

3.7. Histologische Aufarbeitung der Präparate

In die histomorphometrische Auswertung gingen aus jeder der drei Gruppen jeweils sechs Präparate ein.

Entnahme des Präparates

Nach der Beendigung der biomechanischen Tests wurden die linken Tibiae verworfen, die osteotomierten rechten Tibiae über Nacht in zehnprozentiger Formalinlösung fixiert. Die damit verbundene Aushärtung des Gewebes verbesserte die Eigenschaften des Präparates beim Sägen deutlich, insbesondere die des die Tibia umgebenden Weichteilmantels.

Die Sägearbeiten zur Gewinnung der histologischen Präparate wurden am Makrotrennschleifsystem (Firma Exakt, Deutschland) durchgeführt. Die Ausführung der Sägeschnitte erfolgte unter ständiger Wasserkühlung, was einer thermischen Schädigung der Präparate vorbeugte. Die Präparate wurden mit ihren Beracryl eingebetteten Enden in den Einspannvorrichtungen fixiert. Diese Einspannvorrichtung wurde mit dem Schlitten des Trennschleifsystems verschraubt. Für die exakte Arbeit des Trennschleifers war eine feste Montage ohne Spiel nötig. Nur so konnten gerade, definierte Sägeschnitte ausgeführt werden.

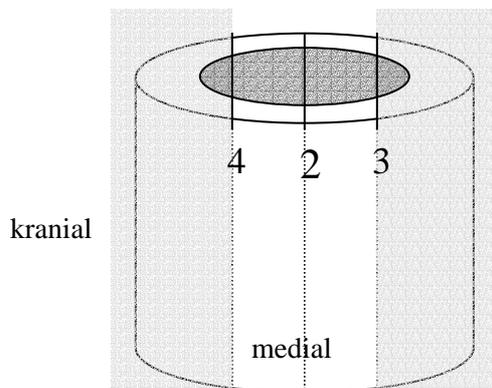


Abb. 3.7-1

Schematische Darstellung der Sägeschnitte 2 bis 4 (Zahlen) in der Längsachse der Tibia.

Der Markraum ist grau schattiert.

Die beiden mittleren Präparatscheiben wurden zur histologischen Auswertung herangezogen. Die hellgrau unterlegten Randstücke wurden verworfen.

Es wurde eine transversale Sägeebe gewöhlt. Bei den Fixateurtieren erfolgte die Orientierung anhand der Bohrlöcher, bei den Marknageltieren anhand von Röntgenbildern. Der erste Sägeschnitt wurde distal des Kallus senkrecht zur Längsachse der Tibia geführt. Dann wurde der Knochen so eingespannt, dass die Markhöhle in mediolateraler Schnittebene mit einem 2. Schnitt parallel zur Tibialängsachse halbiert wurde. Der 3. und 4. Sägeschnitt wurden drei Millimeter anterior bzw. posterior des 2. Schnitts ausgeführt. Die Seitwärtsverschiebung im Millimeterbereich wurde durch die Schlittenmechanik ermöglicht, die die seitliche Ver-

schiebung in Zehntelmillimeter-Schritten erlaubt. Somit waren die Sägeschnitte 2 bis 4 absolut parallel ausgerichtet, die entstehenden Scheiben hatten exakt die eingestellte Stärke von drei Millimetern (Abb. 3.7-1).

Nun wurde proximal des Kallus ein weiterer Sägeschnitt senkrecht zur Tibialängsachse ausgeführt. Dieser trennte die zuvor ausgeführten Längsschnitte vom restlichen Knochen. Bei den mit Marknagel versorgten Tibiae wurde bei der Ausführung der Sägeschnitte zwei bis vier ein Steg belassen, der den Erhalt der ursprünglichen Markraumausdehnung gewährleistete (Abb. 3.7.-2). Bei den Fixateurtieren wurde der Zusammenhalt der Kortikales durch das Knochenmark gesichert. Die beiden mittleren Kallus-Scheiben wurden für die Histologie verwendet, die äußeren Scheiben, welche hauptsächlich aus Kortikalis bestanden, wurden verworfen (Abb. 3.7-1).

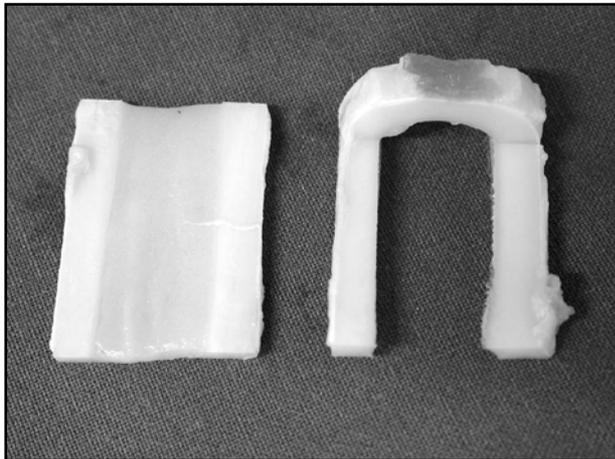


Abb. 3.7.-2:

Beispielgebende Darstellung der mittleren Scheiben nach dem Sägen, links die Markraumsituation bei einem Fixateur-Tier, rechts bei einem UTN-Tier. Oben am UTN-Präparat erkennbar: der als Stabilisierung belassene Steg kortikalen Knochens.

