

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

und dem  
Julius Wolff Institut,  
Charité-Universitätsmedizin Berlin

**Histologische und biomechanische Analyse  
des Frakturkallus unter kritisch scherweicher Fixation zu verschiedenen Zeitpunkten  
post Osteotomie am Schafmodell**

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

vorgelegt von  
**Anne-Christin Fischer**  
Tierärztin aus Berlin  
Berlin 2009

Journal-Nr.: 3296

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin  
der Freien Universität Berlin

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

*Deskriptoren (nach CAB-Thesaurus):*

bone, bone formation, bone fractures, healing, histology,  
animal model, sheep

Tag der Promotion: 25.06.2009

Bibliografische Information der *Deutschen Nationalbibliothek*

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

ISBN: 978-3-86664-697-1

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

Dissertation, Freie Universität Berlin

**D 188**

Dieses Werk ist urheberrechtlich geschützt.

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

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

This document is protected by copyright law.

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

alle Rechte vorbehalten | all rights reserved

© mensch und buch verlag 2009

choriner str. 85 - 10119 berlin

verlag@menschundbuch.de – www.menschundbuch.de

Abkürzungsverzeichnis .....	6
1. Einleitung .....	7
1.1. Zu untersuchende Hypothesen .....	8
2. Stand des Wissens.....	9
2.1. Knochen .....	9
2.2. Knochenbestandteile.....	9
2.2.1. Osteoblasten .....	9
2.2.2. Osteozyten.....	10
2.2.3. Osteoklasten.....	11
2.2.4. Interzelluläre Knochenmatrix .....	12
2.3. Anatomischer Knochenaufbau.....	12
2.3.1. Knochenarten.....	14
2.4.1. Geflechtknochen.....	14
2.4.2. Lamellenknochen .....	15
2.5. Frakturentstehung.....	16
2.6. Frakturheilung.....	16
2.6.1. Primäre Knochenheilung .....	17
2.6.2. Sekundäre Knochenheilung.....	18
2.6.3. Kallusgewebe.....	21
2.7. Osteosynthese mittels Fixateur externe.....	23
2.7.1. Biomechanik der Fixateur externe Osteosynthese .....	25
2.8. Störungen der Knochenheilung .....	26
3. Material und Methoden.....	30
3.1. Versuchsaufbau .....	30
3.2. Tierhaltung .....	30
3.3. Fixateur externe .....	31
3.4. Operationsvorbereitung .....	32
3.5. Operation.....	33
3.6. Nachbetreuung der Tiere.....	36
3.6.1. Pinpflege .....	36
3.6.2. Pinpflegescore .....	37
3.7. Probengewinnung.....	37
3.7.1. Tötung der Tiere .....	37
3.7.2. Biomechanische Testung.....	38
3.7.3. Radiologische Auswertung der Biomechanik.....	39

3.7.4.Sägen der Knochenproben .....	40
3.8. Präparataufbereitung.....	41
3.8.1.Entwässerungsschema.....	42
3.8.2.Kunststoffeinbettung.....	42
3.8.3.Schneiden am Mikrotom.....	43
3.9. Histologische Färbungen.....	43
3.9.1. Safranin-von-Kossa-Färbung .....	44
3.9.2. Azan-Färbung nach Heidenhain .....	45
3.9.3. Movat-Pentachrom-Färbung.....	46
3.10. Deskriptive Auswertung der histologischen Präparate.....	47
3.11. Statistische Auswertung der Daten .....	49
4. Ergebnisse .....	50
4.1. Allgemein.....	50
4.2. Radiologische Befunde .....	50
4.3. Biomechanische Testung .....	51
4.3.1.Torsionstestergebnisse.....	52
4.3.2. Auswertung der radiologischen Befunde.....	55
4.4. Ergebnisse der deskriptiven histologischen Auswertung .....	56
4.4.1. Allgemeine Präparatbeschreibung .....	57
4.4.2. Zwei Wochen post operationem.....	57
4.4.3. Drei Wochen post operationem.....	64
4.4.4. Sechs Wochen post operationem.....	71
4.4.5. Neun Wochen post operationem .....	77
5. Diskussion.....	86
5.1. Allgemeine Überlegungen .....	86
5.2. Tiermodellwahl .....	86
5.3. Versuchsaufbau .....	88
5.4. Probenentnahme- und Aufbereitung .....	90
5.5. Diskussion der Ergebnisse.....	92
5.5.1.Pinpflegebeobachtungen.....	92
5.5.2. Biomechanische Ergebnisse .....	93
5.5.3. Ergebnisse der deskriptiven histologischen Analyse.....	95
5.5.4. Vergleich mit anderen Studien .....	103
5.5. Schlussfolgerung .....	108

6. Zusammenfassung.....	110
7. Summary.....	112
8. Literatur.....	114
Danksagung.....	125
Eidesstattliche Erklärung.....	126

## Abkürzungsverzeichnis

%	Prozent
°	Grad
Ø	Durchmesser
°C	Grad Celsius
Abb.	Abbildung
ap	anteroposterior
bzw.	beziehungsweise
CO <sup>2</sup>	Kohlenstoffdioxid
cm	Zentimeter
dest.	destilata
EKG	Elektrokardiograph
g	Gramm
kg	Kilogramm
KGW	Körpergewicht
KV	Kilovolt
l/l	laterol-lateral
mA	Milliampere
m <sup>2</sup>	Quadratmeter
MEA	Methoxyethylacetat
mg	Milligramm
min	Minute
°/min	Grad pro Minute
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mm Hg	Millimeter Quecksilbersäule
µm	Mikrometer
N	Newton
Nm	Newtonmeter
Nm/°	Newtonmeter pro Grad
N <sub>2</sub> O	Lachgas
op	operationem

# 1. Einleitung

Jede Fraktur oder Störung der skelettalen Integrität stellt einen massiven Eingriff in den Alltag der betroffenen Person dar. Dabei besteht das medizinische Problem der Frakturversorgung zum einen in der technischen Herausforderung bezüglich Reposition und Osteosynthese an den Chirurgen und andererseits in der Zeitspanne, die bis zur restitutio ad integrum erforderlich ist. Das Problem der Ausheilungszeit einer Fraktur ist bei Patienten mit verzögerter Frakturheilung besonders deutlich. Daher ist das Ziel dieses umfassenden Forschungsprojektes die biologischen Abläufe der verzögerten Frakturheilung besser zu verstehen, um Ansatzpunkte für eine frühzeitige Erkennung von Heilungsstörungen und therapeutische Interventionen zu schaffen.

Die Knochenbruchheilung stellt einen sehr komplexen, kaskadenartig ablaufenden Regenerationsmechanismus dar, der von zahlreichen biologischen und mechanischen Faktoren beeinflusst wird (Duda et al., 2000). Diese Abläufe umfassen eine Serie von zellulären, physiologischen und mechanischen Ereignissen (Klaushofer et al., 1994). Trotz der besonderen Eigenschaft des Knochens nach einer Verletzung seine ursprüngliche Form und Funktion ohne minderwertiges Narbengewebe wiederherzustellen, zeigen klinische Erfahrungen, dass es bei der Frakturbehandlung in zehn bis zwanzig Prozent zu Komplikationen wie einer verzögerten oder sogar ausbleibenden Frakturheilung kommt. Trotz der ständigen Fortschritte in der traumatologischen und orthopädischen Chirurgie kommt es auch heute noch zu Komplikationen. Diese Tatsache und das Streben nach immer schnellerer Rehabilitation ohne Funktionsverlust machen die unfallchirurgische Forschung zur Verbesserung der Frakturheilung erforderlich (Haas, 2000).

Durch ein besseres Verständnis der mechanischen und biologischen Rahmenbedingungen kann man gezielt in die verschiedenen Phasen der Frakturheilung eingreifen und somit die Frakturheilung beschleunigen bzw. Störungen der Frakturheilung besser entgegenwirken (Haas, 2000). Das Ziel der Frakturheilungsforschung ist eine Optimierung der Frakturversorgung im Sinne einer Beschleunigung der Heilung. Dies wird einerseits durch eine stetige Verbesserung von Operationsverfahren und Implantaten erreicht und andererseits durch die Aufschlüsselung der auf molekularer Ebene ablaufenden Prozesse, um diese dann gezielt beeinflussen zu können.

In diesem Forschungsprojekt wird in Anlehnung an ein vorangegangenes Tierversuchsprojekt der Heilungsverlauf einer standardisierten Osteotomie in Abhängigkeit von definierten biomechanischen Rahmenbedingungen umfassend evaluiert. Im vorangegangenen Forschungsprojekt wurde das Heilungsverhalten einer standardisierten Osteotomie unter einem rigiden und einem semirigiden Fixateur externe biomechanisch und histologisch analysiert. Dabei wurden Größenordnungen für Scherbewegungen definiert, die eine optimale und eine weniger effektive Heilung zuließen. Gestützt auf das validierte

muskuloskeletale Modell des Schafhinterlaufes wurde für das vorliegende Projekt ein für die Knochenheilung kritisch-scherweicher Fixateur externe entwickelt, der mechanische Bedingungen erzeugt, deren Größenordnung in der Klinik zu Heilungsverzögerungen führen. Die Knochenheilung wurde zu ausgewählten Zeitpunkten histologisch und biomechanisch untersucht und miteinander verglichen. Der Hintergrund der histologischen Untersuchung beruht auf den Erkenntnissen, dass mechanische Rahmenbedingungen die Ausprägung und die Differenzierung des Frakturkallus beeinflussen. Die im Rahmen der lokalen Kallusbildung und -remodellierung gebildeten Gewebetypen lassen sich mittels konventioneller histologischer Färbungen gut darstellen und über den beobachteten Heilungsverlauf erfassen. Die genaue Gewebeverteilung zu den unterschiedlichen Zeitpunkten wird beschrieben und ausgewertet. Des Weiteren werden die histologischen Ergebnisse mit denen des Vorgängerprojektes verglichen, weshalb es wichtig war, den gleichen Versuchsaufbau und die gleiche Versuchstierspezies wie in diesem zu wählen. Abschließend wird geprüft, ob die histologischen mit den biomechanischen Ergebnissen korrelieren.

### **1.1. Zu untersuchende Hypothesen**

In dieser Studie sollen folgende Hypothesen überprüft werden;

1. Unter der Anwendung des kritisch-scherweichen externen Fixateurs kommt es zur Ausbildung eines sehr voluminösen Kallus, der bis zum Sechswochenzeitpunkt überwiegend bindegewebig und zum Neunwochenzeitpunkt überwiegend knorpelig ist.
2. Im Verlauf der neunwöchigen Knochenheilung kommt es nicht zur knöchernen Überbrückung des Osteotomiespalt.
3. Die Torsionstestung, welche nach sechs und neun Wochen durchgeführt werden soll, ist eventuell aufgrund einer ungenügenden Stabilisierung der osteotomierten Fragmente unmöglich.
4. Bei der im Anschluss an die biomechanische Testung durchgeführten Frakturklassifikation nach White und Mitarbeitern (White et al., 1977) erreichen die getesteten Knochen maximal Stadium zwei, was einer wenig fortgeschrittenen Frakturheilung entspricht.



## **2. Stand des Wissens**

### **2.1. Knochen**

Knochengewebe stellt ein besonders hartes, skelettbildendes Stützgewebe dar. In diesem dynamischen Gewebe sind stoffwechselaktive Zellen in ein festes Netzwerk integriert (Kalfas, 2001). Neben der Zahnschmelze (Dentin) ist das Knochengewebe der härteste Baubestandteil des Körpers (Hildebrandt, 1998) und das am höchsten differenzierte Stützgewebe. Seinen Ursprung hat Knochen im mesenchymalen Gewebe (Liebich, 1999).

Knochen ist ein sehr aktives Gewebe (Kenwright et al., 1988; Trostle et al., 1996), welches sich zeitlebens durch Ab-, Auf- und Umbauprozesse an die funktionellen und mechanischen Bedürfnisse des Skelettes anpasst (Kornak et al., 2003).

Der gesamte Prozess der Knochenentwicklung unterliegt einer fein geregelten hormonellen Kontrolle (Weyrauch et al., 1998). Modelling bezeichnet den Knochenumbau und Zuwachs im Zusammenhang mit dem Knochenwachstum (Noble et al., 2000). Druck- und Zugkräfte spielen beim stetigen Knochenumbau eine bedeutende Rolle (Beck, 2003). So führen andauernd wirkende mechanische Druck- und Zugkräfte zu einer Verstärkung der Knochenwand. Dabei kommt es innerhalb der Kortikalis zur Knochenresorption mit anschließender Knochenneubildung in Anpassung an die mechanischen Belastungen. Diesen lebenslang anhaltenden Prozess nennt man Remodelling (Noble et al., 2000). Der Knochenaufbau richtet sich dabei immer nach den Kraftvektoren aus, die auf ihn wirken (Beck, 2003). Bei längerer Ruhigstellung (Gipsverband, Immobilität) hingegen schwindet Knochenmaterial. Im Körper übernimmt das Knochengewebe mehrere wichtige Funktionen (Trostle et al., 1996). Es stützt den Körper, ermöglicht Bewegung durch Gelenke, schützt die inneren Organe, liefert Muskelansatzstellen und ist an wichtigen Stoffwechselfunktionen, wie der Speicherung von Kalzium und Phosphor und der Regulation des Serumkalziumspiegels, beteiligt (Trostle et al., 1996).

### **2.2. Knochenbestandteile**

Knochengewebe besteht aus zellulären und nichtzellulären Bestandteilen. Den zellulären Anteil bilden Osteoblasten, Osteozyten und Osteoklasten, den nichtzellulären Anteil stellt die interzelluläre Knochenmatrix dar.

#### **2.2.1. Osteoblasten**

Als Osteoblasten bezeichnet man reife, stoffwechselaktive Knochenzellen (Kalfas, 2001). Sie sind plasmareich und besitzen basophile Eigenschaften. Sie entstehen aus besonders

teilungsfähigen, osteogenetischen Knochenstammzellen, welche wiederum aus pluripotenten Mesenchymzellen hervorgehen (Remedios, 1999). Die 20 bis 30µm großen Osteoblasten sind kettenförmig an der Knochenoberfläche aufgereiht (Beck, 2003). Auf diese Weise werden mosaikartig sämtliche Knochenoberflächen bedeckt (Menton et al., 1984).

Man unterscheidet aktive und inaktive (ruhende) Osteoblasten. Die inaktiven Osteoblasten werden auch als Bone lining cells bezeichnet. Diese Zellen behalten ihr osteogenes Potential und die Fähigkeit zur Proliferation zeitlebens bei (Liebich, 1999). Die Bone lining cells sind im Gegensatz zu den aktiven Osteoblasten, welche einen runden Kern aufweisen und zahlreiche sekretorische Organellen besitzen, spindelartig abgeflacht. Die Bone lining cells befinden sich auf den endostalen und periostalen Oberflächen des Knochens (Kalfas, 2001). Die knochenbildenden Osteoblasten produzieren die organischen Bestandteile der extrazellulären Matrix und steuern die Mineralisation des zuvor produzierten Osteoids (Schweiberer et al., 1999). In wenigen Tagen produzieren sie das zwei bis vierfache ihres Volumens an extrazellulärer Matrix, welche dem Knochengewebe seine mechanischen Eigenschaften verleiht (Schweiberer et al., 1999). Sie geben das von ihnen synthetisierte Osteoid (Kalfas, 2001), vorwiegend bestehend aus Proteoglykanen und Kollagenfibrillen, an ihre Umgebung ab und mauern sich so allmählich selbst ein. Anschließend differenzieren sie zu abgeplatteten, länglichen Osteozyten.

### **2.2.2.Osteozyten**

Osteozyten sind reife Knochenzellen, welche aus Osteoblasten hervorgehen (Liebich, 1999; Kalfas, 2001). Sie machen den größten Anteil aller im Knochengewebe vorkommenden Zellen aus. Sie sind hoch spezialisierte Osteoblasten und die am höchsten differenzierten Knochenzellen (Noble et al., 2000). Ungefähr zehn bis zwanzig Prozent der Osteoblasten entwickeln sich innerhalb von drei Tagen zu Osteozyten, welche vollständig von verkalkter Knochensubstanz umgeben sind (Liebich, 1999). Gehen die Osteozyten zugrunde, so wird die umliegende Matrix abgebaut (Noble et al., 2000).

Die Knochenzellen liegen isoliert und abgeflacht zwischen den lamellären Knochenschichten in schmalen Lakunen (Remedios, 1999). Osteozyten sind dendritische Zellen, die über zahlreiche fingerförmige Zytoplasmfortsätze untereinander sowie mit Osteoblasten, Blutgefäßen und der Interzellularflüssigkeit in Kontakt stehen (Kalfas, 2001). Diese zelluläre Vernetzung stellt eine funktionelle Einheit dar, die dem Stofftransport und der Kommunikation untereinander dient. Außerdem sind Osteozyten an der Kontrolle des extrazellulären Kalzium- und Phosphorspiegels beteiligt (Kalfas, 2001).

### 2.2.3. Osteoklasten

Der Osteoklast ist eine mehrkernige Riesenzelle, welche durch die asynchrone Fusion von mononukleären Vorläuferzellen aus dem Knochenmark entsteht (Amling et al., 1996). Osteoklasten besitzen mindestens zwei bis maximal 100 Zellkerne pro Zelle (Liebich, 1999) und erreichen im ausgereiften Zustand einen Durchmesser von 50 bis 100 µm (Amling et al., 1996; Li et al., 2006). Außer den vielen Zellkernen beinhalten sie reichlich Mitochondrien, zahlreiche Lysosomen und freie Ribosomen. Osteoklasten sind in der Lage sich amöboid fortzubewegen. Ihre mittlere Lebenserwartung wird mit wenigen Tagen (Owen, 1970) bis hin zu maximal sechs Wochen (Liebich, 1999) angegeben. Osteoklasten, deren einzigartige Fähigkeit die Knochenresorption ist, synthetisieren, transportieren und sezernieren eine große Anzahl proteolytischer Enzyme (Waldeyer et al., 1993). Die Aktivität der Osteoklasten wird durch hormonelle und zelluläre Mechanismen kontrolliert und reguliert (Kalfas, 2001).

Die lebenslang stattfindenden Umbauprozesse des Skelettsystems erfolgen durch ein komplexes Zusammenspiel von Osteoblasten und Osteoklasten (Kornak et al., 2003). Die Osteoklasten bauen während der Skelettentwicklung mineralisiertes Knochengewebe ab und ermöglichen den Ersatz von Geflechtknochen durch höher organisierten Lamellenknochen durch Osteoblasten (Bucher et al., 1997). Die enzymatische Abbauleistung eines Osteoklasten entspricht in etwa der Aufbauleistung von 100 Osteoblasten (Junqueira et al., 1996). Die durch den Knochenabbau entstehenden Einbuchtungen in der Grundsubstanz werden als Howship-Lakunen bezeichnet (Schmolke, 2001). In diesen Lakunen befinden sich die Osteoklasten vorwiegend (Amling et al., 1996; Trostle et al., 1996; Remedios, 1999). Sind diese einzigartigen Eigenschaften der Osteoklasten gestört, so kann es bei verminderter Funktion zu Osteosklerose (Verdichtung des spongiösen Knochengewebes) und Osteopetrose (übermäßige Knochendichte), sowie bei überschießender Reaktion zu Osteoporose (Knochenverlust) kommen (Hildebrandt, 1998; Li et al., 2006). Osteoklasten stellen eine sehr kleine Zellpopulation dar und bedecken ungefähr einen Prozent der gesamten Knochenoberfläche (Amling et al., 1996). Die Aktivität und Differenzierung der Osteoklasten wird durch Osteoblasten gesteuert. Diese sezernieren den macrophage colony-stimulating factor (M-CSF) und produzieren unter anderem das Protein Osteoprotegrin (OPG). Dieses Protein kann auf der Preosteoklastenmembran binden und so die Osteoklastenbildung, Fusion, Differenzierung und Aktivierung stimulieren (Li et al., 2006). Der Entwicklungsprozess zu aktiven Osteoklasten wird außerdem durch eine große Anzahl an Zytokinen und Wachstumsfaktoren gesteuert. Aktive Osteoklasten, die der Knochenoberfläche durch zahlreiche fingerförmige Zellausstülpungen (Resorptionsstruktur-ruffled border) sehr eng anliegen, produzieren proteolytische Enzyme wie die saure Phosphatase und die Carboanhydrase 2, welche die Knochengrundsubstanz abbauen, indem sie Hydroxylapatit-Kristalle aufspalten (Li et al., 2006). Im Bereich der Knochenmatrix aufliegenden Seite befindet sich in der so genannten ruffled border die Protonenpumpe,

welche den zum Knochenabbau nötigen sauren pH-Wert von vier bis fünf aufrecht hält (Li et al., 2006). Nach Abschluss der Knochenresorption lösen sich die Osteoklasten von der Knochenoberfläche ab und wandern zur nächsten Resorptionsstelle, wo sie nach Anheftung erneut mit dem Knochenabbau beginnen (Liebich, 1999).

#### **2.2.4. Interzelluläre Knochenmatrix**

Die Knochenmatrix, welche die Interzellulärsubstanz des Knochens darstellt, besteht zu 30 Prozent aus organischen und zu 70 Prozent aus anorganischen Bestandteilen (Remedios, 1999), wobei Kollagenfasern vom Typ eins mit 90 Prozent den Hauptanteil der organischen Knochengrundsubstanz ausmachen (Wang et al., 2002). Die restliche organische Substanz setzt sich aus Glykosaminoglykanen und Proteoglykanen zusammen (Liebich, 1999). Die Knochenmatrix verleiht dem Gewebe seine mechanischen Eigenschaften, sie bindet Zellen und beeinflusst deren Proliferation und Differenzierung (Schweiberer et al., 1999). Glykoproteine wirken als lokale Mediatoren und Wachstumsfaktoren mit osteoinduktiver Wirkung, die die Zellteilung und Differenzierung beeinflussen (Schweiberer et al., 1999).

Die anorganische Interzellulärsubstanz besteht aus Kalziumphosphat, Kalziumcarbonat, Magnesiumphosphat und Kalziumfluorid. Diese Mineralien liegen in Form von Hydroxylapatit außen den Kollagenfasern an und bestimmen durch ihre Verbindung die Stabilität des Knochens (Liebich, 1999). Die Kalzium-Hydroxylapatitkristalle machen ungefähr 80 Prozent der anorganischen Knochenmatrix aus (Li et al., 2006). Während der anorganische Anteil für die Stabilität verantwortlich ist, bestimmen die organischen Bestandteile die Elastizität des Knochens, welche beim Juvenilen höher ist als beim Adulten.

### **2.3. Anatomischer Knochenaufbau**

Die Tibia als Stellvertreter langer Röhrenknochen besteht aus einem langen Schaft, der Diaphyse, und weist an beiden Knochenenden jeweils eine Epiphyse auf (Remedios, 1999). Die Diaphyse stellt das wichtigste Element für die Steifigkeit und Tragfähigkeit des Knochens dar (Schweiberer et al., 1999). Jeder Röhrenknochen besteht aus der äußeren, lamellär aufgebauten Substantia compacta (kortikaler Knochen) und der inneren Substantia spongiosa (trabekulärer Knochen). Die Spongiosa bildet im Inneren des Knochens ein schwammartiges Balkenwerk (Kalfas, 2001), während die Compacta den Knochen von außen als feste Schicht umgibt. Sie kommt überwiegend in den Diaphysen langer Röhrenknochen und an den Oberflächen flacher Knochen vor. Die Spongiosa befindet sich hauptsächlich im Metaphysenbereich und den Wirbelkörpern.

Weitere Bestandteile des Knochens sind das Periost (Beinhaut), die Kortikalis und der Markraum. Diese drei Strukturen stellen eine biologische Einheit dar. Eine Unterbrechung

dieser Einheit kann mit Störungen der Frakturheilung einhergehen (Schweiberer et al., 1999).

Das Periost überzieht als derbe fibrovaskuläre Membran die gesamte Knochenoberfläche, ausgenommen Gelenkflächen (Kalfas, 2001), sowie viele Muskelansätze (Liebich, 1999). Das Periost ist aus zwei Schichten aufgebaut und stellt das Bindeglied zwischen Weichteilmantel und Kortikalis dar. Es besteht aus derben kollagenen Bindegewebsfasern, Blutgefäßen und Nerven (Schweiberer et al., 1999). Die Periost-Innenschicht (Kambiumschicht) ist weniger faser-, gefäß- und nervenreich als die Periost-Außenschicht, dafür aber sehr zellreich. Sie behält zeitlebens die Fähigkeit zur Knochenbildung und besteht aus Bindegewebszellen, osteoblastischen Stammzellen, Osteoklasten, Endothelzellen und pluripotenten Mesenchymzellen (Schweiberer et al., 1999). Das Periost ist somit Träger eines sehr großen biologischen Reparationspotentials (Schweiberer et al., 1999). Über kollagene Fasern, auch Sharpeysche Fasern genannt, ist das Periost eng mit dem Knochen verankert (Webb et al., 2000). Den Abschluss zur Markhöhle bildet das einschichtige Endost, bestehend aus osteogenetischen Zellen ohne bindegewebige Komponente (Kalfas, 2001).

Der Markraum stellt unter physiologischen Bedingungen das führende Versorgungsglied des Knochens dar. Über Perforationskanäle nimmt er die Markgefäße aus den Weichteilen auf und verteilt sie nach proximal und distal zur Versorgung der Kortikalis (Schweiberer et al., 1999). Durch den Hohlraum der Markhöhle ist es dem Röhrenknochen möglich, hohen elastischen Verformungen bei Spitzenbelastungen standzuhalten (Schweiberer et al., 1999). Die Knochendurchblutung erfolgt von endostal und periostal (Kutscha-Lissberg et al., 2003). Die axial verlaufende Blutversorgung (Mayr, 2002) des Knochens erfolgt über drei Gefäßsysteme (Pennig, 1990; Remedios, 1999; Phieffer et al., 2006), einem afferenten, einem efferenten und einem metaphysären System. Im proximalen Drittel tritt die Arteria nutricia durch die Kortikalis in den Markraum ein und bildet die sich verzweigende Markraumarterie (Pennig, 1990) mit auf- und absteigenden Ästen. Diese teilen sich weiter in Arteriolen auf und übernehmen die Versorgung der Havers'schen Blutgefäße (Remedios, 1999). Eine periostale Ernährung des Knochens erfolgt über segmental abgehende periostale Gefäße, welche vom Hauptgefäß der Extremität abstammen und transversal zur Längsachse des Knochens verlaufen (Macnab et al., 1974). Ein intaktes Periost ist von entscheidender Bedeutung und mitbestimmend für den Heilungsverlauf einer Tibiafraktur (Macnab et al., 1974). Das im metaphysären Bereich liegende arterielle Gefäßsystem spielt beim Erwachsenen eine untergeordnete Rolle (Pennig, 1990; Remedios, 1999). Wird jedoch die Arteria nutricia durch ein Trauma oder während einer Operation verletzt, können die metaphysären Gefäße schnell hypertrophieren und die kortikale Blutversorgung übernehmen (Remedios, 1999). Aufgrund eines höheren intramedullären Druckes im Verhältnis zum periostalen Druck ist der arterielle Blutfluss im Knochen zentrifugal (Remedios, 1999). Die venöse Drainage verläuft zentripetal von außen nach innen. Jede Knochenreparation ist

extrem stoffwechselaktiv und erfordert die Neubildung von Gefäßen. Die Gefäße stammen entweder aus der Markhöhle oder dem Periost und umliegenden Muskelansätzen (Stürmer, 1996). Wenn eine dieser Gefäßquellen gestört ist, kann die andere sie teilweise kompensieren. Sind jedoch beide gestört, kann keine Heilung eintreten (Stürmer, 1996). Ersatzweise erfolgt eine Revaskularisierung des toten Knochens aus der vitalen Grenzschicht über Haversschen-Umbau (Stürmer, 1996). Während die endostale Durchblutung bei allen dislozierten Frakturen empfindlich gestört ist, bleibt die periostale Durchblutung über die Insertionsstellen der Muskulatur und Faszien in der Regel erhalten (Kutscha-Lissberg et al., 2003).

### **2.3.1. Knochenarten**

Histologisch unterscheidet man zwei Arten von Knochengewebe, den funktionell höher strukturierten Lamellenknochen und den einfacheren Geflecht- oder Faserknochen (Liebich, 1999; Noble et al., 2000). Beide weisen qualitativ die gleiche zelluläre, kollagenfaserige sowie mineralisierte Zusammensetzung auf, sie differieren jedoch stark in der Quantität der einzelnen Bestandteile (Liebich, 1999).

### **2.4.1. Geflechtknochen**

Geflechtknochen stellt die entwicklungsgeschichtlich einfachere Knochenform dar und kann als verknöchertes Bindegewebe angesehen werden (Ng et al., 1997). Er kommt überall dort vor, wo über längere Zeit durch Druck und Zug mechanische Kräfte einwirken (Liebich, 1999), denn er ist besonders stabil gegen Zugkräfte und Biegung. Geflechtknochen ist verhältnismäßig primitiv angeordnet und lässt strukturelle und belastungsabhängige Orientierungen vermissen (Klaushofer et al., 1994). Dieser Knochen wird während der embryonalen Entwicklung angelegt (Trostle et al., 1996) und später den mechanischen Erfordernissen entsprechend durch Lamellenknochen ersetzt (Stein, 1998, Weyrauch et al., 1998; Liebich, 1999). Weiterhin treten Geflechtknochen in Regionen auf, in denen Knochen schnell rekonstruiert werden muss, wie z.B. bei der Knochenbruchheilung (Trostle et al., 1996; Noble et al., 2000). Die Bildung von Geflechtknochen erfolgt wesentlich schneller als die lamelläre Knochenbildung (Noble et al., 2000). Außerdem findet man ihn an Ansatzstellen von Sehnen und Bändern und an bestimmten Stellen des Schädelknochens (Stein, 1998).

Der Geflechtknochen ist reich an Osteozyten (Noble et al., 2000), deren Verteilung ohne erkennbare Ordnung in der knöchernen Matrix erfolgt. Die geformte Grundsubstanz wird von einem unregelmäßigen Geflecht von Kollagenfaserbündeln durchzogen, welche keine bestimmte Verlaufsrichtung erkennen lassen (Beck, 2003). Dadurch ist der Geflechtknochen

zwar flexibler als der Lamellenknochen, jedoch weist er eine höhere Instabilität gegenüber einwirkenden Kräften auf (Liebich, 1999; Noble et al., 2000).

Die Bildung von Geflechtknochen erfolgt durch desmale (direkte) Ossifikation. Dabei entsteht das Knochengewebe direkt aus dem mesenchymalen Bindegewebe ohne knorpelige Vorstufe (Liebich, 1999). Dabei differenzieren sich embryonale Bindegewebszellen (Mesenchymzellen) direkt zu Osteoblasten. Diese synthetisieren Osteoid und mauern sich bei der Umwandlung zu Osteozyten in die entstehenden primären Knochenbälkchen aus Geflechtknochengewebe ein (Budras et al., 1996).

## 2.4.2. Lamellenknochen

Der Lamellenknochen ist gekennzeichnet durch seine regelmäßige Struktur, welche sich durch die unterschiedlichen Lamellen und Knochenkanälchen auszeichnet. Diese Knochenform entsteht auf dem Wege der enchondralen (indirekten) Ossifikation wesentlich langsamer als Geflechtknochen (Noble et al., 2000). Die kleinste strukturelle Grundeinheit des Lamellenknochens ist das Osteon bzw. Havers-System, in dessen Mitte ein 20 bis 30µm weiter Zentralkanal (Havers-Kanal) mit einem kleinem Blutgefäß (Havers-Gefäß), Bindegewebe und vegetativen Nerven verläuft (Trostle et al., 1996; Liebich, 1999). Die Osteone verlaufen parallel zur Längsachse des Röhrenknochens. Ihr Aufbau beginnt mit der Bildung der äußersten Lamelle. Ausgehend von dieser bilden sich weitere Lamellen in Richtung Zentralkanal, welcher sich dadurch zunehmend verengt. Den Havers-Kanälen als zentraler Verteiler obliegt die Versorgung der Osteozyten, die in den 4 bis 10µm dicken Lamellen des dem Havers-Kanal zugeordneten Osteons lagern (Schweiberer et al., 1999). Die Havers-Gefäße stehen miteinander über sogenannte Volkmann-Kanäle, welche die Knochenlamellen quer durchbohren, in Verbindung (Weyrauch et al., 1998). Osteone sind aus konzentrisch gelagerten Knochenlamellen (Havers-Lamellen) unterschiedlicher Anzahl aufgebaut, welche um den zugehörigen Zentralkanal angeordnet sind (Trostle et al., 1996). Entlang dieser Lamellen befinden sich kleine Lakunen, in denen die Osteozyten lagern (Trostle et al., 1996). Die einzelnen Lamellen werden von parallel angeordneten Kollagenfasern und von der mineralisierten Knochenmatrix gebildet, wobei sich die Verlaufsrichtung der Kollagenfasern von Lamelle zu Lamelle ändert. Dieses besondere Bauprinzip ermöglicht dem Knochen die Anpassung an auf ihn wirkende Zug- und Druckbelastungen (Liebich, 1999) und gewährleistet ein Höchstmaß an mechanischer Festigkeit (Trostle et al., 1996). Durch die longitudinale Ausrichtung der Osteone ist der Knochen widerstandsfähiger gegen Kompressionskräfte im Gegensatz zu Tensionskräften (Autefage, 2000). Die Kollagenfasern treten teilweise in benachbarte Knochenlamellen über und führen so zur Verfestigung des Gewebes (Weyrauch et al., 1998). Die ständig erforderlichen Adaptationsvorgänge an die aktuelle mechanische Beanspruchung gehen mit

permanenten Umbauvorgängen des Knochengewebes einher (Weyrauch et al., 1998). Dabei entstehen Osteonenfragmente in Form von Schaltlamellen, welche in den Osteonenzwischenräumen liegen.

Nach innen und außen ist der Knochen durch plattenartig geschichtete Knochenlamellen und Generallamellen abgeschlossen, an die das Peri- und Endost grenzen (Junqueira et al., 1996; Webb et al., 2000).

## **2.5. Frakturentstehung**

Eine Fraktur stellt eine Zusammenhangstrennung des Knochens mit Zerstörung seiner anatomischen Form, Schädigung des umgebenden Weichteilmantels (Haut, Muskeln, Nerven, Sehnen, Gefäße) und Verlust der Gliedmaßenfunktion dar (Niemand et al., 2004).

Eine Fraktur entsteht, wenn es durch exzessive Krafteinwirkung zu einer Überlastung des Knochens kommt und die Energie des einwirkenden Traumas die Elastizität des Knochengewebes übertrifft (Niemand et al., 2004). Auf diese Weise wird die obere Belastungsgrenze des Knochens überschritten und es kommt zur Fraktur (Simmons, 1985). Durch die Fraktur wird der Kraftfluss gestört und es treten Bewegungen auf, welche die Gliedmaßenfunktion beeinträchtigen (Perren, 1992). Der Knochen speichert die auf ihn einwirkende Kraft und gibt diese zum Zeitpunkt des Bruches explosionsartig frei. Die Energiemenge, die ein Knochen absorbieren kann bis er bricht, hängt vom Umfang des Knochens ab (Brighton, 1984). Der Knochenumfang ist direkt proportional zur Energiemenge, die absorbiert werden kann und umgekehrt proportional zur Steifigkeit des Knochens. Das heißt, je größer die Steifigkeit des Knochens ist, umso geringer ist die Energiemenge, die der Knochen absorbieren kann, bevor er bricht (Brighton, 1984).

Durch die frakturbedingte Instabilität kann der Knochen seine wichtige Stützfunktion nicht mehr erfüllen, so dass Reparaturvorgänge nötig sind. Die lokalen Gewebeveränderungen der umliegenden Weichteile setzen den komplexen Mechanismus der Frakturheilung in Gang.

## **2.6. Frakturheilung**

Zu den besonderen Eigenschaften des Knochens gehört seine Fähigkeit zur vollständigen Heilung über Regeneration und Wiedererlangung der ursprünglichen Form und Belastbarkeit (Trostle et al., 1996).

Knochengewebe heilt im Unterschied zum Weichteilgewebe ohne Narbenbildung (McKibbin, 1978; Brighton, 1984; DeLacure, 1994; Einhorn, 1998). Sogar nach Mehrfragment-Frakturen kommt es zur vollständigen Regeneration (Lacroix et al., 2002). Der Frakturheilungsprozess



beinhaltet die funktionelle und strukturelle Wiederherstellung des traumatisierten Knochens (Mark et al., 2004). Die zwei wesentlichen Voraussetzungen für eine ungestörte Frakturheilung sind eine ausreichende Vaskularisierung sowie eine mechanische Stabilisierung der Frakturfragmente (Claes et al., 2002). Die mechanische Umgebung der Fraktur beeinflusst den Heilungsverlauf und -ausgang durch direkte Gewebedifferenzierung und Proliferation (Augat et al., 1998). Laut Stürmer (Stürmer, 1996) löst jede Knochenverletzung einen Heilungsreiz aus. Die Bewegung der Fragmente gegeneinander und die damit verbundene Dehnung des interfragmentären Gewebes ist dabei der entscheidende Triggermechanismus der Heilung (Stürmer, 1996). Das wichtigste interfragmentäre Gewebe stellt das Periost dar. Ist dieses vollständig durchtrennt, fehlt der Triggermechanismus (Stürmer, 1996) und es kann zur verzögerten oder sogar ausbleibenden Heilung kommen. Die sehr komplexen Prozesse der Frakturheilung erfordern das koordinierte Zusammenspiel von mehreren Zelltypen (Einhorn, 1998). Die Frakturheilung kann auf unterschiedliche Weise erfolgen. Einerseits ist sie abhängig von Art und Ausmaß der Fraktur, andererseits von der Stabilisierung der Frakturzone. Sie erfolgt über eine Aktivierung von Osteoblasten und Fibroblasten des Periosts, des Endosts und des Havers-Systems.

Man unterscheidet eine primäre (direkte) von einer sekundären (indirekten) Frakturheilung (Schenk et al., 1977; Brighton, 1984; Stürmer, 1984; Chao et al., 1988; Klaushofer et al., 1994; Trostle et al., 1996; Einhorn, 1998).

Die primäre Knochenheilung ist durch das Fehlen eines Fixationskallus gekennzeichnet (Kenwright et al., 1988; Stürmer, 1996). Hingegen findet sich bei der sekundären Frakturheilung als Hauptcharakteristikum ein interfragmentäres Stützgewebe (Kallus) im Frakturspalt (Schenk et al., 1977) und eine flächenhafte Resorption der Fragmentenden (Stürmer, 1996).

### **2.6.1. Primäre Knochenheilung**

Die primäre Frakturheilung erfolgt nur unter absolut stabilen Bedingungen und vollständiger Reposition sowie dem exakten Aneinanderliegen der Frakturfragmente ohne verbleibenden Frakturspalt, so dass keine Bewegung der Frakturfragmente gegeneinander möglich ist (Schenk et al., 1977; McKibbin, 1978).

Diese Form der Frakturheilung stellt eine Regeneration dar (Einhorn, 1998). Man unterscheidet bei der primären Frakturheilung eine Kontakt- und eine Spalthheilung (Schebitz et al., 1993). Durch sehr engen Knochenkontakt können die Osteone direkt in das Gegenfragment einwachsen (Kenwright et al., 1988), was als Kontaktheilung bezeichnet wird (Niemand et al., 2004). Liegt hingegen ein kleiner Frakturspalt unter einem Millimeter bei ansonsten stabilen Bedingungen vor, kommt es zur Spalthheilung. Dabei dürfen die

interfragmentären Verschiebungen nicht über zwei Prozent liegen (Palmer et al., 1992). Die feinen Spalten werden von eingewachsenen Kapillaren aus mit Lamellenknochen gefüllt und anschließend können Osteone den so gefüllten Spalt überwachsen (Niemand et al., 2004). Einwandernde Osteoprogenitorzellen differenzieren direkt zu Osteoblasten, welche die neue Knochenmatrix produzieren (Mark et al., 2005). Es kommt zur Entstehung neuer Osteone, die den Frakturspalt überwachsen und in das gegenüberliegende Fragment mit einer Geschwindigkeit von täglich ca. 70-100µm eindringen. Diese primäre Form der Frakturheilung kommt wesentlich seltener vor als die sekundäre Frakturheilung. Sie tritt zum Beispiel bei absolut stabiler Plattenosteosynthese, Fixateur externe Osteosynthesen mit interfragmentären Zugschrauben und bei stabiler Zugschraubenosteosynthese auf (Stürmer, 1996).

### 2.6.2. Sekundäre Knochenheilung

Die sekundäre Knochenheilung resultiert aus einer gewissen Unruhe zwischen den frakturierten Fragmenten und ist durch periostale und endostale Kallusbildung charakterisiert (Stürmer, 1996). Sie wird im klinischen Alltag häufig gesehen, vor allem bei der konservativen Frakturbehandlung, der Marknagelosteosynthese, der Fixateur externe-Osteosynthese und bei elastischer (biologischer) Plattenosteosynthese (Stürmer, 1996).

Im Allgemeinen wird die sekundäre Frakturheilung histologisch beschrieben. Der Heilungsverlauf gliedert sich je nach Einteilungsschema in mehrere Phasen der Frakturheilung, die fließend ineinander übergehen und teilweise parallel verlaufen. In der Literatur werden von einigen Autoren (Owen, 1970; Cruess et al., 1975; Brighton, 1984) vier und von anderen (Braun et al., 1996) fünf Phasen der Heilung beschrieben, je nachdem, ob man das Frakturereignis selbst als die erste vorgeschaltete Phase definiert. Nach der Frakturentstehung treten folgende ineinander übergehende Phasen auf: Die Entzündungsphase mit Hämatombildung, die Phase des weichen Kallus oder Granulationsphase genannt, die Phase des harten Kallus und abschließend die Remodelling-Phase (Owen, 1970; Cruess et al., 1975; Brighton, 1984; Braun et al., 1996).

Die **initiale Frakturphase** beschreibt die Zeit vom Eintritt der Gewalteinwirkung bis zu dem Moment, an dem die gesamte Energie durch den hierbei brechenden Knochen und das umgebende Gewebe aufgenommen ist (Braun et al., 1996). Während dieser kurzen Phase werden die individuelle Form, die Schwere und das Ausmaß der Fraktur festgelegt.

Durch die Verletzung wird die Kontinuität des Knochens gestört, oft einhergehend mit einem Weichteiltrauma, sowie Verletzungen von Nerven, Sehnen und Gefäßen. An den Frakturrenden kommt es zum Absterben von Osteozyten, wodurch lysosomale Enzyme freigesetzt werden, die zur Zerstörung der organischen Matrix führen (Brighton, 1984;

Remedios, 1999). Des Weiteren werden durch das Absterben von Zellen biochemische Botenstoffe freigesetzt, welche parakrin wirken und lokal vorhandene Zellen für die Wirkung derartiger Botenstoffe sensibilisieren (Klaushofer et al., 1994).

Bedingt durch die auftretenden Gefäßzerreißen in Knochen, Knochenmark und den umliegenden Weichteilen kommt es zum Einströmen von Blut in den Frakturspalt. Es entsteht ein Frakturhämatom (McKibbin, 1978; Simmons, 1985; Palmer et al., 1992; Kalfas, 2001; Mark et al., 2004), welches die ein bis drei Tage, laut Simmons (1985) sogar fünf Tage andauernde, **Entzündungsphase** einleitet (Braun et al., 1996). Das Frakturhämatom ist erforderlich für die spätere Kallusbildung (Brug et al., 1991) und dient als Quelle von für die Frakturheilung unerlässlichen Signalmolekülen (Bolander, 1992). Es kommt zu akuten Entzündungserscheinungen, wie Vasodilatation und überschießende Kapillaraussprossung. Gleichzeitig kommt es unter Vermittlung von Prostaglandinen (Kalfas, 2001) zur verstärkten Einwanderung und anschließender Proliferation vorwiegend polymorphkerniger neutrophiler Granulozyten, Lymphozyten, Makrophagen und Mastzellen, welche mit dem Abbau nekrotischen Gewebes beginnen (Klaushofer et al., 1994; Braun et al., 1996). Die Mastzellen tragen über Histamin- und Heparinausschüttung ebenfalls zur Entzündungsreaktion bei und sind laut Owen (1970) als Ausgangspunkt der Osteoklasten anzusehen. Des Weiteren treten pluripotente mesenchymale Stammzellen auf, welche Osteoblastenvorläufer darstellen (Braun et al., 1996). Die inflammatorische Hypervaskularisation des Periosts stellt eine Grundvoraussetzung für die sekundäre Frakturheilung dar (Schweiberer et al., 1999). Die inflammatorische Phase ist entscheidend für die reparative Phase der Frakturheilung. Das heilende Gewebe wird vor Infektionen geschützt, und wichtige zelluläre Mechanismen werden durch chemische Botenstoffe wie Kinine, Histamine, Prostaglandine und Leukotriene reguliert (Trostle et al., 1996). Klinisch ist diese Phase durch Schmerzen und lokale Schwellung im Frakturbereich gekennzeichnet (Brighton, 1984; Braun et al., 1996). Im Frakturhämatom herrscht ein saures Milieu (Pennig, 1990), welches eine wichtige Rolle für die Enzymaktivitäten spielt. Im weiteren Heilungsverlauf normalisiert sich der pH-Wert und geht bis ins alkalische Milieu.

Im Anschluss an die einleitende Entzündungsphase setzt die zwei bis drei Wochen andauernde **Granulationsphase** ein. Diese beginnt klinisch mit dem Nachlassen des Schmerzes und der Wundschwellung (Brighton, 1984). In dieser Phase wird das Frakturhämatom, welches zu diesem Zeitpunkt ein Fibrinnetz sowie Kollagenfibrillen enthält, rasch organisiert und durch Granulationsgewebe, bestehend aus Entzündungszellen, Fibroblasten, Kollagen und eingewanderten Kapillaren, ersetzt (Klaushofer et al., 1994). Fibroblasten produzieren die extrazelluläre Matrix und füllen damit den interfragmentären Raum aus (Braun et al., 1996). Das Granulationsgewebe führt somit zur ersten

Brückenbildung zwischen den einzelnen Knochenfragmenten, dem sogenannten „weichen Kallus“ (Klaushofer et al., 1994). Die Größe der gebildeten Kallusmenge ist direkt abhängig von dem Grad der vorherrschenden Bewegung (Palmer et al., 1992). Je größer die Instabilität, desto größer ist auch die gebildete Kallusmenge (Palmer et al., 1992). An den Fragmentoberflächen erscheinen bereits resorbierende Osteoklasten, die mit dem Abbau der nekrotischen Knochenmatrix beginnen (Brighton, 1984; Klaushofer et al., 1994). Die Osteoklasten schaffen ein saures Milieu, welches die Hydroxylapatit-Kristalle aus der kollagenen Knochenmatrix herauslöst und die lysosomalen Enzyme aktiviert (Amling et al., 1996).

Diese Phase ist gekennzeichnet durch einen starken Anstieg der Vaskularisierung, welche ihren Höhepunkt in der zweiten Woche nach dem Trauma mit Werten bis zum sechsfachen der Norm erreicht (Braun et al., 1996). Hierbei findet auch die Einsprossung von Kapillaren in den Frakturkallus statt. Außerdem kommt es zur verstärkten Zellproliferation und Differenzierung (Brighton, 1984), es entstehen Chondroblasten und Osteoblasten im Granulationsgewebe. Diese Zellen synthetisieren Matrixbestandteile von Knorpel- und Geflechtknochen, welche nach ungefähr einer Woche zu mineralisieren beginnen (Klaushofer et al., 1994). Die Granulationsphase endet, wenn die Frakturfragmente über Knorpel oder Bindegewebe miteinander verbunden sind (Brighton, 1984).

