s wurde der Bolzen pneumatisch zurückgezogen. Diese Parameter wurden in Vorversuchen etabliert und bewirken eine Weichteilkontusion ohne Ausbildung eines Kompartmentsyndroms [55]. Nach Auslösung des Traumageräts und der Befreiung der Extremität erfolgte eine manuelle Kontrolle des Unterschenkels zum Frakturausschluss.

3.2.4 Frakturmodell

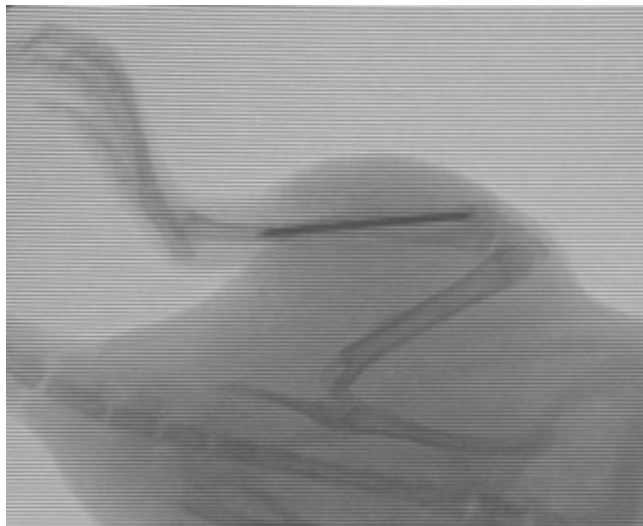
Als experimentelles Design zur Induktion einer Unterschenkelfraktur etablierten BONNARENS und EINHORN ein Modell, das von HOFFMANN et al. sowie SCHMIDMAIER et al. weiter modifiziert wurde [66-68]. Hierbei wird an einem Rattenhinterlauf durch eine definierte 3-Punkt-Biegung in einem definierten Areal eine standardisierte geschlossene Unterschenkelfraktur erzeugt.

Zur Vorbereitung wurde zunächst über der proximalen Tibiakante eine Hautinzision gesetzt und mit einem K-Draht (1,0mm) eine tibiakopfnaher Markraumöffnung für die spätere Einsetzung des Marknagels präpariert. Dabei wurde der Draht in Verlängerung des Markraums weit nach distal vorgeschoben. Anschliessend wurde der Draht vor der Frakturierung wieder entnommen.



Die Frakturzeugung wurde dann durch eine halbstumpfe Guilloutine durchgeführt (Abb. 3). Hierbei fällt ein Gewicht von 650g aus 15cm Höhe geführt auf einen abgerundeten Metallblock unmittelbar über dem medialen Unterschenkel. Dies induziert mit einem Impuls von 1,12Ns eine Quer-Schräg-Fraktur ohne signifikante Weichteilschädigung.

Abb. 3: Frakturierung per Drop-Weight-Technique



Hierdurch werden somit standardisierte geschlossene Frakturen G II nach TSCHERNE und eine A-Verletzung nach AO-Klassifikation erzeugt [69]. Die Fraktur wurde dann unter Bildwandlerkontrolle stabilisiert. Hierzu wurde der Kirschnerdraht erneut antegrad in den Markraum eingeführt und dann knochennah gekürzt (Abb. 4).

Abb. 4: Intraoperative Röntgenkontrolle mittels Bildwandler

Die Hautinzision wurde mit nicht resorbierbarem Nahtmaterial (Ethilon[®] 5-0) in Einzelknopfnah geschlossen, das Areal gründlich mit Ethylalkohol 70% desinfiziert und ein LeukoPlast-Verband angelegt. Alle Tiere wurden bis zum vollständigen Erwachen überwacht.

3.2.5 Kombination von geschlossenem traumatischem Weichteilschaden und geschlossener Fraktur

Für die kombinierte Behandlung mit Trauma und Fraktur wurde nach Einleitung der Narkose zunächst das Weichteiltrauma induziert, eine manuelle Frakturkontrolle durchgeführt und unmittelbar anschließend die Frakturierung vorgenommen. Alle Einzelschritte wurden dabei wie unter 3.2.3 und 3.2.4 beschrieben ausgeführt.

3.2.6 Postoperative Kontrollen

Das postoperative Verhalten der Tiere wurde hinsichtlich der Körperhaltung, der Belastung des betroffenen Hinterlaufs, des Gangbildes und des Freß- und Trinkverhaltens beurteilt. Da die Tiere ebenso bereits kurz nach dem Eingriff vollbelasteten sowie keine Änderung der Nahrungsaufnahme festzustellen war, konnte auf eine Schmerzmittelgabe verzichtet werden.

Zur Verlaufsbeurteilung der Knochenheilung wurden Röntgenkontrollen in zwei Ebenen mit 52 keV/ 1,60 mAs bei allen Tieren mit Fraktur durchgeführt. Die erste Kontrolle wurde am 10. Tag post-OP bei den 3 Wochen-Tieren und am 21. Tag post-OP bei den 6 Wochen-Tieren durchgeführt. Ein Abschlussröntgen fand unmittelbar vor Tötung der Tiere am 21. bzw. 42. Tag statt.

3.2.7 Tötung der Tiere und Prozessierung der Tibiae

Die Tötung der Tiere erfolgte in tiefer Narkose durch Ausbluten nach Laparotomie und Aortendurchtrennung. Der Tod wurde durch Atem- und Kreislaufstillstand verifiziert. Unmittelbar nach Tötung erfolgten eine Stichinzision mit einer kleinen Präparier-Schere und die Präparation der Tibia unter Belassung eines intakten Muskel-/Weichteilmantels über der Frakturhöhe. Weiterhin wurde dann der Muskelmantel des damit freien Unterschenkels unter Schonung des Periostes freipräpariert, die Fibula reseziert und der Marknagel mit einem Nadelhalter aus der Tibia entfernt.

Nach Anfeuchtung der Präparates mit physiologischer NaCl-Lösung wurde die Epiphyse im Bereich der Wachstumsfuge abgesetzt und der Markraum vorsichtig eröffnet sowie die distale Tibia mit ausreichend Sicherheitsabstand zum Kallusareal mit einer Zange durchtrennt, um den ungehinderten Einstrom der Fixierlösung in den Markraum zu gewährleisten.

Die Fixierung erfolgte für 3 Tage in 4%iger Formaldehydlösung bei Raumtemperatur.

Nach Fixierung wurden alle Präparate in aufsteigenden Alkoholreihen vollständig dehydriert, bevor zur Vorbereitung der endgültigen Präparateinbettung in kalt polymerisierendem Kunststoff (Technovit[®]9200, Fa. Haereus Kulzer) eine Präinfiltration (Präinfiltrationslösung Technovit[®]9200, Fa. Haereus Kulzer) des jeweiligen Präparats (1 Tag bei 21°C) und anschließend eine Infiltration (7 Tage bei 4°C) durchgeführt wurden. Nach abgeschlossener Polymerisierung (1-2 Tage bei 0°C) ist die Schnittfähigkeit des eingebetteten Präparats gegeben.

Zur Schnittvorbereitung wurde der zunächst blockförmige Präparat-Rohblock auf einer Schleifmaschine beidseitig längs zum Knochen abgeschliffen (mit einander parallelen Schliefflächen). Danach erfolgte eine Verblockung des entstehenden Quaders mit exotherm polymerisierender Kunststoff als „Sockel“ (Technovit[®]3040, Fa. Haereus Kulzer). Der Übergang beider Kunststoffe wurde durch Schleifen angeglichen, das Präparat mit einem Hartschnittmikrotom geschnitten (Schnittstärke 6-8 µm) und auf einen mit 70%igem Ethylalkohol gut befeuchteten Glasobjektträger aufgezogen.

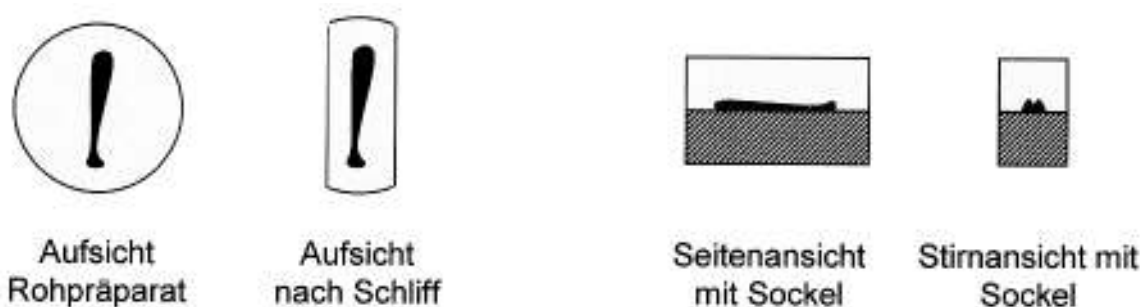


Abb. 5: Schematische Darstellung des Präparateblocks im Rohzustand und vor Schnittfähigkeit

Nach Auftropfen einer Strecklösung aus 0,3 Teilen Butylethylaceton und 0,7 Teilen Ethylalkohol 70% wurden die Objektträger mit einer angepassten Kisolfolie und einem Papierfilter versehen gestapelt und in einer Druckpresse komprimiert für 24h in einen Brutschrank (+58°C) verbracht.

Für die Präparate mit zusätzlicher Sequenzmarkierung wurde die Schnittabnahme bis an den Bereich des maximalen Kallusdiameters vorgenommen und der Präparateblock anschließend gründlich mit Petroleumbenzin entfettet. Zur Aufbringung auf einen Kunststoff-Objekträger wurde dieser mit einer Schleifmaschine angeraut und ebenfalls entfettet, danach erfolgte die Fixierung der schnittfernen Seite des Präparatblocks auf dem Objekträger mit Präzisionskleber (Technovit 7210 VLC, Fa. Haereus Kulzer, Wehrheim).

Nach einheitlicher Aushärtungsdauer von 10min wurde die Schnittseite des Präparats per Schliff begradigt. Nach erneuter Entfettung wurde die freie Seite mit einem weiteren angeschliffenen Objekträger wie oben verklebt und so ein „Sandwich“ gebildet. Zur optimalen Aushärtung des Präzisionsklebers erfolgte eine UV-Licht-Bestrahlung, die zum Schutz der inkorporierten Fluorochrome auf 7min Dauer beschränkt wurde.

Anschließend wurde der Sandwich-Präparateblock mit einer Bandsäge durchtrennt, wobei die Führung des Sägebandes mit minimalem Abstand zur künftigen Schnittfläche des Präparats eingestellt wurde, um einen möglichst flachen Anteil des relevanten Knochenanteils auf dem Objekträger zu belassen.

Danach wurde der Verbundträger angeschliffen, bis eine Knochendicke von 80µm erreicht wurde und das fertige Präparat mit Feinschleifpapieren poliert.

3.3 In-vivo-Fluorochrommarkierungen und histochemische Färbungen

3.3.1 Sequenzielle in-vivo-Fluorochrommarkierung

Zur Untersuchung des zeitlichen Ablaufs der Knochen- und Kallusbildung wurde eine in-vivo-polychrome Sequenzmarkierung genutzt. Die Anwendung und Auswertung der Fluorochrommarkierung erfolgte dabei mit Xylenolorange, Calceingrün und Tetracyclin in Anlehnung an RAHN et al. und weitere Arbeitsgruppen [70-72]. Diese Substanzen werden nach in vivo-Applikation in entstehendes Osteoid inkorporiert und ergeben histologisch-fluoreszenzmikroskopisch charakteristische Farbspektren (Xylenol rot, Calcein grün, Tetracyclin blau).

Die Herstellung der Lösungen geschah durch Einwiegen der entsprechenden Menge an Marker (0,9g Pulver Xylenorange ad 10ml, 0,15g Calceingrün ad 10ml sowie für 0,5g Tetracyclin ad 10ml) auf einer Präzisionswaage und der Überführung in einen 10ml-Meßzylinder.

Nach Zugabe von 5ml Aqua ad iniectabilia wurde die Lösung auf einem Magnetrührer gründlich vermischt und anschließend mit einem kalibrierten pH-Meter mit NaOH (2 molar) bzw. HCl (2 molar) auf pH 7,3 eingestellt.

Nach Volumenergänzung auf 10,0ml mit Aqua ad iniectabilia wurde die Lösung sterilgefiltert und bei 4°C lichtgeschützt gelagert.

Die Gabe der Fluorochrome erfolgte mit 1ml-Präzisionsspritzen über Subkutankanülen gewichtsadaptiert (1ml ad 1kg KG). Hierzu wurde die Injektionslösung auf Zimmertemperatur angewärmt und über eine abgehobene desinfizierte Hautfalte des Abdomens intraperitoneal appliziert.

3.3.2 Histochemische Färbungen

Zur Auswertung und Beurteilung von Kallusqualität und Ossifizierung sind die Färbungen nach Masson-Goldner, v. Kossa/ Safranin-O sowie Safranin-O/ Lichtgrün seit langem anerkannte Standards [73, 74]. Für den Nachweis von Knorpel wird Safranin-O genutzt, während die Versilberung nach v. Kossa die kalzifizierten Arealen eines Gewebes darstellt. Die unkomplizierte Handhabung und ausreichende Kontrastbildung in den genannten Färbekombinationen erlauben eine gute Differenzierung und die Erfassung über spezielle Mikroskop- und Bildanalysesysteme, die den deutlichen Vorteil hochpräziser Erfassung und reproduzierbarer Datensätze haben [75].

3.3.2.1 Masson-Goldner

In der Färbung nach Masson-Goldner sind die verschiedenen zellulären Materialien in der Übersicht gut von einander unterscheidbar. Mineralisiertes Gewebe und Bindegewebe ist leuchtend grün erkennbar, das vorhandene Osteoid dagegen rötlich abgegrenzt. Eine korrekte Unterscheidung zwischen Bindegewebe und mineralischen Anteilen ist bei dieser Färbung jedoch nicht möglich. Einzelne Zellkerne sind braunschwarz angefärbt und Erythrozyten erscheinen gelblich.

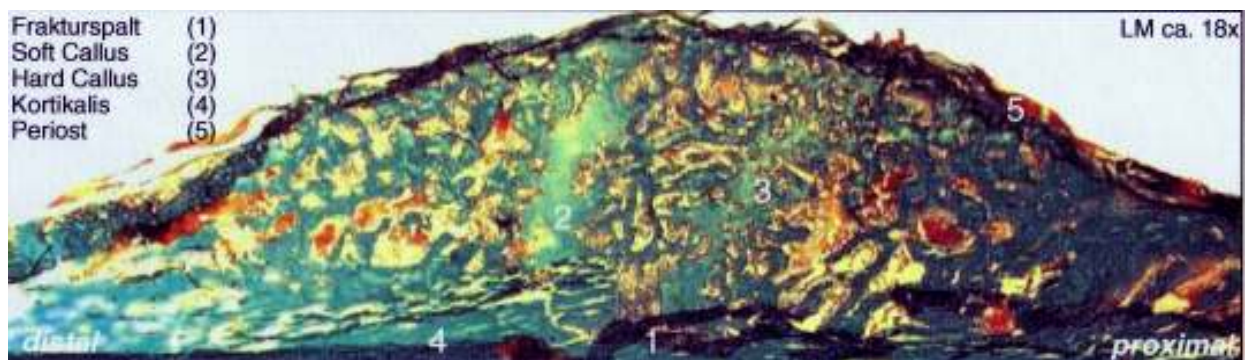


Abb. 6: Längsschnitt durch den periostalen Kallus einer Tibia (3 Wochen) nach Weichteilschaden und Fraktur in der Färbung nach Masson-Goldner (Vergrößerung ca. 18x).

3.3.2.2 Von Kossa/ Safranin O

Bei der Versilberung nach von Kossa wird kalzifizierter Knorpel und durchgängig mineralisches Gewebe schwarz dargestellt und der eigentliche Knorpel mit Safranin O intensiv rot gefärbt.

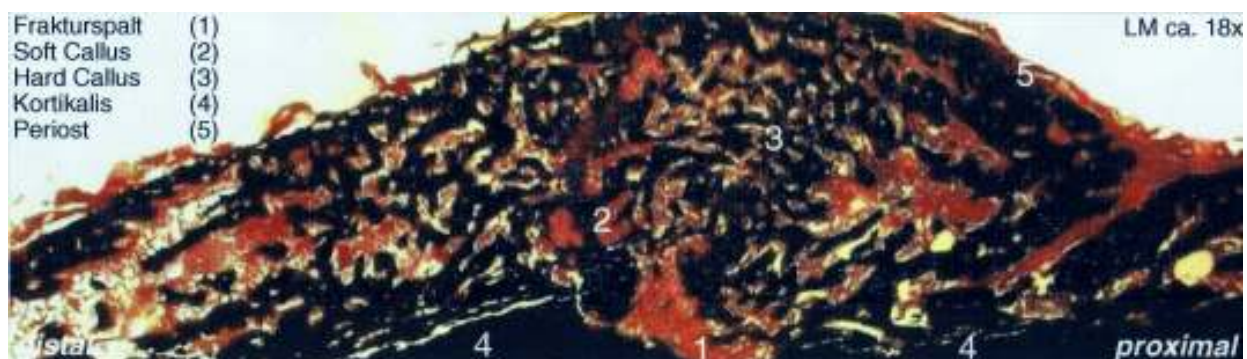


Abb. 7 : Längsschnitt durch den periostalen Kallus einer Tibia (3 Wochen) nach Weichteilschaden und Fraktur in der Färbung nach v.Kossa/Safranin O (Vergrößerung ca. 18x).

3.3.2.3 Safranin O/ Lichtgrün

Bei dieser Färbung stellt sich kalzifiziertes Gewebe in hellgrün dar; die knorpeligen Anteile lassen sich durch die rote Anfärbung gut dazu kontrastieren.

