

Turner (2001)

Institut für Unfallchirurgische Forschung und Biomechanik der Universität  
Ulm  
(Leiter: Prof. Dr. L. E. Claes)

***Der Einfluss eines Weichteilschadens auf die  
Frakturheilung – eine biomechanische und  
angiographische Untersuchung***

Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der Humanbiologie,  
Dr. biol. hum., der Medizinischen Fakultät der Universität Ulm

Mark Bumann-Melnyk  
geboren in Northeim, Niedersachsen

Ulm 2004

Amtierender Dekan: Prof. Dr. R. Marre  
1. Berichterstatter: PD Dr. P. Augat  
2. Berichterstatter: Prof. Dr. H. Gerngross  
Tag der Promotion: 23.4.2004

# Inhaltsverzeichnis

<u>Einleitung</u>	<u>1</u>
Frakturkonsolidierung	3
<i>Primäre Knochenheilung</i>	3
<i>Sekundäre Knochenheilung</i>	4
<i>Desmale und enchondrale Ossifikation</i>	5
<i>Regionen der Frakturheilung</i>	6
Ossäre Vaskularität	8
<i>Durchblutungssituation von Röhrenknochen</i>	8
<i>Tibiale Blutversorgung</i>	8
<i>Blutversorgung nach Fraktur</i>	11
Experimentelle Verfahren zur Beurteilung der Durchblutungssituation im Knochen und im Weichteilgewebe	12
Pathophysiologie des Weichteilschadens	15
<i>Wundheilung – Immunologische Reaktionen</i>	15
<i>Mikrozirkulation nach Schädigung des Skelettmuskels</i>	17
<i>Klassifikation des Weichteilschadens</i>	18
Ziele der Arbeit	20
<u>Material und Methoden</u>	<u>21</u>
Studiendesign	21
Operationsablauf	22
<i>Anästhesie und Operationsvorbereitung</i>	22
<i>Frakturmodell</i>	23
<i>Operatives Vorgehen</i>	24
Postoperatives Vorgehen	27
<i>Haltung und Pflege</i>	27
<i>Versuchsabschluss</i>	27
Auswertungsmethoden	28
<i>Laser Doppler Flowmetrie</i>	28
<i>Mikroangiographische Gefäßdarstellung und -volumenquantifizierung</i>	31
<i>Biomechanik</i>	35

Statistische Auswertung	38
<u>Ergebnisse</u>	<u>39</u>
Postoperativer klinischer Verlauf	39
Blutflussveränderungen im Weichteil- und Knochengewebe nach isoliertem Weichteilschaden	40
Vaskularität nach Fraktur mit Weichteilschaden	44
Biomechanik	48
Gefäßdarstellung und –volumenquantifizierung	50
<i>Digitale Gefäßdarstellung</i>	50
<i>Qualitative Verlaufsdarstellung der Heilung</i>	51
<i>Gefäßquantifizierung</i>	53
Zusammenhang zwischen Gefäßvolumen und Blutfluss	54
<u>Diskussion</u>	<u>55</u>
Methodik	56
<i>Tiermodell</i>	56
<i>Frakturmodell</i>	59
<i>Modell Weichteilschaden</i>	61
<i>Laser Doppler Flowmetrie</i>	62
<i>Gefäßvisualisierung und –volumenquantifizierung</i>	65
<i>Biomechanik</i>	67
Ergebnisse	68
<i>Durchblutungssituation im Weichteilgewebe und in ossären Strukturen nach isoliertem Weichteilschaden</i>	68
<i>Gefäßvisualisierung und –volumenquantifizierung</i>	71
<i>Einfluss eines Weichteilschaden auf die Frakturheilung</i>	72
Generelle Überlegungen	72
Proximale und distale Frakturregion	76
Frakturregion	78
Klinische Relevanz	80
Schlussfolgerungen und Ausblick	82
Zusammenfassung	84
Summary	85
<u>Literatur</u>	<u>86</u>

# Abkürzungsverzeichnis

AO	Arbeitsgemeinschaft für Osteosynthesefragen
BMP	bone morphogenetic protein
ESAF	endothelial cell-stimulating factor
FGF	fibroblast growth factor
G	Grad der Verletzungsschwere
IGF	insulin-like growth factor
LDF	Laser Doppler Flowmetrie
mm Hg	zeitlicher Mittelwert der Drücke am jeweiligen arteriellen Messort
NGF	nerve growth factor
OPS	orthogonal polarization spectral imaging
PET	Positron-Emission Tomographie
µCT	Mikrocomputertomographie
TGF	transforming growth factor
VEGF	vascular endothelial growth factor

# Kapitel 1: Einleitung

Die wesentliche Funktion knöcherner Strukturen des menschlichen Bewegungsapparates besteht in der Lastenübertragung sowie in der Übertragung von Muskelkräften. Die übermäßige Belastung knöcherner Strukturen hat ein Versagen zur Folge, die als Knochenbruch bzw. Fraktur bezeichnet wird. Durch die entstandene Diskontinuität des Knochens ist die Erfüllung der mechanischen Aufgaben nicht mehr gewährleistet. Die Wiederherstellung der mechanischen Funktion durch die Wiedervereinigung der Knochenfragmente ist das Ziel der Frakturheilung. Dabei kennzeichnet eine ausreichende Blutversorgung und eine suffiziente mechanische Stabilität im Frakturspalt die erfolgreiche Frakturheilung. Der Begriff der Frakturstabilisierung steht für eine in einem nur sehr geringen Umfang stattfindende Bewegung zwischen den Fragmentenden (interfragmentäre Bewegung) und eine adäquate interfragmentäre Spaltbreite.

Für die Biologie der Frakturheilung nimmt die Revaskularität der Fragmentenden eine Schlüsselrolle ein. Dabei wirken sich zahlreiche Faktoren auf die Vaskularität im Frakturspalt aus. Einerseits sind es anatomische Strukturen wie das Periost und das den Frakturspalt umgebende Weichteilgewebe, die die externe Blutversorgung übernehmen und andererseits das im Frakturspalt befindliche hämatoide Gewebe, welches die Neogenese von Gefäßstrukturen positiv beeinflusst. Auf zellulärer Ebene wirkt eine adäquate Expression von Wachstumsfaktoren wie der vascular endothelial growth factor (VEGF), transforming growth factor beta 1 (TGF- $\beta$ 1), fibroblast growth factor beta (FGF- $\beta$ ), das bone morphogenetic protein 2 (BMP 2) und bone morphogenetic protein 7 (BMP 7) stimulierend auf die Frakturheilung. Direkte Hinweise auf kausale Zusammenhänge zwischen mechanischer Stabilität, Vaskularität und Gewebsdifferenzierung sind in der Literatur ausreichend beschrieben. *In vitro* Experimente auf molekularbiologischer Ebene konnten zeigen, dass auch die Zelldifferenzierung von den mechanischen Umgebungsbedingungen direkt beeinflusst wird.

Trotz substantiell verbesserter medizinischer Versorgung und intensiver Forschung auf dem Gebiet der Frakturheilung in den letzten 6 Jahrzehnten verbleibt ein

Prozentsatz von 5-10% von Frakturen, die eine Heilungskomplikation aufweisen. Zu diesen Komplikationen gehören Heilungsprozesse, die eine erhebliche Verzögerung aufweisen, obwohl nach der erfolgreichen Erstversorgung und einer komplikationslosen postoperativen Nachversorgung keine Kontraindikationen zu erwarten gewesen wären. Die Heilungskomplikationen reichen hin bis zu manifesten Pseudarthrosen, bei denen die Frakturlokalisierung über Monate hinweg ausbleibt.

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit dem Einfluss eines Weichteilschadens auf die Frakturheilung. Neben der Bestimmung der mechanischen Eigenschaften des geheilten Knochens, soll die Güte der Revaskularisierung im Heilungsverlauf untersucht werden.

## Frakturkonsolidierung

Mit der Überschreitung der Belastungstoleranz ossärer Strukturen kommt es zu einem Versagen der Integrität des Knochens. Diesem Ereignis können unterschiedliche Mechanismen zugrunde liegen. Ein Trauma als Folge eines singulären Gewaltereignisses, eine Stressfraktur infolge lang andauernder, ständig wiederkehrender, gleichförmiger relativ hoher Belastungen ohne ausreichende Regenerationsmöglichkeit des betreffenden Gewebes, Stoffwechsel bedingte Herabsetzung oder alters bedingte Verminderung der mechanischen Eigenschaften können als Ursache für eine Fraktur in Frage kommen.

Zur Frakturkonsolidierung sind eine Vielzahl von Prozessen auf systemischer und lokaler Ebene einerseits und zellulären, biochemischen und biophysikalischen Reparationsvorgänge andererseits nötig, um einen erfolgreichen Heilungsverlauf zu gewährleisten. Demnach stellt die Biologie der Frakturheilung ein kompliziertes Zusammenspiel vielfältigster Prozesse dar, die miteinander gekoppelt sind (McKibbin 1978).

Die Wiederherstellung der mechanischen Kompetenz des Knochens kann ausschließlich durch die knöcherne Wiedervereinigung der Knochenfragmente zustande kommen. Dabei können bei der Behandlung von Frakturen auf makroskopischer Ebene zwei unterschiedliche Heilungsformen beobachtet werden: die primäre und die sekundäre Knochenheilung (Willenegger et al. 1971).

### *Primäre Knochenheilung*

Die primäre Knochenheilung ist gekennzeichnet von einer osteonären Verbindung der Fragmente. Unerlässliche Voraussetzung für diese Art der Heilungsform ist neben einer guten Reposition und einer ausreichenden Vaskularität der Fragmente ein sehr hoher Grad an Stabilität zwischen den Kontaktflächen beider Knochenenden, die unter optimalen Bedingungen keine Bewegung zwischen den Fragmentenden zulässt (Chao et al. 1992, Perren 1979, Willenegger 1971). Das wird in der Regel durch eine interfragmentäre Kompression erreicht (Claes 1989, Perren

1979). Abhängig von der Güte operativer Reposition der Fragmentenden, kann eine Kontaktheilung oder eine Spaltheilung beobachtet werden. Bei der Kontaktheilung haben die Kortices der Fragmentenden direkten Kontakt miteinander, so dass ein Eindringen von Blutgefäßen und anderen Gewebselementen nicht erfolgt. Die Knochenregeneration erfolgt über longitudinal ausgerichtete Osteone, die die Fragmentenden miteinander verzahnen. Ihre Bildung entsteht durch Osteoklasten, die einen Resorptionskanal ausbohren. Im Zuge der Wiederauffüllung des Bohrkanals siedeln sich Osteoblasten an und bilden neues Knochengewebe, den Lamellenknochen, der den Bohrkanal auffüllt (Stürmer 1988). Im Gegensatz zur Kontaktheilung kommt es bei der Spaltheilung zur Ausfüllung des Frakturspaltes mit Knochengewebe, das zunächst aus quer zur Knochenlängsachse gewachsenen lamellären Knochen besteht. Das Bild der Spaltheilung ist in der Regel bei einer Spaltbreite von bis zu 0,5 mm zu beobachten (Schenk und Perren 1977). Wie bei der Kontaktheilung erfolgt dann die Wiederherstellung des ursprünglichen Kortex durch in Längsrichtung wachsende Haversche Umbaueinheiten. Die Spaltheilung ist daher zweiphasig: zuerst ist die Auffüllung des Bruchspaltes mit Knochengewebe zu beobachten, erst dann folgt die osteogene Verzahnung beider Knochenfragmente (Schebitz et al. 1993).

### *Sekundäre Knochenheilung*

Das charakteristische Merkmal der sekundären Knochenheilung ist der periostale Kallus. Diese Schwielenbildung, die sich annähernd rotationssymmetrisch um die Bruchstelle bildet, ist das Ergebnis von in engen Grenzen zugelassenen Bewegungen der Fragmentenden zueinander (Muller et al. 1972). Der Kallus besitzt die wesentliche Aufgabe die Reparationsvorgänge gegenüber auftretenden äußeren Lasten zu schützen, indem die Querschnittsfläche und damit das Flächenträgheitsmoment des Knochens durch den größeren Kallusdurchmesser ansteigt. Eine starke phänotypische Kallusausprägung ist dabei nicht unbedingt mit einer erfolgreichen Heilung verknüpft, sondern kann auch das Erscheinungsbild einer hypertrophen Pseudarthrose sein. Die mechanischen Rahmenbedingungen sind für den Heilungsverlauf von großer Bedeutung. Unterschiedliche flexible Osteosyntheseverfahren wie die intramedulläre Marknagelung, der Fixateur externe oder die Distraction nach Ilizarov, lassen verschieden große Bewegungen im

Frakturspalt zu und induzieren die Kallusbildung. Durch das appositionelle Ablagern von Faserknochen im Zwischenraum von der Diaphysenoberfläche und dem Periost entsteht der Kallus mit einem Abstand von 2-3 cm von dem Frakturspalt. Der nun einsetzende Regenerationsprozess unterliegt fünf temporär aufeinander folgenden Stadien. Das unmittelbar nach dem Frakturtrauma im interfragmentären Raum auftretende Hämatom wird durch das Granulationsgewebe lysiert und durch faseriges Bindegewebe und Faserknorpel ersetzt. In diesem Milieu entsteht der die Fraktur stabilisierende Geflechtknochen. Sich am Verlauf der Gefäße zwischen den kollagenen Fasern von Osteoblasten orientierend, wird der Knochen im Bindegewebe über eine Zwischenstufe des Osteoids gebildet. Nach Verkalkung der Knorpelsubstanz des Faserknorpels sprossen Blutgefäße ein und es treten zunehmend Chondroklasten und Osteoblasten auf. Anschließend kommt es zu einer Umwandlung des Kalkgerüsts in Osteoide und neuen Faserknochen. In der letzten Phase der sekundären Knochenheilung erfolgt mit der Umgestaltung des Kallusgewebes zu mechanisch stabilerem Lamellenknochen, der abschließende Remodelling Prozess. Der periostale Kallus wird hierbei solange resorbiert, bis die ursprüngliche Form des Knochens wiederhergestellt ist. Im Gegensatz zu allen anderen biologischen Geweben hinterlässt ein aufgetretenes Frakturtrauma kein Narbengewebe. Die volle Belastbarkeit des Knochens wird wieder erreicht (Einhorn 1992).

### *Desmale und enchondrale Ossifikation*

Auf der mikroskopischen Ebene können zwei unterschiedliche Formen der Knochenneubildung beobachtet werden: die desmale und die enchondrale Ossifikation (Schenk 1986).

Bei der desmalen Ossifikation handelt es sich um einen Prozess der Knochenneubildung, der an stabile Umgebungsbedingungen gebunden ist und eine ausreichende Blutversorgung erfordert. Die Osteoblasten bilden dabei direkt an kollagenen Strukturen des gefäßreichen Bindegewebes ihr Osteoid, das sich durch Kalzifizierung zum Geflechtknochen entwickelt.

Bei der enchondralen Ossifikation werden hypertrophe Knorpelzellen in ihrer Extrazellulärmatrix eingemauert. Das erfolgt über die Verkalkung des umgebenden Knorpelgewebes. Die verkalkte Matrix, in die zunächst zahlreiche Gefäße

einsprossen, wird dann durch Chondroklasten abgebaut und anschließend durch ein Osteoid ersetzt. Die nutritiven Gefäße kommen von dem bereits gebildeten Knochen aus dem periostalen Kallus. Die Lakunen der hypertrophen Zellen werden im Verlauf der Mineralisierung geöffnet und die Knorpelzellen selbst verschwinden. Über den Stoffwechsel wird das neu gebildete Osteoid mit Kalk angereichert und entwickelt sich zu neuem Knochengewebe, dem so genannten Geflechtknochen, der in der Folge durch Osteoklasten und Osteoblasten zu lamellärem Knochen umgebaut wird (Frost 1989, Hulth 1989, McKibbin 1978).

### *Regionen der Frakturheilung*

Für die Evaluation des Heilungsablaufes bildet die Frakturzone mit dem Frakturspalt und dem umgebenden Frakturkallus das Zentrum des wissenschaftlichen Interesses (Abb. 1). In diesem Bereich laufen alle Prozesse, die je nach Heilungszeitpunkt verschiedene biologische Entwicklungen erkennen lassen. Die einzelnen Heilungsregionen des Frakturkallus wurden wie folgt beschrieben (Einhorn 1992, Rhinelander 1979):

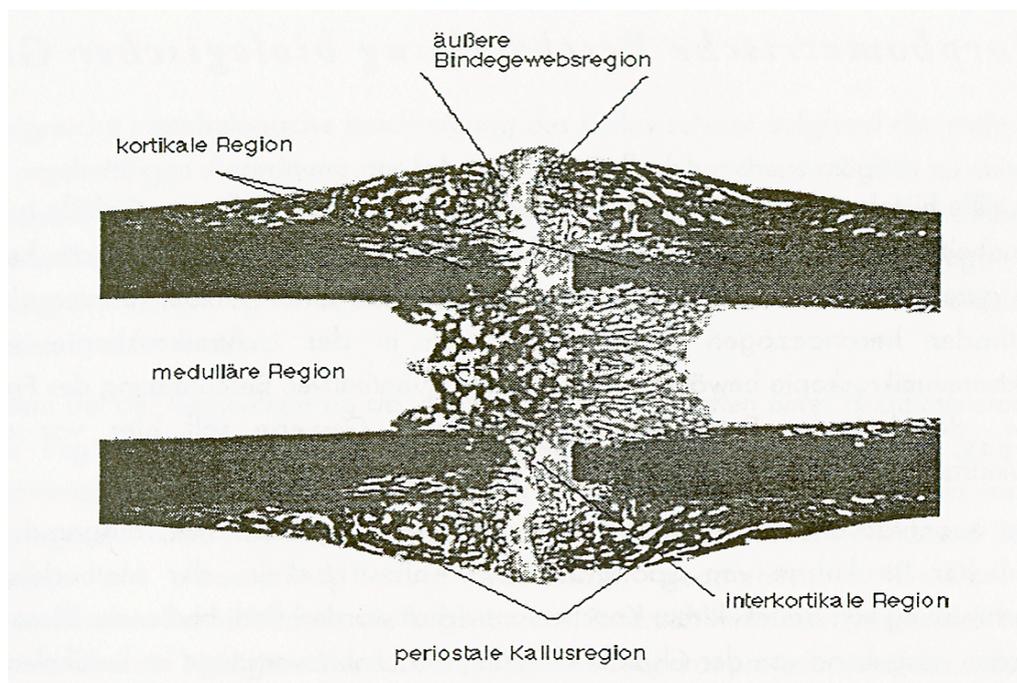


Abbildung 1: Einteilung der Frakturzonen (nach Einhorn 1992)

Die erste sichtbare Kallusbildung lässt sich in der periostalen Region beobachten. Bereits am 3. Tag ist periostaler Kallus sichtbar. Bis zum 9.-11. Tag wächst das Kallusgewebe aus 2-3 cm Entfernung auf den Frakturspalt zu (Hulth 1989). Dieser initiale Wachstumsprozess scheint unabhängig von dem vorherrschenden mechanischen Milieu und der Durchblutungssituation zu sein.

Im Bereich der *äußeren Bindegewebsregion* überbrückt der Kallus den Frakturspalt und leistet einen wichtigen Beitrag zur Stabilität. Dieser Teil des Kallus ist stark abhängig von dem vorherrschenden mechanischen Milieu. Während die Güte des Kallusgewebes von den zellulären und biologischen Prozessen beeinflusst wird, unterliegt die Kallusbildung der mechanischen Situation und kann in Abhängigkeit von der Dynamisierung der Fraktur beeinflusst werden (Augat et al. 2003, Claes 1989, Claes et al. 1997, Claes et al. 2002, Claes et al. 2003, Kenwright und Goodship 1989, Stürmer 1988, Wolf et al. 1998).

Die Knochenbildung und die Revaskularisierung in der *medullären Region* treten sehr früh auf, verlaufen aber innerhalb des Heilungsverlaufs auf geringem Niveau weiter. Erkenntnisse über biomechanisch induzierte Wirkungen auf die medulläre Heilung sind bisher nicht bekannt.

Der sich periostal oder endostal gebildete Geflechtknochen wächst in die *interkortikale Frakturregion* ein. Dieser Prozess beginnt bei ausreichender Stabilität in der Frakturregion und erhöht dabei das Flächenträgheitsmoments.

Die *Kortices* der beiden Fragmentenden wachsen in der Regel erst sehr spät zusammen. Voraussetzung dafür ist eine ausreichende Stabilität der Fraktur. Hierbei wandern die im vitalen Spaltbereich vorhandenen Osteone in die kortikale Region ein und verzapfen sich dort mit dem bereits vorhandenen Geflechtknochen (Einhorn 1992, McKibbin 1978).

## Ossäre Vaskularität

### *Durchblutungssituation von Röhrenknochen*

Das im Körper zirkulierende Blut besteht aus Zellen, die in einer eiweiß- und elektrolythaltigen Lösung, dem so genannten Plasma, suspendiert sind. Bei der Aufrechterhaltung der Homöostase, bei immunologischen Abwehrreaktionen gegenüber Krankheitserregern oder Fremdstoffen und vor allem als Transportmittel nutritiver Stoffe und der Stoffwechselendprodukte ist das Blut beteiligt. Diese Kenntnisse verdeutlichen, dass eine ausreichende Blutversorgung im intakten Knochen für die Vitalität des Knochens von herausragender Bedeutung ist. Im Fall einer aufgetretenen Fraktur ist eine schnelle Wiederherstellung der Blutversorgung nötig, um die Reparationsprozesse auf mikroskopischer Ebene erfolgreich initiieren zu können und im Heilungsverlauf die desmale und chondrale Ossifikation zu unterstützen.

### *Tibiale Blutversorgung*

Der diaphysäre Röhrenknochen wird über die metaphysären Arterien, die periostalen Arterien und die A. nutricia mit Blut versorgt. Sie bilden das afferente Gefäßsystem (Rhineland 1974). Anteilig am Gesamtblutvolumen überwiegt die Vaskularität des Markraumes gegenüber der Kortikalis in einem Verhältnis von 3:1 (Braun und Ruger 1996). Die Arteria nutricia ist in der Tibia das dominierende Blutgefäß, die sich nach dem Eindringen durch den diaphysären Kortex in die Tibia in einen aufsteigenden und einen absteigenden Ast verzweigt. Zusammen mit den Ästen der metaphysalen und epiphysalen Arterien versorgt sie die ossären Gebiete des blutbildenden Knochenmarks, das Gewebe der Kompakta und der Spongiosa und die artikulären und epiphysalen Knorpelgewebe (Rhineland 1979). Der größte Anteil der Blutversorgung (65% der Gesamtpfusion) der kortikalen Tibiastrukturen erfolgt durch diese Gefäßstruktur (Willans 1987). Brookes (Brookes und Revel 1971) dagegen hält eine kortikale Versorgung von 90% aus dem medullären Raum für

realistisch. Eine sechsfach höhere Durchblutung der Spongiosa gegenüber der Kortikalis konnten Kunze (Kunze et al. 1981) nachweisen. Die von Amprino (Amprino und Moratti 1964) festgestellten Unterschiede der Blutvolumen zwischen Metaphyse, Epiphyse und Kortikalis erklären sich aus den verschiedenen, funktionellen und metabolischen Aufgaben der einzelnen Knochenregionen (Reeve et al. 1988, Whiteside et al. 1991). Anastomosen, d.h. Gefäße, die ohne Zwischenschaltung eines Kapillarnetzes den arteriellen und venösen Blutkreislauf verbinden, finden sich zwischen den terminalen Ästen der multiplen metaphysären Arterien und den aufsteigenden und absteigenden Ästen der medullären Gefäße. Die Unversehrtheit dieser Verbindungen ist gerade nach einer Fraktur mit einhergehender Ruptur der A. nutricia für die Aufrechterhaltung der medullären Blutversorgung von großer Bedeutung (Brookes und Revel 1997). Intraangiographische Druckmessungen wiesen im medullären Gefäßabschnitt einen Druck von 45-60 mm Hg und in der extraossären Region von 12-15 mm Hg nach. Diese Befunde ließen den Schluss auf einen zentrifugal ausgerichteten Blutfluss zu (Kelly et al. 1977, McCarthy et al. 1983). Brookes (Brookes und Revel 1997) konnten diese Angaben in ihrer Studie bestätigen. Im Fall von Faszienanlagerungen am Knochen versorgen die von außen in den Knochen eindringenden periostalen Gefäße das äußere Drittel der Kortikalis, während die fibröse Schicht und die Kambiumschicht aus dem Markraum mit Blut versorgt werden (Rhineland et al. 1982). An Knochen ohne Faszienanlagerung ist dagegen keine periostale Blutversorgung festzustellen (Rhineland 1974; Abb. 2 und 3).