Die **Phase der Kallushärtung** beginnt mit dem Abschluss der Vereinigung der Fragmentenden durch den weichen Kallus (Brighton, 1984; Braun et al., 1996). Das Auftreten erster Mineralisationsbereiche signalisiert ebenfalls den Beginn der Kallushärtung (Palmer et al., 1992). Durch zunehmende Mineralisierung der Grundsubstanz sowie des vorhandenen Knorpelgewebes kommt es zur Aushärtung des Kallusgewebes und dadurch zur zunehmenden Stabilisierung der Frakturfragmente (Klaushofer et al., 1994). Es kommt zur kontinuierlichen Reduktion der interfragmentären Beweglichkeit. Durch enchondrale Ossifikation wird der Kallus in Geflechtknochen umgewandelt (Brighton, 1984), dabei hypertrophieren die Knorpelzellen und die Knorpelmatrix wird mineralisiert (Mark et al., 2004). Bei vielen Frakturen nimmt dieser Vorgang drei bis vier Monate in Anspruch (Brighton, 1984). Osteoprogenitorzellen gelangen über Blutgefäße in den Kallus und differenzieren zu Osteoblasten, die anschließend die Knochenmatrix des Geflechtknochens aus der mineralisierten Knorpelmatrix bilden (Mark et al., 2004). Dieses frühe Knochengewebe ist ein dreidimensional orientiertes Netzwerk, welches sich entlang der Kapillaren und nicht entlang seiner mechanischen Beanspruchung ausrichtet (Braun et al., 1996). Die Phase des harten Kallus endet, wenn die Fraktur klinisch und radiologisch geheilt ist (Brighton, 1984).

In der letzten Phase der Heilung, dem **Remodelling**, welches Monate bis mehrer Jahre dauern kann (Brighton, 1984; Braun et al., 1996; Kalfas, 2001) wird der ungerichtete, Fragment überbrückende Geflechtknochen durch regelmäßig angeordneten Lamellenknochen ersetzt (Brighton, 1984; Kenwright et al., 1988; Klaushofer et al., 1994), wobei nun die Knochenbälkchen nicht mehr wirr, sondern geordnet ausgerichtet werden (Braun et al., 1996; Beck, 2003). Der Abbau des Geflechtknochens erfolgt durch Osteoklasten, während Osteoblasten den entstandenen Defekt mit neuem Lamellenknochen auffüllen (Cruess et al., 1975). Bei diesen Umbauprozessen bilden Osteoblasten, Osteozyten, Osteoklasten und vaskuläre Zellen eine als basic multicellular units of bone (BMU) bezeichnete Einheit (Frost, 1989b; Klaushofer et al., 1994; Noble et al., 2000). Diese BMU kommen an sämtlichen Knochenbereichen wie zum Beispiel unter dem Periost, den Gefäßkanälen und in den Markräumen vor (Klaushofer et al., 1994). Diese stereotype Abfolge von Aktivierung, Resorption und Neubildung umfasst einen Zeitraum von drei bis vier Monaten (Klaushofer et al., 1994).

Ist die Kallusbildung beendet, verlagern sich die Resorptions- und Neubildungsvorgänge an die kortikalen, endostalen und periostalen Oberflächen und beginnen die Modellierung der Compacta im Sinne der ursprünglichen Form (Klaushofer et al., 1994). Hierbei werden die Trabekel innerhalb des Knochens entsprechend den Belastungslinien ausgerichtet. Im Gegensatz zu den Umbauvorgängen auf Basis der BMU laufen hier Resorption und Neubildung unabhängig voneinander und an unterschiedlichen Lokalisationen ab (Klaushofer et al., 1994). Diese Umbauvorgänge werden vor allem durch mechanische Kräfte stimuliert (Pennig, 1990). Die Phase ist abgeschlossen, wenn der Knochen seine ursprüngliche Form und Kontur zurück erhalten hat und der Markraum rekanalisiert ist (Brighton, 1984; Palmer et al., 1992).

### **2.6.3. Kallusgewebe**

Die biomechanische Funktion der Kallusbildung besteht in der temporären mechanischen Überbrückung der Frakturfragmente (Claes et al., 2000). Die Kallusheilung ist somit der natürliche Weg der Stabilisierung von Knochenfragmenten (McKibbin, 1978).

Verlauf und Heilungsausgang werden durch die anfänglichen mechanischen Bedingungen mitbestimmt (Klein et al., 2003). Der gesamte Prozess der Kallusdifferenzierung wird stark durch mechanische und biomechanische Faktoren beeinflusst und kontrolliert (Yamagishi et al., 1955). Die Stabilität der Osteosynthese ist für die Kallusbildung einer der wichtigsten Faktoren, da sie die interfragmentären Bewegungen beeinflusst (Claes et al., 2000). Interfragmentäre Bewegungen stellen also eine Reflexion der Fixationsstabilität der Fraktur dar (Epari et al., 2006) und geben laut Stürmer (1988) den entscheidenden Reiz für die Kallusbildung. Sie resultieren aus der Belastung der operierten Extremität, der

Osteosynthesesteifigkeit und der Steifigkeit der momentanen Kallusbildung (Claes et al., 2000). Die Bewegungen im Frakturspalt sind sehr komplex und treten in allen Raumachsen auf (Claes et al., 2000). Ein bestimmtes Maß an Bewegung kann die Kallusbildung und Reifung stimulieren (Bishop et al., 2006). Axiale interfragmentäre Bewegungen zwischen 0,2 und einem Millimeter ermöglichen laut Claes und Mitarbeitern (1998) bei Lückengrößen von drei Millimetern einen optimalen Heilungsverlauf nach transversen Osteotomien.

Das Material des Kallus kann neben unreifem, schlecht strukturierten Knochen auch Bindegewebe und Knorpel enthalten (Perren, 1992). Es besteht ein enger Zusammenhang zwischen den Bewegungen der Frakturfragmente und der im Kallus gebildeten Knorpelmenge (Sarmiento et al., 1977), wobei hydrostatische Kompression den spezifischen Bildungsreiz für Knorpel darstellt. Die unter Belastung im Frakturspalt auftretenden dreidimensionalen Bewegungen beeinflussen den Heilungsverlauf stark (Goodship et al., 1985). Mit zunehmender interfragmentärer Belastung wird die enchondrale Ossifikation reduziert, während die Bildung von faserigem Bindegewebe zunimmt (Lacroix et al., 2002). Die einzelnen Kallusbereiche sind unterschiedlichen Belastungen und somit verschiedenen lokalen Dehnungsreizen ausgesetzt. So wird der externe Kallus deutlich weniger durch Fragmentverschiebungen beeinflusst, als der interfragmentäre Kallus (Lacroix et al., 2002), woraus eine unterschiedliche Kalluszusammensetzung der verschiedenen Bereiche resultiert. Die interfragmentäre Belastung ist definiert als das Verhältnis zwischen der relativen Fragmentverschiebung und der anfänglichen Position der Fragmente zueinander (Perren, 1979; Chao et al., 1988). Die interfragmentäre Belastung beeinflusst die Art des sich im Frakturspalt bildenden Gewebes (Chao et al., 1988). Liegt der Wert dieser Belastung zwischen 10 und 100 Prozent, so entsteht im Frakturspalt Granulationsgewebe. Faserknorpel entsteht bei interfragmentären Belastungen von 2 bis maximal 10 Prozent und erst bei geringen Belastungen bis maximal 2 Prozent bildet sich Knochengewebe (Trostle et al., 1996). Zur mechanischen Stabilisierung der Frakturzone bildet sich eine starke periostale und endostale Kallusmanschette aus (Stürmer, 1988). Die Biege- und Torsionssteifigkeit des Kallusgewebes hängt vom Kallusdurchmesser ab, dabei nimmt die Steifigkeit mit der vierten Potenz des Durchmessers zu (Perren, 1992). Der endostale Kallus überbrückt in der Markhöhle die Knochenfragmente, sein Ausmaß ist deutlich geringer als jenes des periostalen Kallus, ebenso seine Wirkung (Perren, 1992). Als letztes Verbindungsmaterial entsteht der interfragmentäre knöcherne Kallus.

Während der Kallusheilung sind zwei verschiedene Heilungsformen zu beobachten (Claes et al., 2000). Endostal, periostnah und peripher wird überwiegend die desmale Knochenbildung beobachtet, im Gegensatz dazu wird im Zentrum fast ausschließlich die enchondrale Knochenbildung vorgefunden (Claes et al., 2000). Somit tritt in Bereichen mit höheren hydrostatischen Drücken und größerer Gewebedehnung die enchondrale Knochenbildung

auf. Dahingegen führen geringe hydrostatische Drücke und kleine Gewebedehnungen zur desmalen Knochenheilung (Claes et al., 2000).

Bei großer Bewegung zwischen den Fragmenten bildet sich mehr und vorerst unruhig strukturierter Kallus, welcher noch erhebliche interfragmentäre Bewegungen unter Belastung toleriert (Claes et al., 2000). Durch Querschnittsvergrößerung und zunehmende Verknöcherung gewinnt der Kallus stetig an Steifigkeit und führt zur Reduktion der interfragmentären Bewegung (Bishop et al., 2006). Sehr große interfragmentäre Bewegungen führen häufig trotz erheblicher Kallusbildung nicht zur Fragmentüberbrückung, woraus eine hypertrophe Pseudarthrose resultieren kann (Claes et al., 2000).

## 2.7. Osteosynthese mittels Fixateur externe

Das Ziel jeder Knochenbruchbehandlung, die *restitutio ad integrum* in anatomischer und funktioneller Hinsicht, lässt sich auf konservativem Wege häufig nicht erreichen (Tscherne, 1969). Die operative Frakturbehandlung erfüllt primär die Aufgabe, die möglichen Nachteile einer konservativen Behandlung abzuwehren und eine raschere Restitution herbeizuführen (Pennig, 1990). Implantate haben zum Ziel, die Knochenfragmente in reponierter Stellung zu fixieren, so dass möglichst schnell eine volle Funktionsfähigkeit der betroffenen Gliedmaße erreicht wird (Perren, 1992).

Neue Erkenntnisse in der Knochenbruchheilung haben zu einem Umdenken in der Anwendung der Osteosynthesetechniken geführt. Während früher eine exakte anatomische Rekonstruktion und möglichst steife Fixation im Vordergrund standen, haben Erfahrungen gezeigt, dass die Vitalität der Frakturzone von wesentlich größerer Bedeutung ist (Schmickal et al., 1999). Die überbrückende Fixation der Frakturzone sowie der Verzicht auf eine zusätzliche Weichteilkompromittierung sind vorrangige Ziele der Behandlung (Schmickal et al., 1999). Diese Anforderungen erfüllt der Fixateur externe (Schmickal et al., 1999). Die Wahl des geeigneten Osteosynthesemittels wird von zahlreichen Faktoren wie der Art, dem Ausmaß und der Lokalisation des Weichteilschadens, dem Typ und der Lokalisation der Fraktur sowie von lokalen und allgemeinen Begleitverletzungen abhängig gemacht (Runkel et al., 1999). Außerdem sind biologische und biomechanische Gegebenheiten zur Erzielung eines optimalen Ergebnisses von großer Bedeutung (Pennig, 1990). Die Kunst der Knochenbruchbehandlung liegt darin, die für die jeweilige Fraktur geeignete Osteosyntheseform aus der Vielfalt der Methoden auszuwählen (Tscherne, 1969). Nur so werden die Voraussetzungen für eine schnelle und komplikationslose Heilung geschaffen.

Das **Prinzip der externen Fixation** ist die Verlegung der Frakturstabilisatoren außerhalb der Frakturregion und ihrer umgebenen Weichteile ohne deren zusätzliche Traumatisierung (Brug et al., 1991).

Es gibt drei Basistypen des Fixateur externe, den uniplanaren Standard-Fixateur, den Ring-Fixateur und den Hybrid-Fixateur, welcher eine Kombination aus beiden erstgenannten Modellen darstellt (Taljanovic et al., 2003). Der Fixateur externe ist aufgrund seiner Modulbauweise ein sehr variables System (Lewis et al., 2001). Diese modularen Systeme bestehen aus perkutanen Schanz-Schrauben oder Steinmann-Nägeln, welche transkortikal oberhalb und unterhalb der Fraktur in den Knochen implantiert werden (Taljanovic et al., 2003). Die Rohre, Stäbe und Verbindungselemente dieser Systeme bestehen aus Stahl, Aluminium oder Kohlefaser (Höntzsch, 2002). Aufgrund der Fixateurlage unterscheidet man unilaterale, bei denen die Schanz-Schrauben nur eine Hautseite durchdringen, von bilateralen Systemen, bei denen beide Hautseiten perforiert werden. Des Weiteren kann man uniplanare von biplanaren Montageformen unterscheiden (Lewis et al., 2001), bei der uniplanaren Form liegen alle Fixateurschrauben in einer Ebene der Gliedmaße, während bei der biplanaren Form die Schrauben in mehreren Ebenen liegen.

Der Fixateur externe allein kann in der Regel eine Fraktur nicht absolut stabil fixieren, daher tritt bei dieser Behandlungsform vor allem die sekundäre Frakturheilung auf (Stürmer, 1988). Diese Form der Frakturstabilisierung stellt prinzipiell die biologischste Osteosyntheseform dar (Mayr, 2002). Der Fixateur externe ist von allen Möglichkeiten, Frakturen, Pseudarthrosen, Osteotomien und Gelenke zu stabilisieren, die systemisch und lokal am wenigsten Belastende (Höntzsch, 2002). Daraus ergibt sich das weite Indikationsspektrum. Dieses minimalinvasive Verfahren ist besonders geeignet zur Behandlung von offenen und infizierten Frakturen mit ausgeprägtem Weichteilschaden (Höntzsch, 2002). Da der Fixateur externe vom verletzten und infizierten Weichteilgewebe entfernt in den Knochen implantiert wird und somit eine weitere Kontamination und Schädigung des Gewebes vermieden wird. Frakturen mit einem ausgedehnten Weichteilschaden und Deperiostierung besitzen aufgrund der zu erwartenden Durchblutungsstörung der betroffenen Knochenareale eine erhöhte Infektgefährdung. Intramedulläre Implantate können in diesen Extremsituationen die Vitalität des Knochens weiter beeinträchtigen (Schmickal et al., 1999). Durch eine externe Fixation kann die drohende Gefahr einer Osteomyelitis und daraus resultierende Lockerung des Fixateurs verringert werden. Die primäre Versorgung zweit- und drittgradig offener Frakturen mit dem Fixateur externe stellt laut Klemm und Mitarbeitern (1982) die Methode der Wahl dar, um der Entstehung einer infizierten Pseudarthrose, wie sie häufig bei Plattenosteosynthesen vorkommt, vorzubeugen. Ist es aufgrund einer Infektion zur verzögerten Frakturheilung gekommen, so stellt die Fixateur externe Osteosynthese das Mittel der Wahl zur infektionsherdfernen Frakturversorgung dar (Phieffer et al., 2006). Eine bedrohte Gefäßversorgung des Knochens, sei es durch ein Trauma oder eine Infektion, stellt laut Stürmer (1984) die klinisch wichtigste Indikation zur Montage eines Fixateur externe dar, denn die Gefäßversorgung wird durch die externe Fixation nicht weiter gestört. Der Wert der externen Fixation im Rahmen der Erstversorgung des Schwerverletzten gilt als unbestritten



(Schmickal et al., 1999). Die primäre Frakturstabilisierung beim Schwerverletzten mit einem Fixateur externe ist zeitsparend und komplikationsarm, sie stellt ein sicheres und schonendes Osteosyntheseverfahren dar (Taeger et al., 2002). Aufwendige und exakte anatomische Rekonstruktionen sind nicht Aufgabe der „first-day-surgery“ (Schmickal et al., 1999). Außerdem wird der externe Fixateur zur Ruhigstellung von Gelenken und zur Korrektur von Wachstumsstörungen eingesetzt. Wo sich aus biologischen Gegebenheiten die Implantierung von Kraftträgern verbietet, stellt der Fixateur externe das Osteosyntheseverfahren der Wahl dar (Labitzke et al., 1978).

Die Vorteile einer Fixateur externe-Osteosynthese sind also die schnelle, einfache und minimalinvasive Applikation (Runkel et al., 1999). Der Fixateur externe stellt das einzige Osteosyntheseverfahren dar, mit dem der Chirurg intra- und post operativ die Stabilität der Osteosynthese verändern kann, wie zum Beispiel bei der Dynamisierung (Claes et al., 2000). Ein weiterer Vorteil besteht darin, dass das für die Kallusbildung mitverantwortliche Frakturhämatom erhalten bleibt (Brug et al., 1991). Diese Osteosyntheseform zeigt quantitativ und qualitativ die wenigsten Komplikationen (Stürmer, 1988), jedoch gibt es auch bei diesem Verfahren Nachteile. Zum einen bietet das äußere Fixateurkonstrukt einen geringen Tragekomfort verbunden mit Bewegungseinschränkungen, zum anderen überfordert die täglich korrekt durchzuführende Pinpflege oft den Patienten (Mayr, 2002). Die am Tag der Implantierung beginnende Pinpflege besteht aus einer gründlichen Reinigung und Desinfektion der Pineintrittsstellen, nur so kann einer Pintraktinfektion vorgebeugt werden (Taljanovic et al., 2003). Solch eine Knocheninfektion über die Pineintrittsstellen (Claes, 1990) ist für den Patienten sehr schmerzhaft und oft mit weiteren langwierigen Behandlungszeiten verbunden. Es kann zu schwerwiegenden Folgen bis hin zur Amputation der betroffenen Gliedmaße kommen (Karnezis et al., 1999).

### **2.7.1. Biomechanik der Fixateur externe Osteosynthese**

Es ist bekannt, dass die mechanischen Rahmenbedingungen der Osteosynthese den Heilungsverlauf der Fraktur beeinflussen (Chao et al., 1989). Die Stabilität einer Osteosynthese wird im Wesentlichen durch die Steifigkeit des Osteosynthesematerials und die Qualität der Implantat-Knochenverbindung bestimmt (Claes et al., 2000). Somit bestimmen die Variablen Fixationssteifigkeit und Fixationstyp den klinischen Verlauf und Ausgang der Frakturheilung mit (Chao et al., 1988). Obwohl bekannt ist, dass die mechanischen Rahmenbedingungen den Heilungsausgang beeinflussen, ist nur wenig über die Rolle der mechanischen Bedingungen während des Heilungsverlaufes dokumentiert (Schell et al., 2002). In tierexperimentellen Studien an frakturierten Röhrenknochen wurde gezeigt, dass sich eine axiale Bewegung zwischen 0,2 und einem Millimeter als heilungsförderlich erweist (Goodship, 1988). Hingegen zeigen klinische Erfahrungen, dass

sich ein zu großes Ausmaß an Scherbewegungen im Frakturspalt nachteilig auf eine schnelle unkomplizierte Knochenheilung auswirkt (Yamagishi et al., 1955). Bei der Frakturversorgung mit einem Ringfixateur kommt es fortwährend zu Veränderungen der mechanischen Bedingungen (Duda et al., 2000), was für den Heilungsverlauf berücksichtigt werden muss.

Bei einer Fixateur externe Osteosynthese haben die Größe der Schrauben, ihr Abstand zueinander und zur Fraktur, sowie die Steifigkeit des Fixateurs selbst einen großen Einfluss auf die Frakturheilung (Claes, 1990). Den größten Einfluss hat jedoch der Abstand des Fixateurs von der Achse des zu stabilisierenden Knochens. Je näher der Fixateur an den zu stabilisierenden Knochen herangebracht wird, desto stabiler wird das System, da so die freie Länge für die Durchbiegung der Schrauben verringert wird (Claes et al., 2000). Die Steifigkeit des Systems kann durch Erhöhung der Anzahl der Schanz-Schrauben oder deren Durchmesser erhöht werden (Duda et al., 2000), denn dadurch werden die interfragmentären Bewegungen reduziert, was einen starken und gleichmäßigen Anstieg aller Steifigkeitskomponenten zur Folge hat (Duda et al., 2000). Zu berücksichtigen ist, dass beim Fixateur externe sämtliche mechanischen Kräfte über wenige Punkte (die Schanz-Schrauben) in den Knochen geleitet werden und dies zu Belastungsspitzen in der unmittelbaren Umgebung der Schanz-Schrauben führt, wodurch es zum Abbau der Fixateur Spannung mit anschließender Pinauslockerung kommen kann (Stürmer, 1988). Es ist bekannt, dass eine dosierte Vorspannung der Schrauben, Pins und Drähte die Haltekraft verbessert, dies kann durch axiales und seitliches Vorspannen erreicht werden (Höntzsch, 2002). Die Pin-Knochen Verbindung stellt den kritischsten Punkt bei der Fixateur externe Osteosynthese dar (Aro et al., 1993). Generell sind bilaterale Fixateur-Systeme um 50 Prozent steifer als unilaterale Fixateur-Systeme (Chao et al., 1988; Aro et al., 1993). Auch die Frakturspaltbreite hat einen großen Einfluss auf die Knochenheilung, so kann es mit zunehmender Frakturspaltbreite zur signifikanten Verzögerung der Kallusheilung kommen (Claes et al., 1997).

## **2.8. Störungen der Knochenheilung**

Wie zu Beginn erwähnt, kommt es trotz des ständigen Fortschrittes in der Unfallchirurgie und orthopädischen Chirurgie bei zehn bis zwanzig Prozent der Patienten zu Komplikationen bei der Behandlung von Frakturen (Haas, 2000). Die verzögerte oder ausbleibende Frakturheilung ist eine häufige und schwerwiegende Komplikation in der Unfallchirurgie (Zimmermann et al., 2006). Vor allem der distale Unterschenkel neigt aufgrund seiner Durchblutungssituation und seiner schlechten muskulären Deckung zu einem gestörten Verlauf der Frakturheilung (Mayr, 2002). Nonunions (Pseudarthrosen) des Tibiaschaftes sind

ein weit verbreitetes Problem in der Frakturversorgung, und sie können bei allen praktizierten Verfahren der Tibiafraktur-Versorgung auftreten (Phieffer et al., 2006).

Störungen der Knochenbruchheilung haben ihre Ursache fast immer in der traumatischen Schädigung des Knochens, des Periosts oder der Weichteile, hingegen spielen Allgemeinerkrankungen und Medikamente nur selten eine Rolle (Stürmer, 1996). Da die Heilung eines Knochenbruchs von mechanischen und biologischen Faktoren abhängt, spielen diese eine entscheidende Rolle bei auftretenden Frakturheilungsstörungen. Fehlende Gefäßversorgung und damit verbundene Knochennekrose, Instabilität zum falschen Zeitpunkt und ein mangelnder Kontakt der Knochenfragmente stellen die drei wesentlichen Ursachen der gestörten Knochenbruchheilung dar (Stürmer, 1996). Da die externe Kallusbildung von der vaskulären Versorgung, den mesenchymalen Zellen im Periost und dem umliegenden Weichteilgewebe abhängt, kann eine Zerstörung dieser Strukturen die Entwicklung des Kallusgewebes stark beeinträchtigen (McKibbin, 1978).

Auch mechanische Gegebenheiten sind mitverantwortlich für den Heilungsverlauf, Goodship und Kollegen (Kenwright et al., 1989) konnten nachweisen, dass eine minimale Beweglichkeit die Knochenheilung fördert. Andererseits kann durch eine zu starre Fixation die Knochenregeneration gestört werden (Cornell et al., 1992). Ebenso kann dies durch zu starke Beweglichkeit zwischen den Fragmenten geschehen, denn in diesem Fall werden die neu gebildeten Knochenbälkchen und Kapillaren immer wieder zerstört, wodurch zwar der Kallus wächst aber keine knöcherne Konsolidierung erreicht wird.

Die meisten Knochenbrüche sind beim Menschen in Abhängigkeit von Frakturform und lokalen Begleitverletzungen innerhalb von drei bis vier Monaten verheilt (Runkel et al., 2000). Die Bewertung einer adäquaten Heilung (Union) basiert bei Klinikern auf radiographischen und klinischen Befunden (DenBoer et al., 2002). Nach klinischen Kriterien ist eine Fraktur geheilt, wenn eine schmerzfreie Vollbelastung der betroffenen Gliedmaße möglich ist und manuell keine Bewegungen und Schmerzen im Frakturbereich ausgelöst werden können (Kenwright et al., 1991). Als radiographisches Kriterium dient die Anwesenheit eines Fragment überbrückenden Kallusgewebes in mindestens drei der vier Kortikalis-Bereiche (Krettek et al., 1991).

Ist ein Knochenbruch nach vier bis sechs Monaten nicht knöchern konsolidiert, so spricht man von einer verzögerten Frakturheilung (delayed union) (Runkel et al., 2000; Mayr, 2002). Es gibt viele verschiedenen Gründe, die zu einer verzögerten oder sogar ausbleibenden Heilung führen. Eine unzureichende Blutversorgung stellt einen der wesentlichsten Gründe da (Phieffer et al., 2006). Für eine optimale Frakturversorgung ist es daher besonders wichtig die biologischen und mechanischen Gegebenheiten kritisch zu beurteilen um ein geeignetes Osteosyntheseverfahren wählen zu können (Phieffer et al., 2006).

Bei einer verzögerten Frakturheilung auch delayed union genannt werden die Heilungsabläufe zwar fortgesetzt, eine Heilung in der erwarteten Zeit findet jedoch nicht statt

(Bishop et al., 2006). Die Heilungsabläufe verlaufen langsamer (Brighton, 1984). Eine verzögerte Frakturheilung findet sich hauptsächlich nach unzureichender Ruhigstellung der Frakturzone sowie bei fehlerhaften, instabilen Osteosynthesen. Meist sind es Scher- und Stauchungskräfte, die die Frakturheilung stören (Bishop et al., 2006). Hingegen können geringe axiale Bewegungen die Knochenregeneration stimulieren (Yamagishi et al., 1955). Je nach Dauer der Verzögerung der Knochenbruchheilung kommt es entweder zu einem verspäteten lamellenartigen Knochendurchbau oder zum völligen Ausbleiben der Frakturheilung (Phieffer et al., 2006).

Hat nach acht Monaten klinisch und radiologisch keine knöcherne Heilung stattgefunden, bezeichnet man dies als Pseudarthrose oder nonunion (Runkel et al., 2000; Mayr, 2002). Die biologischen Heilungsabläufe sind zum Stillstand gekommen, bevor eine Vereinigung der Fragmente erreicht werden konnte (Phieffer et al., 2006). Pseudarthrosen treten besonders häufig an Knochen auf, die von nur einzelnen Gefäßen versorgt werden, höhergradig offene Frakturen, speziell der Tibia, haben aufgrund ihrer vaskulären Situation ein deutlich erhöhtes Pseudarthrosenrisiko (Runkel et al., 2000).

Typische klinische Symptome einer Pseudarthrose sind abnorme Beweglichkeit verbunden mit belastungsabhängigen instabilitätsbedingten Schmerzen und Schwellung im Frakturbereich (Runkel et al., 2000). Pseudarthrosen entstehen immer dann, wenn entweder für den Parameter Stabilität oder Vitalität (bestimmt durch die Knochendurchblutung) bestimmte Grenzen überschritten werden, oder aber ein Missverhältnis beider Parameter vorliegt (Kutscha-Lissberg et al., 2003). Es ist unumstritten, dass sowohl die Stabilität der Fragmente, als auch die erhaltene Vitalität der Frakturzone zwei elementare Grundvoraussetzungen für die ungestörte Knochenbruchheilung darstellen (Kutscha-Lissberg et al., 2003). Die Häufigkeit der Pseudarthrosen hat mit zunehmender Verbreitung verschiedener Osteosynthesetechniken erheblich zugenommen (Stürmer, 1996). Technische Fehler der Osteosynthese spielen in der Pseudarthroseentstehung somit ebenfalls eine wesentliche Rolle (Stürmer, 1996). Minimalinvasive, dynamische Osteosyntheseverfahren zeigen nach offener Reposition oder Missachtung biomechanischer Gesetzmäßigkeiten hohe Versagensraten mit Folge einer ausbleibenden Heilung auf (Kutscha-Lissberg et al., 2003). Je nach Situation an der Bruchstelle bilden sich unterschiedliche Formen der Pseudarthrose aus. Pseudarthrosen werden anhand radiologischer Kriterien eingeteilt in hypertrophe und atrophe Pseudarthrosen (Schweiberer et al., 1999; Runkel et al., 2000; Mayr, 2002; Kutscha-Lissberg et al., 2003; Phieffer et al., 2006). Diese Unterscheidung ist sehr wichtig, da sie Informationen über die Ätiologie und das anschließende therapeutische Vorgehen liefert (Einhorn, 1998; Schweiberer et al., 1999). Die Kenntnis ihrer Ursache (biologisch-mechanisch, infektiös) ist der Schlüssel zu einer erfolgreichen Pseudarthrose-Behandlung (Runkel et al., 2000).

Die hypertrophe Pseudarthrose stellt die klassische Form der Pseudarthrose dar (Kutschalissberg et al., 2003). Sie ist gekennzeichnet durch einen großen periostalen Kallus mit fehlender knöcherner Überbrückung der Fragmente (Mayr, 2002). Diese biologisch reaktionsfähige Form der Heilungsstörung entsteht durch unzureichende Stabilität bei ausreichender Durchblutung (Schweiberer et al., 1999; Phieffer et al., 2006). Durch eine Verbesserung der mechanischen Rahmenbedingungen, vor allem einer Stabilitätssteigerung zum Beispiel mittels Plattenosteosynthese oder gebohrtem Marknagel lässt sich in den meisten Fällen eine knöcherne Ausheilung erzielen (Mayr, 2002).

Ist dagegen die Instabilität mit einer Durchblutungsstörung des Frakturbereiches gekoppelt, kann es zur Ausbildung einer atrophen Pseudarthrose kommen (Runkel et al., 2000). Diese biologisch inaktive Form ist durch avitales Gewebe, verbunden mit wenig Kallusvorkommen gekennzeichnet. Die Reparationsvorgänge sind bei dieser Form zum Stillstand gekommen. Die atrophen Pseudarthrosen sind prognostisch deutlich ungünstiger zu beurteilen (Kutschalissberg et al., 2003). Die Therapie zielt auf eine Verbesserung der Biologie aus. Einerseits muss die Stabilität deutlich erhöht werden, andererseits muss die Stimulation der Kallusbildung durch Dekortikation und Spongiosaplastik erfolgen (Mayr, 2002). Nekrotische Knochenareale müssen entfernt werden, da es sonst nicht zur Heilung kommen kann (Mayr, 2002).

### **3. Material und Methoden**

Für die praktische Durchführung dieser Frakturheilungsstudie wurde ein etabliertes und standardisiertes Schafmodell gewählt. Die Genehmigung zur Durchführung des Tierversuchvorhabens wurde durch das Landesamt für Arbeitsschutz, Gesundheitsschutz und technische Sicherheit Berlin erteilt (Genehmigungsnummer 0172/04).

Die Untersuchung der biologischen Prozesse der Frakturheilung zu ausgewählten Zeitpunkten erfordert eine physiologische Belastung des Frakturbereiches über den von uns beobachteten Heilungszeitraum von neun Wochen.

#### **3.1. Versuchsaufbau**

In diesem Tierversuchsprojekt wurden 32 Schafe verwendet, von denen jeweils acht Tiere randomisiert in vier Gruppen eingeteilt wurden. Diese vier Gruppen unterschieden sich in der Länge ihrer Standzeiten von zwei, drei, sechs und neun Wochen nach der durchgeführten Osteotomie und Versorgung mit einem speziellen kritisch scherweichen Fixateur externe.

#### **3.2. Tierhaltung**

Für das Versuchsvorhaben wurden ausschließlich weibliche Merinomix-Schafe mit einem durchschnittlichen Alter von zwei bis drei Jahren und einem mittleren Körpergewicht von 75 ( $\pm 7$ ) Kg verwendet.

Vor der Unterbringung in den Stallungen der Forschungseinrichtungen für experimentelle Medizin der Charité, Campus Virchow-Klinikum wurden die Tiere einer tierärztlichen Allgemeinuntersuchung unterzogen. Bei dieser Untersuchung wurde das Gewicht der Tiere registriert.

Nach der Feststellung eines guten Gesundheitszustandes und Nichtträchtigkeit wurden die Tiere mit einer Ohrmarke gekennzeichnet und durch die subkutane Applikation von 1,5 ml Ivermectin (Ivomec®, Biokema SA, Crissier, Schweiz) pro 50 Kg KGW prophylaktisch entwurmt. Um eine eventuell nicht erkannte Frühträchtigkeit abubrechen, erhielten die Tiere intramuskulär 0,5 ml Luprostiol (Pronolen®, Intervet Deutschland GmbH, Unterschleißheim, Deutschland) verabreicht. Anschließend erfolgte die Unterbringung in Gruppenhaltung, wobei jedem Tier mindestens 1,5 m<sup>2</sup> Platz zur Verfügung standen.

Die Tiere wurden während des gesamten Versuchzeitraumes auf Einstreu und Stroh gehalten, welches regelmäßig erneuert wurde. Eine gleichmäßige Raumtemperatur mit regelmäßiger Belüftung war durch eine Klimaanlage gewährleistet. Die Stallungen wurden durch Tageslicht belichtet. Wasser stand den Tieren über eine Selbsttränke, welche täglich

gereinigt und kontrolliert wurde, ad libitum zur Verfügung. Die Fütterung mit Heu als Grundfutter erfolgte zweimal täglich ebenfalls ad libitum. Zusätzlich bekamen die Tiere während des Lauftrainings und nach der Operation während der Ganganalyse Kraftfutter verabreicht.

### 3.3. Fixateur externe

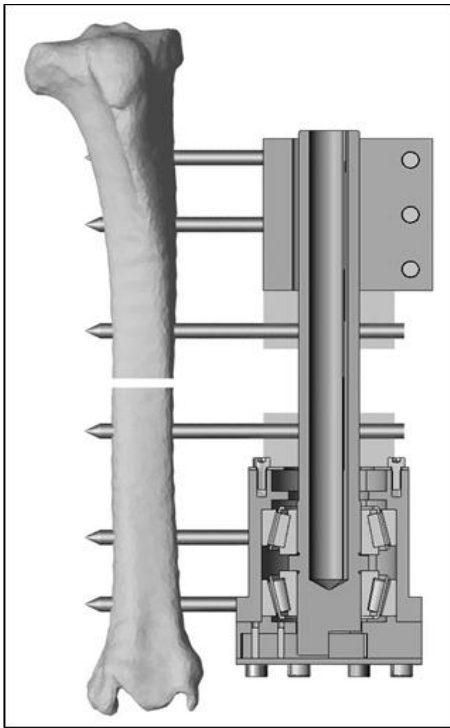
Bei allen 32 Versuchstieren wurde ein einheitlicher Fixateur externe (siehe Abb. 3.3.-1.) medial an der rechten Tibia montiert. Dieser kritisch scherweiche Fixateur externe wurde zuvor von Ingenieuren speziell für dieses Projekt entwickelt.

Der kritisch scherweiche Fixateur (Abb. 3.3.-1) stellt einen Rotations-Fixateur dar, welcher technisch gesehen einem monolateralen Fixateur externe entspricht. Der Fixateur besteht aus einer besonders biegesteifen Fixationsstange, die das untere Gehäuse, einschließlich des Gehäusedeckels, mit der oberen Klemme verbindet. Diese obere Klemme sitzt fest auf der Fixateurstange und ermöglicht über das Klemmsystem die axiale Einstellung des entsprechenden Frakturspaltes von 3 mm. Das untere Gehäuse beinhaltet zwei übereinander liegende Kegelrollenlager, welche die axialen Kräfte aufnehmen und eine leichtgängige Rotation ermöglichen. Die Rotationsbewegung ist komplett freigegeben und nur durch Muskel- und Weichteilzug des Tieres selbst begrenzt.

Die obere Klemme und das Gehäuse bestehen aus einer leichten, hochfesten Aluminiumlegierung, welche zum Oberflächenschutz eloxiert wurde. Die Fixationsstange, sowie die Klemmbacken bestehen aus einem besonders biegesteifen Material.

Das Fixateurkonstrukt wurde mittels sechs den Knochen bikortikal perforierenden Schanz-Schrauben medial an der Tibia montiert. Die Schanz-Schrauben, mit einem Durchmesser von 5 mm, wurden proximal beginnend von eins bis sechs durchnummeriert. Ihre jeweilige Position wurde über eine einheitliche Bohrschablone, welche medial an der Tibia am Malleolus medialis angelegt wurde, definiert. Die Schablone wurde so gelagert, dass alle sechs Schanz-Schrauben mittig in den Knochen gesetzt werden konnten. Die standardisierte Osteotomie wurde nach Fixateurmontage unter Kühlung mittels steriler Kochsalzlösung in der Mitte zwischen den Schanz-Schrauben drei und vier gesetzt.

Bei den Versuchstieren mit einer Standzeit von neun Wochen wurden zusätzlich zwei Schanz-Schrauben ( $\varnothing$  4 mm), welche nicht mit dem Fixateurkonstrukt verbunden waren, kranial in die Tibia eingebracht, sie dienten der optischen Messung der Fragmentbewegungen.



**Abb. 3.3.-1:**

Graphische Darstellung der rechten Tibia mit einem medial montiertem kritisch scherweichen Fixateur externe. Monolaterale Fixation des Fixateurs mittels sechs den Knochen perforierender Schanz-Schrauben. Mittig im Knochen zwischen den Schanz-Schrauben drei und vier ist der Osteotomiespalt dargestellt. Der Fixateur externe ist längs eröffnet, dadurch ist die innere Mechanik im unteren Teil sichtbar.

### **Biomechanik**

Mit Hilfe einer Materialprüfmaschine (Zwick 1455, Zwick GmbH, Ulm, Deutschland) wurde die initiale Steifigkeit des Osteosyntheseverbundes ermittelt. Die Messungen erfolgten an ovinen Kadavertibiae, an welche zuvor der Fixateur externe montiert wurde.

### **3.4. Operationsvorbereitung**

Die Tiere wurden zwölf Stunden vor der Operation nüchtern gehalten, Wasser stand ihnen ad libitum über eine Selbsttränke zur Verfügung.

Zur Vorbereitung der Narkose mittels intravenöser Injektion wurde ein Venenverweilkatheter in die Vena cephalica antebrachii gelegt und seine Durchgängigkeit mit Natriumchloridlösung getestet. Anschließend erhielten die Tiere über den Katheter 0,5 g Thiopental-Natrium (Trapanal®, Altana Pharma Deutschland GmbH, Konstanz, Deutschland) pro 50 kg KGW infundiert. Zur Überwachung der Narkosetiefe wurden während der gesamten Vorbereitungszeit die Vitalparameter und die Reflexe der Tiere überprüft. Im Anschluss an die Sedation wurden die Tiere mit Hilfe eines Laryngoskopes mit einem Trachealtubus der Größe 9,0 intubiert. Nachdem der Cuff des Tubus geblockt war, wurden die Tiere an das Narkosegerät mit Monitorüberwachung angeschlossen und mit einem Gemisch aus Isofluran, Lachgas und Sauerstoff beatmet.

Die Beatmungsfrequenz betrug zwölf Atemzüge pro Minute. Das Atemzugvolumen betrug etwa 10ml/kg KGW, so dass sich ein expiratorischer CO<sub>2</sub>-Partialdruck von 35-40 mm Hg



einstellte. Damit während der Operation das Entweichen von Pansengasen gewährleistet war, erhielten die Tiere eine Magen-Schlundsonde.

Einem Austrocknen der Kornea wurde durch Eingabe von Bepanthen-Augensalbe (Jenapharm®, Jenapharm GmbH & Co. KG, Jena, Deutschland) in beide Augen der Tiere vorgebeugt. Die Tiere wurden auf dem Operationstisch in rechter Seitenlage fixiert, wobei das linke Hinterbein nach vorn über den Rücken ausgebunden wurde. Das zu operierende rechte Hinterbein lag gestreckt dem Tisch auf. Anschließend wurde das rechte Hinterbein medial im Bereich vom Knie bis zum Fesselgelenk freigeschoren und mit Enthaarungscreme enthaart. An beiden Vorderbeinen, sowie am linken Hinterbein, wurden zur EKG-Überwachung während der Operation Klebelektroden angebracht. Zur weiteren Überwachung der Vitalparameter erfolgte die Sauerstoffpartialdruckmessung und ein Kapnograph wurde angeschlossen.

Das zu operierende rechte Hinterbein wurde anschließend mit einer Povidon- Jod- Lösung (Braunol®, B. Braun Melsungen AG, Deutschland) desinfiziert und unter sterilen Kautelen abgedeckt. Nachdem die Tiere steril vorbereitet waren, erfolgte präoperativ eine prophylaktische Antibiose durch intravenöse Infusion mit 2,2g Amoxicillin/ Clavulansäure (Augmentan®, 2,2g GlaxoSmithKline GmbH & Co. KG München, Deutschland), welches zuvor in 100ml Aqua destillata gelöst wurde. Zur Analgesie erhielten die Tiere bei Operationsbeginn 5ml Fentanyl Dihydrogencitrat (Fentanyl- Janssen® 0,5mg, Janssen- Cilag GmbH, Neuss, Deutschland) intravenös verabreicht. Perioperativ erhielten die Tiere 500ml Vollelektrolytlösung intravenös infundiert.

### 3.5. Operation

Der Zugang zur rechten Tibia erfolgte von medial über das Planum cutaneum cruris, denn hier konnte der Weichteilschaden so gering wie möglich gehalten werden, da sich in diesem Bereich keine Muskulatur befindet.

Die spezielle Schablone (siehe Abb. 3.5-1.) zur Fixateurmontage wurde jeweils am Malleolus medialis der rechten Tibia angelegt und so gelagert, dass alle sechs Bohrlöcher möglichst mittig in den Knochen gesetzt werden konnten. Die dafür notwendigen Markierungen wurden mittels Hautinzision durch die Schablone hindurch gesetzt. Bei der Ausrichtung der Schablone wurde die individuelle Tibiakrümmung berücksichtigt. Die Bohrhülse wurde durch die Schablone und Hautinzisionen hindurch eng auf das Periost aufgesetzt und die Vorbohrung für die Schanzschrauben unter gleichmäßiger Spülung mit 0,9%iger Natriumchlorid-Lösung durchgeführt. Unter Hautschutz durch die Bohrhülse hindurch erfolgte anschließend die manuelle, bikortikale Eindrehung der sechs Schanzschrauben unter Verwendung eines Universalhandbohrfutters. Die Operationsassistenz achtete dabei auf

eine parallele Stellung der sechs Schanzschrauben zueinander. Die Schanzschrauben wurden von proximal nach distal mit eins bis sechs durchnummeriert.

Nach der Entfernung der Bohrhülsen und der Schablone wurde der kritische Fixateur externe auf die Schanzschrauben aufgesetzt und im definierten Hautabstand von zwei Zentimetern montiert. Durch eine weitere Schablone wurde der Bereich bestimmt, an dem die Osteotomie gesetzt wurde.

Die Sägeschablone wurde an die beiden mittleren Schanzschrauben drei und vier angelegt und ein etwa drei cm langer Hautschnitt gesetzt. Nach Entfernung der Schablone wurde im vorher gesetzten Hautschnitt mit einer Metzenbaumschere stumpf in die Tiefe präpariert, so wurden Bindegewebe und die Tibia umgebene Muskelfaszien gelöst. Durch das Einbringen zweier Großzehenheber nach Hohmann und Umfahrung der Tibia konnte das umliegende Weichteilgewebe beim Durchsägen der Tibia geschützt werden. Danach wurde mittels einer oszillierenden, Druckluft betriebenen Säge unter gleichmäßiger Kühlung mit 0,9%iger Natriumchlorid-Lösung die Osteotomie gesetzt.

Nach der vollständigen Durchtrennung des Knochens wurden die oberen Klemmbacken des Fixateur externe gelöst und der Frakturspalt über einen Abstandhalter auf 3mm Breite eingestellt, anschließend wurden die Fixateurschrauben fest angezogen und der Abstandhalter entfernt (siehe Abb. 3.5.-2. und Abb. 3.5-3.). Zum Abschluss der Operation erfolgte die Hautnaht mittels Einzelheften.

Der operierte Unterschenkel wurde mit zwei Mullbinden steril verbunden. Beim Ausleiten der Narkose wurde mit dem Wiedereinsetzen der Spontanatmung die Magenschlundsonde gezogen und mit dem Einsetzen des Schluckreflexes der Trachealtubus entfernt. Die anschließende Unterbringung erfolgte im Stall, wo die Tiere während der Aufwachphase beobachtet wurden.

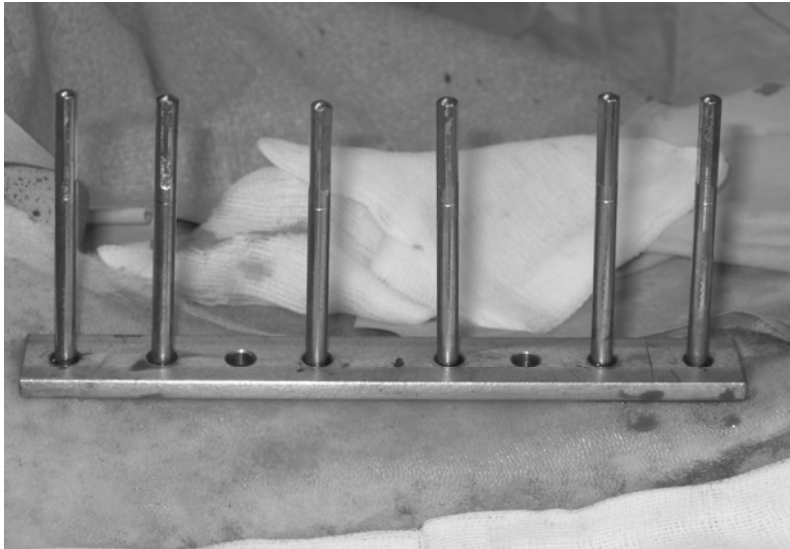


Abb.3.5.-1.:

Mediale Ansicht der Tibia mit aufgesetzter Bohrschablone und sechs in den Knochen eingedrehte Schanz-Schrauben.

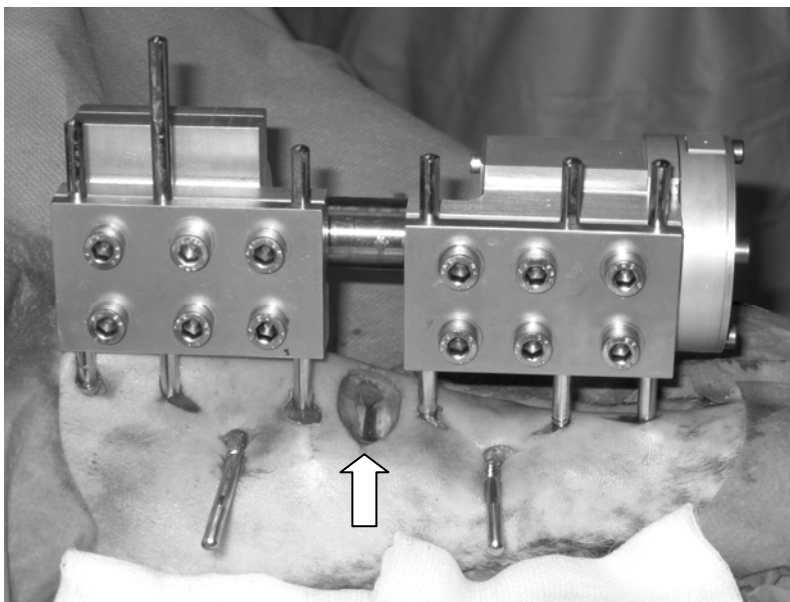


Abb.3.5.-2.:

Kraniale Ansicht des montierten kritisch scherweichen Fixateurs. Mittig zwischen Schanz-Schraube drei und vier ist der Osteotomiespalt von drei mm sichtbar (siehe Pfeil).