Die gewonnenen mittleren Scheiben (Abb. 3.7-1/2) wurden zur Stabilisierung auf Tissue-Tek[®] III-Kassetten (Fa. Sakura, Gießen, Deutschland) gelegt und gekennzeichnet. Die Präparate wurden für 24 Stunden in zehnpromzentiger Formalinlösung fixiert. Vor ihrer Weiterbearbeitung wurden die Proben eine halbe Stunde unter fließendem Leitungswasser gewässert.

Entwässern

Die fixierten Präparate wurden nach folgendem Schema in einer aufsteigenden Alkoholreihe entwässert:

3 Tage in 70 % Ethanol

3 Tage in 80 % Ethanol

2 mal 3 Tage in 96 % Ethanol

3 mal 7 Tage in 100 % Ethanol

Die Verdünnungsstufen des Ethanols wurden aus einhundertprozentigem Ethanol hergestellt, indem dieser mit einer entsprechenden Menge Aqua destillata versetzt wurde. Die Präparate wurden mit reichlich Alkohol bedeckt in luftdicht schließenden Gläsern auf einem Entwässerungs-/Infiltrationsgerät (HS 501 digital, IKA Labortechnik, Deutschland) gelagert. Die Schwingungen des Gerätes sorgten für eine stetige Durchmischung und Benetzung der Präparate mit dem Ethanol und beschleunigten dadurch den Entwässerungsprozess. Nach Abschluss der eigentlichen Entwässerung wurden die Präparate für 24 Stunden in Xylol entfettet.

Einbetten

Die histologischen Untersuchungen werden an den in das Methylmetacrylat Technovit[®] 9100 NEU (Fa. Heraeus Kulzer, Wehrheim, Deutschland) eingebetteten Präparaten durchgeführt. Um eine komplette Durchtränkung des Präparates mit diesem Kunststoff zu erreichen, werden die Präparate vor der eigentlichen Einbettung zweimal präinfiltriert. Die Herstellung und der Gebrauch von Präinfiltrations-, Infiltrations- und Gebrauchslösung erfolgt entsprechend der Herstellerangaben.

Die entwässerten und entfetteten Präparate wurden zur Vorbereitung auf das Einbetten in den Methylmetacrylatkunststoff für zwei Stunden bei Raumtemperatur in die Präinfiltrationslösung eingelegt. Dann erfolgte die 48-stündige Infiltration bei 4° C in der Infiltrationslösung. Die eigentliche Einbettung erfolgte in kleinen, der Präparatgröße angepassten, luftdicht verschließbaren Glasgefäßen. Die Präparate wurden mit der anzuschneidenden Seite auf den Glasboden gelegt, darauf wurde möglichst blasenfrei die visköse Technovitlösung gegossen, die das Präparat gut bedecken und einen Überstand von mindestens zwei Zentimetern bilden sollte. Um ein optimales Ergebnis zu erreichen, war entgegen Herstellerangaben eine Temperatur von 0 °C nötig. Nach erfolgreicher Auspolymerisation des Methylmetacrylates nach etwa 24 Stunden wurde das Glas entfernt.

Schneiden

Am Hartschnittmikrotom (Leica SM 2500S; Fa. Leica, München, Deutschland) wurden unter ständiger Benetzung mit Schneideflüssigkeit vier Mikrometer dicke Schnitte angefertigt und auf mit Chromalaungelatine beschichtete Objektträger aufgezogen. Die Objektträger waren analog der Präparate markiert, was eine spätere genaue lokale Zuordnung der Schnitte ermöglicht. Die Schnitte wurden mit einer Streckflüssigkeit behandelt, welche eine Streckung und in Maßen eine Entfaltung des Gewebes bewirkte. Diese Streckflüssigkeit bestand aus sechs Teilen siebenzig-prozentigem Alkohol und vier Teilen Butoxyethyl-Acetat. Die gestreckten Schnitte wurden mit Klarsichtfolie abgedeckt. Die abgedeckten Schnitte wurden mit saugstarkem Filterpapier als Trennung übereinander gestapelt unter Schraubzwingendruck im Brutschrank bei 60°C zwei Tage getrocknet.

Histologischen Färbungen

Als Vorbereitung auf die Färbung wurden die Schnitte entplastet, d. h., der Kunststoff wurde komplett aus dem Gewebe gelöst, um dieses für die histologischen Farbstoffe zugänglich zu machen. Dieses erfolgte im Methylmetacrylat (MEA)-Tauchbad, welches drei mal gewechselt, für je eine halbe Stunde auf die Schnitte einwirkte. Hernach wurden die Schnitte in einer absteigenden Alkoholreihe rehydriert. Die Schnitte wurde jeweils kurz, aber gründlich in die Küvetten mit den absteigend sortierten Alkoholen getaucht und darin bewegt, dann leicht abgetropft und in die nächste Küvette überführt. Nach erfolgter Rehydrierung des Gewebes konnte die gewünschte histologische Färbung vorgenommen werden.

- *Safranin-Orange / Lichtgrün*

Diese Färbung stellt bindegewebige Strukturen, zu denen, neben dem eigentlichen Bindegewebe auch mineralisierter Knochen und Knorpel zählt, grün dar. Nichtmineralisiertes Knorpelgewebe wird rot gefärbt (Abb. 3.7.-2, oben).