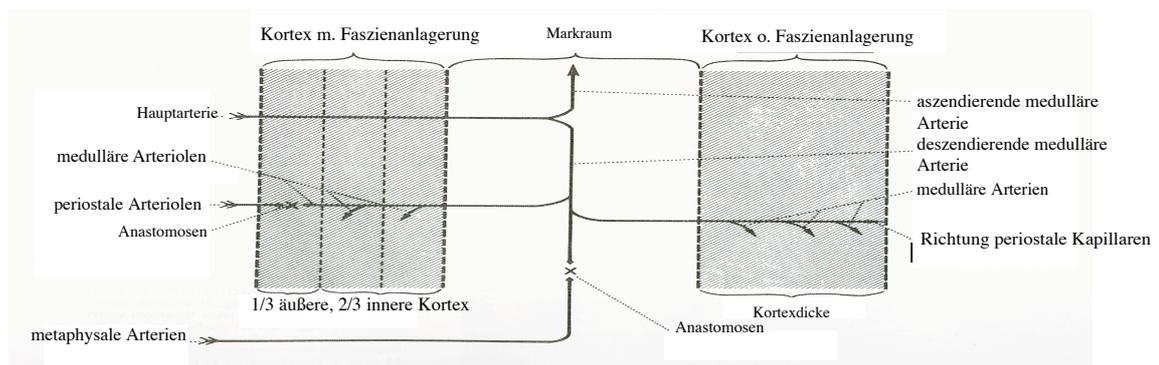


Abbildung 2: Afferentes Gefäßsystem eines Röhrenknochens mit/ohne Faszienanlagerung (aus Rhineland 1972)

Das interkortikale Gefäßsystem setzt sich aus den Volkmanschen und Haversschen Kanälen zusammen. Dabei gelangen die für die Vitalität wichtigen Nährstoffe nur über die Canaliculi zu den Osteozyten, da kein richtiges Kapillarnetzwerk im

kompakten Knochen existiert. Über die efferenten Gefäßbahnen gelangt das venöse Blut aus dem Kortex in den zentralen Sinus und von dort in die größeren Venen, die den Markraum verlassen.

Die biomechanischen und biophysikalischen Einflüsse sind in der Regel auf die Muskelpumpe, den Stau- und Pulsdruck, die Blutflussrate, die Flussunterschiede innerhalb des Knochens und auf die von außen wirkenden Lasten zurückzuführen (Brookes und Revel 1997). Das den intakten Knochen umgebende Weichteilgewebe scheint auf die absolute Höhe des Blutflussvolumens keinen Einfluss zu haben (Macnab und de Haas 1974, Trueta 1974). Die Blutflussgeschwindigkeit innerhalb eines Röhrenknochens liegt zwischen 0,2-0,8 mm/s ohne erkennbare Abhängigkeit von der Lokalisation innerhalb des Knochens (Branemark 1959). Das Alter hat wie auf alle anderen vitalen Organe auch Auswirkungen auf die Blutversorgung des intakten Knochens. Etwa ab Mitte des 5. Lebensjahrzehnts verändert sich sukzessive die Strömungsrichtung von zentrifugal nach zentripetal. Mit Erreichen des 70. Lebensjahres wird der Knochen ausschließlich über die periostalen Gefäßstrukturen mit Blut versorgt (Bridgeman und Brookes 1996).

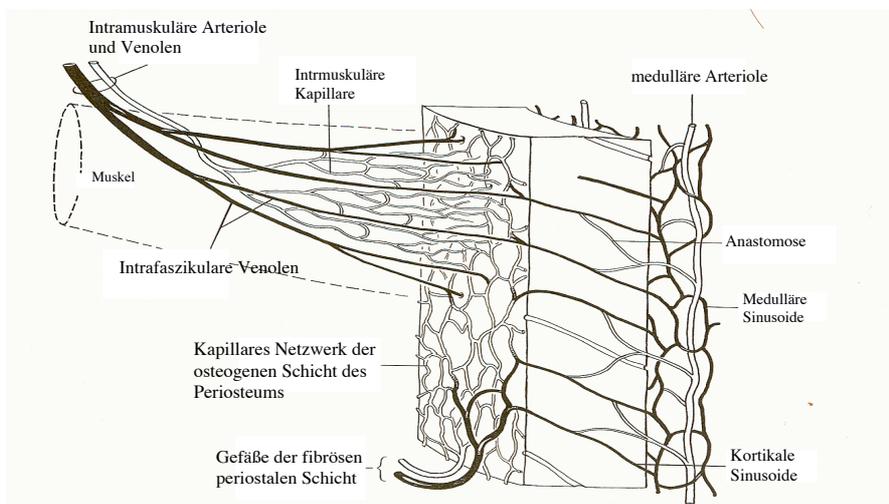


Abbildung 3: Verbindungsstruktur der Blutgefäße zwischen Markraum, Kortikalis, Periost und angrenzendem Muskelgewebe (aus Brookes und Revel. 1997)

## *Blutversorgung nach Fraktur*

Die durch das Frakturtrauma bedingten Zerstörungen der kortikalen Knochenstrukturen sind abhängig von den Einflussfaktoren Energiegröße, -dauer und -richtung (Chao und Aro 1992). Die longitudinal verlaufenden medullären Gefäße und die Haversschen Kanäle werden hierbei größtenteils zerstört, während die transvers ausgerichteten Gefäßstrukturen wie die periostalen und Volkmannschen Gefäße nicht in dem Ausmaß betroffen sind (Macnab und de Haas 1974). Bei schweren Verletzungsereignissen wie z. B. bei offenen Frakturen mit Weichteilschäden ist nicht nur der Knochen von dem aufgetretenen Trauma betroffen, sondern auch die wichtigen Umgebungsstrukturen wie das Periost und der Weichteilmantel. Durch Zerstörung der medullären Gefäße und des damit assoziierten abfallenden medullären Blutdrucks kann die physiologische zentrifugale Strömungsrichtung nicht weiter aufrechterhalten werden. Statt der Versorgung der Kortikalis aus medullärer Richtung, werden in der ersten Heilungsphase die Gebiete der Kortikalis, des Endosts und teilweise die medulläre Region über die Gefäße des umliegenden Weichteilgewebes und des Periosts versorgt (Dankwardt-Lillieström 1969, Strachan et al. 1990, Stürmer 1988). Diese zentripetale Fließrichtung wird solange aufrechterhalten bis die medulläre Versorgung wieder ausreichend hergestellt ist (Rhineland 1974).

Generell erfolgt die Gefäßneubildung auf gefäßbildende Stimuli hin und beginnt hervorgerufen im Endothelgewebe in präexistenten Gefäßen (Glowacki 1998). Erste Beobachtungen dies bezüglich stellten dafür einen Zeitpunkt zwischen der 2. und 3. Woche nach Fraktur fest (Rhineland et al. 1968). Neuere Studien zeigten dagegen, dass die Angiogenese in Abhängigkeit von der Lokalität im Frakturspalt wesentlich früher beginnt. Für die periostale Frakturzone konnten erste kapillare Strukturen bereits nach dem 3. Tag und im medullären Areal nach dem 7. Tag nachgewiesen werden (Einhorn 1995, Glowacki 1998, Hulth 1989). Zusätzlich dazu entstehen neue Anastomosen im Markraum zwischen den medullären und metaphysalen Gefäßen, die für den Anstieg der medullären Revaskularisation sorgen (Rhineland 1974). Tritt dagegen eine Verzögerung bei der Revaskularisierung der medullären Frakturzone ein, kann sich die periostale und extraossäre Blutversorgung um ein Vielfaches verlängern (Hulth 1989). Die Ausrichtung der angiogenen Neubildung scheint einer Gesetzmäßigkeit zu folgen, die möglicherweise von

funktionellen Umgebungsbedingungen initiiert wird. So berichteten Inoue (Inoue et al. 2001) von Kapillaren im medullären Bereich, die eine strenge Ausrichtung in Richtung des Knochendefekts aufwiesen. Auch Trueta (Trueta 1974) demonstrierte mittels mikroangiographischer Aufnahmen eine orientierte Angioneogenese im periostalen Frakturkallus, die mit zentripetaler Ausrichtung in die Kortikalis einsprossen.

## Experimentelle Verfahren zur Beurteilung der Durchblutungssituation im Knochen und im Weichteilgewebe

Für die Evaluation der Durchblutungssituation im Knochen bieten sich anatomische *in situ* Verfahren und *in vivo* Blutflussmethoden an. Während die Mikroangiographie und die Spalteholtz-Technik den anatomischen Verfahren zuzurechnen sind, sind die intravitale Fluoreszenzmikroskopie, die scintigraphische Darstellung und Micropheres - Untersuchungen als *in vivo* Blutflussmethoden zu klassifizieren.

Bei der **Mikroangiographie** handelt sich um ein terminales Verfahren, bei dem eine Barium-Sulfat Lösung injiziert wird (Macnab und de Haas 1974, Rhinelander et al. 1968, Rhinelander 1972, Rhinelander 1974, Trueta 1974). Die Verteilung im Organismus erfolgt unter physiologischen Druckbedingungen des Gefäßsystems, so dass auch kleinste Arteriolen zum Einleitungszeitpunkt gefüllt werden können. Nach Abschluss der Einleitung kann dann mittels einer konventionellen radiologischen Schnittbilduntersuchung eine zweidimensionale Darstellung des Gefäßsystems generiert werden. Ferner können mit diesem Verfahren Mikroradiographien hergestellt werden, die ihrerseits eine Beurteilung der unterschiedlichen Knochenabschnitte und deren Gefäßstrukturen durch Schichtbildaufnahmen zulassen. Zudem erlauben die Mikroradiographien einen semiquantitativen Vergleich mit histologischen Untersuchungen.

Das zweite anatomische Verfahren ist die **Spalteholtz-Technik** (Chidgey et al. 1986, Petersen et al. 2002, Yamaguchi et al. 1997). Hierbei wird eine schwarze

Farblösung (India Ink) dem Organismus über den arteriellen Schenkel zugeführt. Nach Entnahme und Auswaschen des Präparates können unter dem Durchlichtmikroskop die schwarzen Gefäßstrukturen auf dem hellen Hintergrund qualitativ ausgewertet werden. Die Durchführung dieses Verfahrens lässt eine parallele histologische Aufarbeitung des Präparats nicht zu (Abb. 4).

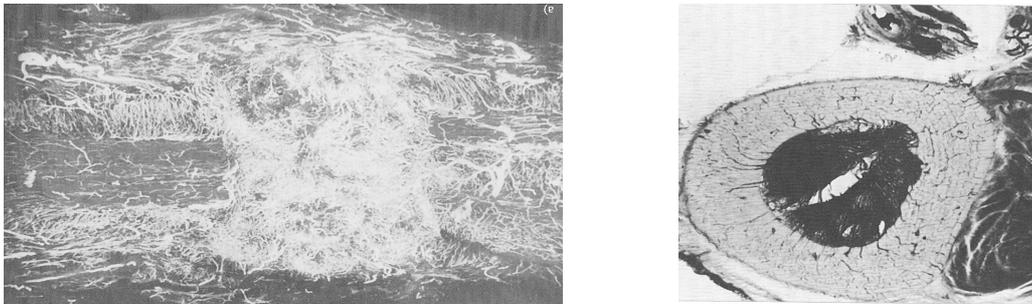


Abbildung 4: Mikroangiographische Darstellung (links), Photographie einer kortikalen Struktur nach Spalteholtz Technik (aus Rhineland et al. 1982; rechts; in die Kortikalis einsprossenden Gefäße sind schwarz angefärbt)

Zur Bewertung des Blutflusses unter *in vivo* Bedingungen haben sich einige Verfahren in den zurückliegenden 50 Jahren etablieren können. Bei der ‚**washout**‘ **Technik** werden radioaktive Isotope wie Argon 41 ( $^{41}\text{Ar}$ ), Xenon 133 ( $^{133}\text{Xe}$ ), Iodoantipyrine ( $^{125}\text{I}$ ) dem Organismus verabreicht (Jurvelin et al. 1988, Kelly 1973, Takahashi et al. 1990). Der Hinweis auf die Durchblutungshöhe des betrachteten Gewebes ergibt sich aus der Differenz der in das Gewebe einströmenden und wieder ausströmenden Isotope, also der Menge der Isotope, die das betreffende Knochengewebe aus dem Blut ‚herausgewaschen‘ hat. Hierbei muss die Volumenverteilung der Tracer im untersuchten Gewebe bekannt sein, um objektive Beurteilungen vornehmen zu können.

Das **Clearance-Verfahren** unterscheidet sich von der ‚washout‘ Technik, indem die Differenz des Isotopengehalts ( $^{85}\text{Sr}$ ;  $^{47}\text{Ca}$ ) zwischen Blut und Organ berechnet wird (Lewallen et al. 1984). Allerdings muss sichergestellt sein, dass das Verschwinden der Isotope ausschließlich vom Blutfluss abhängig ist. Ferner ist bei der quantitativen Bewertung der Durchflussmenge zu berücksichtigen, dass die Extraktion der Isotope im Falle hoher Fließgeschwindigkeiten geringer ausfällt als unter langsamen Blutflussbedingungen.

Eine weitere Möglichkeit der Blutflussmessung stellt die **Microsphere Methode** dar (Grundnes et al. 1993, Reichert et al. 1995, Strachan et al. 1990). Nach der

systemischen Applikation von radioaktiven Substanzen wird das betreffende Organ entnommen und die Ablagerung der radioaktiven Substanzen wie Scandium 46 ( $^{46}\text{Sc}$ ), Chronium 51 ( $^{51}\text{Cr}$ ) und Cobalt 57 ( $^{57}\text{Co}$ ) in den Gefäßen quantifiziert. Die verwendeten Substanzen haben den Vorteil, dass sie vom Körper nicht metabolisiert werden und somit eine Lebensdauer von einigen Tagen im Organismus aufweisen. Die Auswahl der radioaktiven Substanz kann nicht beliebig erfolgen. Sie muss sich am Gefäßdurchmesser des Zielorgans orientieren.

**Die Szintigraphie** stellt eine nicht invasive und nicht destruktive Untersuchungsmethode dar, die jedoch nur große Blutflussveränderungen verlässlich detektieren kann (Bhatt et al. 2000). Nach Gabe von Isotopen wie z. B. Technetium 99 ( $^{99}\text{Tc}$ ) wird in statischem Zustand eine einzelne Aufnahme mittels Positron-Emission-Tomographie (PET) durchgeführt. Daher erlaubt das Verfahren nur qualitative Hinweise auf eine veränderte Durchblutungssituation. Eine direkte Blutflussmessung ist möglich.

Die **Laser Doppler Flowmetrie** ist ein weiteres etabliertes Verfahren, um die Durchblutungssituation im Knochen oder im Muskelgewebe zu bestimmen (Notzli et al. 1989, Schemitsch et al. 1994). Dabei wird die durch die sich bewegenden Erythrozyten erzeugte Frequenzverschiebung (Doppler Effekt) ausgewertet. Da diese Methode ein wichtiger Methodenbaustein der vorliegenden Arbeit ist, findet eine genaue Beschreibung des Verfahrens im Abschnitt ‚Material und Methoden‘ statt.

Bei Durchblutungsmessungen am Knochen und im Weichteilgewebe hat die **intravitale Fluoreszenzmikroskopie** in den letzten Jahren stark an Bedeutung gewonnen (Mittlmeier et al. 2003, Rucker et al. 2002, Schaser et al. 1999, Szczesny et al. 2000, Zhang et al. 2003). Dabei handelt es sich um ein invasives Messverfahren, das eine Injektion von fluoreszierenden Markern, so genannten Fluorochromen, in die Blutbahn verlangt. Diese Fluorochrome dienen der Sichtbarmachung von gewebsgebundenen Antigen-Antikörperkomplexen. Eine Quantifizierung der Durchblutung wird durch Mikroskopieeinsatz mittels eines Fluoreszenzfilters vorgenommen. Messparameter wie die funktionelle Kapillardichte, die mikrovaskuläre Permeabilität und das Verhalten der Leukozyten an der Gefäßwand können hiermit evaluiert werden.

Das **OPS-imaging** (orthogonal polarization spectral imaging), ein neuartiges intravitalmikroskopisches Verfahren, erlaubt ohne die Applikation von Fluoreszenzfarbstoffen eine Beurteilung der Mikrozirkulation von Gewebsstrukturen

(De Backer 2003). Aufgrund der verbesserten Bilddarstellung ist die Auswertung gegenüber der herkömmlichen Methode vereinfacht und daher weniger zeitintensiv. Bisher wurden allerdings nur Studien an ligamentären Strukturen durchgeführt (Biberthaler et al. 2003) und die Mikrozirkulation von Organen (Chung et al. 2003, Puhl et al. 2003, Thomale et al. 2002) untersucht. Vergleichende quantitative Untersuchungen konnten eine hohe Korrelation zwischen der Intravitalmikroskopie und dem OPS-imaging nachweisen (Biberthaler et al. 2001, Langer et al. 2002). Auf dem Gebiet der Frakturheilung sind Studien mit dem OPS-imaging bis zum gegenwärtigen Zeitpunkt noch nicht publiziert.

## Pathophysiologie des Weichteilschadens

### *Wundheilung - Immunologische Reaktion*

Schädigungen quergestreifter Muskelstrukturen mit einhergehender Ischämie nach banalen Verletzungen so wie auch nach Polytrauma besitzen eine erhebliche Inzidenz in der medizinischen Versorgung (Barlow und Willoughly 1992). In der operativen Medizin ist die Ischämie ein pathologisches Bild, das eine vitale Bedrohung darstellen kann (Menger und Messmer 1993). Vor allem der Aspekt der zügigen Wiederherstellung der Mikrozirkulation scheint ein deterministischer Faktor zur Vermeidung der Entstehung nekrotischer Areale in der Traumaumgebung zu sein (Mittlmeier et al. 2003).

Unabhängig von der Schwere des Traumas werden im wesentlichen zwei Ziele nach einem aufgetretenen Weichteilschaden vom Organismus verfolgt (Krettek 1998): Zur Vermeidung eines drohenden Blut-, Wasser-, und Wärmeverlustes kommt es zu einem schnellen Verschluss der Wunde und parallel dazu wird ein Schutz vor einer möglichen Infektion aufgebaut (Oestern und Tscherner 1983). Mit dem Eintritt der Gewebeschädigung und der häufig assoziierten Blutung reagiert der Organismus mit sofortiger Exsudation, Anhäufung von kapillarreichen Reparationsgeweben und der anschließenden Proliferation von Fibroblasten. Die vollständige aktive Exsudation beginnt mit einer starken Vasokonstriktion der Gefäße im Verletzungsgebiet. Nach

wenigen Minuten setzt durch die Freisetzung von Entzündungsmediatoren (Prostaglandine, Bradykinin, Histamin, Serotonin) eine Gefäßdilatation ein, die ihrerseits auf die Exsudatsabgabe fördernd wirkt. In der letzten Phase der Exsudation wirkt das freigesetzte Histamin vasokonstriktorisch auf kleine Venen. Bei der Infektabwehr und der ablaufenden Phagozytose kommt den Makrophagen eine Schlüsselrolle zu. Sie versehen die Wunde mit einem Debridement des verletzten Gewebes, bauen Makromoleküle zu Aminosäuren und Zucker ab -was zu einer Makrophagenakkumulation führt-, sorgen für eine Fibroblastenvermehrung und wirken sich des weiteren positiv auf die Angiogeneese aus (Oestern und Tscherne 1983, Thakral et al. 1979). Durch neutrophile Granulozyten wird der Schritt zur Erkennung und Beseitigung der Mikroorganismen eingeleitet. Humorale Mechanismen der Heilung von Weichteilgewebe bestehen in der Abgabe von mitogenen Substanzen aus Thrombozyten, die die Fibroblastenneubildung fördern und die Proteinsynthese stimulieren. Mittels Hydrolasen werden Gewebstrümmer zu löslichen und diffusen Gewebssubstanzen abgebaut. Die Freisetzung der mitogenen Substanzen Histamin und Prostaglandin führt zu einer Permeabilitätssteigerung der Kapillaren, die eine Flüssigkeitsverschiebung in das Wundgebiet zur Folge hat. Das hierbei hervorgerufene Ödem ist die Voraussetzung für eine Aktivierung adventitieller Zellen, für die Umwandlung von Fibroblasten in Fibrozyten und resultiert in einer Verminderung der Konzentration toxischer Substanzen (Krettek 1998, Lang 1987). In der Regel laufen die Regenerationsprozesse nach einem Weichteiltrauma als primäre Wundheilung ab. Der zeitliche Verlauf der Wundheilung lässt sich in eine exsudative (Tag 1), eine resorptive (1.-3. Tag), eine proliferative (3.-6. Tag) und eine regenerative Phase (7.-8. Tag) unterteilen. Die genannten Zeitfenster beziehen sich auf die Wundheilung humaner Gewebe. Für die Regeneration eines Weichteilschadens gibt Frayn (Frayn 1986) einen Zeitraum von 3 Wochen an, der sich jedoch je nach Art und Ausmaß des Weichteilschadens verlängern kann. Dagegen ist bei Nagetieren bereits nach 14 Tagen eine erfolgreiche Weichteilkonsolidierung festzustellen (Carlson und Faulkner 1983, Stoner 1986).

## *Mikrozirkulation nach Schädigung des Skelettmuskels*

Entscheidender Parameter für die Versorgung des Skelettmuskels mit Sauerstoff und Substraten ist die Perfusion der nutritiven Kapillaren. Eine Diskontinuität der kapillären Perfusion kann sich in Abhängigkeit von der Ischämiedauer von tendenzieller Minderversorgung bis hin zum Zelltod auswirken. Der während einer Ischämie hypoxiebedingte Verlust nutritiver Substrate (oder energiereicher Phosphate) führt aufgrund des eingeschränkten  $\text{Na}^+$ - $\text{K}^+$ -Transports zur Schwellung der Endothelzellen sowie zu intravaskulärer Hämokonzentration. Weitere pathologische Charakteristiken stellen sich nach Minderperfusion ein. Es kommt zur Extravasation von Makromolekülen aus Kapillaren und Venolen, die als Ausdruck einer gesteigerten mikrovaskulären Permeabilität anzusehen sind. Ferner kommt es zu einer Akkumulation von Leukozyten im postkapillären Bereich mit intermittierender Interaktion mit dem mikrovaskulären Endothel ("rolling") und Adhärenz („sticking“) (Menger et al. 1992, Mittlmeier et al. 2003, Nolte et al. 1991, Schaser et al. 1999, Vollmar et al. 1994, Zhang et al. 2003). Die Manifestation dieser beschriebenen Abläufe wird als Reflow-Paradoxon charakterisiert (Menger und Messmer 1993). Die Beeinträchtigung der verschiedenen Faktoren bedingt die Güte der kapillären Situation. In Abhängigkeit von der persistierenden Ischämieschwere ist neben dem Reflow-Paradoxon eine weitere Komponente des Ischämie/Reperfusionssyndroms zu beobachten. Das kapillare Perfusionsversagen, bezeichnet als no-reflow Phänomen, zeigt sich in der Thrombosierung von Mikrogefäßen, dem Verstopfen („plugging“) von Kapillaren mit Leukozyten, der Verschlechterung der Blutfluidität, der Schwellung der kapillären Endothelzellen sowie dem Anstieg des vasomotorischen Widerstandes in der postkapillären Ausstrombahn (Menger et al. 1992). Es verlängert die Dauer der Ischämie über den Zeitraum der postischämischen Reperfusion hinaus und bewirkt durch ein weiteres Absinken der Gewebe-pH, der energiereichen Phosphate und durch ein ansteigendes Sauerstoffdefizit einen Gewebeschaden (Menger et al. 1992, Rose et al. 1996). Ebenfalls nehmen die viskoelastischen Eigenschaften der Blutzellen durch die Hypoxie ausgelöste Azidose ab. Eine Obstruktion der Kapillaren erfolgt nahezu zwangsläufig (Menger und Messmer 1993, Yuan et al. 1995).