Für die optische Messung befinden sich zwei zusätzliche Schanz-Schrauben im 90° Winkel zum Fixateurkonstrukt.

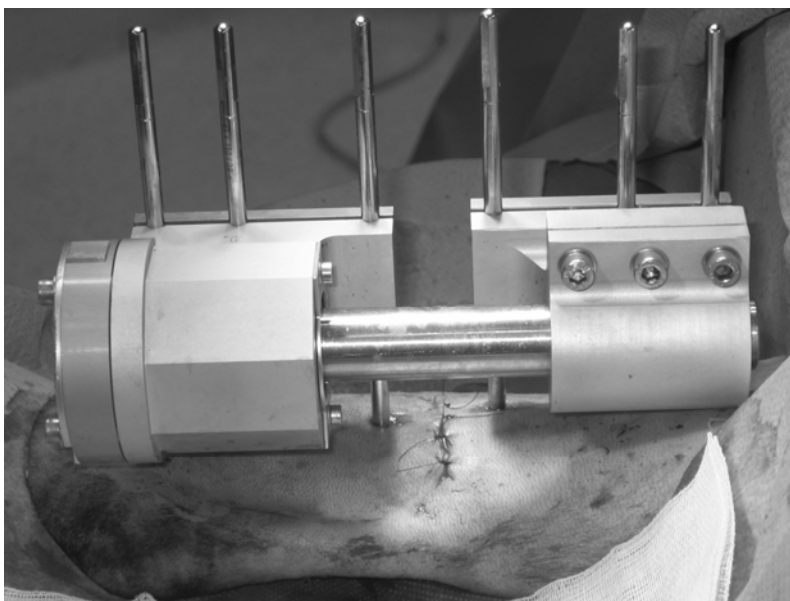


Abb.3.5.-3.:

Kaudale Ansicht des medial fertig montierten kritisch scherweichen Fixateurs. Die Hautnaht erfolgte mittels Einzelheften.

### 3.6. Nachbetreuung der Tiere

Im Anschluss an die Operation wurde noch am narkotisierten Tier ein postoperatives Kontrollröntgenbild im anterioposterioren Strahlengang mit 73KV und 2,5mA angefertigt (siehe Abb. 3.6-1.). Dabei wurden die Osteotomiespaltweite und die Positionen und Eindrehtiefen der sechs Schanzschrauben beurteilt. Außerdem wurde auf eventuelle Knochenabsplitterungen geachtet. Um den Heilungsverlauf zu überwachen, wurden im wöchentlichen Abstand weitere Röntgenbilder angefertigt. Die letzten Aufnahmen erfolgten post mortem mit und ohne Fixateurkonstrukt und nach der biomechanischen Testung.

Die Tiere erhielten über einen Zeitraum von fünf Tagen zur Schmerzprophylaxe 2ml Flunixin-Meglumin (Finadyne®, RP, Essex Pharma GmbH, München, Deutschland) subcutan verabreicht.

Während des gesamten Versuchszeitraumes wurden die Tiere in Gruppen von zwei bis maximal zehn Tieren gehalten. Im Anschluss an die Operation stand den Tieren Heu und Wasser ad libitum zur Verfügung.

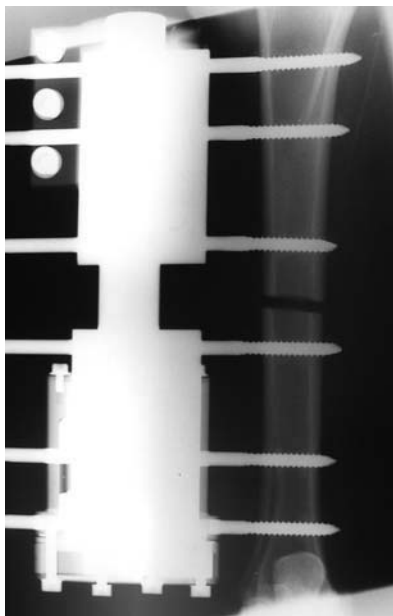


Abb. 3.6-1.:

Röntgenbild post operationem im anterioposterioren Strahlengang, Fixateure externe und sechs in den Knochen eingedrehte Schanzschrauben sichtbar, zwischen Schraube drei und vier ist der Osteotomiespalt als durchgehende schwarze breite Linie zu erkennen.

#### 3.6.1. Pinpflege

Über den gesamten Beobachtungszeitraum wurde bei jedem Tier eine tägliche Pinpflege durchgeführt, beginnend einen Tag post operationem. Dabei wurden der klinische Allgemeinzustand des Tieres, wie Futteraufnahme, Verhalten (Schmerzaüßerungen, Teilnahmslosigkeit), Fortbewegung (Bewegungsunlust, Grad der Lahmheit, Stellung der operierten Gliedmaße) und die Wunde selbst beurteilt.

Nach Abnahme des Verbandes erfolgte ein vorsichtiges Entfernen eventuell gebildeter Krusten an den Pineintrittsstellen, danach wurde die Haut um die Eintrittsstellen herum mittels einer 20ml Spritze und einer sterilen Knopfkanüle mit einer 5%igen Ethacridinlactat-Lösung (Rivanol®, Riedel- de Haen AG, Seelze, Deutschland) gereinigt, um einer Wundinfektion vorzubeugen. Des Weiteren wurden die Schanzschrauben auf Lockerungserscheinungen hin untersucht. Die verwendeten Knopfkanülen wurden nach jedem Tier gewechselt, täglich gereinigt und desinfiziert. Abschließend wurde die Wunde wieder steril verbunden.

Die täglichen Beobachtungen wurden in einem Pinpflegeprotokoll dokumentiert. Zur Erleichterung der Protokollierung wurde ein einheitliches Schema zur Beobachtungsdokumentation gewählt, das im Folgenden erläutert wird.

### 3.6.2. Pinpflegescore

- 0 bedeutet: es gibt keine Entzündungserscheinungen, Pineintrittsstellen sind sauber und trocken
- 1 bedeutet: es gibt leichte Entzündungserscheinungen, Pineintrittsstelle vermehrt warm oder schmerzhaft, wenig seröses Sekret
- 2 bedeutet: es gibt mäßige Entzündungserscheinungen, Pineintrittsstelle vermehrt warm und schmerzhaft, mäßig bis viel seröses Exsudat oder wenig eitriges Exsudat
- 3 bedeutet: starke Entzündungserscheinungen, Pineintrittsstelle vermehrt warm und schmerzhaft, gerötet, mäßig bis viel eitriges Exsudat

Andere wichtige Beobachtungen wie beispielsweise Auslockerungen, Blutungen, Verbiegungen von Pins, Verlauf der Wundheilung, Fäden ziehen wurden individuell für jedes Tier in einer extra Spalte unter Bemerkungen protokolliert.

## 3.7. Probengewinnung

### 3.7.1. Tötung der Tiere

Die 32 Versuchstiere wurden nach ihren jeweiligen Standzeiten von zwei, drei, sechs und neun Wochen euthanasiert. Sie erhielten 2,5g Thiopental- Natrium (Trapanal®, 2,5 g, Altana, Pharma Deutschland GmbH, Konstanz, Deutschland) intravenös zur Narkotisierung und anschließend zur Euthanasie 100ml 7,5%ige Kaliumchloridlösung infundiert. Mittels Auskultation wurde der Tod durch Herzstillstand festgestellt. Nach der Euthanasie wurden vor Entnahme der Proben die letzten Röntgenbilder in zwei Ebenen angefertigt.

Im Sektionsraum erfolgte anschließend bei jedem Tier die Entnahme der operierten, sowie der nicht operierten Hintergliedmaße. Nach Entfernung der Haut wurde das Bein im Kniegelenk abgesetzt, das Tarsokruralgelenk durchtrennt und im Anschluss die Muskelbäuche entfernt, so dass an der Tibia nur ein kleiner Weichteilmantel als Schutz verblieb. Danach wurde vorsichtig das Fixateurkonstrukt gelöst und entfernt. Die Knochen der Tiere mit einer Standzeit von sechs und neun Wochen wurden anschließend biomechanisch getestet (siehe unter 3.7.2.). Anschließend kamen alle Präparate einschließlich der biomechanisch getesteten nach sauberer Freipräparation der Gelenkflächen für 24 Stunden in eine 10prozentige Formalinlösung, was zur Aushärtung des Weichteilmantels und somit zu einer deutlich verbesserten Sägeeigenschaft des Materials führte.

### **3.7.2. Biomechanische Testung**

Anhand der biomechanischen Untersuchung wurden die Torsionssteifigkeit und das Torsionsmoment des getesteten Knochens bestimmt. Diese Testung erfolgte bei den Tieren mit einer Standzeit von sechs und neun Wochen. Es konnten aus beiden Gruppen jeweils nur vier Knochenpräparate getestet werden, da die restlichen vier Knochen nach Entfernung des Fixateurkonstrukts zu instabil waren. Von den acht testungsfähigen Präparaten wurde jeweils die operierte und kontralaterale intakte Tibia untersucht.

Es wurde ein Torsionstest bis zum Versagen durchgeführt. Zuvor wurde am proximalen und distalen Ende jeder Tibia das Weichteilgewebe entfernt, um anschließend die beiden freipräparierten Knochenenden in viereckige Beracrylblöcke (Beracryl, W. Troller, AG, Fülenbach, Schweiz) einzubetten. Bei allen Tibiae war das beracrylfreie Knochenstück gleich lang und entsprach der Fixateurlänge. Diese Vorbereitung war nötig, um die Tibiae in die Materialprüfmaschine (Universalprüfmaschine Zwick 1455, Ulm, Deutschland) einspannen zu können (siehe Abb. 3.7.2.-1). Der verbliebene passive Weichteilmantel erhöht, verglichen mit einem freipräparierten Knochen, die Steifigkeit um 20 Prozent (Duda et al., 2000). Zum Schutz vor Austrocknung wurden die Tibiae mit feuchten Kompressen umwickelt.

Anschließend erfolgte der Torsionstest, bei dem eine axiale Vorkraft von 25N aufgebracht wurde, um im Fall einer Fraktur eine Dislokation der einzelnen Fragmente zu vermeiden und die Kontinuität der Achse zu gewährleisten. Die Tibiae wurden mit einer Testgeschwindigkeit von 10°/min der Torsionsmessung unterzogen, welche bis zum Bruch durchgeführt wurde. Die Maschine misst direkt das Drehmoment (Torsionsmoment) in Newtonmeter [Nm] und den Torsionswinkel in Winkelgrad [°]. Es wurde online eine Belastungs-Deformationskurve aufgezeichnet, in der sich der Bruch des Knochens als erster Abfall darstellte. Die Steigung dieser Kurve dient im linearen Bereich als Maß der Torsionssteifigkeit (Kallussteifigkeit) [Nm/°]. Die Steifigkeit stellt den Quotienten aus der Belastung des Knochens und seiner

Verformung dar. Die Ergebnisse der operierten Tibia wurden im Anschluss auf die Werte der intakten Tibia des jeweiligen Tieres bezogen und als prozentualer Anteil dargestellt, um so individuelle tierspezifische Unterschiede wie zum Beispiel das Körpergewicht und die sich daraus ergebende unterschiedliche Knochengröße und -festigkeit auszuschließen. Nach abgeschlossener biomechanischer Testung wurden Röntgenaufnahmen angefertigt, um den Bereich, in dem es zur Fraktur kam, zu bestimmen.



Abb.3.7.2-1.:

Materialprüfmaschine Zwick 1455 mit eingespannter Tibia (mit Mullbinden umwickelt), welche oben und unten jeweils durch die Beracrylblöcke fest mit der Prüfmaschine verbunden ist.

### 3.7.3. Radiologische Auswertung der Biomechanik

Die biomechanische Untersuchung der Tibiae wurde im Anschluss radiologisch ausgewertet. Die bei der Testung entstandene Fraktur wurde im Röntgenbild aufgesucht und nach der **Frakturklassifikation von White und Mitarbeitern (1977)** eingeteilt und beurteilt. Dabei konnten Rückschlüsse auf das Heilungsstadium gemacht werden. White und Mitarbeiter teilten die Frakturheilung, nach der Reaktion auf die biomechanische Torsionstestung, in **vier biomechanische Stadien** ein.

### Erstes Stadium

- der Knochen bricht im ursprünglichen Defektbereich bei geringer Steifigkeit (weniger stabil als ursprünglicher Knochen)

### Zweites Stadium

- der Knochen bricht im ursprünglichen Defektbereich bei hoher Steifigkeit (weniger stabil als ursprünglicher Knochen)

### Drittes Stadium

- der Knochen bricht teilweise im ursprünglichen Defektbereich, teilweise im intakten Knochen bei hoher Steifigkeit (genauso stabil wie ursprünglicher Knochen)

### Viertes Stadium

- der Knochen bricht im intakten Knochen bei hoher Steifigkeit (stabiler als ursprünglicher Knochen)

### **3.7.4.Sägen der Knochenproben**

Die für die histologischen und histomorphometrischen Untersuchungen benötigten Knochenscheiben wurden mittels einer Bandsäge von 1mm Dicke (Makro-Trennschleifsystems Firma Exakt Apparatebau GmbH, Norderstedt, Deutschland) aus den osteotomierten rechten Tibiae gewonnen. Um eine thermische Schädigung der Knochenproben zu verhindern, erfolgten die Sägearbeiten unter kontinuierlicher Wasserkühlung. Zuerst wurden die Tibiae so eingespannt, dass der Knochen transversal in Höhe des dritten Pinkanals durchgesägt werden konnte. Anschließend wurde der proximale Knochenanteil verworfen und der distale Knochenanteil mit enthaltenem Osteotomiebereich so eingespannt, dass mit der Bandsäge mittig beginnend fünf Längsschnitte gemacht wurden. Der erste Schnitt befand sich median im Knochen, die anderen jeweils zwei rechts und zwei links paramedian immer im Abstand von 3mm. Anschließend wurden die gesägten Tibiabereiche auf Höhe des vierten Pinkanals transversal abgesetzt. Die beiden äußeren Knochenrandbereiche wurden verworfen. Die vier jeweils 3mm dicken Knochenscheiben wurden von S1 bis S4 durchnummeriert (siehe Abb. 3.3.7-1).

Um eine spätere Lokalisationszuordnung vornehmen zu können, wurden die Knochenscheiben außerdem proximomedial mit einem Bleistiftpunkt gekennzeichnet. Diese gekennzeichneten Seiten stellten die späteren Anschnittflächen für die Gewinnung der histologischen Präparate dar. Die Scheiben S1 und S3 wurden für die histologische und die



Scheiben S2 und S4 für die immunhistochemische Untersuchung verwendet, welche von einem Mitdoktoranden durchgeführt wurde.

Alle Knochenscheiben wurden im Anschluss an das Sägen einzeln in Kompressen gewickelt, mit der jeweiligen Tier-, sowie Schnittnummer (S1-S4) gekennzeichnet und für 48 Stunden in eine 10%ige Formalinlösung gegeben. Während dieser Nachfixierung standen die Proben auf einem Laborschüttler (HS 501 digital, IKA® Werke GmbH & Co KG, Staufen, Deutschland), um eine gleichmäßige Durchtränkung des Gewebes zu gewährleisten.

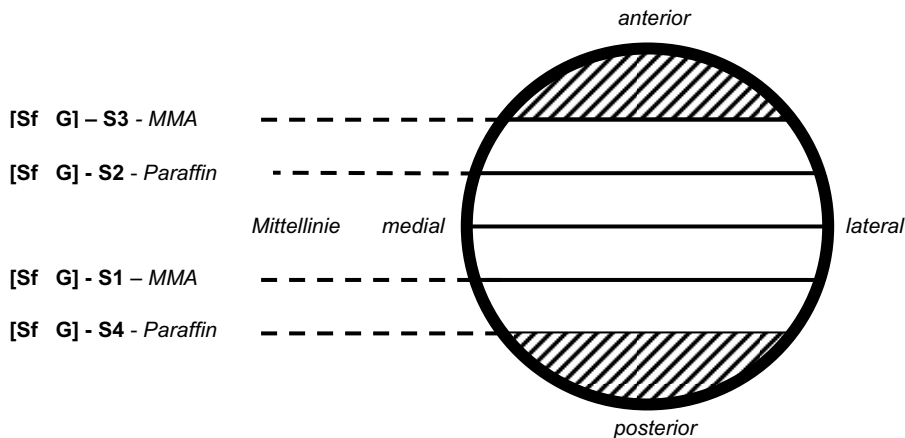


Abb. 3.3.7-1.:  
Sägeschema der Knochenproben. Die Knochenscheiben S1 und S3 wurden für die histologische Auswertung verwendet.

### 3.8. Präparataufbereitung

Nach der zweitägigen Formalinfixierung wurden die Knochenscheiben (siehe Abb. 3.8-1.) unter fließendem Leitungswasser für 30 min gewässert. Die für die histologische Untersuchung vorgesehenen Scheiben S1 und S3 wurden im Anschluss in aufsteigender Alkoholreihe nach folgendem Schema entwässert.

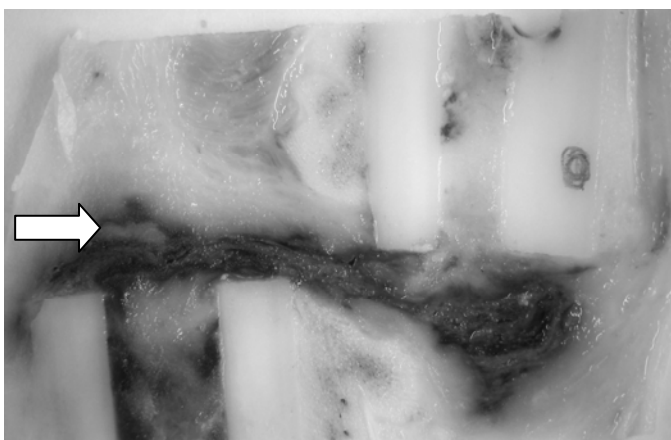


Abb. 3.8-1.:  
Knochenscheibe nach dem Sägen, Bleistiftmarkierung proximomedial auf der Kortikalis der Tibia, zwischen den stark verschobenen Knochenfragmenten sind deutliche Hämatomstrukturen sichtbar (siehe Pfeil) zum drei Wochenzeitpunkt.

### **3.8.1. Entwässerungsschema**

- 1 x 3 Tage in 70%igen Alkohol
- 2 x 7 Tage in 80%igen Alkohol
- 2 x 7 Tage in 96%igen Alkohol
- 3 x 7 Tage in 100%igen Alkohol

Um eine optimale Infiltration der Knochenscheiben mit dem jeweiligen Alkohol zu erzielen, standen die Proben während der gesamten Entwässerung weiterhin auf einem Laborschüttler (HS 501 digital, IKA Labortechnik).

### **3.8.2. Kunststoffeinbettung**

Nach der mehrwöchigen Entwässerung wurde eine vierstündige Entfettung in Xylol (Mallinckrodt Baker, Griesheim, Deutschland) durchgeführt. Anschließend erfolgte als Vorbereitung auf die Kunststoffeinbettung eine siebentägige Präinfiltration und abschließend eine siebentägige Infiltration, welche bei Kühlung auf 4 °C erfolgte. Bis zur Infiltration standen die Präparate in Gläsern auf einem Laborschüttler (HS 501 digital, IKA Labortechnik) um eine gleichmäßige Durchtränkung der Gewebe mit der jeweiligen Lösung zu erzielen. Die Prä- und Infiltrationslösungen wurden laut Herstellerangaben zubereitet, beide Lösungen enthielten bereits in verschiedenen Anteilen das Einbettmedium Technovit® 9100 NEU (Heraus Kulzer GmbH & Co KG, Wehrheim/Ts., Deutschland).

Technovit® 9100 NEU ist ein spezielles Medium zur Einbettung von mineralisierten Geweben, es stellt ein Polymerisationssystem auf der Basis von Methylmethacrylat dar. Die chemische Polymerisation erfolgt unter Sauerstoffausschluss mit Hilfe eines Katalysatorensystems aus Peroxid und Amin. Im Anschluss an die siebentägige Infiltration erfolgte die eigentliche Einbettung der Präparate in Methylmethacrylat (Technovit 9100 NEU). Dafür wurden eine Stammlösung A und eine Stammlösung B nach den jeweiligen Herstellerangaben angefertigt und die Einbettlösungen im Verhältnis 9:1 gemischt. Jede Knochenscheibe wurde einzeln, mit der späteren Anschnittfläche nach unten zeigend, in eine runde, zur Einbettung vorgesehene Kunststoffform gegeben. In diese Form wurde zuvor Einbettlösung gefüllt, anschließend luftdicht verschlossen und bei 4 °C gelagert, um ein Entweichen der Polymerisationswärme zu gewährleisten.

Nach 24 Stunden war die Polymerisation abgeschlossen und die Präparate ausgehärtet, so dass sie aus der Kunststoffform herausgelöst werden konnten. Zur besseren Einspannfähigkeit in das Hartschnittmikrotom wurde an der Unterseite der Präparatblöcke ein weiterer schnellhärtender, kaltpolymerisierender Kunststoff Technovit® 3040 (Heraeus Kulzer GmbH & CO. KG, Wehrheim/Ts., Deutschland) angebracht.

Die runden Präparatblöcke wurden an einer Handschleifmaschine Phoenix 3000 (Jean Wirtz GmbH & Co. KG, Wehrheim/Ts., Deutschland) angeschliffen. Durch das Anschleifen war es möglich, die Blöcke in der Haltevorrichtung am Hartschnittmikrotom einzuspannen, ohne dass diese beim anschließenden Schneidevorgang verrutschen konnten.

### **3.8.3. Schneiden am Mikrotom**

Die durchgeführte Kunststoffeinfettung bietet die Möglichkeit, nichtentkalktes Gewebe am Mikrotom zu schneiden, so dass anschließend anhand von verschiedenen Färbungen die Differenzierung von mineralisiertem und nicht mineralisiertem Gewebe möglich ist.

Nach Einspannen des Kunststoffblockes und Einstellung der Schnittdicke wurden am Hartschnittmikrotom (Leica® SM 2500S, Leica Microsystems Nussloch GmbH, Nussloch, Deutschland) von jedem Präparatblock mehrere Schnitte von jeweils 6µm Dicke angefertigt, von denen später die Besten für die Färbungen verwendet wurden. Während des gesamten Schneidevorganges wurden die Präparatblöcke und das Messer mit einer Schneideflüssigkeit benetzt, um die Oberfläche geschmeidig zu halten und ein Reißen der Schnitte zu verhindern. Diese Schneideflüssigkeit bestand aus einem Wasser- Seifen-Gemisch.

Die gewonnenen Schnitte wurden einzeln auf zuvor beschriftete und mit 70%igem Alkohol befeuchtete Objektträger aufgebracht und anschließend mit einer Streckflüssigkeit (bestehend aus 70 ml 70%igem Ethanol und 30ml 2-Butoxyethyl-Acetat) beträufelt, um eine Glättung der Schnitte zu erzielen. Dann wurde jeder Objektträger mit Krisolfolie (Kettenbach GmbH & Co. KG, Eschenburg, Deutschland) abgedeckt und mittels eines Pinsels wurden teilweise vorhandene Luftblasen und leichte Faltenbildung vorsichtig herausgestrichen, abschließend wurde ein zurechtgeschnittenes Filterpapier aufgelegt. Die Objektträger wurden in einer Presse übereinander gestapelt und bei 60 °C für mindestens 24 Stunden im Brutschrank getrocknet. Durch den gleichmäßigen Druck der Presse auf die einzelnen Präparate konnte ein Abrutschen der dünnen Knochenscheiben vom Objektträger beim anschließenden Färbeprozess verhindert werden.

### **3.9. Histologische Färbungen**

Als histologische Färbung bezeichnet man die Art der Schnittfärbung, bei der ein Farbstoff, der in Lösung angeboten wird, an definierte Gewebestrukturen bindet, wodurch eine Kontrastierung von Zell- und Gewebestrukturen erreicht wird.

Die Färbetheorie der biologischen Färbungen begründet sich in der unterschiedlichen Affinität bestimmter Gewebestrukturen zu bestimmten Farbstoffen, es kommt zur

differenzierten Anfärbung unterschiedlicher Gewebe- und Zellbestandteile. Dabei stellt die Ionenbindung die Hauptbindungskraft dar, durch sie werden zum Beispiel saure Farbstoffe an basische Proteine (bzw. basische Farbstoffe an saure Proteine) gebunden und so farblich hervorgehoben. Der Kontraststeigerung dienen Kombinationsfärbungen wie in Bi- oder Trichromfärbungen.

Von den zuvor fixierten und geschnittenen Präparaten wurden von jedem Tier drei Schnitte nach folgenden Färbeprotokollen angefärbt und anschließend ausgewertet.

1. Safranin-von-Kossa-Färbung
2. Azan-Färbung nach Heidenhain
3. Movat-Pentachrom-Färbung

### **3.9.1. Safranin-von-Kossa-Färbung**

Diese Färbung dient der Unterscheidung von mineralisiertem und nichtmineralisiertem Gewebe. Bei dieser Färbemethode (siehe Abb. 3.9.1-1.) wird mineralisiertes Knorpel- und Knochengewebe schwarz angefärbt. Mineralisationsfronten stellen sich schwarz granuliert dar und Bindegewebe, hyaliner Knorpel und nicht mineralisierter Knochen werden intensiv rot gefärbt.

Bevor die Schnitte nach einem einheitlichen Färbeprotokoll angefärbt werden konnten, mussten sie in MEA (Methoxyethylacetat) entplastet und anschließend in absteigender Alkoholreihe rehydriert werden. Die ausgewählten Schnitte wurden Gruppenweise (zwei, drei, sechs und neun Wochentiere jeweils zusammen) in so genannte Färbeschiffchen gegeben und der entsprechenden Färbung nach folgendem Färbeschema unterzogen.

#### **Färbeprotokoll**

1. Schnitte entplasten in MEA 3 x 20 min
2. Rehydrierung in 100-96-80-70%igen Alkohol jeweils 2 min
3. in Aqua destilata geben 2 min
4. Färben in 3%iger wässriger Silbernitratlösung für 5 min
5. Spülen in Aqua destillata 3 x kurz
6. Reduzieren in Natrium- Formaldehydlösung 2 min
7. Wässern mit Leitungswasser 10 min
8. 5%iges Natriumthiosulfat 5 min
9. Wässern mit Leitungswasser 10 min
10. Spülen in Aqua destillata kurz

11. Färben mit Safranin Orange 8 min
12. Spülen in Aqua destillata kurz
13. Entwässern 2 x 96% Alkohol 2 min
14. Entwässern 2 x 100% Alkohol 2 min
15. Entfetten in Xylol 2x 5 min
16. Eindeckeln mit Vitroclud



Abb. 3.9.1-1.: Safranin-von-Kossa-Färbung, drei Wochen post operationem

### 3.9.2. Azan-Färbung nach Heidenhain

Die Azanfärbung wurde 1915 von dem Tübinger Professor für Anatomie M. Heidenhain in die Histologie eingeführt. Der Name dieser Färbung ist ein Akronym aus den Anfangsbuchstaben der Farbstoffe Azokarmin und Anilin, den Hauptträgern der prächtigen Farbwirkung. Azokarmin ist ein roter Farbstoff, er dient vorwiegend der Zellkernanfärbung. Der Farbstoff Anilinblau dient der Gegenfärbung. Diese Färbemethode (siehe Abb. 3.9.2-1.) stellt eine Mehrfach-Färbung dar, welche der Differenzierung von extrazellulären Bindegewebsfasern, Geweben und Zellbestandteilen dient. Zellkerne stellen sich rot und Zytoplasma rötlich dar, kollagene und retikuläre Bindegewebsfasern werden hellblau bis blau angefärbt, wohingegen elastische Fasern nicht angefärbt werden.

#### Färbeprotokoll

1. Schnitte entplasten in MEA 3 x 20 min
2. Rehydrieren in 100- 96- 80- 70%igem Alkohol jeweils 2 min
3. in Aqua destillata geben kurz
4. Färben in Azokarmin bei 60°C für 15 min
5. in Aqua destillata 5- 10 min abkühlen lassen
6. Entfärbung und Beizen des Bindegewebes in 5%iger wässriger Phosphormolybdän-säure für 20 min
7. Spülen in Aqua destillata kurz
8. Gegenfärbung in Azanlösung für 20 min

9. Spülen in Aqua destilata kurz
10. Differenzieren in 96%igem Eisessig- Alkohol
11. Rehydrieren in 100%igem Alkohol
12. Entfetten in Xylol für 2 x 5 min
13. Eindeckeln mit Vitroclud



Abb. 3.9.2-1.: Azan-Färbung nach Heidenhain, zwei Wochen post operationem

### 3.9.3. Movat-Pentachrom-Färbung

Diese Mehrfach-Färbung ermöglicht eine farbenprächtige Unterscheidung der Hart- und Weichgewebekomponenten. Sie ist besonders für Studien der chondralen Ossifikation und Frakturheilung geeignet, da mineralisiertes von nichtmineralisiertem Knorpel- und Knochengewebe unterscheidbar sind.

Mineralisiertes Knochengewebe, sowie Kollagen werden leuchtend gelb und mineralisierter Knorpel blau- grün angefärbt. Knorpelgewebe stellt sich je nach Fixierung rötlich bis gelb dar. Saure Glykosaminoglykane färben sich leuchtend hellblau, Osteoid dunkelrot und elastische Fasern rot an. Zellkerne werden blauschwarz und Zytoplasma rötlich angefärbt. Bei dieser Färbung ist die Differenzierung des Osteoids von mineralisiertem Knochengewebe ähnlich spezifisch wie nach Safranin-von-Kossa-Färbungen, jedoch erlaubt die Movat-Pentachrom-Färbung auch noch die Beurteilung des Fibrillenverlaufes.

#### Färbeprotokoll

1. Schnitte entplasten in MEA 3x 20 min
2. Rehydrierung in 100- 96- 80- 70%igem Alkohol jeweils 2 min
3. kurz in Aqua destillata geben
4. Färben in Alcianblau- Lösung 10 min

5. Spülen in fließendem Leitungswasser 5 min
6. Stabilisieren in alkalischem Äthylalkohol (10 ml Ammoniumhydroxid auf 90 ml 96%igen Äthylalkohol) 60 min
7. Spülen in fließendem Leitungswasser 10 min
8. kurz Eintauchen in Aqua destillata
9. Kernfärbung in Weigerts Eisenhämatoxylin 10 min
10. kurz Spülen in Aqua destillata
11. Wässern in fließendem Leitungswasser 15 min
12. Färben in Brillant Crocein- Säurefuchsin 10- 15 min
13. kurz in 0,5%iger Essigsäure spülen
14. Differenzieren in 5%iger Phosphorwolframsäure 10 min
15. sorgfältig spülen in 0,5%iger Essigsäure
16. Dehydrieren in 100%igem Alkohol 3x 3 min
17. Färben in Saffron du Gatinais 60 min
18. Waschen in 100%igem Alkohol 3x 3 min
19. Entfetten in Xylol für 2 x 5 min
20. Eindecken mit Vitroclud

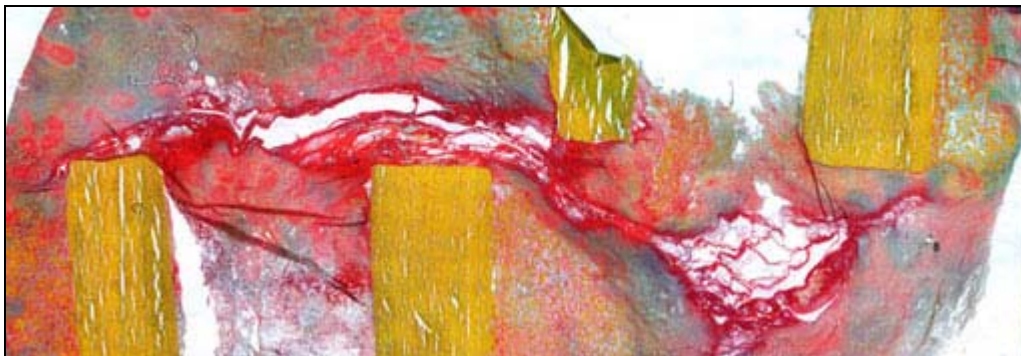


Abb. 3.9.3-1.: Movat-Pentachrom-Färbung, drei Wochen post operationem

Um aus den einzelnen Schnitten Dauerpräparate herzustellen, mussten sie luftdicht abgedeckt werden. Dazu wurden die Objektträger mit passenden Deckgläsern versehen, welche zuvor mit dem Klebstoff Vitroclud (Einschlussmittel für mikroskopische Technik, R. Langenbrink, Emmendingen, Deutschland) benetzt wurden. Nach 24 Stunden waren die Objektträger getrocknet und konnten in entsprechenden Mappen für histologische Präparate aufbewahrt werden.

### 3.10. Deskriptive Auswertung der histologischen Präparate

Die gefärbten Präparate wurden einzeln unter einem binokularen Lichtmikroskop (Novex Holland B-Series) und einem Photomikroskop bei aufsteigender Vergrößerung nach einem

einheitlichen Schema durchgemustert und deskriptiv ausgewertet. Zur Anwendung kamen die Objektive 2,5fach (2,5x), 10fach (10x), 20fach (20x), 40fach (40x) und 100fach (100x, Ölimmersion). Begonnen wurde die mikroskopische Untersuchung mit der 2,5 fachen Vergrößerung, mit dieser wurde sich ein Überblick über den jeweiligen Schnitt verschafft.

Die morphologischen Abläufe der Frakturheilung (wie Inflammation, Hämatombildung, Organisation, Phase des weicher Kallus, Knorpelbildung, enchondrale Ossifikation, Phase des harten Kallus, Remodeling) wurden zu den vier unterschiedlichen Untersuchungszeitpunkten anhand der in der Literatur beschriebenen Frakturheilungsphasen nachvollzogen.

Jeder Schnitt wurde nach einem einheitlichem Vorgehen und zuvor festgelegten Kriterien ausgewertet. Die im Folgenden aufgezählten morphologischen Gegebenheiten, Zellen und Gewebearten sind maßgeblich an den Abläufen der Frakturheilung beteiligt und wurden histologisch ausgewertet. Nach Orientierung und Überblickverschaffung eines jeden Schnittes wurden folgende Kriterien besonders beachtet. Es wurde auf vorliegende Fragmentverschiebungen (beurteilt anhand der jeweiligen Kortikalbreite) geachtet. Die einzelnen Kortizes wurden ebenfalls lichtmikroskopisch untersucht und beurteilt, dabei wurde besonderes Augenmerk auf die spaltnahe kortikale Dichte sowie die Form der kortikalen Osteotomieänder gelegt. Des Weiteren wurden die Schnitte auf Vorkommen und Zusammensetzung des Kallusgewebes, sowie deren räumliche Verteilung (periostal, endostal, interfragmentär) untersucht. Bei der Zusammensetzung des Kallusgewebes wurde auf die jeweilige Menge an bindegewebigen, knöchernen und knorpeligen Anteilen geachtet. Außerdem wurde die Dichte des Kallusgewebes beurteilt und jeweils mit den anderen untersuchten Zeiträumen verglichen. Anschließend wurde auf das Vorkommen von Hämatomgewebe, deren Zusammensetzung und deren Verteilung geachtet. Die Bereiche, in denen enchondrale Ossifikation auftrat wurden ebenfalls festgehalten, sie wurden mittels der Safranin-von-Kossa-Färbung anhand der sich schwarz darstellenden granulierten Ossifikationsfronten ermittelt.

Die verschiedenen Gewebeanteile wie Knochen, knöcherne Kallusformationen, Knorpel und bindegewebige Proliferation konnten so bei aufsteigender Vergrößerung bewertet werden. Das Vorkommen von Osteoklasten im Zusammenhang mit einem Knochenumbau- und abbau wurde ebenfalls dokumentiert.

Die histologische Aufarbeitung der Osteotomieregion zu unterschiedlichen Zeitpunkten bietet die Möglichkeit, die Abläufe der Frakturheilung im Detail zu beurteilen. Mittels den in dieser Studie angewandten drei unterschiedlichen Färbemethoden ist die differenzierte Darstellung bestimmter Strukturen, Gewebe, Zellen und von Frakturheilungsabläufen möglich. Mit Hilfe dieser Übersichts-färbungen konnte neu gebildetes Gewebe im Osteotomiespalt, sowie An-, Ab- und Umbauvorgänge der Kortizes zu den verschiedenen Zeitpunkten histologisch



dargestellt und unterschieden werden. Die Beschreibung der histologischen Befunde der zwei, drei, sechs und neun Wochentiere erfolgte gruppenweise.

Zusammenfassung der Untersuchungskriterien

1. Fragmentverschiebungen
2. Dichte der spaltnahen Kortikalis, kortikale Osteotomieanten
3. Hämatom, Vorkommen, Zusammensetzung
4. Kallusgewebe, Vorkommen, Zusammensetzung
5. Knorpelgewebe, Vorkommen
6. Osteotomiespalt allgemein
7. Osteoklasten als Zeichen von Abbauvorgängen

### **3.11. Statistische Auswertung der Daten**

Die Ergebnisse der biomechanischen Testung wurden graphisch in Form von Punktediagrammen (=Streudiagramm) dargestellt. Eine zuerst geplante Boxplotdarstellung erwies sich als ungeeignet aufgrund der geringen Probenanzahl. Die ermittelten Daten der Torsionstestung der beiden unterschiedlichen Untersuchungszeitpunkte wurden miteinander verglichen. Aufgrund der geringen Probenanzahl wurde von einer statistischen Auswertung abgesehen. Alle Knochen, die getestet werden konnten, wurden graphisch dargestellt und miteinander verglichen. Aus jeder für die biomechanische Untersuchung vorgesehenen Gruppe gingen jeweils vier Präparate in die Untersuchung ein.

## **4. Ergebnisse**

### **4.1. Allgemein**

Insgesamt gingen 32 Merino-Mix Schafe in die Auswertung ein. Post operationem wurden die Tiere im Rahmen der täglichen Wundkontrolle untersucht. Anhand des Pinpflege-Scores wurde der Gesundheitszustand jedes einzelnen Tieres täglich über den gesamten Versuchszeitraum dokumentiert.

Es kam bei fünf Tieren zu einer leichten Pintraktinfektion (Grad1, siehe Pinpflege-Score), bei vier Tieren war jeweils einer der beiden Messpins betroffen und bei einem Tier kam es zu leichten Entzündungserscheinungen an Pin eins und sechs. Alle Tiere konnten erfolgreich behandelt werden und überstanden die restliche Versuchszeit ohne weitere Komplikationen. Die 32 Tiere waren noch am Operationstag in der Lage selbstständig aufzustehen, im Stand entlasteten sie das osteotomierte Hinterbein in den ersten Tagen. Später zeigten sie unterschiedlich starke Lahmheiten, bei ungestörtem Allgemeinbefinden und normaler Futteraufnahme. Bei der überwiegenden Zahl der Tiere war eine leichte Lahmheit bis zum Versuchende zu beobachten.

Ein Tier aus der Zweiwochengruppe musste aufgrund einer Komplikation frühzeitig euthanasiert werden und konnte daher nicht in die Auswertung eingehen. Des Weiteren traten technische Probleme beim Schneiden am Mikrotom auf, weshalb ein weiteres Präparat der Zweiwochengruppe nicht ausgewertet werden konnte. Es gingen somit sechs Tiere der Zweiwochengruppe in die Auswertung ein und jeweils acht Tiere in den drei, sechs und neun Wochengruppen.

### **4.2. Radiologische Befunde**

Anhand der wöchentlich durchgeführten Röntgenuntersuchung konnte der Heilungsverlauf radiologisch kontrolliert werden. Das Ausheilungsergebnis basierte auf der Auswertung der Anzahl der überbrückten Kortizes, wofür Röntgenbilder in zwei Ebenen herangezogen wurden. Begonnen wurde die röntgenologische Dokumentation post operationem.

Bei allen Tieren war über den jeweiligen Beobachtungszeitraum von zwei bis zu neun Wochen eine fortschreitende sekundäre Frakturheilung röntgenologisch sowie auch histologisch zu erkennen. Es kam innerhalb der neun Wochen jedoch bei keinem der 32 Tiere zu einer knöchernen Überbrückung des Osteotomiespalt. Bei allen Tieren war ein, wenn auch teilweise sehr schmaler, durchgehender Spalt zwischen den beiden Knochenfragmenten vorhanden.

Auf den ersten Röntgenbildern post operationem stellte sich der drei Millimeter breite Osteotomiespalt deutlich dar, er wurde proximal und distal durch glatte, scharfkantige Osteotomieeränder der einzelnen Kortizes der osteotomierten Fragmente begrenzt.

Des Weiteren konnte der bikortikale Sitz der Pins beurteilt werden. Eventuelle Fragmentabspaltungen, wie sie bei zwei Tieren der Fall waren, konnten so ebenfalls beurteilt werden. Außerdem wurden alle Röntgenbilder auf Osteolysen der implantierten Pins hin untersucht.

Zwei Wochen post operationem war bereits eine erste geringe periostale Kallusbildung sichtbar, die sich als eine leichte Auflockerung der zuvor glatten periostalen Seitenränder der Kortizes darstellte. Bei fünf der sechs Präparate lagen deutliche Fragmentverschiebungen in der Längsachse vor. Bei dem einen Tier mit nur dezenten Fragmentverschiebungen wurde die geringste periostale Kallusbildung beobachtet. Diese nahm über den Zeitraum von drei, sechs und neun Wochen stetig zu. Die Kallusformationen stellten sich zunehmend als einheitliche wolkige bzw. kugelförmige knochendichte Strukturen dar, die zunehmend den Osteotomiespalt überragten. Die überwiegenden periostalen Kallusanteile dehnten sich nach proximal und distal um die Osteotomieeränder herum aus. Geringe endostale Kallusanteile waren ebenfalls sichtbar.

Trotz der Kalluszunahme kam es innerhalb der neun Wochen bei keinem der Tiere zu einer vollständigen knöchernen Konsolidierung der Osteotomiefragmente. Der Osteotomiespalt war bei allen Tieren zum Neunwochenzeitpunkt noch als schmale Linie erkennbar, die mittig durch die Osteotomieeränder zog. Die distalen und proximalen knöchernen Kallusanteile wuchsen zwar aufeinander zu, füllten jedoch den ursprünglichen Osteotomiedefekt nicht vollständig aus. Anhand der Röntgenbilder konnten die Fragmentverschiebungen, welche aufgrund der freigegebenen Rotationsbewegung des scherverweichen Fixateurs entstanden, ebenfalls gut dokumentiert und beurteilt werden.

### 4.3. Biomechanische Testung

Es folgt die Darstellung der Ergebnisse der post mortem durchgeführten Torsionstestung. Beim Torsionstest wurden das Torsionsmoment in [Nm] sowie der Torsionswinkel in [°] bestimmt. Mittels dieser beiden Werte konnte die Torsionssteifigkeit [Nm/°], welche das Verhältnis zwischen Torsionsmoment und Torsionswinkel widerspiegelt, berechnet werden. Die biomechanische Untersuchung erfolgte zum sechs und neun Wochenzeitpunkt.

Aus den Tiergruppen mit einer Standzeit von sechs und neun Wochen konnten jeweils nur vier der acht Knochenpräparate in die Testung eingehen, die anderen Knochen waren nach Entfernung des Fixateurkonstruktes zu instabil für die Testdurchführung. Im Anschluss an die Testung der osteotomierten Tibia erfolgte bei jedem Tier die Testung der linken intakten Tibia. Die ermittelten Daten der osteotomierten Seite wurden anschließend auf die Werte der

## Ergebnisse

---

intakten Seite bezogen, um tierspezifische Unterschiede auszuschließen. Es werden nur die relativen Werte bezogen auf die gesunde Seite dargestellt, da die absoluten Werte bei den einzelnen Tieren der beiden Untersuchungszeiträume sehr stark voneinander abwichen. Aufgrund der geringen Untersuchungsanzahl von nur vier Proben pro Gruppe erfolgt keine statistische Analyse, sondern eine rein deskriptive Analyse der gewonnenen Daten.

Zunächst werden die Werte der biomechanischen Analyse der Sechswochentiere und anschließend die der Neunwochentiere dargestellt. Die relativen Ergebnisse der Torsionssteifigkeit, sowie des Torsionsmomentes werden für beide Untersuchungszeitpunkte zum direkten Vergleich in graphischer Form als Punktediagramm dargestellt.

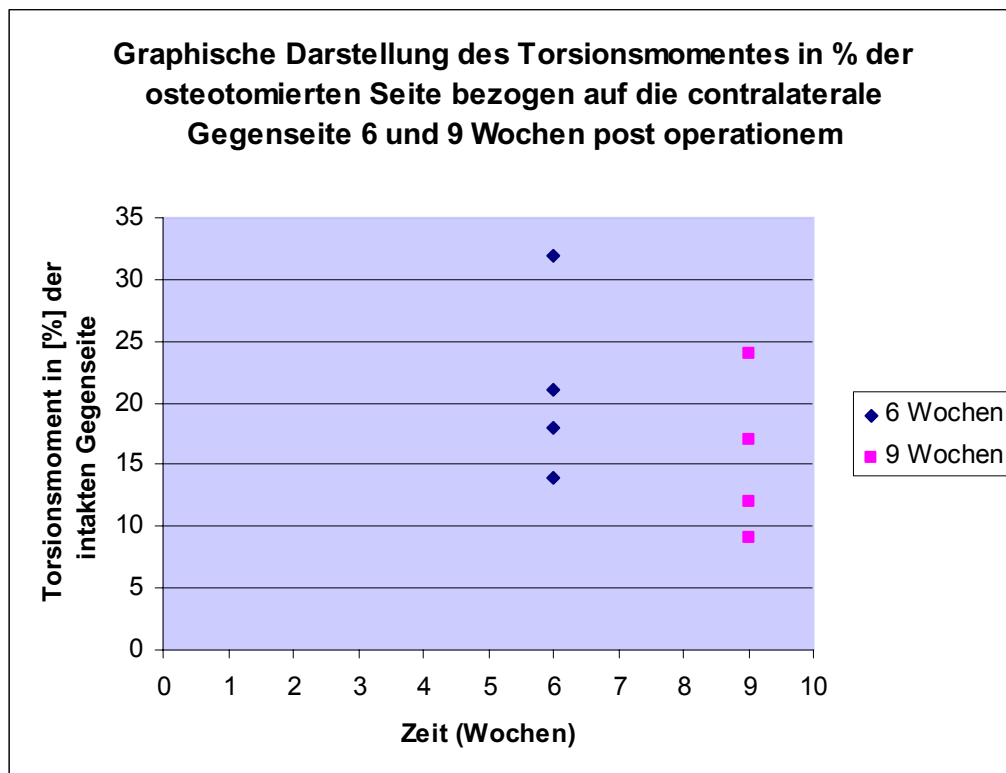
### 4.3.1.Torsionstestergebnisse

#### Biomechanische Analyse sechs Wochen post operationem

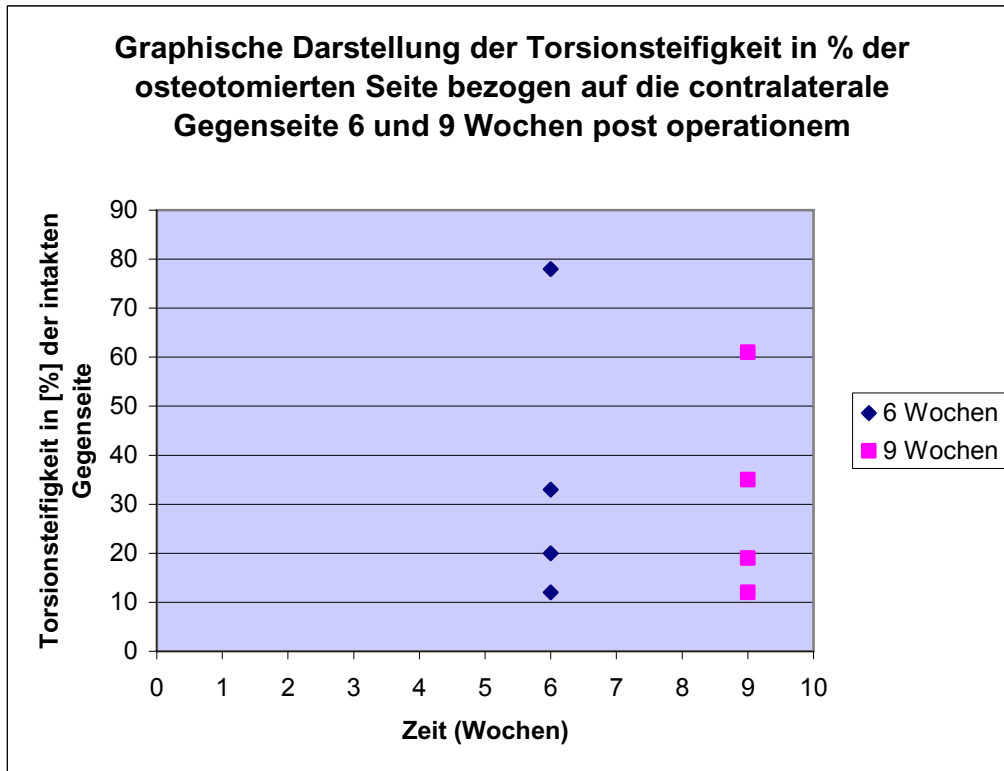
Tiernummer 6 Wochen	Torsionsmoment intakt Nm	Torsionsmoment osteotomiert Nm	% Anteil osteotomiert zu intakter Tibia
Schaf 58	76,60	13,70	18
Schaf 20	81,10	11,34	14
Schaf 70	69,53	21,91	32
Schaf 90	76,03	15,85	21

#### Biomechanische Analyse neun Wochen post operationem

Tiernummer 9 Wochen	Torsionsmoment intakt Nm	Torsionsmoment osteotomiert Nm	% Anteil osteotomiert zu intakter Tibia
Schaf 5	76,95	9,12	12
Schaf 6	72,09	12,26	17
Schaf 7	66,00	5,58	9
Schaf 88	67,84	16,37	24



Vergleicht man die nach sechs und neun Wochen gemessenen Torsionsmomentwerte der Tiere, so sind keine signifikanten Unterschiede zwischen den verschiedenen Zeitpunkten zu verzeichnen. Von der sechsten zur neunten Woche lag keine Erhöhung des Torsionsmomentes als Anzeichen eines Heilungsfortschrittes vor.