- *Safranin-Orange / von Kossa*

Diese Färbung erlaubt die Unterscheidung von nichtmineralisiertem und mineralisiertem Gewebe. Mineralisierter Knorpel und Knochen wird tiefschwarz angefärbt, nicht mineralisierter Knorpel und das Bindegewebe werden in verschiedenen intensiven Rottönen dargestellt (Abb. 3.7.-2, unten).

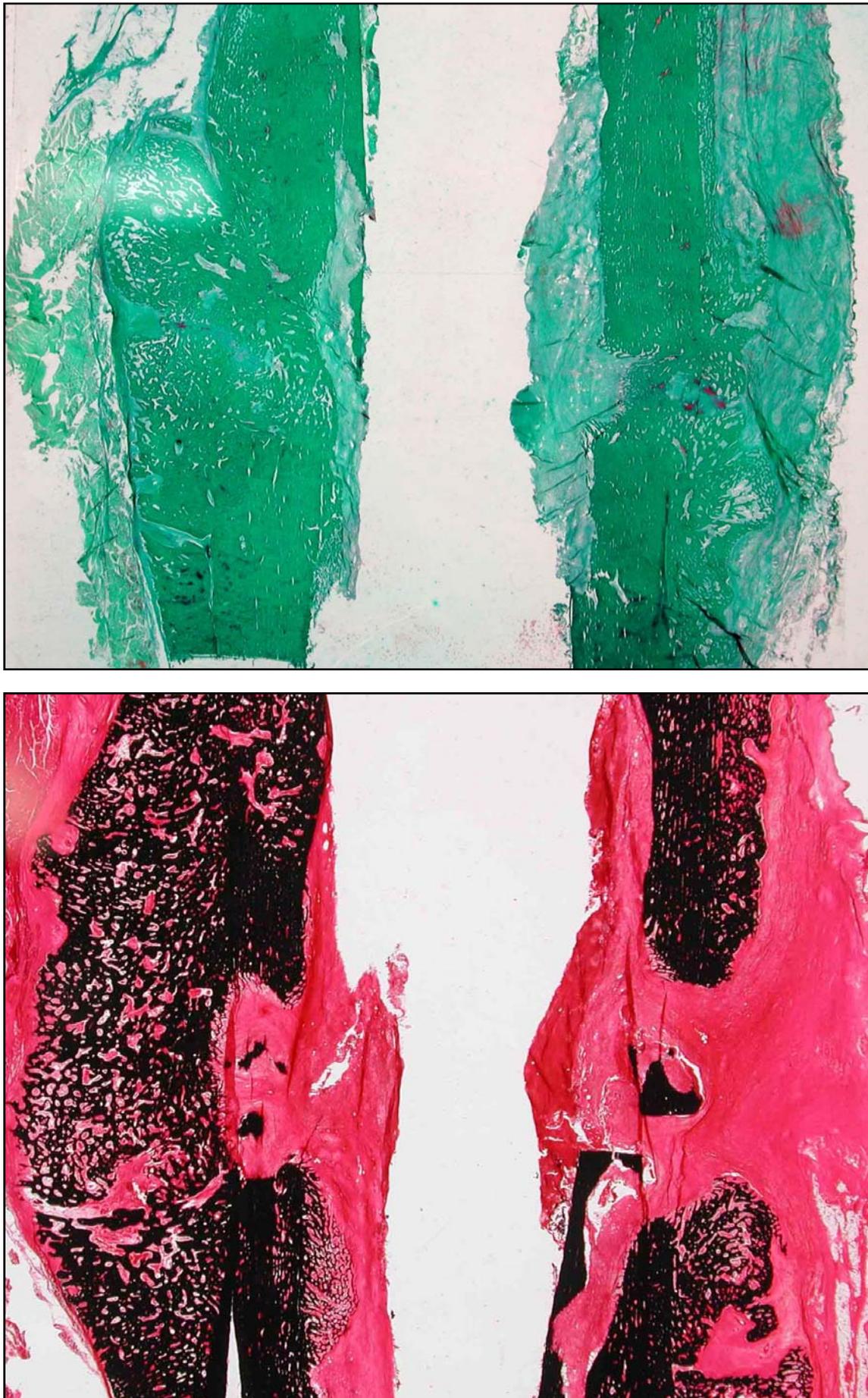


Abb. 3.7.-2
Präparate von UTN-Tieren, gefärbt nach Safranin-O/Lichtgrün (oben) und Safranin-O/von Kossa (unten).

Eindecken der Schnitte

Nach der Durchführung der histologischen Färbung und Entwässerung in einer aufsteigenden Alkoholreihe lagerten die Schnitte in Xylol. Um die Präparate für längere Zeit zu konservieren, mussten sie luftdicht abgedeckt werden. Die dazu verwendeten Deckgläser sind dünner als Objektträger und in verschiedenen Größen erhältlich. Die Größe der Deckgläser wurde entsprechend der Präparate- und Objektträgergröße gewählt. Als Klebstoff wurde Vitroclud (Einschlussmittel für mikroskopische Technik, R. Langenbrink, Emmendingen, Deutschland) benutzt. Die eingedeckten Objektträger trockneten über Nacht in waagerechter Position.