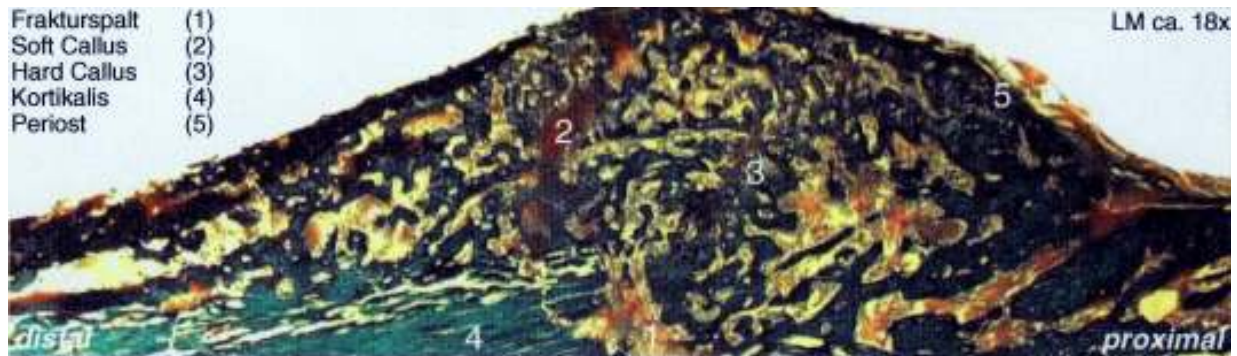


Abb. 8 : Längsschnitt durch den periostalen Kallus einer Tibia (3 Wochen) nach Weichteilschaden und Fraktur in der Färbung nach Safranin O/Lichtgrün (Vergrößerung ca. 18x).

3.4 Quantitative histomorphometrische Analyse mittels PC-gestütztem Bildanalysessystem

3.4.1 Histomorphometrische Parameter zur Analyse des Kallus

Mittels des PC-gestützten Bildanalyseystems (Software: AxioVision[®], Fa. Zeiss/ Mikroskop: DMRB, Fa. Leica) wurden folgende Parameter bestimmt:

1. Kallusdurchmesser auf Frakturspalthöhe
2. Fläche Kallus (gesamt-periostal-endostal)
3. Mineralisierte Fläche im Kallus (gesamt-periostal-endostal)
4. Kallusdichte (Mineralisierunganteil in % der Fläche, gesamt-periostal-endostal)
5. Fläche Kortikalis
6. Mineralisierte Fläche in den Kortikales
7. Kortikalisdichte (Mineralisierunganteil in % der Fläche)

Die optische Vergrößerung betrug in allen Messreihen einheitlich 1,6 bei einem elektronischen Zoomfaktor von 0,63. Zur Definition der region of interest (ROI) wurde

der bikortikale Durchmesser auf Frakturspalthöhe definiert, dieser Wert mit 1,5 multipliziert und die entstehende Strecke vom Frakturspalt (Zentrum) ausgehend sowohl nach proximal als nach distal gelegt (Abb. 9).

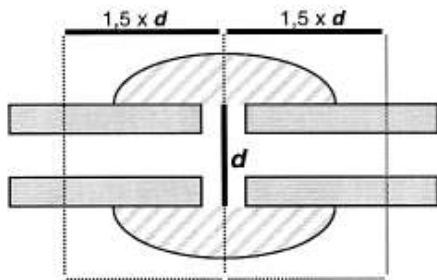


Abb. 9: Schema der Region Of Interest (ROI)

Die genannten Parameter wurden interaktiv am Bildschirm markiert und die angegebenen Ratios automatisch programmintern berechnet. Die notwendige Programmierung der Steuerungsmacros wurde individuell für die vorliegende Untersuchung vorgenommen. Die relevanten Areale wurden nach Definition und Kalibrierung von Beleuchtung, Vergrößerung und Zoom über ein Additions- bzw. Subtraktionsverfahren vermessen. Die Ausarbeitung dieser Macros wurde in enger und kontinuierlicher Abstimmung mit einem spezialisierten Biotechnologie-Ingenieur des Forschungslabors des Centrums für Muskuloskeletale Chirurgie der Charité in Vorversuchen getestet und überwacht.

3.4.2 Quantitative Analyse der Fluorochrommarkierung

Die Auswertung der polychrom sequenzmarkierten Präparate wurde durch dasselbe Bildanalyzesystem und identischer Einstellung, jedoch in Kombination mit einer integrierten Fluoreszenzlampe und angepassten Filtern vorgenommen. Die Anreicherungen mit Xylenolorange (rot), diejenige mit Calcein (grün) und die durch die Gabe von Tetracyclin (blau) wurden makrogestützt registriert und vermessen. Die Belichtungszeit wurde automatisiert für das jeweilige Fluorochrom angeglichen, um Unterschiede hinsichtlich der Strahlungsintensität auszugleichen und somit Abweichungen der Flächenbestimmung zu vermeiden. Die vermessenen Areale umfassten die jeweiligen Kallusanteile (periostal/endostal) sowie 30% der

dazugehörigen externen und internen Kortikalisschichten, um eine eventuelle Stimulation periostaler und endostaler Osteoblasten mitzuerfassen und diese Fluoreszenzareale mit den Signalen der Kontrollgruppe vergleichbar zu machen.

3.5 Statistik

Die weitere Datenbearbeitung erfolgte mit EXEL[®] (Fa. Microsoft, Seattle/USA) und die statistische/ grafische Auswertung mit SigmaStat[®] und SigmaPlot[®] (Fa. Systat, Richmond/USA).

Alle Daten wurden als Mittelwerte der jeweiligen Gruppen mit den zugehörigen Standardabweichungen angegeben. Dabei wurde Student's t-Test für die Analyse der Unterschiede zwischen der 3 Wochen- und der 6 Wochen-Gruppe verwendet. Für die Untersuchung verschiedener Zeitpunkte innerhalb einer Tiergruppe wurden univariate Varianzanalysen (one-way-ANOVA) mit post-hoc-Analyse (Bonferroni-Korrektur) durchgeführt. Die Signifikanzgrenze wurde einheitlich bei $p < 0,05$ festgelegt.

3.6 Geräte, Chemikalien und Verbrauchsmaterialien

Narkosegerät	Trajan 800, Fa. Drägerwerk AG, Lübeck GME 4 Anaesthesie, Fa. Stephan
Frakturierguillotine	Konstruktion Biomechaniklabor, CMSC Berlin
CII-Gerät	Biomechanical Engineering Facility, Virginia Commonwealth University/ USA
Bildwandler	Siremobil Iso-C, Fa. Siemens, München
Röntgengerät	Mobilett Plus, Fa. Siemens, München
Röntgenkassette / Filmentwicklung	Cronex Cassette Quanta Detail 24 x 30cm und Protec 45 Compact, Fa. DuPont de Nemours, Bad Homburg
pH-Meter	PH 320, Fa. WTW, Weilheim
Schleifgeräte	Phoenix 3000, Fa. Jean Wirtz (Bezug über Metec GmbH, Düsseldorf) und AW-10, Fa. EXAKT, Norderstedt
Bandsäge	Typ 36, Fa. EXAKT, Norderstedt
Mikrotom	SM 2500 S, Fa. Leica Instruments, Nussloch

Wärmeschrank	Function-line B12, Fa. Heraeus Instruments/ Fa. Kendro, Hanau
Bildanalyse	Zeiss KS 400 und AxioVision, Fa. Zeiss, Oberkochen
Mikroskop	DMRB, Fa. Leica, Wetzlar
Narkotikum	Isofluran, Fa. Abbott GmbH, Wiesbaden
Kirschnerdrähte	1,0mm, Fa. Mathys Medical Ltd., Bettlach/ CH
Nahtmaterial	Propylene 5-0, Fa. Johnson-Johnson, New Brunswick/ USA
Röntgenfilme	Microvision C Mammografiefilm, Fa. Sterling Diagnostic Imaging, Newark/ USA
Filmentwickler/-fixierer	Cronex Mix-MD-Developer und Mix-MF-E Fixer, Fa. Sterling Diagnostic Imaging, Bad Homburg
Fluorochrome	Tetracyclinhydrochlorid, Fa. Synopharm, Barsbüttel Xylenolorange, Fa. Arcos Organics, New Jersey/ USA Calcein, Fa. Sigma Chemicals Co., St. Louis/ USA
Aquq ad iniect.	Fa. Braun, Melsungen
Injektionsmaterial	Omnifix 1ml, Fa. Braun, Melsungen
Kunststoffe	Technovit 9200 NEW und Technovit 3040, Fa. Haereus Kulzer, Wehrheim
Schleifpapier	WS-Flex 18-C SK 250mm P80/1000/2000/4000, Fa. Hermes, Bezug über Fa. dia-plus, Oststeinbeck
Alkohole/ Xylol	Herbeta-Arzneimittel, Berlin
Schneidflüssigkeit	Fa. WIV, Schwetzingen
Objektträger	HistoBond, Fa. Marienfeld, Lauda-Königshofen und Fa. dia-plus, Oststeinbeck
Deckgläser	Fa. Menzel-Gläser, Braunschweig
Schutzfolie	Kisol-Folie 0,025 x 95 x 95mm farblos, Fa. Medim Histotechnologie, Gießen
Kleber	Vitro-Clud, Fa. R. Langenbrinck, Emmendingen und Technovit 7100 und Technovit 7210 VLC, Fa. Heraeus Kulzer, Wehrheim
Färbelösungen	Fa. Merck, Darmstadt und Fa. Waldeck, Münster

4. Ergebnisse

4.1 Quantitative Histomorphometrie der Kallusparameter

4.1.1 Kallusflächen (gesamt – periostal – endostal)

In allen folgenden Abbildungen ist aus Gründen der Übersichtlichkeit der Weichteilschaden synonym als „Trauma“ bezeichnet.

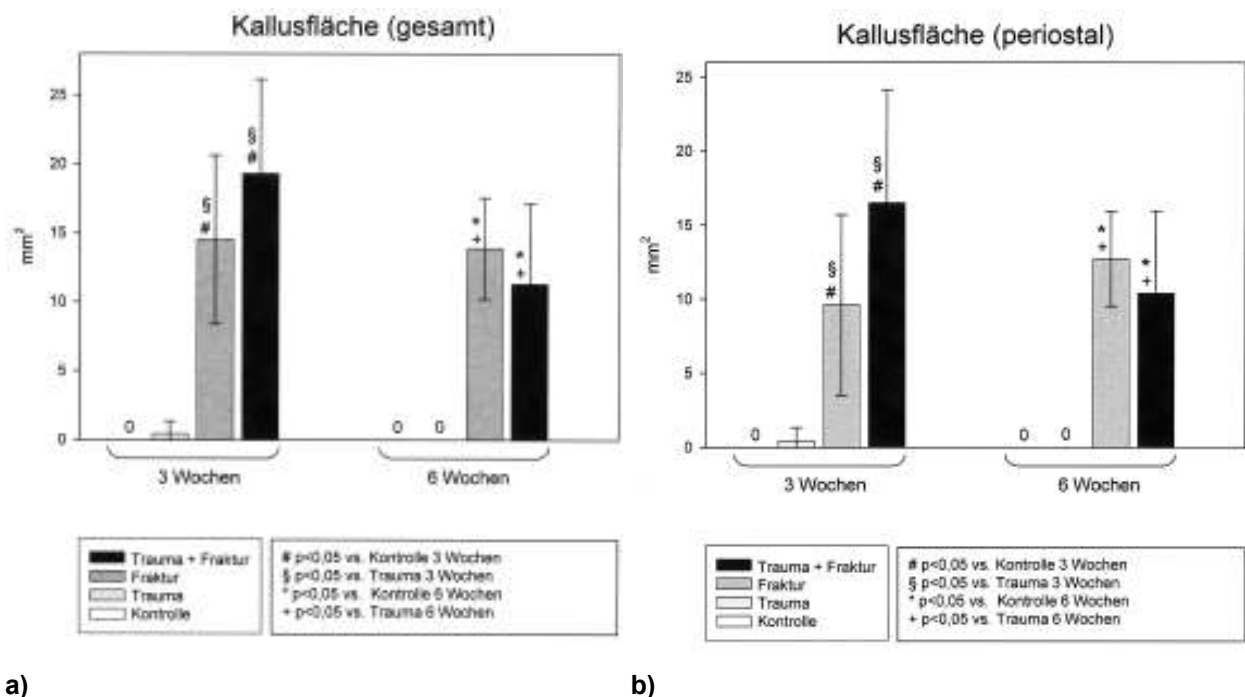


Abb. 10 a): Gesamte Kallusfläche nach 3 bzw. 6 Wochen bei Kontrollen und nach Weichteilschaden, Fraktur und kombinierter Verletzung

b): Periostale Kallusfläche nach 3 bzw. 6 Wochen bei Kontrollen und nach Weichteilschaden, Fraktur und kombinierter Verletzung

Die gesamte Kallusfläche ohne nähere Differenzierung zeigte signifikant erhöhte Werte bei Tieren mit Fraktur sowie Weichteilschaden/Fraktur im Vergleich zu den Kontrollen. Ferner bestand eine signifikante Zunahme zwischen den Fraktur-Tieren und den Weichteilschaden/Fraktur-Tieren und den Weichteilschaden-Gruppen nach 3 und 6

Wochen. Ein signifikanter Unterschied zwischen Fraktur- und Weichteilschaden/Fraktur-Tieren konnte in keiner der beiden Zeitgruppen bestätigt werden. Tendenziell zeigte sich jedoch nach dreiwöchiger Standzeit eine größere Kallusfläche bei den Weichteilschaden/Fraktur-Tieren im Vergleich zu den Tieren mit isolierter Fraktur. Nach 6 Wochen konnte dieser Trend nicht mehr nachgewiesen werden. Insgesamt sind die Kallusflächen nach 6 Wochen niedriger als nach 3 Wochen.

Die quantitative Analyse der periostalen Kallusfläche zeigte, dass diese den weitaus überwiegenden Anteil an der Gesamtkallusfläche einnimmt. Signifikante Unterschiede konnten bei den Fraktur- bzw. Tieren mit kombinierter Verletzung zu den jeweiligen unverletzten Kontrollen und der Weichteilschaden-Gruppe gezeigt werden. Beim Vergleich der Fraktur-Tiere mit der Gruppe der Weichteilschaden/Fraktur-Tiere zeigte sich nach 3 Wochen ein Vergrößerungstrend der Kallusfläche bei den stärker verletzten Tieren. Nach 6 Wochen lag das durchschnittliche Kallusareal der stärker verletzten Tiere hingegen unter dem der Tiere mit isolierter Fraktur. Hinzuweisen ist auf eine sehr geringe Kallusfläche nach isoliertem Weichteilschaden nach 3 Wochen, das nach 6 Wochen nicht mehr nachweisbar war.

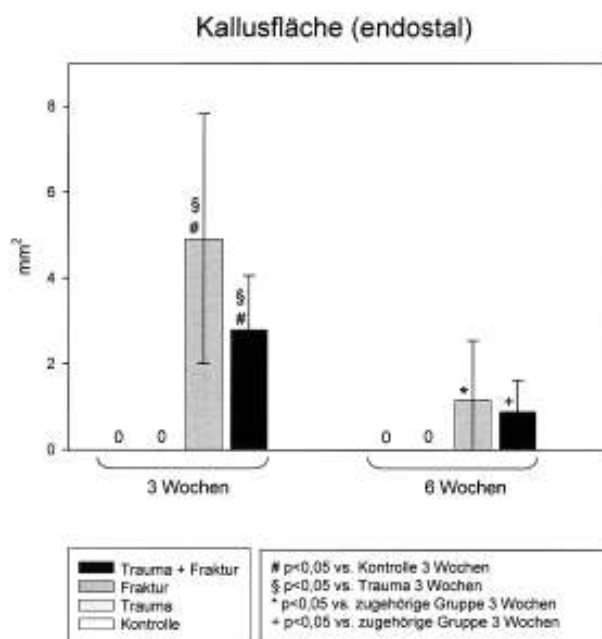


Abb. 10 c):

Endostale Kallusfläche nach 3 bzw. 6 Wochen bei Kontrollen und nach Weichteilschaden, Fraktur und kombinierter Verletzung

c)

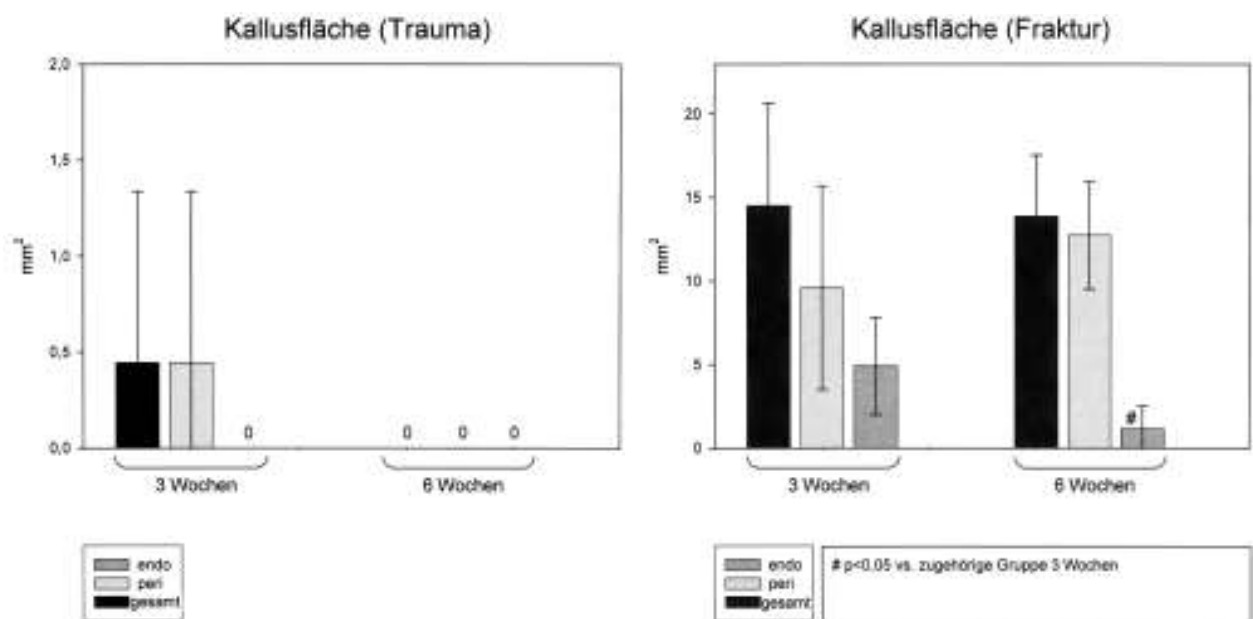
Die endostalen Anteile des Gesamtkallus waren insgesamt gering. Bemerkenswert war die Tendenz einer erhöhten Kallusfläche nach 3 Wochen bei den Fraktur-Tieren im Gegensatz zu den Weichteilschaden/Fraktur-Tieren. Beim Gesamt- sowie

Periostalkallus war dieses Verhältnis umgekehrt. Nach 6 Wochen war das endostale Areal sehr niedrig. Dennoch existierte hier eher eine leicht größere Fläche bei der Fraktur-Gruppe als bei den Tieren mit kombinierter Verletzung.