Bei einem Vergleich der relativen Werte der Torsionssteifigkeit der osteotomierten Seite bezogen auf die contralaterale gesunde Seite nach sechs und neun Wochen sind keine signifikanten Unterschiede zu verzeichnen. Es kam innerhalb der drei Wochen zu keiner Erhöhung der Torsionssteifigkeit als Maß der vorangeschrittenen Frakturheilung in Form einer Steifigkeitszunahme.

### 4.3.2. Auswertung der radiologischen Befunde

Auswertung der biomechanischen Ergebnisse anhand der Frakturklassifikation nach White und Mitarbeitern (1977)

Tiernummer	Standzeit in Wochen	Frakturklassifikation nach White (1977) Stadium eins bis vier
Nr. 20	6	Erstes Stadium
Nr. 58	6	Erstes Stadium
Nr. 70	6	Erstes Stadium
Nr. 90	6	Erstes Stadium
Nr. 5	9	Erstes Stadium
Nr. 6	9	Erstes Stadium
Nr. 7	9	Erstes Stadium
Nr. 88	9	Erstes Stadium

Bei der radiologischen Beurteilung der zuvor biomechanisch getesteten Knochenproben waren keine relevanten Unterschiede zu verzeichnen. Alle acht Knochen der Sechs- und Neunwochentiere brachen bei der Durchführung der Torsionstestung im ursprünglichen Defektbereich mit geringer Steifigkeit und nicht im angrenzenden ursprünglichen Knochengewebe. Die Frakturlinien verliefen schräg und überwiegend mittig durch das knöcherne Kallusgewebe im ehemaligen Osteotomiespalt und stellten sich auf den Röntgenbildern als schmale durchgehende Verschattung dar.

**Histologische Darstellung einer bei der biomechanischen Testung entstandenen Fraktur durch das neu gebildete Kallusgewebe im ehemaligen Osteotomiespalt.**

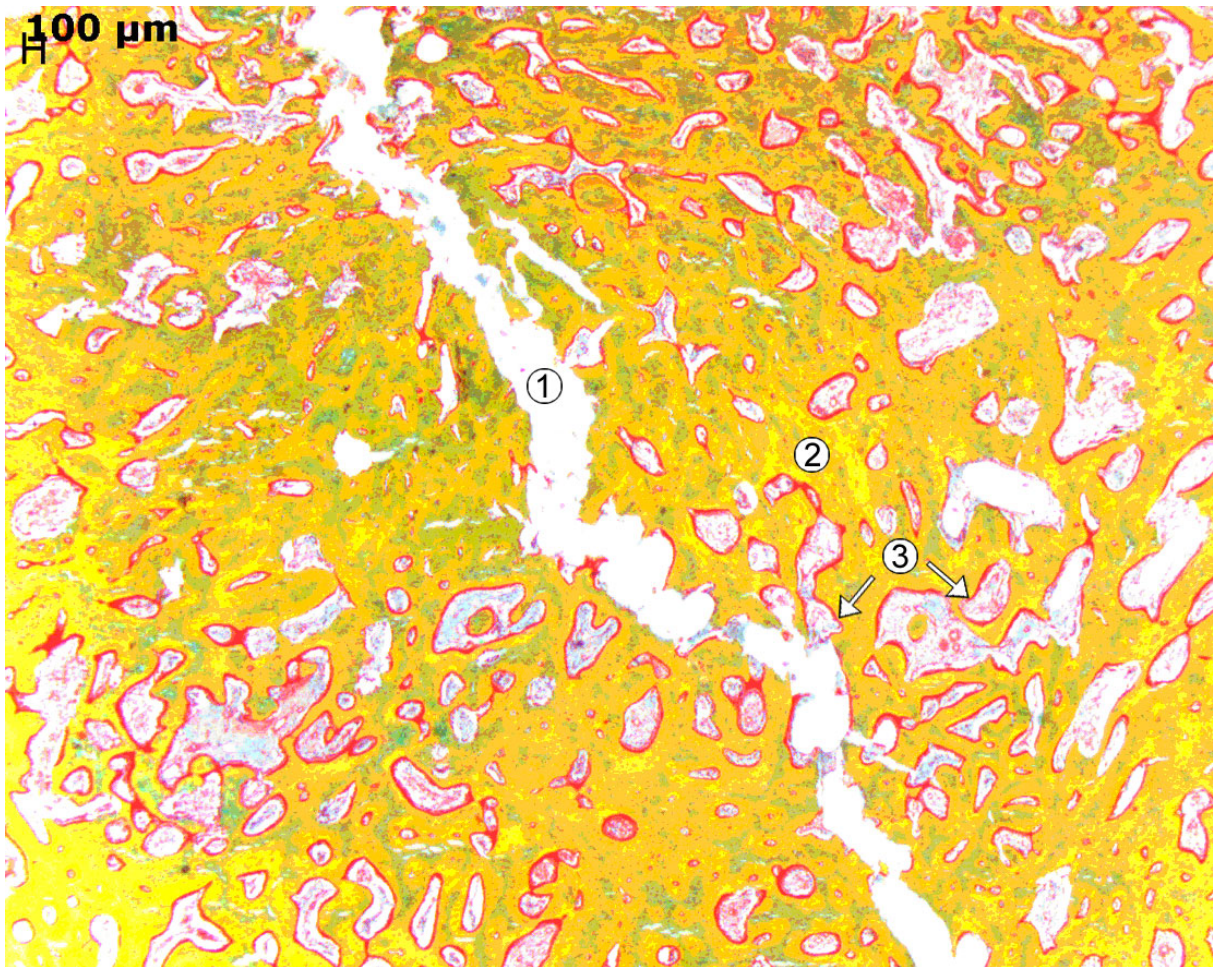


Abb. 4.3.-1: Movat-Pentachrom-Färbung, neun Wochen post operationem, durchgehende **Frakturlinie (1)** durch knöchernes Kallusgewebe nach Torsionstestung (erstes Stadium der Frakturklassifikation nach White), gelb stellt sich mineralisiertes **Kallusgewebe (2)** dar, rote Umrandung der Hohlräume im Kallusgewebe ist synthetisiertes **Osteoid (3)**.

#### **4.4. Ergebnisse der deskriptiven histologischen Auswertung**

Die angefärbten Schnitte zu den unterschiedlichen Zeitpunkten von zwei, drei, sechs und neun Wochen wurden unter dem Lichtmikroskop bei aufsteigender Vergrößerung nach einem einheitlichen Schema durchgemustert und ausgewertet.

Jedes Tier ging mit drei unterschiedlich angefärbten Schnitten in die Auswertung ein. Die Safranin-von-Kossa-Färbung diente vor allem der Unterscheidung von mineralisiertem und unmineralisiertem Gewebe, so konnten die knöchernen Kallusanteile deutlich von bindegewebigen und knorpeligen Anteilen unterschieden werden, außerdem wurden mittels dieser Färbung die Osteotomiekanten und die spaltnahe kortikale Dichte beurteilt. Mit der Azan-Färbung ließen sich besonders gut Bindegewebe, deren Faserverlauf und Knorpelzellen differenzieren. Die Movat-Pentachrom-Färbung findet vor allem bei Studien



der enchondralen Ossifikation und der Frakturheilung Anwendung, daher eignete sie sich besonders gut für die Auswertung der einzelnen Frakturheilungsphasen. Das synthetisierte Osteoid, welches im Rahmen der Knochenneubildung entstand, hob sich in dieser Färbung ebenfalls sehr gut hervor. Obwohl die Movat-Pentachrom-Färbung nicht osteoklastenspezifisch ist, konnte man die knochenabbauenden Riesenzellen mit dieser Färbung sehr gut differenzieren. Es gab zwei Kriterien die eine Zelle erfüllen musste, um als Osteoklast eingestuft zu werden, die Zellen mussten in direkter Verbindung mit einer knöchernen Struktur (Knochenlakune) liegen und mindestens zwei Zellkerne aufweisen.

Die Beschreibung und Auswertung der mikroskopischen Untersuchung erfolgt gruppenweise, beginnend mit dem frühen Zeitpunkt von zwei Wochen. Es folgt die Beschreibung des drei, sechs und abschließend des neun Wochenzeitpunktes.

#### **4.4.1. Allgemeine Präparatbeschreibung**

Aufgrund der gewählten Sägeebene durch die Tibialängsachse stellten sich die histologischen Knochenpräparate der Osteotomiezone unter dem Lichtmikroskop folgendermaßen dar: Die Kortikalis eines jeden Fragmentes stellte sich als zwei schmale, längliche Rechtecke dar, die mittig durch den Markraum voneinander getrennt waren. Zwischen dem proximalen und distalen Fragment befand sich der Osteotomiespalt von ursprünglich drei Millimetern Breite.

Aufgrund der starken Verschiebungen der beiden osteotomierten Knochenfragmente war es teilweise sehr schwierig, beim Sägen der Knochenscheiben dieses einheitliche Bild von vier Kortikalisrechtecken zu erreichen. Bei einigen Präparaten war der Markraum nicht vollständig angesägt, so dass sich die Kortikalis dieses Fragmentes nur als ein Rechteck darstellte (siehe Abbildung 4.4.2.-1), welches nicht durch den Markraum unterteilt war. Aufgrund der Ungleichheit der Schnitte konnte keine histomorphometrische Auswertung stattfinden, denn eine Standardisierung der Schnitte war nicht möglich. Daher erfolgt die histologische Auswertung der Schnitte rein deskriptiv.

Die einzelnen Präparate innerhalb einer der vier Gruppen zu unterschiedlichen Zeitpunkten wiesen vergleichsweise ähnliche histologische Bilder auf, weshalb die Beschreibung gruppenweise erfolgt.

#### **4.4.2. Zwei Wochen post operationem**

In die Auswertung gingen 18 histologische Präparate von insgesamt sechs Tieren mit einer Standzeit von zwei Wochen ein.

### **1. Fragmentverschiebung**

Bei fast allen untersuchten Präparaten zeigten sich leichte bis starke Fragmentverschiebungen von einer halben bis zu eineinhalb Kortikalisbreiten. Nur bei einem Präparat waren kaum Fragmentverschiebungen vorhanden, so dass die Osteotomiefragmente genau übereinander lagen und mittig durch den Osteotomiespalt getrennt waren.

### **2. Dichte der spaltnahen Kortikalis, kortikale Osteotomieanten**

Die spaltnahe kortikale Dichte war bei allen untersuchten Präparaten unverändert (siehe Abb. 4.4.2.-1). Die Kortikalis bestand aus gleichmäßig mineralisiertem Gewebe. Aufgrund der gewählten Sägebene waren in der Kortikalis längs angeschnittenen Osteone mit darin gelagerten Osteozyten erkennbar (siehe Abb. 4.4.2.-4). Die Osteozyten stellten sich als sternförmige Zellen dar, welche feine Zytoplasmaausläufer aufwiesen. Die durch die Osteotomie erzeugten Osteotomieanten der Kortikalis waren bei allen Präparaten scharf und rechtwinkelig (siehe Abb. 4.4.2.-1), wie auch auf den postoperativen Kontrollröntgenbildern. Zu diesem frühen Zeitpunkt waren bereits bei zwei Drittel der Präparate an den periostalen und endostalen Kortikaliskanten erste zarte Geflechtknochenausläufer vorhanden (siehe Abb. 4.4.2.-1). Bei den übrigen Präparaten hatten zum Zweiwochenzeitpunkt noch keine knöchernen Anbauvorgänge in diesem Bereich stattgefunden.

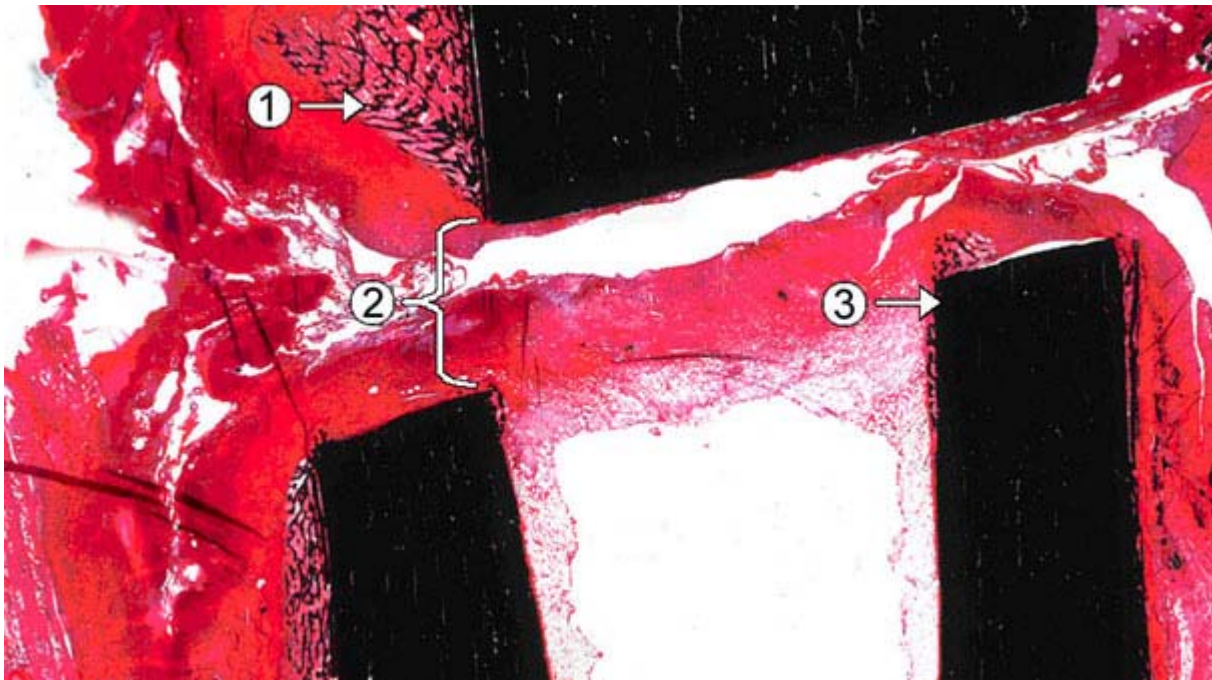


Abb. 4.4.2.-1: Safranin-von-Kossa-Färbung, zwei Wochen post operationem, beim oberen Knochenfragment ist der Markraum nicht angeschnitten, deshalb stellt sich die Kortikalis als ein Rechteck dar. Die Dichte der spaltnahen **(3) Kortikalis** ist hoch, die Osteotomieanten sind glatt, wobei unten rechts erste zarte knöcherne Kallusausläufer von der Osteotomieante der Kortikalis in Richtung Osteotomiespalt wachsen. Interfragmentär im **Osteotomiespalt (2)** befinden sich bindegewebiger Kallus und Hämatomstrukturen. Eine deutliche **periostale Kallusbildung (1)** ist vorhanden, diese liegt vorwiegend dem verschobenen Fragment gegenüber.

### 3. Hämatom, Vorkommen, Zusammensetzung

Durch die Osteotomie bedingte Kontinuitätsunterbrechung wurden periostale, kortikale und endostalen Blutgefäße zerstört. In folge dessen kam es zur Einblutung in den Osteotomiespalt sowie das umliegende Weichteilgewebe und somit zur Bildung eines Frakturhämatoms.

Die Hämatomstrukturen waren zum Zweiwochenzeitpunkt vor allem interfragmentär noch deutlich erhalten (siehe Abb. 4.4.2.-2). Bei fast allen Präparaten befanden sich auch außerhalb des Osteotomiespalt medial und lateral zwischen den proximalen und distalen Fragmenten vereinzelt Hämatomstrukturen. Nur bei einem Präparat, bei dem kaum Fragmentverschiebungen vorlagen, war kein Hämatomgewebe außerhalb des Osteotomiespalt vorhanden. Das Hämatom selbst bestand aus zahlreichen, dicht aneinander liegenden Zellen, wobei es sich überwiegend um zusammengeballte Erythrozyten mit vereinzelt dazwischen liegenden Abwehrzellen handelte. In der Übersichtsvergrößerung stellte sich das Hämatom in allen Präparaten als große ovale bis kugelige rot angefärbte homogene Masse dar (siehe Abb. 4.4.2.-2). Teilweise war das Hämatom durch proliferierendes Bindegewebe und Kapillareinsprossungen bereits organisiert (siehe Abb. 4.4.2.-3).

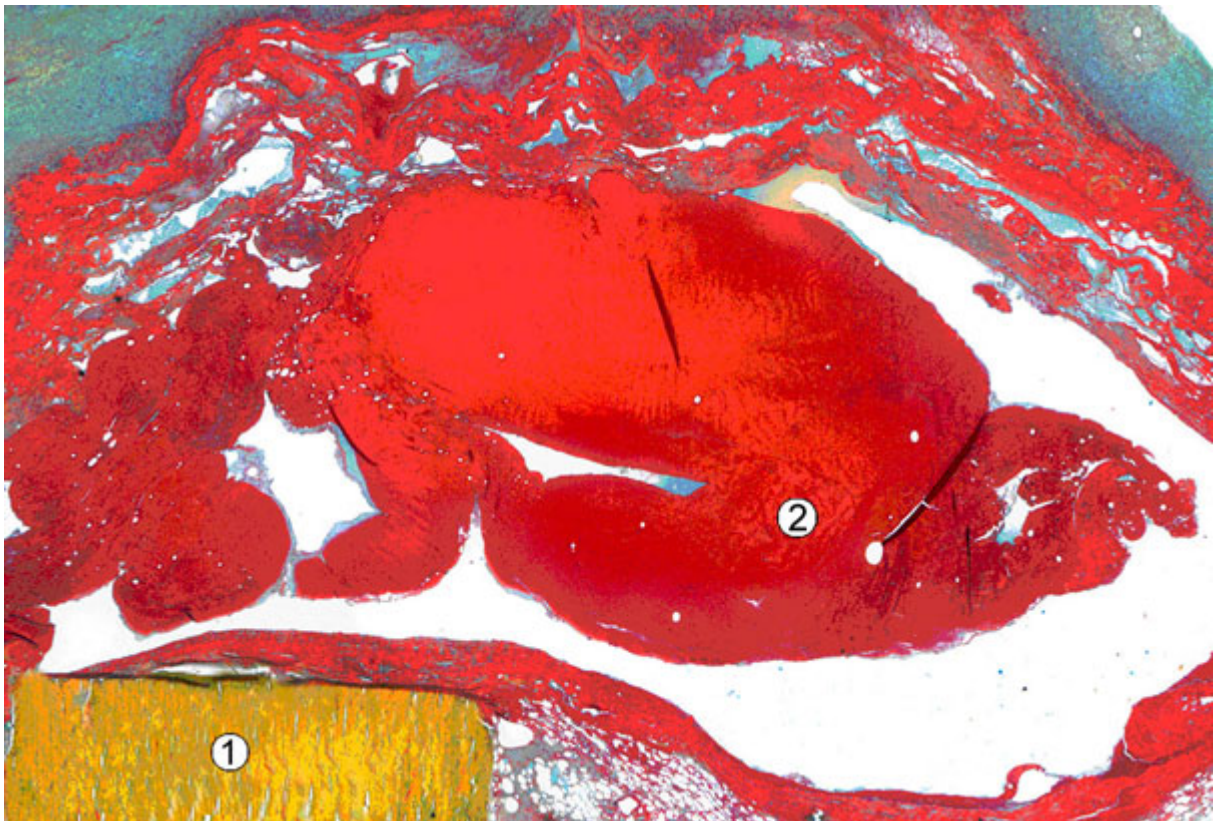


Abb. 4.4.2.-2: Movat-Pentachrom-Färbung, zwei Wochenpost operationem, **Hämatomgewebe (2)** zusammengeballt zu einer homogenen großen Masse interfragmentär im Osteotomiespalt, es besteht überwiegend aus Erythrozyten und in geringeren Anteilen aus Abwehrzellen. Oben blau dargestellt Bindegewebe, unten links gelb angefärbt ist ein **(1) Kortikalissegment** angeschnitten.

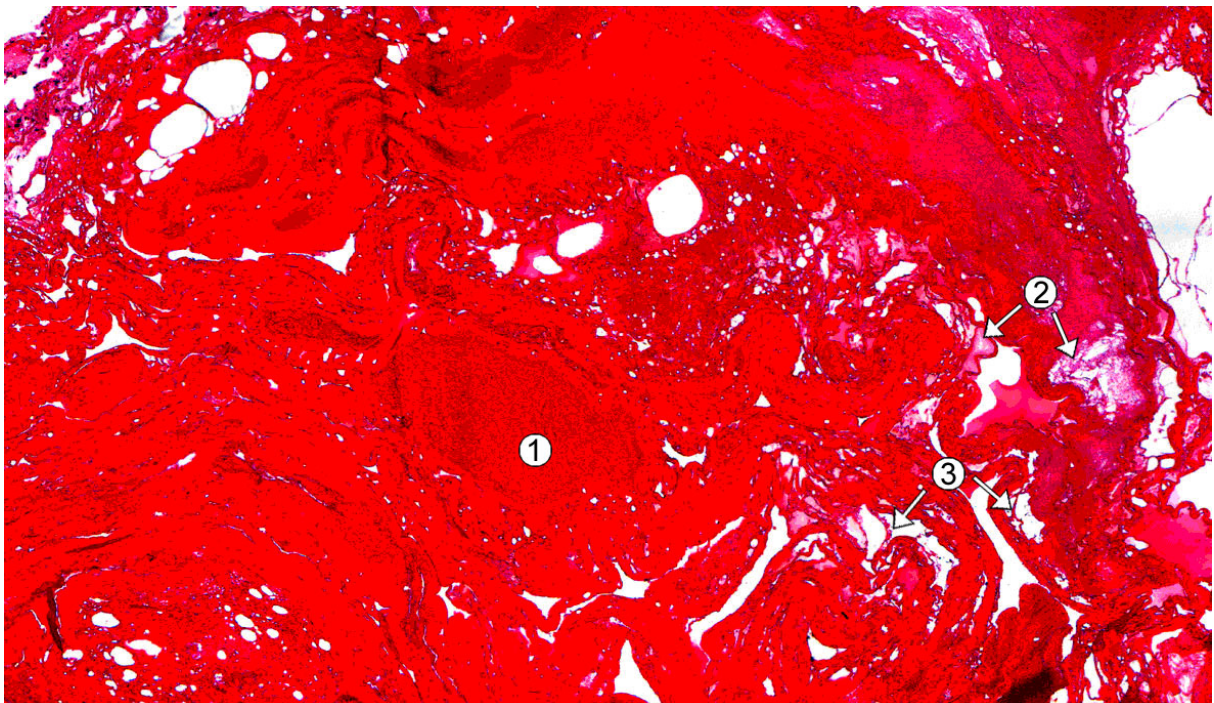


Abb. 4.4.2.-3: Safranin-von-Kossa-Färbung, zwei Wochen post Operationem, **Hämatomgewebe (1)** überwiegend bestehend aus zusammengeballten Erythrozyten und in geringerer Anzahl aus Abwehrzellen. Homogen rosa-rot stellt sich **Fibrin (2)** dar. Teils sind geschlängelt verlaufende **Bindegewebsstränge (3)** vorhanden.

#### 4. Kallusgewebe, Vorkommen, Zusammensetzung

Allgemein unterscheidet man aufgrund seiner Lokalisation drei verschiedene Kallusregionen, den periostalen, den endostalen und den interkortikalen Kallus. In ihrer Zusammensetzung unterscheiden sie sich nicht, sondern die Bezeichnungen dienen der besseren Lagebeschreibung, wobei der interkortikale Kallus sich direkt zwischen den osteotomierten Knochenfragmenten im Osteotomiespalt befindet und die anderen jeweils in der bezeichneten Kortikalisregion, periostal (außen) und endostal (innen).

Im interfragmentären Raum befand sich neben den großen Hämatomstrukturen überwiegend bindegewebiger Kallus. Periostal lateral und medial kam es an den spaltnahen Kortikalisrändern zur ersten Bildung von vereinzelt fingerförmigen knöchernen Kallusausläufern (siehe Abb. 4.4.2.-4). Überwiegend kam es an der periostalen Seite, die dem anderen verschobenen Fragment zugewandt war, zur Geflechtknochenbildung, bei der die Knochenbälkchen noch ungeordnet und ungleichmäßig ausgerichtet sind. Bei den Präparaten von zwei Tieren, wo nur leichte beziehungsweise keine Fragmentverschiebungen vorlagen, war eine deutlich geringere knöchernen Kallusmenge vorhanden, als bei den Präparaten von Tieren mit größeren Verschiebungen. Je stärker die Fragmentverschiebungen waren, desto größer war die zum Zweiwochenzeitpunkt zu beobachtende knöchernen Kallusmenge.

Die zarten Knochenbälkchen waren nicht miteinander verbunden, ihre Bildung begann ungefähr 15mm proximal und distal des Osteotomiespalt und sie wuchsen aufeinander zu. Diese diskontinuierlichen, strangförmigen Geflechtknochenausläufer waren außen mit einem dichten perlschnurartigen Besatz von aneinander gereihten Osteoblasten besetzt (siehe Abb. 4.4.2.-4; Abb. 4.4.2.-5).

Die Osteoblasten, welche sich als kubische Zellen mit einem großen runden Zellkern darstellten, bildeten die knöchernen Grundsubstanz, das Osteoid. Dieses hob sich in der Movat-Pentachrom-Färbung deutlich durch die rote Färbung vom gelb angefärbten bereits mineralisierten Kallus hervor (siehe Abb. 4.4.2.-4). Das knöchernen Kallusgewebe hatte zu diesem frühen Zeitpunkt ein einheitliches und gleichmäßiges Aussehen. Die knöchernen Kallustrabekel waren sehr dünn, dazwischen war reichlich bindegewebiger Kallus vorhanden. Zu diesem frühen Zeitpunkt bestand somit das Kallusgewebe überwiegend aus Bindegewebe, der knöchernen Anteil war im Verhältnis noch sehr klein. Die Kontinuität des knöchernen Kallusgewebes war zum Zweiwochenzeitpunkt nur gering ausgeprägt.

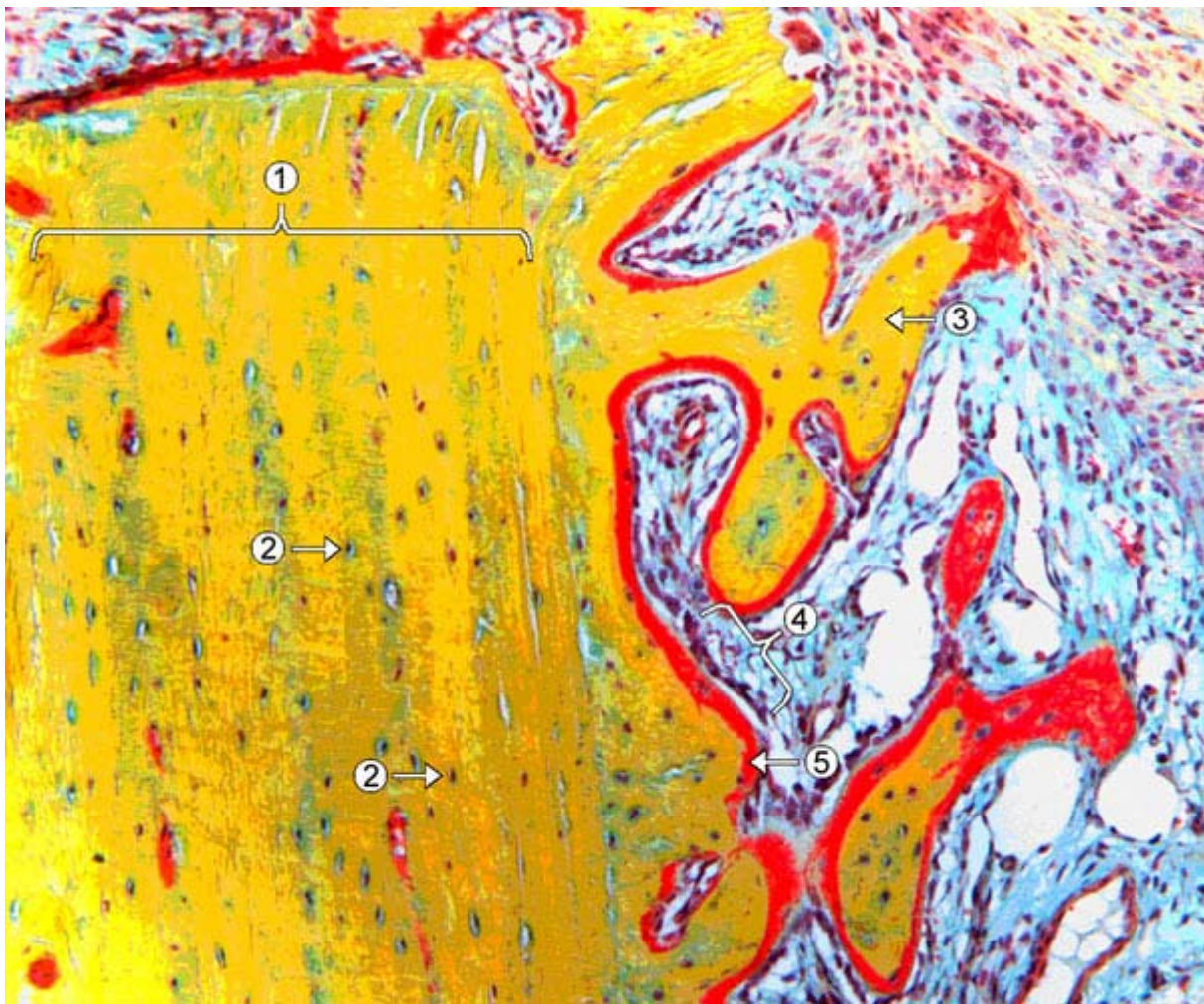


Abb. 4.4.2.-4: Movat-Pentachrom-Färbung zum Zweiwochenzeitpunkt: Ausschnitt aus einem Kortikalisbereich (gelb) mit beginnender periostaler knöcherner Kallusbildung. In der **Kortikalis (1)** befinden sich längs angeschnittene Osteone mit darin gelagerten **Osteozyten (2)**, die kortikale Dichte ist hoch. Der periostale Kortikalisrand ist unregelmäßig aufgrund des von dort beginnenden diskontinuierlichen Kalluswachstumes. Von den überwiegend perlschnurartig gelagerten **Osteoblasten (4)** neu gebildetes **Osteoid (5)** ist rot angefärbt, mineralisiertes Knochengewebe stellt sich gelb dar. Zwischen den ersten zarten knöchernen **Kallusbalken (3)** befindet sich blau angefärbter bindegewebiger zellreicher Kallus. Die Ausrichtung der Kallusausläufer ist noch ungerichtet.

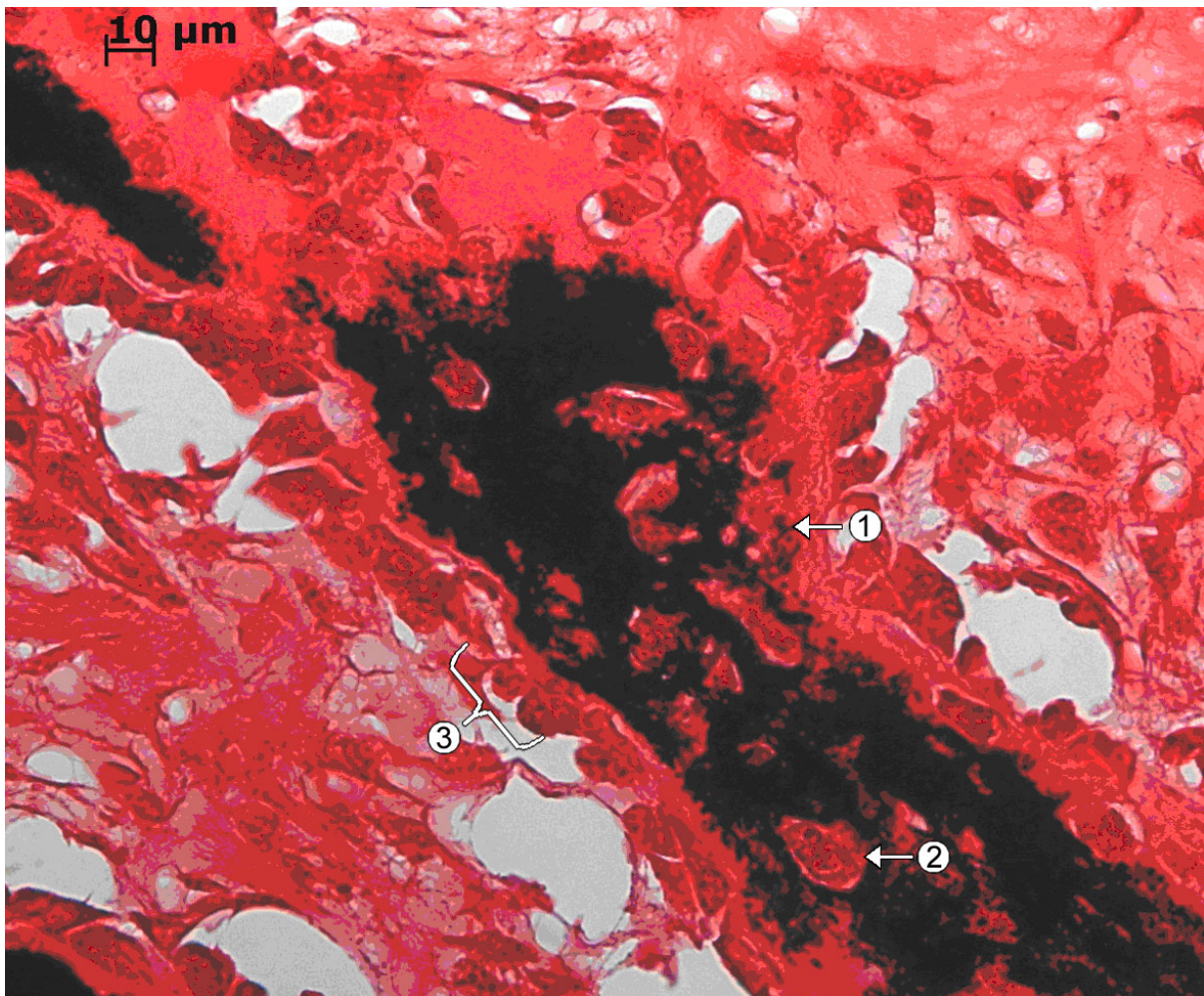


Abb. 4.4.2.-5: Safranin-von-Kossa-Färbung, zwei Wochen post operationem, Bildung eines Geflechtknochentrabekels. Schwarz stellt sich mineralisiertes Gewebe dar, in den Randbereichen deutlich zu erkennen die körnigen fein **granulierten Mineralisierungsstrukturen (1)**. Innerhalb des Knochentrabekels sind sich **einmauernde Osteozyten (2)** zu erkennen, diese flachen ab und verlieren die Eigenschaft Osteoid zu produzieren. Um den Knochentrabekel herum befindet sich zellreiches Bindegewebe, direkt außen liegen dicht **aneinander gereihete Osteoblasten (3)**, welche das sich homogen rot darstellende Osteoid produzieren.

### 5. Knorpelgewebe, Vorkommen

Bei einem Drittel der Präparate waren bereits vereinzelt kleine knorpelige Areale periostal medial und lateral auf Spalthöhe vorhanden. Die Knorpelzellen waren teilweise stark hypertrophiert und befanden sich in Form von kleinen Inseln am Übergang des knöchernen zum bindegewebigen Kallusgewebe überwiegend außerhalb des Osteotomiespaltes.

### 6. Osteotomiespalt allgemein

Bei keinem der untersuchten Präparate kam es zur knöchernen Überbrückung des Osteotomiespaltes. Dieser war bei allen Präparaten überwiegend mit Hämatomgewebe und bindegewebigem Kallus ausgefüllt (siehe Abb. 4.4.2.-1). Die Anordnung des interfragmentären Gewebes war ungeordnet. Der Markraum war mit Bindegewebe und

Fettgewebe ausgefüllt. Zu diesem frühen Zeitpunkt der Frakturheilung dominierten Mesenchymzellen und weniger differenziertes Gewebe das Bild. Allgemein traten somit bei allen untersuchten Präparaten aktive Vorgänge der sekundären Frakturheilung auf. Beim Präparieren der Schnitte musste man sehr vorsichtig vorgehen, da das junge noch größtenteils undifferenzierte Gewebe sehr empfindlich war und schnell einriss, vor allem im Bereich des Osteotomiespaltes.

### 7. Osteoklasten als Zeichen von Abbauvorgängen

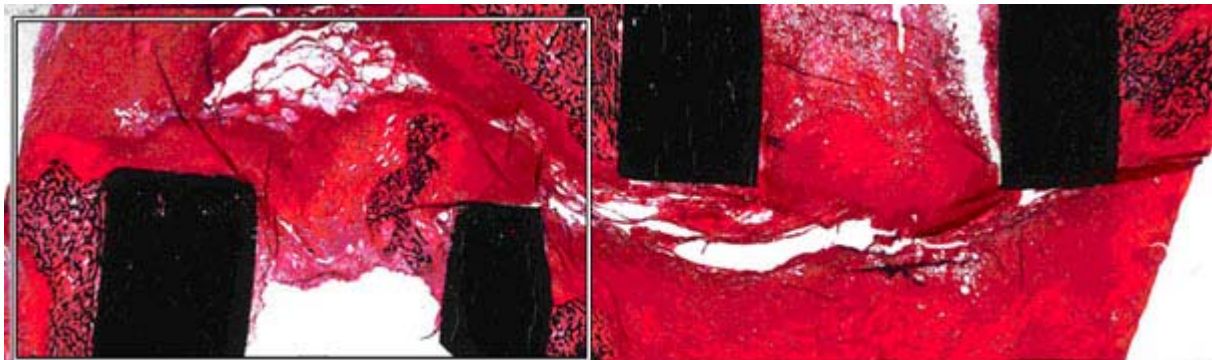
Zum Zweiwochenzeitpunkt waren in keinem der Präparat Osteoklasten nachweisbar. Als eindeutiges Kriterium müssen diese Zellen in direktem Kontakt zu knöchernem Gewebe liegen und mindestens zwei Zellkerne aufweisen.

### 4.4.3. Drei Wochen post operationem

In die Auswertung gingen 24 histologische Präparate von insgesamt acht Tieren mit einer Standzeit von drei Wochen ein.

#### 1. Fragmentverschiebung

Bei allen Präparaten lagen deutliche Fragmentverschiebungen zwischen einer und maximal zwei Kortikalisbreiten vor (siehe folgende Abb. 4.4.3.-1).



↓  
Ausschnittsvergrößerung in Abb. 4.4.3.-2

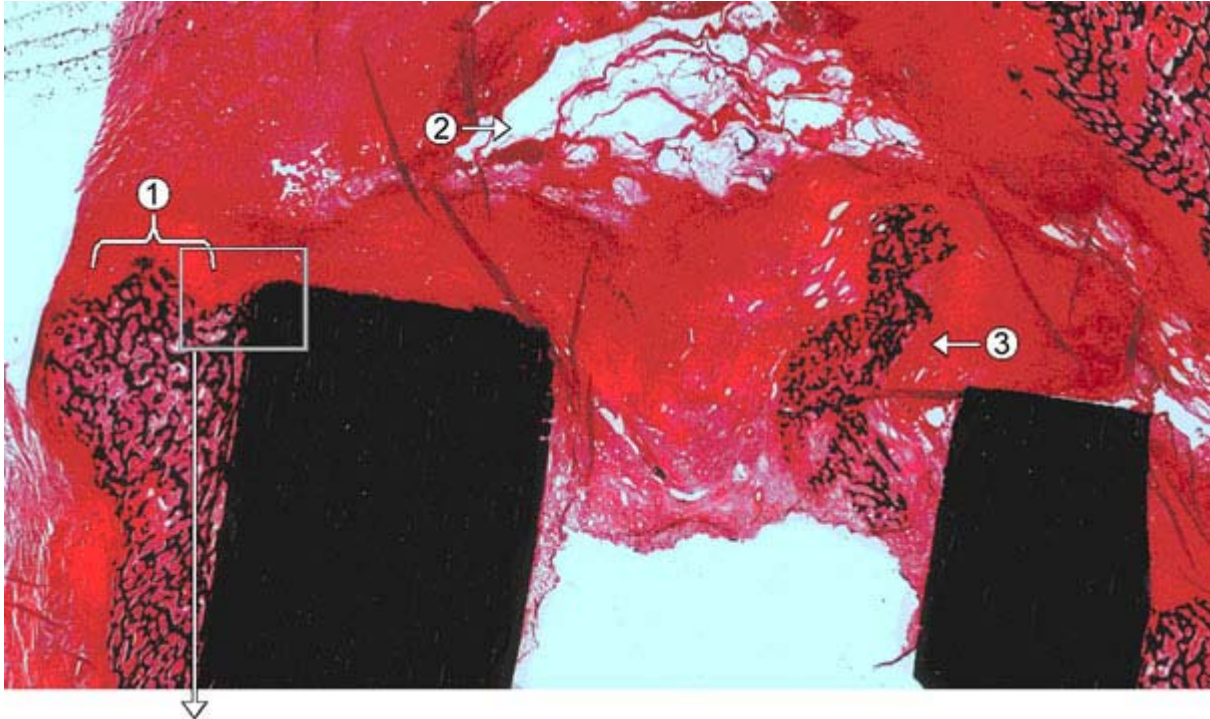
Abb. 4.4.3.-1: Safranin-von-Kossa-Färbung, drei Wochen post operationem, starke Fragmentverschiebung von mehr als zwei Kortikalisbreiten, Osteotomiespalt mit bindegewebigem Kallus und Hämatomgewebe ausgefüllt. Deutliche periostale knöcherne Kallusbildung vorhanden, geringe endostale Kallusbildung.

#### 2. Dichte der spaltnahen Kortikalis, kortikale Osteotomieanten

Die spaltnahe kortikale Dichte war bei allen Präparaten weiterhin unverändert hoch (siehe Abb. 4.4.3.-3). Der spaltnahe kortikale Knochenaufbau war gleichmäßig. An den zuvor scharfkantigen Osteotomieändern der einzelnen Kortizes waren erste Veränderungen in



Form von leichten Abrundungen, Zackungen und dezenter knöcherner Kallusbildung vorhanden, so dass an der ehemaligen glatten Osteotomielinie ein ungleichmäßiger Kortikalisrand entstand (siehe Abb. 4.4.3.-3). Dieser war zu diesem frühen Zeitpunkt noch sehr gut abgrenzbar vom neu gebildeten knöchernen Kallusgewebe.



Ausschnittsvergrößerung folgt in Abb. 4.4.3.-3

Abb. 4.4.3.-2: Safranin-von-Kossa-Färbung, drei Wochen post operationem, Ausschnitt aus Abb. 4.4.3.-1 Gleichmäßig dichte Kortikalis, mit leichter Abrundung der operationsbedingt scharfkantigen Osteotomiegrenze. Zarte **knöcherne Kallustrabekel** überwiegend **periostal (1)** teilweise **interkortikal (3)**. Deutlich aufgelockerte **Hämatomstrukturen (2)**.