3.8. Auswertung

3.8.1. Deskriptiv

Die gefärbten und eingedeckten histologischen Schnitte aus der Frakturregion wurden unter dem Mikroskop bei aufsteigender Vergrößerung durchgemustert. Dabei wurden die Kallusform und die Kallusausprägung, die räumliche Gewebeverteilung im Kallus, sowie eventuelle Auffälligkeiten wie Osteolysen oder entzündliche Prozesse festgehalten. Auch die Kortikalis wurde bezüglich ihrer Knochenstruktur und Remodelingprozessen beurteilt.

3.8.2. computergestützte Bildanalyse

Für die weitere Auswertung in der computergestützten Bildanalyse wurden die Präparate vor einem Leuchttisch mit einer Digitalkamera fotografiert. Neben dem Präparat waren auf der Aufnahme ein Millimetermaß und ein Fixpunkt für die räumliche Orientierung zu sehen (Abb. 3.8-1 bis -3). Der Abstand der Kamera zu den Präparaten wurde während des gesamten Photographievorganges nicht verändert. Außerdem diente das mitphotographierte Millimetermaß der Skalierung.

Zur Auswertung in der Bildanalyse kamen zwei Schnitte pro Tier, ein nach Safranin-Orange / von Kossa und ein nach Safranin-Orange / Lichtgrün gefärbter. Die im Folgenden erläuterte Auswertung wurde von drei unabhängigen Untersuchern durchgeführt, deren Ergebnisse gemittelt wurden. Alle in dieser Studie präsentierten Ergebnisse sind aus diesen Mittelwerten abgeleitet. Es zeigte sich, dass sich die durch die einzelnen Untersucher ermittelten

Werte nur geringgradig unterschieden. Untenstehende Tabelle (Tab. 3.8-1) vermittelt einen Eindruck der inter-individuellen Schwankungen der Messwerte. Größere Unterschiede zeigten sich vor allem bei Parametern, welche in der Bildanalyse durch Farbsegmentierung berechnet wurde, so z. B. die unten aufgeführten Flächen an Bindegewebe, mineralisiertem Knochen und Knorpel. Der Grad der Segmentierung zur optimalen Darstellung des Gewebes wurde scheinbar von den Untersuchern unterschiedlich eingeschätzt. Allerdings lagen die Werte dennoch sehr eng beieinander und es war keine Tendenz erkennbar, dass etwa immer derselbe Untersucher extrem abweichende Werte gemessen hätte.

Parameter	Untersucher	Median	Minimum	Maximum
kortikale Weite	1	17.6	15.3	24.0
	2	17.8	14.2	24.6
	3	17.8	14.2	24.1
Gesamtkallusweite	1	29.0	20.0	38.7
	2	28.7	19.7	38.3
	3	28.5	19.7	38.1
knöcherne Kallusweite	1	27.7	19.9	36.2
	2	27.5	20.0	35.8
	3	27.4	19.7	35.9
Fläche mineralisierten Knochens	1	166.0	65.8	237.5
	2	159.1	68.2	232.2
	3	169.8	71.8	228.5
Bindegewebsfläche	1	40.2	11.9	143.7
	2	35.1	12.1	162.9
	3	31.0	9.5	110.1
Knorpelfläche	1	0.2	0.0	4.7
	2	0.6	0.0	7.3
	3	0.0	0.0	2.6

Tab. 3.8-1: Darstellung der Inter-Untersucher-Varianz für einige Parameter. Die Parameter werden im Laufe des Kapitels erläutert (s. Parameterdefinition)

Definition der Region of Interest (ROI)

Eine **Region Of Interest (ROI, Auswertungsgebiet, das Gebiet von Interesse)** wurde für die Auswertung festgelegt, um sicherzustellen, dass die fraglichen Parameter nur in einem definierten, aber immer konstanten Feld des Präparates ausgewertet wurden. Die Ausdehnung der Region von Interesse wurde folgendermaßen festgelegt: Die Basis der ROI wurde längs durch den Osteotomiespalt gelegt und umfasste die Breite des gesamten Kallus. Von dieser Basis ausgehend, wurden nach proximal und distal je sechs Millimeter abgemessen und so die Höhe der ROI definiert. Die Breite der ROI war durch die Gesamtkallusbreite vorgegeben. Die Höhe der ROI wurde auf insgesamt zwölf Millimeter festgelegt. Diese zwölf Millimeter

erlaubten eine Auswertung von 4,5 mm ober- und unterhalb des Osteotomiespalts (1,5-fache Osteotomiespaltweite), einschließlich der Auswertung des ursprünglichen drei Millimeter Osteotomiespalts selbst. Die Begrenzung auf diesen engen, unmittelbar dem Osteotomiespalt anliegenden Bereich wurde gewählt, da so der Fokus der Auswertung auf den tatsächlichen Ort des Geschehens, die Osteotomieheilung, gelenkt wurde. Der Kallus benachbarter Schanzschrauben, Messpins oder Verriegelungsbolzen ging durch die enge räumliche Begrenzung nicht in die Auswertung ein und wurde somit nicht dem Frakturkallus zugerechnet.