Nach 6 Wochen war das endostale Areal sehr gering, ebenfalls mit einer leicht größeren Fläche bei den Fraktur-Tieren im Vergleich zu den Weichteilschaden/Fraktur-Tieren.

Signifikant erhöht waren die Werte der jeweiligen Fraktur-Tiere und Weichteilschaden/Fraktur-Tiere waren nach 3 Wochen im Vergleich zur ihrer Kontrolle und Gruppe mit isoliertem Weichteilschaden. Zusätzlich zeigte sich jedoch auch ein signifikanter Unterschied zwischen den Tieren mit 6 Wochen im Vergleich zur jeweilig zugehörigen 3 Wochen-Gruppe.

4.1.2 Kallusfläche nach Weichteilschaden, Fraktur und kombinierter Verletzung



a)

b)

Abb. 11: a) Kallusflächen nach 3 bzw. 6 Wochen nach Weichteilschaden

b) Kallusflächen nach 3 bzw. 6 Wochen nach Fraktur

Bei Vergleich der Kallusflächen zwischen den verschiedenen Verletzungsstufen zeigte sich eine geringe Kallusentwicklung nach isoliertem Weichteilschaden. Nach 3 Wochen

trat ein ausschließlich periostaler Kallus auf. Nach 6 Wochen war dieser nicht mehr nachweisbar.

Der Vergleich der Kallusareale nach Fraktur zeigte zwischen den 3 Wochen und den 6 Wochen keine Unterschiede im Gesamtkallus. Die Verteilung der Kallusflächen war nach 6 Wochen zugunsten des periostalen Anteils verschoben. Eine signifikante Reduktion war für den endostalen Kallus nach 6 Wochen detektierbar.

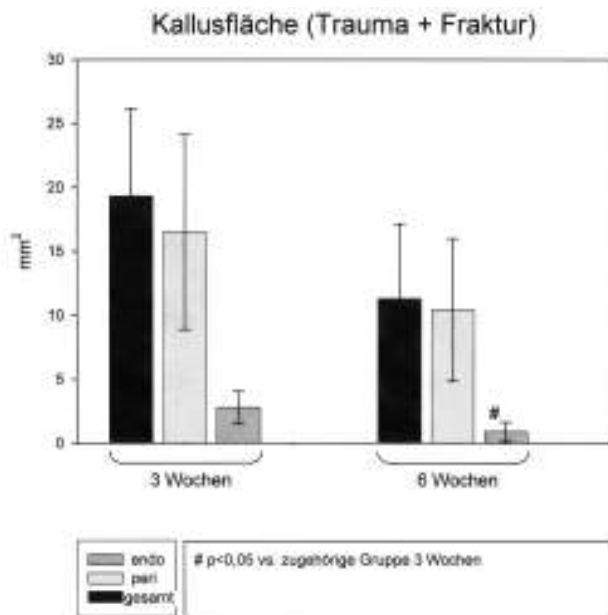


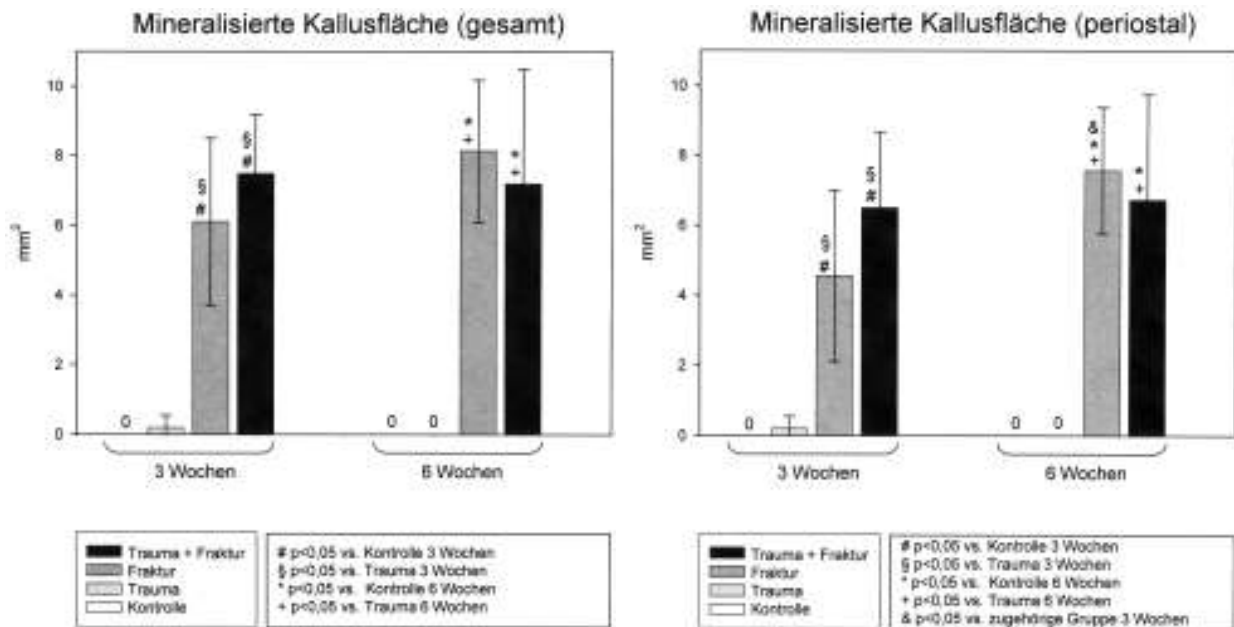
Abb. 11 c):

Kallusflächen nach 3 bzw. 6 Wochen nach kombinierter Verletzung

c)

Bei den Weichteilschaden/Fraktur-Tieren lag bei 3 Wochen und bei 6 Wochen der periostale Anteil am jeweiligen Gesamtkallus vergleichsweise hoch bzw. der endostale Anteil entsprechend gering. Ein signifikanter Unterschied der erfassten Flächen zwischen 3 Wochen und 6 Wochen war nicht nachweisbar. Der endostale Kallus nach Weichteilschaden mit Fraktur zeigte nach 6 Wochen signifikant reduzierte Werte im Vergleich zur 3 Wochen-Gruppe.

4.1.3 Mineralisierte Kallusfläche (gesamt – periostal – endostal)



a)

b)

Abb.12 a): Gesamte mineralisierte Kallusflächen nach 3 bzw. 6 Wochen nach Weichteilschaden, Fraktur und kombinierter Verletzung

b): Periostale mineralisierte Kallusflächen nach 3 bzw. 6 Wochen nach Weichteilschaden, Fraktur und kombinierter Verletzung

Der Anteil mineralisierter Matrix innerhalb des Gesamtkallus zeigte eine sehr geringe Ossifizierung des Weichteilschaden-Kallus nach 3 Wochen. Ebenfalls war nach 3 Wochen in der Weichteilschaden/Fraktur-Gruppe tendenziell mehr mineralisierter Kallus zu finden als bei isolierter Fraktur. Nach 6 Wochen zeigte sich analog zum Gesamtkallus eine verstärkte Mineralisierung in der Fraktur-Gruppe im Vergleich zur Gruppe mit kombinierter Verletzung. Auch hier sind keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich der beiden Gruppen zu verzeichnen. Erwartungsgemäß konnte jedoch nach 6 Wochen insgesamt eine tendenziell stärkere Ossifizierung als bei den 3 Wochen-Gruppen demonstriert werden. Hinsichtlich der mineralisierten Areale zeigt sich 3 Wochen nach isolierter Fraktur ebenso wie nach Weichteilschaden und Fraktur ein signifikanter Unterschied zu den Tieren der Kontroll- und Weichteilschaden-Gruppe. Analoge

Verhältnisse mit vergleichbaren signifikanten Unterschieden fanden sich nach 6 Wochen.

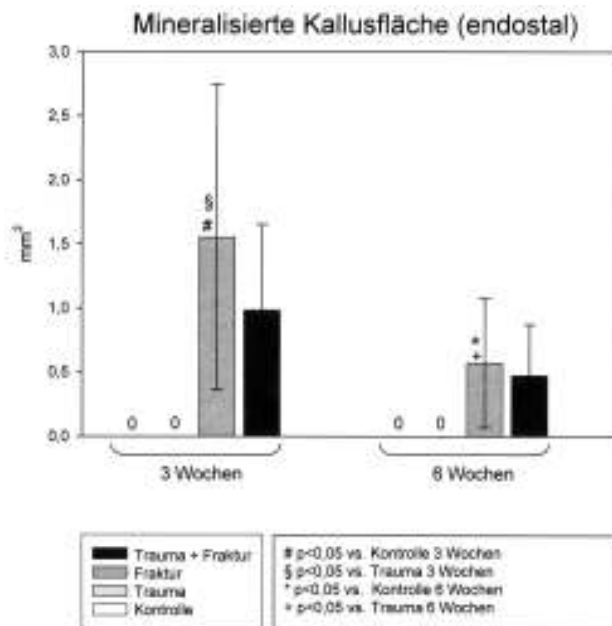


Abb. 12 c):

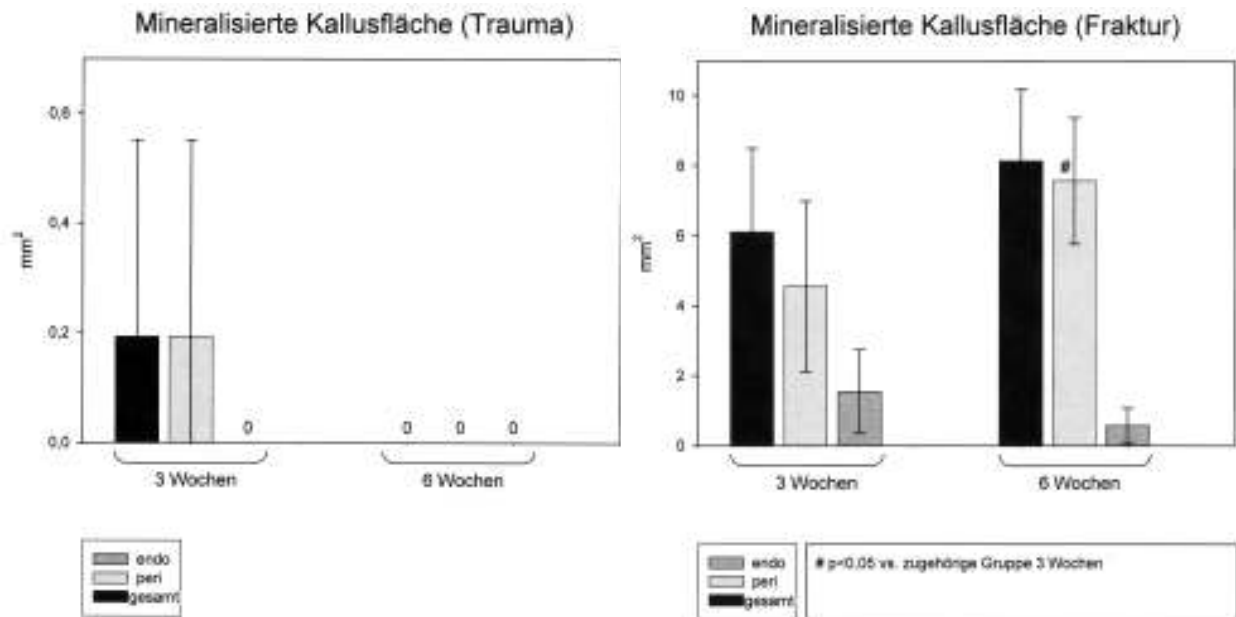
Endostale mineralisierte Kallusflächen nach 3 bzw. 6 Wochen nach Weichteilschaden, Fraktur und kombinierter Verletzung

c)

Die mineralisierten Flächen der Weichteilschaden/Fraktur-Gruppen zu 3 und 6 Wochen sind annähernd identisch. Bei den Tieren mit isolierter Fraktur fand sich nach 6 Wochen ein signifikant höherer Anteil mineralisierter Kallusfläche als nach 3 Wochen. Alle Charakteristika des mineralisierten Gesamtkallus konnten bei hauptsächlich periostal lokalisiertem Kallusgewebe auch für den rein periostalen Kallus gezeigt werden.

Hinsichtlich des endostalen Kallus wiesen die Tiere mit isolierter Fraktur nach 3 Wochen und nach 6 Wochen eine tendenziell größere mineralisierte Fläche auf als die jeweils zeitgleichen Tiere mit kombinierter Verletzung. Dieser Trend war in der 3 Wochen-Gruppe stärker ausgeprägt. Insgesamt nahm die mineralisierte endostale Kallusfläche sowohl der Fraktur-Tiere als auch der Weichteilschaden/Fraktur-Tiere von 3 Wochen nach 6 Wochen hin ab.

4.1.4 Mineralisierte Kallusfläche nach Weichteilschaden, Fraktur und kombinierter Verletzung



a)

b)

Abb.13 a): Mineralisierte Kallusfläche nach 3 bzw. 6 Wochen nach Weichteilschaden

b): Mineralisierte Kallusfläche nach 3 bzw. 6 Wochen nach Fraktur

Bei der Weichteilschaden-Gruppe war lediglich nach 3 Wochen eine äußerst geringe Mineralisierung nachweisbar. Nach 6 Wochen war generell kein Trauma-induzierter Kallus zu finden.

Bei den Tieren mit Fraktur war der Trend zur maßgeblich periostal lokalisierten Mineralisierung klar erkennbar. Ebenso fand sich eine insgesamt höhere Mineralisierung nach 6 Wochen. Während der Gesamtkallus nach 6 Wochen keine signifikanten Unterschiede zur 3 Wochen-Gruppe zeigte, waren der periostale Anteil jedoch nach 6 Wochen signifikant erhöht. Die endostalen mineralisierten Kallusflächen waren vergleichsweise gering.

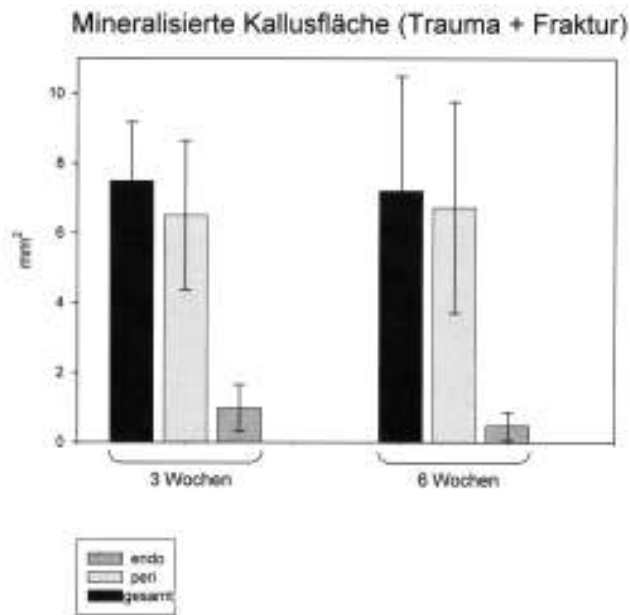


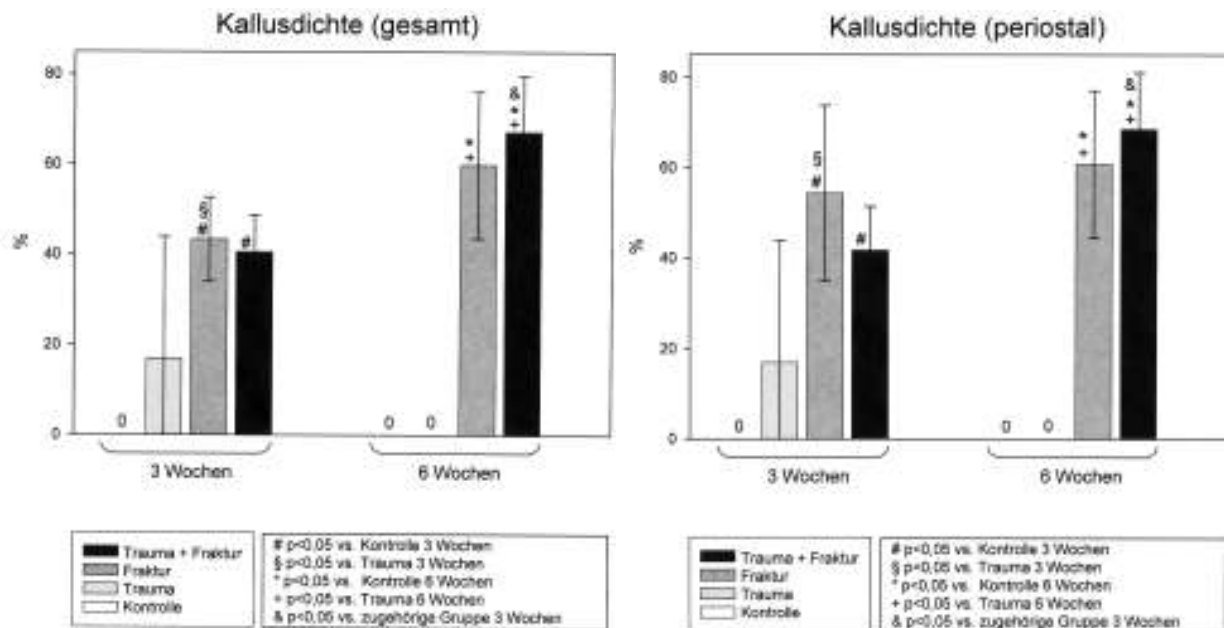
Abb. 13 c):

Mineralisierte Kallusfläche nach 3 bzw. 6 Wochen nach kombinierter Verletzung

c)

Bei den Tieren mit kombinierter Verletzung zeigten sich nach 3 und 6 Wochen kaum Unterschiede. Zu beiden Zeitpunkten waren die endostalen bzw. periostalen mineralisierten Anteile nahezu identisch. Tendenziell war der Gesamtkallus nach 6 Wochen etwas verringert, bedingt durch eine endostale Verminderung der Mineralisierung.