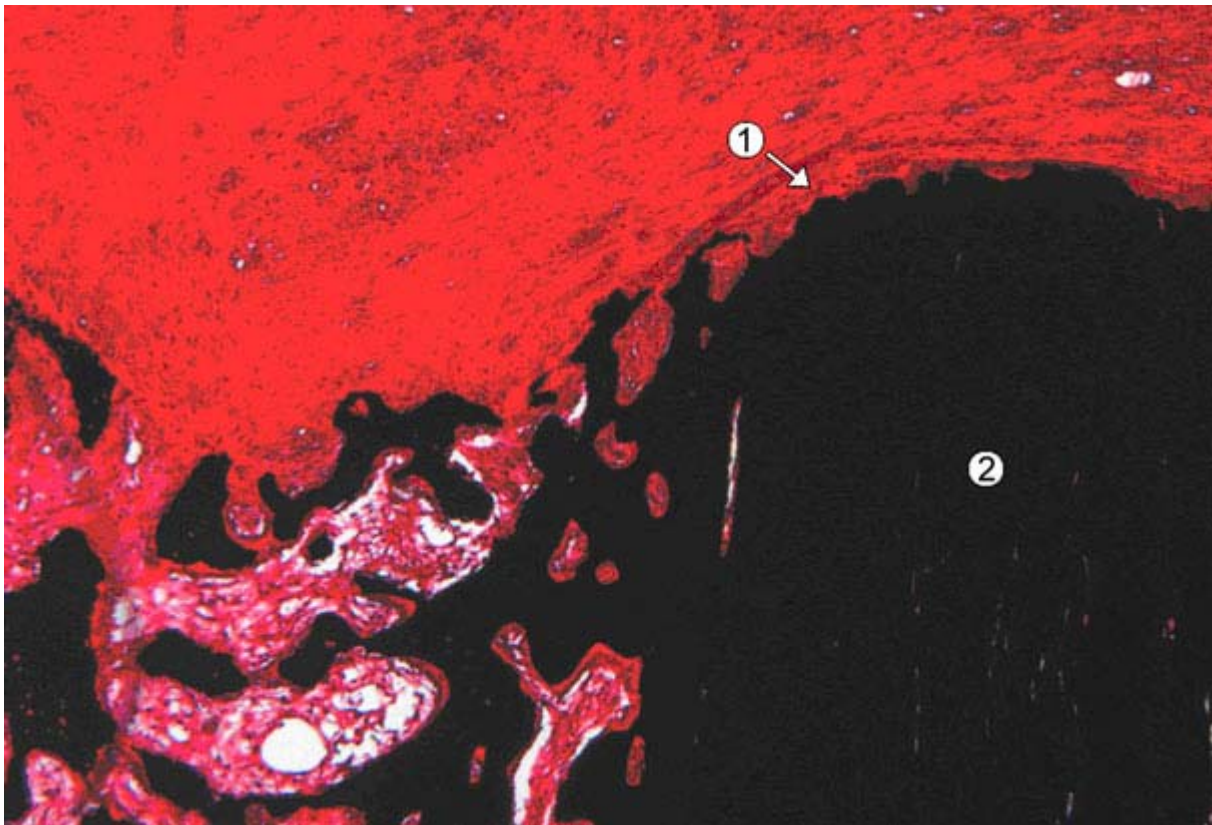


Abb. 4.4.3.-3: Safranin-von-Kossa-Färbung, drei Wochen post operationem, vergrößerter Ausschnitt eines Kortikalschnittes aus Abb. 4.3.3.-2. deutliche Abrundung und leichte Zackung der **Osteotomie**kante (1), beginnendes Kalluswachstum an der abgerundeten Ecke, diskontinuierliche knöcherne Trabekel, zwischen ihnen Bindegewebe und Gefäße. Über dem Kortikalisfragment im Osteotomiespalt intensiv rot angefärbter bindegewebiger Kallus sichtbar. Hohe **kortikale Dichte** (2) vorhanden.

### 3. Hämatom, Vorkommen, Zusammensetzung

Das Frakturhämatom befand sich weiterhin überwiegend im Osteotomiespalt interkortikal und teilweise auch außerhalb medial und lateral auf Spalthöhe. Im Vergleich zum Zweiwochenzeitpunkt war die Menge des Frakturhämatoms geringer. Es stellte sich im Vergleich zum Zweiwochenzeitpunkt aufgelockerter und in der Form nicht mehr so einheitlich dar (siehe Abb. 4.4.3.-2). Es bestand aus zahlreichen Zellen, die von Fibrinfäden und Bindegewebe durchzogen waren. Die überwiegende Zellzahl waren Erythrozyten und in geringerer Anzahl Abwehrzellen. Das Hämatom wirkte im Vergleich zum Zweiwochenzeitpunkt aufgelockert und wies zahlreiche Hohlräume zwischen den zusammengeballten Zellpaketen aus Erythrozyten auf (siehe Abb. 4.4.3.-3).

### 4. Kallusgewebe, Vorkommen, Zusammensetzung

Im zeitlichen Verlauf war bei allen Präparaten im Vergleich zum Zweiwochenzeitpunkt eine deutliche Zunahme der knöchernen Kallusbildung vorhanden. Die knöchernen Kallusbildung nahm, vor allem periostal und in geringerer Menge auch endostal, zu (siehe Abb. 4.4.3.-1). Im Vergleich zum Zweiwochenzeitpunkt nahm nicht nur die knöchernen Kallusfläche, sondern

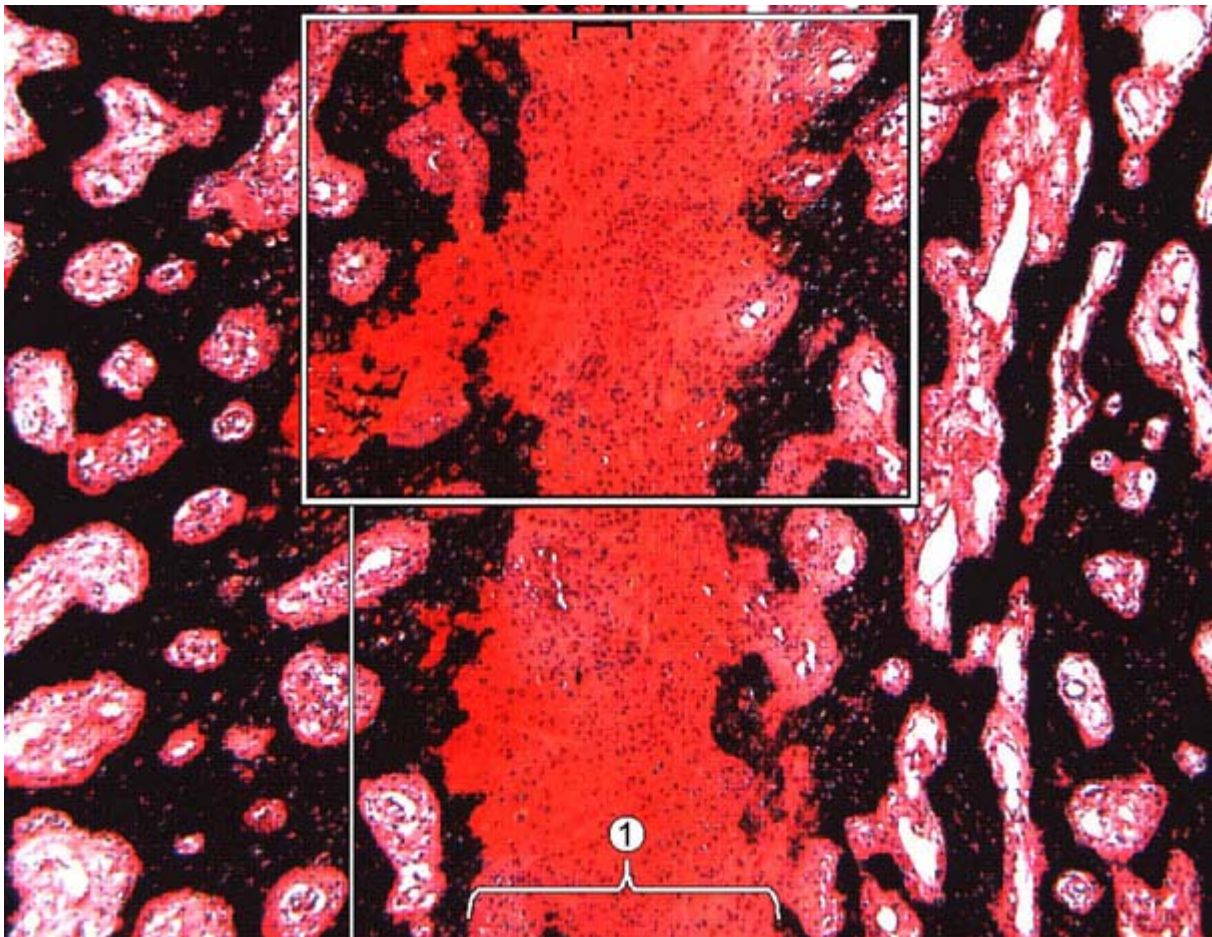
auch die Kallusdichte erheblich zu. Die geflechtartigen knöchernen Kallusausläufer wurden breiter und ließen eine erste richtungsweisende Anordnung erkennen. Die periostalen Kallustrabekel, die gegenüber dem verschobenen Fragment entstanden, wiesen einen überwiegend parallelen Verlauf zur Osteotomie auf. Der bindegewebige Anteil zwischen den knöchernen Kallustrabekeln nahm im Vergleich zum Zweiwochenzeitpunkt ab (siehe Abb. 4.4.3-4).

Neben dem medialen und lateralen periostalen Kallusgeflecht entstand zunehmend auch endostal knöchernes Kallusgewebe, wenn auch deutlich weniger als periostal. Interfragmentär bildeten sich vereinzelt zarte Knochenausläufer, die von den Osteotomieanten ausgingen und in den Spalt wuchsen, mit überwiegend zur Knochenachse parallelem Verlauf. Das knöcherne Kallusgewebe wies auch zu diesem Zeitpunkt ein einheitliches Aussehen auf. Außen waren die Knochenausläufer dicht mit kubischen Osteoblasten besetzt, welche Osteoid produzierten. Die periostalen knöchernen Kallusformationen stellten sich in einigen Präparaten kugelförmig dar und wuchsen in die Breite.

## **5. Knorpelgewebe, Vorkommen**

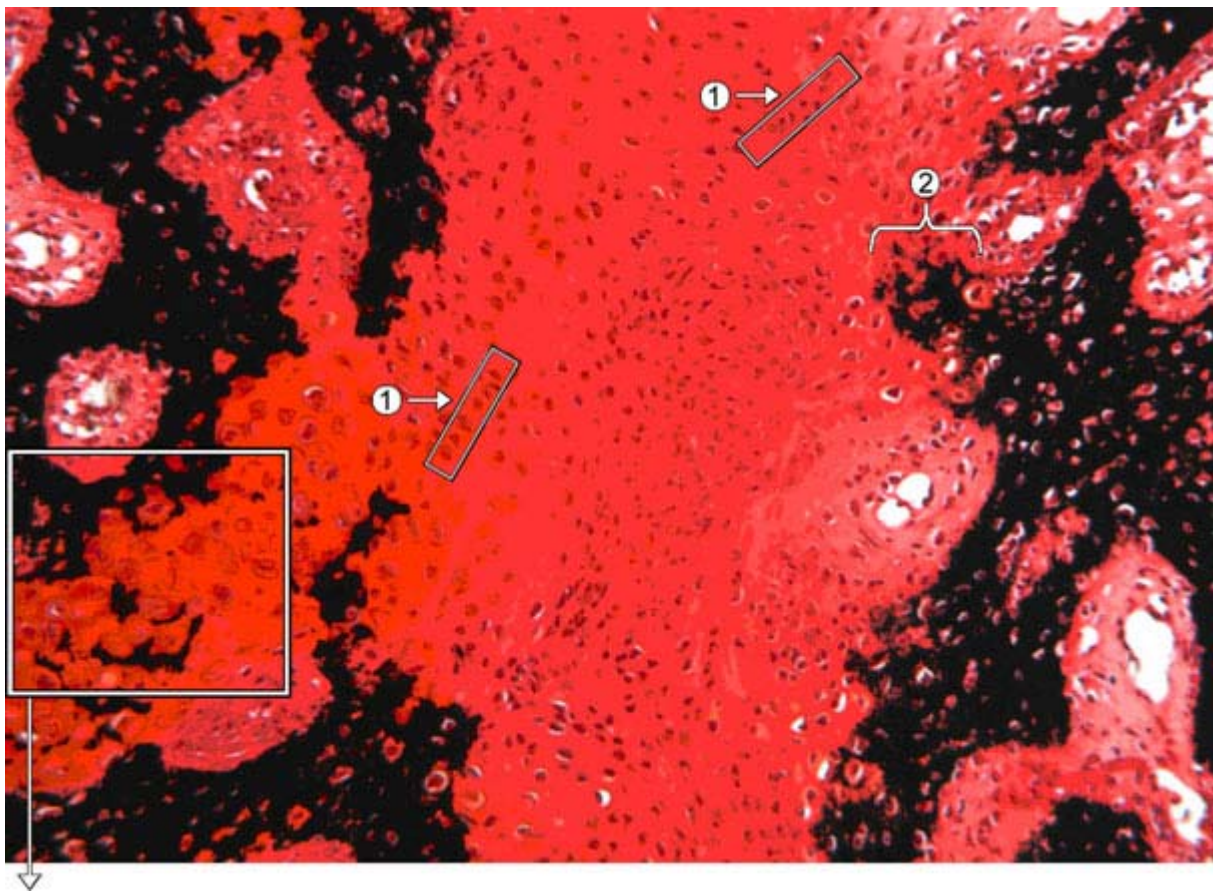
Im Vergleich zum Zweiwochenzeitpunkt nahm die Knorpelmenge deutlich zu. Bei allen Präparaten traten zunehmend knorpelige Areale auf. Diese Knorpelinseln waren vor allem im periostalen Kallus auf Höhe des Osteotomiespalt zwischen den proximalen und distalen knöchernen Kallusformationen. Die Knorpelbereiche lagen immer in unmittelbarer Nähe zum knöchernen Kallus. Außerdem befand sich in der Mehrzahl der Präparate im Osteotomiespalt ein diskontinuierlicher breiter Saum von Knorpelzellen, der ebenfalls direkt an Kallusgewebe angrenzte (siehe Abb. 4.4.3.-4).

Die Knorpelzellen lagen in kleinen Gruppen zusammen, teilweise war eine säulenförmige Anordnung vorhanden (siehe Abb. 4.4.3.-5) und sie waren überwiegend hypertroph. Sie wiesen ein homogenes, gering angefarbtes Zytoplasma auf und hatten einen ovalen bis runden Zellkern, außen waren sie von einer deutlich angefarbten Knorpelkapsel umgeben (siehe Abb. 4.4.3.-6). Das Knorpelgewebe zeigte die verschiedenen Phasen der Mineralisation auf (siehe Abb. 4.4.3.-6). Die Mineralisationsbereiche der hypertrophen Knorpelzellen waren in der Safranin-Orange/von-Kossa-Färbung als kleine schwarze, ungleichmäßige körnige Strukturen erkennbar, dabei handelte es sich um granulierten Ossifikationsfronten (siehe Abb. 4.4.3.-6). Die unmineralisierten Knorpelzellen waren in der Safranin-von-Kossa-Färbung intensiv rot angefarbt (siehe Abb. 4.4.3.-6).



Ausschnittsvergrößerung folgt in Abb. 4.4.3.-5.

Abb. 4.4.3.-4: Safranin-von-Kossa-Färbung, drei Wochen post operationem, mittig rot angefärbter, durchgehender **breiter Spalt (1)** zwischen den knöchernen Kallusformationen, im Spalt viele Chondrozyten und an den Übergangsbereichen von knöchernem Kallus zu knorpeligem Kallus sind vermehrt granulierte Bezirke der chondralen Ossifikation erkennbar.



Ausschnittsvergrößerung folgt in Abb. 4.4.3.-6

Abb. 4.4.3.-5: Safranin-von-Kossa-Färbung, drei Wochen post operationem, Ausschnitt aus vorheriger Abbildung, überwiegend **Chondrozyten** vorhanden, welche sich teilweise **säulenförmig (1)** anordnen, **granulierte Mineralisationsfronten (2)** im Rahmen der enchondralen Ossifikation sind erkennbar in den Übergangsbereichen von Knorpel- zu Knochengewebe.

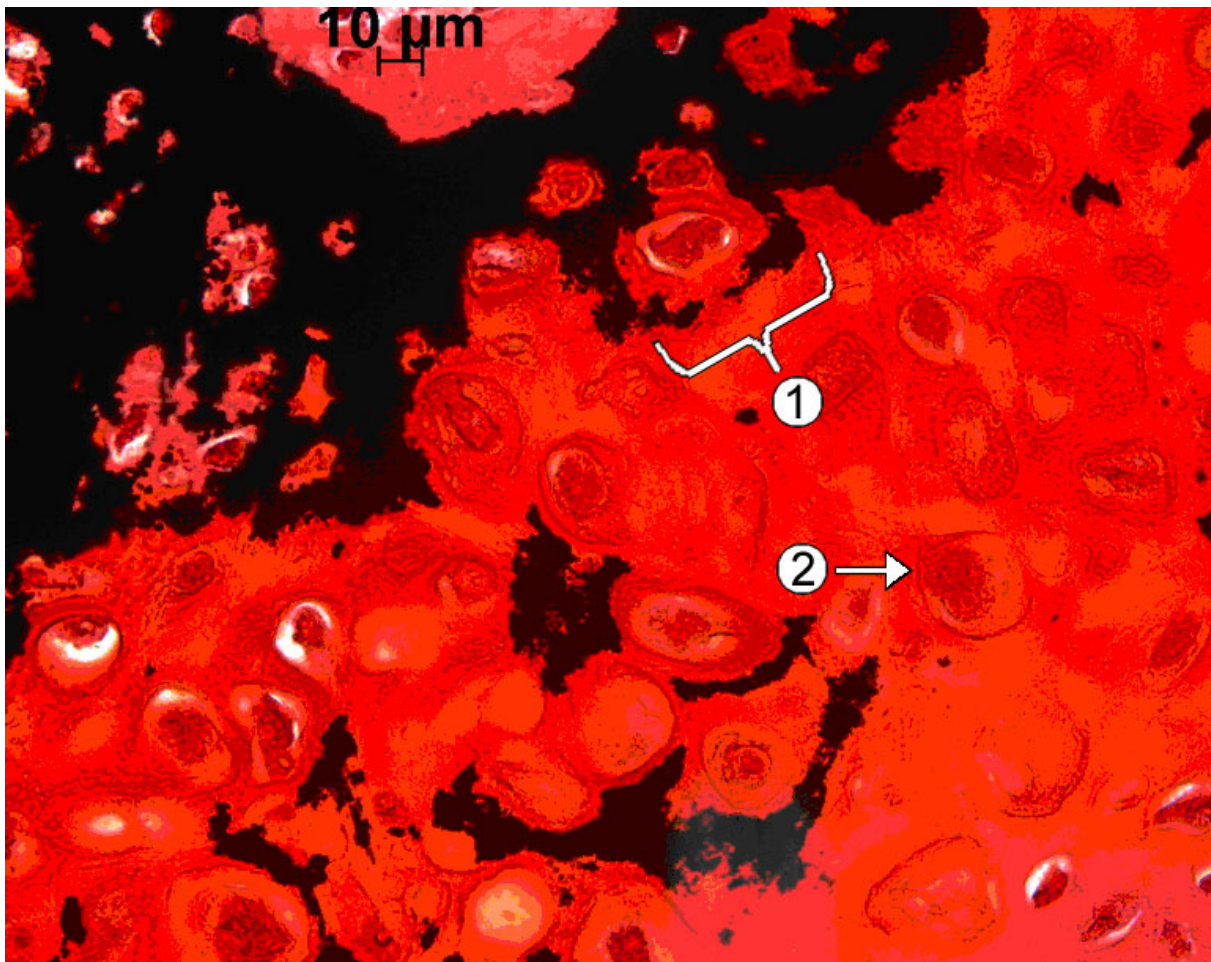


Abb. 4.4.3.-6: Safranin-von-Kossa-Färbung, drei Wochen post operationem, Ausschnitt aus Abb. 4.4.3.-5 Knorpelzellen in den verschiedenen Phasen der Mineralisation. **Unmineralisierte Knorpelzellen (2)** sind intensiv rot angefärbt, sie besitzen einen ovalen bis runden Zellkern und sind teilweise großblasige Zellen, die von der Knorpelmatrix umgeben sind und in Knorpelhöhlen lagern. Die schwarz granulierten Bereiche sind Bezirke der Mineralisation im Rahmen der enchondralen Ossifikation. **(1)** kennzeichnet eine **Knorpelzelle**, deren umgebene Matrix sich in **Mineralisation** befindet.

## 6. Osteotomiespalt allgemein

Trotz der fortschreitenden Kallusbildung im Vergleich zum Zweiwochenzeitpunkt kam es bei keinem der Präparate zur knöchernen kallösen Vereinigung der Osteotomiefragmente. Es blieb ein deutlich durchgehender Spalt, in dem sich überwiegend zellreicher, bindegewebiger Kallus, Knorpelgewebe und Hämatomreste befanden. Der bindegewebige Faserverlauf, welcher mittels der Azan-Färbung gut beurteilt werden konnte, war überwiegend ungerichtet, vereinzelt durchzogen kleine Faserbündel parallel zur Osteotomie-richtung den Spalt, wobei die Fasern selbst wellenartig verliefen.

## 7. Osteoklasten als Zeichen von Abbauvorgängen

Zum Dreiwochenzeitpunkt traten erste knochenabbauende Osteoklasten im Rahmen von aktiven Resorptionsvorgängen auf. Diese mehrkernigen Riesenzellen waren in kleinen

Knochenlakunen angeordnet (siehe Abb. 4.4.3.-7). Diese Umbauvorgänge des Knochens erfolgten hauptsächlich periostal an den Kortikalisbereichen, die jeweils am weitesten entfernt waren von dem gegenüberliegenden verschobenen Fragment. Die Osteoklasten waren über eine Verschmelzungszone (ruffled border) direkt mit dem Knochen verbunden (siehe Abb. 4.4.3.-7). Des Weiteren kamen sie an den Übergängen von bindegewebigem zum knöchernen Kallus vor.

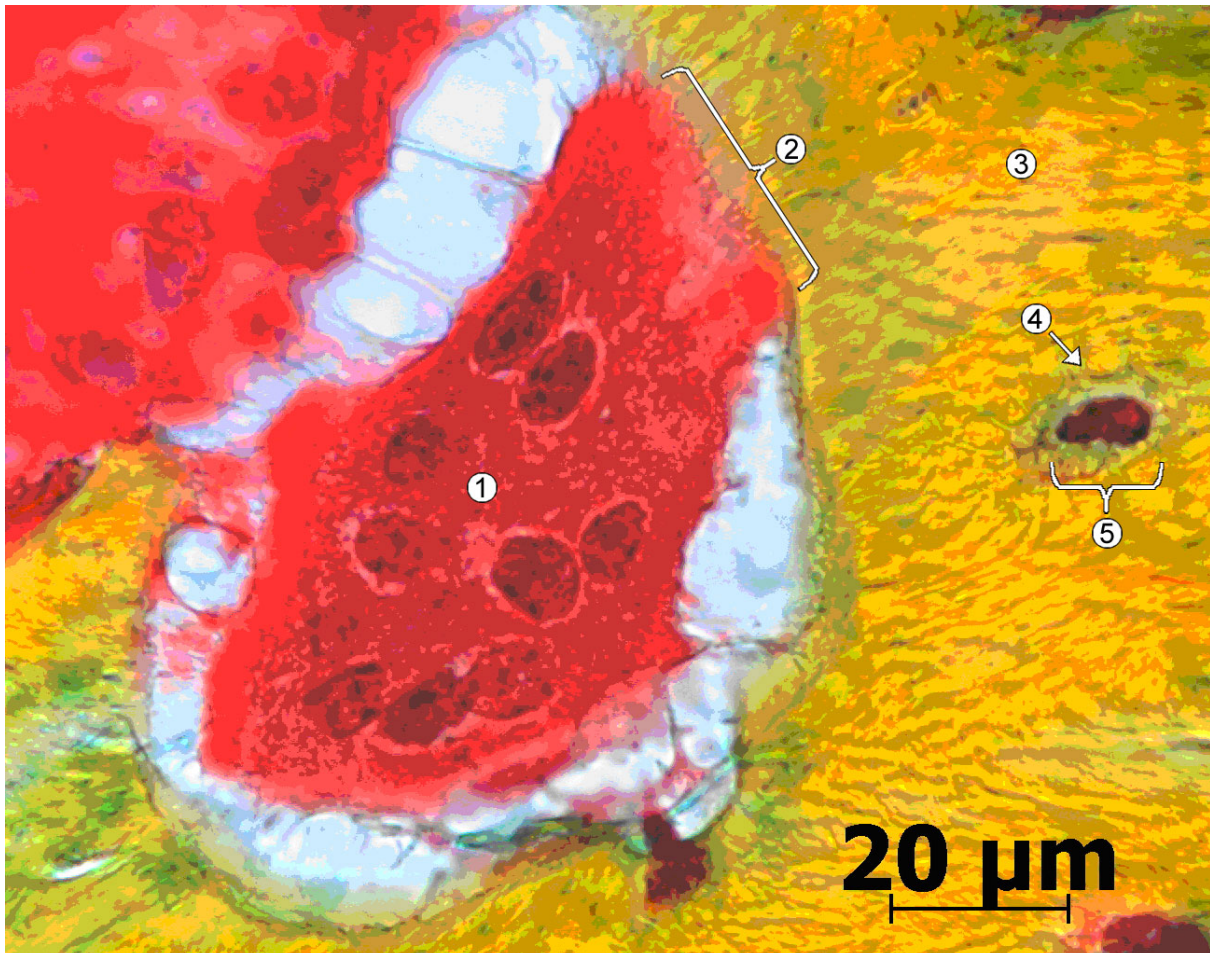


Abb. 4.4.3.-7: Movat-Pentachrom-Färbung, dargestellt ist ein rot angefarbter mehrkerniger **Osteoklast** (1), welcher direkt über eine **Verschmelzungszone (ruffled border)** (2) mit dem anliegenden **Knochen** (3) fest verbunden ist. Der Osteoklast liegt in einer deutlich bogenförmig verlaufenden Howship'schen Knochenlakune. Im gelblich angefarbten Knochen befindet sich ein wesentlich kleinerer **Osteozyt** (5), welcher über **Zytoplasmafortsätze (gap junctions)** (4) mit anderen Zellen kommuniziert.

#### 4.4.4. Sechs Wochen post operationem

In die Auswertung gingen 24 histologische Präparate von insgesamt acht Tieren mit einer Standzeit von sechs Wochen ein.

### **1. Fragmentverschiebung**

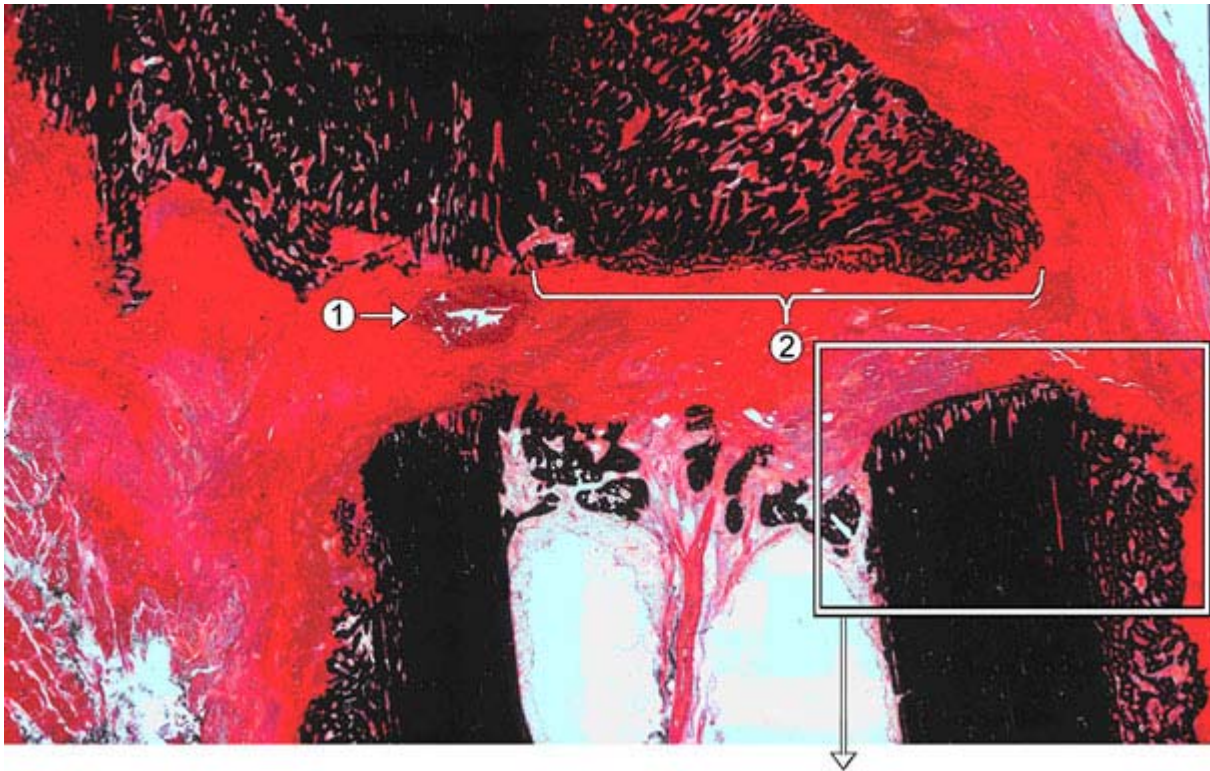
Bei allen ausgewerteten Schnitten lagen Fragmentverschiebungen von mindestens einer und maximal zweieinhalb Kortikalisbreiten vor. Somit lag bei Schnitten mit Verschiebungen von über zwei Kortikalisbreiten dem verschobenen Fragment kein Knochen des anderen Fragmentes gegenüber, sondern Weichteilstrukturen wie Muskeln und Bindegewebe.

### **2. Dichte der spaltnahen Kortikalis, kortikale Osteotomieanten**

Die spaltnahe kortikale Dichte war zum Sechswochenzeitpunkt herabgesetzt. Im Vergleich zu den vorherigen Zeitpunkten wirkte die spaltnahe Kortikalis in mehreren Bereichen etwas aufgelockert, es waren vereinzelt längliche, sehr schmale Spalten als dezente Hohlräume in den Kortizes in Osteotomiespaltnähe vorhanden (siehe Abb. 4.4.4.-2).

An den ursprünglich glatten Osteotomieanten waren anhand von verstärkten Zackungen und ungleichmäßigen Osteotomieanten der einzelnen Kortizes deutliche Resorptionszonen erkennbar. Die ehemaligen Osteotomieanten waren nur noch schwer abzugrenzen. Die Kortikalis wies in den periostalen und endostalen Randbereichen Bezirke auf, in denen die ursprüngliche lamelläre Knochenarchitektur durch Geflechtknochen und Bindegewebe ersetzt war. Es kam zu deutlichen Abrundungen an den äußeren Kortikaliskanten, die am weitesten vom anderen verschobenen Fragment entfernt waren (siehe Abb. 4.4.4.-1). Um diese abgerundeten Kortikalisecken zogen vermehrt bogenförmig angeordnete Bindegewebsfasern. Diese Abrundungen traten vermehrt bei den Präparaten auf, bei denen große Fragmentverschiebungen von mehr als einer Kortikalisbreite vorlagen.





Ausschnittsvergrößerung folgt in Abb. 4.4.4.-2.

Abb. 4.4.4.-1: Safranin-von-Kossa-Färbung, sechs Wochen post operationem, viel knöcherne Kallusbildung, große **periostale nasenförmige Kallusformation (2)** wächst gegenüber dem verschobenen Fragment und bildet dadurch ein knöchernes Gegenstück. Die spaltnahe kortikale Dichte ist reduziert, man erkennt längliche schmale Hohlräume und kann die ehemalige Osteotomiegrenze nur noch schwer erkennen aufgrund des Kalluswachstums auf der Kortikalsfläche. **Gefäß (1)** im Osteotomiespalt erkennbar.

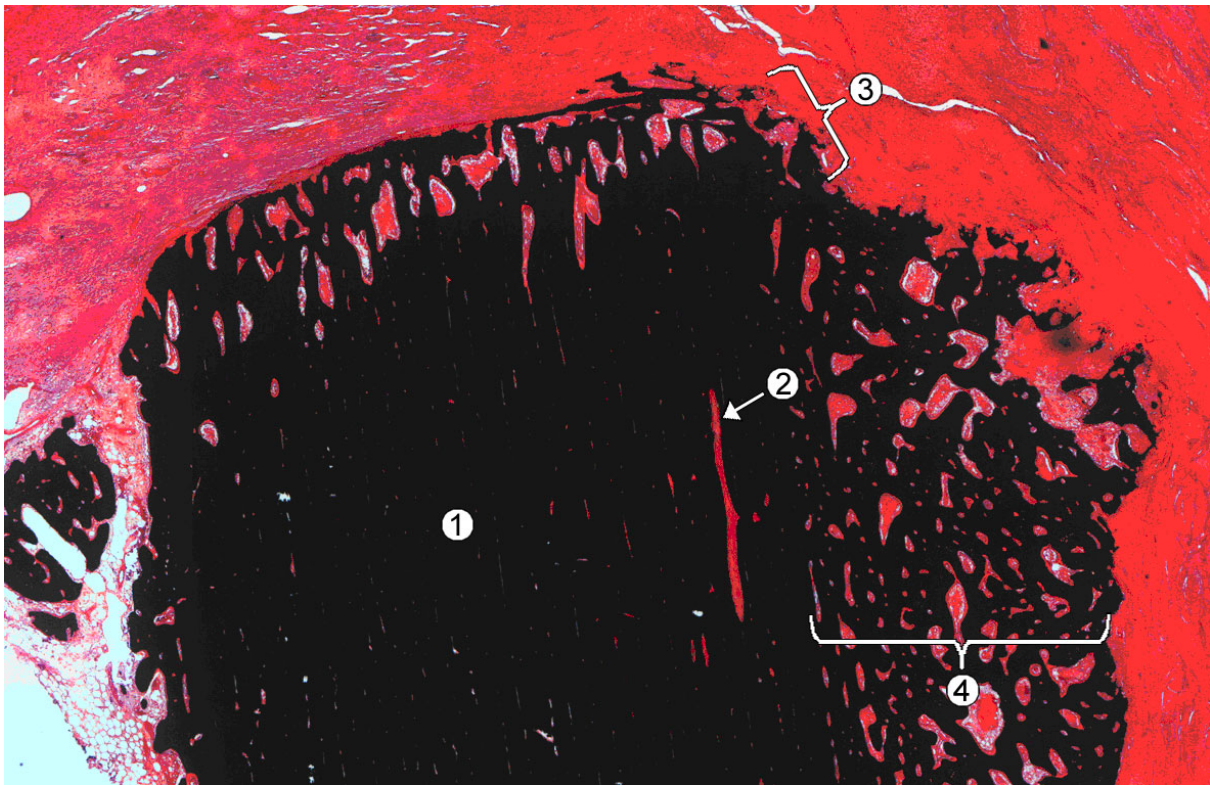


Abb. 4.4.4.-2: Safranin-von-Kossa-Färbung, sechs Wochen post operationem, Ausschnitt aus Abb. 4.4.4.-1 Auflockerung der spaltnahen **Kortikalis (1)** anhand von überwiegend **länglichen Hohlräumen (2)**, Zackungen und Einbuchtungen erkennbar. Keine genaue Grenze zwischen ehemaliger Osteotomiekannte und neuem Kallusgewebe erkennbar **(3)**. Periostal dichte knöcherne **Kallusbildung (4)**, mit kontinuierlichen breiten Knochen trabekeln.

### 3. Hämatom, Vorkommen, Zusammensetzung

Zu diesem fortgeschrittenem Heilungszeitpunkt wurden nur noch in einem Präparat Hämatomreste interfragmentär im Osteotomiespalt nachgewiesen, diese waren von bindegewebigem Kallus umgeben. Diese Hämatomstrukturen stellten sich als kleine längliche Areale von zusammengeballten Erythrozyten dar. Bei allen anderen Präparaten ließen sich weder interfragmentär noch außerhalb des Osteotomiespalt es Hämatomstrukturen nachweisen.

### 4. Kallusgewebe, Vorkommen, Zusammensetzung

Die knöcherne Kallusbildung hat im Vergleich zum Dreiwochenzeitpunkt kontinuierlich zugenommen. Vor allem periostal in den Bereichen, die dem anderen verschobenen Fragment gegenüberliegen, hier ist die größte Kalluszunahme zu verzeichnen. An der periostalen Seite, die am weitesten entfernt ist vom verschobenen Gegenfragment, war die knöcherne Kallusmenge im Vergleich zum Dreiwochenzeitpunkt eher reduziert (siehe Abb. 4.4.4.-1). Der Knochenquerschnitt in der Osteotomieregion nahm durch das vermehrte Kalluswachstum im Vergleich zum Dreiwochenzeitpunkt ebenfalls erheblich zu. Neben der medialen und lateralen periostalen Kalluszunahme kam es auch endostal zu einem

vermehrten knöchernen Kalluswachstum. Die endostalen diskontinuierlichen Kallustrabekel wuchsen überwiegend parallel zum Osteotomiespalt auf die benachbarte Kortikalis zu (siehe Abb. 4.4.4.-1). Bei den Präparaten von zwei Tieren war der Markraum fast vollständig knöchern durchbaut.

Das knöcherne Kallusgewebe nahm im Vergleich zum Dreiwochenzeitpunkt weiter an Dichte zu, der bindegewebige Anteil zwischen dem Geflechtknochennetzwerk wurde geringer. Im knöchernen Kallusgewebe selbst waren Umbauvorgänge erkennbar, das Kallusgewebe stellte sich nicht mehr so einheitlich dar, wie zu den vorherigen Zeitpunkten. Es wies strukturell unterschiedliche Bereiche auf. Teilweise wirkte es sehr dicht, kompakt und gleichmäßig, und in anderen Regionen war es aufgelockert und zeigte ungleichmäßige Mineralisationsbezirke, die durch eine unterschiedlich starke Anfärbung gekennzeichnet waren. Auch die Osteoidbildung war in den aufgelockerten Kallusbezirken geringer als in den dichten kompakten Bereichen. Die Knochen trabekel im Kallus waren überwiegend gerichtet angeordnet. Der Kallus wuchs bei den stark verschobenen Präparaten periostal proximal in Gestalt einer nasenförmigen Ausziehung in Richtung auf das verschobene Fragment zu, dabei waren die Trabekel überwiegend „nasenspitzenwärts“ ausgerichtet, und die untere Begrenzung verlief parallel zum Osteotomiespalt (siehe Abb. 4.4.4.-1). Die Spitze des nasenförmigen Kallusgewebes reichte so weit, dass sie dem verschobenen Fragment gegenüberlag (siehe Abb. 4.4.4.-1). Die Kallusformation befand sich somit in dem Bereich, in dem ohne vorliegende Fragmentverschiebung das gegenüberliegende Osteotomiefragment liegen würde.

### **5. Knorpelgewebe, Vorkommen**

An den spaltnahen Randbereichen des Kallusgewebes befanden sich längliche Bezirke mit zum größten Teil säulenförmig angeordneten hyalinen Knorpelzellen (siehe Abb. 4.4.4.-3), welche überwiegend großblasig waren. Im Osteotomiespalt lag das Knorpelgewebe wie ein Verbindungsglied zwischen den proximalen und distalen Kallusformationen, es durchzog den Spalt fast auf ganzer Länge in Form eines ungefähr ein Millimeter breiten Knorpelsaumes. In der Safranin-von-Kossa-Färbung ließen sich in der unmittelbaren Umgebung dieser Knorpelzellen vermehrt Mineralisationsbereiche anhand granulierter Ossifikationsfronten erkennen. Das Knorpelvorkommen nahm im Vergleich zum Dreiwochenzeitpunkt weiter zu. Auch außerhalb des Osteotomiespalt es waren aneinander gelagerte Knorpelzellinseln vorhanden. Diese befanden sich zwischen den proximalen und distalen knöchernen Kallusformationen.

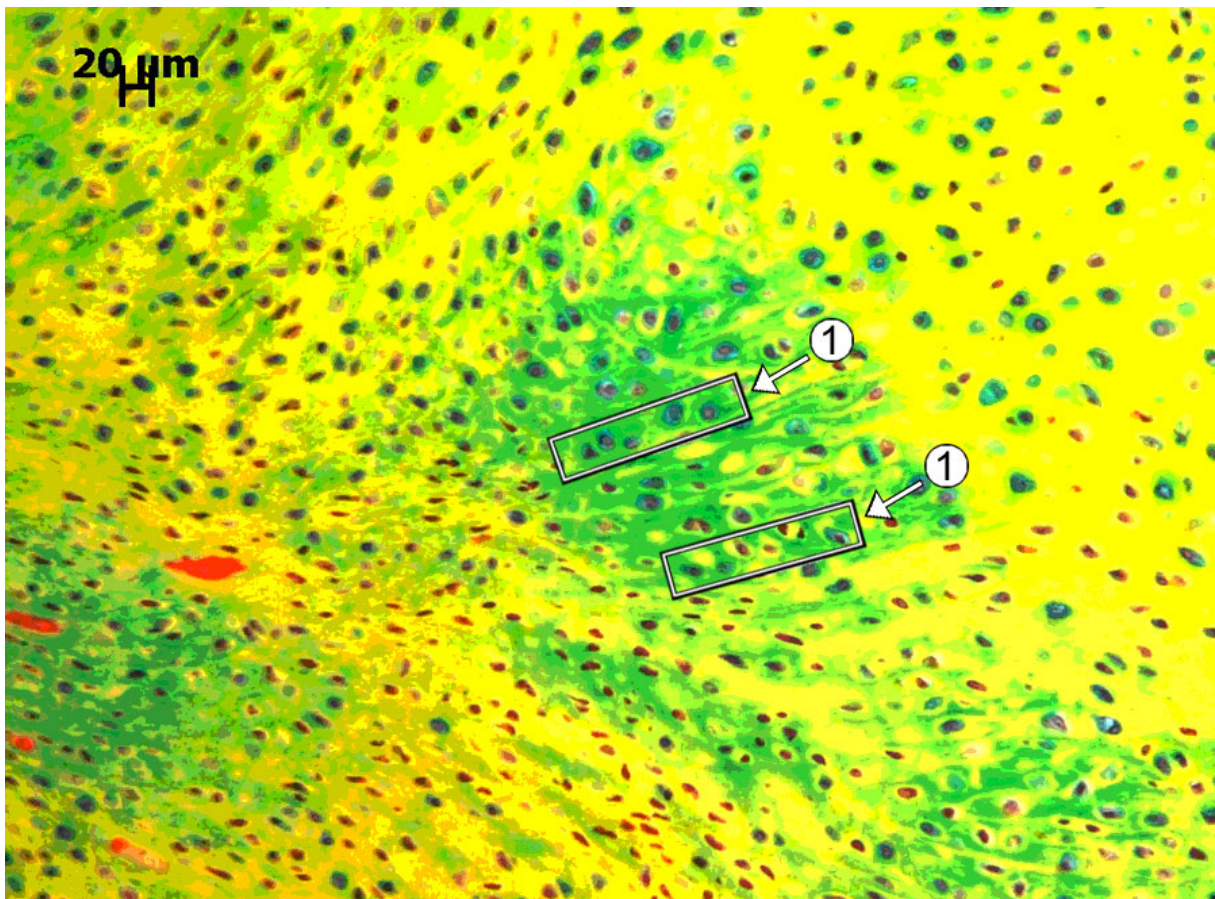


Abb. 4.4.4.-3: Movat-Pentachrom-Färbung, sechs Wochen post operationem, Knorpelgewebe im Osteotomiespalt zwischen den knöchernen Kallusformationen. Die **Knorpelzellen** des hyalinen Knorpelgewebes zeigen vermehrt eine **säulenförmige Anordnung (1)**.

## 6. Osteotomiespalt allgemein

Obwohl die Kallusgröße im Vergleich zum Dreiwochenzeitpunkt erheblich zugenommen hat, kam es bei keinem der Präparate zur knöchernen Überbrückung und Vereinigung der Osteotomiefragmente. Bei allen Präparaten war zu diesem Zeitpunkt noch ein deutlicher Spalt von einem bis zwei Millimetern Breite vorhanden. Die dichten Geflechtknochenformationen der beiden Osteotomiefragmente waren durch einen durchgehenden bindegewebigen und knorpeligen Spalt verbunden. Dieses interfragmentäre Gewebe wurde von zahlreichen Bindegewebsfasern durchzogen, die überwiegend wellenförmig angeordnet waren und hauptsächlich parallel zur Osteotomie verliefen. Des Weiteren befand sich bei drei Präparaten im Osteotomiespalt zwischen den bindegewebigen und knöchernen Kallusformationen ein länglicher schmaler Spalt.

## 7. Osteoklasten als Zeichen von Abbauvorgängen

Bei allen Präparaten fand man in osteotomienahen Abschnitten der Kortizes in kleinen Lakunen knochenabbauende Osteoklasten, (siehe Abb. 4.4.4.-4). Auch im knöchernen Kallusgewebe fand man ein zunehmendes Vorkommen von knochenabbauenden Osteoklasten. Beim genauen Fokussieren der verschiedenen Ebenen des Präparates

erkannte man die Verschmelzungszone (ruffled border) des Osteoklasten mit dem Knochen in Form von feinsten Härchen, die fest mit dem Knochen verankert waren. Im Vergleich zum Dreiwochenzeitpunkt hat die Anzahl der Osteoklasten deutlich zugenommen.

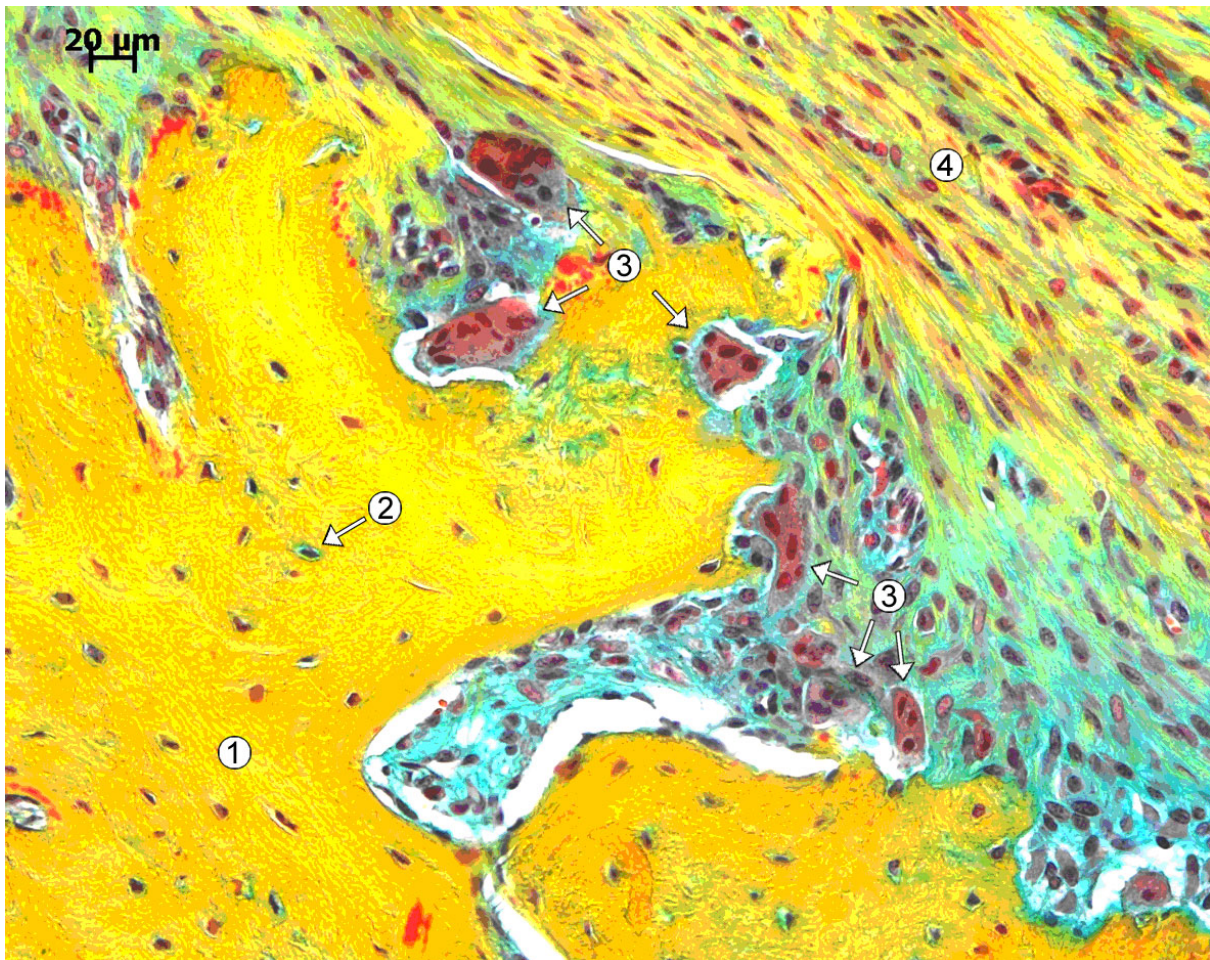


Abb. 4.4.4.-4: Movat-Pentachrom-Färbung, sechs Wochen post operationem. Gelb stellt sich **knöchernes Kallusgewebe (1)** dar, mit ummauerten **Osteozyten (2)**. In den ungleichmäßigen und gezackten Rändern und Übergängen vom knöchernen zum **bindegewebigen Kallus (4)** lagern in einzelnen Knochenlakunen vermehrt **Osteoklasten (3)**, welche in direktem Knochenkontakt stehen. Vereinzelt sind kleine rote Bezirke vorhanden, welche von Osteoblasten neu gebildetes Osteoid darstellen. Deutliche Umbauvorgänge in Form einer Knochenresorption durch Osteoklasten sind erkennbar.