Anwendung des Computerprogramms zur Histomorphometrie

Die auf CD gespeicherten Bilder wurden im Rahmen des zur Auswertung verwendeten Computerprogramms (Makro, ein den Messzwecken angepasstes Computerprogramm) im Rechner hochgeladen. Dann wurden Schritt für Schritt die Anweisungen des Makros ausgeführt. Zunächst wurde das System kalibriert. Dazu musste ein vom Makro vorgegebenes Rechteck anhand der mitfotografierten Millimeterskala auf 20 mm Kantenlänge eingestellt werden (Abb. 3.8.-1 a). Mit dem Makro wurden zunächst die Safranin-O / von Kossa gefärbten Schnitt des entsprechenden Tieres ausgewertet. Anhand dieser Färbung wurden der Durchmesser von Kortikalis, knöchernem und Gesamtkallus bestimmt (Abb. 3.8.-1 b, c und 3.8.-2 oben und unten links). Mit Hilfe des Durchmessers des Gesamtkallus, der mittig in der Querachse des Osteotomiespalts gemessen wurde, wurde die ROI definiert und im digitalen Bild des Präparates fixiert (Abb. 3.8.-1 d und 3.8.-2, unten rechts). Die ROI erstreckte sich quer über den gesamten Osteotomiespalt, der proximale und distale Bereich wurde zu je sechs Millimetern in die ROI einbezogen. Alle weiteren Messungen des Makros erfolgten nur noch innerhalb der fixierten ROI. Dann wurden dem Rechner die Grenze zwischen medialem und lateralem Bereich in der Mitte des Markraums angegeben und jeweils durch die Mitte der medialen und lateralen Kortikalis die Grenze zwischen periostalem und endostalem Bereich angegeben (Abb. 3.8.-1 h und 3.8.-2, oben rechts). Daraus errechnete der Computer sowohl mediale, laterale und periostale, endostale ROI als auch z. B. endostal-laterale oder auch periostal-mediale ROI. Nach der Festlegung der ROI erfolgt die Gewebedifferenzierung halbautomatisch. Das kalibrierte Computerprogramm gibt die Flächenanteile des Knochen-, Binde- oder Knorpelgewebes entsprechend der vorgegebenen Standardfarben für die einzelnen Gewebe (Abb. 3.8.-1 e, f und 3.8.-3) an, der Benutzer des Programms kann diese Einschätzung mittels Farbwertregler nach oben oder unten korrigieren (Abb. 3.8.-3, oben). Als letztes wird die Kortikalis durch den Auswertenden markiert (Abb. 3.8.-1 g). Aus den eingegebenen In-

formationen errechnet der Computer die Flächenanteile der unterschiedlichen Gewebe bezogen auf die verschiedenen Lokalisationen.

Abb. 3.8.-1: (nächste Seite)

Ausgewählte Schritte der histomorphometrischen Analyse mittels computergestützter Bildverarbeitung am Beispiel eines KM Fixateur-Präparates

- a: Kalibrierung, Einstellen des vorgegeben Rechtecks auf 20 mm Kantenlänge anhand des fotografierten Lineals.
- b: Einzeichnen des Kortikalisdurchmessers.
- c: Einzeichnen der maximalen knöchernen Kallusbreite auf Höhe des Osteotomiespalts.
- d: Legen der rechteckigen ROI durch den Rechner, Breite durch den Benutzer definiert (Gesamtkallusbreite), Höhe im Programm auf zwölf Millimeter festgelegt.
- e: Anzeigen der Knochenmaske. Der Rechner färbt alles von ihm als mineralisiertes (= schwarz gefärbtes) Gewebe gelb an, der Benutzer überprüft und korrigiert dieses gegebenenfalls.
- f: Isolierung der Knochenmaske zur Berechnung der Knochendichte durch den Rechner.
- g: Einzeichnen der Kortikalis durch den Benutzer, die Flächen werden durch den Rechner von der Knochenfläche des Kallus subtrahiert.
- h: Einzeichnen der Grenze zwischen medialem und lateralem Kallus (mittlerer Strich) und periostalem und endostalem Kallus (äußere Striche) durch den Benutzer. Ermöglicht die Differenzierung der Gewebeanteile bezüglich der verschiedenen Lokalisationen.