## *Klassifikation des Weichteilschadens*

Um wirksame therapeutische Maßnahmen bei einer auftretenden Weichteilschädigung in Kombination mit einer Fraktur einzuleiten, ist eine genaue Einschätzung der Traumaschwere eine wichtige Voraussetzung. Da jedoch die klinischen Verletzungsbilder von vielen Merkmalen und Kofaktoren abhängig sind, ist eine Einteilung nach Umfang und Schwere des Weichteilschadens schwer zu treffen. Zur Lösung der Beurteilungsproblematik etablierten sich zwei Klassifikationssysteme. In Abgrenzung zu der Klassifikation von Frakturen mit offenem Weichteilschaden nach Gustillo (Gustilo et al. 1976, Gustilo et al. 1984), haben sich die Klassifikationskriterien für Frakturen mit geschlossenem Weichteilschaden nach Oestern/Tscherne (Oestern und Tscherne 1983) national wie auch international durchgesetzt (Krettek 1998). Dabei umfasst die Klassifikation nach Oestern/Tscherne vier Stufen (G 0, G I – G III):

- Die Kennzeichnung G 0 steht für keine oder eine nur unbedeutende Weichteilverletzung und die aufgetretene Fraktur zeigt einfache Bruchformen, die durch indirekte Verletzungsmechanismen entstanden sind.
- Der Ausprägungsgrad G I bezeichnet oberflächliche Schürfung oder eine Kontusion durch Fragmentdruck von innen mit einfachen bis mittelschweren Bruchformen.
- Zu lokalisierende Haut- und Muskelkontusionen und tiefe, kontaminierende Schürfungen, die durch ein direktes Trauma hervorgerufen wurden, assoziiert mit einem drohenden Kompartmentsyndrom bei mittelschweren bis schweren Knochenbrüchen gehen in die G II-Klassifikation ein.
- Der Schweregrad G III beschreibt die schwerste Form eines Frakturereignisses mit einem geschlossenen Weichteilschaden. Beobachtet wird in diesem Fall eine ausgedehnte Hautkontusion, Hautquetschung oder Zerstörung der Muskulatur. Das Auftreten von einer Verletzung eines arteriellen Hauptgefäßes und ein manifestes Kompartmentsyndrom einhergehend mit schweren Bruchformen oder Knochenzertrümmerungen sind charakteristisch für eine G III-Verletzung.

Eine anerkannte Klassifikation für offene Frakturen mit Weichteilschaden lässt sich bei Gustilo (Gustilo und Andersen 1976) finden. Sie klassifizieren offene Frakturen in 3 verschiedene Schweregrade, wobei das Ausmaß der Hauptverletzung zugrunde gelegt wird. Grad I umfasst eine offene Fraktur mit einer 1 cm großen Wunde. Grad II

beurteilt eine offene Fraktur mit einer Hautverletzung, die größer als 1 cm ohne einen ausgedehnten Weichteilschaden aufzuweisen. Der Grad III umfasst eine offene Segmentfraktur sowie eine Fraktur mit Weichteilschaden oder eine traumatische Amputation. Neben Gustillo und Anderson existiert noch eine Klassifikation nach Oestern und Tscherno (Oestern und Tscherno 1983), die im Gegensatz zu Gustillo und Anderson eine detaillierte Beschreibung aufweist und sich an der Einteilung des geschlossenen Weichteilschadens orientiert, wohingegen die Einteilung von Allgöwer (Allgöwer 1971) nicht mehr angewendet wird.

## Ziele der Arbeit

Die übergeordnete Fragestellung dieser Arbeit ist, den Einfluss einer Schädigung des Weichteilgewebes auf den Heilungsverlauf nach einer Fraktur zu evaluieren. Hierzu sollen quantitative Auswertemethoden eingesetzt werden, welche eine Beurteilung der mechanischen Kompetenz und der Vaskularität des heilenden Knochens erlauben. Die im Zuge der Reparationsvorgänge einsetzende Gefäßneubildung und -wiederherstellung soll mittels einer neu entwickelten Methode evaluiert werden. Im Einzelnen sollen folgende Fragen beantwortet werden:

a.

Welchen Einfluss hat ein zusätzlicher Weichteilschaden auf die mechanischen Eigenschaften des heilenden Knochens?

Hat eine eventuelle systemische Wirkung des zusätzlichen Weichteilschadens Auswirkungen auf die nicht frakturierten Tibien der kontralateralen Seite?

b.

Welchen Einfluss hat ein isolierter Weichteilschaden auf die Durchblutungssituation des intakten Knochens?

Wie sind die Blutflussveränderungen im Knochen und im Weichteilgewebe nach einem Kombinationstrauma von Fraktur mit zusätzlichem Weichteilschaden charakterisiert?

c. Eine Methode zur Quantifizierung der Angiogenese im Heilungsverlauf soll mit dem Einsatz eines hochauflösenden Computertomographen entwickelt und etabliert werden.

## Kapitel 2: Material und Methoden

Alle vorgenommenen Operationen wurden am Tierforschungszentrum (TFZ) der Universität Ulm durchgeführt. Die Kommission zur Genehmigung von Tierversuchen des Regierungspräsidiums Tübingen genehmigte die Durchführung der Studie aufgrund des Tierversuchsantrags Nummer 707 vom 17.10.2001.

Als Versuchstiere wurden männliche WISTAR Ratten mit einem Körpergewicht zwischen 365 und 400g (Mittelwert: 375g) verwendet. Bezogen wurden die Tiere der Frakturgruppe von der Zuchtstation „Charles River Deutschland“ (Sulzbach, Deutschland), die Tiere der Weichteilschadengruppe und der Gruppe Fraktur und Weichteilschaden von der Harlan Winkelmann GmbH (Borchen, Deutschland). Alle WISTAR Ratten wiesen beim Eintreffen im Tierforschungszentrum ein Lebensalter von 77 Tagen auf und waren von gleicher genetischer Herkunft. Nach einer Standzeit von 7 Tagen im Tierforschungszentrum der Universität Ulm wurden die Operationen vorgenommen.

Die verwendete Tieranzahl für den jeweiligen Studienarm basiert auf einem Gutachten des Instituts für Biometrie und medizinische Statistik der Universität Ulm (Prof. Gaus), in dem die Gesamtanzahl der verwendeten Tiere als sinnvoll geplant und zur Durchführung empfohlen wurde.

### Studiendesign

67 WISTAR Ratten wurden randomisiert in 3 Versuchsgruppen eingeteilt. 3 Tiere der Frakturgruppe und 5 Tiere der Gruppe Fraktur mit Weichteilschaden verstarben im postoperativen Zeitraum. 7 Tiere wurden durch nachfolgende Operationen ersetzt. Ein Tier in der Frakturgruppe konnte aus tierschutzrechtlichen Gründen nicht nachoperiert werden, da die Tierzahl limitiert war. Zur Beurteilung der Frakturheilung wurden drei Auswerteverfahren eingesetzt. Zu definierten Untersuchungszeitpunkten (1, 3, 7, 14, 28 Tagen nach Fraktur) wurden die Blutflussveränderungen mit der

Laser Doppler Flowmetrie (LDF) gemessen, die Angiogenenese mit Hilfe der Mikroangiographie bestimmt und die strukturellen mechanischen Eigenschaften des Knochens durch die biomechanische Testung ermittelt (Abb. 5).

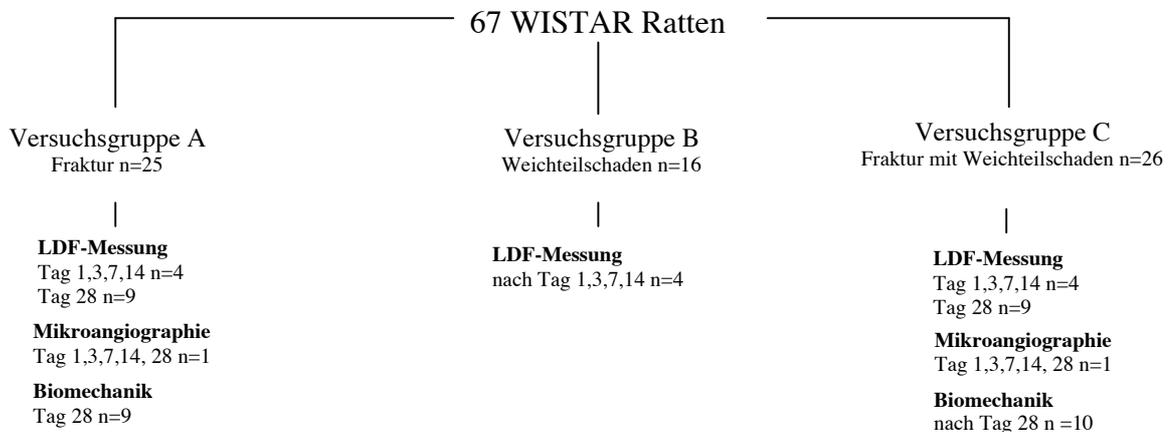


Abbildung 5: Darstellung des Studiendesigns mit Versuchsgruppenzuordnung und Auswertungsverfahren. Anzahl der auswertbaren Versuchstiere ist als „n=x“ beschrieben und Untersuchungszeitpunkte als „nach Tag x“ definiert.

## Operationsablauf

### *Anästhesie und Operationsvorbereitung*

Während des gesamten Operationsablaufs war auf Ruhe in der Umgebung der Ratten zu achten. Nachdem das Tier in seinen Käfig in den Operationssaal gebracht worden war, wurde das Körpergewicht ermittelt, um die Dosierung für die Allgemeinanästhesie festzulegen.

Zur Reduktion der zu erwartenden Hypersalivation und der vegetativen Reaktionen während der Narkose erfolgte zunächst eine Prämedikation subcutan mit Atropin (0,05 mg/kg Körpergewicht) (Atropinsulfat 0,5 mg, Braun AG, Melsungen). Nach einer Einwirkdauer von 10 Minuten wurde die Allgemeinnarkose durch eine intraperitoneale Injektion von Ketamin (Ketanest, 75 mg/ kg Körpergewicht, Wirtschaftsgenossenschaft Deutscher Tierärzte WDT, Garbsen) und Xylazin (Rompun, 12 mg/kg Körpergewicht, Bayer AG, Leverkusen) durchgeführt. Um ein

Austrocknen der Augen zu verhindern (narkotisierte Ratten zeigen keinen Lidreflex), fand eine Bepinselung mit einem Augengel statt (Vidisic, Dr. Mann Pharma, Berlin). Nach Sicherstellung einer ausreichenden Narkosetiefe wurde das jeweils rechte Bein der Ratte bis zur Hüfte rasiert und die Haut anschließend mit Kodan-Spray desinfiziert.

## *Frakturmodell*

Als Frakturmodell diente eine geschlossene Tibiaschaftfraktur, lokalisiert im mittleren Abschnitt der Diaphyse ca. 3 cm distal des Tibiaplateaus an der Ratte (Abb. 6). Diese gewählte Frakturlokalität konnte mit dem vorliegenden Frakturapparat sehr gut reproduziert werden und gewährleistete somit kontrolliert standardisierte Versuchsbedingungen. Die Frakturversorgung erfolgte durch eine Marknagelung zweier nacheinander applizierter Kirschner-Drähte (Mizuho Medical Co., Tokyo, Japan) ohne dabei den Markraum durch Aufbohrung zusätzlich zu beschädigen. Der erste Draht (ca. 4 cm Länge) wurde medial des Tibiaplateaus in den Markraum bis zum Beginn der Epiphyse eingebracht. Zur weiteren Stabilisierung gegenüber möglichen Rotationsmomenten wurde der Frakturspalt mit einem zweiten kürzeren Kirschner-Draht (ca. 3 cm) versorgt. Diese Applikation erfolgte ca. 2-3 mm lateral des ersten Eintrittspunktes und der Draht wurde bis kurz hinter die Frakturlinie den ersten Draht hinterkreuzend eingeführt. Die Fibulafraktur wurden nicht stabilisiert.



Abbildung 6: Röntgenbild der zweifachen Marknagelversorgung einer osteotomierten Rattentibia (post operativ)

Das Verfahren der intramedullären Nagelung kam zur Anwendung, da es sich um ein klinisch etabliertes und sehr häufig benutztes Verfahren zur Frakturstabilisierung langer Röhrenknochen handelt (Krettek 2001). Im Rahmen der Frakturheilung wurde die Ratte als Kleintiermodell erfolgreich angewendet (Grundnes und Reikeras 1992, Utvag et al. 1998, Utvag et al. 2003).

## *Operatives Vorgehen: Fraktur, Weichteilschaden, Fraktur und Weichteilschaden*

### **Versuchsgruppe A: geschlossene Tibiaschaftfraktur**

Der Operateur vergewisserte sich vor dem Operationsbeginn durch Beobachtung der Herzfrequenz (Herzschlag/Min.) und des mittlerer arteriellen Blutdrucks (zeitlicher Mittelwert der Drücke am jeweiligen Messort im Arteriensystem [mm Hg]; Oxymeter, Nellcor, USA) einer ausreichenden Narkosetiefe.

Eine geschlossene Tibiaschaftfraktur wurde mittels einem institutseigenen nach Bonnarens (Bonnarens und Einhorn 1984) modifizierten Guillotine-Verfahren für das Kleintiermodell an der Ratte appliziert (Abb. 7).

Dazu wurde das rasierte rechte Bein zwischen Amboss und Stempel positioniert. Ein durch zwei Stahlstifte gesicherter fixer Freiraum von 3,5 mm zwischen beiden Auflageflächen verhinderte eine komplette Durchtrennung der unteren Extremität. Um eine komplikationslose Frakturversorgung zu gewährleisten, wurde vor der Fraktur über eine Hautinzision an der Tuberositas Tibiae ein Kirschner-Draht in den Markkanal eingebracht. Zum Zeitpunkt der Fraktur wurde der zuvor in den Markraum eingebrachte Kirschner-Draht bis zum im Tibiakopf zurückgezogen, so dass die Fraktur ohne Einfluss des Kirschnerdrahtes gesetzt werden konnte. Die Ratte wurde so gelagert, dass der laterale Teil des Beines auf zwei schmalen Ambossen auflag und die mediale Tibiaseite in Richtung des auftreffenden, spitz zulaufenden Stempels zeigte. Zuvor wurde die Frakturhöhe mit einem wasserfesten sterilen Markierungsstift 25 mm proximal des gut tastbaren Malleolus medialis im Bereich der Tibiavorderkante bestimmt. Damit konnte eine hohe Reproduzierbarkeit der

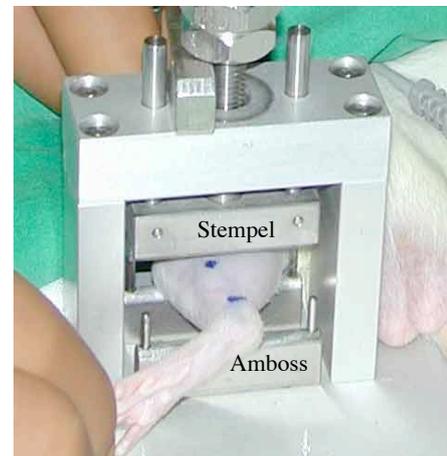


Abbildung 7: Verfahren zur Osteomie des rechten Rattenbeines

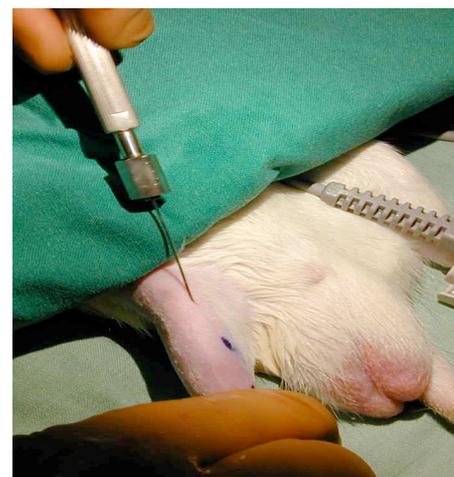


Abbildung. 8: Frakturkonsolidierung mit einem Kirschner-Draht

Tibiavorderkante bestimmt. Damit konnte eine hohe Reproduzierbarkeit der

Frakturlokalisierung erreicht werden. Die Fraktur wurde nach dem Prinzip der Drei-Punkt-Biegung mit einem definierten Gewicht ( $m = 650 \text{ g}$ ) und einer definierten Fallhöhe ( $h = 13 \text{ cm}$ ) durch einen Kraftstoß mit einer Aufprallgeschwindigkeit von  $1,6 \text{ m/s}$  erzeugt. Die einwirkende Kraft übertrug sich direkt auf die Tibia und generierte die Fraktur, ohne ein wesentliches zusätzliches Weichteiltrauma im angrenzenden Gewebe der medialen Seite zu erzeugen. Auf der lateralen Seite wurde auf Höhe der zwei Ambosse nur bei einem Versuchstier ein minimaler Weichteilschaden festgestellt. Gleichzeitig kam es immer zu einer Fraktur der distalen Fibula.

Anschließend wurde eine intramedulläre Stabilisierung mittels des Kürschner-Drahts vorgenommen, der durch die Vorimplantation vor dem Frakturereignis vorbereitet war (Abb. 8). Auf ein zusätzliches Aufbohren des medullären Kanals wurde verzichtet. Da die Rattenkollektive in den Vorversuchen zu einem sehr frühen postoperativen Zeitpunkt Bewegungsaktivität zeigten und somit das operierte Bein frühzeitig belasteten, wurde ein weiterer Kirschner-Draht eingebracht, um eine Rotationsstabilität zu gewährleisten. Die Lage des Drahts wurde im Abschnitt Frakturmodell bereits beschrieben. Die ebenfalls frakturierte Fibula blieb unversorgt. Anschließend wurde die Wunde der Hautinzision mit einem nicht resorbierenden Nahtmaterial (4/0 Monocryl, Fa. Ethicon, Hamburg) geschlossen. Postoperativ wurden den Versuchstieren subkutan das Analgetikum Tramal ( $1,5 \text{ mg/kg}$ , Grünenthal, Aachen) verabreicht, das in der applizierten Dosis eine Schmerzlinderung in den ersten 24 Stunden postoperativ bewirkt.

Zur Überprüfung der intramedullären Frakturstabilisierung wurde nach Abschluss eine konventionelle radiologische Untersuchung als Projektaufnahme durchgeführt (Faxitron, 43805NX-Raysystem, Hewlett-Packard, USA).

Es wurde davon abgesehen, etwaigen Infektionen im postoperativen Zeitraum mit Gabe von Antibiotikum entgegenzuwirken, da sich bei keiner Ratte Wundheilungsstörungen beobachten ließen.

### **Versuchsgruppe B: geschlossener Weichteilschaden**

Die Narkoseeinleitung, das verwendete Guillotine-Verfahren und die Lagerung des Hinterlaufes entsprachen dem der Frakturgruppe. Gegenüber dem Frakturverfahren wurde der Weichteilschaden mit zwei planen Stempeloberflächen (Amboss und Fallgewicht) erzeugt. Sie gewährleisteten, dass durch den stumpfen Impuls die knöchernen Strukturen des Hinterlaufes unversehrt blieben und nur das umgebende

Weichteilgewebe verletzt wurden. Mittels der planen Stempelgeometrie von 4 cm Breite und 1 cm Länge ließ sich eine Fläche von 4 cm<sup>2</sup> des Weichteilmantels traumatisieren. Dabei wurde die freigesetzte Energie über die Gegendruckplatte (Amboss) auf das Weichteilgewebe übertragen. Um eine umfassende Traumatisierung zu erreichen, wurde die Krafteinleitung zweimal durchgeführt. Einmal von medial nach lateral und ein zweites Mal von lateral nach medial, so dass die antero-laterale wie auch die mediale Seite des rechten Unterschenkels einer Kontusion unterlagen (Abb. 9). Auf einen gesicherten fixen Freiraum wurde hierbei verzichtet. Im Gegensatz zum Betrag des Kraftstoßes von 1,6 m/s im Studienarm A, wirkte auf das Weichteilgewebe eine Aufprallgeschwindigkeit von 5,94 m/s (Fallgewicht: 170 g; Fallhöhe: 180 cm) ein. Der generierte Weichteilschaden wurde der klinisch üblichen Klassifikation nach Oestern und Tscherner (Oestern und Tscherner 1983) zugeordnet und als Grad II definiert. Postoperativ wurde von einer Schmerzmedikation mit Tramal abgesehen.

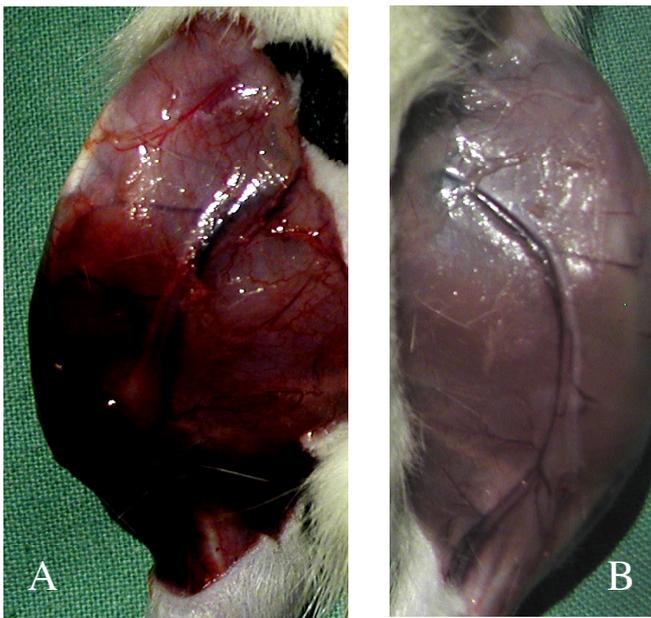


Abbildung 9:

Darstellung eines Weichteilschadens aus medialer Ansicht unmittelbar nach dem Trauma (A; rechtes Bein). Im Vergleich unversehrtes Weichteilgewebe des kontralateralen Beins (B).

### **Versuchsgruppe C: geschlossene Fraktur mit geschlossenem Weichteilschaden**

Für die Versuchsgruppe C wurde das Studiendesign der Gruppen A und B zusammengefasst. Hierbei wurden zuerst das Weichteiltrauma und nachfolgend die Fraktur gesetzt. Beide Traumen wurden im Bereich des M. gastrocnemius und der rechten Tibiadiaphyse innerhalb von 60 Sekunden nacheinander appliziert.

## Postoperatives Vorgehen

### *Haltung und Pflege*

Unmittelbar nach der Operation wurden die Ratten in Einzelkäfigen untergebracht. Nach Wiederherstellung der Mobilität und Schmerzfreiheit, qualitativ ermittelt durch die Kontrolle des Ess- und Bewegungsverhaltens, wurden die operierten Tiere zu dritt oder zu viert in Makrolon Typ IV Käfigen bis zu ihren Tötungszeitpunkten gehalten. Die Grundfläche eines jeweiligen Käfigs betrug 35\*30cm und wies eine Deckenhöhe von 20 cm auf. Über den ganzen Haltszeitraum herrschte eine konstante Umgebungstemperatur von 21 +/-1,5°C bei einer relativen Luftfeuchtigkeit von 55 +/-10%. Als Futtermittel erhielten die Ratten Altromin 1314 Forti (Fa. Altromin, Lage) und Wasser ad libitum mit einem pH-Wert von 2,5-3. Der saure pH-Wert verhinderte eine Keimbesiedlung des Trinkwassers. Die tägliche Überprüfung der allgemeinen Gesundheit und der applizierten Frakturstabilisierung bzgl. möglicher Komplikationen wurde von den Untersuchern durchgeführt. Eine qualitative Bewertung des Bewegungsablaufs als Gütemaß für die Belastung der frakturierten Extremität wurde ebenfalls vorgenommen.

### *Versuchsabschluss*

Zu den jeweils definierten Beobachtungszeiträumen (1., 3., 7., 14., 28. Tag postoperativ) wurden die Tiere in Narkose getötet. Dazu wurde eine ausreichende Narkosetiefe zur Sicherstellung des bereits erwähnten analgo-sedativen Zustandes mit Ketanest/Xylazin hergestellt. Wie bei den durchgeführten Operationen erfolgte hierbei die Injektion subkutan.

Das Tötungsverfahren für die Gruppen der Biomechaniktestung und der Laser Doppler Flowmetrie Untersuchung erfolgte durch eine Laparatomie mit anschließender Durchtrennung der Aorta abdominalis oder durch eine Überdosis Ketanest, die ins Herz injiziert wurde. Dagegen fanden die Gruppentiere der mikroangiographischen Gefäßdarstellung während der Micropaque-Infusion den Tod.