4.1.5 Kallusdichte (gesamt – periostal – endostal)



a)

b)

Abb. 14 a): Gesamte Kallusdichte nach 3 bzw. 6 Wochen bei Kontrollen und nach Weichteilschaden, Fraktur und kombinierter Verletzung

b): Periostale Kallusdichte nach 3 bzw. 6 Wochen bei Kontrollen und nach Weichteilschaden, Fraktur und kombinierter Verletzung

Die aus dem Verhältnis von mineralisierten und nicht mineralisierten Anteilen bestimmte Dichte demonstrierte signifikant erhöhte Werte bei den Fraktur-Tieren im Vergleich zu den entsprechenden Kontroll- und Weichteilschaden-Gruppe nach 3 Wochen. Für die Weichteilschaden/Fraktur-Tiere nach 3 Wochen konnte dies nur im Vergleich zur Kontrollgruppe nachgewiesen werden.

Beim Vergleich der 6 Wochen-Tiere war eine signifikante Zunahme der Kallusdichte zwischen Fraktur- bzw. Gruppe mit kombinierter Verletzung und jeweiliger Kontroll- und Weichteilschaden-Gruppe erkennbar. Zusätzlich konnte für die Weichteilschaden-/Fraktur-Tiere nach 6 Wochen eine signifikant höhere Dichte im Vergleich zur korrespondierenden 3 Wochen-Gruppe gezeigt werden. Die Kallusdichte war insgesamt mit Ausnahme der Gruppen mit isoliertem Weichteilschaden nach 6 Wochen erhöht. Bei den 3-Wochen-Tieren lag die Kallusdichte der Fraktur-Gruppe leicht höher als die der

Weichteilschaden/Fraktur-Gruppe. Bei den 6 Wochen-Tieren war dieses Verhältnis umgekehrt.

Die periostalen Kallusdichten waren nach 3 Wochen bei der Fraktur-Gruppe signifikant höher als bei der entsprechenden Kontroll- und Weichteilschaden-Gruppe. Für die Gruppe mit kombinierter Verletzung war dies nur im Hinblick auf die Kontrolle nachweisbar. Ebenfalls demonstrierten die Tiere der Weichteilschaden/Fraktur-Gruppe nach 3 Wochen tendenziell eine geringere Kallusdichte als die Tiere der vergleichbaren Fraktur-Gruppe. Innerhalb der 6 Wochen-Gruppe waren die Dichtewerte des periostalen Kallus insgesamt höher als bei den 3 Wochen-Gruppen. Dieser Unterschied war für die Tiere der Weichteilschaden/Fraktur-Gruppe signifikant. Nach 6 Wochen waren die periostale Kallusdichte sowohl der Fraktur- als auch der Gruppe mit kombinierter Verletzung signifikant höher ausgeprägt als in den entsprechenden Kontroll- und Weichteilschaden-Gruppen.

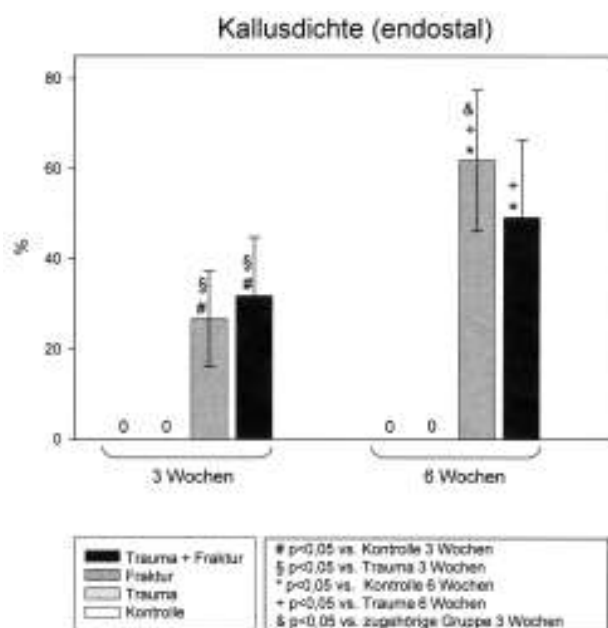


Abb. 14 c):

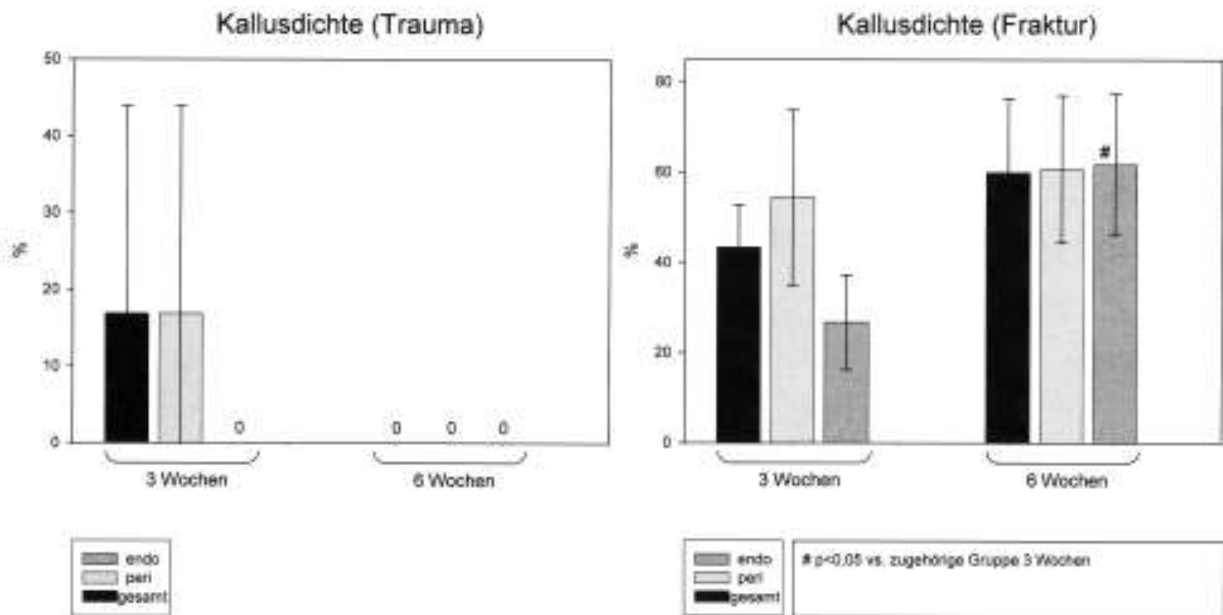
Endostale Kallusdichte nach 3 bzw. 6 Wochen bei Kontrollen und nach Weichteilschaden, Fraktur und kombinierter Verletzung

c)

Auch die endostalen Kallusdichten tendierten nach 6 Wochen zu höheren Werten. Für die Fraktur-Gruppe ergab sich nach 6 Wochen ein signifikant höherer Wert als bei der korrespondierenden 3 Wochen-Gruppe. Nach 3 und 6 Wochen war die endostale Kallusdichte der Fraktur- und Weichteilschaden/Fraktur-Gruppe im Vergleich zur jeweiligen Kontroll- und Weichteilschaden-Gruppe signifikant erhöht.

Allgemein lagen die Dichtewerte bei der 3 Wochen-Gruppe mit kombinierter Verletzung etwas höher als bei der Gruppe mit isolierter Fraktur. Nach 6 Wochen war eine umgekehrte Tendenz zu sehen.

4.1.6 Kallusdichte nach Weichteilschaden, Fraktur und kombinierter Verletzung



a)

b)

Abb. 15 a): Kallusdichte nach 3 bzw. 6 Wochen nach Weichteilschaden

b): Kallusdichte nach 3 bzw. 6 Wochen nach Fraktur

Nur nach 3 Wochen war noch ein Kallus nach isoliertem Weichteilschaden darstellbar. Dieser war ausschließlich periostal lokalisiert und auf vergleichsweise niedrigem Niveau mineralisiert.

Die Fraktur-Kallus zeigen tendenziell eine höhere nach 6 Wochen als nach 3 Wochen. Eine signifikante Zunahme konnte für die endostale Kallusdichte nach 6 Wochen im Vergleich zur 3 Wochen-Gruppe demonstriert werden. Generell konnte festgestellt werden, dass nach 3 Wochen periostal eine deutlich stärkere Mineralisierung durchlaufen wurde als endostal. Nach 6 Wochen bestand fast keine Differenz mehr.

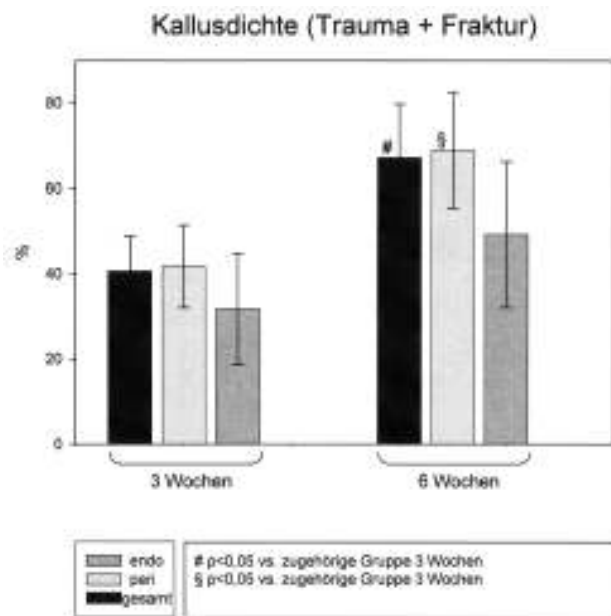


Abb. 15 c):

Kallusdichte nach 3 bzw. 6 Wochen nach kombinierter Verletzung

c)

Die Dichtewerte in der Gruppe mit Weichteilschaden/Fraktur waren nach 6 Wochen durchweg erhöht im Vergleich zum 3 Wochen-Zeitpunkt. Nach 6 Wochen konnte eine signifikante Zunahme der Gesamtkallus-Dichte sowie der periostale Kallusdichte im Vergleich zu den 3 Wochen-Tieren gezeigt werden. Für die endostalen Werte galt dies nur tendenziell.

4.1.7 Kortikalisdichte

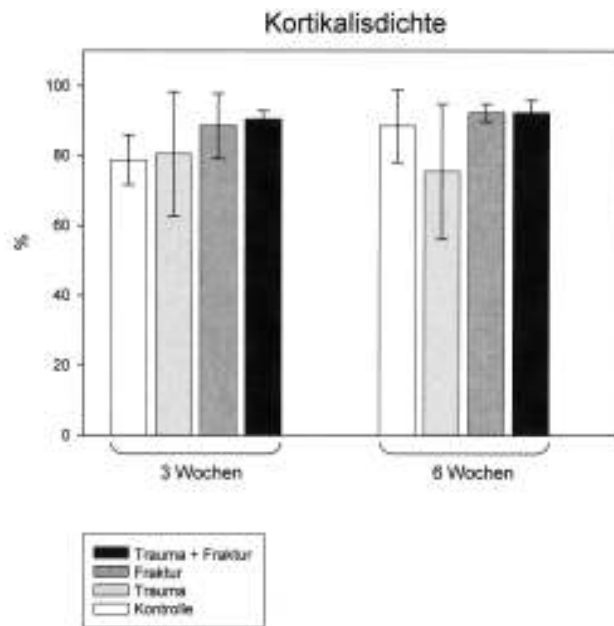


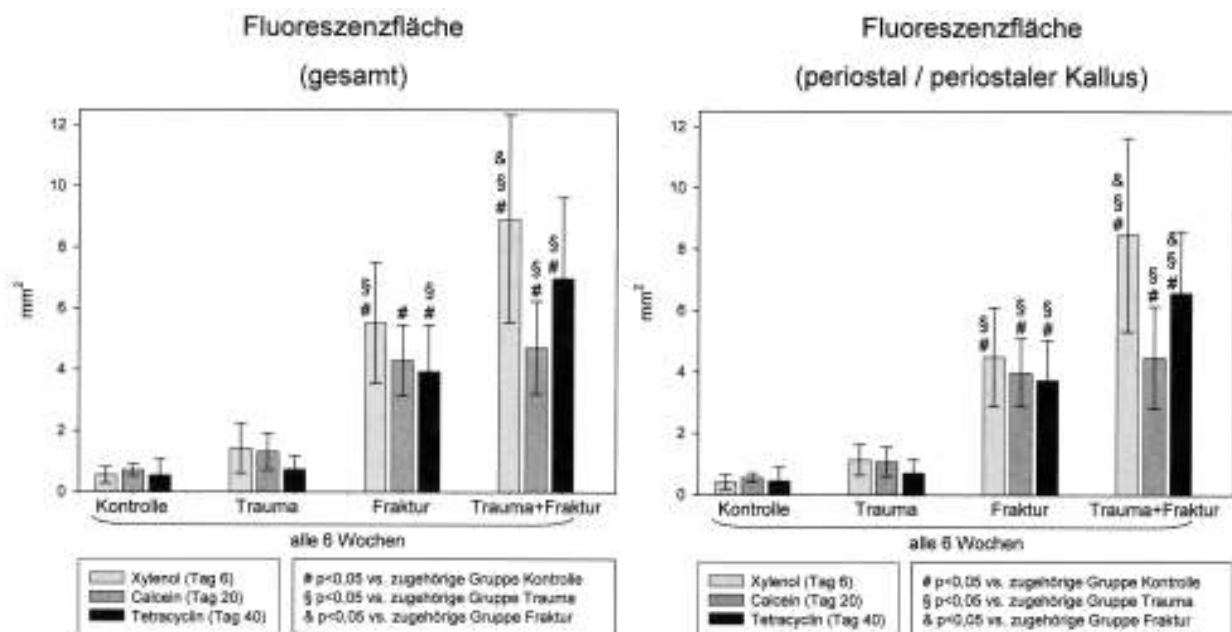
Abb. 16:

Dichte der Kortikalis nach 3 bzw. 6 Wochen bei Kontrollen und nach Weichteilschaden, Fraktur und kombinierter Verletzung

Die Veränderung der Kortikalisdichte der jeweiligen Untersuchungsgruppen im Vergleich zu den Kontrollen zeigt keinerlei statistisch signifikanten Differenzen.

4.2 Planimetrische Analyse der Fluorochrommarkierungen

4.2.1 Fluoreszenzfläche (gesamt – periostal – endostal)



a)

b)

Abb. 17 a): Gesamte Fluoreszenzflächen nach 6 Wochen bei Kontrollen und nach Weichteilschaden, Fraktur und kombinierter Verletzung

b): Periostale Fluoreszenzflächen nach 6 Wochen bei Kontrollen und nach Weichteilschaden, Fraktur und kombinierter Verletzung

Hinsichtlich der gesamten Fluoreszenzfläche zeigte die Auswertung der Xylenolmarkierung einen signifikanten Anstieg bei den Fraktur-Tieren im Vergleich zur Weichteilschaden-Gruppe. Ebenso war ein nochmaliger signifikanter Anstieg bei den Tieren mit kombinierter Verletzung im Vergleich zur Gruppe mit isolierter Fraktur nachweisbar. Signifikant erhöhte Werte der Weichteilschaden/Fraktur-Gruppe waren auch im Vergleich zu den Weichteilschaden- und Kontroll-Tieren erkennbar. Bei den Tieren mit isoliertem Weichteilschaden war tendenziell eine erhöhte Anreicherung im Vergleich zu den unverletzten Kontrollen erkennbar.