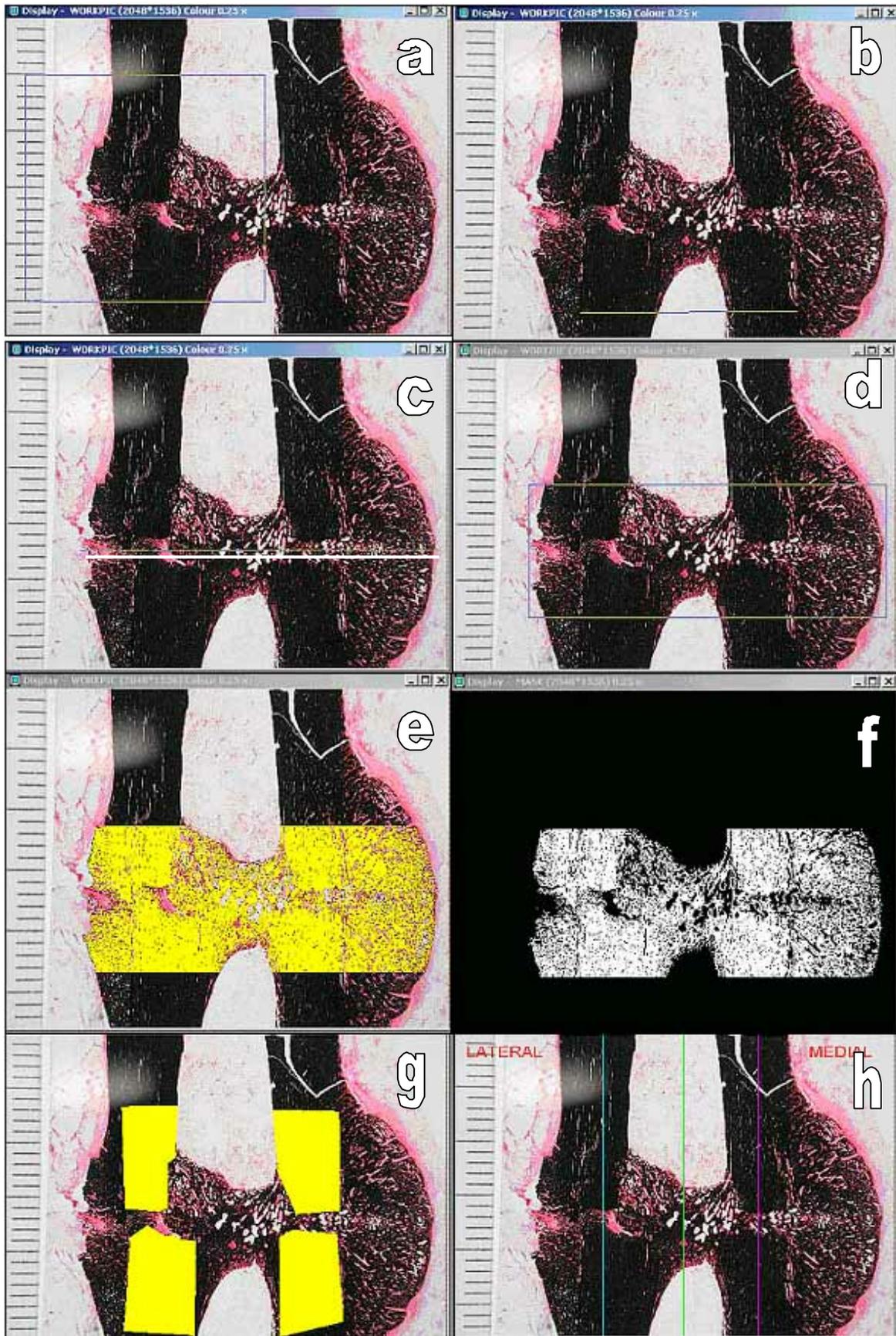


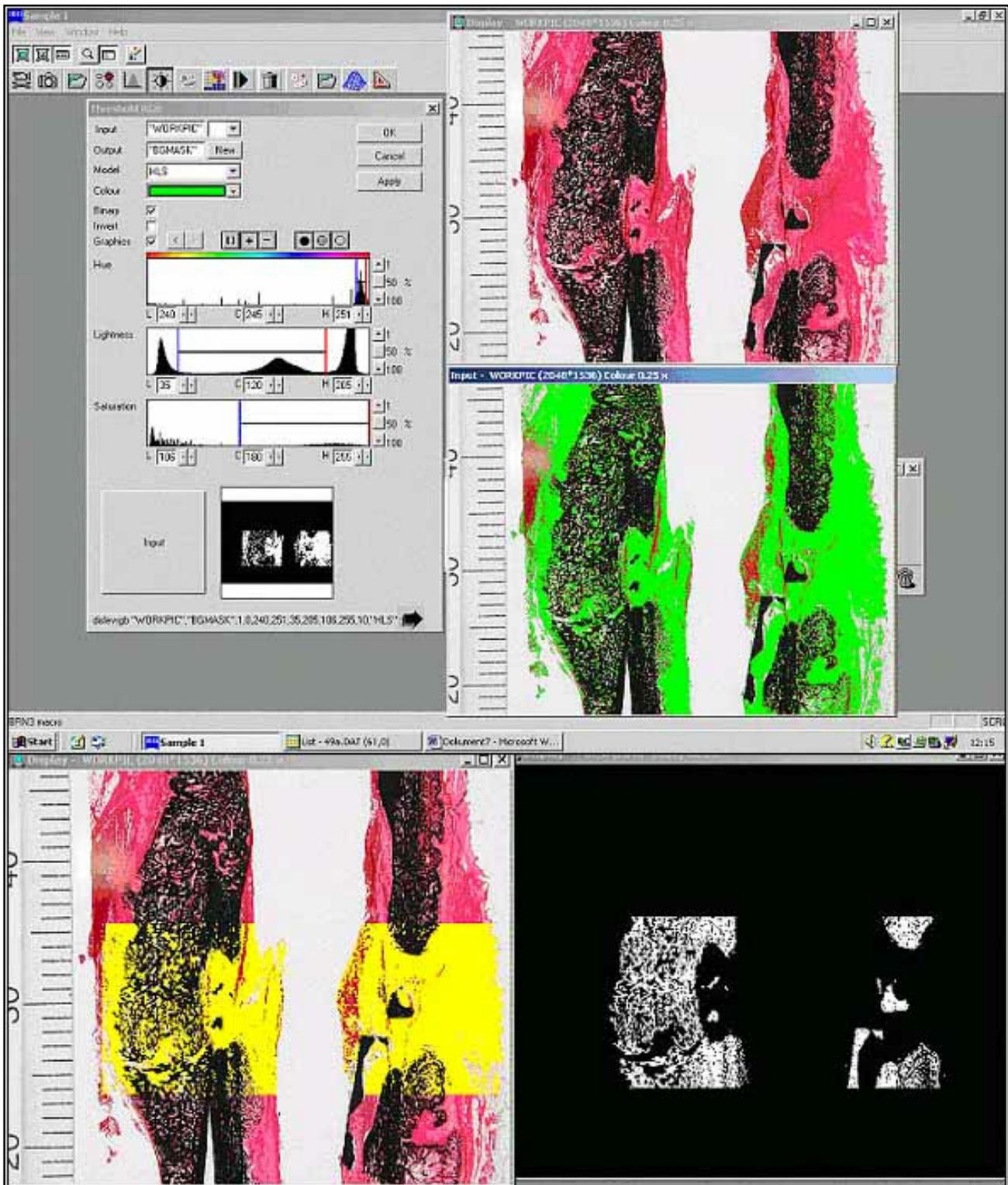


Abb. 3.8.-2: diese Seite

Oben links: Einzeichnen des Kortikalisdurchmessers. Deutlich erkennbar die aufgelöste Kortikalisstruktur.
 Oben rechts: Einzeichnen der Grenze zwischen medialem und lateralem Kallus (mittlerer Strich) und periostalem und endostalem Kallus (äußere Striche) durch den Benutzer. Ermöglicht die Differenzierung der Gewebeanteile bezüglich der verschiedenen Lokalisationen, welche an diesem Präparat und denen der anderen UTN- Tiere aufgrund der aufgelösten Kortikalisstruktur schwierig war.
 Unten links: Einzeichnen der maximalen knöchernen Kallusbreite auf Höhe des Osteotomiespalts. Bei Uneindeutigkeit wurde die Mitte des Osteotomiespaltes anhand des Röntgenbildes rekonstruiert.
 Unten rechts: Positionieren der rechteckigen ROI durch den Rechner, Breite durch den Benutzer definiert (Gesamtkallusbreite), Höhe im Programm auf zwölf Millimeter festgelegt.

Abb. 3.8.-3: nächste Seite

Oben: Segmentierung der Bindegewebsmaske. Der Rechner berechnet die von ihm erkannten und grün markierten Flächen als Bindegewebe. Eine Korrektur durch den Benutzer ist auf der abgebildeten Oberfläche möglich.
 Unten links: Sequenziertes Bindegewebe (gelb) in der ROI.
 Unten rechts: Sequenziertes Knochengewebe (weiß) in der ROI zur Errechnung der Knochendichte in Kallus und Kortikalis.



Parameterdefinition

Die mit Hilfe der computergestützten Bildanalyse erhobene Parameter sind im Folgenden aufgeführt und erläutert. Die englischen Begriffe sind aus dem Computerprogramm zur Bildanalyse (Makro) übernommen und werden hier genannt, um Rückschlüsse auf dieses Programm zu ermöglichen. Die Parameterdefinitionen sind der Arbeit von Parfitt (1988) entnommen.