## Auswertungsmethoden

### *Laser Doppler Flowmetrie*

#### **Physiologische Grundlagen**

Bei der Laser Doppler Flowmetrie handelt es sich um ein nicht invasives Diagnoseverfahren, das die Durchblutungssituation in organischen Gewebestrukturen evaluieren kann. Dem Faktor „Blutfluss“ liegen grundsätzlich zwei Faktoren zugrunde: die Fließgeschwindigkeit des Blutes und das Blutvolumen. Das Produkt beider Größen entspricht dem Wert des Blutflusses. Beeinflusst wird der Blutfluss neben dem systemischen Faktor des Herzzeitvolumens vor allem von der Gefäßgeometrie als direkte Determinante. In dieser Betrachtung nimmt der Strömungswiderstand R eine wichtige Rolle ein und ist nach dem Hagen-Poiseuille-Gesetz wie folgt definiert<sup>1</sup>:

$$R = 8 \cdot \eta \cdot l / \pi \cdot r^4$$

Aus dieser Gesetzmäßigkeit folgt, dass der Volumenstrom hauptsächlich von der Gefäßgeometrie abhängt. Bereits kleine Änderungen des Gefäßradius wirken sich entscheidend auf den Volumenstrom aus, ändert sich doch der Fließwiderstand mit der 4. Potenz des Gefäßradius. Das bedeutet, dass bei einer Verdopplung des Gefäßdurchmessers der Volumenstrom um den Faktor 16 ansteigt.

Unter physiologischen Bedingungen liegt in der Regel in fast allen Gefäßabschnitten eine laminare Strömung vor. Charakteristisch für diese Art des Blutflusses ist der zentrale Erythrozytenstrom. Er weist eine laminare Verlaufsform im Inneren des Gefäßes auf, während an den wandnahen Bereichen das Plasma turbulent fortbewegt wird.

---

<sup>1</sup> R = Strömungswiderstand

$\eta$  = Viskosität des Blutes

l = Länge des Gefäßes

r = Radius des Gefäßinnenraums

### **Biophysikalische Grundlagen**

Generell wird unter dem Doppler Effekt, benannt nach dem Physiker Christian Doppler (1803-1853), die Frequenzänderung einer Welle bei einer relativen Bewegung von Sender und/oder Empfänger zu einem Beobachter verstanden.

Das Verfahren der Laser Doppler Flowmetrie macht sich den Effekt zueigen, das Licht, welches an bewegten Teilchen gestreut wird, von einem ruhenden Beobachter Frequenz verschoben wahrgenommen wird. Dabei ist die auftretende Frequenzverschiebung proportional zur mittleren Geschwindigkeit der sich bewegenden Teilchen.

Mit dem in dieser Studie verwendeten LDF-Verfahren (Optoflow, LEA Medizintechnik AG, Gießen, Deutschland) wurde die Laseremission (Diodenlaser der Schutzklasse 3A, 30 mV Laserleistung; 820 nm Wellenlänge) mit kontinuierlicher Impulsdauer in das Gewebe emittiert. Als für die Frequenzverschiebung sorgende Streuer dienen die roten Blutkörperchen, die Erythrozyten. Zur Ermittlung der auftretenden Frequenzverschiebungen wird die „heterodyne Lichtschwebungstechnik“ angewendet. In diesem Verfahren wird das reflektierte, nicht Frequenz verschobene Licht mit dem reflektierten, Frequenz verschobenen Licht überlagert. Die dabei entstehenden Schwebungsfrequenzen werden Frequenz analysiert.

### **Durchführung der Laser Doppler Flowmetrie**

Um ein ganzheitliches Bild der Durchblutungssituation nach einer Fraktur zu erhalten, wurde mittels der Laser Doppler Flowmetrie im Frakturspalt, auf der medialen Tibiaseite im intakten Knochen proximal und distal der Frakturregion der Blutfluss gemessen. Auf der lateralen Seite wurde das Blutflussgeschehen im Weichteilgewebe bestimmt. Die Messpunkte der medialen Tibiaseite lagen 1 cm distal und proximal von der Frakturlinie entfernt, so dass keine Signalartefakte aus den revaskularisierten Gebieten der Kallusregion in die jeweilige Messung mit einfließen konnten. Der Messpunkt auf der lateralen Seite lag auf der Höhe des Frakturspalts (Abb. 10).

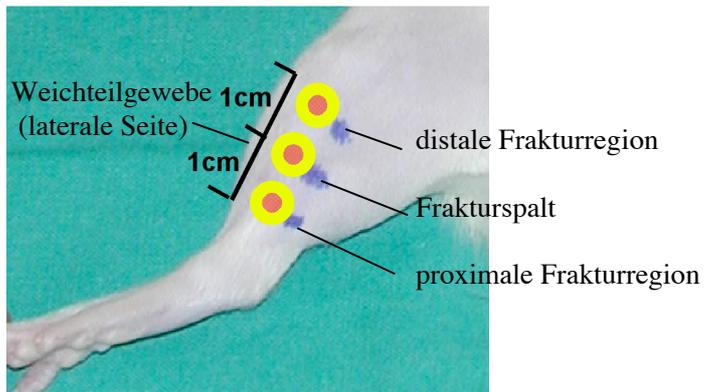


Abbildung 10:

Lokalisation der LDF-Messung am Rattenhinterlauf. Die roten Punkte zeigen die genauen Messpunkte

Zur Messung der medialen Messlokalisationen wurde die Ratte seitlich gelagert, so dass das rechte Bein flach auf dem Operationstisch gelegt werden konnte. Dadurch konnte gewährleistet werden, dass die markierten Messpunkte auf der Haut faktisch nicht verschoben wurden. Der laterale Messpunkt setzte eine seitliche Lagerung der kontralateralen Körperhälfte voraus. Hierbei war der Muskelbauch des *M. gastrocnemius* als Messlokalität definiert. Um die Messpunkte wieder zu finden, wurden diese mit einem blauen nichtlöslichen Stift markiert.

Mit der eigens für diese Studie entwickelten Messkopfhalterung mit einer eingebrachten Feder im Inneren der Halterung konnte eine hohe intraindividuelle Reproduzierbarkeit (<12%) erzielt werden. Grund hierfür war eine geringe Interfacebewegung zwischen dem Messkopf und der Haut und ein standardisierter Anpressdruck auf der Gewebeoberfläche. Ferner musste der Sensorkopf möglichst in einem 90° Winkel zur Messoberfläche aufgesetzt werden, da ein Verkanten des Sensorkopfes auf der Hautoberfläche in den Vorstudien zu Messartefakten geführt hatte.

Das verwendete Messsystem besitzt fünf Kanäle (ein Sendekanal, vier Empfangskanäle), mit denen die Durchblutungssituation des interessierenden Gewebeabschnittes detektiert werden konnte. Der Durchmesser des Messkopfes betrug 4 mm. Um die Durchblutungssituation den unterschiedlichen Gewebetiefen zuordnen zu können, wurde in einer Vorstudie unter *in situ* Bedingungen die Frage nach der Penetrationstiefe für jeden einzelnen Kanal eruiert. Die Ergebnisse zeigten für die Messpunkte direkt am Knochen eine Eindringtiefe von maximal 2 mm. Im Bereich des Weichteilgewebes beschränkte sich die Auswertung auf den Kanal 1 und den Kanal 4, da in den Kanälen 2 und 3 keine signifikanten Blutflussunterschiede zu Kanal 1 festgestellt werden konnten. Mit dem Kanal 1

konnten Blutflussveränderungen im Weichteilgewebe bis zu einer Gewebstiefe von 2 mm gemessen werden. Der Kanal 4 detektierte eine veränderte Blutflusssituation bis zu 6 mm Gewebetiefe (Abb. 11).

Die Dauer einer LDF-Messung betrug 20 Sekunden. Die Messwerte der 5. bis 15. Sekunde gingen in die Ergebniserhebung ein, bei der das arithmetische Mittel der 10 Sekunden-Sequenz als resultierender Wert in die Auswertung einfluss. Alle Messdaten werden als %-Blutflussveränderungen dargestellt. Sie sind auf das präoperative Messergebnis bezogen. Zum Tötungszeitpunkt 28. Tag wurden 19 Ratten, zu den übrigen Zeitpunkten jeweils vier Tiere mittels LDF untersucht.

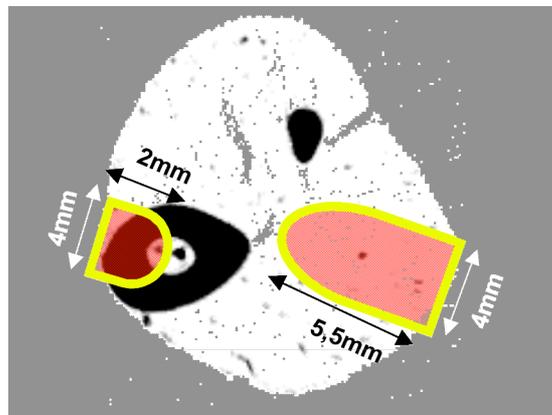


Abbildung 11:

Darstellung der max. Penetrationstiefe der Laseremission in Abhängigkeit vom Gewebetypus (6 mm im Weichteilgewebe; 2 mm im tibialen Knochen). Die Darstellung wird durch eine computertomographischen Schnittbildaufnahme auf Frakturhöhe illustriert. Links ist die Tibia und oben mittig die Fibula zu erkennen, weiß unterleert ist das Weichteilgewebe des Hinterlaufes.

## *Mikroangiographische Gefäßdarstellung und -volumenquantifizierung*

Ergänzend zu den *in vivo* Durchblutungsmessungen sollte ein neues Verfahren zur Quantifizierung von Gefäßvolumina entwickelt werden. Dieses Verfahren sollte die Möglichkeit offerieren, ein quantitatives Gütemaß für die Wiederherstellung der Mikrozirkulation und die Angiogeneese nach einer Fraktur in Kombination mit einem Weichteilschaden zu bestimmen. Dazu wurde aus jeder Gruppe eine Wistar Ratte zum jeweiligen definierten Tötungszeitraum untersucht.

### Operatives Vorgehen und Makroradiographie

Nach der Sicherstellung eines analgo-sedativen Narkosezustandes mit Ketanest/ Xylazin (siehe „Anästhesie und Operationsvorbereitung“) erfolgte durch eine mediane Laparotomie der Zugang zur Aorta abdominalis. Nach Punktierung der Aorta abdominalis wurde ein humaner Gefäßkatheter ( $\varnothing=0,7$  mm) in den infrarenalen Abschnitt der Aorta abdominalis implantiert (nicht-selektive Methode). Anschließend wurde eine systemische Heparinisierung (100 I.E. Liquiem N 5000, Hoffmann–La Roche AG, Grenzach-Wyhlen) durchgeführt. In einem zweizeitigen Vorgehen wurden zunächst 50 ml einer 30%igen Barium-Sulfat/Natriumchlorid 0,9% Lösung, danach 50ml einer 30%igen Barium-Sulfat/4%igen Formalin Lösung (Fa. Guerbet, Sulzbach) über eine Perfusionspumpe (Fließgeschwindigkeit 99,9 ml/h; Perfuser segura FT, Braun AG, Melsungen) eingeleitet. Das Infundieren der zweiten Lösung wurde bis zu den einsetzenden Faszikulationen der Muskulatur der unteren Extremität aufrechterhalten. Mit dem Eintritt der Muskelzuckungen wurde die A. abdominalis mit einem resorbierbaren Nahtmaterial (3/0 Vikryl, Fa. Ethicon, Hamburg, Deutschland) nach distal ligiert und nach proximal geöffnet. Zur Überprüfung der erfolgreichen Gabe der Mikropaque-Lösung wurde von jedem Tier eine Makroradiographie in Form einer konventionellen radiologischen Untersuchung als Projektionsaufnahme (Abb.12) durchgeführt (Spannung 25 kV, Stromstärke 3 mA, Belichtungszeit 5 Min). Der betreffende Hinterlauf wurde nach der Exartikulation oberhalb des Tibiakopfplateaus und am oberen Sprunggelenk entnommen und in einen Behälter mit abgepuffertem, neutralen 4%igen Formalin<sup>2</sup> (Fa. Merck, Darmstadt) überführt. Von der in Vorversuchen ebenfalls angewandten selektiven Angiographie mit einem Zugang über die Aorta femoralis dextra wurde abgesehen, da sich keine qualitativen Unterschiede zwischen dem selektiven und nicht-selektiven Verfahren fanden und die Implantation der Gefäßkatheter deutlich schwieriger durchführbar war.



Abbildung. 12:  
Röntgenbild eines frakturierten Hinterlaufs nach Mikropaque Injektion

<sup>2</sup> Chemische Zusammensetzung der Formalin-Lösung (pH 7,0 - 7,4):  
Formalin-Stammlösung (säurefrei, ca. 37%)  
Natrium-Dihydrogen-Phosphat ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ )  
Di-Natrium-Hydrogen-Phosphat ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , wasserfrei)

### **Mikrocomputertomographie (µCT)**

Für die Untersuchungen zur mikroradiographischen Fragestellung wurden die entnommenen und in Formalin fixierten Beine in Polymethylmethacrylat (Technovit 3040, Fa. Kulzer, Wehrheim) mit dem distalen Tibiaende eingebettet (Einbettungshöhe ca. 0,5 cm). Um ein Verrutschen des Präparates und Eigenbewegungen in der medio-lateralen und anterior-posterioren Projektionsebene während der Aufnahme auszuschließen, wurde das Präparat in einer Haltevorrichtung fixiert (Abb. 13). Als bildgebendes Instrumentarium für die µCT-Analyse der Rattenunterschenkel stand ein Fan Beam µ-SCOPE (Fa. Stratec Medizintechnik, Pforzheim) mit dem dazugehörigen Softwarepaket zur Verfügung. Alle Biopsien wurden mit einer räumlichen Auflösung von 50 µm für alle Ebenen (z-, x-, y-Achse) gescannt. Vom Kallusgebiet der Frakturgruppe wurden 400 Schichtbildaufnahmen, von den Gruppen Weichteilschaden, Fraktur und Weichteilschaden jeweils 500 Schichtbildaufnahmen erstellt.

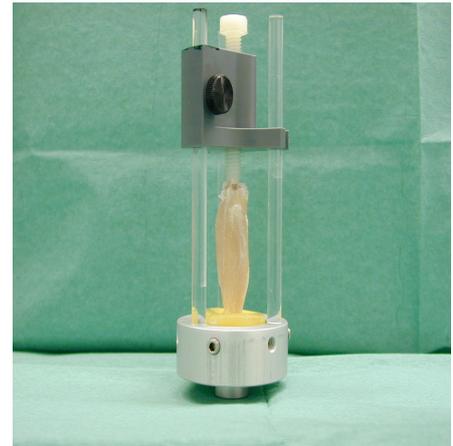


Abbildung 13: Haltevorrichtung der Rattentibia für die µCT Untersuchung

### **Visualisierung der Gefäßanatomie**

Zur Visualisierung wurden alle Schichtaufnahmen als Packet in eine Visualisierungssoftware (Amira 2.3, Indeed-Visual Concepts GmbH, Berlin) eingespeist. Mittels der Software war es möglich, aus den durch die Schichtaufnahme gewonnenen Datensätzen automatisch eine dreidimensionale Rekonstruktion der Gefäßstruktur des jeweiligen Präparates herzustellen. Dabei wurde ein Grauwertfilter von 60 gewählt, der subjektiv die beste räumliche Auflösung der Gefäße und der kalzifizierten Strukturen erkennen ließ.

### **Quantifizierung der Gefäßvolumina**

Die Volumenquantifizierung wurde ebenfalls mittels Aufnahmen der Mikrocomputertomographie durchgeführt. Die Schnittbildaufnahme wurde mit einer kommerziellen Software VGStudiomax (Volume Graphics, Heidelberg, Germany) bearbeitet. Semiautomatisch wurden die kalzifizierten Strukturen wie Tibia, Fibula

und Frakturkallus durch manuelle Segmentation ausgeschnitten. Danach wurden die verbliebenen Grauschattierungen im CT-Bild als Artefakt oder als Zeichen für die Existenz von Weichteilgewebe definiert. Diese wurden mittels eines Grauwertfilters von 100 aus der Darstellung eliminiert. Die Höhe des Grauwertfilters wurde nach der Differenzierbarkeit zwischen den im CT-Bild enthaltenen Strukturen definiert. Dabei wurden alle Pixel mit einem Grauwert größer als 100 den mit der Mikropaque-Lösung gefüllten Gefäßen zugerechnet. Alle Pixel mit einem Grauwert kleiner als 100 wurden als Weichteilgewebe, nicht-kalzifiziertes Material und Aufnahmeartefakte (Hintergrundrauschen, Rand des Probenhalters) klassifiziert. Nach dieser zusätzlichen Segmentation mittels Grauwertverfahren wurden die verbliebenen Strukturen als Gefäßstruktur angenommen und mittels der Berechnungssoftware deren Volumen kalkuliert (Abb. 14). Um die interindividuelle Vergleichbarkeit der Ergebnisse valide evaluieren zu können, wurde bei jedem Versuchstier das Gefäßvolumen des geheilten Beines auf das des intakten Beines prozentual normiert. Anschließend wurden die prozentualen Veränderungen in der Frakturgruppe mit den Ergebnissen der Frakturgruppe mit Weichteilschaden verglichen.

Die Reliabilität dieser Vorgehensweise wurde mit drei Messvorgängen an jedem Präparat überprüft. Hierbei konnte kein signifikanter Unterschied zwischen den Ergebnissen der einzelnen Volumenberechnungen nachgewiesen werden.

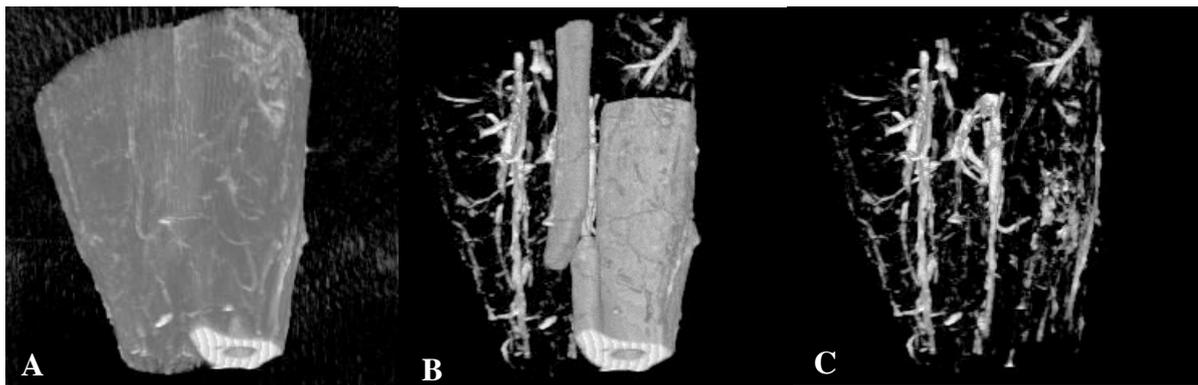


Abbildung 14: Methodische Vorgehensweise bei der Volumenquantifizierung: Darstellung des gesamten Präparats nach CT-Aufnahme (A), nach Elimination des Weichteilgewebes und Artefakte (B), Ergebnisbild nach Segmentation ossärer Strukturen (C)

## Biomechanik

### Präparation und Testdurchführung

Mittels der 3-Punkt-Biegeprüfung wurden die geheilten und die kontralateralen intakten Tibien der WISTAR Ratten der Gruppe Fraktur (n=9) und der Gruppe Fraktur mit Weichteilschaden (n=10) nach dem 28. postoperativen Tag getestet. Als Ausdruck der mechanischen Kompetenz des Knochens wurde die Festigkeit, definiert als Bruchkraft, und die Biegesteifigkeit bestimmt (Abb.15).

Die Präparation der zu testenden Unterschenkel beinhaltete zunächst die Ablösung des umliegenden Weichteilgewebes, die Entfernung der Fibula und des Kirschner-Nagels. Es musste dabei mit äußerster Sorgfalt gearbeitet werden, um bei den Präparaten den Kallus unversehrt zu belassen. Bei der Behandlung der Präparate wurde vor allem im Vorfeld der biomechanischen Testung darauf Wert gelegt das Knochenmaterial feucht zu halten, um eine Austrocknung und damit eine erhöhte Sprödigkeit des Knochens zu

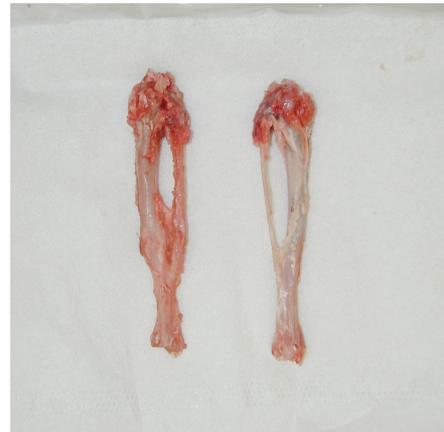


Abbildung 15: Tibiapräparate; frakturiertes (li.) und gesundes Bein (re.) vor Entfernung der Fibula

verhindern. Da im Zuge der Drei-Punkt Biegetestung eine komplette Zerstörung der Frakturzone nicht auszuschließen war, wurde von allen Tibien vor der biomechanischen Testung eine zusätzliche Aufnahme im Mikrocomputertomographen ( $\mu$ CT) angefertigt. Im Vordergrund dieser Schnittaufnahmen stand die Betrachtung struktureller Einzelheiten des Frakturspalts mit den Gewebearealen im Abstand von 0,5 cm distal und proximal der Frakturlinie. Die Auflösung betrug 50  $\mu$ m. Die Präparatvorbereitung endete mit der Einbettung des proximalen Endes in einer mit Polymethylmethacrylat (Technovit 3040, Fa. Kulzer, Wehrheim) gefüllten Einmalküvette.

Die Drei-Punkt Biegung wurde mit der Materialprüfmaschine der Fa. Zwick (Typ 1445, Ulm) durchgeführt und die erhobenen Daten mit dem zugehörigen Materialprüfprogramm für Zug-, Druck- und Biegeprüfungen (Fa. Zwick, Version 5.50A) evaluiert. Über eine im Druckstempel eingelassene Kraftmessdose (U2A, Fa. HBM, Darmstadt) mit einem Messbereich bis zu 500 N konnten die aufgetragenen

Kräfte ermittelt werden. Das am proximalen Ende in Technovit eingegossene Tibiapräparat wurde in einer institutseigenen 3-Punkt Biegevorrichtung mit einer einseitigen Einspannvorrichtung fixiert. Die Einspannlänge betrug 26 mm. Die Ausrichtung des distalen Endes erfolgte auf einem Auflager, so dass eine horizontale Lagerung ermöglicht wurde. Der Druckstempel wurde direkt über die Frakturlinie gefahren (Abb. 16). Die hergestellte Position gewährleistete die zur Testung der Biegesteifigkeit und der Bruchkraft notwendige senkrecht zum Präparat verlaufende zentrale Krafteinleitung. Für die Testung wurde eine Prüfgeschwindigkeit von 1 mm/min. appliziert und eine obere Kraftgrenze von 200 N und eine Vorkraft von 1 N festgelegt.

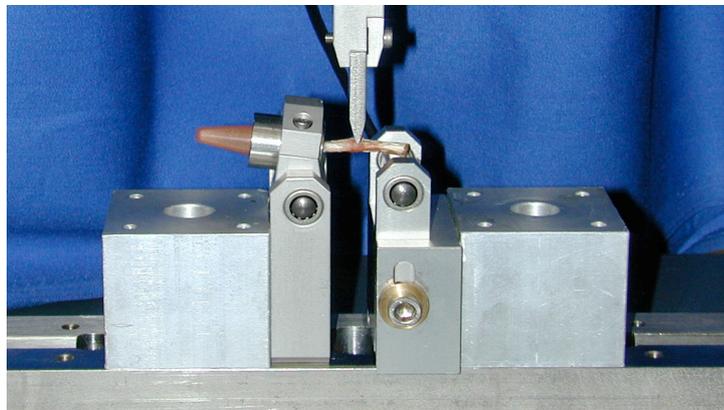


Abbildung 16: Drei-Punkt Biegetestung der Rattentibia zur Bestimmung der mechanischen Kompetenz des Knochens

### Theoretische Betrachtung

Ein Probekörper wird mittels einer in der Mitte zwischen den Auflagern eingeleiteten Druckkraft, deren Wirkungslinie genau senkrecht zur Längsachse des Probekörpers war, gebogen (Drei-Punkt Biegeversuch). Aus den Werten der aufgebrachten Druckkraft und der erreichten Durchbiegung des Probekörpers lässt sich eine Aussage über seine strukturellen mechanischen Eigenschaften ableiten. Bei Prüfkörpern, die einen rotationssymmetrisch heterogenen Querschnitt auf ihre gesamte Länge aufweisen, wird die Biegesteifigkeit ( $S=E*I$ ) als Ersatz für den E-Modul gewählt. Sie errechnet sich nach folgender Gleichung:

$$(E*I) = \frac{F_{el_2} - F_{el_1}}{\Delta l} * \frac{l_v^3}{48}$$

$\Delta l$  = Durchbiegung

$l_v$  = Stützweite

$F_{el_2}$  = Kraft beim oberen Punkt der Biegesteifigkeitsermittlung

$F_{el_1}$  = Kraft beim unteren Punkt der Biegesteifigkeitsermittlung

Die Bruchkraft wurde mittels der Spannungs-Dehnungs Kurve bestimmt. Sie liegt am höchsten Punkt der Kurve und wird als Wert von  $F_{max}$  definiert.

## Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung hielt sich an die Empfehlungen des Gutachtens des Instituts für Biometrie und Medizinische Statistik der Universität Ulm (Leiter: Prof. Dr. Gaus).

Grundsätzlich wurde im Falle mehrerer Einzelwerte bei einer untersuchten Probe das arithmetische Mittel der Messwerte gebildet. Die mit den arithmetischen Mittelwerten angegebenen Standardabweichungen wurden für jede Ratte einzeln berechnet.

Für die Feststellung einer statistischen Signifikanz zwischen der Frakturgruppe (n = 10) und der Frakturgruppe mit Weichteilschaden (n = 10) bezüglich ihrer mechanischen Kompetenz wurde der nicht parametrische Wilcoxon-Test angewendet. Zur Darstellung einer eventuellen statistischen Relevanz der Ergebnisse wurde das Signifikanzniveau auf  $p < 0.05$  festgelegt. Unterschiede, die größer als die Signifikanzschranke waren, werden als statistisch nicht signifikant (n.s.) bezeichnet.

Eine auf Signifikanz vergleichende Betrachtung der Einzelzeitpunkte in der LDF-Längsschnittuntersuchung konnte aufgrund des gewählten Versuchsdesigns nicht vorgenommen werden. Der Grund lag in den geringen Tierzahlen pro Tötungszeitpunkt (n=4), die keine valide statistische Testung zuließen. Darüber hinaus sind die Ergebnisse der Tötungszeitpunkte nicht direkt miteinander vergleichbar, da zu jedem Zeitpunkt unterschiedliche Versuchstiere untersucht wurden.

Aufgrund der zu geringen Fallzahl (n=1/ Tötungszeitpunkt) in der Untersuchung „Mikroangiographischen Gefäßdarstellung“ konnte kein statistischer Test durchgeführt werden. Es kamen ausschließlich Einzelwerte zur Darstellung.

Die Korrelationsanalyse zwischen den Ergebnisdaten der LDF-Messungen und der Quantifizierung der Gefäßvolumina wurde mit einer Regressionsgeraden dargestellt und der Pearsonsche Korrelationskoeffizient berechnet. Die Ergebnisse der geheilten Tibien wurden auf die Daten der intakten Tibien bezogen.

Alle Berechnungen wurden mittels des Tabellenkalkulationsprogramms Microsoft Excel (Version 2000, Microsoft Inc.) und des Statistikprogramms JMP (JMP, 5.0, SAS Institute, Cary, N. C., USA) durchgeführt.

## Kapitel 3: Ergebnisse

### Postoperativer klinischer Verlauf

Generell erholten sich die Ratten zügig von der Operation. Sie zeigten bereits nach wenigen Stunden allgemeine Bewegungsaktivität und begannen mit der Wiederaufnahme des Trinkverhaltens.

Nach Verabreichung des Schmerzmittels Tramal am Ende der Operation wurden die operierten Ratten zurück in einen frisch hergerichteten Käfig überführt. Dabei hing die Aufenthaltsdauer von dem Anhalten der Narkose ab. Während des Aufwachzeitraumes war eine fortlaufende Beobachtung der Ratten durch den Operateur gewährleistet. Abschließend wurden die Versuchstiere wieder zurück in ihre ursprüngliche Umgebung eingegliedert und dem gewohnten Tag-/Nachtzyklus (12h/12h) zugeführt.

In den ersten drei postoperativen Tagen wurden das Trink- und Essverhalten und die Bewegungsaktivität der Ratte, hierbei vor allem die Lastübernahme des operierten rechten Beins, qualitativ betrachtet. Eine deutliche Belastbarkeit des frakturierten Beines stellte sich zwischen dem 2. und 3. postoperativen Tag ein und nahm im Heilungsverlauf sukzessive zu. Bezüglich der intramedullären Versorgung der Fraktur konnten im postoperativen Zeitraum keine Probleme festgestellt werden. Weder kam es zu einem Nagelbruch noch war eine Dislokation der Fragmentenden zu beobachten. Als Ausdruck einer erfolgreichen Heilung konnte für jede Tibia ein ausgeprägter Frakturkallus festgestellt werden. Infektionen im Frakturspalt, im Bereich der vorgenommenen Hautinzision oder im Bereich der Einstichstelle der Narkosenadel konnte bei keinem Versuchstier nachgewiesen werden. Die Tötung wurde zum jeweiligen definierten Zeitpunkt vollzogen. Die Art der Tötung hing dabei von der Untersuchungsgruppe ab.

## Blutflussveränderungen im Weichteil- und Knochengewebe nach isoliertem Weichteilschaden

Die Ergebnisse der Laser Doppler Flowmetrie zeigen im traumatisierten Weichteilgewebe auf der lateralen Seite eine initiale postoperative Durchblutungsreduktion von 18% in den tiefen Gewebeschichten und eine geringfügige Blutflussminderung von 8% im superfascialen Gebiet an (Abb. 17). 24 Stunden postoperativ kann in 6 mm Gewebetiefe eine weitere Reduktion festgestellt werden (-22%), während in der oberflächlichen Muskelschicht bereits eine Normalisierung des Blutflusses eingetreten ist. Am dritten Tag ist in allen Messregionen eine Hyperperfusion zu beobachten, die sich in den tiefen Gewebsstrukturen im weiteren Untersuchungszeitraum der 1. und 2. Woche noch verstärkt (+38%), wohingegen sich in 2 mm Tiefe das Durchblutungsniveau des dritten Tages auch am 7. und 14. Tag zeigt.

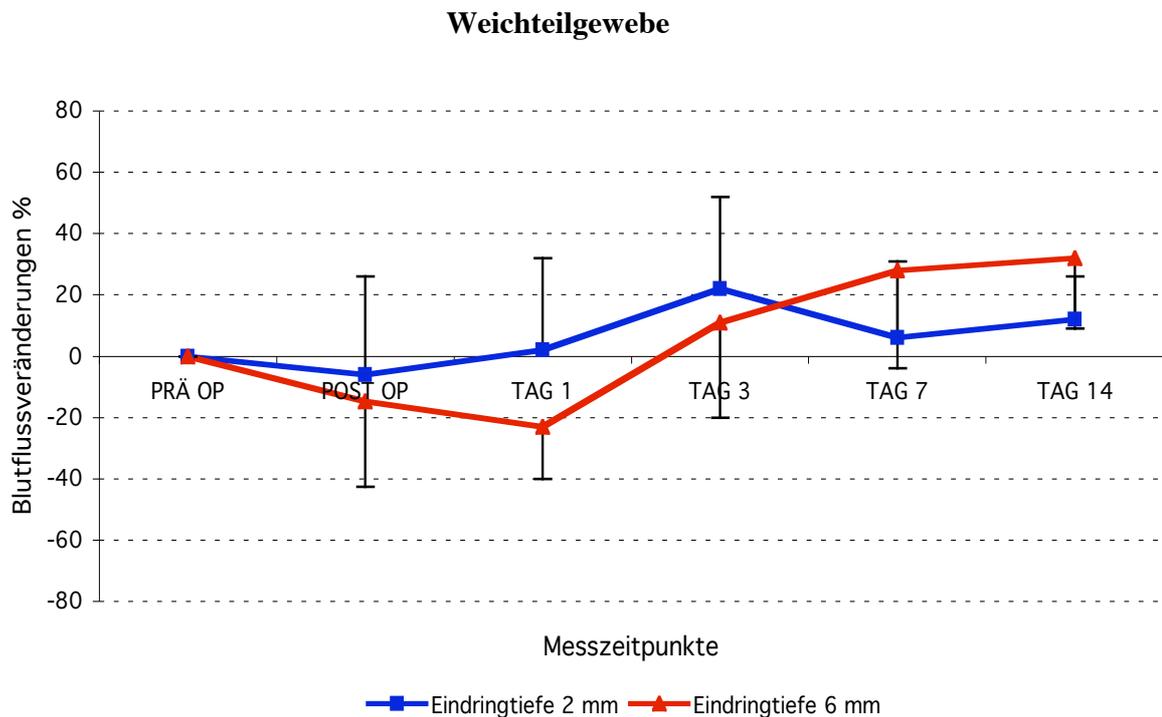


Abbildung 17: Verlaufsdarstellung der Blutflussveränderungen im untersuchten Heilungszeitraum von 28 Tagen im Weichteilgewebe der lateralen Seite nach einem isolierten Weichteilschaden (Grad II der Klassifikation nach Oestern/Tscherne). Die Blutflussveränderungen sind auf das präoperative Ergebnis normiert. Die Verlaufskurve zeigen Blutflussveränderungen in 2 mm (blau) und 6 mm (rot) Gewebetiefe.

Die Blutflussveränderungen auf Höhe der Tibiamitte (korrespondierend mit der Lokalisation der Fraktur in den anderen Versuchsgruppen) nach einem isolierten Weichteilschaden in der postoperativen Phase demonstrieren eine moderate Abnahme von 20 % bzw. 35 % gegenüber den präoperativen Blutflussresultaten. Diese Reduktion ist nach 24 Stunden weiterhin nachzuweisen. Am 3. postoperativen Tag beschreiben die Messdaten eine deutliche Verbesserung der Durchblutungssituation über das Ausgangsniveau für beide Gewebetiefen hinaus. Nach einem leichten Abfall des Dreitagenniveaus am 7. Tag, steigt der Blutfluss am 14. Tag auf den Höchstwert von über 60 % über dem präoperativen Niveau. Die starke Mehrdurchblutung ist in allen Gewebsschichten zu beobachten (Abb. 18).

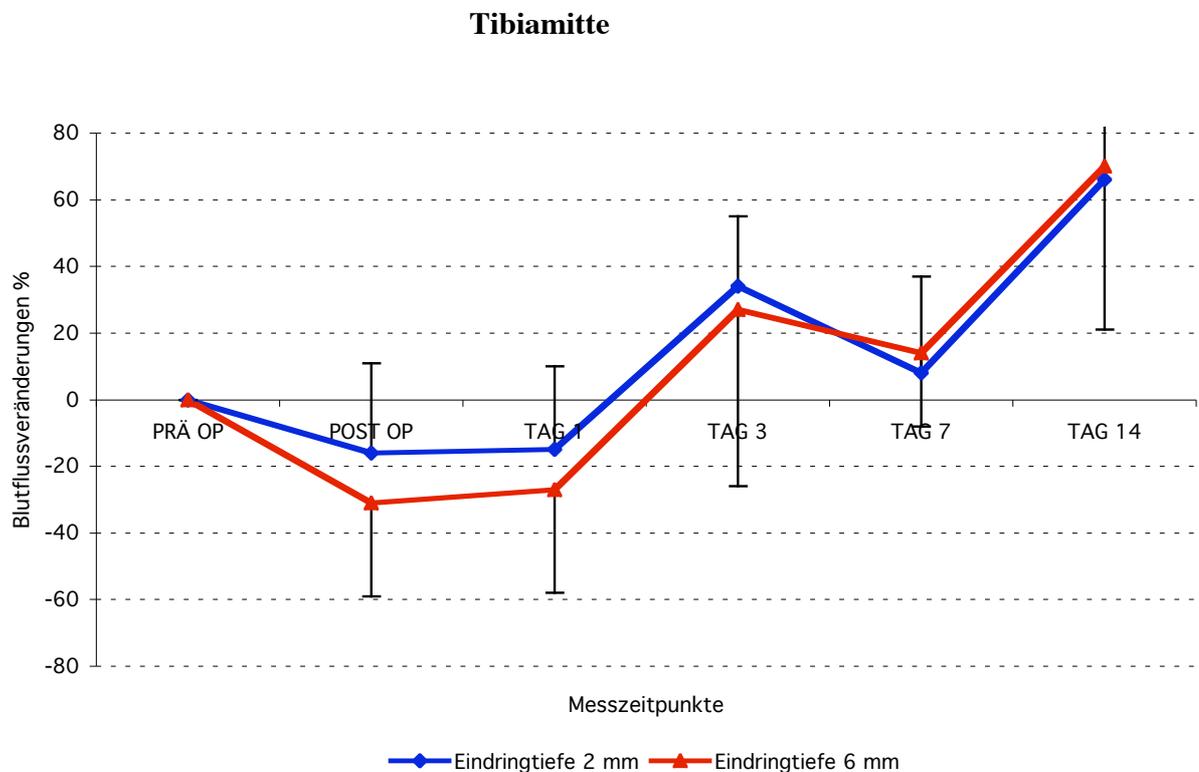


Abbildung 18: Veränderungen des Blutflussgeschehens auf der Höhe der Tibiamitte auf der medialen Seite nach isoliertem Weichteilschaden

In der *distalen Region* kommt es nach einer initialen Durchblutungsabnahme von fast 40% im postoperativen Zeitraum bereits am ersten Tag zu einer annähernden Wiederherstellung der normalen Blutflussverhältnisse. Nach einem schwachen Rückgang des Blutflusses am 3. Tag beschreibt der Verlauf eine tendenzielle Hypervaskularität im distalen Knochengewebe am 7. Tag, die sich nach 14. Tag in beiden Gewebetiefen in gleich großem Ausmaß (+37%) manifestiert (Abb. 19).

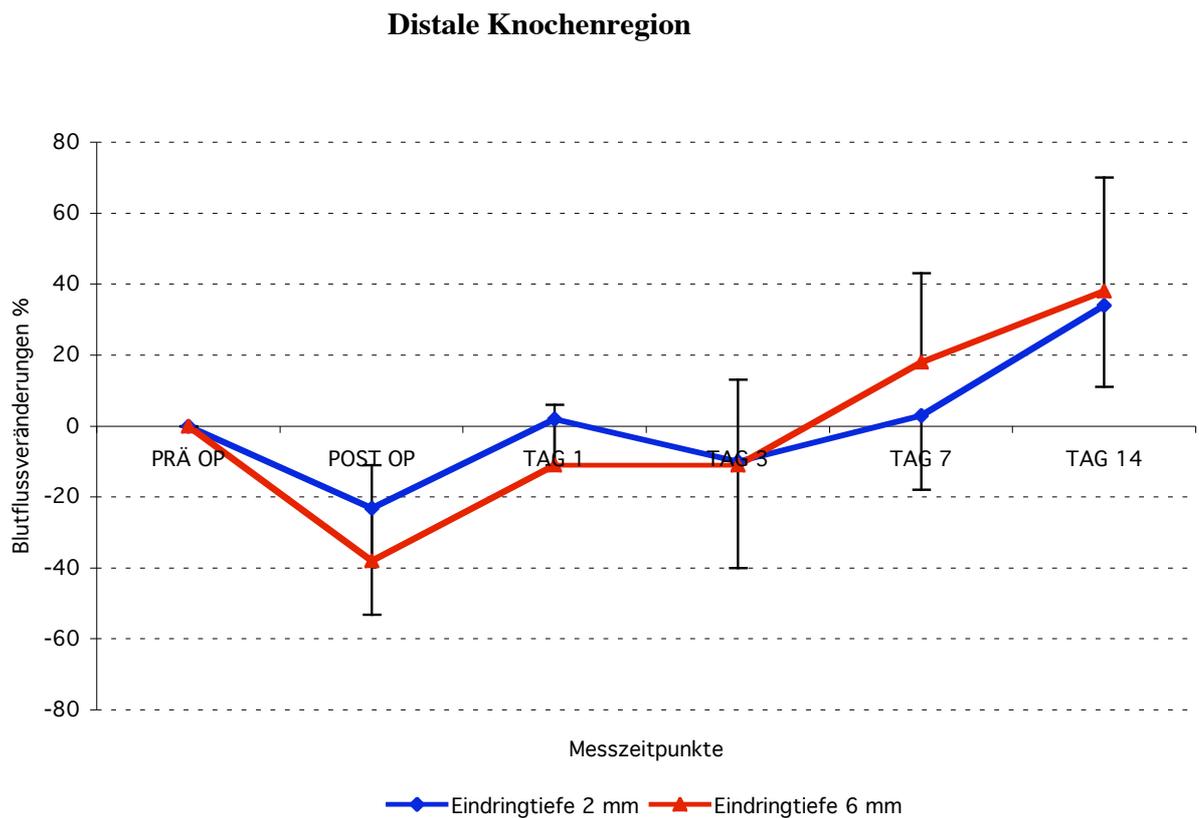


Abbildung 19: Darstellung des Blutflussgeschehens in der distalen Knochenregion auf der medialen Seite nach isoliertem Weichteilschaden

Die Durchblutungsveränderungen in der *proximalen Knochenregion* zeigen einen erheblichen Einbruch in beiden Gewebstiefen (40% bei 2 mm; 57% bei 6 mm) in den ersten 24 Stunden. Bereits nach 72 Stunden ist jedoch eine Wiederherstellung der physiologischen Blutflusshöhe nachweisbar. Während im weiteren Messzeitraum die oberflächliche Gewebedurchblutung leicht auf dem Ausgangsniveau bestehen bleibt, ist der Blutfluss in den tiefer gelegenen kortikalen Regionen der Tibia durch eine Reduktion von etwa 20% unter dem Ausgangsniveau gekennzeichnet (Abb. 20).

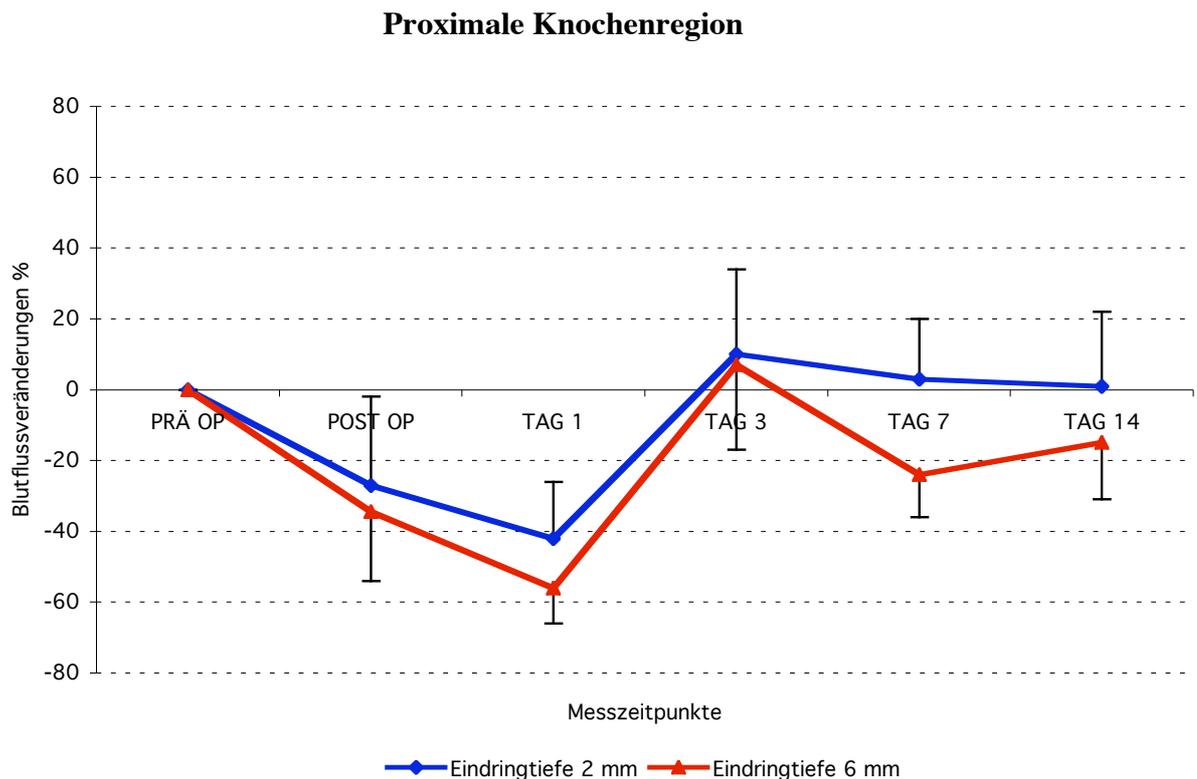


Abbildung 20: Durchblutungssituation nach isoliertem Weichteilschaden in der proximalen Knochenregion der medialen Seite des Unterschenkels

## Vaskularität nach Fraktur mit Weichteilschaden

Eine unterschiedliche Durchblutungssituation zwischen den Untersuchungsgruppen Fraktur (FR) und Fraktur mit Weichteilschaden (FR+WT) lässt sich *im Frakturspalt* festzustellen. In den ersten 24 Stunden nach dem Trauma fällt der Durchblutungsrückgang in der FR+WT-Gruppe mit einem Ausmaß von  $-78\%$  gegenüber  $-53\%$  der FR-Gruppe größer aus. Im zeitlichen Fortlauf der Heilung nimmt die Gewebedurchblutung sukzessive bis zum 14. postoperativen Tag zu, wobei für die FR+WT-Gruppe ein höherer Blutfluss als in der FR-Gruppe gemessen werden kann ( $+75\%/+48\%$ ). Zum Heilungszeitpunkt nach 28 Tagen kann in beiden Gruppen eine um ca. 30% erhöhte Blutzirkulation ermittelt werden (Abb. 21).

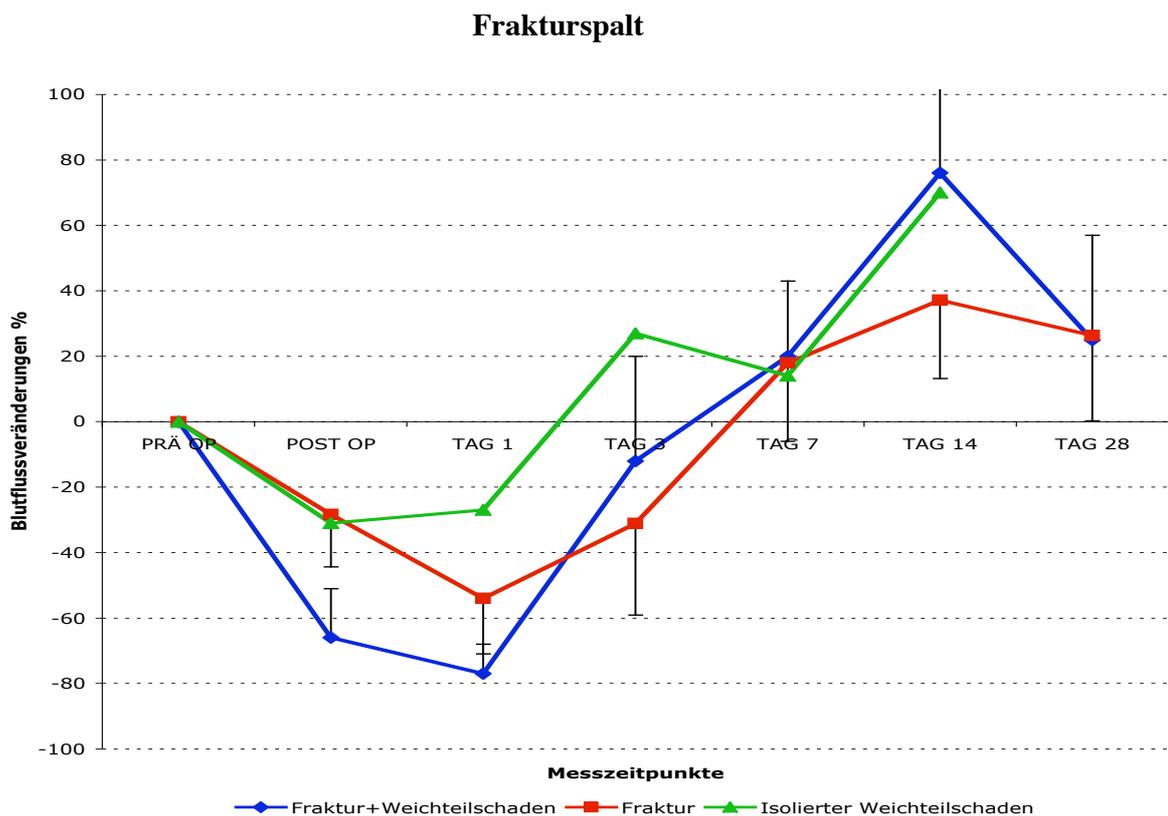


Abbildung 21: Gegenüberstellung der Blutflussveränderungen im Frakturspalt nach einem Kombinationstrauma von Fraktur mit Weichteilschaden (blau) und isolierter Fraktur (rot). Messung des Blutflusses in bis zu 2 mm Gewebetiefe. Die grüne Verlaufskurve stellt die Blutflussveränderungen nach isoliertem Weichteilschaden dar (mit korrespondierender Lokalisation).