Für das zweite Fluorochrom war ein ähnlicher, jedoch weniger eindeutiger Verlauf feststellbar. Hier lag die Anreicherung mit Calcein bei der Weichteilschaden-Gruppe tendenziell höher als bei der Kontroll-Gruppe. Eine weitere Zunahme bei den Tieren mit

isolierter Fraktur war im Vergleich zur Kontroll-Gruppe signifikant. Bei den Tieren mit Weichteilschaden und Fraktur zeigte sich ebenfalls eine nochmalige Erhöhung, die im Vergleich zur Weichteilschaden- und Kontroll-Gruppe signifikant war.

Zur Darstellung der Spätphase in der Frakturheilung wurde zwei Tage vor Tötung der Tiere das dritte Fluorochrom verabreicht. Hier zeigte sich eine gering erhöhte Anreicherung nach isoliertem Weichteilschaden im Vergleich zur Kontrolle. Bei den Tieren mit Fraktur war ein signifikant gesteigerter Einbau im Vergleich zur Kontroll-Gruppe und zur Weichteilschaden-Gruppe darstellbar. Desweiteren zeigte sich ein nochmals erhöhtes Fluoreszenzverhalten bei der Gruppe mit kombinierter Verletzung mit signifikant erhöhten Werten im Vergleich zu den unverletzten Kontrollen und den Tieren mit isoliertem Weichteilschaden.

Insgesamt war die Frühphase der Frakturheilung quantitativ am stärksten mit einem Fluorochromeinbau verbunden. Die mittlere Phase des Betrachtungszeitraums ergab eine etwas geringere Einbauaktivität ohne signifikante Unterschiede. Eine Ausnahme dieser Tendenz war die hohe Aktivität in der Weichteilschaden-Gruppe nach 3 Wochen. Der Verlauf der Spätphase nach 6 Wochen war gekennzeichnet durch eine nochmals verringerte Inkorporierung des Tetracyclins im Vergleich zu den zum frühen bzw. mittleren Zeitpunkt verabreichten Fluorochrom. Allerdings konnte dies nicht für die Weichteilschaden/Fraktur-Gruppe aufgezeigt werden, welche hinsichtlich ihrer Fluoreszenzaktivität zwischen Früh- und Mittelphase lag.

Alle Tendenzen des Gesamtkallus waren auch für die periostale Fluorochrom-Anreicherung nachweisbar. Weiterhin war bei der zweiten Fluorochromgabe bei den Tieren mit isolierter Fraktur eine signifikante Erhöhung der Werte im Vergleich zur Gruppe mit isoliertem Weichteilschaden darstellbar. Für die Spätphase der Weichteilschaden/Fraktur-Gruppe nach 6 Wochen wurde ein signifikanter Anstieg gegenüber der Fraktur-Gruppe aufgezeigt.

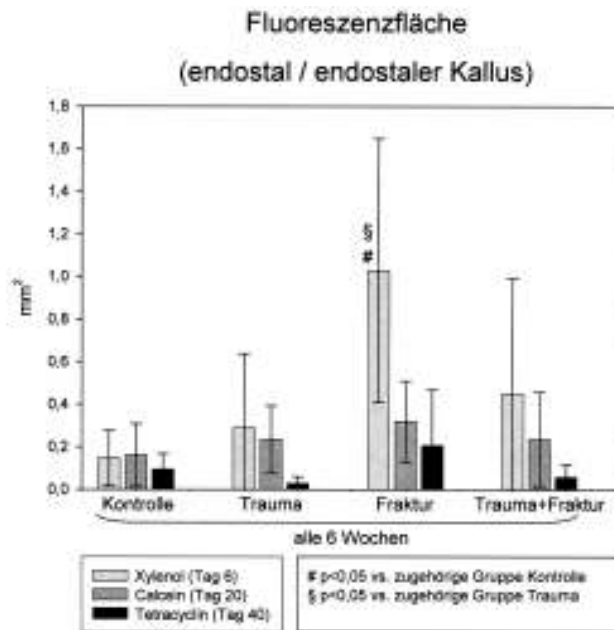


Abb. 17 c):

Endostale Fluoreszenzflächen nach 6 Wochen bei Kontrollen und nach Weichteilschaden, Fraktur und kombinierter Verletzung

c)

Die quantitativ geringeren endostalen Fluoreszenzflächen ergaben im Vergleich ein eher uneinheitliches Bild. Die in der Frühheilung inkorporierte Menge Xylenol zeigte in der Weichteilschaden-Gruppe gegenüber der Kontrolle eine Zunahme. Die Tiere mit isolierter Fraktur demonstrierten sowohl im Vergleich zur Kontrolle als auch zur Gruppe mit Weichteilschaden eine signifikante Zunahme der Xylenolmarkierung. Die Tiere mit kombinierter Verletzung wiesen jedoch zum frühen Zeitpunkt der Frakturheilung einen weit geringeren Fluorochromeinbau als die Fraktur-Gruppe auf.

Die mittlere Heilungsphase nach 3 Wochen demonstrierte eher geringe Unterschiede zwischen den unterschiedlichen Versuchsgruppen. Auf niedrigem Niveau war der Fluorochromeinbau nach isoliertem Weichteilschaden gegenüber der Kontrolle leicht gesteigert. Ein leichter Zuwachs war bei der Fraktur-Gruppe zu erkennen. Bei der Weichteilschaden/Fraktur-Gruppe fiel der Einbau vergleichsweise ab.

Die Tetracyclinannahme der Knochenmatrix war nach Weichteilschaden im Vergleich zu Kontrolle reduziert. Nach Fraktur konnte eine relative Zunahme detektiert werden. Auch beim Tetracyclineinbau der Gruppe mit kombinierter Verletzung war die Fluoreszenzfläche geringer als bei ausschließlicher Fraktur. Insgesamt nimmt im Zeitverlauf auch endostal die Fluoreszenzaktivität tendenziell eher ab.

4.2.2 Xylenolorange (gesamt – periostal – endostal)

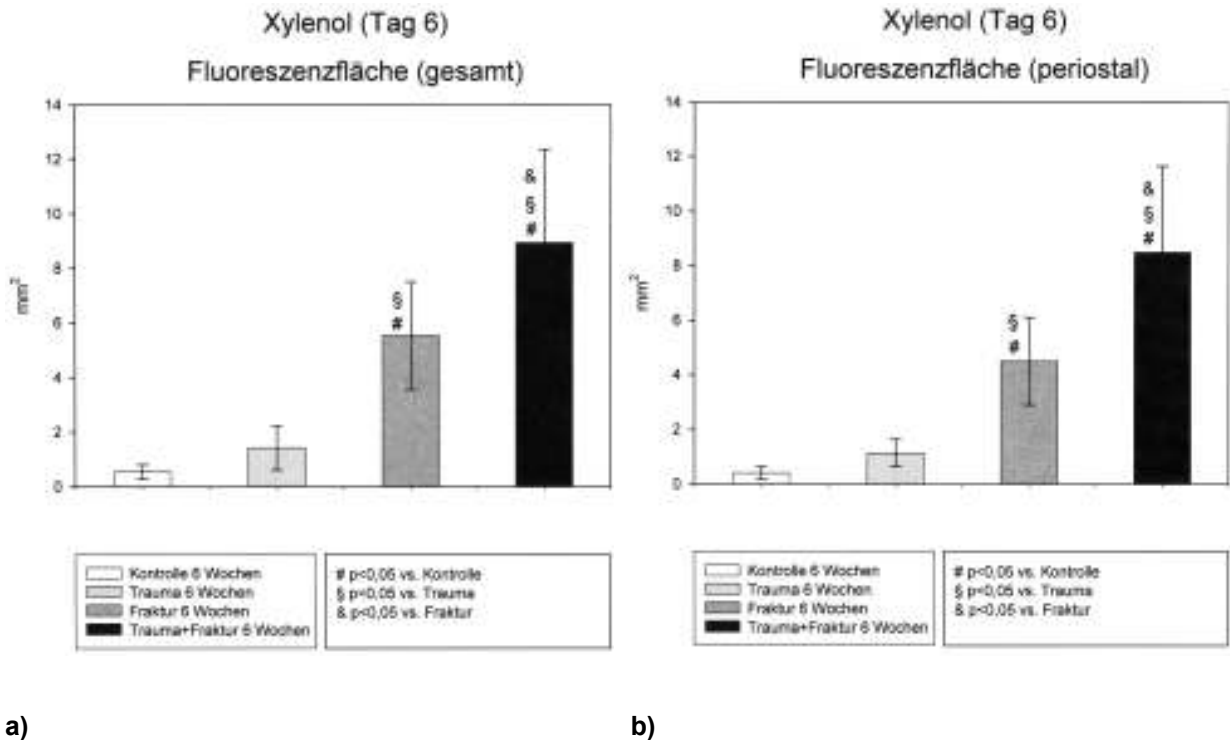


Abb. 18 a): Gesamte Xylenolanreicherung nach 6 Wochen in Kontrollen und nach Weichteilschaden, Fraktur und kombinierter Verletzung

b): Periostale Xylenolanreicherung nach 6 Wochen in Kontrollen und nach Weichteilschaden, Fraktur und kombinierter Verletzung

Hinsichtlich der ersten Fluorochromgabe mit Xylenol war eine signifikante Steigerung der gesamten Fluoreszenzaktivität in den Fraktur- und den Weichteilschaden/Fraktur-Tieren erkennbar. Gegenüber der Kontrolle ist nach isoliertem Weichteilschaden der Xylenoleinbau nur tendenziell erhöht. Nach Fraktur und insbesondere nach kombinierter Verletzung war jedoch eine statistisch signifikante Zunahme nachweisbar.

Die periostale Xylenolanreicherung wies ein vergleichbares Verteilungsmuster wie im Gesamtareal auf. Nach isoliertem Weichteilschaden konnte eine tendenziell größere Fluoreszenzfläche festgestellt werden. Nach Fraktur war die Werte gegenüber den Kontrollen und der Weichteilschaden-Gruppe signifikant erhöht.

Ein nochmaliger signifikanter Anstieg konnte für die Weichteilschaden/Fraktur-Tieren im Vergleich zu den Kontrollen, der Weichteilschaden-Gruppe und der Gruppe mit isolierter Fraktur aufgezeigt werden.

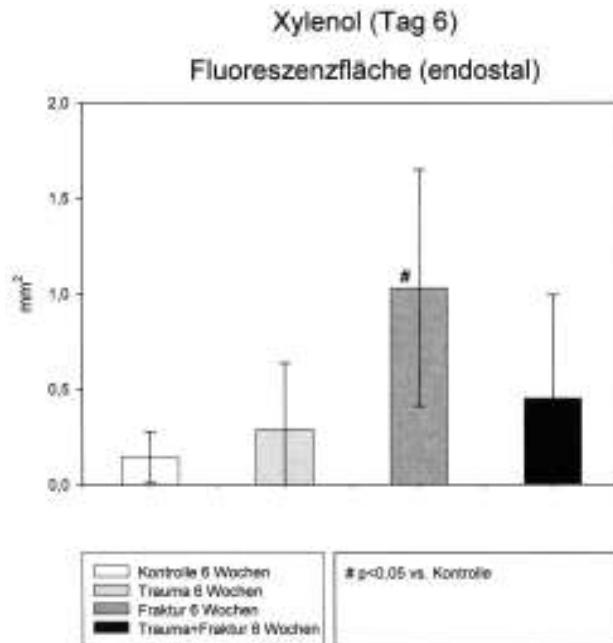


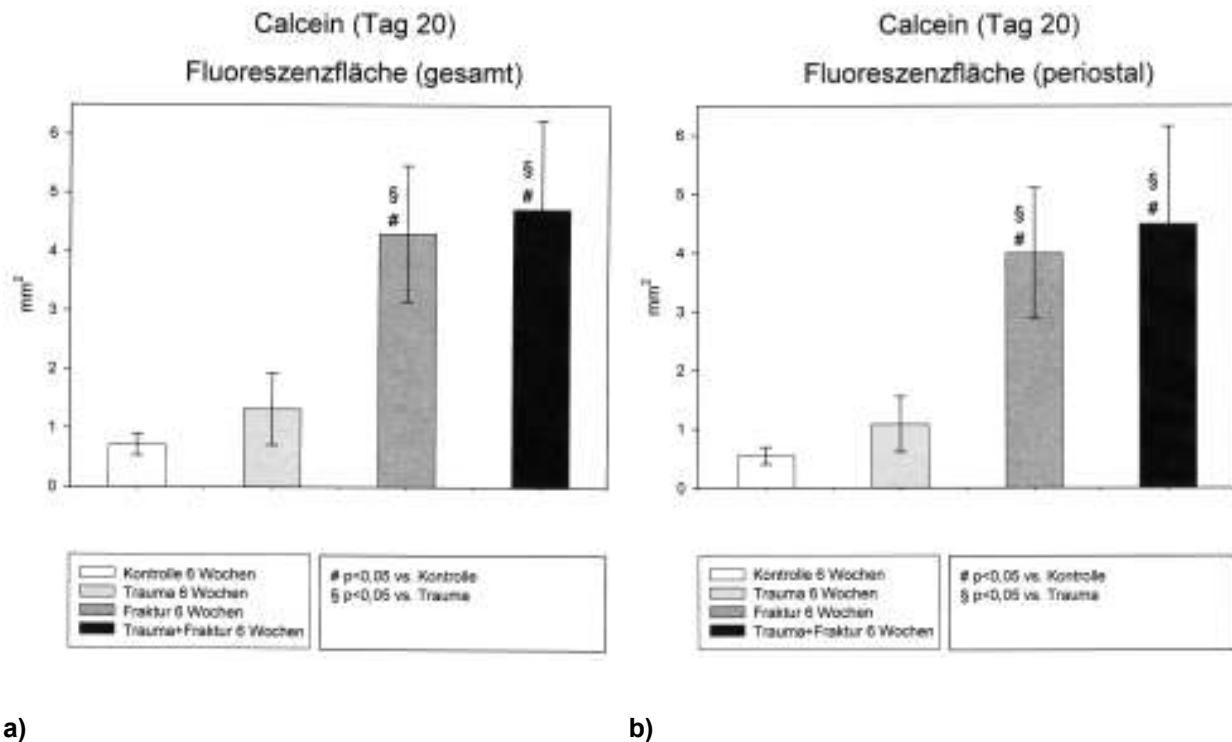
Abb. 18 c):

Endostale Xylenolanreicherung nach 6 Wochen in Kontrollen und nach Weichteilschaden, Fraktur und kombinierter Verletzung

c)

Die endostalen Fluoreszenzsignale verdeutlichten eine geringe Zunahme nach isoliertem Weichteilschaden gegenüber der Kontrolle. Dagegen konnte eine signifikante Erhöhung nach Fraktur nachgewiesen werden. Bei den Tieren mit kombinierter Verletzung fiel der Zuwachs an fluoreszenzaktiver Fläche gegenüber isolierter Fraktur deutlich geringer aus und unterschied sich nur wenig von der Inkorporation nach isoliertem Weichteilschaden.

4.2.3 Calceingrün (gesamt – periostal – endostal)



a)

b)

Abb. 19 a): Gesamte Calceinanreicherung nach 6 Wochen in Kontrollen und nach Weichteilschaden, Fraktur und kombinierter Verletzung

b): Periostale Calceinanreicherung nach 6 Wochen in Kontrollen und nach Weichteilschaden, Fraktur und kombinierter Verletzung

Die gesamte Matrixanreicherung mit Calcein zeigte einen vergleichbaren Trend wie die Fluoreszenzflächen zum frühen Zeitpunkt der Frakturheilung. Nach isoliertem Weichteilschaden war die Fluoreszenzaktivität tendenziell gegenüber der Kontrolle erhöht. Sowohl die Fraktur- als auch Weichteilschaden/Fraktur-Gruppe zeigten jeweils eine signifikante Zunahme im Vergleich zur Kontroll- und Weichteilschaden-Gruppe.

Die periostale Fluorochromanreicherung mit Calcein zeigte ein vergleichbares Profil wie in der Gesamtanreicherung. Es konnte eine tendenzielle Erhöhung nach Weichteilschaden im Vergleich zur Kontrolle sowie eine signifikante Erhöhung der Fluoreszenzsignale nach Fraktur bzw. nach kombinierter Verletzung gegenüber der Kontroll-Gruppe und den Tieren mit isoliertem Weichteilschaden dargestellt werden.