- 1. Region of Interest Area: Auswertungsfläche [mm²]** – ergibt sich aus der festgelegte ROI-Höhe von 12 mm multipliziert mit dem Gesamtkallusdurchmesser. Der Osteotomiespalt liegt vertikal zentral in der ROI.
- 2. Cortical Width: Kortikale Weite [mm]**, Durchmesser des Knochens von Kortikalisaußenkante zu Kortikalisaußenkante. Dieser Durchmesser ist in der Auswertung eine wichtige Bezugsgröße zum Gesamtkallusdurchmesser, um die tatsächliche Durchmesserzunahme des Knochens als Reaktion auf eine Osteotomie beurteilen zu können.
- 3. Callus Width: Gesamtkallusdurchmesser [mm]**, auf Höhe der größten Ausdehnung, dient als Basis für die Position der ROI. Hier wird der Gesamtkallusdurchmesser, inklusive weitester bindegewebiger oder knorpeliger Ausdehnung beurteilt.
- 4. Callus Bone Width: knöcherner Kallusdurchmesser [mm]** auf Höhe der weitesten knöchernen Ausdehnung. Dieser Parameter erlaubt die Beurteilung der Zunahme des Knochendurchmessers.
- 5. Total Bone Area: Gesamtknochenfläche [mm²]** – besteht nicht nur aus dem schwarz gefärbten mineralisierten Knochen, sondern umfasst auch eingeschlossene bindegewebige und knorpelige Anteile, ebenso ungefüllte Lakunen, Blutgefäße, Entzündungszellen etc. Der Anteil der Gesamtknochenfläche sagt alleine nichts über die Qualität oder über den Entwicklungszustand des untersuchten Kallusgewebes aus. Um dieses beurteilen zu können, muss die Fläche mit dem folgenden Parameter in Beziehung gesetzt werden.
- 6. Total Mineralized Bone Area: Gesamtfläche mineralisierten Knochens [mm²]** – berücksichtigt nur die schwarz gefärbten, also mineralisierten Anteile

des Knochens und Knorpels. Nicht berücksichtigt werden Inseln von Binde- oder nichtmineralisiertem Knorpelgewebe, leere Lakunen, Gefäße usw. Die berücksichtigte Fläche entspricht der mineralisierten Knochenmatrix, da die Anteile mineralisierten Knorpels verschwindend gering sind..