Die Darstellung der Blutflussveränderungen *im Weichteilgewebe* zeigt in beiden Gruppen eine postoperative Minderdurchblutung, die bis zu 24 Stunden anhält. Dabei fällt die Reduktion in der FR+WT-Gruppe mit  $-51\%$  größer aus als der verminderte Blutfluss in der FR-Gruppe ( $-36\%$ ). Auch im weiteren Verlauf sind Unterschiede zwischen beiden untersuchten Gruppen zu beobachten. Während bei der FR-Gruppe zwischen Tag 3 und Tag 28 eine verbesserte Perfusion gegenüber der Ausgangssituation mit einem Blutflussspitzenwert am 14. Tag zu erkennen ist, bewegen sich die gemessenen Werte für die FR+WT-Gruppe im Bereich des festgestellten präoperativen Niveaus. Allerdings zeigen die Ergebnisse am 28. Tag einen starken Blutflusseinbruch von  $-34\%$  im Vergleich zum Ausgangswert (Abb. 22).

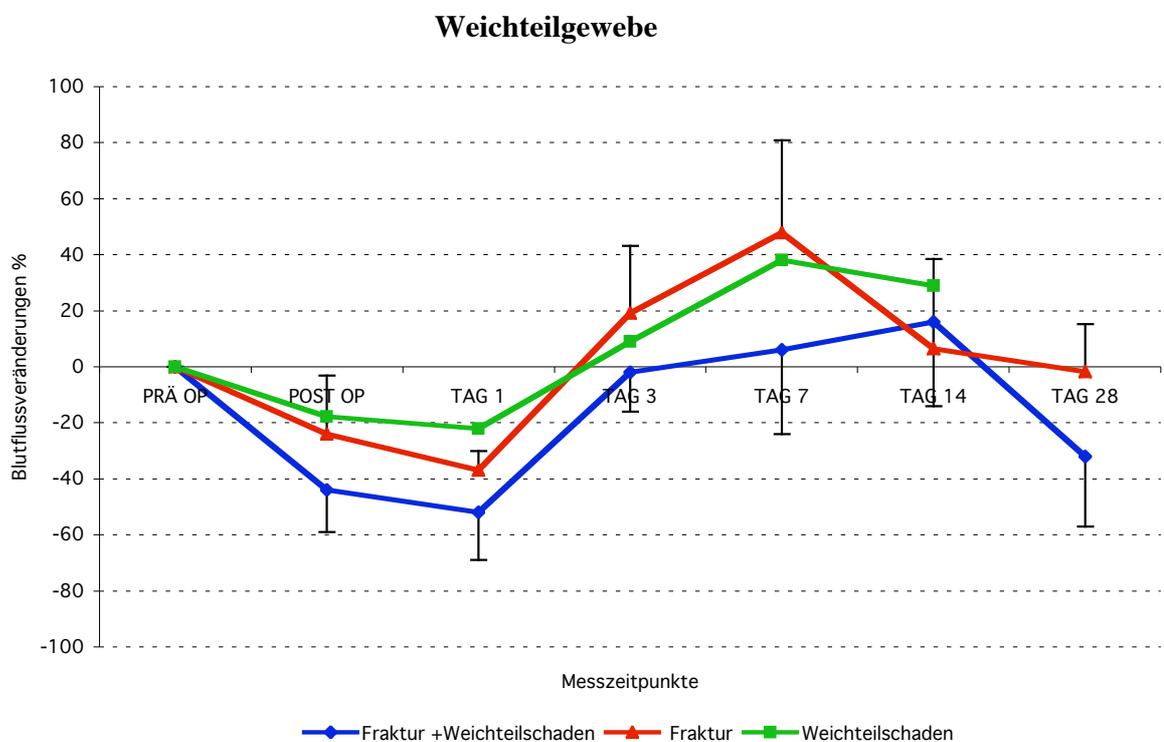


Abbildung 22: Darstellung des Blutflussgeschehens im Weichteilgewebe über einen Heilungszeitraum von 28 Tagen. Blaue Verlaufskurve kennzeichnet die Versuchsgruppe Fraktur mit Weichteilschaden, die rote die Fraktur-Gruppe. Die grüne Kurve zeigt die Blutflussveränderungen nach einem isolierten Weichteilschaden als Referenz zu den beiden genannten Versuchsgruppen.

Die Abbildung 23 zeigt die Veränderungen des Blutflussgeschehens im *proximalen Fragmentabschnitt* der heilenden Tibia. Aus der Betrachtung der Blutflusssituation in der FR+WT-Gruppe wird ersichtlich, dass im gesamten Heilungsverlauf keine Rückkehr zum präoperativen Wert nachgewiesen werden kann. Vor allem in der frühen Heilungsphase, definiert als die ersten 24 Stunden postoperativ, ist eine Hypoperfusion von 58% unterhalb des Ausgangsniveaus zu erkennen. Die Ergebnisse der FR-Gruppe zeigen eine verminderte Perfusion von 31% nach Tag 1. Die Wiederherstellung der Blutflusssituation am 3. Tag verstärkt sich zu einer Hyperperfusion am 7. Tag. Zum Heilungszeitpunkt Tag 14 ist eine wenn auch verminderte Durchblutung (-40%) festzustellen, die auch nach der 4. Woche in einem kleineren Ausmaß (-25%) besteht.

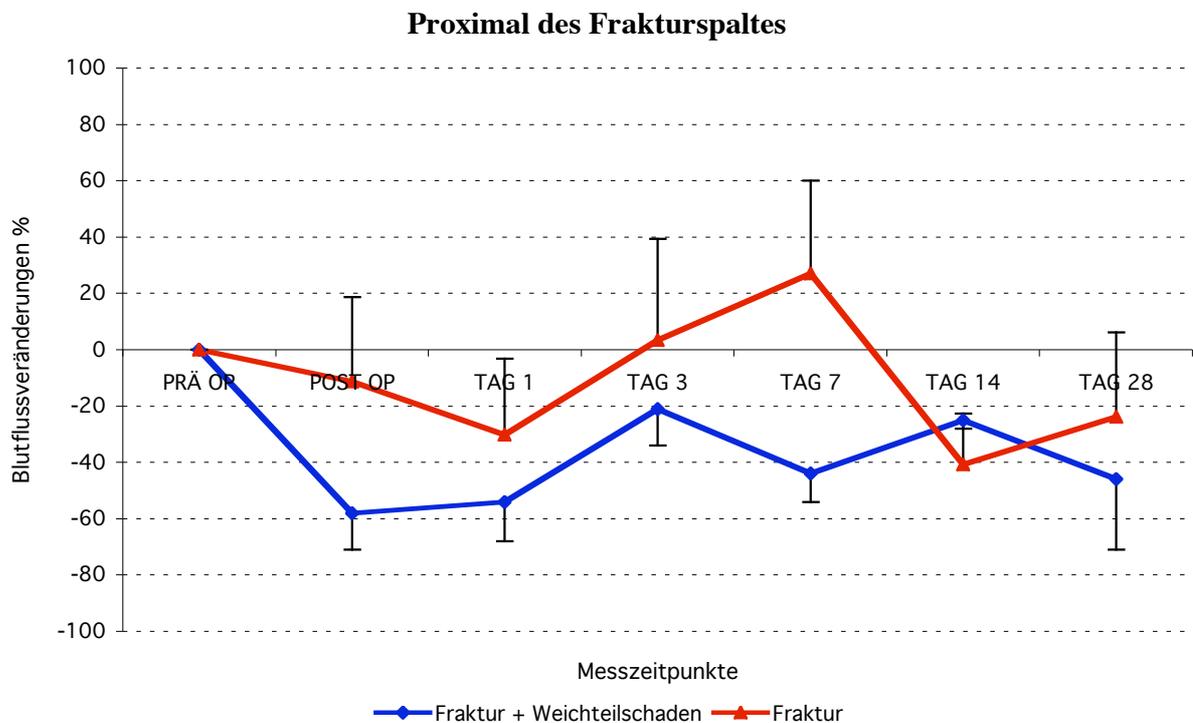


Abbildung 23: Eruiierung der Blutzirkulation im proximalen Frakturfragment der zwei Untersuchungsgruppen FR und FR+WT. Aufgetragen sind die Blutflussveränderungen über einen Messzeitraum von 28 Tagen

In der distalen Region des Frakturspaltes ist am ersten postoperativen Tag eine erhebliche Reduktion der Blutzirkulation von  $-71\%$  in der FR-Gruppe gegenüber einem  $22\%$ igen Rückgang in der FR+WT-Gruppe festzustellen. Zu den Messzeitpunkten Tag 3 und 7 wurden keine gravierenden Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen festgestellt. In beiden Gruppen ist die Vaskularität nach dem dritten Tag wiederhergestellt und erhöht sich leicht zum Tag 7 ( $+14\%$ ). Während sich in der FR-Gruppe eine Hyperperfusion von  $30\%$  über dem Ausgangsniveau zeigt, kann für die FR+WT-Gruppe eine Reduzierung des Blutflusses von  $26\%$  zum Ausgangsstadium gemessen werden. Zum Abschluss des Heilungszeitraums zeigt sich am 28. Tag in beiden Gruppen eine Minderperfusion von etwa  $30\%$  (Abb. 24).

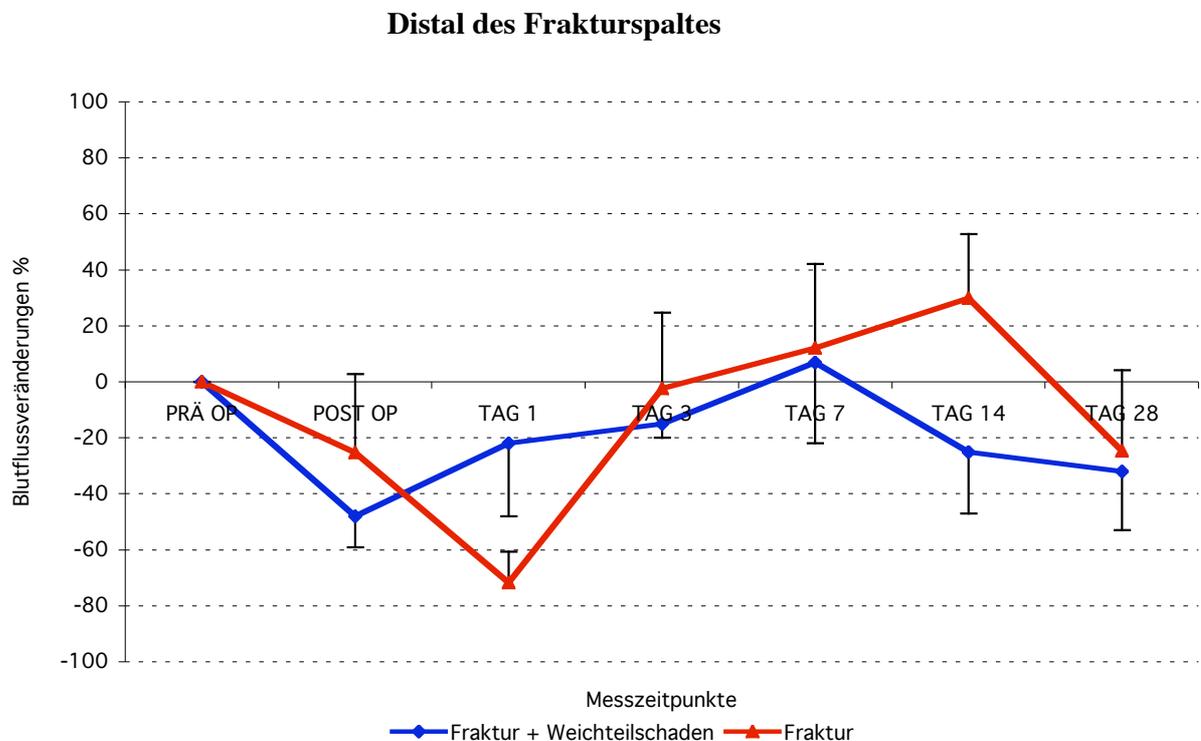


Abbildung 24: Blutflussveränderungen im distalen Bereich des Frakturspaltes. Die Untersuchungsgruppen FR (rot) und FR+WT (blau) sind dargestellt.

## Biomechanik

Die Ergebnisse des mechanischen Tests weisen auf eine tendenziell verbesserte Frakturheilung in der FR+WT-Gruppe hin. Diese Aussagen können für beide Messparameter aufgrund der Ergebnisse der Festigkeits- und Biegesteifigkeitsprüfung getroffen werden. Die geheilten Tibien der FR+WT-Gruppe zeigen eine doppelt so hohe Biegesteifigkeit gegenüber der FR-Gruppe ( $10 \text{ Nm}^2 / 6 \text{ Nm}^2$ ). Die Untersuchung der intakten Tibien der kontralateralen Seite konnte nur minimale Differenzen zwischen den beiden Gruppen feststellen (Abb. 25). Eine statistische Signifikanz konnte für die Unterschiede zwischen beiden Gruppen weder für die geheilten noch für die intakten Tibien gefunden werden ( $p=0.31 / p=0.69$ ). Beim Vergleich der geheilten Tibien mit den intakten Tibien in der Frakturgruppe erreichten die geheilten Tibien lediglich 22% der Biegesteifigkeit der intakten Tibien, in der Gruppe Fraktur mit Weichteilschaden lag der Wert bei 30%.

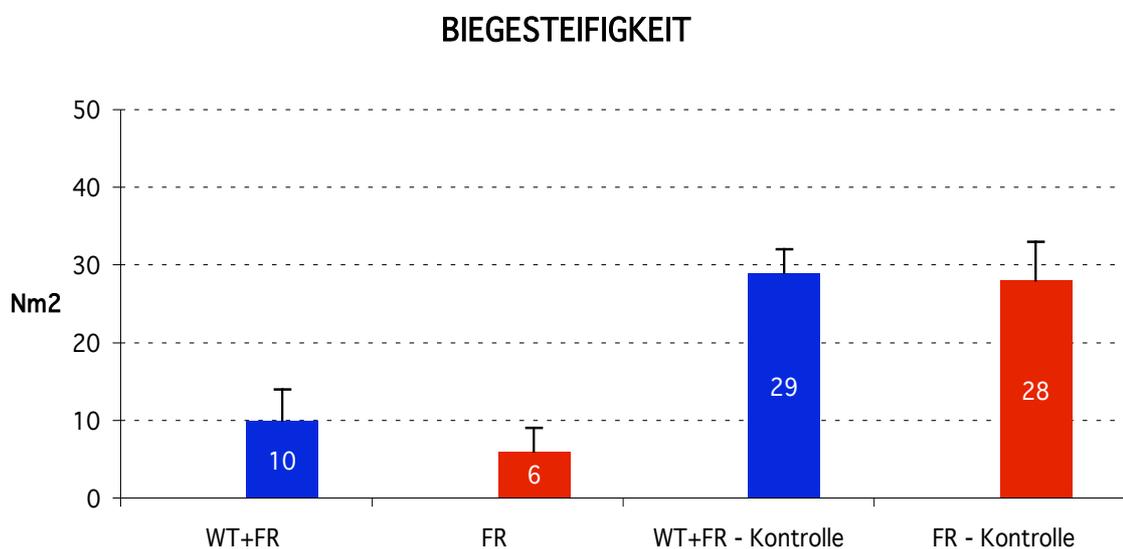


Abbildung 25: Biegesteifigkeiten der einzelnen Gruppen dargestellt als Mittelwert und dessen Standardabweichung. Die nicht frakturierten Tibiae sind innerhalb der Gruppe mit dem Zusatz Kontrolle versehen (WT+FR = Gruppe Fraktur+Weichteilschaden  $n=10$ ; FR = Gruppe Fraktur  $n=9$ ).

Für den Parameter Bruchkraft wurde eine 60%ig höhere Festigkeit der geheilten Tibien der FR+WT-Gruppe (28 N) gegenüber der FR-Gruppe (17 N) gemessen. Ein signifikanter Unterschied konnte nicht festgestellt werden ( $p=0.41$ ). Auch bei den intakten Tibien konnte tendenziell eine höhere Festigkeit für Gruppe Fraktur mit Weichteilschaden (95 N vs. 89 N) eruiert werden (Abb. 26). Allerdings konnten diese Unterschiede zwischen beiden Gruppen nicht statistisch abgesichert werden ( $p=0.25$ ), da die Differenzen der Mittelwerte in der gleichen Größenordnung lagen wie die Standardabweichungen innerhalb der jeweilig bezeichneten Gruppe. Die Gegenüberstellung intakter versus geheilter Tibien zeigte in der Frakturgruppe eine herabgesetzte Bruchkraft von 18% der intakten Tibien, in der Fraktur mit Weichteilschaden Gruppe konnte nur eine Bruchkraft von 31% der geheilten Tibien gegenüber den intakten Tibien gemessen werden.

#### BRUCHKRAFT FR+WT vs. FR

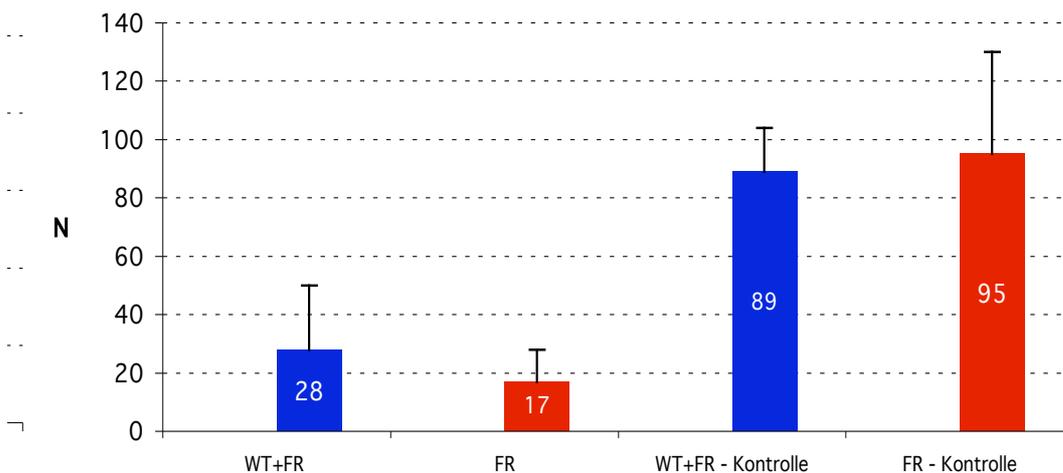


Abbildung 26: Ergebnisdarstellung der Bruchkraft als Ausdruck der Festigkeit der knöchernen Strukturen im Frakturspalt. Die Gruppe WT+FR zeigt eine tendenziell verbesserte Heilung gegenüber der FR-Gruppe. Die abgebildeten Werte in der Säulengraphik geben des arithmetische Mittel (Frakturgruppe  $n=9$ ; Gruppe Fraktur mit Weichteilschaden  $n=10$ ) an.

## Gefäßdarstellung und -volumenquantifizierung

### *Digitale Gefäßdarstellung*

Mit der Zusammensetzung der im  $\mu$ -CT generierten radiologischen Schnittbildaufnahmen mittels Visualisierungssoftware konnte mit diesem neuartigen Verfahren erstmalig die Gefäßanatomie in einer dreidimensionalen Auflösung digitalisiert betrachtet werden. Dieses erlaubte eine qualitative Beurteilung der vaskulären Situation am Knochen und im Weichteilgewebe im Heilungsprozess nach einer Fraktur.

Die Abbildung 27 stellt exemplarisch die Gefäßsituation und die ossären Strukturen qualitativ dar. Das Bild zeigt ein räumliches Fenster von 2 cm mittig der Rattentibia. Der aufgetragene schwarze Rahmen umschließt das Gebiet des Frakturkallus. Während die Frakturlinie bei der Fibula klar zu erkennen ist, kann die tibiale Frakturlinie in dieser Ansicht nicht lokalisiert werden. Die dreidimensionale Darstellung ermöglicht es ferner, neben der kompletten räumlichen Ansicht auch die Gefäßstrukturen im Markraum zu betrachten. Die periostale tibiale Gefäßstruktur ist im ganzen Abschnitt reichlich ausgeprägt. Eine quantitative Beurteilung bezüglich der Angiogenese war in den fraktur-nahen Gebieten nicht möglich.

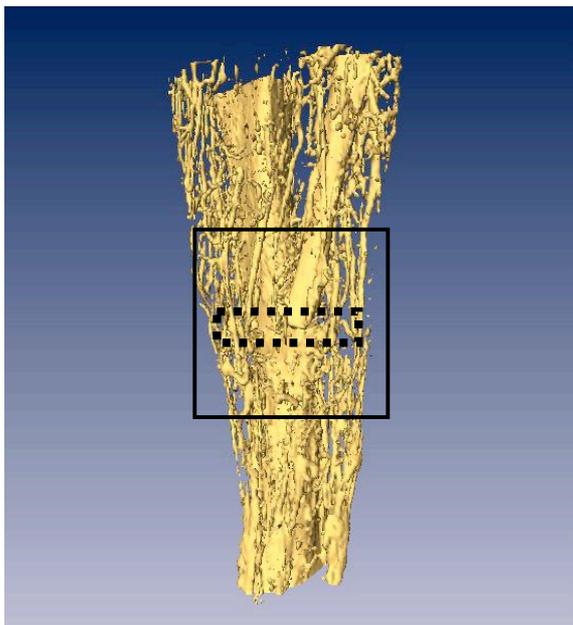


Abbildung 27:

Darstellung einer dreidimensionalen Gefäßstruktur nach der modifizierte Methode nach Rhinelander; das Bild zeigt Tibia und Fibula mit Frakturzone (schwarzer Rahmen), die Frakturlinie (gepunkteter Rahmen) und die umgebenden Gefäße nach dem 14. Heilungstag

## Qualitative Verlaufsdarstellung der Heilung

Die Datensätze der Mikrocomputertomographie gewähren neben der quantitativen Bestimmung des Gefäßvolumens auch eine qualitative Betrachtungsweise der Frakturkonsolidierung, d.h. der Kalzifizierung der Frakturlinie mit dem Frakturkallus als Zeichen der sekundären Knochenheilung (Abb.28).

Die beginnende Kalzifizierung ist nach Tag 7 im Frakturbereich zu erkennen, die aus frakturfernen Gebieten auf die Frakturlinie zuwächst. Der weitere Verlauf zeigt eine bis zum 14. Tag massiv verstärkte Kalzifizierung, die die Frakturkonsolidierung der Fibula mit einschließt. Dagegen scheint zwischen der 2. und 4. Woche eine Stagnation in der Kallusproduktion einzutreten. Zu welchem Zeitpunkt die Überbrückung des Frakturspalts vollzogen ist, kann durch dieses Verfahren nicht zweifelsfrei bestimmt werden. Parallel vorgenommene histologische Untersuchungen bezüglich der Gewebsdifferenzierung deuten auf einen Zeitpunkt zwischen der 2 und 4 postoperativen Woche hin. Das Gefäßvolumen nimmt bis zum Tag 7 erheblich zu. Die Daten am 14. Tag beschreiben eine starke Gefäßverästelung im Frakturkallus mit einer leichten Gefäßausrichtung in Richtung Frakturlinie. Nach 28 Tagen scheint diese Ausrichtung durch eine longitudinale Orientierung der Gefäßstrukturen ersetzt worden zu sein. Eine weitere Zunahme des Gefäßvolumens ist nicht zu erkennen.