#### 4.4.5. Neun Wochen post operationem

In die Auswertung gingen 24 histologische Präparate von insgesamt acht Tieren mit einer Standzeit von neun Wochen ein.

## 1. Fragmentverschiebung

Bei allen Präparaten waren Fragmentverschiebungen von einer bis zu zweieinhalb Kortikalisbreiten vorhanden (siehe Abb. 4.4.5.-1). Aufgrund dieser starken Fragmentverschiebungen lag teilweise nicht Knochenfragment auf Knochenfragment, sondern den einzelnen Osteotomiefragmenten lag Bindegewebe, Knorpelgewebe und zunehmend auch knöchernes Kallusgewebe gegenüber. Dieses knöchernen Kallusgewebe war teilweise sehr schwer vom ursprünglichen Knochengewebe abzugrenzen, da es in einigen Bereichen genauso dichte Bezirke aufwies wie das ursprüngliche Knochengewebe.

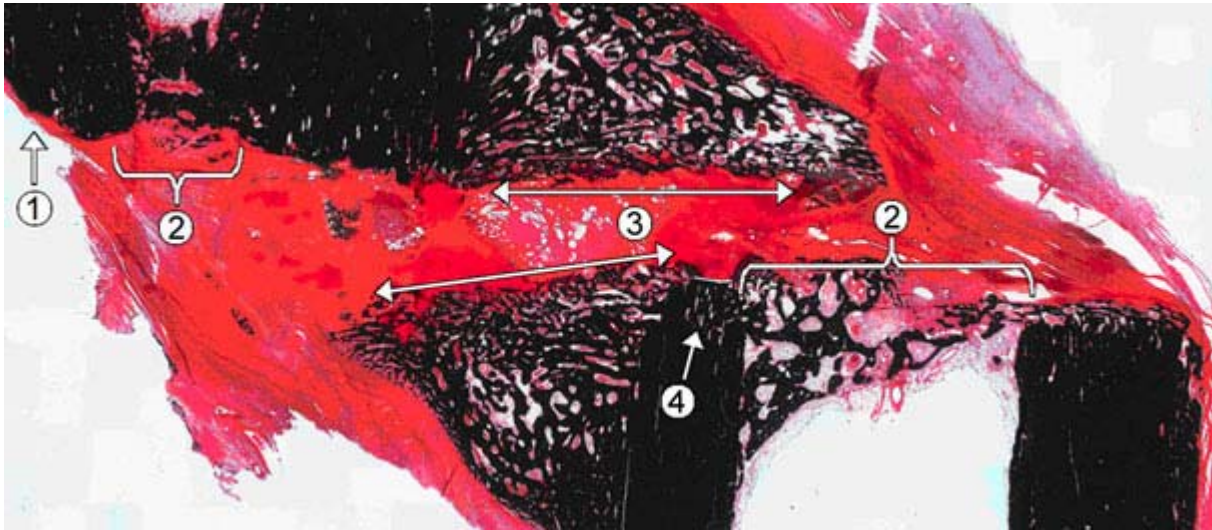


Abb. 4.4.5.-1: Safranin-von-Kossa-Färbung, neun Wochen post operationem, starke Fragmentverschiebung von mehr als zwei Kortikalisbreiten vorhanden. Eine große **periostale knöchernen Kallusbildung (3)** ist jeweils an der periostalen Seite, die dem verschobenen Gegenfragment am nächsten liegt, zu erkennen. Deutliche Reduktion der **spaltnahen kortikalen Dichte (4)**. Abrundung der **äußeren Kortikalisecken (1)**, die jeweils vom verschobenen Gegenfragment am weitesten entfernt liegen. Knöchernen Überbauung des **Markraumes (2)** durch endostales Kallusgewebe vorhanden.

## 2. Dichte der spaltnahen Kortikalis, kortikale Osteotomieanten

Die Dichte der spaltnahen Kortikalis war in allen untersuchten Präparaten aufgelockert, es waren im Vergleich zum Sechswochenzeitpunkt mehr längliche spaltförmige Hohlräume vorhanden (siehe Abb. 4.4.5.-1). An den ehemaligen Osteotomieanten waren fließende Übergänge zwischen aufgelockertem Lamellenknochen und dichtem neu gebildeten Geflechtknochen vorhanden, nur noch an wenigen Stellen konnte man das neu gebildete Kallusgewebe gut abgrenzen (siehe Abb. 4.4.5.-2). Es kam zu deutlichen Abrundungen vor allem an den äußeren Kortikaliskanten, die am weitesten entfernt waren vom anderen Fragment, also in den Bereichen, wo der Kortikalis eines Fragmentes aufgrund der starken Fragmentverschiebung kein Knochen des anderen Fragmentes, sondern Weichteilstrukturen gegenüber lagen (siehe Abb. 4.4.5.-1).

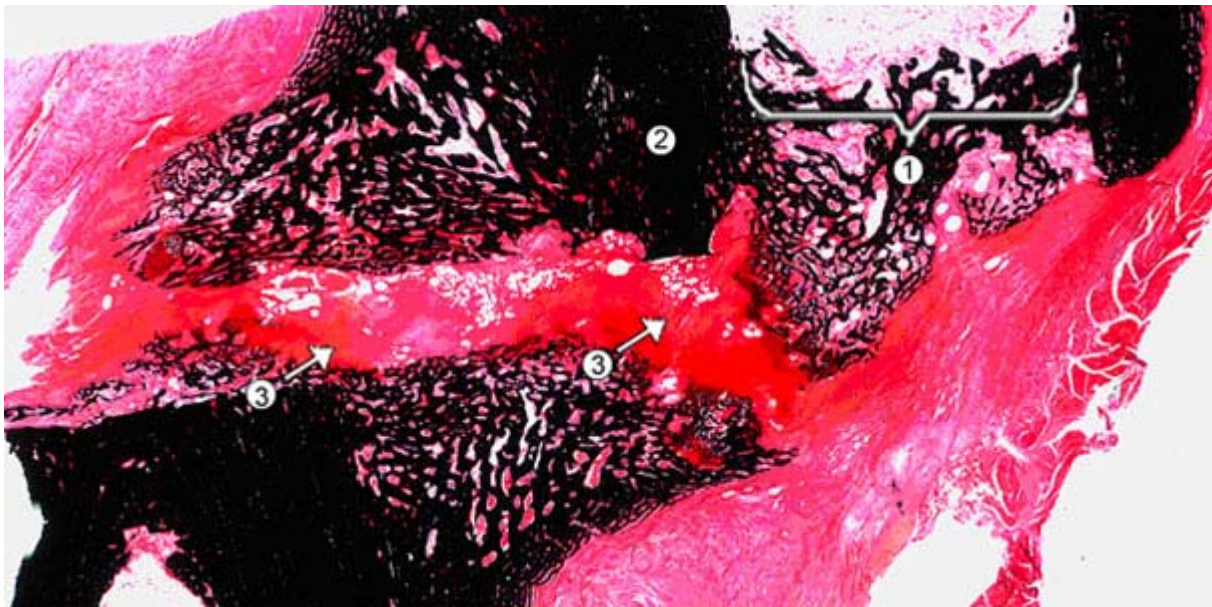


Abb. 4.4.5.-2: Safranin-von-Kossa-Färbung, neun Wochen post operationem, aufgrund der starken Fragmentverschiebung liegen der dem anderen Fragment zugewandten Kortikalis Kallusgewebe und Weichteilstrukturen gegenüber. Knöcherne Durchbauung des Markraumes durch großen **endostalen Kallus (1)** zu erkennen. Es ist ein deutlich durchgehender breiter bindegewebiger und knorpeliger Spalt zwischen den Fragmenten vorhanden. Kein knöcherner Kallus vorhanden an periostaler Kortikalis, die jeweils am weitesten vom verschobenen Fragment entfernt ist. Die **spaltnahe kortikale Dichte (2)** ist reduziert. Am Übergang vom knöchernen Kallus zum Osteotomiespalt befinden sich viele leuchtend rote Bezirke, die **Knorpelgewebe (3)** darstellen.

### 3. Hämatom, Vorkommen, Zusammensetzung

Zum Neunwochenzeitpunkt konnten in keinem der Präparate, weder interfragmentär noch außerhalb des Spaltes, Hämatomstrukturen nachgewiesen werden. Die Hämatomstrukturen waren zu diesem fortgeschrittenen Zeitpunkt vollständig abgebaut.

### 4. Kallusgewebe, Vorkommen, Zusammensetzung

Die knöcherne Kallusbildung hat im Vergleich zum Sechswochenzeitpunkt weiterhin zugenommen. Somit war zum Neunwochenzeitpunkt der größte Kallusumfang während des beobachteten Versuchszeitraumes vorhanden. Die periostalen knöchernen Kallusanteile wuchsen medial und lateral bogenförmig von proximal und distal aufeinander zu und waren durch einen überwiegend knorpeligen und in geringeren Anteilen bindegewebigen Spalt voneinander getrennt. Auffällig war die Reduktion der periostalen knöchernen Kallusanteile an den äußeren Kortizes, die jeweils am weitesten entfernt waren vom anderen Fragment, hier war der knöcherne Kallusanteil verglichen mit dem des Sechswochenzeitpunktes deutlich verringert (siehe Abb. 4.4.5.-1; Abb. 4.4.5.-2). Der endostale Anteil des Kallusgewebes überbrückte in zwei Dritteln der Präparate den Markraum vollständig auf Höhe des Osteotomiespaltes (siehe Abb. 4.4.5.-2), bei den übrigen Präparaten waren ebenfalls endostal knöcherne Kallusformationen vorhanden, welche jedoch den Markraum nicht vollständig, sondern diskontinuierlich überbrückten.

Sehr imposant war die Zunahme der interkortikalen knöchernen Kallusanteile im Vergleich zum Sechswochenzeitpunkt. Die ursprünglich glatten Osteotomieanten wurden durch dieses interkortikale Kalluswachstum deutlich umgestaltet und waren teilweise nicht mehr abgrenzbar vom neu gebildeten Kallusgewebe. Es kam zu fließenden Übergängen des dichten Geflechtknochennetzes und der angrenzenden aufgelockerten Kortikalis. Wobei die Ausrichtung der dichten knöchernen Kallusmassen einen mehr senkrechten Verlauf zur Knochenlängsachse aufwies, im Gegensatz zur Knochenstruktur der Kortikalis, welche einen parallelen Verlauf zur Knochenlängsachse aufwies.

Das knöcherne Kallusgewebe wurde in allen Bereichen (periostal, endostal, interkortikal) dichter, und die bindegewebigen Zwischenräume zwischen den einzelnen Knochen trabekeln wurden kleiner (siehe Abb. 4.4.5.-3). Es traten vermehrt Bezirke auf, in denen knochenaufbauende Osteoblasten neben knochenabbauenden Osteoklasten vorkamen. Interfragmentär in unmittelbarer Kortikalisnähe wies der kallöse Knochen im strukturellen Aufbau erste Anzeichen von Lamellenknochen auf, wobei vereinzelt erste Osteone, welche einen senkrechten Verlauf zur Knochenlängsachse aufwiesen, auftraten. Das Kallusgewebe zeigte große strukturelle Variationen auf, während es spaltnah sehr dicht und kompakt war, wirkte es osteotomiespaltfern weniger homogen und auch weniger kompakt. In den peripheren Bereichen medial sowie auch lateral befand sich der knöcherne Kallus im Umbau und wies unterschiedlich starke Mineralisationsbereiche auf.



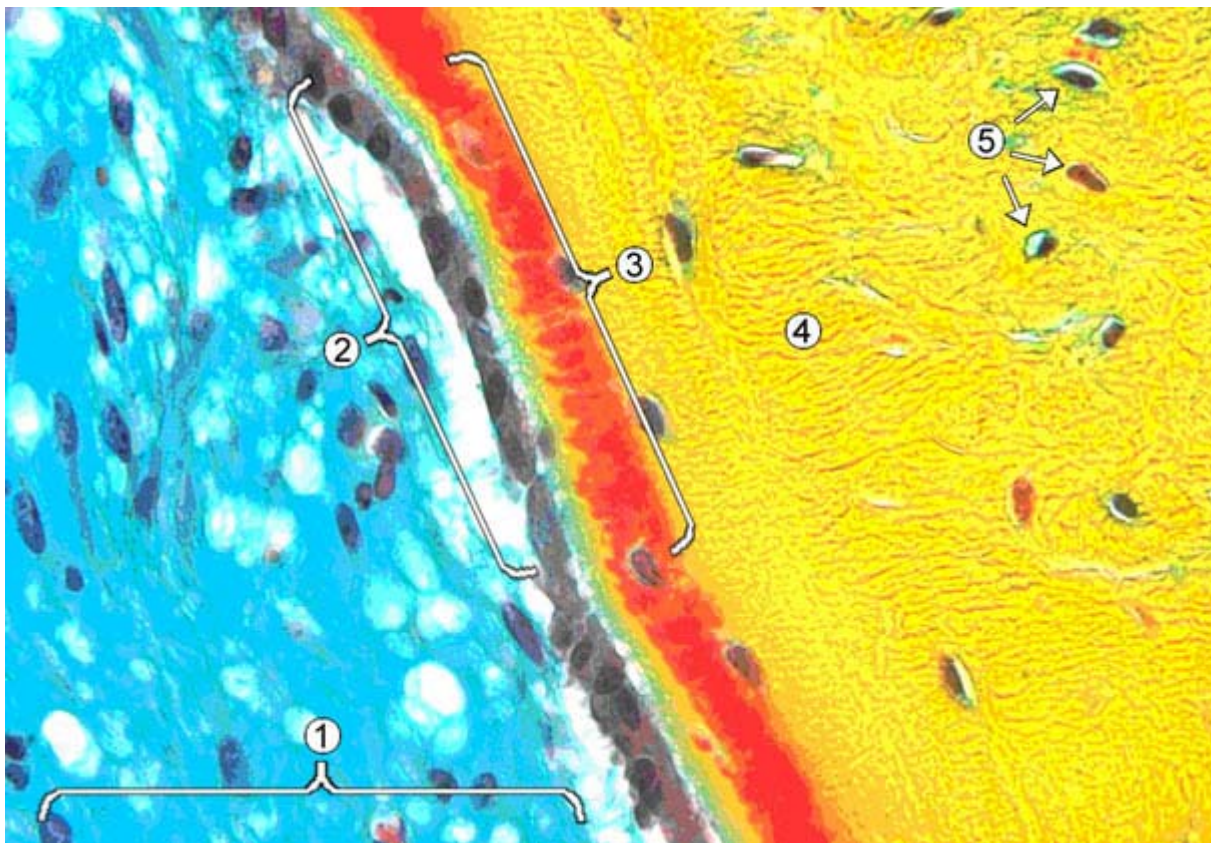


Abb. 4.4.5.-3: Movat-Pentachrom-Färbung, neun Wochen post operationem, gelb dargestellt ist dichtes knöchernes bereits **mineralisiertes Kallusgewebe (4)**. Vereinzelt lagern darin längliche blau-lila angefärbte **Osteozyten (5)**, welche vollständig von knöchernem Gewebe (gelb) umgeben sind. Am Übergang vom blau gefärbten **Bindegewebe (1)** zum knöchernen Kallus sind die **Osteoblasten perlschnurartig (2)** dicht aneinander gereiht. Diese kubischen Zellen produzieren die unmineralisierte Knochenmatrix, das **Osteoid (3)**, welches sich in dieser Färbung rot darstellt.

### 5. Knorpelgewebe, Vorkommen

Im Vergleich zum Sechswochenzeitpunkt nahm die Anzahl der Knorpelzellbereiche deutlich zu. Die mächtigen proximalen und distalen knöchernen Kallusformationen wurden auf Osteotomiehöhe durch einen durchgehenden ein bis zwei Millimeter breiten Spalt unterbrochen, dieser bestand überwiegend aus säulenförmig angeordneten Knorpelzellen und in geringeren Anteilen aus Bindegewebe (siehe Abb. 4.4.5.-2). Es waren große Bereiche vorhanden, die von enchondraler Ossifikation geprägt waren, welche sich in der Safranin-von-Kossa-Färbung als schwarz granuliert Bezirke in unmittelbarer Umgebung zu hypertrophen Knorpelzellen darstellten. Außerdem wurden die großen periostalen Kallusmassen nach außen von Knorpelgewebe umschlossen und lagen somit zwischen knöchernem Kallusgewebe und angrenzendem Bindegewebe. Das Knorpelgewebe bestand überwiegend aus hyalinem (siehe Abb. 4.4.5.-4) und in geringeren Anteilen aus Faserknorpel (siehe Abb. 4.4.5.-5).

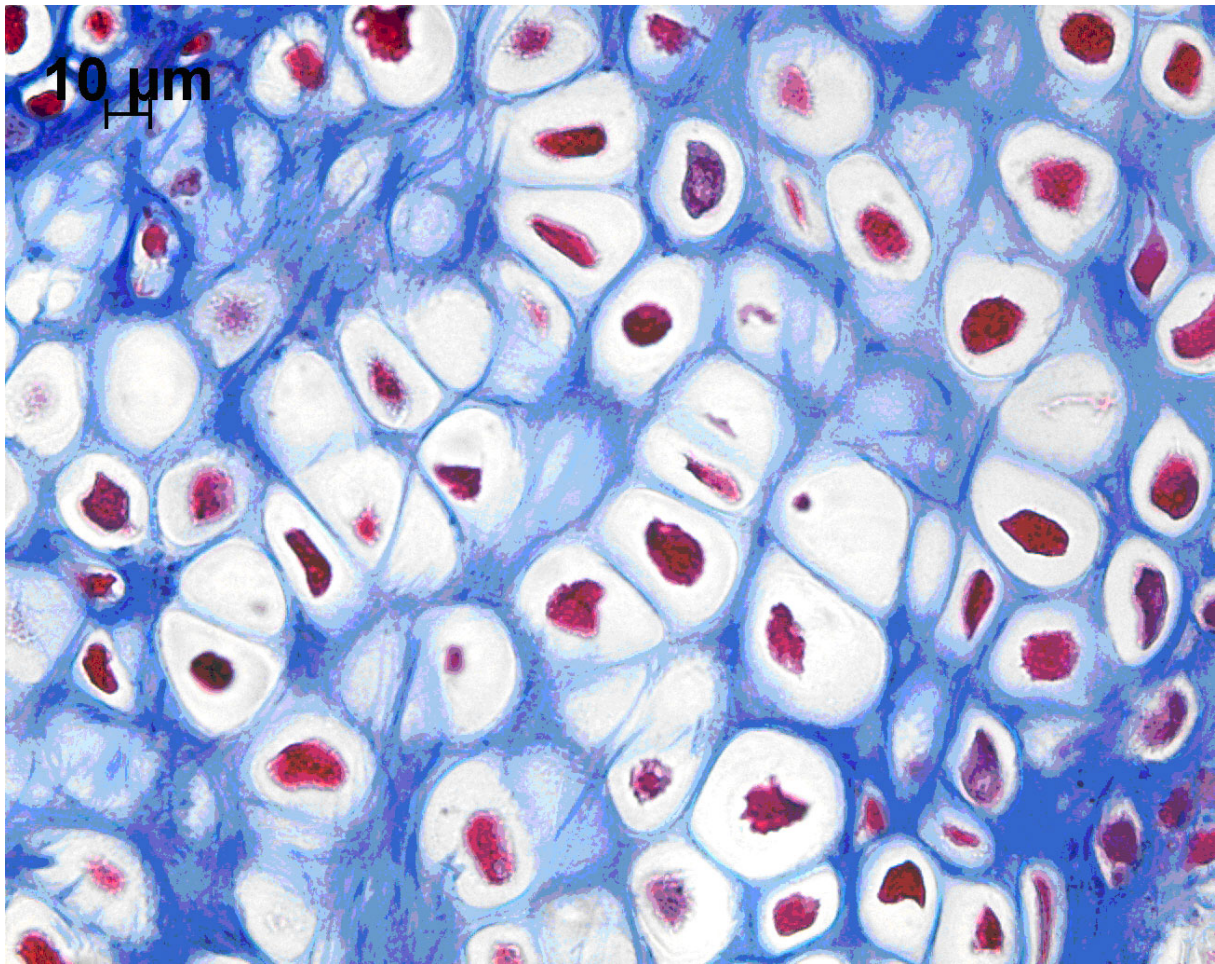


Abb. 4.4.5.-4: Azan-Färbung, neun Wochen post operationem. Dargestellt sind reihenförmig angeordnete, großblasige Knorpelzellen dicht aneinander liegend mit vereinzelt blau angefärbten Fasern zwischen den Knorpelzellen. Weiß dargestellt sind Knorpellakunen mit darin liegenden Knorpelzellen, welche außen eine intensiv blau gefärbte Kapsel aufweisen.

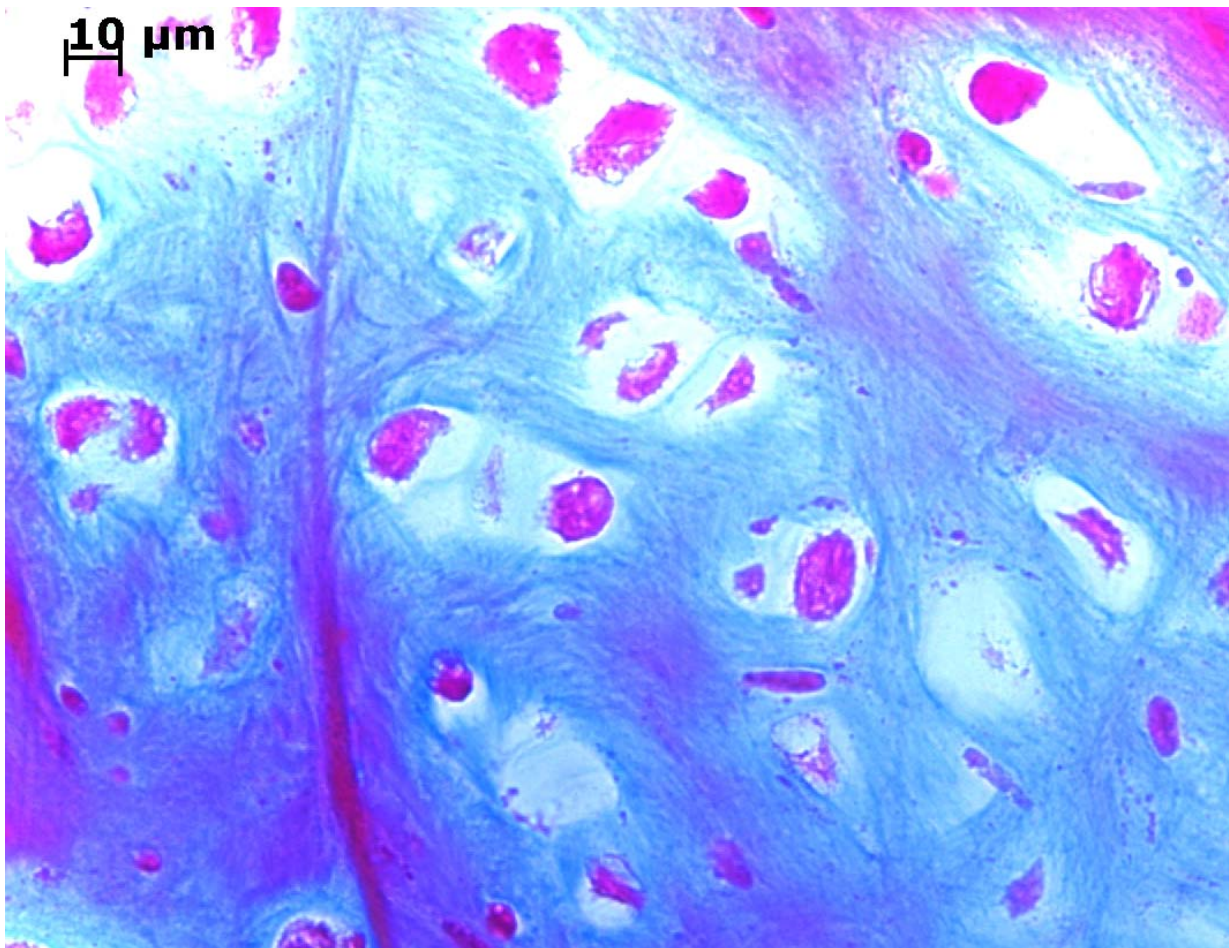


Abb. 4.4.5.-5: Azan-Färbung, neun Wochen post operationem, Knorpelgewebe aus dem Osteotomiespalt, zwischen den einzelnen Knorpelzellen befinden sich neben der amorphen Grundsubstanz vermehrt blau angefärbte kollagene Fasern.

### 6. Osteotomiespalt allgemein

Trotz der weiteren Zunahme des Kallusgewebes im Vergleich zum Sechswochenzeitpunkt kam es bei keinem der Präparate zur knöchernen Überbrückung des ursprünglichen Osteotomiedefektes. Bei allen Präparaten war ein schmaler durchgehender Spalt zwischen den großen knöchernen Kallusformationen im ehemaligen Osteotomiespalt vorhanden (siehe Abb. 4.4.5.-6). Dieser war wesentlich schmaler als zum Sechswochenzeitpunkt (siehe Abb. 4.4.5.-6). Er bestand überwiegend aus Knorpelgewebe und in geringeren Anteilen aus dazwischen gelagertem Bindegewebe.

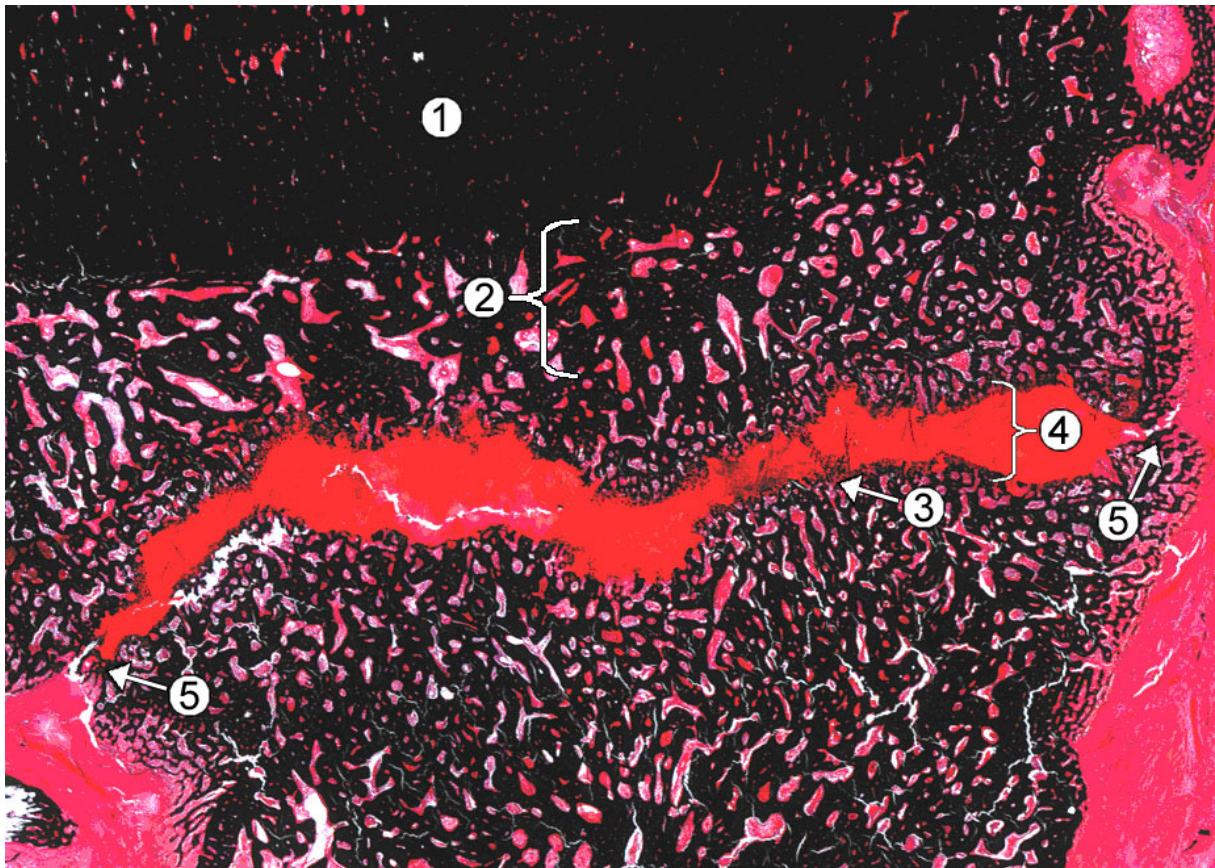


Abb. 4.4.5.-6: Safranin-von-Kossa-Färbung, neun Wochen post operationem, zwischen den großen knöchernen Kallusformationen ist ein durchgehender überwiegend **knorpeliger Bewegungsspalt (4)** vorhanden. In den äußeren Randbereichen sind die proximalen und distalen knöchernen **Kallusgebilde fast vereint (5)**, innerhalb des knorpeligen Spaltes sind schwarz granulierte Bereiche der **enchondralen Ossifikation (3)** vorhanden. Die ehemalige Osteotomielinie an der oberen **Kortikalis (1)** ist nicht mehr eindeutig vom neu gebildeten **knöchernen Kallusgewebe (2)** abgrenzbar.

### 7. Osteoklasten als Zeichen von Abbauvorgängen

In den aufgelockerten Hohlräumen der spaltnahen Kortikalis waren vermehrt Osteoklasten vorhanden. Auch in den peripheren Bereichen medial sowie auch lateral traten immer mehr Osteoklasten im knöchernen Kallusgewebe auf, vor allem in randständigen Bereichen, in denen der knöcherne Kallus an Bindegewebe oder Knorpel angrenzt, waren die knochenabbauenden Riesenzellen zu finden. Es gab zunehmend Bereiche, in denen knochenbildende Osteoblasten direkt neben knochenabbauenden Osteoklasten Osteoid produzierten. Im Vergleich zu den vorherigen Zeitpunkten war zum Neunwochenzeitpunkt die größte Anzahl an Osteoklasten vorhanden.

---

**Zusammenfassung der histologischen Befunde**

Die Beobachtungen des Heilungsverlaufes über den definierten Zeitraum von neun Wochen zeigten einen der Literatur entsprechenden charakteristischen Verlauf der sekundären Frakturheilung mit einer zeitlichen Verzögerung.

Unter Verwendung des kritisch scherweichen Fixateurs zeichnete sich ein stetiger Anstieg des Kallusdurchmessers auf Osteotomiespalthöhe von der zweiten bis zur neunten Woche ab. Während allen vier Untersuchungszeiträumen waren aktive Vorgänge der sekundären Frakturheilung vorhanden, man erkannte anhand der beobachteten Gewebesituationen einen stetigen Fortschritt der Frakturheilung, jedoch kam es in keinem der untersuchten Präparate innerhalb des Beobachtungszeitraumes zur knöchernen Überbrückung des Osteotomiespaltes. Auch nach neun Wochen befand sich bei allen Präparaten ein ungefähr ein bis zwei Millimeter breiter durchgehender knochenfreier Spalt, welcher mit Knorpelgewebe und in geringerer Anzahl mit Bindegewebe gefüllt war.

## **5. Diskussion**

### **5.1. Allgemeine Überlegungen**

Die verzögerte oder sogar ausbleibende Frakturheilung ist eine häufige und oft schwerwiegende Komplikation in der Unfallchirurgie (Zimmermann et al., 2006). Vor allem der distale Unterschenkel neigt aufgrund seiner schlechten muskulären Deckung und seiner Durchblutungssituation zu einem gestörten Verlauf der Frakturheilung (Mayr, 2002). Laut Esterhai und Mitarbeitern (1981) zeigt der Humerus mit 57,1 Prozent die höchste Inzidenz für die Ausbildung einer synovialen Pseudarthrose, welche aber durchaus auch in anderen Bereichen, wie zum Beispiel der Tibia, im Rahmen von Heilungsstörungen auftreten kann.

Die hoch komplexen Abläufe der Frakturheilung sind auch heute noch nicht vollständig verstanden und aufgeklärt. Trotz des ständigen therapeutischen Fortschrittes in der orthopädischen und unfallchirurgischen Forschung weist noch jeder fünfte bis zehnte Patient erhebliche Probleme bei der Frakturheilung auf. Diese Tatsache und das Streben nach immer schnellerer Rehabilitation ohne Funktionsverlust machen die unfallchirurgische Forschung zur Verbesserung der Frakturheilung zwingend erforderlich (Haas, 2000).

Wir wollen die zugrunde liegenden Vorgänge bei der verzögerten Reparatur von knöchernem Gewebe in dieser Studie analysieren. Durch ein besseres Verständnis der genauen Abläufe während den einzelnen Phasen der Frakturheilung soll eine frühzeitige Erkennung von Heilungsstörungen mit raschem therapeutischem Eingreifen ermöglicht werden, mit dem Ziel einer schnellen Ausheilung der Fraktur.

### **5.2. Tiermodellwahl**

Auch heute ist der Einsatz von Versuchstieren in der medizinischen Forschung unumgänglich. Dabei muss ein Tiermodell bestimmte Anforderungen erfüllen, welche sich zum einen aus der Fragestellung und zum anderen aus den Eigenschaften der Tierspezies selbst ergeben. Einige der entscheidenden Auswahlkriterien sind die allgemeine Übertragbarkeit der Ergebnisse, die gute technische Durchführbarkeit des Versuchsvorhabens, sowie die ethische Vertretbarkeit.

Bei orthopädischen Studien, wie im vorliegenden Fall, spielen die anatomischen Verhältnisse der Versuchstierspezies im Vergleich zum Menschen für die Übertragbarkeit der gewonnenen Daten eine entscheidende Rolle. In der muskuloskeletalen Forschung werden, je nach Fragestellung, verschiedene Tiermodelle verwendet. Aus früheren Untersuchungen ist bekannt, dass die Frakturheilung beim Schaf nach den gleichen Prinzipien wie beim Menschen verläuft, daher lassen sich die gewonnenen Daten gut auf den

humanmedizinischen Bereich übertragen. Auch in Bezug auf eine Vergleichbarkeit der Knochenstoffwechselaktivität und der skeletalen Größenverhältnisse zur Humansituation bei osteologischen Fragestellungen hat sich das Schaf als sehr gut geeignete Versuchstierspezies etabliert (Wissing et al., 1990). Daher wird das Schaf trotz seiner Größe häufig für orthopädische Fragestellungen als Versuchstier genutzt. Auch in unserem Forschungsprojekt wurde für die praktische Durchführung das Schafmodell gewählt.

Metak und Mitarbeiter (1998) fanden anhand eines von ihnen durchgeführten Interspeziesvergleiches bezüglich der unterschiedlichen Dynamik der Knochendefektheilung heraus, dass sich das Schaf hinsichtlich der Übertragbarkeit von Versuchsergebnissen auf den Menschen am besten eignet. Des Weiteren eignet sich das Schaf besonders für Langzeitstudien der Knochendefektheilung (Metak et al., 1998), denn das Schaf weist eine ähnlich lange Frakturheilungszeit wie der Mensch auf (Stürmer et al., 1980). Je nach Frakturversorgung dauert diese mindestens sechs bis acht Wochen (Wu et al., 1984), daher waren die einzelnen Frakturheilungsphasen, die in dieser Studie untersucht wurden, gut mit den Phasenabläufen des Menschen zu vergleichen. Hingegen weisen kleinere Versuchstierspezies wie zum Beispiel Mäuse und Ratten aufgrund ihrer primitiven Knochen ohne Haversches System eine wesentlich schnellere knöcherne Durchbauung der Frakturregion auf und erweisen sich daher als ungeeignet für die Untersuchung der einzelnen Phasen der Frakturheilung. Auch das Kaninchen ist ungeeignet für unser Versuchsvorhaben, denn bei ihm verlaufen die Knochenumbauprozesse dreimal schneller als beim Schaf (Flautre et al., 1999). Dies erschwert die Festlegung einzelner Untersuchungszeitpunkte und lässt keinen Vergleich mit der Frakturheilungssituation beim Menschen zu (Metak et al., 1998). Die von Finlay und Mitarbeitern (1995) festgestellten anatomischen und biomechanischen Ähnlichkeiten zwischen der ovinen und humanen Tibia sprechen ebenfalls für die Verwendung des Schafes als Versuchstier. Auch Rehman und Mitarbeiter (Rehman et al., 1995) kamen zu dem Schluss, dass sich das Schaf aufgrund seiner dem Menschen sehr ähnlichen Knochenstrukturverhältnissen sehr gut als Versuchstierspezies eignet. Denn sowohl beim Schaf als auch beim Menschen stellt die Tibia einen englumigen Röhrenknochen dar, der sich in Form und Struktur sehr ähnelt (Stürmer, 1988). Nach dem Wolffschen Gesetz der Transformation kann man bei ähnlicher Form zweier Knochen auch auf eine ähnliche Belastung dieser schließen (Stürmer, 1988). Auch funktionell ist die Schaftibia mit der Tibia des Menschen gut zu vergleichen, da sie beide in der Tragachse stehen und dadurch sehr ähnliche Belastungen erfahren (Stürmer, 1988).

Da Schafe ihre Hintergliedmaßen nicht effektiv schonen können, gewährleisten sie nach einem Eingriff wie der von uns durchgeführten Osteosynthese eine frühzeitige Belastung (Stürmer, 1988). Diese Belastung war in vorliegender Studie erwünscht, denn die Beurteilung der Knochenheilung ist nur sinnvoll, wenn sie während der Heilungsphase einer

physiologischen Be- und Entlastung unterliegt. Auch schon in früheren Studien hat sich das Schaf als Versuchstier aufgrund seiner knöchernen Dimension in der traumatologischen und orthopädischen Forschung als geeignet erwiesen (Claes et al., 1997; Hente et al., 2004; Schell et al., 2005; Epari et al., 2006; Lienau et al., 2006).

Rinder und Pferde eignen sich aufgrund ihrer Größe und einer wesentlich längeren Ausheilungszeit einer Fraktur nicht für solche Forschungsvorhaben (Roach et al., 1989). Eine Verwendung von humanmedizinischem Osteosynthese-Instrumentarium, wie es in vorliegender Studie der Fall war, ist bei diesen Tierarten aufgrund der Größe ebenfalls nicht möglich. Laut den Ergebnissen der Interspeziesuntersuchungen von Aerssens und Mitarbeitern (1998) eignet sich der Hund besonders gut für Knochenstudien, da der Hundeknochen die größten anatomischen wie auch strukturellen Übereinstimmungen mit humanen Knochen aufweist. Jedoch wurde aufgrund deutlich höherer Kosten für Anschaffung sowie Unterbringung und vor allem aufgrund ethischer Bedenken Abstand von dieser Tierart genommen.

Da Alter und Geschlecht der verwendeten Tierart Einfluss auf die Versuchsergebnisse haben können (Aerssens et al., 1998), wurden ausschließlich weibliche Tiere mit einem Zahnalter von zwei Jahren verwendet. Die Tiere wurden aus einer Gruppe von Merino-Mix Schafen ausgewählt und randomisiert in vier gleich große Gruppen eingeteilt. Externe Einflussfaktoren auf das Ausheilungsergebnis wurden durch identisches operatives Vorgehen, sowie durch identische Haltungs- und Versorgungsbedingungen für jedes Tier weitgehend ausgeschlossen. Schafe zeichnen sich außerdem durch ein leichtes Handling und ein geringes Aggressionspotential aus.

### **5.3. Versuchsaufbau**

Die vorliegende tierexperimentelle Arbeit stellt eine Teilstudie eines komplexen Forschungsprojektes zur Biologie der verzögerten Frakturheilung dar. Diese Teilstudie beschäftigt sich mit der deskriptiven histologischen Analyse der verzögerten Frakturheilung unter kritisch scherweicher Fixation, begleitet von radiologischen und biomechanischen Ergebnissen.

Speziell für die zu untersuchende Fragestellung wurde ein kritisch scherweicher Fixateur externe entwickelt. Dieser wurde mittels sechs Schanz-Schrauben medial an der rechten Tibia montiert und eine Osteotomie mit einem Osteotomiespalt von drei Millimetern nach einem bewährten und standardisierten Verfahren durchgeführt. Dass die Steifigkeit einer Osteosynthese den Verlauf und das Ergebnis der Frakturheilung beeinflusst, ist allgemein bekannt. Außerdem wird davon ausgegangen, dass sich moderate Kompressionsbewegungen förderlich auf die Heilung auswirken, wohingegen den



Scherbewegungen eher ein negativer Einfluss auf die Heilung zugeschrieben wird (Claes et al., 2000).

Nach den Regeln der Knochenbruchheilung und der Regulation des Knochenauf- und abbaues wird bei einer Fraktursituation die sukzessive Wiederherstellung des ursprünglichen Zustandes erwartet. Durch die starke Beweglichkeit des verwendeten kritisch scherweichen externen Fixateurs sollten die Abläufe der unter optimalen Bedingungen (rigide Fixation) verlaufenden Frakturheilung verzögert werden. Die Prozesse der Frakturheilung wurden zu unterschiedlichen Zeitpunkten (zwei, drei, sechs, neun Wochen) radiologisch, biomechanisch und vor allem histologisch untersucht und ausgewertet. Da bekannt ist, dass die Frakturheilung mehrere Phasen (initiale Entzündungsphase, Phase des weichen Kallus, Phase des harten Kallus, Remodelling) durchläuft, wurden die vier Untersuchungszeiträume so gewählt, dass alle vier Phasen der sekundären Frakturheilung in die Untersuchung eingehen konnten.

Der genaue Versuchsaufbau, sowie die Art des operativen Vorgehens wurden aus erfolgreichen vorangegangenen Studien am Tiermodell des Schafes übernommen (Schell et al., 2002; Duda et al., 2003; Klein et al., 2003; Schell et al., 2005; Schell et al., 2006). Aufgrund vorangegangener Studien und den anatomischen Gegebenheiten beim Schaf ist die mediale Tibiafläche am besten geeignet für die Implantierung eines Fixateurkonstruktes, denn in diesem Bereich befinden sich keine Muskelgruppen. Hingegen befinden sich lateral sowie kaudal der Tibia Muskelbäuche, die durch eine Implantierung von Schanz-Schrauben und die Durchführung einer Osteosynthese unnötig traumatisiert würden und somit den Heilungsverlauf negativ beeinflussen könnten. Des Weiteren liefert die mediale Tibia eine lange plane Fläche, welche die besten Voraussetzungen für eine bikortikale Implantierung aller sechs Schanz-Schrauben bietet. Im cranialen Tibiabereich befindet sich eine unebene Fläche aufgrund des dort liegenden Margo cranialis, welcher eine zusätzliche Erschwernis bei der Fixateur Implantierung darstellen würde. Somit kann das beste Ausheilungsergebnis bei einer medialen Fixateur Anbringung erwartet werden.

Beim operativen Vorgehen war es wichtig, die Osteosynthese möglichst in einem Ablauf ohne Absetzen der oszillierenden Säge durchzuführen. Ansonsten könnte es durch Stufenbildungen und Fragmentabsprengungen im Osteotomie nahen Bereich zu Komplikationen während des Heilungsverlaufes kommen. Bei der Anbringung des kritisch scherweichen Fixateurs musste darauf geachtet werden, dass alle sechs Schanz-Schrauben bikortikal im Knochen saßen, denn nur so konnten sie einen optimalen festen Sitz des stark beweglichen Fixateurkonstruktes gewährleisten. Aufgrund der komplett freigegeben Rotationsbewegung und der großen Axialen- und Scherbewegungen des kritisch scherweichen Fixateurs waren die osteotomierten Tibiafragmente sehr beweglich und mussten großen Belastungen standhalten. Die elastischen Fixationssysteme, wie der in dieser Studie verwendete Fixateur, lassen große interfragmentäre Verschiebungen zu

während der funktionellen Belastung (Hente et al., 2004). Der Bewegungsradius wurde nur durch umliegendes Weichteilgewebe und Muskeln begrenzt.

Sobald die Tiere aus der Narkose erwachten, standen sie selbständig auf, und da es sich beim Schaf um ein Fluchttier handelt, kam es sehr schnell zur Belastung der operierten Gliedmaße, was im Rahmen dieser Studie erwünscht war. Es gibt andere Vergleichsstudien, in denen eine sofortige Belastung der operierten Gliedmaße durch eine Tenotomie verhindert bzw. stark reduziert wurde (Hente et al., 2004).

### **5.4. Probenentnahme- und Aufbereitung**

Nach Ablauf der jeweiligen Standzeit von zwei, drei, sechs und neun Wochen wurden die Tiere euthanasiert und jeweils die osteotomierte, sowie die kontralaterale Tibia zu Vergleichszwecken entnommen. Alle rechten, operierten Tibiae wiesen ab der dritten Woche im Vergleich zur kontralateralen Seite eine zunehmende, knöcherne Umfangsvermehrung im Bereich der Osteotomie auf. Zur Aushärtung des Gewebes kamen die osteotomierten Tibiae mit montiertem Fixateur externe für 24 Stunden in eine Formalin-Fixierlösung. Im Anschluss an diese Aushärtung konnte das Fixateurkonstrukt vorsichtig entfernt werden. Dabei musste mit besonderer Sorgfalt vorgegangen werden, da die Knochenfragmente teilweise sehr beweglich waren. Von diesem Härteprozess ausgenommen waren die Sechs- und Neun Wochenproben, welche biomechanisch getestet wurden. Zum frühesten Untersuchungszeitraum von zwei Wochen war die Knochenverbindung der osteotomierten Fragmente am instabilsten und es waren die größten Bewegungen zwischen den Fragmenten vorhanden. Ohne die 24stündige Aushärtung wäre es beim Entfernen des Fixateurs zu starken Verschiebungen und Zerreißen im noch sehr instabilen Osteotomiespalt gekommen.

Die vorliegende Instabilität der Knochenfragmente beeinflusste auch die Durchführbarkeit der biomechanischen Untersuchungen, welche nach sechs und neun Wochen Standzeit erfolgte.

Die Aushärtung des Gewebes war für die anschließenden Sägearbeiten der osteotomierten Tibiabereiche ebenfalls notwendig. Auch nach diesem Härtezeitraum gestalteten sich die Sägearbeiten äußerst schwierig, denn der sehr weiche bindegewebige Kallus, welcher den Osteotomiespalt zusammen mit Hämatomgewebe überbrückte war noch sehr instabil und es kam leicht zu Zerreißen des Gewebes.