- 7. Total Bone Density: Gesamtknochendichte [%]** des Kallus - ist der Quotient aus Gesamtknochenfläche dividiert durch die Gesamtfläche mineralisierten Knochens und ergibt die Dichte des kallösen Knochens. Je höher der Anteil der Gesamtfläche mineralisierten Knochens an der Gesamtknochenfläche, desto höher die Knochendichte. Diese ist naturgemäß in spongiösem Knochen weniger hoch als in kompaktem Knochen. Die Gesamtknochendichte kann in Beziehung gesetzt werden zur kortikalen Dichte. Die kortikale Dichte repräsentiert hierbei den „ursprünglichen“ Zustand des Knochens, dem die Dichte des knöchernen Regeneratgewebes gegenübergestellt wird. Allerdings muss in der Interpretation der beiden Ergebnisse zueinander beachtet werden, dass auch der kortikale Knochen im Zuge der Osteotomieheilung Umbauvorgängen unterliegt, die seine Dichte verändern können.
- 8. Total Connective Tissue Area: Gesamtbindegewebsfläche [mm²]** im Kallusgewebe. Der Parameter trägt zur Bestimmung der Gesamtknochendichte bei, ebenso wie die
- 9. Cartilage Area: Knorpelfläche [mm²]** im gesamten Kallusgewebe.
- 10. Cortical Bone Area: Fläche kortikalen Knochens [mm²]**, dieser Parameter ermöglicht es, Umbauvorgänge im kortikalen Knochen zu erkennen. Da das Verfahren zur Bestimmung der ROI einen übereinstimmenden Bildausschnitt zwischen den Präparaten sicherstellt und die Wandstärke des Knochens bei den einzelnen Individuen (siehe Größe und Gewicht der Tiere, Messungen intra operationem und Röntgenbilder) des Versuchs ebenso vergleichbar ist, spricht eine signifikante Abnahme der kortikalen Knochenfläche für Resorptionsvorgänge in der Kortikalis. Das abgebaute Knochengewebe wird durch Bindegewebe ersetzt, der Verlust von Knochengewebe ist in einer Abnahme der
- 11. Cortical Mineralized Bone Area: Fläche mineralisierten kortikalen Knochens [mm²]** sichtbar. Dieses gilt allerdings nur, wenn das Ersatzbindegewebe

vom Untersucher als zur Kortikalis gehörig erkannt und für den Rechner dementsprechend markiert wird.

12. Cortical Bone Density: Dichte kortikalen Knochens [%] ist der Quotient aus der Fläche kortikalen Knochens dividiert durch die Fläche mineralisierten kortikalen Knochens. Der kortikale Knochen ist aufgrund seiner kompakten Bauweise sehr dicht, nur geringe Anteile von Bindegewebe in den Haversschen und Volkmannschen Kanälen unterbrechen diese Einheit. Diese Anteile werden als

13. Cortical Connective Tissue Area: Bindegewebsfläche des kortikalen Knochens [mm²] ausgewertet. Nimmt der Bindegewebsanteil der Kortikalis zu, kann das einerseits auf verstärkte Resorptionsvorgänge des Knochens mit bindegewebigem Ersatz hinweisen, andererseits aber auch auf eine paradoxe Auflockerung der Kortikalis im Zuge der Remodelingphase der Osteotomieheilung (Chao et al., 1989).

Die Parameter 5 bis 13 werden getrennt für die mediale und laterale Seite des Kallus, die Parameter 5 bis 8 auch getrennt nach periostalem und endostalem Kallus ermittelt.

3.8.3. Statistik

Die statistische Auswertung der Messwerte wurde mit SPSS 10.0 durchgeführt. Die in Excel gesicherten Werte aus dem Programm der computergestützten Bildanalyse wurden nach SPSS kopiert. Die in die Auswertung eingehenden Tiere wurden bezüglich ihrer Implantatversorgung in 3 Gruppen unterteilt. Die Gruppe 1 enthielt die mit dem medialen Fixateur versorgte Tiere, die Gruppe 2 die mit dem kranio-medialen Fixateur und die Gruppe 3 bestand schließlich aus den mit der UTN behandelten Tieren. Die drei Gruppen sind voneinander unabhängig. In der statistischen Auswertung wurden alle drei Gruppen miteinander verglichen. Diese Vergleiche zweier Gruppen wurden, da unabhängige Gruppen verglichen wurden, mittels Mann-Whitney-Test durchgeführt. Für alle Vergleiche wurde eine Signifikanz der Unterschiede bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit von unter fünf Prozent angenommen, das Signifikanzniveau also bei $p = 0,05$ festgelegt. Durch den statistischen Vergleich aller drei Gruppen wird bezüglich des getesteten Merkmals eine Abhängigkeit der Tests untereinander geschaffen. Diese Abhängigkeit wirkt sich auf das Signifikanzniveau aus, welches nach Bonferroni

(Guggenmoos-Holzmann et al., 1996) gesenkt werden muss, indem es durch die Anzahl der durchgeführten Tests dividiert wird. Daher wird das Signifikanzniveau, wenn drei Tests durchgeführt werden, auf $p = 0,05/3 = 0,0167$ nach unten korrigiert.