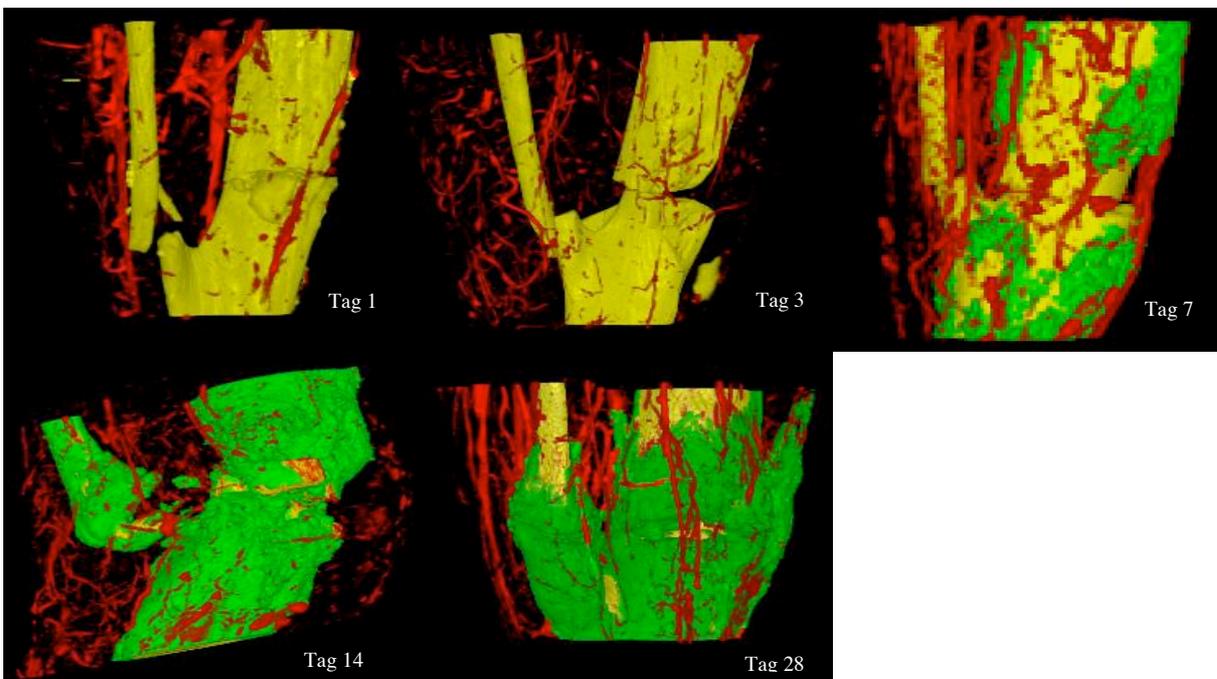


Abbildung 28:

Qualitative Beschreibung der Kalzifizierung des Frakturspalts (grün) und der Gefäßstrukturen (rot) im Heilungsverlauf nach Fraktur. Zu sehen ist der Frakturbereich mit der Tibia (rechts) und der Fibula (links).

Allerdings muss bei dieser qualitativen Betrachtung berücksichtigt werden, dass für jeden Untersuchungszeitpunkt ein anderes Präparat aufbereitet worden war. Es handelt sich also nicht um eine echte Verlaufbeschreibung der Frakturkonsolidierung. Dieses ist besonders zwischen dem Bild Tag 1 und Tag 3 aufgrund der veränderten Lage der Knochenfragmente der Tibia wie auch der Fibula deutlich zu erkennen.

## Gefäßquantifizierung

Die vergleichende Betrachtung der Gefäßvolumina beider Versuchsgruppen lässt eine gleiche Gefäßquantität am Tag 7 bzw. ein höheres Gefäßvolumen der Gruppe Fraktur mit Weichteilschaden gegenüber der Frakturgruppe erkennen (33%/ 25%). Auffallend ist, dass bis auf den 3. Tag in der Frakturgruppe (-35%) alle bestimmten Volumina des verletzten Beines über den der intakten Seite liegen. Die größten Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen sind am Tag 1 (35% Fraktur/ 570% Fraktur mit Weichteilschaden) und am 14. postoperativen Tag nachzuweisen (556%/ 24737%). Nur nach 28 Tagen konnte ein größeres Gefäßvolumen für die Frakturgruppe gegenüber der Gruppe Fraktur mit Weichteilschaden berechnet werden. Einzelne Gefäßquantitäten mit einem Unterschied von 24000% wie zum Beispiel in der Gruppe Fraktur mit Weichteilschaden am 14. Tag sollten sehr kritisch betrachtet werden, da unter normalen Bedingungen eine solche übermäßig starke Angiogeneese nicht zu erwarten ist. In diesem Fall ist eine sichere Aussage nicht möglich (Abb. 29).

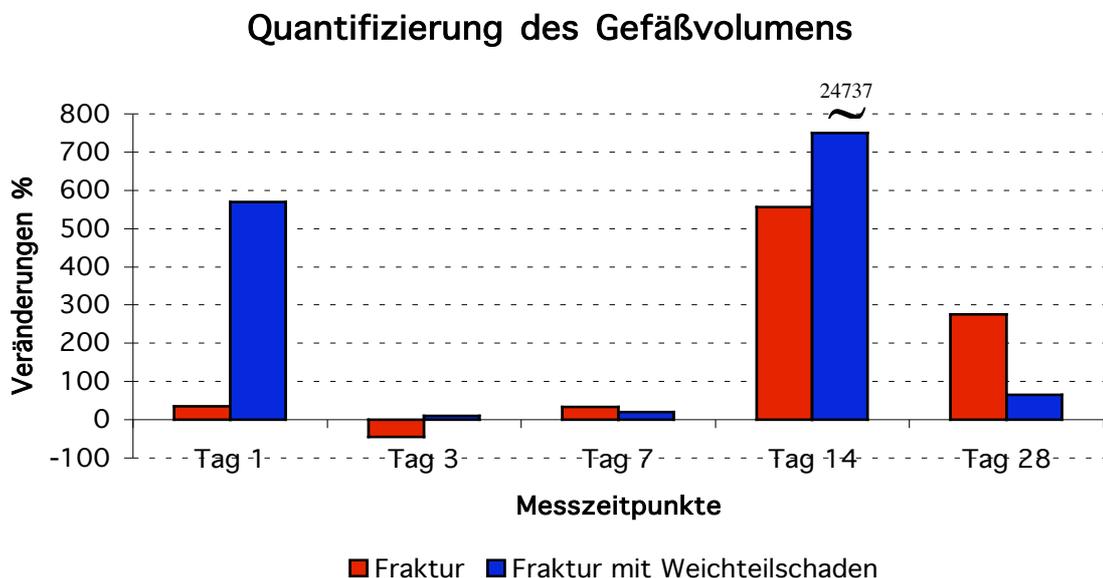


Abbildung 29: Darstellung der Gefäßquantitäten der Versuchsgruppen Fraktur und Fraktur mit Weichteilschaden im Frakturheilungsverlauf über 28 Tagen. Die Gefäßquantitäten wurden durch eine prozentuale Normierung des frakturierten auf das geheilte Bein eines Versuchstieres bestimmt.

## Zusammenhang zwischen Gefäßvolumen und Blutfluss

Ein Korrelat zwischen den mittels Laser Flowmetrie gemessenen Blutflussveränderungen und den evaluierten Gefäßvolumina konnte für beide Versuchsgruppen nicht nachgewiesen werden. Der Korrelationskoeffizient nach Pearson betrug für die Frakturgruppe  $r = 0,10$  (Abb. 30). Für die Gruppe Fraktur mit Weichteilschaden (nicht dargestellt) konnte ebenfalls kein Zusammenhang gefunden werden.

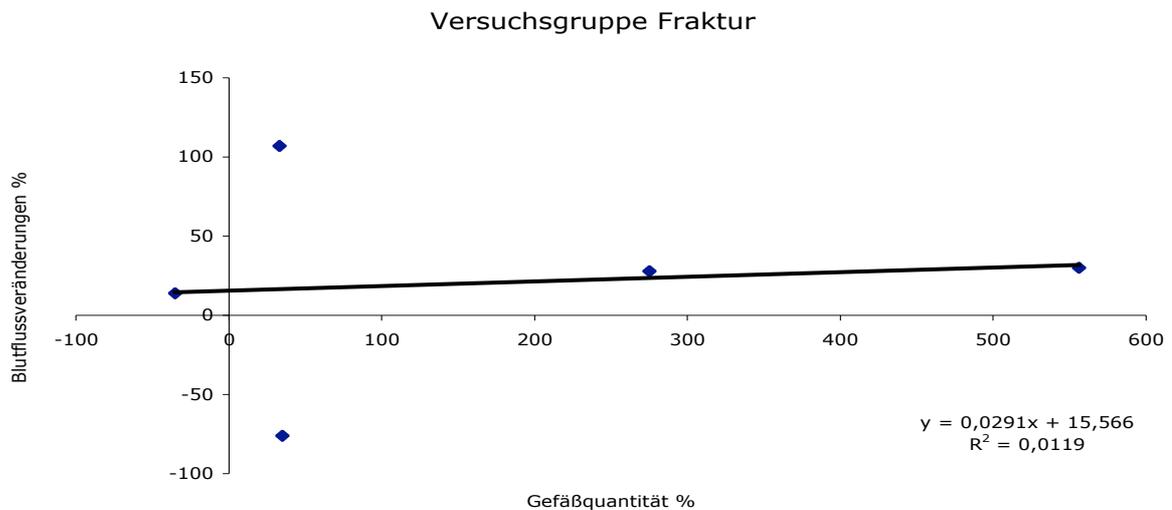


Abbildung 30: Darstellung des Zusammenhangs zwischen LDF-Daten und Gefäßvolumen der Frakturgruppe von fünf einzelnen Messzeitpunkten (Tag 1, 3, 7, 14, 28 Tagen) mit einem Pearson Korrelationskoeffizienten von  $r = 0,10$ .

## Kapitel 4: Diskussion

Die eingangs formulierten Fragestellungen zur Wiederherstellung der Vaskularität in der Frakturheilung mit Weichteilschaden konnten in der vorliegenden Arbeit mit den ausgewählten Methoden erfolgreich beantwortet werden. Dazu wurde einerseits die nutritive Versorgung der Rattentibia und ihr umgebendes Muskelgewebe im Verlauf des Heilungsvorganges evaluiert und andererseits mittels einer modifizierten mikroangiographischen Vorgehensweise das Ausmaß der Angiogeneese quantifiziert.

So konnten mittels der Laser Doppler Flowmetrie Veränderungen der Durchblutungssituation im Knochen nach isoliertem Weichteilschaden und nach einer Tibiaschaftfraktur mit Weichteilschaden *in vivo* aufgezeigt werden. Anhand der drei Messlokalisationen am Knochen und der Messregion des M. gastrocnemius konnte ein regionales Mapping der Vaskularität nach dem jeweiligen applizierten Trauma durchgeführt werden. Deutlich erkennbar war der Einfluss der Fraktur mit Weichteilschaden auf die Durchblutungssituation der differenten ossären Strukturen. Vor allem im Frakturspalt kam es zu einer abnehmenden Perfusion in der Heilungsphase, die möglicherweise mit der Verletzungsschwere in Verbindung zu bringen ist. Insbesondere die unterschiedlichen Blutflussverhältnisse in der distalen und proximalen Frakturregion weisen auf eine heterogene Blutversorgung nach Fraktur mit Weichteilschaden hin. Ebenfalls beeinflusst ein isolierter Weichteilschaden die Blutzirkulation im intakten Knochen nachhaltig. Dieses konnte an allen drei Messlokalisationen gezeigt werden. Die Wiederherstellung der Durchblutung im Muskelgewebe nach Weichteilschaden verlief innerhalb der bereits in der Literatur beschriebenen Zeitfenster. Allerdings deuten die Blutflussergebnisse am 14. Tag nicht auf eine vollkommene Geweberegeneration hin.

Mit der neu entwickelten Methode zur Quantifizierung des Gefäßvolumens konnte tendenziell das Ausmaß der Angiogeneese für den Zeitraum der Frakturheilung nachgewiesen werden. Es konnte allerdings kein Nachweis erbracht werden, zu

welchem Zeitpunkt die Angiogeneese einsetzt und wie sie im Heilungsverlauf fortschreitet.

Die Ergebnisse der mechanischen Tests zeigten keinen signifikanten Unterschied zwischen beiden Versuchsgruppen. Demzufolge ist weder der mechanische Parameter der Bruchkraft noch die Steifigkeit des geheilten Knochens von dem zusätzlichen Trauma einer Weichteilquetschung beeinflusst.

## METHODEN

### *Tiermodell*

Für die Untersuchung zur Fragestellung des Einflusses eines Weichteilschadens auf die Frakturheilung wurde die Ratte als Tiermodell ausgewählt. Die Wahl des Tiermodells ergab sich aus der Zielsetzung der Studie.

Beim Frakturmodell der hinteren Rattenextremität handelt es sich um ein etabliertes Tiermodell (Yuehuei et al. 1999), welches sich gerade für Untersuchungen bezüglich der Durchblutungssituation als sehr geeignet erwiesen hat (Grundnes et al. 1992, Grundnes et al. 1994, Reed et al. 2003, Utvag et al. 1996, Zhang et al. 2003). Gleiches kann aus der Vielzahl von publizierten Untersuchungen am isolierten Weichteilschaden (Couffinhal et al. 1998, Menth-Chiari et al. 1999, Mittlmeier et al. 2003, Schaser et al. 1999, Vollmar et al. 1994) sowie nach einem Polytrauma von Fraktur mit Weichteilschaden (Utvag et al. 1998, Utvag et al. 2003, Zhang et al. 2003) am Rattenmodell belegt werden. Vor allem die hohe Infektionsresistenz, die geringen notwendigen räumlichen Kapazitäten, die einfache Pflegehaltung und darüber hinaus der moderate finanzielle Aufwand im Vergleich zu anderen Tiermodellen macht das Rattenmodell für die experimentelle unfallchirurgische Forschung attraktiv.

Ein immanentes Problem von tierexperimentellen Ergebnissen liegt in der Übertragbarkeit der Ergebnisse auf den menschlichen Organismus. Das Rattenmodell ist im Sinne der Übertragbarkeit weniger gut geeignet als zum Beispiel das Schaf- oder Hundmodell (Lippuner et al. 1992, Stürmer et al. 1980, Wissing und Stürmer 1986). Während die ovine Tibia aufgrund ihrer vergleichbaren Anatomie

dem des Menschen ähnlich ist, weisen Rattenknochen eine primitive Knochenstruktur ohne Haverssche Kanäle auf, welche für die Durchblutungssituation des humanen Knochens eine wichtige Bedeutung haben (Nunamaker 1998). Bei der Ergebnisinterpretation ist weiterhin zu berücksichtigen, dass der Organismus der Ratte generell einen höheren metabolischen Umsatz als der Mensch aufweist, was durch eine höhere Knochenbildungsrate dokumentiert wird (Wissing und Stürmer 1986). Auf die größere Regenerationskapazität der Ratten sei ebenfalls hingewiesen (Stürmer und Schuchardt 1980). Fragen zur Biomechanik der Frakturheilung werden in der Regel mit dem Schafsmodell beantwortet, da hier die operative Versorgung mit Osteosyntheseverfahren und die biomechanischen Bedingungen besser zu kontrollieren sind. Ferner sind die Gewebeproben wesentlich größer als bei der Ratte (Augat 1995, Nunamaker 1998).

Bei der Auswahl der Ratten wurde streng darauf geachtet, dass alle Ratten gleicher genetischer Herkunft und gleichen Alters waren sowie vom gleichen Geschlecht abstammten. Studien konnten zeigen, dass sich innerhalb der ersten zwei Lebensjahre einer Ratte das Erythrozytenvolumen in der Kortikalis und in den einzelnen Regionen der Epiphyse und Metaphyse der Tibia um mehr als 75% reduziert. Vergleichbare Verläufe wurden ebenfalls für das Rattenfemur nachgewiesen (Brookes und Revel 1997). Dabei war die totale Höhe der kortikalen Perfusion des Femurs gegenüber der Tibia um 23% und der femurale medulläre Raum gegenüber der tibialen Medulla um 15% erhöht (Brookes 1965). Diese deutlich verbesserte kortikale Durchblutung des Femurs ist mit dem umfassenden Weichteilmantel und seinen reichlichen Gefäßverästelungen mit dem Periost erklärbar (McKibbin 1978). Die geschilderten Sachverhalte sollten gerade in Hinblick auf quantitative Vergleiche von Blutflussergebnissen zwischen Frakturmodellen des Femurs und der Tibia beachtet und zusätzlich zum Lebensalter berücksichtigt werden.

Die Frage nach dem Einfluss des verwendeten Narkotikums Ketamin auf die Mikrozirkulation kann nur unzureichend beantwortet werden. Generell ist bekannt, dass Ketamin beim Menschen eine Erhöhung des Blutdrucks um ca. 30% und der Pulsfrequenz bewirkt während die Atemfunktion unbeeinflusst bleibt (Forth et al. 2001). Den direkten Einfluss des Wirkstoffes Ketamin auf die Blutzirkulation der Ratte untersuchten Smith et al. (Smith et al. 1993). Sie fanden nach Gabe von Ketamin eine signifikante Blutflussreduktion und in den Venolen vermehrte

Vasospasmen. Mikrozirkulatorische Einflüsse anderer Narkotika sind bezüglich der Leukozyten-Endothel-Zellinteraktion, dem Rolling und adhäsiven Sticking an der Gefäßwand, gut dokumentiert. Halothane sowie Sevoflurane beeinflusste die Hämodynamik mit einer Zunahme des Rollings und der Adhäsion der Leukozyten am venösen Gefäßendothel (Morisaki et al. 1997) ungünstig. Die Gabe von Fentanyl erhöhte hingegen das Leukozyten-Rolling, während die Geschwindigkeit der kumulierten Leukozyten unverändert blieb. Ein signifikant erhöhter Blutfluss konnte nur bei Gabe von Fluanisone festgestellt werden (Janssen et al. 1997). Midazolam und Thiopental verringern die neutrophile Reaktion, die über immunologische Reaktionsmechanismen indirekt zur Wiederherstellung der nutritiven Situation im traumatisierten Gewebe beiträgt. Im Gegensatz dazu konnte für Ketamin diesbezüglich keine negative Wirkung nachgewiesen werden (Nishina et al. 1998).

In allen drei Studienarmen wurde für die Narkose Ketamin/Xylazin injiziert. Die Dosis richtete sich nach dem jeweiligen Gewicht des Versuchstieres. Nach einer generellen Analgesie (>10 Minuten) waren die Versuchstiere für den Rest der Operation bewusstlos und gegenüber Schmerzreizen unempfindlich. Aufgrund der kurzen Operationszeiten (Fraktur 10 Minuten, Weichteilschaden 10 Minuten, Fraktur mit Weichteilschaden 12 Minuten) waren keine Nachinjektionen notwendig. Mit dem Erreichen der angestrebten Narkosetiefe wiesen die Ratten eine mittlere Herzfrequenz von 180 Schlägen auf, die damit weit unterhalb des physiologischen Ausgangswertes (330 Schläge) lag. Eine durch das Ketamin hervorgerufene verstärkte Salivation konnte nicht beobachtet werden. Die Prämedikation mit Atropin verhinderte dies erfolgreich. Das subkutan verabreichte Analgetikum Tramal induzierte die gewünschte Schmerzlinderung für die ersten postoperativen 24 Stunden. Es kam bei keinem Versuchstier zu Nebenwirkungen, die sich auf die applizierten Medikationen zurückführen ließen. Um ein Auskühlen der Ratten im operativen Zeitraum zu verhindern, wurden die Ratten auf eine Heizdecke gelegt, die einem Absinken der Körperkerntemperatur entgegenwirkte. Eine stabile Körperkerntemperatur sorgte ebenfalls dafür, dass die Temperatur der Haut und der tiefer liegenden Muskelschichten keinen signifikanten Schwankungen unterlag. Temperaturschwankungen können insbesondere bei Untersuchungen mit der Laser Doppler Flowmetrie einen nicht unerheblichen Einfluss auf die Blutflussergebnisse haben (Bornmyr et al. 1980).

Ein weiterer wichtiger Faktor, der einen Einfluss auf die Heilungsvorgänge der Fraktur besitzt, ist die mechanische Belastung. So konnte in tierexperimentellen Studien gezeigt werden, dass die Spaltbreite der Fraktur, die interfragmentäre Bewegung und die Art des Fixationsverfahrens wesentlich das Heilungsergebnis beeinflussen können (Augat et al. 1998, Augat et al. 2003, Claes et al. 1997, Claes et al. 2002, Claes et al. 2003, Wolf et al. 1998). Zur allgemeinen Beurteilung der Belastung der Extremität sind Kenntnisse über die Höhe der auftretenden Komponenten der Bodenreaktionskraft für die Einschätzung der im Frakturspalt herrschenden Lastgrößen und der Lastwechselhäufigkeit nicht unbedeutend. Ganganalytische Untersuchungen an der Ratte konnten zeigen, dass vertikale Bodenreaktionskräfte der rechten Hinterläufe von 80% des Körpergewichts und medio-laterale Bodenreaktionskräfte von bis zu maximal 20% des Körpergewichts auftraten. Für die horizontalen Bodenreaktionskräfte wurden in der Bremsphase 16% des Körpergewichts und in der Beschleunigungsphase 9% des Körpergewichts gemessen (Muir und Wishaw 1999). Eine spätere Untersuchung bestätigte die Resultate für die vertikalen Bodenreaktionskräfte (86% rechter, 77% des Körpergewichts linker Hinterlauf). Angaben für die medio-laterale Ebene fanden sich nicht (Howard et al. 2000). Die auf die Tibia wirkenden Kräfte sind mit denen der Belastungsmuster der Schafstibia vergleichbar, wobei Zugkräfte auf die anteriore und Druckkräfte auf die posteriore Tibiaseite wirken.

### *Frakturmodell*

Um die zugrunde liegenden Fragestellungen zur Frakturheilung mit assoziiertem Weichteilschaden bearbeiten zu können, wurden die Frakturen mit einem modifizierten Modell nach Bonnarens (Bonnarens und Einhorn 1984) hergestellt. Dieses Guillotine-Verfahren der 3-Punkt-Biegung besitzt den Vorteil einer hohen Reproduzierbarkeit bezüglich der Lokalisation und dem Schweregrad des Traumas. Mit allen Tibiafrakturen ging eine Fibulafraktur einher. Diese Assoziierung ist für den Heilungsverlauf der Tibia von Bedeutung, da sich im Falle einer intakten Fibula die mechanischen Bedingungen im tibialen Frakturspalt verändern und in Folge dessen die Wiederherstellung der ossären Integrität beeinflussen (Beck et al. 2000). Der in die Guillotine integrierte fixe Freiraum von 3,5 mm sorgte für eine geschlossene Fraktur der Tibia. Ein kleinerer Freiraum hätte neben der Fraktur zu Zerreißungen

der umgebenen Haut und der muskulären Strukturen führen können. Als Konsequenz wäre eine offene Fraktur aufgetreten, die gegenüber einer geschlossenen Fraktur eine wesentlich schlechtere Heilungsprognose hat (Grundnes und Reikeras 1992) und nicht im Fokus des Studiendesigns gelegen hätte. Des Weiteren konnte das Verletzungsrisiko der an der Frakturstelle angreifenden Muskulatur minimiert werden. Ferner ist eine geschlossene Fraktur gut standardisierbar. Von einer Osteotomie wurde abgesehen, da sie vor dem Hintergrund der klinischen Fragestellung ein weniger geeignetes Frakturmodell darstellt.