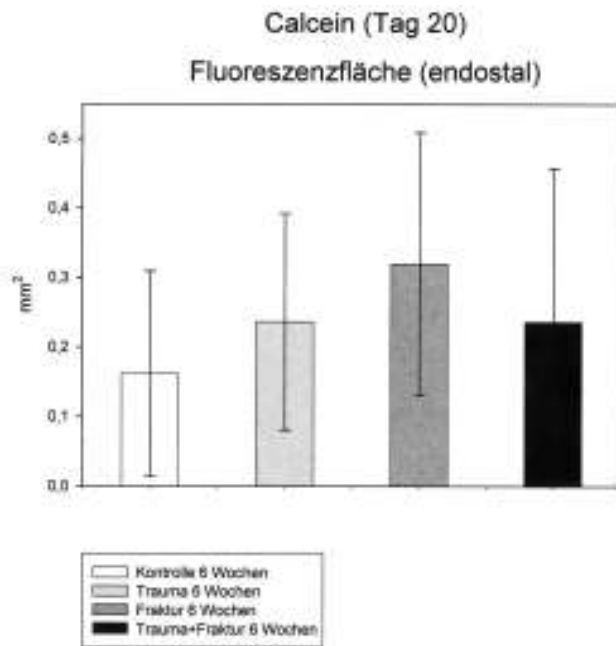


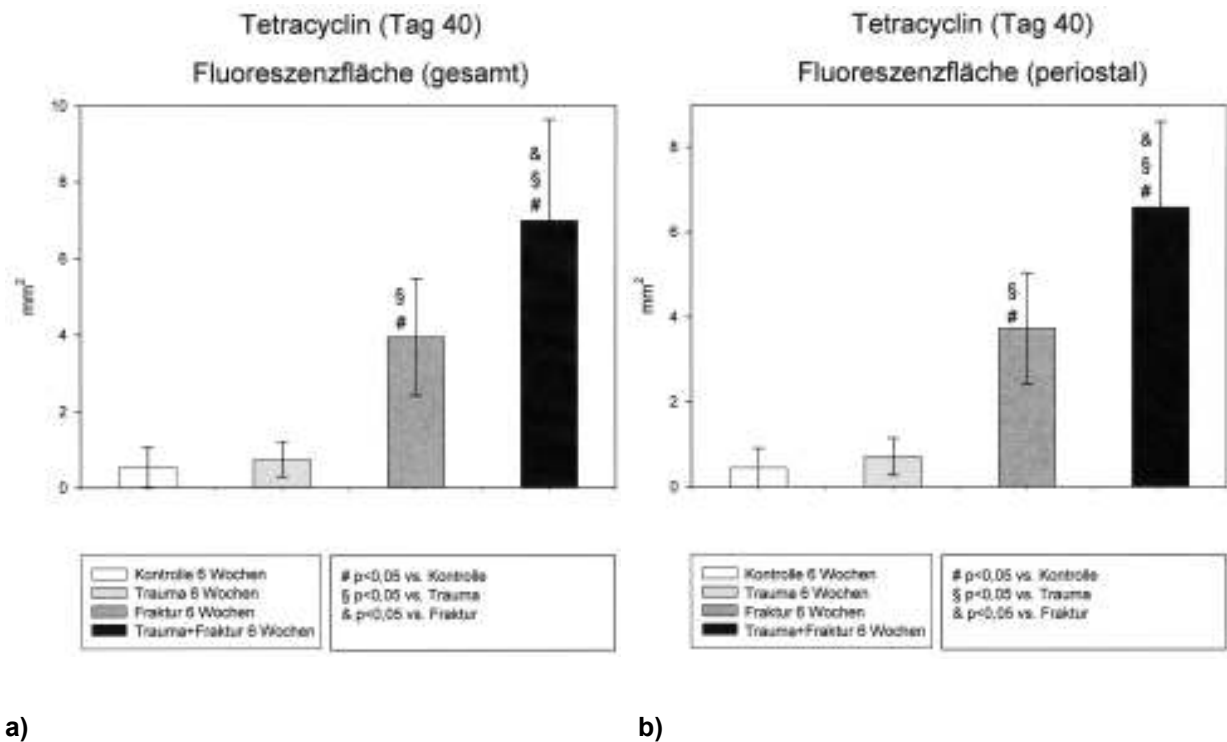
Abb.19 c):

Endostale Calceinanreicherung nach 6 Wochen in Kontrollen und nach Weichteilschaden, Fraktur und kombinierter Verletzung

c)

Die endostale Inkorporierung von Calcein zeigte auf niedrigstem Niveau keine signifikanten Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen.

4.2.4 Tetracyclin (gesamt – periostal – endostal)



a)

b)

Abb. 20 a): Gesamte Tetracyclinanreicherung nach 6 Wochen in Kontrollen und nach Weichteilschaden, Fraktur und kombinierter Verletzung
b): Periostale Tetracyclinanreicherung nach 6 Wochen in Kontrollen und nach Weichteilschaden, Fraktur und kombinierter Verletzung

Der gesamte Tetracyclineinbau nach 6 Wochen bewirkte von allen drei applizierten Fluorochromen die geringste gemessene Aktivität. Auch hier war die Steigerung nach Weichteilschaden vs. Kontrolle minimal, diejenigen nach Fraktur bzw. Weichteilschaden/Fraktur jedoch deutlich. Signifikant erhöht waren die Einbauraten bei Fraktur vs. Kontrolle und Weichteilschaden-Gruppe sowie zwischen kombinierter Verletzung vs. Kontrolle, Weichteilschaden und Fraktur.

Die periostale Tetracyclinaktivität demonstrierte bei überwiegend periostaler Kallusbildung ein vergleichbares Fluoreszenzverhalten wie im Gesamteinbau. Eine signifikante Erhöhung der Werte war für die Fraktur-Gruppe im Vergleich zu den Kontroll-Tieren und der Gruppe mit isoliertem Weichteilschaden darstellbar. Die Versuchsgruppe mit kombinierter Verletzung wies signifikant erhöhte

Fluoreszenzflächen im Vergleich zur Kontrolle, der Gruppe mit Weichteilschaden und den Tieren mit Fraktur auf.

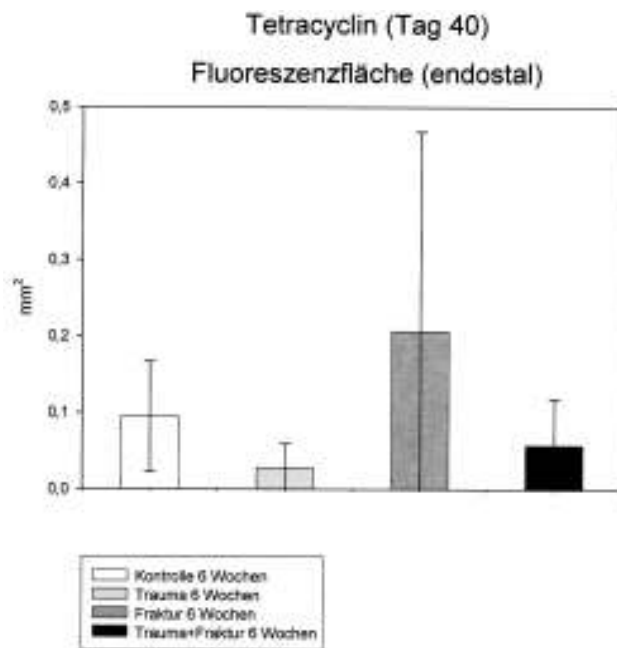


Abb. 20 c):

Gesamte Tetracyclinanreicherung nach 6 Wochen in Kontrollen und nach Weichteilschaden, Fraktur und kombinierter Verletzung

c)

Die endostalen Fluoreszenzsignale des Tetracyclins lagen vergleichsweise niedrig mit starken Unterschieden im Verteilungsmuster. Nach isoliertem Weichteilschaden war die entsprechende Fluoreszenzfläche geringer als in der Kontrolle. Dagegen konnte nach Fraktur ein deutlicher Anstieg verzeichnet werden. Für die Gruppe mit kombinierter Verletzung war das Signal ebenfalls schwächer als bei der Kontrolle, jedoch stärker als nach isoliertem Weichteilschaden.

5. Diskussion

Die Weichteilschädigung per *Controlled Impact Injury*-Technik bietet durch die genannte Versuchsanordnung den Vorteil eines standardisiert ausgeführten, reproduzierbaren Traumas. Dabei wurden die entsprechenden Parameter für Impression, Kontaktfläche und Beschleunigung in Vorversuchsreihen etabliert, um eine schwere Weichteilschädigung ohne Manifestation eines Kompartmentsyndroms zu erreichen. Hierzu wurden entsprechende Druckmessungen durchgeführt, bei denen zu keinem Zeitpunkt der intrakompartimentelle Druck über der kritischen Marke von 30mmHg lag [55].

Die von BONNARENS und EINHORN vorgestellte Operationsmethode ist ein seit längerem erfolgreich etabliertes Verfahren zur Frakturinduzierung an der Tibia der Ratte [66]. Da in diesem Modell die Frakturierung bei bereits liegender intramedullärer Schienung durchgeführt wird, ist die Übertragbarkeit der Ergebnisse auf die realen Bedingungen eines Hochrasanztraumas jedoch begrenzt. Die für die vorliegende Untersuchung genutzte aktuelle Weiterentwicklung durch SCHMIDMAIER et al. ermöglicht hingegen eine Frakturierung des Unterschenkels ohne liegenden Marknagel und erlaubt somit nochmals verbesserte Ergebnisse der 3-Punkt-Biegung [68]. Dabei ist eine gute Torsionsstabilität im Frakturspalt durch den intramedullären K-Draht gewährleistet, die Verhinderung von Rotation allerdings nur teilweise. Diese rotatorische Instabilität scheint aber nach einer Untersuchung entsprechend angelegter femoraler Osteotomien von GRUNDNES et al. keinen entscheidenden Einfluss auf die Kallusbildung zu haben [76]. Auch BISHOP et al. kommen zu dem Schluss, dass Scherkräfte nicht automatisch eine Heilungsverzögerung bewirken müssen [46]. Weiterhin wurde in der vorliegenden Untersuchung eine Frakturierung des gesamten Unterschenkels und nicht nur der Tibia vorgenommen, da eine intakte Fibula den Heilungsverlauf einer Tibiafraktur stabilitätsfördernd beeinflusst [77].

Im vorliegenden Projekt konnte nun erstmals die Kombination des Modells zur Erzeugung eines geschlossenen Weichteilschadens mit dem beschriebenen Frakturmodell erfolgreich durchgeführt werden. Damit wurde eine realitätsnahe Untersuchung unter kontrollierten Bedingungen im Tiermodell realisiert. Anzumerken ist

jedoch, dass die in vivo simultan auftretenden Verletzungen hier sequenziell erzeugt wurden. Da die Frakturierung im unmittelbaren Anschluss an den Weichteilschaden vorgenommen wurde, kann dennoch von einer adäquaten Simulation der realen klinischen Situation ausgegangen werden.

Das Ausmaß des Weichteilschadens ist in vivo nicht nur durch die externe Krafteinwirkung, sondern auch durch die Dislokation der Knochenfragmente mit folgender innerer Schädigung der Weichgewebe geprägt. Hier können innere Verletzungen relevante Ausmaße annehmen [78, 79]. Diesem Aspekt trägt das hier verwendete Kombinationsmodell ebenfalls zum ersten Mal Rechnung, da neben dem zugefügten Anpralltrauma während der Frakturierung durch das modifizierte Frakturmodell eine realistische Dislokation der Fragmente möglich ist.

Eine nicht beeinflussbare Größe im Frakturmodell war die Mobilität bzw. das Belastungsverhalten der Tiere, das einen erheblichen Einfluss auf die Knochenheilung haben kann [80-83]. Eine primäre postoperative Immobilisierung wie beim Patienten konnte nicht durchgeführt werden, womit von Beginn an eine freie Frakturbelastung möglich war. Die tägliche Kontrolle der Versuchstiere zeigte dabei jedoch keine gravierenden Unterschiede im Bewegungsverhalten während Frakturheilung; bereits kurz nach Erwachen aus der Narkose belasteten die Tiere durchgängig die verletzte Extremität teilweise und erreichten zügig die Vollbelastung. Eine N. ischiadicus-Resektion der betroffenen Extremität wurde aufgrund der zu erwartenden Veränderung der Kallusbildung nicht durchgeführt [84, 85].

Bei Betrachtung der Kallusbildung nach isoliertem Weichteilschaden weisen die Ergebnisse klar auf einen temporären Kallus geringerer Qualität hin. Diese Beobachtung war prinzipiell zu erwarten, da ein Weichteilschaden zu einer entsprechenden periostalen Reaktion führen kann [86]. Als Begründung weisen SVINDLAND et al. dabei auf die Perfusionsminderung in den traumatisierten Arealen hin, die zu einer hypoxiebedingten osteoblastären Differenzierung periostaler Zellen führen [50]. Die Fläche dieses Kallus ist jedoch erheblich geringer als nach den mit einer Fraktur verbundenen Eingriffen der beiden anderen Versuchsgruppen; die Mineralisierung liegt entsprechend der weitgehend unbeeinträchtigten Integrität der betroffenen Extremität bei unter 20% und entspricht damit dem niedrigsten Wert im Vergleich. Die Ergebnisse der Fluoreszenzanalyse stützen die Annahme einer nur sehr

gering ausgeprägten Osteoblastenaktivität mit einem gegenüber der Kontrolle nur mäßigen Fluorochromeinbau. Dies gilt für alle drei applizierten Substanzen und damit über Früh-, Mittel- und Spätphase der Heilung.

Kritisch anzumerken ist an dieser Stelle die bislang nicht quantifizierte Degradation inkorporierter Fluorochrome. Es ist allerdings empirisch davon auszugehen, dass die vermessenen Flächen die Mindestmenge der eingebauten Substanzen nach Abzug der durch Osteoklasten entfernten Matrix widerspiegeln. Diese Umbauvorgänge kennzeichnen gleichermaßen die Ergebnisse der Standard-Histomorphometrie, so dass eine problemlose parallele Anwendbarkeit beider Methoden anzunehmen ist. Eine von SUN et al. durchgeführte Vergleichsuntersuchung bestätigt die Zuverlässigkeit der Fluoreszenzanalyse, weist jedoch auch auf eine ungünstige Korrelation zwischen Tetracyclinfluoreszenz und tatsächlicher Mineralisierung hin [72]. Ähnliches berichten STUART et al. [71].

Nach 6 Wochen ist keinerlei traumainduzierter Kallus mehr per Standard-Histomorphometrie nachweisbar, der Gesamteinbau von Tetracyclin als Marker der Spätphase liegt nur marginal höher als bei der Kontrolle gleichen Alters.

Alle auftretenden Effekte waren auch im Rahmen klinischer Erfahrung und im Kontext der Traumaabstufung der Untersuchung zu erwarten.

Durch die Erzeugung einer Fraktur kommt es bei beiden Standzeiten zur Ausbildung eines deutlichen Kallus. Ein interessantes Detail ist die Tatsache, dass trotz der längeren Heilungszeit nach 6 Wochen die gesamte Kallusfläche nach Fraktur auf ähnlichem Niveau liegt wie nach 3 Wochen. Woran diese Verzögerung liegt, ist nicht eindeutig ableitbar.

Deutlich festzustellen ist aber in diesem Zusammenhang eine signifikante Verschiebung der Kallusverteilung zugunsten der periostalen Anteile, ebenso ist die gesamte Mineralisierung nach 6 Wochen tendenziell erhöht im Vergleich zu den 3 Wochen-Tieren. Für den periostalen mineralisierten Kallus ist diese Eigenschaft signifikant. Die Kallusdichte steigt ebenfalls im zeitlichen Verlauf an. Zu klären wäre hier der Zusammenhang zwischen einer eventuell endostal und periostal unterschiedlichen Perfusion und der Ossifizierung, der diese Umverteilung eventuell begründen könnte. CLAES et al. wiesen im Rahmen einer tierexperimentellen Osteotomie-Heilung auf endostal größere Gefäße als im peripheren Kallus hin [87]. Auch SCHELL et al.

betonten in einer Untersuchung eine rasche endostale Rekanalisierung und die Bedeutung des periostalen Kallus für die Stabilität [88].

Die Implantation des Marknagels führte weder makroskopisch noch mikroskopisch bei den entsprechend behandelten Tieren zu einer Verlegung oder Verdrängung des endostalen Kalluswachstums im Frakturspalt. Beim Patienten hingegen könnte dieser Effekt aufgrund eines anatomisch relativ engeren diaphysären Markraumes bei liegendem Marknagel im Vergleich zur Rattentibia jedoch eine Rolle spielen. Die Vergleichbarkeit des genutzten Tiermodells und der klinischen Situation ist an dieser Stelle kritisch zu prüfen.

Die lokalisationsbezogene Betrachtung der Kallusdichte demonstriert darüber hinaus auch eine Veränderung der Werte zwischen den Untersuchungszeitpunkten. Liegt bei der 3 Wochen-Gruppe noch eine primär periostal stärkere Mineralisierung vor, nähern sich später die Dichtewerte der endostalen und periostalen Anteile an. Insofern darf trotz der insgesamt nahezu unveränderten Gesamtkallus-Fläche zum frühen und zum späten Zeitpunkt der Frakturheilung davon ausgegangen werden, dass nach 6 Wochen durch die voranschreitende Mineralisierung und die Angleichung der periostalen und endostalen Dichten eine qualitativ höherwertige Knochenmatrix vorliegt.

Die Fluorochromanalyse unterstützt diese Annahme. Eine offenkundig geringer werdende Notwendigkeit der Mineralisierung durch zunehmende Stabilität zeigt sich in einer tendenziell abnehmenden Inkorporierung der Fluorochrome über den Verlauf der Heilungsphase. Die Frühphase der isolierten Frakturheilung ist gekennzeichnet durch einen zunächst steil ansteigenden Xylenoleinbau, der sich im periostalen Kallusanteil signifikant von Kontrolle und der Trauma-Gruppe unterscheidet. Darauf folgt die von etwas geringerer Aktivität geprägte mittlere Heilungsphase, repräsentiert durch die Calceinfluoreszenz nach 3 Wochen. Auch diese ist signifikant gegenüber der Kontrolle erhöht. Nochmals geringer, aber immer noch signifikant gegenüber Kontrolle und Trauma gesteigert, ist die Einbauaktivität nach 6 Wochen am Ende des Betrachtungszeitraumes.

Die offenkundig weit weniger entscheidende Rolle des endostalen Kallus für die Heilung der isolierten Fraktur spiegelt sich in erheblich geringeren Fluoreszenzsignalen wieder, die jedoch auch in der Tendenz dem genannten Muster folgen.

Nach Kombination von Fraktur und Weichteiltrauma nimmt das Gesamtkallusareal nach 6 Wochen im Vergleich zum frühen Zeitpunkt ab. Auch hier ist die Kallusformation weit überwiegend periostal lokalisiert. Damit folgt auch diese Untersuchungsgruppe einem Verhalten wie bereits die Gruppe mit isolierter Fraktur. Die Gründe hierfür könnten dieselben wie im genannten Falle sein: ein starkes Verletzungsmuster mit der Erfordernis einer raschen Stabilisierung und fortschreitender Frakturfixierung zum Ende des Beobachtungszeitraums hin. Die signifikante Abnahme des quantitativ weniger bedeutsamen endostalen Kallus weist ebenfalls wie schon bei den Fraktur-Tieren auf eine untergeordnete Rolle des endostalen Kallus für die Frakturheilung hin.