Um ein Verschieben während des Sägevorganges zu verhindern, wurden die Knochenpräparate vor dem longitudinalen Sägeschnitt mit festem Klebeband umwickelt und somit stabilisiert. Durch Auswahl einer longitudinalen Sägeebe durch die Tibia, erzielte man ein Präparat, welches alle wichtigen Knochenbereiche angrenzend an die Osteotomieregion enthielt. Ein Nachteil dieser Vorgehensweise ist, dass man nur einen

zweidimensionalen Einblick in den Knochen bekommt. Durch Anfertigung und Auswertung von so genannten Serienschnitten hätte man einen dreidimensionalen Eindruck des osteotomierten Knochens erhalten, jedoch erfordert dieses Vorgehen einen sehr viel höheren Zeitaufwand, weshalb von diesem Vorgehen Abstand genommen wurde. Zu Beginn der Sägearbeiten orientierte man sich an den zuletzt post mortem angefertigten Röntgenbildern eines jeden Tieres, jedoch traten aufgrund der starken Fragmentverschiebungen rasch erste Probleme auf, weshalb die anschließende Ebeneneinstellung nicht mehr strikt anhand der Röntgenbilder erfolgte, sondern individuell für jedes Tier nach Augenmaß und unter Berücksichtigung der aktuellen Verschiebungssituation der Knochenfragmente. Diese starken Fragmentverschiebungen stellten somit eine besondere Herausforderung an den Sägenden dar. Denn durch sie war es teilweise nicht möglich die einzelnen Proben so zu sägen, dass man bei jedem Schnitt ein einheitliches Bild mit vier Kortikalis-Rechtecken erzielte, einige Male wurde der Markraum bei einem der beiden Knochenfragmente nicht angeschnitten, was die histologische Auswertung erschwerte.

Da die drei Millimeter dicken Knochenscheiben überwiegend nur durch ein sehr labiles Gewebe zusammengehalten wurden, musste man mit besonderer Sorgfalt während den einzelnen Überführungen von einer Fixierlösung in die nächste vorgehen. Als positiv zu bewerten ist, dass man von jedem Knochenpräparat zwei drei Millimeter dicke Scheiben hatte, so dass bei allen Tieren mindestens eine Knochenscheibe weiter bearbeitet und später ausgewertet werden konnte.

Aufgrund der starken Fragmentverschiebungen entstanden beim Sägen oft sehr große Knochenscheiben, die eine Erschwernis bei den anschließenden Schneidarbeiten am Mikrotom darstellten. Je größer die Schnitte waren, desto mehr rollten sie sich beim Schneidvorgang ein. Das anschließende Glätten mit der Streckflüssigkeit und einem Pinsel musste sehr sorgfältig und vorsichtig erfolgen, da es aufgrund der Größe und des instabilen Gewebes leicht zu Faltenbildung und Zerreißen kam. Im Anschluss an diese Vorarbeiten konnten die histologischen Färbungen erfolgen.

Die histologische Aufarbeitung des Knochens erlaubt die qualitative Beurteilung des Stadiums der Frakturspaltüberbrückung ausgehend vom Bindegewebe bis zu zunehmend sich schwarz darstellenden Kalziueinlagerungen im Rahmen eines Frakturheilungsfortschrittes. Bei den histologischen Färbungen traten in der Azan-Färbung vermehrt Artefakte in Form von länglichen Rissen in den Kortizes auf. Dies war aber nicht weiter von Bedeutung, da diese Färbung vor allem der Bindegewebs- und Knorpeldarstellung diente und sich diese relevanten Gewebe ohne Probleme darstellen ließen. Die Auswertung der spaltnahen kortikalen Dichte und der Osteotomieanten der einzelnen Kortizes erfolgte anhand der Safranin-von-Kossa-Färbung, in der sich die Kortikalis ohne Probleme darstellte. Obwohl die Movat-Pentachrom-Färbung nicht

osteoklastenspezifisch ist, ließen sich diese Zellen mit ihr sehr gut darstellen und differenzieren. Somit konnte in vorliegender Arbeit auf eine osteoklastenspezifische Färbung verzichtet werden.

Aufgrund der uneinheitlichen Anschnitte der jeweiligen Kortizes war keine Standardisierung der einzelnen Schnitte möglich, so dass keine histomorphometrische Auswertung erfolgen konnte. Eine Computergestützte histomorphometrische Auswertung bietet gegenüber einer rein deskriptiven Auswertung den Vorteil, dass sie standardisiert und vom Menschen unabhängig bewertet ist. Die histologische Auswertung erfolgte rein deskriptiv anhand eines bei jedem Schnitt gleichen Vorgehens. Sicher ist diese rein deskriptive Auswertungsart als kritisch zu bewerten. Jedoch wurde jeder Schnitt nach einem einheitlichen zuvor vom Untersucher festgelegten Schema durchgemustert und analysiert.

## **5.5. Diskussion der Ergebnisse**

### **5.5.1. Pinpflegebeobachtungen**

Die täglich durchgeführte Pinpflege dieser Studie war erfolgreich. Durch das tägliche Entfernen von aus Wundsekret bestehenden Krusten um die Pineintrittsstellen konnte in fast allen Fällen eine sekundäre Infektion vermieden werden. Bei den wenigen Tieren, bei denen es zu leichten Pintraktentzündungen kam, konnte durch die intensive tägliche Pflege eine schnelle Heilung erzielt werden, und alle Tiere überstanden den Beobachtungszeitraum ohne weitere Komplikationen. Das rasche und regelmäßige Entfernen der sich täglich neu bildenden Krusten beugte einem verzögerten Wundsekretabfluss der Pinkanäle vor und verhinderte so schwerwiegende Infektionen.

Aufgrund des Aufbaues eines externen Fixateurs sind die Pineintrittsstellen besonders oft von Infektionen betroffen, solche Pintraktinfektionen stellen die häufigste Komplikation bei der Versorgung mit einem Fixateur externe dar. Deshalb war eine täglich korrekt ausgeführte Pinpflege besonders wichtig. Auch Mayr (2002) beschrieb die Wichtigkeit einer regelmäßigen Durchführung der Pinpflege.

Einen weiteren Schutz gegen Verschmutzungen und etwaige Wundinfektionen der Pinkanäle stellte der täglich im Rahmen der Pinpflege frisch angelegte Schutzverband dar. Weiterhin als positiv zu bewerten ist das äußerst kooperative Verhalten der Schafe, bei denen es nicht zur Kontamination des Wundgebietes sei es durch Belecken oder Benagen des Tieres selbst oder durch Artgenossen kam. Die Tiere zeigten weder direkt nach der Operation noch zu einem späteren Zeitpunkt ein Interesse an der Wunde oder dem Fixateur externe. Damit hing der Erfolg der Pinpflege von der Regelmäßigkeit und der Intensität der Durchführung der Reinigung und Desinfektion ab.

## 5.5.2. Biomechanische Ergebnisse

Die Wiederherstellung der mechanischen Kompetenz und der anatomischen Integrität des Knochens demonstrieren das funktionelle Ergebnis der Knochenheilung. Dabei ist das maximale Torsionsmoment ein geeignetes Maß zur Bestimmung der mechanischen Kompetenz langer Röhrenknochen (Netz et al., 1978). Das Torsionsmoment wird demnach in Studien der Frakturheilung häufig als Messgröße verwendet.

Die Ermittlung der Torsionssteifigkeit und des maximalen Torsionsmoments im Rahmen der biomechanischen Untersuchung bieten die Möglichkeit, die biomechanische Qualität des im Beobachtungszeitraum entstandenen Kallusgewebes beziehungsweise des gesamten Knochens zu ermitteln und zu analysieren. Es ist bekannt, dass die Steifigkeit exponentiell zur Heilungszeit ansteigt, und es lässt sich über deren Ermittlung die Heilungsrate bestimmen. Auftretende Heilungsverzögerungen können somit anhand einer geringen Steifigkeit des reparierten Gewebes aufgezeigt werden.

Alle Testungen der präparierten Knochen erfolgten unter Erhaltung eines passiven Weichteilmantels, laut Duda und Mitarbeitern (2000) führt die Weichteilerhaltung zu einer Erhöhung der Steifigkeitswerte um 20 Prozent. Diese Angabe ist wichtig für den Vergleich mit Ergebnissen anderer Studien, schwierig ist der Vergleich mit Studien, in denen nicht angegeben ist, ob die Testung mit oder ohne Weichteilmantel erfolgte.

Die eingangs aufgestellte Hypothese, dass eine Durchführung der Torsionstestung möglicherweise nicht möglich ist, hat sich in 50 Prozent der vorliegenden Fälle bestätigt. Die biomechanische Torsionstestung konnte jeweils nur bei vier Tieren der Sechs- und Neunwochengruppen durchgeführt werden. Die Tibiae der anderen acht Tiere dieser beiden Gruppen waren nach Entfernung des Fixateurkonstruktes zu instabil für die Untersuchung. Ein Einspannen der Knochen in die Prüfmaschine war ohne Schädigung der instabilen Osteotomieregion nicht möglich. Das heißt, das Kallusgewebe war aufgrund einer unzureichend fortgeschrittenen Heilung noch nicht in der Lage, eine genügende Stabilisierung der Knochenfragmente zu gewährleisten. Das Kallusgewebe bestand hauptsächlich aus kartilaginösen und fibrösen Anteilen, welche noch leicht verformbar waren. Bei einem Vergleich der Ergebnisse der Sechs- und Neunwochentiere ergab sich keine Steifigkeitserhöhung im Rahmen eines Heilungsfortschrittes innerhalb der drei Wochen zwischen beiden Untersuchungszeitpunkten. Trotz der weiteren Kalluszunahme von der sechsten bis zur neunten Woche, die histologisch zu verzeichnen war, kam es nicht zur Steifigkeitszunahme, somit hat innerhalb dieser drei Wochen keine Verfestigung des Kallusgewebes im Rahmen eines Heilungsfortschrittes stattgefunden.

Es konnten anhand der sich an die Testung anschließenden Einteilung in die Frakturklassifikation nach White (1977) Aussagen über den Fortschritt der Heilung gemacht werden. Denn es ist nicht nur die gebildete Kallusmenge allein, sondern auch deren qualitative Eigenschaft selbst von großer Bedeutung für die Beurteilung des

Heilungsfortschrittes und deren anschließenden Heilungsausgang. White und Mitarbeiter (1977) fanden in Untersuchungen heraus, das anhand der bei der biomechanischen Testung auftretenden Fraktur je nach ihrer Lokalisation Rückschlüsse auf den jeweiligen Heilungszustand des Knochens gemacht werden können. Daraufhin haben sie eine Einteilung für die radiologischen Befunde nach Durchführung der biomechanischen Torsionstestung, welche bis zum Versagen des Knochens durchgeführt wird, erstellt. Anhand des Schemas von White und Mitarbeitern (1977) erfolgt eine Frakturklassifikation in vier Stadien, dabei ist die Heilung im Stadium eins am geringsten und im Stadium vier am weitesten fortgeschritten.

Die anschließend radiologisch gewonnenen Ergebnisse korrelieren mit denen der Biomechanik. Denn auch radiologisch konnte kein Heilungsfortschritt von der sechsten bis zur neunten Woche verzeichnet werden. Bei keinem Tier war der ursprüngliche Osteotomiedefekt vollständig mit knöchernem Gewebe ausgefüllt. Die eingangs aufgestellte Hypothese, dass die biomechanisch getesteten Knochen nicht über das Stadium zwei der Frakturklassifikation nach White hinausgehen hat sich in jedem Fall bestätigt. Bei allen untersuchungsfähigen Proben beider Untersuchungszeitpunkte kam es im Bereich der Frakturregion zum Versagen, wobei alle Knochen eine geringe Torsionssteifigkeit aufwiesen, dies entspricht dem Stadium eins des Auswertungsschemas von White und Mitarbeitern (1977) und somit einer wenig fortgeschrittenen Heilung. Stadium eins zeichnet sich durch ein Versagen in der Frakturregion aus, dabei weist der Kallus eine geringe Steifigkeit und große Verformungsfähigkeit auf. Es ist jedoch zu beachten, dass das Schema von White und Mitarbeitern (1977) streng genommen für Frakturen gilt und es sich bei vorliegendem Versuchsaufbau um eine Osteotomie handelt. Allgemein kann man sagen, dass es bei keinem der untersuchten Knochen zur Wiederherstellung der mechanischen Kompetenz kam.

In Abbildung 4.3.1 im biomechanischen Ergebnissteil ist die schräg verlaufende testungsbedingte Fraktur durch den knöchernen Kallus nach der Durchführung der Torsionsprüfung zu erkennen. Die auf den Knochen einwirkenden Kräfte überschritten die Toleranzgrenze des Knochens (Stürmer, 1996). Es kam im ursprünglichen Osteotomiebereich zur Fraktur. Die testungsbedingte Fraktur ist von einer im vitalen Gewebe erfolgten Fraktur gut abzugrenzen, denn bei letzterer wären Hämatomstrukturen, vermehrte Blutgefäßbildung sowie Anzeichen einer frakturbedingten Entzündungsreaktion vorhanden, was hier nicht nachgewiesen werden konnte. Die biomechanischen Ergebnisse korrelieren auch mit den Befunden der deskriptiven histologischen Untersuchungen. Denn auch histologisch war die Heilung nach neun Wochen im Vergleich zur optimal verlaufenden Heilung nicht weit genug vorangeschritten, es kam innerhalb des Beobachtungszeitraumes bei keinem Tier zur knöchernen Überbrückung des Osteotomiespaltes.

### 5.5.3. Ergebnisse der deskriptiven histologischen Analyse

Die verschiedenen Phasen der sekundären Frakturheilung konnten in dieser Studie anhand typischer Zellen und Gewebesituationen zu den untersuchten Zeitpunkten nachvollzogen werden. Alle vier Untersuchungszeiträume wiesen histologische Veränderungen auf, es konnte der Entwicklungsprozess von unreifem, ungeordnetem und bindegewebigem Kallus bis hin zu dichtem knöchernem Kallusgewebe beobachtet werden. Im Vergleich zur optimal verlaufenden Frakturheilung (unter rigider Fixation) ließ sich aufgrund des von uns gewählten Versuchsaufbaues mit großer mechanischer Instabilität eine zeitliche Verzögerung der Frakturheilung erkennen. Denn bei physiologisch ablaufender Frakturheilung wäre zum letzten Untersuchungszeitpunkt von neun Wochen eine knöcherne Überbrückung des Osteotomiespalt nachweisbar, was im vorgestellten Modell weder peripher im knöchernen Kallus, noch direkt zwischen den Kortizes der Fall war.

Die zuvor aufgestellte Hypothese, dass es innerhalb des von uns gewählten Versuchszeitraumes nicht zur knöchernen Überbrückung kommt, hat sich in jedem Fall bestätigt. Eine weitere zuvor aufgestellte Hypothese bzgl. der Kallusbeschaffenheit zum Sechs- und Neunwochenzeitpunkt konnte nur teilweise bestätigt werden. Unter Anwendung des kritisch-scherweichen Fixateur externe sollte es zur Ausbildung eines sehr voluminösen Kallusgewebes kommen, dies war bei jedem untersuchten Knochen der Fall. Dieser Kallus sollte bis zum Sechswochenzeitpunkt überwiegend bindegewebig und zum Neunwochenzeitpunkt überwiegend knorpelig sein. Dies konnte nicht einheitlich bestätigt werden, die knorpeligen Anteile nahmen zwar von der sechsten zur neunten Woche zu, waren aber nicht in jedem Fall dominierend, sondern bei einigen Präparaten wies der Kallus ähnlich große Anteile an Binde- und Knorpelgewebe auf. Es ist eine deutliche Tendenz zur überwiegenden Knorpelbildung zu verzeichnen.

Einen der dominantesten frakturheilungsbeeinflussenden Faktoren stellt die Frakturgeometrie, beschrieben durch Frakturtyp und Lückengröße, dar. Ist eine Fraktur nicht ausreichend stabil fixiert, so kann es durch exzessive, andauernde interfragmentäre Bewegungen zu Zerreizungen des jungen Granulationsgewebes kommen (Gardner et al., 2000). Dies kann dazu führen, dass der normale reparative Prozess abgeändert wird und es, wie in vorliegender Studie, zur verzögerten Frakturheilung kommt. Nicht nur die Menge, sondern auch die Richtung der interfragmentären Bewegungen spielt dabei eine entscheidende Rolle, so wird aus klinischer Sicht Bewegungen in axialer Richtung eher eine positive und Scherbewegungen eher eine negative Wirkung auf den Heilungsverlauf zu geschrieben (Claes et al., 2000). Nun ist es schwierig, die genauen Bewegungen im Osteotomiespalt zu bestimmen, denn die Bewegungen sind sehr komplex und treten in allen Raumachsen auf (Claes et al., 2000). Sicher ist, dass flexible Osteosynthesesysteme, wie der von uns verwendete kritisch scherweiche Fixateur externe und die frühe Belastung der operierten Gliedmaße zu deutlich mehr Kallusbildung führen, als es bei stabilen

Osteosynthesen der Fall ist. Dies konnte mit vorliegender Studie bestätigt werden. Die sekundäre Knochenheilung erfolgte über den Weg der enchondralen Ossifikation, wobei es jedoch nach neun Wochen in keinem der untersuchten Fälle zur knöchernen Überbrückung des Osteotomiespalt kam. Die enchondrale Ossifikation als Zeichen der sekundären Frakturheilung tritt in Bereichen mit geringen mechanischen Belastungen auf, hingegen entstehen Faserknorpel und Bindegewebe überwiegend in Bezirken mit großer Gewebedehnung und großen hydrostatischen Drücken (Claes et al., 1998). Die Geschwindigkeit der enchondralen Ossifikation wird durch die mechanischen Bedingungen beeinflusst, so können intermittierende hydrostatische Druckbelastungen zu einer verlangsamten oder sogar ausbleibenden Frakturheilung (nonunion) führen (Carter et al., 1998). In vorliegender Studie waren die interfragmentären Bewegungen bis zum letzten Untersuchungszeitraum von neun Wochen zu groß, um eine knöcherne Überbrückung des Osteotomiespalt zugewährleisten. Obwohl histologisch alle Abläufe der sekundären Frakturheilung nachgewiesen wurden, ist es sehr wahrscheinlich, dass es bei längerer Beobachtung zur Ausbildung einer hypertrophen Pseudarthrose (nonunion) kommt. Histopathologisch weist eine Pseudarthrose allgemein alle Elemente und Gewebearten der normal verlaufenden Frakturheilung auf, wobei Knorpel- und Bindegewebe persistieren und nicht durch neu gebildeten Knochen ersetzt werden (Brighton, 1984). Die konstanten interfragmentären Bewegungen am Frakturspalt verhindern die Mineralisation des Knorpelgewebes (Fossum, 2007).

In allen Gruppen waren zahlreiche aktiv Osteoid synthetisierende Osteoblasten vorhanden, welche charakteristisch sind für aktive Knochenheilungsabläufe. Ihr zahlreiches Vorkommen spricht somit gegen eine atrophe Pseudarthrose, bei der keine aktiven Osteoblasten vorkommen.

Welches Ersatzgewebe zur provisorischen Stabilisierung der Frakturfragmente gebildet wird, hängt entscheidend von den mechanischen Einflüssen auf das Frakturgebiet ab. Denn es ist bekannt, dass die mechanische Umgebung den Verlauf und den Ausgang der Heilung durch direkte Differenzierung und Proliferation des Gewebes beeinflusst (Augat et al., 1998), wobei die genauen Interaktionen zwischen den mechanischen und biologischen Faktoren im Differenzierungsprozess noch unklar sind (Carter et al., 1988).

Die starken Beweglichkeiten der Frakturfragmente gegeneinander und dadurch bedingten Zug- und Druckbelastungen führten zur Ausbildung einer voluminösen Kallusformation mit Knorpelbildung und sich anschließender enchondraler Ossifikation. Eine besondere mechanische Eigenschaft des Knorpelgewebes ist seine Druckfestigkeit gepaart mit einer angemessenen Druckelastizität (Weyrauch et al., 1998), wodurch sich dieses Gewebe hervorragend eignet, stark bewegliche Fragmente, wie in vorliegender Studie, zu stabilisieren. Ein weiterer Grund für die Entstehung von Knorpelgewebe ist eine geringe Sauerstoffspannung im Gewebe (Cruess et al., 1975). Da Knorpelgewebe durch Diffusion



ernährt wird, kann es fast vollständig gefäßfrei existieren (Weyrauch et al., 1998). Histologisch wies das vorliegende Knorpelgewebe tatsächlich nur geringe Anzahlen von Gefäßen auf.

Aufgrund der großen interfragmentären Beweglichkeit kommt es zu Gefäßzerreißen und Zerstörungen des jungen Granulationsgewebes, das reparative Gewebe wird somit zerstört. Bei allen untersuchten Knochenproben blieb zwischen den proximalen und distalen Knochenfragmenten bis zum Versuche von neun Wochen eine durchgehende flexible Binde- und Knorpelgewebsbrücke bestehen. Trotz der erheblichen Kallusmassen konnten die interfragmentären Bewegungen nicht weit genug reduziert werden, um eine knöcherne Vereinigung zu gewährleisten. Im untersuchten Zeitraum von neun Wochen konnte die mechanische Kompetenz nicht hergestellt werden. Die Untersuchungsergebnisse demonstrieren, dass zum letzten Untersuchungszeitpunkt eine biologisch reaktive Situation vorliegt. Jedoch kann man nach dem Beobachtungszeitraum von neun Wochen keine Aussage über den endgültigen Heilungsausgang treffen, dafür ist der gewählte Beobachtungszeitraum zu kurz bemessen. Betrachtet man die in der Literatur gültigen Definitionen einer Pseudarthrose, so wird deutlich, dass wir nach neun Wochen keine abschließende Aussage über das Ausheilungsergebnis treffen können. Eine allgemein akzeptierte Definition der Pseudarthrose ist das radiographische Ausbleiben der Heilung einer Fraktur nach sechs Monaten oder das Ausbleiben einer Progression der Heilung in einem Zeitraum von drei Monaten (Wiss et al., 1996). Laut Runkel und Rommens (2000) gilt sogar erst eine Fraktur, die nach acht Monaten noch nicht geheilt ist, als Pseudarthrose. Um eine definitive Aussage über das Ausheilungsergebnis bei vorliegendem Versuchsaufbau treffen zu können, müssten sich Versuche über einen Beobachtungszeitraum von mindestens sechs, besser sogar acht Monaten anschließen.

### **Zwei Wochen post operationem**

Zum ersten Untersuchungszeitpunkt von zwei Wochen ließen sich in allen untersuchten Präparaten anhand der vorherrschenden Gewebesituationen Abläufe der Entzündungsphase der sekundären Frakturheilung erkennen.

Bei allen Präparaten befanden sich im Osteotomiespalt überwiegend Hämatomstrukturen, welches ein typisches Kriterium der Entzündungsphase darstellt (Brighton, 1984). Aufgrund von frakturbedingten Gefäßzerreißen kommt es in den ersten Tagen nach einer Fraktur zur Ausbildung eines Hämatoms (Kalfas, 2001; Fossum, 2007). Die Hämatombildung ist für die spätere Kallusbildung zwingend erforderlich (Brug et al., 1991). Ein wesentlicher Bestandteil des Hämatoms sind Fibrinfäden, welche durch ihre Vernetzung zur ersten Stabilisierung der Knochenfragmente beitragen (Kalfas, 2001). Als weiteres stabilisierendes Gewebe bildete sich vor allem interfragmentär und um die Knochenenden herum ein vorwiegend bindegewebiger Kallus, welches den Beginn der Granulationsphase darstellt

(Klaushofer et al., 1994). Dieser weiche Kallus übernahm die weitere Fixation der Osteotomiefragmente, es handelt sich dabei um ein sehr flexibles Gewebe, welches noch eine erhebliche Menge an Gewebedehnung toleriert (Einhorn, 1998). Außerdem entstand zu diesem frühen Zeitpunkt, wenn auch in sehr geringen Anteilen, erster knöcherner Kallus, was den Anfängen der Phase der Kallushärtung entspricht (Frost, 1989a). Die Kallusreaktion und Bildung passt sich der primär vorherrschenden großen Instabilität durch Bildung eines flexiblen Kallusgewebes an, es kommt somit zur weiteren Stabilisierung der stark beweglichen Fragmente. Die Tatsache, dass es zur ersten Kallusbildung kam, ist ein Zeichen für eine ausreichende Durchblutung in der Osteotomieregion, denn die Kallusbildung hängt entscheidend von der Blutversorgung ab (Stürmer, 1996). Außerdem tritt eine Kallusbildung bei instabiler Fixation und somit großen interfragmentären Bewegungen auf (Phillips, 2005), wie sie in diesem Versuchsaufbau vorlagen. Es waren eindeutig Abläufe der sekundären Frakturheilung nachweisbar, was aufgrund der flexiblen Fixation mit dem kritisch scherweichen Fixateur zu erwarten war.

### **Drei Wochen post operationem**

Zum Dreiwochenzeitpunkt nahm die Menge an Hämatomgewebe deutlich ab, da dieses zunehmend organisiert und abgebaut wurde (McKibbin, 1978). Im Osteotomiespalt befand sich mehr bindegewebiger Kallus, sowie Knorpelgewebe, was einem Fortschreiten der Phase des weichen Kallus entsprach. Zusätzlich kam es im Vergleich zum Zweiwochenzeitpunkt zu einer deutlichen Zunahme und Verdichtung der knöchernen Kallusanteile, welche den interfragmentären Bewegungen entgegen wirkten. Der flexible weiche Kallus wurde nach und nach durch das die Knochenrigidität erhöhende Gewebe (faseriges Bindegewebe, Bindegewebsknorpel, Geflechtknochen) ersetzt (Dimitriou et al., 2005). Der periostal gebildete knöcherne Kallus führte somit zunehmend zur Stabilisierung und Fixierung der Osteotomiefragmente und erhöhte durch ansteigenden Gewebedurchmesser die Stärke des Knochens. Aktive Osteoblasten waren morphologisch durch ihre kubische Zellform gekennzeichnet und lagen dem von ihnen produzierten Osteoid direkt an (Kalfas, 2001). Trotz der starken Kalluszunahme kam es in keinem der Präparate zu einer knöchernen Überbrückung des Osteotomiespalt, dies ist vermutlich darauf zurückzuführen, dass die interfragmentären Bewegungen noch zu groß waren für die Ausbildung eines überbrückenden knöchernen interkortikalen Kallusgewebes. Es ist bekannt, dass die einzelnen Kallusbereiche unterschiedlichen Belastungen und Dehnungsreizen ausgesetzt sind (Lacroix et al., 2002). Der externe Kallus wird im Vergleich zum interfragmentären Kallus deutlich weniger durch Fragmentverschiebungen beeinflusst (Lacroix et al., 2002). Dies erklärt die auch zum späteren Zeitpunkt von sechs Wochen vermehrt zu beobachtende unterschiedliche Kalluszusammensetzung in den verschiedenen Bereichen. Interkortikal liegen daher die größten Bewegungen vor, welche bei der Frakturheilung als letzte

überwunden werden (Perren, 1992). Eine Vereinigung der distalen und proximalen knöchernen Kallusformationen geschieht auf Höhe der Frakturlinie zuerst peripher in den Kallusaußenzonen (Claes et al., 2000). Erst nach dieser Vereinigung ist die Fraktur ausreichend stabilisiert, so dass die Heilung der frakturierten Kortizes erfolgen kann (Claes et al., 2000).

Der früh entstandene Kallus wird später im Rahmen des Remodellings durch Osteoklasten abgebaut und durch Osteoblasten ersetzt (Amling et al., 1996). Osteoklasten sind durch ihre spezifischen Organellen und Membrandomänen („ruffled border“, „sealing zone“) gekennzeichnet (Liebich, 1999). Osteoklasten liegen vorwiegend in so genannten Resorptionslakunen dem abzubauenden Knochen direkt an (Athanasou, 1996). Die Lakunen waren beim genauen Fokussieren in den einzelnen Präparaten eindeutig zu erkennen. Das zum Dreiwochenzeitpunkt erste Auftreten von Osteoklasten steht als Zeichen für beginnende Remodelling- und Resorptionsvorgänge (Webb et al., 2000).

### **Sechs Wochen post operationem**

Im Unterschied zum vorangegangenen Untersuchungszeitpunkt waren nach sechs Wochen nur noch in einem Präparat Hämatomreste nachweisbar. Mit fortschreitender Knochenneubildung wurden die aktiven Osteoblasten zunehmend zu Osteozyten, welche vollständig von Knochen umgeben waren (Braun et al., 1996). Insgesamt war die Knochenneubildung weiter vorangeschritten. Das Kallusgewebe stellte sich nicht mehr so einheitlich dar wie zu den vorherigen Zeitpunkten, es wies zunehmend strukturell sehr unterschiedliche Bereiche auf. Teilweise wirkte es kompakt und gleichmäßig, in anderen Regionen war es aufgelockert und wies ungleichmäßige Mineralisationsbereiche auf. Diese histologischen Beobachtungen lassen sich mit den Erkenntnissen von Lacroix und Prendergast erklären. Die unterschiedliche Kalluszusammensetzung der verschiedenen Bereiche resultiert aus einer unterschiedlichen Belastung und somit verschiedenen lokalen Dehnungsreizen auf das jeweilige Gewebe (Lacroix et al., 2002). Erst bei geringen Belastungen bis maximal zwei Prozent bildet sich Knochengewebe (Trostle et al., 1996), da es im Osteotomiespalt nicht zur knöchernen Überbrückung kam, ist davon auszugehen, dass die dort vorherrschenden Belastungen zum Untersuchungszeitpunkt über zwei Prozent lagen.

Auffällig war die zu diesem Zeitpunkt beginnende Reduktion der periostalen knöchernen Kallusanteile der jeweiligen Kortizes, welche am weitesten entfernt waren vom verschobenen Gegenfragment. Es kam vermehrt zu Abrundungen der äußeren Kortikaliskanten, die am weitesten vom ursprünglich gegenüberliegenden Fragment entfernt waren. Durch diese Resorptionsvorgänge der Osteoklasten werden laut Perren (2001) die im Bereich der Fragmentenden wirkenden Dehnungsbelastungen reduziert. Auf Dehnungsreize über zehn Prozent reagiert der Knochen vorrangig mit Resorption (Perren, 2002), womit die

auftretenden Umbauvorgänge an den Osteotomieanten erklärt werden können. Auch Stürmer (1996) beschreibt im Rahmen der sekundären Frakturheilung eine flächenhafte Resorption der Fragmentenden. Diese Abrundungen sind ein Zeichen für große Zug- und Druckbelastungen in diesen Arealen. Für die Abrundungen der zuvor glatten Knochenkanten sind aktive Osteoklasten verantwortlich, welche vermehrt auftraten und mit remodelierenden Prozessen begannen. Durch die Umgestaltung der Kortikaliskanten kam es zum Abbau so genannter Belastungsspitzen, die auftretenden Bewegungen wirken somit nicht mehr allein auf die kleine Fläche der Ecken, sondern werden über eine größere Fläche verteilt und abgefangen. Diese Umbauvorgänge können als Antwort auf die mechanischen Verhältnisse in diesem Bereich interpretiert werden. Laut Perren (1992) herrscht zwischen den Knochenfragmenten die größte bewegungsabhängige Dehnung aufgrund der kurzen Distanz zwischen den beiden Knochenfragmenten. Die Umbauvorgänge an den Kortikalisecken sind ein Zeichen dafür, dass auch zu diesem fortgeschrittenen Zeitpunkt der Frakturheilung noch erhebliche interfragmentäre Bewegungen vorliegen. Lacroix und Prendelgast (2002) konnten mit ihren Untersuchungen bestätigen, dass die Knochenneubildung erst nach ausreichender Stabilisierung der Fragmente durch Knorpel- und Bindegewebe und bei niedrigem hydrostatischem Stress erfolgen kann. Nimmt der hydrostatische Stress im Gewebe zu, so wird die Knorpelbildung begünstigt (Lacroix et al., 2002). Bei zunehmenden Scherbewegungen wird die Bildung von Knorpel gehemmt und die Entstehung von Bindegewebe gefördert (Lacroix et al., 2002). Aufgrund dieser Erkenntnisse sind die starke Zubildung von Binde- und Knorpelgewebe, sowie die ausbleibende knöcherne Vereinigung der Fragmente in vorliegender Studie zu erklären. Obwohl sich peripher große knöcherne Kallusmassen gebildet haben, reichten diese nicht aus, den Osteotomiespalt genügend zu stabilisieren, um die knöcherne Überbrückung zu ermöglichen. Bei allen Präparaten war ein durchgehender unverknöcherter Osteotomiespalt mit überwiegend bindegewebigen und in geringerer Menge knorpeligen Kallusanteilen vorhanden. Zu diesem Zeitpunkt wird das Vorliegen einer verzögert ablaufenden Frakturheilung im Vergleich zur optimal verlaufenden Heilung deutlich, denn bei einem Vorgängerversuch unter optimalen mechanischen Rahmenbedingungen waren zu diesem Zeitpunkt bereits fast alle Frakturen knöchern überbrückt (Schell et al., 2005).

### **Neun Wochen post operationem**

Auch zum letzten Untersuchungszeitraum von neun Wochen hatte in keiner der untersuchten Knochenproben eine knöcherne Überbrückung der Osteotomieregion stattgefunden. Die massiven knöchernen Kallusformationen wuchsen zwar von proximal und distal weiter in Richtung Osteotomiespalt aufeinander zu, führten aber in keinem Präparat zur knöchernen Vereinigung. Es befand sich interfragmentär bei allen Präparaten ein durchgehender teils bindegewebiger und überwiegend knorpeliger Spalt mit einer durchschnittlichen Breite von

einem Millimeter. Die Knorpelzellen waren überwiegend stark hypertrophiert und wiesen vermehrt Bezirke der enchondralen Ossifikation auf. Der vorhandene Kallus macht laut Stürmer (1996) während der fortschreitenden Heilungsphase ein inneres Remodelling durch und ist anschließend nicht mehr elastisch genug, um die auftretende Instabilität abzufedern, der Kallus nähert sich in seinem Elastizitätsverhalten der Kortikalis an. Sobald durch Resorption der Fragmentenden und Bildung eines kräftigen Kallus die interfragmentären Bewegungen auf mikroskopischer Ebene soweit reduziert werden, dass junger Faserknochen nicht mehr über seine Elastizitätsreserve gedehnt wird, kann der verbliebene Spalt zwischen den Fragmenten knöchern überbrückt werden (Stürmer, 1996). Die erste knöcherne Überbrückung einer Fraktur ist generell in der Peripherie des periostalen Kallus zu erwarten, denn dort liegen im Vergleich zum zentralen Bereich des Osteotomiespaltes die geringsten Druckbelastungen vor (Carter et al., 1998). Die Überbrückung der peripheren Kallusanteile stellt eine wesentliche Voraussetzung für die sich anschließende knöcherne Vereinigung der osteotomierten Kortikalis dar, denn sie zeigt an, dass die Fraktur stabil genug ist für eine kortikale Überbrückung (Claes et al., 2000).

Neben hyalinem Knorpelgewebe traten zunehmend Bereiche mit Faserknorpelgewebe auf. Faserknorpel stellt eine sehr kompakte und stabile Knorpelart dar, welche vor allem in Zwischenwirbelscheiben, Gelenkbändern und Sehnen vorkommt, sich aber auch bei starken Gewebelastungen aus hyalinem Knorpel entwickeln kann (Weyrauch et al., 1998). Dies war in vorliegender Studie der Fall, in den besonders beanspruchten Bereichen zwischen den Osteotomiefragmenten und jeweils im Randbereich distal und proximal, bildete sich aus zuvor entstandenem hyalinem Knorpel Faserknorpel, wobei die kollagenen Fasern in Richtung der Hauptbelastung des Gewebes angeordnet waren. Die Regionen genau zwischen den Fragmentenden erfahren laut Carter und Mitarbeitern (1998) die größten mechanischen Druckbelastungen, was die dortige Faserknorpelbildung erklärt. An allen anderen Knochenoberflächen und auch außerhalb des Osteotomiespaltes liegen geringere Druckbelastungen vor (Carter et al., 1998). Dies erklärt die dort überwiegend vorkommende knöcherne Kallusbildung. Trotz der großen Kallusformationen waren die interfragmentären Bewegungen auch nach neun Wochen noch zu groß für eine knöcherne Überbrückung. Die massiven Kallusformationen konnten die interfragmentären Bewegungen nicht ausreichend reduzieren, dass eine problemlose knöcherne Überwachsung des restlichen Osteotomiespaltes erfolgen konnte, so kommt es in jedem Fall zur verzögerten, wenn nicht sogar zur ausbleibenden Heilung (Kenwright et al., 1989). Die anhaltende Instabilität führt über Biege- und Torsionsbelastungen zu großen Gewebelastungen im Spalt und hohen Zugbelastungen um die Osteotomie-region herum mit der Folge von Verletzungen und Zerreißen von neu gebildetem Gewebe und Gefäßen, dadurch kommt es zu Heilungsverzögerungen. Aufgrund der anhaltenden Druckbelastungen kommt es vermehrt zur Bildung von Knorpelgewebe, dies kann bis hin zur Ausbildung einer Pseudarthrose

führen (Carter et al., 1998). Große interfragmentäre Bewegungen können zwar einen fördernden Effekt auf die Kallusbildung haben, jedoch sind sie schädlich für die Angiogenese und führen vermehrt zur Ausbildung einer hypertrophen Pseudarthrose (Wallace et al., 1994). Bei intakter Durchblutung kann laut Stürmer (1996) eine hohe interfragmentäre Bewegung sogar einen kräftigen Kallus wie eine starke Resorption triggern. Dieser Triggermechanismus kann aber auch erlöschen und es stellt sich ein „steady state“ mit dem Bild einer hypertrophen Pseudarthrose ein (Stürmer, 1996).

Nach neun Wochen Untersuchungszeitraum besteht die Situation einer verzögerten Knochenheilung, wobei zu diesem Zeitpunkt keine Aussage über den endgültigen Heilungsausgang getroffen werden kann. Erst wenn nach sechs Monaten keine knöcherne Überbrückung erfolgt ist, kann man laut Runkel und Rommens (2000) beim Menschen von einer Pseudarthrose sprechen. Dies bedeutet, dass sämtliche Reparationsprozesse zum Stillstand gekommen sind.

Zum jetzigen Zeitpunkt kann aufgrund der biomechanischen und histologischen Befunde von einer Situation gesprochen werden, die zu einer hypertrophen Pseudarthrose führen kann. Eine genaue Beurteilung, ob es sich hierbei tatsächlich um eine verzögerte Knochenheilung handelt oder um eine hypertrophe Pseudarthrose, kann nach einem Untersuchungszeitraum von neun Wochen nicht vorgenommen werden.

Aufgrund des histologischen Erscheinungsbildes kommt es entweder in nächster Zeit zur knöchernen Vereinigung oder es kommt zur Ausbildung einer hypertrophen Pseudarthrose mit keiner vollständigen knöchernen Überbrückung des Osteotomiespalt. In vorliegender Studie liegen einige histologische Hinweise für die Ausbildung einer hypertrophen Pseudarthrose vor, die knöcherne Durchbauung des Markraumes, die membranähnliche Struktur im verbleibenden Bewegungsspalt als mögliche Grundlage einer Gelenkkapselbildung, sowie die ausbleibende knöcherne Vereinigung nach neun Wochen. Dies sind jedoch nur vorsichtige Tendenzen, die keinen endgültigen Schluss zulassen. Um das endgültige Ausheilungsergebnis mit letzter Sicherheit beurteilen zu können, müsste der Untersuchungszeitraum verlängert werden, was in einem Folgeprojekt geplant ist. Dort kann man dann anhand der histologischen Situation zu einem späteren Zeitpunkt ein genaues Ergebnis über den Heilungsausgang erzielen. Bei der Folgestudie sollen die Untersuchungen über einen Zeitraum von sechs Monaten ausgedehnt werden.

### **Zusammenfassende Schlussfolgerung**

Aufgrund der großen interfragmentären Bewegungen durch den kritisch scherweichen Fixateurs kam es zu einer starken biomechanischen Beanspruchung des Kallusgewebes, was zu einer vermehrten Kallusbildung führt. Durch die zunehmende Kallusbildung werden die relativen Bewegungen zwischen den beiden Osteotomiefragmenten nach und nach verringert.

Unter Verwendung des kritisch scherweichen Fixateurs zeichnete sich ein stetiger Anstieg des Kallusdurchmessers auf Höhe des Osteotomiespalt von der zweiten bis zur neunten Woche ab. Während allen vier Untersuchungszeiträumen waren aktive Vorgänge der sekundären Frakturheilung vorhanden, man erkannte anhand der beobachteten Gewebesituationen einen stetigen Fortschritt der sekundären Frakturheilung, jedoch kam es in keinem der untersuchten Präparate innerhalb des Beobachtungszeitraumes von zwei bis neun Wochen zur knöchernen Überbrückung des Osteotomiespalt. In diesem befand sich zum Neunwochenzeitpunkt ein ungefähr ein bis zwei Millimeter breiter durchgehender Spalt, welcher aus Knorpelgewebe und in geringeren Anteilen aus Bindegewebe bestand. In einigen Präparaten ließen die großen knöchernen Kallusformationen erste Tendenzen für eine baldige Vereinigung erkennen, sie wuchsen auf Osteotomiespalthöhe in den peripheren Bereichen aufeinander zu und waren teilweise nur durch einen sehr schmalen überwiegend knorpeligen Spalt voneinander getrennt. Eine genaue Beurteilung, ob es sich hierbei tatsächlich um eine verzögerte Knochenheilung handelt oder um eine hypertrophe Pseudarthrose, kann nach einem Untersuchungszeitraum von neun Wochen nicht vorgenommen werden. Es ist ohnehin schwierig, eine genaue Definition für eine verzögerte Knochenheilung zu geben. Laut Runkel und Rommens (2000) und Mayr (2002) gilt eine Heilung als verzögert, wenn sie innerhalb vier bis sechs Monaten nicht vollständig geheilt ist. Diese Definition bezieht sich auf den Menschen, daher ist sie nur bedingt für unser Versuchstier Schaf anwendbar. Es ist bekannt, dass die knöchernen Durchbauung beim Schaf, ähnlich wie beim Menschen, mindestens sechs bis acht Wochen dauert und von der gewählten Frakturversorgung abhängt (Wu et al., 1984). Hingegen sind die Knochenumbauvorgänge oftmals auch nach zwei Jahren noch nicht vollständig abgeschlossen. Die zeitliche Definition einer Heilungsverzögerung verdeutlicht die Schwierigkeit einer abschließenden Aussage über den Heilungsausgang nach unserem Versuchszeitraum von neun Wochen.

#### **5.5.4. Vergleich mit anderen Studien**

Im Rahmen der Frakturheilung existieren mehrere Studien, die sich mit den mechanischen und biologischen Abläufen der Heilung unter Anwendung einer Fixateur externe-Osteosynthese befasst haben, jedoch gibt es nur wenige direkte Vergleichstudien zur verzögerten oder sogar ausbleibenden Frakturheilung. Bei keiner der folgenden Vergleichsstudien war die interfragmentäre Rotationsbewegung komplett freigegeben wie in vorliegender Studie. Die Rotationsbewegung wurde in vorliegender Studie nur durch die angrenzenden Weichteile wie Muskeln, Sehnen und Bänder begrenzt. Aufgrund des speziell für diese Studie entwickelten Fixateurdesigns kann man in der Literatur diesbezüglich keine direkten Vergleichsstudien erwarten, dennoch gibt es mehrere Forschungsvorhaben, die

einen vergleichbaren Versuchsaufbau vorweisen und ebenfalls einen monolateralen Fixateur externe anderen Designs am Großtiermodell untersuchten.

Schell und Kollegen (2005) untersuchten in einem vorangegangenen Forschungsprojekt mit gleichem Versuchsaufbau wie in dieser Studie die Beeinflussung der Frakturheilung durch unterschiedliche mechanische Rahmenbedingungen. Die Heilung wurde ebenfalls nach zwei, drei, sechs und neun Wochen radiologisch, biomechanisch und histologisch untersucht und ausgewertet. Insgesamt wurde bei 64 Schafen eine Tibiaosteotomie mit gleichem Osteotomiespalt wie in vorliegender Studie durchgeführt, wobei 32 Tiere einen rigiden und 32 Tiere einen semirigiden Fixateur externe implantiert bekamen. Der semirigide Fixateur externe entsprach vom Design dem rigiden, wobei das Modell so abgeändert wurde, dass es flexibler war und somit mehr Scherbewegungen zuließ. Schell und Kollegen (2005) konnten in ihrer Studie nachweisen, dass der Heilungsverlauf durch die anfängliche Fixationsstabilität beeinflusst wird. Die Tiere, welche mit dem semirigiden Fixateur externe versorgt wurden, zeigten zwar keine Heilungsverzögerung, aber einen weniger optimalen Heilungsweg. Nach sechs Wochen wiesen die semirigide versorgten Tiere eine signifikant schlechtere Kallussteifheit und eine minderwertige Kallusqualität im Vergleich zu den Tieren mit rigidem Fixateur externe auf. Daraus schlossen Schell und Kollegen (2005), dass nicht nur der Heilungsausgang durch die anfängliche Fixationsstabilität beeinflusst wird, sondern auch der Heilungsverlauf. Die Ergebnisse zeigen, dass der Heilungsverlauf sich nicht nur in der Kallusgestaltung, sondern auch in der Entwicklungsgeschwindigkeit des Kallus unterscheidet. Vergleicht man die histologischen Ergebnisse der vorliegenden Studie mit denen von Schell und Kollegen, so wird deutlich, dass die Heilung der hier vorgestellten Studie ebenfalls über einen weniger optimalen Weg verläuft und zusätzlich verzögert ist. Während bei Schell und Kollegen die Verzögerung des Heilungsverlaufes über den weniger optimalen Weg bis zum Neunwochenzeitpunkt aufgeholt werden konnte und alle Tibiae im ursprünglichen Osteotomiebereich knöchern überbrückt waren, ist dies in vorliegender Studie nicht der Fall. Die Studie von Schell und Kollegen diente dieser Studie als Modell und Grundlage. Die hier diskutierte Studie stellt ein Nachfolgeprojekt der Studie von Schell und Kollegen dar und sollte im Anschluss an die Aufklärung eines weniger optimal verlaufenden Heilungsweges nun die Abläufe der stark verzögerten Frakturheilung analysieren und darstellen.

Schell und Kollegen (2005) konnten unter stabiler Fixateur externe-Osteosynthese eine knöcherne Konsolidierung der Osteotomiefragmente bereits in großen Teilen zum Sechswochen- und in jedem Fall zum Neunwochenzeitpunkt beobachten. In der vorangegangenen Studie wurde die größte Kallusmenge unter rigider Fixation bereits zum Dreiwochenzeitpunkt und unter semirigider Fixation zum Sechswochenzeitpunkt verzeichnet. In der rigiden Fixationsgruppe nahm die Kallusmasse im Rahmen des frühen Remodellings bereits ab der dritten Woche wieder ab, wohingegen der Kallusumfang in der semirigide versorgten Gruppe



von der sechsten bis zur neunten Woche nur wenig reduziert wurde, was für ein späteres Remodelling spricht. Innerhalb der neunwöchigen Untersuchung kam es bei allen Tieren zur knöchernen Überbrückung, somit wurden die zum Drei-, Sechs-, und Neunwochenzeitpunkt beobachteten histologischen Heilungsunterschiede ausgeglichen und von der semirigide versorgten Gruppe vollständig aufgeholt. Die biomechanischen Ergebnisse der rigide versorgten Tiere zeigten eine Erhöhung der Steifigkeit zum Sechswochenzeitpunkt auf, die Knochen unter semirigider Fixation erzielten den gleichen Heilungsfortschritt nach neun Wochen.