Der Mineralisierungsgrad ist jedoch nicht vollständig schlüssig in dieses Schema einzubringen, da die Ossifizierung nach 3 Wochen leicht über der der 6 Wochen-Tiere liegt. Zu erwarten gewesen wäre zunächst eine eher höhere Mineralisierung am Ende der Standzeit wie bei den Tieren mit isolierter Fraktur (s.o.). Allerdings sind die aufgezeigten Unterschiede gering und nicht signifikant. Die Dichtewerte des gesamten und periostalen Kallus liegen nach 6 Wochen erwartungsgemäß auf einem signifikant höheren Niveau als nach 3 Wochen. Für den periostalen Kallus trifft dies in der Tendenz ebenfalls zu. Entsprechend kann man auch bei der Trauma/Fraktur-Gruppe vergleichbar der Fraktur-Gruppe von einem klar erkennbaren Heilungsfortschritt bei der längeren Standzeit ausgehen.

Die Fluoreszenzsignale der Untersuchungsgruppe mit Trauma und Fraktur zeigen eine eher unerwartete Verteilung. So ist die periostale Xylenolanreicherung als Markierung der frühen Heilungsphase signifikant höher als bei den Tieren mit Fraktur, was durch die intensivere periostale Schädigung und die damit verbundene stärkere biologische Antwort gut erklärbar ist. Die mittlere Phase weist jedoch in Form des Calceinsignals eine Einbaurrate auf, die in etwa der der Tiere mit isolierter Fraktur entspricht. Damit wäre zum 3 Wochen-Zeitpunkt kein deutlicher Unterschied in der Osteoblastenaktivität zwischen einer Fraktur und einer Fraktur mit zusätzlichem Weichteiltrauma nachweisbar. Aufgrund der nicht darstellbaren signifikanten Unterschiede ist jedoch keine sichere Aussage hierzu möglich, zumal in der Spätphase der Heilung die Einbaurrate an Tetracyclin wieder höher als die der Fraktur-Gruppe ist.

Die endostalen Fluoreszenzsignale liegen analog zu den Ergebnissen der Standard-Histomorphometrie auf niedrigstem Niveau und unterstreichen nochmals die

offensichtlich entscheidende Bedeutung des periostalen Kallus für eine suffiziente Frakturheilung. Dennoch ist auch hier die Tendenz einer abnehmenden Osteoblastenaktivität im Verlauf der Heilungsphasen darstellbar.

In der abschließenden Betrachtung ist ein gemeinsames Charakteristikum aller Ergebnisse, dass nach längerer Standzeit die Kallusquantität im Vergleich zur 3 Wochen-Gruppe verringert ist. Durch eine entsprechend fortgeschrittene Rekonvaleszenz der verletzten Knochen- und Muskelbestandteile und wachsender Wiedergewinnung biomechanischer Stabilität sinkt offenbar die Osteoblastenaktivität, worauf die Fluoreszenzdaten hinweisen. Gleichzeitig verbessert sich die Kallusqualität im Hinblick auf den steigenden Mineralisierungsgrad und die damit zunehmende stabilitätsbestimmende Dichte im Frakturareal. Diese Remodellingphänomene waren im zeitlichen Kontext zu erwarten.

Die Frage, ob ein zusätzlicher Weichteilschaden generell eine Verzögerung der Frakturheilung und eine schlechtere Kallusqualität hervorruft, muss bei dem hier genutzten Tiermodell mit der verwendeten Weichteiltrauma-Schwere offengelassen werden. Es bewirkt eine histomorphometrisch nachweisbare stärkere globale Kallusbildung nach 3 Wochen bei schlechterer Mineralisierung und zeigt damit Zeichen einer tendenziell schlechteren Rekonstitution als nach isolierter Fraktur. Nach 6 Wochen weisen die Trauma/Fraktur-Tiere gegenüber isolierter Fraktur eine geringere allgemeine Kallusfläche auf, was angesichts des gleichzeitig erhöhten Mineralisierungsgrads allerdings eher als Ausdruck erfolgreicher Stabilisierung interpretiert werden könnte.

Offensichtlich ist das erzeugte Weichteiltrauma in dieser Untersuchung damit nicht ausgeprägt genug, um eine signifikante Reduktion der Frakturheilung (vergleichbar der klinischen Beobachtung bei Fraktur mit schwerem Weichteilschaden) zu erreichen. Tendenziell fand sich sogar eine erhöhte Inkorporierung der applizierten Fluorochrome als Zeichen osteoblastärer Aktivierung im Vergleich zur isolierten Fraktur. Ein Grund hierfür könnte wiederum eine ischämische Stimulation des Periosts sein [50]. Eine Ausnahme besteht im Fluoreszenzsignal nach 3 Wochen, bei dem ein lediglich marginaler Unterschied zu dem der Fraktur besteht. Statistisch signifikant ist diese Aussage jedoch nicht. Eine aktuelle Arbeit von CLAES et al. stützt die Beobachtung,

dass ein relativ schwacher Weichteilschaden die Frakturheilung lediglich in der Frühphase der Heilung spürbar beeinträchtigt [89].

Dass jedoch ein Trauma ein prinzipiell für den Knochen durchaus schädigendes Ereignis darstellt, ist experimentell aus der Kallusbildung nach isolierem Weichteilschaden (s. Ergebnisteil) ersichtlich und wird durch eine Vielzahl an Untersuchungen und allgemeiner klinischer Erfahrung bestätigt [52, 53, 57, 90]. Jedoch sind in der vorliegenden Arbeit sowohl Kallusquantität als auch Kallusqualität nur sehr gering im Vergleich zum intakten Knochen ausgeprägt und statistisch nicht hinreichend aussagekräftig; darüber hinaus ist ein solcher Kallus nach 6 Wochen histomorphometrisch nicht mehr nachweisbar. Auch LANDRY et al. kommen in einer Studie zu dem Schluss, dass nicht jedes Weichteiltrauma nicht per se einen negativen Einfluss auf die Frakturheilung haben muss, sondern es differenzierterer Betrachtung bedarf [86]. UTVAG et al. berichten ähnliches [53].

Zur genaueren Abschätzung, wann genau ein additives Trauma eine signifikante Verzögerung im Heilungsverlauf eines frakturierten Rattenhinterlaufs bewirkt, wäre mit verschiedenen Abstufungen eines Weichteilschadens auch die eventuell mittelfristig stimulierende Wirkung des Weichgewebes bzw. Periosts auf die Frakturheilung zu prüfen und zu quantifizieren.

6. Zusammenfassung

Ziel der Untersuchung war die genaue histomorphometrische Analyse der Kallusbildung nach geschlossenem traumatischen Weichteilschaden, Unterschenkelfraktur sowie ihrer Kombination am Modell der Ratte. Hierzu wurden 48 männliche Sprague-Dawley-Ratten mit einem Initialgewicht von 250-300g in zwei Untersuchungszeitpunkte von 3 bzw. 6 Wochen aufgeteilt. Zur Erzeugung des standardisierten Weichteilschadens wurde die CII-Technik verwendet. Für die Frakturierung wurde auf ein etabliertes Frakturmodell der geschlossenen Unterschenkelfraktur zurückgegriffen. Die Kombination der beiden Modelle erfolgte sequenziell, als Kontrollen dienten unverletzte Tiere.

Zur Untersuchung der Ossifizierung wurde den Tieren der 6 Wochen-Gruppe am 6. postoperativen Tag Xylenolorange, am 20. Tag Calceingrün und am 40. Tag Tetracyclin gewichtsadaptiert injiziert. Die 3 Wochen-Gruppe erhielt keine Fluorochrome.

Nach Tötung der Tiere wurden von den linken Tibiae Hartschnitte angefertigt und nach Masson-Goldner, v.Kossa/Safranin-O bzw. Safranin-O/Lichtgrün gefärbt. Von den Fluorochrom-behandelten Tibiae wurden zusätzlich 80µm dicke Schliffe angefertigt. Alle Schnitte und Schliffe wurden mit einem elektronischen Bilderfassungssystem (AxioVision[®]/ KS 400, beide Fa. Zeiss / Mikroskop: DMRB, Fa. Leica) vermessen. Als Parameter wurden Kallusfläche, mineralisierte Kallusfläche, Kallusdichte (alle jeweils periostal/endostal/gesamt), Kortikalisdichte bzw. Xylenolfluoreszenz, Calceinfluoreszenz und Tetracyclinfluoreszenz (alle jeweils periostal/endostal/gesamt) bestimmt und ausgewertet.

Die Ergebnisse des Fluoreszenzverhaltens zeigten von den Kontrollen über Weichteilschaden, isolierter Fraktur bis zur Kombinationverletzung generell ansteigende Signale als Ausdruck einer jeweils intensivierten Osteoblastenaktivität. Die frühe Heilungsphase demonstrierte dabei die stärkste Markierung, gefolgt von Mittel- und Spätphase. Die Standardfärbungen zeigten nach 6 Wochen generell geringere Kallusflächen als nach 3 Wochen. Dies dürfte auf die fortschreitende Stabilisierung der Fraktur zurückzuführen sein, was durch die gleichzeitig zunehmende Kallusdichte unterstützt wird. Einheitliche Tendenzen bei der Betrachtung von isolierter Fraktur gegenüber der Kombinationsverletzung waren im gewählten Tiermodell nicht darstellbar. Nach 3 Wochen war für die Kombinations-Gruppe ein größerer

Gesamtkallus festzustellen als nach isolierter Fraktur; nach 6 Wochen war jedoch das betroffene Areal der Frakturgruppe größer und der Kallus der Kombinationsgruppe kleiner. Für die Kallusdichte galt entsprechendes; sie lag nach 3 Wochen bei der Kombinations-Gruppe im Vergleich zur Fraktur-Gruppe auf niedrigerem Niveau. Nach 6 Wochen kehrte sich dieses Verhältnis um.

Als Interpretation ist festzustellen, dass ein zusätzlicher Weichteilschaden moderater Stärke wie in unserem Modell zu einer Fraktur nicht zwangsläufig mit einer Verzögerung der Frakturheilung bzw. einer Verschlechterung der Kallusqualität einhergehen muss. Im vorliegenden Modell ist nach 3 Wochen histomorphometrisch eine Heilungsverzögerung durch den additiven Weichteilschaden festzustellen; nach 6 Wochen kann jedoch sogar von einer leichten Stimulation der osteoblastären Aktivität durch den gewählten Weichteilschaden ausgegangen werden. Eine weitere Untersuchung mit einer Abstufung der Weichteilschädigung könnte einen Hinweis geben, ab welcher Stärke ein zusätzlicher Weichteilschaden eine histomorphometrisch messbare Verzögerung auch in der Spätphase der Frakturheilung bewirkt.

7. Literatur

1. Claes L., Bumann-Melnyk M., Henke T., et al., *Soft Tissue Damage delays new bone formation during early fracture healing*. J Orthop Trauma, 2004. **18 Supplement(9)**: p. S 16- S 17.
2. Rommens P.M., Broos P.L., *The significance of soft tissue trauma for fracture healing. A prospective study on 70 tibial shaft fractures following primary treatment with the Monofixateur*. Unfallchirurg, 1992. **95(3)**: p. 133-41.
3. Gerber H.P., Vu T.H., Ryan A.M., et al., *VEGF couples hypertrophic cartilage remodeling, ossification and angiogenesis during endochondral bone formation*. Nat Med, 1999. **5(6)**: p. 623-8.
4. Lewinson D., Silbermann M., *Chondroclasts and endothelial cells collaborate in the process of cartilage resorption*. Anat Rec, 1992. **233(4)**: p. 504-14.
5. Netter F., *Knochenentwicklung*, in *Netters Orthopädie*. 2001. p. 8-10,12.
6. Tatsuyama K., Maezawa Y., Baba H., et al., *Expression of various growth factors for cell proliferation and cytodifferentiation during fracture repair of bone*. Eur J Histochem, 2000. **44(3)**: p. 269-78.
7. Einhorn T.A., *The cell and molecular biology of fracture healing*. Clin Orthop, 1998(355 Suppl): p. S7-21.
8. Bouletreau P.J., Warren S.M., Spector J.A., et al., *Factors in the fracture microenvironment induce primary osteoblast angiogenic cytokine production*. Plast Reconstr Surg, 2002. **110(1)**: p. 139-48.
9. Kinner B., Spector M., *Expression of smooth muscle actin in osteoblasts in human bone*. J Orthop Res, 2002. **20(3)**: p. 622-32.
10. Kinner B., Gerstenfeld L.C., Einhorn T.A., et al., *Expression of smooth muscle actin in connective tissue cells participating in fracture healing in a murine model*. Bone, 2002. **30(5)**: p. 738-45.
11. Menard C., Mitchell S., Spector M., *Contractile behavior of smooth muscle actin-containing osteoblasts in collagen-GAG matrices in vitro: implant-related cell contraction*. Biomaterials, 2000. **21(18)**: p. 1867-77.

12. Bostrom M.P., *Expression of bone morphogenetic proteins in fracture healing*. Clin Orthop, 1998(355 Suppl): p. S116-23.
13. Einhorn T.A., Majeska R.J., *Neutral proteases in regenerating bone*. Clin Orthop Relat Res, 1991(262): p. 286-97.
14. Pierce A.M., Lindskog S., Hammarstron L., *Osteoclasts: structure and function*. Electron Microsc Rev, 1991. **4**(1): p. 1-45.
15. Wildemann B., Kadow-Romacker A., Lubberstedt M., et al., *Differences in the fusion and resorption activity of human osteoclasts after stimulation with different growth factors released from a polylactide carrier*. Calcif Tissue Int, 2005. **76**(1): p. 50-5.
16. Hayman A.R., Cox T.M., *Tartrate-resistant acid phosphatase: a potential target for therapeutic gold*. Cell Biochem Funct, 2004. **22**(5): p. 275-80.
17. Sarisozen B., Durak K., Diner G., et al., *The effects of vitamins E and C on fracture healing in rats*. J Int Med Res, 2002. **30**(3): p. 309-13.
18. Johannsson G., Bengtsson B.A., *Growth hormone and the acquisition of bone mass*. Horm Res, 1997. **48 Suppl 5**: p. 72-7.
19. Holzer G., Majeska R.J., Lundy M.W., et al., *Parathyroid hormone enhances fracture healing. A preliminary report*. Clin Orthop Relat Res, 1999(366): p. 258-63.
20. Bassett J.H., Williams G.R., *The molecular actions of thyroid hormone in bone*. Trends Endocrinol Metab, 2003. **14**(8): p. 356-64.
21. Sunyer T., Lewis J., Collin-Osdoby P., et al., *Estrogen's bone-protective effects may involve differential IL-1 receptor regulation in human osteoclast-like cells*. J Clin Invest, 1999. **103**(10): p. 1409-18.
22. Takagi K., Urist M.R., *The role of bone marrow in bone morphogenetic protein-induced repair of femoral massive diaphyseal defects*. Clin Orthop Relat Res, 1982(171): p. 224-31.
23. Bax B.E., Wozney J.M., Ashhurst D.E., *Bone morphogenetic protein-2 increases the rate of callus formation after fracture of the rabbit tibia*. Calcif Tissue Int, 1999. **65**(1): p. 83-9.

24. Lind M., *Growth factor stimulation of bone healing. Effects on osteoblasts, osteomies, and implants fixation.* Acta Orthop Scand Suppl, 1998. **283**: p. 2-37.
25. Makino T., Hak D.J., Hazelwood S.J., et al., *Prevention of atrophic nonunion development by recombinant human bone morphogenetic protein-7.* J Orthop Res, 2005. **23**(3): p. 632-8.
26. Giannoudis P.V, Tzioupis C., *Clinical applications of BMP-7: the UK perspective.* Injury, 2005. **36 Suppl 3**: p. S47-50.
27. Zhang Z., Lu S., Wang J., *[Distribution and effectiveness of endogenic bone morphogenetic protein (BMP) in bone defect].* Zhonghua Wai Ke Za Zhi, 1996. **34**(10): p. 596-8.
28. Onishi T., Ishidou Y., Nagamine T., et al., *Distinct and overlapping patterns of localization of bone morphogenetic protein (BMP) family members and a BMP type II receptor during fracture healing in rats.* Bone, 1998. **22**(6): p. 605-12.
29. Sato M., Ochi T., Nakase T., et al., *Mechanical tension-stress induces expression of bone morphogenetic protein (BMP)-2 and BMP-4, but not BMP-6, BMP-7, and GDF-5 mRNA, during distraction osteogenesis.* J Bone Miner Res, 1999. **14**(7): p. 1084-95.
30. Champagne C.M., Takebe J., Offenbacher S., et al., *Macrophage cell lines produce osteoinductive signals that include bone morphogenetic protein-2.* Bone, 2002. **30**(1): p. 26-31.
31. Johnson E.E., Urist M.R., Finermann G.A., *Bone morphogenetic protein augmentation grafting of resistant femoral nonunions. A preliminary report.* Clin Orthop Relat Res, 1988(230): p. 257-65.
32. Johnson E.E., Urist M.R., *Distal metaphyseal tibial nonunions associated with significant bowing deformity and cortical bone loss: treatment with human bone morphogenetic protein (h-BMP) and internal fixation.* Nippon Seikeigeka Gakkai Zasshi, 1989. **63**(5): p. 613-20.
33. Nordsletten L., *Recent developments in the use of bone morphogenetic protein in orthopaedic trauma surgery.* Curr Med Res Opin, 2006. **22 Suppl 1**: p. S13-7.
34. Jones A.L., Bucholz R.W., Bosse M.J., et al., *Recombinant human BMP-2 and allograft compared with autogenous bone graft for reconstruction of diaphyseal*

- tibial fractures with cortical defects. A randomized, controlled trial.* J Bone Joint Surg Am, 2006. **88**(7): p. 1431-41.
35. Egermann M., Lill C.A., Griesbeck K., et al., *Effect of BMP-2 gene transfer on bone healing in sheep.* Gene Ther, 2006. **13**(17): p. 1290-9.
 36. Laitinen M., Jortikka L., Halttunen T., et al., *Measurement of total and local bone morphogenetic protein concentration in bone tumours.* Int Orthop, 1997. **21**(3): p. 188-93.
 37. Schmidmaier G., Wildemann B., Gabelein T., et al., *Synergistic effect of IGF-I and TGF-beta1 on fracture healing in rats: single versus combined application of IGF-I and TGF-beta1.* Acta Orthop Scand, 2003. **74**(5): p. 604-10.
 38. Zimmermann G., Henke P., Kusswetter M., et al., *TGF-beta1 as a marker of delayed fracture healing.* Bone, 2005. **36**(5): p. 779-85.
 39. Lee J.Y., Kim K.H., Shin S.Y., et al., *Enhanced bone formation by transforming growth factor-beta1-releasing collagen/chitosan microgranules.* J Biomed Mater Res A, 2006. **76**(3): p. 530-9.
 40. Wildemann B., Bamdad P., Holmer Ch., et al., *Local delivery of growth factors from coated titanium plates increases osteotomy healing in rats.* Bone, 2004. **34**(5): p. 862-8.
 41. Wildemann B., Kandziora F., Krummrey G., et al., *Local and controlled release of growth factors (combination of IGF-I and TGF-beta 1, and BMP-2 alone) from a polylactide coating of titanium implants does not lead to ectopic bone formation in sheep muscle.* J Control Release, 2004. **95**(2): p. 249-56.
 42. Schmidmaier G., Wildemann B., Ostapowicz D., et al., *Long-term effects of local growth factor (IGF-I and TGF-beta 1) treatment on fracture healing. A safety study for using growth factors.* J Orthop Res, 2004. **22**(3): p. 514-9.
 43. Raschke M., Wildemann B., Inden P., et al., *Insulin-like growth factor-1 and transforming growth factor-beta1 accelerates osteotomy healing using polylactide-coated implants as a delivery system: a biomechanical and histological study in minipigs.* Bone, 2002. **30**(1): p. 144-51.
 44. Yamaji T., Ando K., Wolf S., et al., *The effect of micromovement on callus formation.* J Orthop Sci, 2001. **6**(6): p. 571-5.

45. Egger E.L., Gottsauer-Wolf F., Palmer J., et al., *Effects of axial dynamization on bone healing*. J Trauma, 1993. **34**(2): p. 185-92.
46. Bishop, *Shear does not necessarily inhibit bone healing*. Clin Orthop Relat Res, 2006. **443**(February 2006): p. 307-314.
47. Kokubu T., Hak D.J., Hazelwood S.J., et al., *Development of an atrophic nonunion model and comparison to a closed healing fracture in rat femur*. J Orthop Res, 2003. **21**(3): p. 503-10.
48. Mark H., Penington A., Nannmark U., et al., *Microvascular invasion during endochondral ossification in experimental fractures in rats*. Bone, 2004. **35**(2): p. 535-42.
49. Schaser K.D., Zhang L., Haas N.P., et al., *Temporal profile of microvascular disturbances in rat tibial periosteum following closed soft tissue trauma*. Langenbecks Arch Surg, 2003. **388**(5): p. 323-30.
50. Svindland A.D., Nordsletten L., Reikeras O., et al., *Periosteal response to transient ischemia. Histological studies on the rat tibia*. Acta Orthop Scand, 1995. **66**(5): p. 468-72.
51. Fischer M.D., Gustilo R.B., Varecka T.F., *The timing of flap coverage, bone-grafting, and intramedullary nailing in patients who have a fracture of the tibial shaft with extensive soft-tissue injury*. J Bone Joint Surg Am, 1991. **73**(9): p. 1316-22.
52. Utvag S.E., Iversen K.B., Grundnes O., et al., *Poor muscle coverage delays fracture healing in rats*. Acta Orthop Scand, 2002. **73**(4): p. 471-4.
53. Utvag S.E., Grundnes O., Rindal D.B., et al., *Influence of extensive muscle injury on fracture healing in rat tibia*. J Orthop Trauma, 2003. **17**(6): p. 430-5.
54. Whiteside L.A., Lesker P.A., *The effects of extraperiosteal and subperiosteal dissection. II. On fracture healing*. J Bone Joint Surg Am, 1978. **60**(1): p. 26-30.
55. Schaser K.D., Vollmar B., Menger M.D., et al., *In vivo analysis of microcirculation following closed soft-tissue injury*. J Orthop Res, 1999. **17**(5): p. 678-85.

56. Zhang L., Bail H., Mittlmeier T., et al., *Immediate microcirculatory derangements in skeletal muscle and periosteum after closed tibial fracture*. J Trauma, 2003. **54**(5): p. 979-85.
57. Utvag S.E., Grundnes O., Reikeras O., *Effects of lesion between bone, periosteum and muscle on fracture healing in rats*. Acta Orthop Scand, 1998. **69**(2): p. 177-80.
58. Granger D.N., *Role of xanthine oxidase and granulocytes in ischemia-reperfusion injury*. Am J Physiol, 1988. **255**(6 Pt 2): p. H1269-75.
59. Granger D.N., Kvietys P.R., Perry M.A., et al., *Leukocyte--endothelial cell adhesion induced by ischemia and reperfusion*. Can J Physiol Pharmacol, 1993. **71**(1): p. 67-75.
60. Korthuis R.J., Gute D.C., Duran W.N., et al., *Adhesion molecule expression in postischemic microvascular dysfunction: activity of a micronized purified flavonoid fraction*. J Vasc Res, 1999. **36**(Suppl 1): p. 15-23.
61. Jerome S.N., Kong L., Korthuis R.J., et al., *Microvascular dysfunction in postischemic skeletal muscle*. J Invest Surg, 1994. **7**(1): p. 3-16.
62. Gute D.C., Ishida T., Yarimizu K., et al., *Inflammatory responses to ischemia and reperfusion in skeletal muscle*. Mol Cell Biochem, 1998. **179**(1-2): p. 169-87.
63. Korthuis R.J., Granger D.N., Townsky M.I., et al., *The role of oxygen-derived free radicals in ischemia-induced increases in canine skeletal muscle vascular permeability*. Circ Res, 1985. **57**(4): p. 599-609.
64. Menger M.D., Steiner D, Messmer K., *Microvascular ischemia-reperfusion injury in striated muscle: significance of "no reflow"*. Am J Physiol, 1992. **263**(6 Pt 2): p. H1892-900.
65. Dixon C.E., Clifton G.L., Lighthall J.W., et al., *A controlled cortical impact model of traumatic brain injury in the rat*. J Neurosci Methods, 1991. **39**(3): p. 253-62.
66. Bonnarens F., Einhorn T.A., *Production of a standard closed fracture in laboratory animal bone*. J Orthop Res, 1984. **2**(1): p. 97-101.
67. Hoffmann J.-E., Schmidtmaier G., Duda G.N., et al., *Ein neues standardisiertes Frakturmodell an der Ratte*. Der Unfallchirurg, Hefte zu, 1999. **275**(275-276).

68. Schmidmaier G., *Development and characterization of a standard closed tibial fracture model in the rat*. Eur J Trauma 2004, 2004. **30**: p. 35-42.
69. Tscherne H., Oestern H.J., *[A new classification of soft-tissue damage in open and closed fractures (author's transl)]*. Unfallheilkunde, 1982. **85**(3): p. 111-5.
70. Rahn B.V., Bacellar F.C., Trapp L., et al., *[A method for morphometry of bone formation using fluorochromes (author's transl)]*. Aktuelle Traumatol, 1980. **10**(2): p. 109-15.
71. Stuart A.J., Smith D.A., *Use of the fluorochromes xylene orange, calcein green, and tetracycline to document bone deposition and remodeling in healing fractures in chickens*. Avian Dis, 1992. **36**(2): p. 447-9.
72. Sun T.C., Mori S., Roper J., et al., *Do different fluorochrome labels give equivalent histomorphometric information?* Bone, 1992. **13**(6): p. 443-6.
73. Pastoureau P., Chomel A., *Methods for cartilage and subchondral bone histomorphometry*. Methods Mol Med, 2004. **101**: p. 79-91.
74. Revell P.A., *Histomorphometry of bone*. J Clin Pathol, 1983. **36**(12): p. 1323-31.
75. O'Driscoll S.W., Marx R.G., Fitzsimmons J.S., et al., *Method for automated cartilage histomorphometry*. Tissue Eng, 1999. **5**(1): p. 13-23.
76. Grundnes O., Reikeras O., *Effects of instability on bone healing. Femoral osteotomies studied in rats*. Acta Orthop Scand, 1993. **64**(1): p. 55-8.
77. Shefelbine S.J., Augat P., Claes L., et al., *Intact fibula improves fracture healing in a rat tibia osteotomy model*. J Orthop Res, 2005. **23**(2): p. 489-93.
78. Porcellini M., Bernardo B., Capasso R., et al., *Combined vascular injuries and limb fractures*. Minerva Cardioangiol, 1997. **45**(4): p. 131-8.
79. Nanobashvili J., Kopadaze T., Tvaladze M., et al., *War injuries of major extremity arteries*. World J Surg, 2003. **27**(2): p. 134-9.
80. Case N.D., Duty A.O., Ratcliffe A., et al., *Bone formation on tissue-engineered cartilage constructs in vivo: effects of chondrocyte viability and mechanical loading*. Tissue Eng, 2003. **9**(4): p. 587-96.
81. Hodgson S., *Proximal humerus fracture rehabilitation*. Clin Orthop Relat Res, 2006. **442**: p. 131-8.

82. Buckwalter J.A., Grodzinsky A.J., *Loading of healing bone, fibrous tissue, and muscle: implications for orthopaedic practice.* J Am Acad Orthop Surg, 1999. **7**(5): p. 291-9.
83. Grundnes O., Reikeras O., *Mechanical effects of function on bone healing. Nonweight bearing and exercise in osteotomized rats.* Acta Orthop Scand, 1991. **62**(2): p. 163-5.
84. Madsen J.E., Hukkanen M., Anne A.K., et al., *Fracture healing and callus innervation after peripheral nerve resection in rats.* Clin Orthop Relat Res, 1998(351): p. 230-40.
85. Aro H., *Effect of nerve injury on fracture healing. Callus formation studied in the rat.* Acta Orthop Scand, 1985. **56**(3): p. 233-7.
86. Landry P.S., Marino A.A., Sadasivan K.K., et al., *Effect of soft-tissue trauma on the early periosteal response of bone to injury.* J Trauma, 2000. **48**(3): p. 479-83.
87. Claes L., Eckert-Hubner K., Augat P., *The fracture gap size influences the local vascularization and tissue differentiation in callus healing.* Langenbecks Arch Surg, 2003. **388**(5): p. 316-22.
88. Schell H., Lienau J., Epari D.R., et al., *Osteoclastic activity begins early and increases over the course of bone healing.* Bone, 2006. **38**(4): p. 547-54.
89. Claes L., Maurer-Klein N., Henke T., et al., *Moderate soft tissue trauma delays new bone formation only in the early phase of fracture healing.* J Orthop Res, 2006. **24**(6): p. 1178-85.
90. Utvag S.E., Grundnes O., Reikeras O., *Effects of periosteal stripping on healing of segmental fractures in rats.* J Orthop Trauma, 1996. **10**(4): p. 279-84.

Abkürzungen

Beh.	Behandlung
BMP	Bone Morphogenic Protein
CII	Controlled Impact Injury
D	Tag
EtOH	Ethylalkohol
Fx	Fraktur
GH	Growth Hormone
ICAM	Intercellular Adhesion Molecule
IGF	Insulin-like Growth Factor
IL	Interleukin
i.p.	Intraperitoneal
K-Draht	Kirschner-Draht
KG	Körpergewicht
Lig.	Ligamentum
M.	Musculus
NaCl	Natriumchlorid
PDGF	Platelet Derived Growth Factor
PTH	Parathyroid Hormone
ROI	Region Of Interest
Rx	Röntgen
SZ	Standzeit
TGF	Transforming Growth Factor
Tr	Trauma (hier: Weichteilschaden)
TRAP	Tartrate Resistant Acid Phosphatase
TSH	Thyroid Stimulating Hormone
US	Unterschenkel (Tibia + Fibula)
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
Vol-%	Volumenprozent

8. Abbildungsverzeichnis

Tab. 1: Zuordnung der Versuchstiere	14
Abb. 1: Protokoll im zeitlichen Überblick	17
Abb. 2: Standardisierte geschlossene Weichteilschädigung	19
Abb. 3: Frakturierung per Drop-Weight-Technique	20
Abb. 4: Intraoperative Röntgenkontrolle mittels Bildwandler	20
Abb. 5: Schematische Darstellung des Präparateblocks	22
Abb. 6: Längsschnitt periostaler Kallus (Masson-Goldner)	25
Abb. 7: Längsschnitt periostaler Kallus (v.Kossa/Safranin O)	25
Abb. 8: Längsschnitt periostaler Kallus (Safranin O/Lichtgrün)	26
Abb. 9: Schema der Region Of Interest (ROI)	27
Abb. 10 a-c: Gesamte, periostale, endostale Kallusfläche	30, 31
Abb. 11 a-c: Kallusfläche nach Weichteilschaden, Fraktur, Kombination	32, 33
Abb. 12 a-c: Gesamte, periostale, endostale mineralisierte Kallusfläche	34, 35
Abb. 13 a-c: Mineral. Kallus nach Weichteilschaden, Fraktur, Kombination	36, 37
Abb. 14 a-c: Gesamte, periostale, endostale Kallusdichte	38, 39
Abb. 15 a-c: Kallusdichte nach Weichteilschaden, Fraktur, Kombination	40, 41
Abb. 16: Dichte der Kortikalis	42
Abb. 17a-c: Gesamte, periostale, endostale Fluoreszenzfläche	43, 44
Abb. 18 a-c: Gesamte, periostale, endostale Xylenolfluoreszenz	46, 47
Abb. 19 a-c: Gesamte, periostale, endostale Calceinfluoreszenz	48, 49
Abb. 20 a-c: Gesamte, periostale, endostale Tetracyclinfluoreszenz	50, 51

9. Erklärung und Lebenslauf

„Ich, Markus Appel, erkläre an Eides statt, dass ich die vorgelegte Dissertationsschrift mit dem Thema: *Einfluss des geschlossenen traumatischen Weichteilschadens auf die Frakturheilung: eine histomorphometrische Analyse im Tiermodell der Ratte* selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.“

Berlin, den _____

(Markus Appel)

Lebenslauf

„Mein Lebenslauf wird aus Datenschutzgründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht mit veröffentlicht.“

10. Danksagung

Zunächst möchte ich dem Direktor des Centrums für Muskuloskeletale Chirurgie an der Charité – Universitätsmedizin Berlin, Herrn Prof. Dr. med. Dr. h.c. Norbert P. Haas, danken. Seine ausdrückliche Unterstützung wissenschaftlicher Arbeit hat den erfolgreichen Abschluss des Projekts ermöglicht, und ich danke ihm für das gewährte Vertrauen.

Weiterhin gilt mein großer Dank meinem Betreuer, Herrn PD Dr. med. Klaus-Dieter Schaser, für die Überlassung dieses sehr interessanten und klinisch relevanten Themas. Dabei danke ich ihm auch für die kontinuierlich geduldige Begleitung und das Verständnis auch für Fehler.

Herrn Prof. Dr.-Ing. Georg N. Duda, Leiter des Forschungszentrums am CMSC, danke ich für die Möglichkeit, die umfangreiche Forschungsinfrastruktur der Abteilung nutzen zu können.

Ebenso danke ich der Arbeitsgruppe „Frakturheilung/ Weichteilschaden“ mit Annette Lauffer, Nele Kreutz und Henning Rune für ihre Geduld und ihre Hilfestellungen.

Großen Anteil am erfolgreichen Ablauf des Projektes haben Frau Marzena Princ, Frau Camilla Bergmann und ganz besonders Frau Gabriele Hardung vom Knochen-Histologielabor des CMSC-Forschungslabors. Ihnen danke ich allen für ihre uneingeschränkte Hilfsbereitschaft.

Frau PD Dr. rer. nat. Britt Wildemann und Herrn Dr. med. Philip Schwabe gebührt Dank für ihre wertvollen praktischen Hinweise zur Verwendung des Frakturmodells. Ebenso danke ich Herrn PD Dr. med. vet. Christian Grosse-Siestrup, Leiter der Tierexperimentellen Abteilung im Biotechnologischen Forschungszentrum der Charité, für die Unterstützung sowie Herrn Dr.-Ing. Devakara Epari für seine eminent wichtige technische Expertise.

An dieser Stelle möchte ich auch Herrn Prof. Dr. rer. nat. Dr. h.c. Holger Preuschoff, Emeritus für funktionelle Morphologie an der Ruhr-Universität Bochum, erwähnen, ohne den mein Leben fachlich wie persönlich einen wesentlich anderen Lauf genommen hätte.

Insbesondere sind schließlich meine Eltern, meine Familie und meine Freunde zu nennen, die mich über viele Jahre hinweg kontinuierlich unterstützt haben. Ihnen gebührt mein herzlicher Dank.

Markus Appel