Vergleicht man die histologischen und biomechanischen Ergebnisse der hier vorgestellten Studie mit denen der vorangegangenen, so bestätigen diese die Annahme, dass in vorliegender Studie die Heilungsabläufe verzögert und weniger optimal sind. In der vorangegangenen Studie war die größte Kalluszunahme bereits sechs Wochen post operationem zu beobachten, nicht wie in dieser Studie erst zum Neunwochenzeitpunkt. Es kam zur vollständigen knöchernen Konsolidierung aller vier Kortizes mit geringerer Kallusformation als in der hier vorliegenden Studie. Auch wenn in der vorliegenden Studie bis zum letzten Untersuchungszeitpunkt von neun Wochen keine knöcherne Vereinigung erfolgte, so sind dennoch bis zum Schluss aktive Vorgänge der sekundären Frakturheilung vorhanden. Die von Schell und Kollegen (2005) beobachtete Kallusreduzierung im Rahmen eines frühen Remodellings der rigide versorgten Gruppe konnte in vorliegender Studie nicht nachgewiesen werden, die Kallusmenge nahm bis zum letzten Beobachtungszeitpunkt zu und erreichte ihr Maximum zum Neunwochenzeitpunkt. Somit war der Heilungsprozess im Vergleich deutlich verzögert, und es konnte noch keine Kallusabnahme im Rahmen eines frühen Remodellings beobachtet werden. Die aufgrund der starken Fragmentbewegung vorliegende Verzögerung der Frakturheilung konnte nicht, wie im vorangegangenen Projekt, innerhalb der neun Wochen aufgeholt werden. Die interfragmentären Bewegungen waren zu groß, es wurde innerhalb der neun Wochen Beobachtungszeit keine ausreichende Stabilisierung der beiden Osteotomiefragmente erreicht, welche die Grundvoraussetzung für die abschließende knöcherne Überbrückung der Kortizes darstellt. Aufgrund der vorliegenden Ergebnisse nach neun Wochen kann für die vorliegende Studie keine abschließende Aussage über das endgültige Heilungsergebnis getätigt werden, der Beobachtungszeitraum ist für die starke Heilungsverzögerung mit neun Wochen zu kurz bemessen.

Ein Vergleich mit den Versuchsergebnissen von Stürmer (1988) bestätigt ebenfalls die Annahme, dass in der hier vorgestellten Studie eine Heilungsverzögerung vorliegt. Stürmer führte ebenfalls bei Schafen eine Querosteotomie durch, mit anschließender unilateraler Fixateur externe-Versorgung. Dieser Fixateur externe war deutlich stabiler konfiguriert als das Modell in vorliegender Studie und ließ im Vergleich wesentlich geringere interfragmentäre Bewegungen zu. Stürmer (1988) führte histologische Untersuchungen nach

zwei, vier, sechs und acht Wochen durch. Im Gegensatz zu den hier vorliegenden Ergebnissen waren einige Osteotomien bereits nach sechs und alle nach acht Wochen knöchern überbrückt.

Sowohl die Frakturspaltgröße als auch die Frakturstabilität haben einen entscheidenden Einfluss auf den Heilungsausgang. Um dies genauer zu definieren, führten Augat und Kollegen (1998), sowie Claes und Mitarbeiter (1998) ebenfalls Untersuchungen an Schafen durch. Die Tiere erhielten im Gegensatz zur vorliegenden Studie eine Osteotomie des Metatarsus und nicht der Tibia. Die 42 Schafe wurden randomisiert in sechs Gruppen eingeteilt und erhielten unterschiedliche Osteotomiespaltgrößen von eins, zwei und sechs Millimetern Breite kombiniert mit verschiedenen interfragmentären Bewegungen von 7 und 31 Prozent. Die Tiere erhielten über den Beobachtungszeitraum von neun Wochen einen monolateralen Fixateur externe implantiert, der kleine definierte Axialbewegungen zuließ. Nach Ablauf der neun Wochen wurden die Tiere euthanasiert, und es folgten biomechanische sowie histologische Untersuchungen. Dabei stellte sich heraus, dass eine zunehmende Spaltgröße in einer schlechteren mechanischen und histologischen Qualität des Kallusgewebes resultierte und der Heilungsprozess weniger erfolgreich war als bei kleineren Spaltgrößen. Somit kamen sie anhand ihrer Ergebnisse zu dem Schluss, dass das Ausmaß des Frakturspalts einen größeren Einfluss auf den Heilungsprozess hat als die interfragmentären Bewegungen selbst (Claes et al., 1998).

In vorliegender Studie lagen neben einer Spaltgröße von drei Millimetern zusätzlich große interfragmentäre Bewegungen vor, so dass sicherlich beide Komponenten gleichermaßen für das Ausbleiben einer knöchernen Fragmentüberbrückung verantwortlich gemacht werden können. Um dies genauer zu eruieren, könnte man Untersuchungen mit identischem Versuchsaufbau und gleichem Fixateur externe, aber kleinerem Osteotomiespalt von nur einem Millimeter durchführen und nach neun Wochen analysieren.

Numerische Grenzwerte für günstige und problematische interfragmentäre Bewegungen anzugeben ist aufgrund der individuellen Bedingungen einer jeden Fraktur kaum möglich (Claes et al., 2000). Allgemein bekannt ist, dass die mechanische Umgebung, vor allem die Größe der interfragmentären Bewegungen, einen ausschlaggebenden Einfluss auf die produzierte Menge an knöchernem Kallusgewebe hat (McKibbin, 1978; Sarmiento et al., 1995). Außerdem beeinflussen die interfragmentären Bewegungen die Qualität sowie die Quantität der Kallusbildung (Klein et al., 2003). Große interfragmentäre Bewegungen führen häufig trotz einer erheblichen Kallusbildung nicht zur knöchernen Überbrückung der Osteotomiefragmente, was zu einer verzögerten Heilung oder zu einer hypertrophen Pseudarthrose führen kann (Augat et al., 1996). Dies wurde auch durch vorliegende Studie deutlich, denn es kam aufgrund der großen interfragmentären Bewegungen zwar zur Bildung großer Kallusmengen, diese wiesen aber nur eine geringe Stabilität auf, welche keine knöcherne Überbrückung ermöglichte.

Anhand der Erkenntnisse der Literatur, dass flexible Fixationssysteme zu großen interfragmentären Bewegungen führen, haben Hente und Mitarbeiter (2004) die Beeinflussung der Frakturheilung durch Kompressions- und Distraktionsbewegungen untersucht. Dabei gingen Hente und Kollegen davon aus, dass Kompressionsbewegungen einen übergeordneten Einfluss auf die Frakturheilung haben im Gegensatz zu distraktiven Bewegungen. Sie führten bei 18 Schafen, die in drei Gruppen eingeteilt wurden, eine diaphysäre Osteotomie der Tibia mit einer Spaltgröße von zwei Millimetern durch und montierten einen speziellen unilateralen Stellorgan angetriebenen Fixateur externe. Dieser elastische Fixateur externe führte über das Stellorgan zu einer konstanten Zugbeanspruchung auf der einen und zu einer Komprimierung des Spaltgewebes auf der anderen Seite, wobei der Stellmotor jeweils ein Biegemoment von 22,5 Nm erzeugte. Während der Zyklusdauer von 0,8 Sekunden wird das Spaltgewebe immer ausgehend von der neutralen Position auf der Distraktionsseite auf drei Millimeter geweitet und auf der Kompressionsseite auf einen Millimeter verengt. Eine der drei Gruppen fungierte als Kontrollgruppe ohne aktive Verschiebungen, die zweite Gruppe erhielt zehn und die dritte Gruppe 1000 zyklische Verschiebungen innerhalb von 24 Stunden. Im Unterschied zu der hier vorgestellten Studie führten Hente und Kollegen (2004) eine Patellasehnen-Tenotomie durch, um eine Beeinflussung des Ausheilungsergebnisses durch unkontrollierte Bewegungen zu vermeiden. Nach einer Beobachtungszeit von sechs Wochen wurden die Tiere euthanasiert und es folgten biomechanische, radiologische sowie mikroradiographische Untersuchungen. Hente und Kollegen (2004) kamen anhand ihrer Befunde zu dem Ergebnis, dass zyklische Kompressionsbewegungen während der ersten sechs Wochen tatsächlich zu einer größeren Menge an neu gebildetem Knochen führen, während bei distraktiven Bewegungen kein signifikanter Anstieg zu verzeichnen war. Angaben in der Literatur bestätigen die Ergebnisse von Hente und Mitarbeitern, dass zyklische Kompressionsbewegungen einen der wichtigsten Einflussfaktoren für die Knochenbildung darstellen (Goodship et al., 1985).

Matsushita und Kurokawa (1998) fanden hingegen bei ihren Untersuchungen keine entscheidenden Unterschiede von zyklischen Kompressions- versus Distraktionsbewegungen auf die Beeinflussung der Frakturheilung. Sie erzielten in ihrem Kaninchenmodell mit einer Osteotomie von drei Millimetern Breite für beide Untersuchungsgruppen (Kompression, Distraction) die gleichen Werte. Vermutlich führte die funktionelle Belastung der Tiere aufgrund der flexiblen Fixation mit dünnen Pins zu großen Kompressionsbewegungen, die der Distraction übergeordnet waren und somit auch in dieser Untersuchungsgruppe zu deutlich besseren Werten führten als bei reiner Distraktionsbewegung.

Wolf und Kollegen (1998) untersuchten ebenfalls den Einfluss der externen Stimulation auf die Frakturheilung. Sie führten bei 41 Schafen eine Osteotomie an der linken Tibia mit einem

identischen Osteotomiespalt wie in vorliegender Studie durch. Die Tiere erhielten einen unilateralen Fixateur externe und wurden in vier Gruppen mit unterschiedlich extern zugeführten interfragmentären Bewegungen (0,0; 0,2; 0,4; 0,8 mm) eingeteilt. Nach einem Beobachtungszeitraum von sechs Wochen wurden die Tiere euthanasiert und biomechanisch sowie radiologisch untersucht. Wolf und Kollegen (1998) erzielten mit ihrer externen Stimulation nur einen geringen Effekt auf die Knochenheilung im Vergleich zu Tieren mit einem normal flexiblen Fixateur externe und uneingeschränkter Gangaktivität. Nur gegenüber der sehr rigide versorgten Kontrollgruppe ohne externe Stimulation konnten sie einen deutlichen Unterschied feststellen. Die sehr rigide versorgte Gruppe wies eine weniger gute Heilung auf als die beiden anderen Gruppen, welche sehr ähnliche Heilungsraten aufzeigten. Daraus kann man schließen, dass eine Versorgung mit einem heute üblichen elastischen Fixationssystem wie dem Fixateur externe eine ausreichende Menge an interfragmentären Bewegungen zur Stimulation der erwünschten Kallusbildung erzeugt und keine externe Stimulation nötig ist. Vergleicht man die Ergebnisse mit denen der vorliegenden Studie, so ist zu berücksichtigen, dass der kritisch scherweiche Fixateur externe in vorliegender Studie deutlich flexibler war und wesentlich mehr interfragmentäre Bewegungen zuließ, dies erklärt das deutlich schlechtere Heilungsergebnis zum Sechswochenzeitpunkt.

Trotz der vielen Forschungsprojekte ist die genaue mechanische Beeinflussung der Frakturheilung auch heute noch nicht ausreichend geklärt. Allgemein bekannt ist, dass es durch exzessive Bewegungen jeglicher Art, dies können sowohl Scherbewegungen als auch axiale Kompressionsbewegungen sein, zu Heilungsverzögerungen kommen kann (Bishop et al., 2006).

### **5.5. Schlussfolgerung**

Ziel der hier diskutierten Studie war es, den Einfluss definierter biomechanischer Rahmenbedingungen auf die Ausprägung und Differenzierung des sich während der Heilung bildenden Frakturkallus, zu untersuchen. Die Studie hat mit ihrem Aufbau Bedeutung für die Grundlagenforschung, denn es wurden Rahmenbedingungen geschaffen, die im klinischen Alltag zu Heilungsverzögerungen führen.

Die Ergebnisse dieser Studie haben gezeigt, dass das biomechanische Umfeld einer Fraktur einen signifikanten Einfluss auf den Heilungsverlauf und deren Ausgang ausübt. Vor allem die initial auf das Frakturgebiet einwirkenden interfragmentären Bewegungen beeinflussen das Langzeitergebnis der Heilung (Schell et al., 2005). Das in vorliegender Studie gewählte biomechanische Umfeld der Frakturregion führte in jedem Fall zu einer deutlich verzögerten Knochenheilung. Insgesamt kann die Aussage von Claes und Kollegen (1998), dass eine große Anzahl an interfragmentären Bewegungen zwar die Kallusmenge selbst, aber nicht

zwingend die Kallusqualität erhöht, bestätigt werden. Die Kallusbildung und -differenzierung wird über den gesamten Heilungsverlauf durch die interfragmentären Bewegungen beeinflusst (Claes et al., 1998). In vorliegender Studie führten die großen interfragmentären Bewegungen zwar zu einer starken Kallusbildung, jedoch in keinem Fall zur Ausheilung der Fraktur. Vergleicht man diese Ergebnisse mit denen der vorangegangenen Studie, welche den gleichen Versuchsaufbau jedoch optimale mechanische Rahmenbedingungen aufwies, so stellt man eine deutliche Heilungsverzögerung fest, denn in vorangegangener Studie waren alle Osteotomien nach neun Wochen knöchern konsolidiert. In der vorherigen Studie reichte der Zeitraum von neun Wochen aus, um die interfragmentären Bewegungen soweit zu reduzieren, dass eine knöcherne Konsolidierung möglich war. Diese Tatsache stützt die in hier diskutierter Studie vorliegende starke Heilungsverzögerung. Allgemein wird mit vorliegender Studie bestätigt, dass starke unkontrollierte Bewegungen zu einer Heilungsverzögerung im schlimmsten Fall sogar zu einem Heilungsstillstand führen können. Um in vorliegender Studie eine abschließende Aussage über den endgültigen Heilungsausgang treffen zu können, ist der Beobachtungszeitraum mit neun Wochen zu kurz bemessen. Es kann lediglich die Aussage getroffen werden, dass bis zum letzten Untersuchungszeitpunkt von neun Wochen aktive Abläufe der Knochenheilung mit deutlicher Verzögerung und ungewissem Heilungsausgang vorliegen.

Auch heute spielen technische Fehler bei der Osteosynthese noch eine wesentliche Rolle. Mit der zunehmenden Verbreitung von Osteosynthesetechniken hat auch die Häufigkeit von Komplikationen wie z. B. Pseudarthrosenbildung während der Heilungsphase erheblich zugenommen (Stürmer, 1996). Durch ein besseres Verständnis der mechanischen und biologischen Rahmenbedingungen kann man gezielt in die verschiedenen Phasen der Frakturheilung eingreifen und somit die Frakturheilung beschleunigen bzw. Störungen der Frakturheilung besser entgegenwirken (Haas, 2000). Das Ziel der hier diskutierten Studie ist ein besseres Verständnis der histologischen und biomechanischen Abläufe unter verzögerter Frakturheilung. Durch ein besseres Verständnis der histologischen Abläufe kann gezielt in das Geschehen zur Optimierung der Knochenheilung eingegriffen werden. Alle erwähnten Forschungsvorhaben haben das gleiche abschließende Ziel vor Augen, eine Optimierung und Beschleunigung der Knochenheilung. Dies kann einerseits durch eine stetige Verbesserung von Operationsverfahren und Implantaten erreicht werden, andererseits durch die Aufschlüsselung der auf histologischer Ebene ablaufenden Prozesse um diese dann gezielt beeinflussen zu können. Daher ist es besonders wichtig den Heilungsverlauf der verzögerten Knochenheilung in folgenden Studien weiter aufzudecken und zu analysieren.

## 6. Zusammenfassung

Trotz der guten Fortschritte in der unfallchirurgischen Forschung kommt es in zehn bis zwanzig Prozent der Frakturen zu Komplikationen während der Heilungsphase (Haas, 2000). Das Ziel der unfallchirurgischen Behandlung ist eine möglichst schnelle und vollkommene Wiederherstellung der Funktion des Bewegungsapparates. Das ist nur möglich durch ein besseres Verständnis der komplexen Zusammenhänge zwischen der mechanischen und biologischen Situation im Frakturbereich. In einem vorangegangenen Tierversuchsprojekt konnten bereits Größenordnungen für Scherbewegungen definiert werden, die eine optimale bzw. eine weniger effektive Heilung zulassen. Gestützt auf das validierte muskuloskeletale Modell des Schafhinterlaufes wurde für vorliegendes Projekt ein spezieller kritisch-scherweicher Fixateur externe entwickelt, welcher mechanische Rahmenbedingungen erzeugt, deren Größenordnung in der Klinik zu Heilungsverzögerungen führen.

Ziel dieser Studie war es den Einfluss definierter mechanischer Rahmenbedingungen auf die Ausprägung und Differenzierung des sich bildenden Frakturkallus zu untersuchen und die Ergebnisse mit denen unter optimalen mechanischen Bedingungen zu vergleichen. Dazu wurden 32 Schafe mit einem monolateralen kritisch-scherweichen Fixateur externe versorgt. Bei allen Tieren wurde eine standardisierte Osteotomie der rechten Tibia mit jeweils identischem Osteotomiespalt von drei Millimetern durchgeführt. Nach Ablauf der jeweiligen Standzeit von zwei, drei, sechs und neun Wochen wurden die Tiere euthanasiert und radiologische, biomechanische und vor allem histologische Untersuchungen schlossen sich an.

Innerhalb des gesamten Beobachtungszeitraumes kam es bei keinem der Tiere zur knöchernen Überbrückung des Osteotomiespalt. Alle Tiere wiesen röntgenologisch auch nach neun Wochen einen wenn auch teilweise schmalen so doch durchgehend knochenfreien Spalt im ursprünglichen Osteotomiebereich auf, welcher histologisch aus Knorpel- und Bindegewebe bestand. Der Vergleich mit den Befunden des Vorgängerprojektes bestätigt die Annahme, dass der hier angewandte Versuchsaufbau zur Heilungsverzögerung führt, denn unter optimalen Bedingungen war ein Großteil der Tibiae bereits nach sechs und in jedem Fall nach neun Wochen vollständig knöchern überbrückt.

Die in der biomechanischen Untersuchung sechs und neun Wochen post operationem festgestellte geringe Torsionssteifigkeit weist ebenfalls auf eine wenig fortgeschrittene Heilung hin. In 50 Prozent der Fälle konnte eine biomechanische Untersuchung aufgrund einer zu großen Instabilität des noch unreifen Kallusgewebes nicht durchgeführt werden. Zwischen sechs und neun Wochen war kein Heilungsfortschritt, d.h., keine Steifigkeitszunahme, zu verzeichnen. Histologisch wurden zu allen vier Untersuchungszeitpunkten aktive Prozesse der Knochenheilung nachgewiesen, jedoch wurde das eigentliche Ziel der Knochenheilung, die knöcherne Überbrückung der Kortizes,

innerhalb der neun Wochen nicht erreicht. Der Grund für diese stark verzögerte Knochenheilung sind die ungünstigen mechanischen Rahmenbedingungen. Diese Ergebnisse demonstrieren, dass der Verlauf und das Ergebnis der Knochenheilung durch die biomechanischen Bedingungen entscheidend beeinflusst werden. Um eine genaue Aussage über den weiteren Heilungsverlauf und deren Ausgang zu treffen, ist der gewählte Beobachtungszeitraum von neun Wochen zu kurz. Nach neun Wochen liegt eine Situation der verzögerten Knochenheilung mit aktiven Abläufen der Heilung vor, welche vermutlich in nächster Zeit ihren Abschluss in der knöchernen Vereinigung der Fragmente findet oder aber in einer hypertrophen Pseudarthrose endet. Um dies genauer zu evaluieren, muss der Versuchszeitraum deutlich verlängert werden, was in einem Anschlussprojekt geplant ist. Die gewonnenen Erkenntnisse um die histologischen Abläufe der verzögerten Frakturheilung unter definierten mechanischen Rahmenbedingungen sollen helfen, die Möglichkeiten und Grenzen einer Osteosynthese frühzeitig abschätzen zu können und somit ein möglichst problemloses Ausheilen auch komplexer Frakturen zu ermöglichen.

## 7. Summary

### **Histological and biomechanical analysis of fracture callus under critical shear- flexible fixation at different time points post osteotomy in a sheep model.**

Although there are many progresses in the trauma surgical research, there are healing complications in about ten to twenty percent of fracture therapies (Haas, 2000).

The purpose of the trauma surgical treatment is a fast and total restoration of the function of the musculoskeletal system. This is only possible with a better understanding of the complex interaction between the mechanical and biological factors during the fine adjusted process of fracture healing.

In a previous animal study the magnitude for shear movements, inducing on the one hand a perfect and on the other a less effective healing, was defined.

Based on a validated musculoskeletal model of the sheep's hind leg, a special shear-flexible external fixator was designed for this project, which creates mechanical conditions known to hinder the healing process in the clinic.

The purpose of this study was to investigate the influence of determined critical mechanical conditions on the callus modulation and differentiation in comparison to the healing results induced by perfect mechanical conditions from a previous study.

For this study 32 sheep were stabilized by a monolateral critical external fixator. All sheep underwent a standardized osteotomy of the right tibia with an identical three millimetre wide osteotomy-gap. After the observation period of two, three, six or nine weeks the animals were sacrificed, and then radiological, biological and biomechanical analyses were performed.

During the observation time of nine weeks all sheep showed an incomplete fracture healing of the osteotomy gap. After nine weeks all sheep showed a small continuous fracture line in the fracture callus, which histologically consists of cartilage and connective-tissue.

By comparing with the results of the previous study, the hypothesis is confirmed, that the critical mechanical conditions in this study induced a delayed fracture healing: under perfect mechanical conditions, bony bridging occurred in most of the tibiae after six and in all tibiae after nine weeks.

The poor torsional stiffness after six and nine weeks also suggests a hardly advanced healing progress. In 50 percent of the cases the biomechanical testing was not possible due to immature callus tissue. Between six and nine weeks no increase in torsional stiffness was found in biomechanical testing. The reasons of the delayed bone healing are the very critical mechanical conditions.

The results demonstrate that the process and the score of the bone healing are influenced by the biomechanical circumstances.



To make a more precise statement of the healing process and its healing results, the chosen observation time period of nine weeks is too short. After nine weeks a delayed bone healing with active courses of the healing was observed, which could presumably lead to a healing of the fragments in the future but may also end in a hypertrophic pseudarthrosis.

To evaluate this precisely, the testing period must be longer, which is already planned in a further project.

The new perceptions about the histological steps of the delayed fracture healing under defined mechanical circumstances could help to figure out the possibilities and boundaries of an osteosynthesis. In this way a non-problematic healing could be realized even for complex fractures.

## 8. Literatur

Aerssens, J.; Boonen, S.; Lowet, G.; Dequeker, J. (1998):  
Interspecies differences in bone composition, density, and quality: potential implications for in vivo bone research.  
Endocrinology 139(2). S. 663-70.

Amling, M.; Delling, G. (1996):  
[Cell biology of osteoclasts and molecular mechanisms of bone resorption].  
Pathologie 17(5). S. 358-67.

Aro, H. T.; Chao, E. Y. (1993):  
Biomechanics and biology of fracture repair under external fixation.  
Hand Clin 9(4). S. 531-42.

Athanasou, N. A. (1996):  
Cellular biology of bone-resorbing cells.  
J Bone Joint Surg Am 78(7). S. 1096-112.

Augat, P.; Margevicius, K.; Simon, J.; Wolf, S.; Suger, G.; Claes, L. (1998):  
Local tissue properties in bone healing: influence of size and stability of the osteotomy gap.  
J Orthop Res 16(4). S. 475-81.

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

Autefage, A. (2000):  
The point of view of the veterinary surgeon: bone and fracture.  
Injury 31 Suppl 3. S. C50-5.

Beck, T. (2003):  
Der Knochen- lebendig und stoffwechselaktiv.  
Pharm.Ztg.(30). S. 30-39.

Beck, T. (2003):  
Der Knochen-lebendig und stoffwechselaktiv.  
Pharm.Ztg.

Bishop, N. E.; van Rhijn, M.; Tami, I.; Corveleijn, R.; Schneider, E.; Ito, K. (2006):  
Shear does not necessarily inhibit bone healing.  
Clin Orthop Relat Res 443. S. 307-14.

- Bolander, M. E. (1992):  
Regulation of fracture repair by growth factors.  
Proc Soc Exp Biol Med 200(2). S. 165-70.
- Braun, W.; Ruter, A. (1996):  
[Fracture healing. Morphologic and physiologic aspects].  
Unfallchirurg 99(1). S. 59-67.
- Brighton, C. T. (1984):  
The biology of fracture repair.  
Instr Course Lect 33. S. 60-82.
- Brug, E.; Winckler, S. (1991):  
[A return to callus healing using dynamic osteosynthesis procedures. Principles, indications, complications, x-ray diagnosis of interlocking nailing and dynamic monofixators in comparison with conventional bone plates].  
Radiologe 31(4). S. 165-71.
- Bucher, O.; Wartenberg, H. (1997):  
Cytologie, Histologie und mikroskopische Anatomie des Menschen. - Hans Huber Verlag.  
Bern.
- Budras, K.-D.; Fricke, W.; Richter, R. (1996):  
Atlas der Anatomie des Hundes. - 5. Auflage. Schlütersche Verlagsanstalts Hannover.
- Carter, D. R.; Beaupre, G. S.; Giori, N. J.; Helms, J. A. (1998):  
Mechanobiology of skeletal regeneration.  
Clin Orthop Relat Res(355 Suppl). S. S41-55.
- Carter, D. R.; Blenman, P. R.; Beaupre, G. S. (1988):  
Correlations between mechanical stress history and tissue differentiation in initial fracture healing.  
J Orthop Res 6(5). S. 736-48.
- Chao, E. Y.; Aro, H. T.; Lewallen, D. G.; Kelly, P. J. (1989):  
The effect of rigidity on fracture healing in external fixation.  
Clin Orthop Relat Res(241). S. 24-35.
- Chao, E. Y.; Hein, T. J. (1988):  
Mechanical performance of the standard Orthofix external fixator.  
Orthopedics 11(7). S. 1057-69.
- Claes, L. (1990):  
[The biomechanics of osteosynthesis].  
Aktuelle Probl Chir Orthop 34. S. 32-8.

Claes, L.; Augat, P.; Suger, G.; Wilke, H. J. (1997):  
Influence of size and stability of the osteotomy gap on the success of fracture healing.  
J Orthop Res 15(4). S. 577-84.

Claes, L.; Eckert-Hubner, K.; Augat, P. (2002):  
The effect of mechanical stability on local vascularization and tissue differentiation in callus healing.  
J Orthop Res 20(5). S. 1099-105.

Claes, L.; Wolf, S.; Augat, P. (2000):  
[Mechanical modification of callus healing].  
Chirurg 71(9). S. 989-94.

Claes, L. E.; Heigele, C. A.; Neidlinger-Wilke, C.; Kaspar, D.; Seidl, W.; Margevicius, K. J.; Augat, P. (1998):  
Effects of mechanical factors on the fracture healing process.  
Clin Orthop Relat Res(355 Suppl). S. S132-47.

Cornell, C. N.; Lane, J. M. (1992):  
Newest factors in fracture healing.  
Clin Orthop Relat Res(277). S. 297-311.

Cruess, R. L.; Dumont, J. (1975):  
Fracture healing.  
Can J Surg 18(5). S. 403-13.

DeLacure, M. D. (1994):  
Physiology of bone healing and bone grafts.  
Otolaryngol Clin North Am 27(5). S. 859-74.

DenBoer, F. C.; Patka, P.; Bakker, F. C.; Haarmann, H. J. T. (2002):  
Current concept of fracture healing, delayed unions and nonunions.  
Osteo. Trauma Care 10. S. 1-7.

Dimitriou, R.; Tsiridis, E.; Giannoudis, P. V. (2005):  
Current concepts of molecular aspects of bone healing.  
Injury 36(12). S. 1392-404.

Duda, G. N.; Kassi, J. P.; Hoffmann, J. E.; Riedt, R.; Khodadadyan, C.; Raschke, M. (2000):  
[Mechanical behavior of Ilizarov ring fixators. Effect of frame parameters on stiffness and consequences for clinical use].  
Unfallchirurg 103(10). S. 839-45.

Duda, G. N.; Sporrer, S.; Sollmann, M.; Hoffmann, J. E.; Kassi, J. P.; Khodadadyan, C.; Raschke, M. (2003):  
Interfragmentary movements in the early phase of healing in distraction and correction osteotomies stabilized with ring fixators.  
Langenbecks Arch Surg 387(11-12). S. 433-40.

Einhorn, T. A. (1998):  
The cell and molecular biology of fracture healing.  
Clin Orthop Relat Res(355 Suppl). S. S7-21.

Epari, D. R.; Taylor, W. R.; Heller, M. O.; Duda, G. N. (2006):  
Mechanical conditions in the initial phase of bone healing.  
Clin Biomech (Bristol, Avon) 21(6). S. 646-55.

Flautre, B.; Delecourt, C.; Blary, M. C.; Van Landuyt, P.; Lemaitre, J.; Hardouin, P. (1999):  
Volume effect on biological properties of a calcium phosphate hydraulic cement: experimental study in sheep.  
Bone 25(2 Suppl). S. 35S-39S.

Fossum, T. W. (2007):  
Chirurgie der Kleintiere. - 1.deutsche Auflage. Elsevier Urban und Fischer Verlag. - ISBN: 13: 978-3-437-57090-2.

Frost, H. M. (1989a):  
The biology of fracture healing. An overview for clinicians. Part I.  
Clin Orthop Relat Res(248). S. 283-93.

Frost, H. M. (1989b):  
The biology of fracture healing. An overview for clinicians. Part II.  
Clin Orthop Relat Res(248). S. 294-309.

Gardner, T. N.; Stoll, T.; Marks, L.; Mishra, S.; Knothe Tate, M. (2000):  
The influence of mechanical stimulus on the pattern of tissue differentiation in a long bone fracture--an FEM study.  
J Biomech 33(4). S. 415-25.

Goodship, A. E.; Kenwright, J. (1985):  
The influence of induced micromovement upon the healing of experimental tibial fractures.  
J Bone Joint Surg Br 67(4). S. 650-5.

Haas, N. P. (2000):  
Callusmodulation- Fiktion oder Realität?  
Chirurg 71(9). S. 987-988.

Hente, R.; Fuchtmeier, B.; Schlegel, U.; Ernstberger, A.; Perren, S. M. (2004):  
The influence of cyclic compression and distraction on the healing of experimental tibial fractures.  
J Orthop Res 22(4). S. 709-15.

Hildebrandt, H. (1998):  
Pschyrembel, klinisches Wörterbuch. - 258. Auflage. Walter de Gruyter Verlag. - ISBN: 3-11-014824-2.

Höntzsch, D. (2002):  
Current developments in various external fixateur systems.  
Trauma Berufskrankh 4. S. 370-376.

Junqueira, L. C.; Carneiro, J. (1996):  
Zytologie, Histologie und mikroskopische Anatomie des Menschen. Springer Verlag Berlin Heidelberg New York.

Kalfas, I. H. (2001):  
Principles of bone healing.  
Neurosurg Focus 10(4). S. E1.

Karnezis, I. A.; Miles, A. W.; Cunningham, J. L.; Learmonth, I. D. (1999):  
Axial preload in external fixator half-pins: a preliminary mechanical study of an experimental bone anchorage system.  
Clin Biomech (Bristol, Avon) 14(1). S. 69-73.

Kenwright, J.; Goodship, A. E. (1988):  
Controlled Mechanical Stimulation in the Treatment of Tibial Fractures.  
Clin Orthop 241. S. 36-47.

Kenwright, J.; Goodship, A. E. (1989):  
Controlled mechanical stimulation in the treatment of tibial fractures.  
Clin Orthop Relat Res(241). S. 36-47.

Kenwright, J.; Richardson, J. B.; Cunningham, J. L.; White, S. H.; Goodship, A. E.; Adams, M. A.; Magnussen, P. A.; Newman, J. H. (1991):  
Axial movement and tibial fractures. A controlled randomised trial of treatment.  
J Bone Joint Surg Br 73(4). S. 654-9.

Klaushofer, K.; Peterlik, M. (1994):  
[Pathophysiology of fracture healing].  
Radiologe 34(12). S. 709-14.

Klein, P.; Schell, H.; Streitparth, F.; Heller, M.; Kassi, J. P.; Kandziora, F.; Bragulla, H.; Haas, N. P.; Duda, G. N. (2003):  
The initial phase of fracture healing is specifically sensitive to mechanical conditions.  
J Orthop Res 21(4). S. 662-9.

- Kornak, U.; Delling, G.; Mundlos, S. (2003):  
Molecular Mechanisms of Regulation of Bone Density by Osteoclasts.  
Deutsches Ärzteblatt 100(19). S. A-1258.
- Krettek, C.; Haas, N.; Schandelmaier, P.; Frigg, R.; Tscherner, H. (1991):  
[Unreamed tibial nail in tibial shaft fractures with severe soft tissue damage. Initial clinical experiences].  
Unfallchirurg 94(11). S. 579-87.
- Kutscha-Lissberg, F.; Hopf, K. F. (2003):  
[Why do osteosyntheses fail? The problem with biomechanics and biology].  
Unfallchirurg 106(9). S. 708-21.
- Labitzke, R.; Henze, G. (1978):  
[Biomechanics of the external fixation clamps].  
Unfallheilkunde 81(8). S. 546-52.
- Lacroix, D.; Prendergast, P. J. (2002):  
A mechano-regulation model for tissue differentiation during fracture healing: analysis of gap size and loading.  
J Biomech 35(9). S. 1163-71.
- Lewis, D. D.; Cross, A. R.; Carmichael, S.; Anderson, M. A. (2001):  
Recent advances in external skeletal fixation.  
J Small Anim Pract 42(3). S. 103-12.
- Li, Z.; Kong, K.; Qi, W. (2006):  
Osteoclast and its roles in calcium metabolism and bone development and remodeling.  
Biochem Biophys Res Commun 343(2). S. 345-50.
- Liebich, H.-G. (1999):  
Funktionelle Histologie der Haussäugetiere. - 3. Auflage. Schattauer Verlag. - ISBN: 3-7945-1899-3.
- Lienau, J.; Schell, H.; Epari, D. R.; Schutze, N.; Jakob, F.; Duda, G. N.; Bail, H. J. (2006):  
CYR61 (CCN1) protein expression during fracture healing in an ovine tibial model and its relation to the mechanical fixation stability.  
J Orthop Res 24(2). S. 254-62.
- Macnab, I.; De Haas, W. G. (1974):  
The role of periosteal blood supply in the healing of fractures of the tibia.  
Clin Orthop Relat Res(105). S. 27-33.
- Mark, H.; Nilsson, A.; Nannmark, U.; Rydevik, B. (2004):  
Effects of fracture fixation stability on ossification in healing fractures.  
Clin Orthop Relat Res(419). S. 245-50.

Mark, H.; Rydevik, B. (2005):  
Torsional stiffness in healing fractures: influence of ossification: an experimental study in rats.  
Acta Orthop 76(3). S. 428-33.

Mayr, E. (2002):  
[Tibial fractures].  
Chirurg 73(6). S. 642-61; quiz 662-3.

McKibbin, B. (1978):  
The biology of fracture healing in long bones.  
J Bone Joint Surg Br 60-B(2). S. 150-62.

Menton, D. N.; Simmons, D. J.; Chang, S. L.; Orr, B. Y. (1984):  
From bone lining cell to osteocyte--an SEM study.  
Anat Rec 209(1). S. 29-39.

Metak, G.; Gomoll, A.; Wolter, W.; Barth, G.; Ascherl, R. (1998):  
[Interspecies comparison of healing standardized bone defects with and without autogenous bone transplantation].  
Langenbecks Arch Chir Suppl Kongressbd 115(Suppl I). S. 25-30.

Netz, P.; Eriksson, K.; Stromberg, L. (1978):  
Torsional strength and geometry of diaphyseal bone. An experimental study on dogs.  
Acta Orthop Scand 49(5). S. 430-4.

Ng, K. W.; Romas, E.; Donnan, L.; Findlay, D. M. (1997):  
Bone biology.  
Baillieres Clin Endocrinol Metab 11(1). S. 1-22.

Niemand, H. G.; Suter, P. F. (2004):  
Praktikum der Hundeklinik. - 9. Auflage. Parey-Verlag. - ISBN: 3-8304-4071-5.

Noble, B. S.; Reeve, J. (2000):  
Osteocyte function, osteocyte death and bone fracture resistance.  
Mol Cell Endocrinol 159(1-2). S. 7-13.

Owen, M. (1970):  
The origin of bone cells.  
Int Rev Cytol 28. S. 213-38.

Palmer, R. H.; Hulse, D. A.; Hyman, W. A.; Palmer, D. R. (1992):  
Principles of bone healing and biomechanics of external skeletal fixation.  
Vet Clin North Am Small Anim Pract 22(1). S. 45-68.



- Pennig, D. (1990):  
[The biology of bones and of bone fracture healing].  
Unfallchirurg 93(11). S. 488-91.
- Perren, S. M. (1979):  
Physical and biological aspects of fracture healing with special reference to internal fixation.  
Clin Orthop Relat Res(138). S. 175-96.
- Perren, S. M. (1992):  
[Biomechanical basis of fracture treatment].  
Orthopade 21(1). S. 3-10.
- Perren, S. M. (2002):  
Evolution of the internal fixation of long bone fractures. The scientific basis of biological internal fixation: choosing a new balance between stability and biology.  
J Bone Joint Surg Br 84(8). S. 1093-110.
- Phieffer, L. S.; Goulet, J. A. (2006):  
Delayed unions of the tibia.  
J Bone Joint Surg Am 88(1). S. 206-16.
- Phillips, A. M. (2005):  
Overview of the fracture healing cascade.  
Injury 36 Suppl 3. S. S5-7.
- Rehman, I.; Smith, R.; Hench, L. L.; Bonfield, W. (1995):  
Structural evaluation of human and sheep bone and comparison with synthetic hydroxyapatite by FT-Raman spectroscopy.  
J Biomed Mater Res 29(10). S. 1287-94.
- Remedios, A. (1999):  
Bone and bone healing.  
Vet Clin North Am Small Anim Pract 29(5). S. 1029-44, v.
- Roach, H. I.; Shearer, J. R.; Archer, C. (1989):  
The choice of an experimental model. A guide for research workers.  
J Bone Joint Surg Br 71(4). S. 549-53.
- Runkel, M.; Klepsch, M. (1999):  
Developments in the treatment of tibial shaft fractures.  
Trauma Berufskrankh 1. S. 229-239.
- Runkel, M.; Rommens, P. M. (2000):  
[Pseudoarthrosis].  
Unfallchirurg 103(1). S. 51-63; quiz 63.

Sarmiento, A.; Schaeffer, J. F.; Beckerman, L.; Latta, L. L.; Enis, J. E. (1977):  
Fracture healing in rat femora as affected by functional weight-bearing.  
J Bone Joint Surg Am 59(3). S. 369-75.

Sarmiento, A.; Sharpe, F. E.; Ebramzadeh, E.; Normand, P.; Shankwiler, J. (1995):  
Factors influencing the outcome of closed tibial fractures treated with functional bracing.  
Clin Orthop Relat Res(315). S. 8-24.

Schebitz, H.; Brass, W.; Wintzer, H. J. (1993):  
Allgemeine Chirurgie für Tierärzte und Studierende. - 2.  
Berlin, Hamburg: Paul Parey Verlag.

Schell, H.; Epari, D. R.; Kassi, J. P.; Bragulla, H.; Bail, H. J.; Duda, G. N. (2005):  
The course of bone healing is influenced by the initial shear fixation stability.  
J Orthop Res 23(5). S. 1022-8.

Schell, H.; Klein, P.; Opitz, M.; Kandziora, F.; Bragulla, H.; Bail, H. J.; Duda, G. (2002):  
Influence of unreamed nailing and external fixation on the mechanical conditions during  
fracture healing.  
Trans Orthop Res Soc, Dallas.

Schell, H.; Lienau, J.; Epari, D. R.; Seebeck, P.; Exner, C.; Muchow, S.; Bragulla, H.; Haas,  
N. P.; Duda, G. N. (2006):  
Osteoclastic activity begins early and increases over the course of bone healing.  
Bone 38(4). S. 547-54.

Schenk, R. K.; Perren, S. M. (1977):  
[Biology and biomechanics of fracture healing in long bones as a basis for osteosynthesis].  
Hefte Unfallheilkd(129). S. 29-41.

Schmickal, T.; Hochstein, P.; Wentzensen, A. (1999):  
Treatment of tibial shaft fractures with external fixation. Indications, treatment, strategy and  
results, and stability measurements with the fractometer.  
Trauma Berufskrankh 1. S. 240-246.

Schmolke, B. (2001):  
[Laboratory diagnosis of osteoporosis].  
Orthopade 30(7). S. 425-36.

Schweiberer, L.; Baumgart, R.; Deiler, S. (1999):  
[The biological reaction in atrophic and hypertrophic pseudarthrosis of diaphysis of long  
bone. Causes and forms of appearance].  
Chirurg 70(11). S. 1193-201.

Simmons, D. J. (1985):  
Fracture healing perspectives.  
Clin Orthop Relat Res(200). S. 100-13.

Stürmer, K. M. (1984):  
Histological findings of fracture healing under external fixation and their clinical implications.  
Unfallchirurg 10(3). S. 110-122.

Stürmer, K. M. (1988):  
Histologie und Biomechanik der Frakturheilung unter den Bedingungen des Fixateur externe.  
Hefte der Unfallheilkunde, Heft 200. S. 233-242.

Stürmer, K. M. (1996):  
Pathophysiology of fracture healing disorders.  
Orthopäde 25. S. 386-393.

Stürmer, K. M.; Schuchardt, W. (1980):  
New Aspects of Closed intramedullary Nailing and Marrow Cavity Reaming in Animal Experiments.  
Unfallheilkunde 83. S. 341-345.

Taeger, G.; Ruchholtz, S.; Zettl, R.; Waydhas, C.; Nast-Kolb, D. (2002):  
[Primary external fixation with consecutive procedural modification in polytrauma].  
Unfallchirurg 105(4). S. 315-21.

Taljanovic, M. S.; Jones, M. D.; Ruth, J. T.; Benjamin, J. B.; Sheppard, J. E.; Hunter, T. B. (2003):  
Fracture fixation.  
Radiographics 23(6). S. 1569-90.

Trostle, S. S.; Markel, M. D. (1996):  
Fracture biology, biomechanics, and internal fixation.  
Vet Clin North Am Food Anim Pract 12(1). S. 19-46.

Tscherne, H. (1969):  
[Operative treatment of fractures].  
Langenbecks Arch Chir 324(4). S. 348-82.

Waldeyer, A.; Mayer, A. (1993):  
Anatomie des Menschen. - 16.  
Berlin: De Gruyter Verlag.

Wallace, A. L.; Draper, E. R.; Strachan, R. K.; McCarthy, I. D.; Hughes, S. P. (1994):  
The vascular response to fracture micromovement.  
Clin Orthop Relat Res(301). S. 281-90.

Wang, X.; Shen, X.; Li, X.; Agrawal, C. M. (2002):  
Age-related changes in the collagen network and toughness of bone.  
Bone 31(1). S. 1-7.

Webb, J. C. J.; Tricker, J. (2000):  
bone biology- A review of fracture healing.  
Current Orthopaedics 14. S. 457-463.

Weyrauch, K. D.; Smollich, A.; Schnorr, B. (1998):  
Histologie-Kurs für Veterinärmediziner.  
Stuttgart: Enke-Verlag.

White, A. A., 3rd; Panjabi, M. M.; Southwick, W. O. (1977):  
The four biomechanical stages of fracture repair.  
J Bone Joint Surg Am 59(2). S. 188-92.

Wiss, D. A.; Stetson, W. B. (1996):  
Tibial Nonunion: Treatment Alternatives.  
J Am Acad Orthop Surg 4(5). S. 249-257.

Wissing, H.; Stürmer, K. M.; Breidenstein, G. (1990):  
Die Wertigkeit verschiedener Versuchstierspezies für experimentelle Untersuchungen am  
Knochen.  
Hefte der Unfallheilkunde, 212. S. 479-488.

Wu, J. J.; Shyr, H. S.; Chao, E. Y.; Kelly, P. J. (1984):  
Comparison of osteotomy healing under external fixation devices with different stiffness  
characteristics.  
J Bone Joint Surg Am 66(8). S. 1258-64.

Yamagishi, M.; Yoshimura, Y. (1955):  
The biomechanics of fracture healing.  
J Bone Joint Surg Am 37-A(5). S. 1035-68.

Zimmermann, G.; Wagner, C.; Moghaddam, A.; Wentzensen, A. (2006):  
Need for bone morphogenetic proteins in fracture healing.  
Trauma Berufskrankh 8(1). S. 45-48.

## Danksagung

An erster Stelle richtet sich mein Dank an meinen Doktorvater Herrn Professor Dr. med. vet. Karl Weyrauch für die Betreuung der externen Doktorarbeit und Durchsicht meiner Arbeit als Erstgutachter.

Weiterhin gilt mein Dank Herrn Professor Georg Duda für die Bereitstellung des Themas und die Möglichkeit Erfahrungen auf dem Gebiet der Forschung zu sammeln.

Ein herzliches Dankeschön an Frau Dr. med. vet. Hanna Schell und Frau Dr. med. vet. Jasmin Lienau für die intensive Betreuung und gute Zusammenarbeit während der gesamten Projektzeit. Hanna danke ich besonders für das aufmerksame Korrekturlesen und die kritischen Denkanstöße, sowie die guten Erklärungen der biomechanischen Zusammenhänge, ohne die ich wohl noch heute im Dunkeln tappen würde.

Des Weiteren möchte ich den Mitarbeitern des Forschungslabors Camilla Bergmann, Gabriele Hartung und ganz besonders Martin Wolny für die intensive und tatkräftige Unterstützung bei der Laborarbeit sowie in der Bildanalyse danken.

Meinen Mitdoktoranden danke ich für die gute Zusammenarbeit und stets netten Stunden bei der gemeinsamen Laborarbeit. Dabei gilt mein ganz besonderer Dank Hauke Weber, der stets ein aufmunterndes Wort parat hatte, wenn sich mal wieder einer der vielen Kunststoffblöcke nicht schneiden lassen wollte.

Herrn Dr. med. vet. Damian Nowak möchte ich besonders danken, für die Ermöglichung während meines Hochschulstudiums sowie der Doktorarbeit erste praktische Erfahrungen in seiner Kleintierpraxis sammeln zu können.

Insbesondere möchte ich an dieser Stelle meiner lieben Mutter von ganzem Herzen danken, die mir die Universitätsausbildung so selbstverständlich erscheinen ließ und die mich von jeher in jeglicher Art unterstützt hat. Vielen Dank, dass du immer an mich geglaubt hast und immer für mich da warst und bist.

Meinem Freund Alexander danke ich für sein da sein und seine motivierenden Worte. Außerdem danke ich ihm für sein reges Interesse an meiner Arbeit und seine sehr hilfreiche fachliche Unterstützung bei der PC-Arbeit.

Allen weiteren Personen, die mich im Zusammenhang mit meiner Doktorarbeit fachlich unterstützt, inspiriert und weitergebracht haben, insbesondere Paula Brünig, Alkje Moritz und Christiane Flechtner danke ich herzlich für ihr eifriges Korrekturlesen einzelner Textabschnitte meiner Arbeit.

## **Eidesstattliche Erklärung**

Hiermit erkläre ich, Anne-Christin Fischer, dass die vorliegende Dissertationsschrift mit dem Titel „Histologische und biomechanische Analyse des Frakturkallus unter kritischerweicher Fixation zu verschiedenen Zeitpunkten post Osteotomie am Schafmodell“ von mir selbst und ohne (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst wurde. Die Arbeit stellt auch in Teilen keine Kopie anderer Arbeiten dar. Ich versichere, keine außer den angegebenen Hilfsmittels und angegebenen Literaturstellen verwendet zu haben.

Berlin, den 08.03.2009