Mit der Frakturversorgung durch die intramedulläre Nagelung wurde der klinisch am häufigsten angewendeten Methode der Frakturstabilisierung Rechnung getragen. Die Implantation des Drahtes mittels unaufgebohrter Technik ist akzeptiert und von der AO/ASIF empfohlen (Krettek 2001). Ferner ist die Verwendung der unaufgebohrten Marknagelung insbesondere bei additivem Weichteilschaden aufgrund der frakturfernen Einbringung und Schonung des Weichteilgewebes ein klinisch etabliertes Verfahren (Krettek 1998). Der Vorteil der Marknagelung gegenüber einer Fixateur externe Versorgung besteht im Wesentlichen in der hohen axialen Stabilität und in einem weitaus geringeren Infektionsrisiko (Chao und Aro 1992). Bezüglich der Beeinflussung der Knochenvascularität sind beide Verfahren zur Frakturstabilisierung kritisch zu betrachten. Das Einbringen des Marknagels zerstört zwangsläufig Strukturen der medullären Gefäßversorgung. Ein zusätzliches Aufbohren des Markraumes wurde nicht durchgeführt, da es zu einer Zerstörung der endostalen Gefäße führt. Ein dramatischer Rückgang der Perfusion des Knocheninneren sowie Nekrosen der ossären Strukturen wäre die Folge. Das Problem auftretender Fettembolien wird ebenfalls durch die Verwendung der unaufgebohrten Technik minimiert (Buttaro et al. 2002, Krettek 2001, O'Sullivan et al. 1989, Smith et al. 1987). Der zweite eingebrachte wesentlich kürzere Marknagel sollte gerade in der frühen Heilungsphase, in der die Ratte bereits wieder bewegungsaktiv war, dem Frakturspalt eine zusätzliche Rotationsstabilität geben, da eine fehlende Stabilität gegenüber Rotationsmomenten den Heilungserfolg negativ beeinflusst (Kenwright und Goodship 1989, Molster et al. 1982, Molster 1984). Der Fixateur externe zerstört seinerseits kortikale und periostale Gefäßstrukturen an den Eintrittsstellen der Schrauben im proximalen und distalen Frakturfragment und kann die ossäre Durchblutung im Knochen nachhaltig stören. Allerdings bleibt bei dieser Art der

Fixation die nutritive Zirkulation im Heilungsgebiet unbeeinflusst und kann unter dieser Bedingung als das Verfahren mit der geringsten vaskulären Beeinflussung angesehen werden.

### *Modell Weichteilschaden*

Für die Herstellung des Weichteilschadens wurde ebenfalls das modifizierte Guillotine-Verfahren nach Bonnarens (Bonnarens und Einhorn 1984) verwendet. Der plane Amboss und Stempel führten zu einem stumpfen geschlossenen Weichteiltrauma, ohne dabei eine Fraktur der Tibia oder Fibula zu erzeugen. In dieser Versuchsgruppe war das Ziel, einen umfassenden Schaden der Weichteilstrukturen herzustellen und somit dem klinischen Bild einer umfassenden Muskelkontusion nahe zu kommen. Im Gegensatz zu bisherigen Studien (Mittlmeier et al. 2003, Schaser et al. 1999) wurde auf eine selektive Auswahl der zu verletzenden Muskeln verzichtet. Stattdessen wurde die gesamte Wadenmuskulatur auf einer definierten Höhe in transverser Ausrichtung gequetscht, um sicherzustellen, dass die vom Weichteilmantel ausgehende periostale Blutversorgung gestört wurde. Es wurde dabei nicht nur der antero-laterale Muskelmantel gequetscht, sondern auch die medialen Weichteile mit dem angrenzenden Periost traumatisiert. Die Aufprallgeschwindigkeit lag bei 5,94 m/s. Voruntersuchungen konnten zeigen, dass geringere Aufprallgeschwindigkeiten zwar oberflächliche Einblutungen erkennen ließen (vergleichbar mit GI der Oestern und Tscherne-Klassifikation), jedoch keine schweren Verletzungen der Muskelstrukturen und tiefe Einblutungen hervorriefen. Ein ausreichender Weichteilschaden war auch auf mikroskopischer Ebene nicht nachzuweisen. Demgegenüber konnte mit einer Aufprallgeschwindigkeit von 5,94 m/s ein nachhaltiger Weichteilschaden gesetzt werden, der dem Grad II der Klassifikation von Oestern/ Tscherne (Oestern und Tscherne 1983) entsprach. Eine Grad III Verletzung lag nie vor, da bei keinem Versuchstier ein manifestes geschlossenes Kompartmentsyndrom auftrat. Zudem konnten Hinweise auf ein Kompartimentsyndrom für jedes Versuchstier aufgrund der zügig einsetzenden Revaskularisierung und den vorgenommenen qualitativen Beobachtungen ausgeschlossen werden. Generell sollte ein Kompartimentsyndrom strikt vermieden werden, da eine zusätzliche intramuskuläre Druckerhöhung eine verminderte Mikrozirkulation in einer einhergehenden irreversiblen Störung der neuromuskulären

Funktion induziert (Matsen et al. 1980) und den postischämischen Gewebeschaden verstärkt (Heppenstall et al. 1986, Heppenstall 1997). Dynamische Blutflussmessungen sind unter diesen Bedingungen unmöglich (Schaser et al. 1999). Eine weitaus höhere Aufprallgeschwindigkeit mit 7 m/s favorisierten hingegen andere Forschergruppen (Mittlmeier et al. 2003, Schaser et al. 1999, Zhang et al. 2003), die jedoch unter der vorliegenden methodischen Vorgehensweise in der Regel zu einer Fraktur der Fibula und je nach Lagerung auch der Tibia geführt hätte. Zudem wurden unter diesen Bedingungen häufig offene Weichteilschäden generiert.

Im Vergleich zu den bisher bekannten Modellen (Crisco et al. 1994, Jarvinen et al. 1975, Rushton et al. 1997, Schaser et al. 1999, Smith et al. 1993, Zhang et al. 2003) zur Erzeugung eines Weichteilschadens ist mit dem vorgestellten Modell eine hohe Reproduzierbarkeit bei leichter Handhabung gegeben. Auch das Ausmaß des Einwirktraumas lässt sich durch die Variabilität der zu verändernden Fallhöhe und des Fallgewichts sehr gut steuern. Entgegen der Argumentation von Zhang (Zhang et al. 2003), die eine selektive Muskelkontusion in der Frakturheilungsfrage favorisieren, muss unter dem Aspekt einer notwendigen klinischen Relevanz auf eine umfassende Schädigung des Weichteilmantel hingewiesen werden (Oestern und Tscherner 1983). Crisco (Crisco et al. 1994) setzten mittels eines Zylinders ein Weichteiltrauma, das für die eingangs gestellten Fragestellungen aufgrund der kleinen Applikationsfläche (Durchmesser 6,4 mm) keine Relevanz besitzt.

Der Untersuchungszeitraum von 14 Tagen wurde in Anlehnung an die in der Literatur beschriebenen Regenerationszeiten festgelegt (Carlson 1983, Carlson und Faulkner 1983).

### *Laser Doppler Flowmetrie*

Blutflussveränderungen wurden mit der Methode der Laser Doppler Flowmetrie (LDF) eruiert. Hierbei handelt es sich um ein nicht invasives Verfahren, das eine kontinuierliche Erfassung von bewegten Erythrozyten im Gewebe ermöglicht. Im Gegensatz zum Verfahren der Laser Doppler Perfusion Imaging, bei dem große Gewebsflächen untersucht und als deskriptive Bildbeschreibung dargestellt werden können (Chan et al. 1999, Couffinal et al. 1998, Linden et al. 1995), beschreibt die LDF ausschließlich den veränderten Blutfluss eines relativ kleinen Gewebeabschnittes. Gleichzeitig ist es das mit am häufigsten eingesetzte Verfahren

zur Evaluierung von Perfusionsveränderungen in Geweben und Organen (Kuznetsova et al. 1998).

Zur Messung wurde der Sensorkopf auf die dünne Haut direkt über der Knochenoberfläche oder auf die kutane Schicht des Muskels gesetzt. Als vorteilhaft erwies sich der leicht zu bewegenden Messkopf mit dem mehrere Gewebeabschnitte flowmetrisch in einer kurzen Zeitsequenz (<3 Min.) untersucht werden konnten, so dass der zeitliche Einfluss von möglichen Blutflussveränderungen minimiert wurde. Das Wiederauffinden der Messpunkte wurde im postoperativen Zeitpunkt und nach dem ersten Tag mittels Filzstiftmarkierung gewährleistet. Zu späteren Messzeitpunkten orientierte sich der Untersucher am Frakturspalt, der periostalen Kallusbildung und an den muskuloskeletalen Strukturen. Aufgrund der beobachteten und in der Literatur beschriebenen hohen biologischen Variabilität im Durchblutungsverhalten einzelner Versuchstiere (Johnson et al. 1984) wurden die Perfusionsänderungen im postoperativen Zeitraum prozentual auf das individuelle präoperative Niveau normiert. Beim Vergleich zwischen den verschiedenen Lokalisationen und bei Interpretationen der Blutflussergebnisse ossärer Messlokalisationen muss berücksichtigt werden, dass die kortikalen Wandstärke von proximal nach distal abnimmt und damit der medulläre Blutfluss einen größeren Anteil im distalen Gesamtergebnis als im proximalen Tibiaabschnitt einnehmen kann. Um eine akzeptable Reproduzierbarkeit der Messergebnisse zu erreichen, wurde ein Messkopfhalter entwickelt. Eine Federeinrichtung, die mit dem Messkopf verbunden war, erzeugte einen standardisierten Anpressdruck auf der Gewebeoberfläche ohne die Blutzirkulation der darunter liegenden Strukturen signifikant zu beeinflussen. Ferner zeigten Vorarbeiten, dass sich bei Variation des Anstellwinkels des Messkopfes auf der Hautoberfläche Messartefakte ergeben. Hierbei erwies sich ein Anstellwinkel von 90° auf der Messoberfläche als jener Winkel, der die geringsten Messwertschwankungen erzeugte. Die durch das manuelle Halten des Messkopfes (3 cm Länge) hervorgerufenen Messwertschwankungen konnten durch den Einsatz des Messkopfhalters (13 cm) minimiert werden. Der Maßnahmenkatalog setzte den Reproduzierbarkeitsfehler auf <12% herab.

Ein grundsätzliches Problem bei der Interpretation von Laser Doppler Flowmetrie Untersuchungen ist die Validität der Ergebnisse. Eine gewichtende Einschränkung der verwendeten Methode liegt in der Vernachlässigung von Shuntflow bzw. Reflux-Phänomenen und der Unterscheidung der Erythrozytenbewegung in den prä- und

postkapillären Gefäßen. Weiterhin unterliegt das Blutflusssignal den durch Druckgradienten und Strömungswiderstand hervorgerufene vaskulären Tonusänderungen, die als solche nicht aus dem resultierenden Signal zu quantifizieren sind. Zudem können infolge von Gewebszerstörungen freigesetzte lokale Mediatoren der immunologischen Antwort den vasomotorischen Gefäßzustand verändern. Unter Berücksichtigung dieser genannten Bedingungen ist der in dieser Arbeit verwendete Terminus „Blutfluss“ als Maß der relativen Gewebsdurchblutung zu verstehen.

Eine direkte Vergleichbarkeit von LDF-Ergebnissen mit Resultaten anderen Blutflussmeßmethoden ist bisher nicht nachgewiesen. Untersuchungen im Muskel und Knochengewebe zwischen der <sup>133</sup>Xe Clearance-Technik (Montiero et al. 1989) und der <sup>85</sup>Sr Microsphere-Technik (Lausten et al. 1993, Swiontkowski et al. 1986, Swiontkowski et al. 1988) und LDF-Messungen zeigten keine Korrelation. Vorstudien ergaben, dass die kommerziell erworbene Laserdioden Technik in zwei differenten Gewebetiefen Erythrozytenbewegungen detektieren konnte. Anwendungsmöglichkeiten im Knochen (2 mm) und im Weichteilgewebe (2 bzw. 6 mm) erlaubten eine differenzierte Betrachtungsweise des Blutflusses. Einschränkend bezüglich der Ergebnisinterpretation muss auf die Abhängigkeit der Penetrationstiefe von der Gewebestruktur hingewiesen (je mehr kalzifiziertes Material, desto größer die Absorption des Laserlichts, was mit einem geringeren Messsignal einhergeht) werden. Nötzli et al. (Notzli et al. 1989) konnte in einem ähnlich fokussierten Experiment sogar eine Eindringtiefe, die sog. „threshold thickness“, im trabekulären von 3,5 mm und im kortikalen Knochen von 2,9 mm feststellen. In einer weiteren Studie ließ sich der Blutfluss bis zu einer Gewebetiefe von 2,43 mm messen, was nach Autorenmeinung für die klinische Anwendung ausreichend ist (Schemitsch et al. 1994).

Die Festlegung der ossären Messpunkte erfolgte nach den differenten anatomischen Gegebenheiten mit der von proximal nach distal abnehmenden tibialen Weichteilummantelung. Die Blutflussuntersuchung im Muskelgewebe diente der Bestimmung der initialen Traumaschwere und der Wiederherstellung der physiologischen Blutflusssituation innerhalb der ablaufenden Regenerationsprozesse. Allerdings reichte die Sensitivität des Messsystems nicht aus, um Veränderungen in den sub- und extraperiostalen Gefäßstrukturen des Muskels voneinander zu detektieren. Während beide vaskulären Areale unter

physiologischen Bedingungen keinen Einfluss auf die lokale Durchblutung des Muskels haben, ist nach einer Kontusion mit traumatisierter extraperiostaler Schicht der Blutfluss im Muskel stark vermindert. Die Muskelblutzirkulation nach traumatisierter subperiostalen Schicht bleibt dagegen unbeeinflusst (Whiteside et al. 1978).

### *Gefäßvisualisierung und -quantifizierung*

Die Visualisierung von Gefäßstrukturen konnte mit der Weiterentwicklung der Computertomographie, enormen Rechnerkapazitäten und innovativer Softwareentwicklung in den letzten zwei Dekaden erheblich verbessert werden. Durch diese verbesserte Technik entwickelte sich aus der zweidimensionalen (Cavadias et al. 1965, Macnab und de Haas 1974, Rhinelande et al. 1968, Rhinelande 1979, Trueta 1974, Zucman 1960) die dreidimensionale Darstellung (Bachmann et al. 1993, Herman 2000, Kalender et al. 2000, Redaelli et al. 2002). Während sich mit der bildhaften Wiedergabe Gefäßstrukturen in 2 Dimensionen die räumlichen Komplexität nur sehr unzureichend darstellen lässt, erlaubt die dreidimensionale Veranschaulichung neben dem Einblick in die räumliche vaskuläre Verteilung eine präoperative Simulation von Operationen an Gefäßstrukturen (Katthagen et al. 1995).

Die Gefäßdarstellung erfolgte durch die Einleitung der Kontrastmittellösung Barium-Sulfat (Erol et al. 1980). Bei der applizierten Micropaque Lösung lag der Hauptanteil der Partikelgröße (>85%) in einer Größenordnung von 0,8-1,3  $\mu\text{m}$ , kleinere Anteile (<20%) bei <0,5  $\mu\text{m}$  und die größten Partikel (>2  $\mu\text{m}$ ) anteilig bei <15%. Jedoch kann bei diesen Partikelgrößen nicht davon ausgegangen werden, dass kleinste Gefäßstrukturen vollständig angefärbt werden, da humane Arteriolen einen Durchmesser von etwa 5  $\mu\text{m}$  aufweisen (Thews und Vaupel 1997) und die kapillären Strukturen bei der Ratte noch wesentlich kleiner sind. Klug (Klug 1986) konnte in einem Kaninchenexperiment mit 1-3  $\mu\text{m}$  großen Bariumsulfatpartikeln eine Anfärbung bis zu einem Gefäßdurchmesser von größer als 0,1 mm nachweisen. Mit der festgelegten Perfusionsgeschwindigkeit von 99,9 ml/Stunde konnte auch im Fall eines frühzeitig eintretenden Exodus des Versuchstieres während der Mikropaque-Injektion eine Ganzkörperperfundierung erreicht werden. Der Erfolg war qualitativ mit dem Austritt des Kontrastmittels aus dem venösen Schenkel bestimmbar. Eine im

Vorfeld durchgeführte experimentelle Untersuchung zeigte keine qualitativen Unterschiede zwischen einer Einleitung in den infrarenalen Abschnitt der Aorta abdominalis und der Infusion in die Aorta femoralis (Bumann et al. 2002). Um mögliche größere Artefaktsignale in der qualitativen Beurteilung und bei der Gefäßquantifizierung auszuschließen, wurden vor der Einleitung die in der aufgezogenen Lösung verbliebenen Lufteschlüsse manuell minimiert.

Die auf die 3D-Illustration aufbauende Quantifizierung des Gefäßvolumens wurde prozentual im Rechts-Links-Vergleich, verletztes gegen intaktes Bein, durchgeführt. Die Beschränkung auf nur ein Versuchstier pro Messzeitpunkt und die Schwierigkeit valide Berechnungskriterien zu finden, lassen nur sehr vorsichtige Aussagen über die gemessenen Volumina zu. Trotz eines definierten Schwellenwerts, der die Trennung der mit Barium-Sulfat gefüllten Gefäßstrukturen von Hintergrund gewährleistet, wurde einheitlich auf den dimensionslosen Wert von 50 gesetzt. Dadurch wurde sichergestellt, dass die Segmentierung der Gefäßstrukturen auf einer objektiven Grundlage erfolgte. Gleiches galt für die aus den gewonnenen CT-Datensätze quantitativ bestimmte Angiogenese. Insbesondere das Extrahieren ossärer Strukturen (Segmentation) und die teilweise unzureichend definierbaren Grenzflächen zwischen weißen und schwarzen Voxelgrenzen führen zu einem subjektiven empirisch geprägten Auswertemodus (Redaelli et al. 2002). Auch der definierte Grauwertfilter kann dieses Problem nicht adäquat lösen, da mit unterschiedlichen Filterwerten entweder mehr oder weniger mit Micropaque gefüllten Gefäßstrukturen quantifiziert werden können. Problematisch für die Volumenberechnung ist neben den Lufteschlüssen der mögliche Übertritt der Mikropaque-Lösung in das Gewebe und kleinste Knochenabsplitterungen, die als Folge des Frakturgeschehens im CT-Bild nur schwer von großen Gefäßstrukturen zu unterscheiden sind. Anhand der CT-Schnittbildaufnahmen kann insbesondere bei kleineren von der Anatomie abweichenden Strukturen schwer zwischen tatsächlichem Gefäß und einer Akkumulation von Barium-Sulfat Lösung differenziert werden. Die limitierte örtliche Auflösung seitens des verwendeten Mikro-Computertomographen ist für die präsentierten Datensätze unerheblich, da jedes Präparat mit der gleichen Parametereinstellung gescannt wurde und der Einfluss eines systematischen Fehlers akzeptiert wurde. Beim Vergleichen mit anderen Ergebnissen muss allerdings diese gewählte Parametrisierung berücksichtigt werden.

## *Biomechanik*

Zur Beurteilung des Heilungserfolges wurde als primäres Kriterium ein mechanischer Test in Dreipunktbiegung durchgeführt. Dieser gab Aufschluss darüber welche Güte die Überbrückung des Frakturspaltes erreicht hatte. Diese Güte hing von der heterogenen Zusammensetzung der in die Frakturlinie eingewachsen Gewebestrukturen ab. Da die physiologische Beanspruchung der langen Röhrenknochen bei Ratten als auch bei Mensch und Schaf weitgehend aus Biegung und Druck besteht (Martin et al. 1989, Pauwels 1973), wurde in dem vorliegenden Experiment zur Bestimmung der Biegesteifigkeit eine Biegeprüfung durchgeführt.

Zur Biegesteifigkeitsprüfung bot sich einerseits die Vier-Punkt Biegung andererseits die Drei-Punkt Biegung an. Die angewandte Prüfung wurde mittels Drei-Punkt Biegung durchgeführt, da sich bei der Vier-Punkt Biegung aufgrund der kürzeren Hebelarme die anteilig wirkenden Scherkräfte erhöhen. Da veränderte Hebelverhältnisse das Prüfergebnis bei der Drei-Punkt Biegung überaus stark beeinflussen können, musste bei der unilateralen Einbettung des proximalen Tibiaendes stets darauf geachtet werden, dass das Präparat zentral in vertikaler Ausrichtung eingebracht wurde. Nach einer exakten Positionierung des distalen Tibiaendes auf dem Auflager erfolgte eine Vorbelastung der Tibia von 5 N. Mit der durchgeführten Konditionierung wurde eine verbesserte Präparatepositionierung erreicht. Dabei zeigte die aufgebrachte Kraft von <5 N keine Auswirkungen auf die Materialeigenschaften des Frakturbereichs.

## ERGEBNISSE

### *Durchblutungssituation im Weichteilgewebe und in ossären Strukturen nach isoliertem Weichteilschaden*

Das Ausmaß des Weichteilschadens wurde nebst der Blutflussuntersuchung mittels qualitativer Beurteilung der Schwellungscharakteristika bestimmt. Im postoperativen Stadium konnte im Wesentlichen ein starkes Einbluten im gesamten lateralen Areal beobachtet werden. Auf der medialen Seite kam es ebenfalls zu Einblutungen, die jedoch aufgrund des kleineren Gewebevolumentums geringer ausfielen. Die Ödembildung erreichte am ersten und dritten postoperativen Tag ihren Höhepunkt und war nach dem 7. Tag nicht mehr nachweisbar. Die Beobachtungen zeigen die hohe resorptiven Kapazität des Rattenorganismus und stehen im Einklang mit anderen Studienergebnissen (Barlow und Willoughby 1992, Crisco et al. 1994, Schaser et al. 1999). Einschränkend soll an dieser Stelle auf die unterschiedliche Regenerationspotenz schneller und langsamer Muskelfasern hingewiesen werden (Bassaglia und Gautron 1995) durch die eine Heterogenität in der Ödembildung und auch in der Blutflussquantität nicht auszuschließen ist.

Die temporäre Wiederherstellung der Durchblutungssituation im traumatisierten Muskel folgte dem physiologischen Ablauf der Inflammation, Reparation und dem Remodelling bei Muskelverletzungen (Barlow und Willoughby 1992, Buckwalter et al. 1996). Die mit der Muskelkontusion einhergehenden Verschlechterungen der Hämodynamik und der Blutflussreduktion sind mit Gefäßzerreisungen und Gefäßbeschädigungen zu erklären. Vor allem die Abnahme der kapillären Perfusion, die Zunahme der Leukozyten-Endothelialzell-Interaktion kann im frühen postoperativen Stadium (<24 Std.) ein Nekroserisiko für das traumatisierte Gewebe und in den angrenzenden Gewebsbereichen induzieren (Schaser et al. 1999) Die beschriebenen Blutflussveränderungen stimmen in hohem Maße mit anderen Studien überein (Menth-Chiari et al. 1999, Szczesny et al. 2001) und unterstreichen die Annahme, dass nach 24 Stunden nur 50% der initial durchströmten Kapillaren

reperfundiert sind (Menger und Messmer 1993) Die am 3.Tag vorherrschende Hyperperfusion ist als Zeichen des eingeleiteten Regenerationsprozesses zu verstehen, der mit der Normalisierung der Mikrozirkulation assoziiert ist (Menth-Chiari et al. 1999). Ferner lassen sich auf histologischer Ebene durch zahlreiche von Mitochondrien umgebenen regenerierenden Muskelzellen, in das traumatisierte Muskelgewebe einwandernde Satellitenzellen und durch eine hohe Fibroblastentätigkeit nachweisen (Fisher et al. 1990). Auch auf zellulärer Ebene konnten in einer anderen Studie B-FGF, IGF-1 und NGF als potente Stimulatoren für die Proliferation von Myoblasten markiert werden (Menetrey et al. 2000). Eigene parallel zur LDF-Messung durchgeführte histologische Untersuchungen zeigten ebenfalls einen starken Anstieg der VEGF-Expression am dritten Tag, der als Indikator für eine wiedereinsetzende Durchblutung bewertet werden kann.

Dass die vollständige Wiederherstellung der Gewebeintegrität der Muskulatur nach der zweiten postfraktären Woche abgeschlossen sein soll (Fisher et al. 1990, Jarvinen et al. 1975, Tischler et al. 1983), konnte mit den vorliegenden LDF-Ergebnissen weder in den intermediären Muskelschichten noch in den tiefliegenden Gewebsregionen nachgewiesen werden. Der von uns beobachtete verlängerte Heilungszeitraum könnte mit der altersabhängigen Regenerationspotenz der Versuchstiere oder Differenzen in der postoperativen Phase bezüglich des Aktivitätsniveaus erklärt werden (Brookes und Revel 1997, Jarvinen 1976, Jarvinen et al. 1982). Ein anderer in der methodischen Vorgehensweise begründeter Erklärungsansatz wäre, dass im vorliegenden Tierexperiment nicht selektiv ein kleines Muskelareal traumatisiert wurde, sondern großflächig und bilateral der knöchernen Struktur ein Weichteilschaden appliziert wurde. Zudem konnte eine assoziierte Verletzung des periostalen Gewebes nicht gänzlich ausgeschlossen werden. Die daraus entstandene erhebliche Traumaschwere könnte ein weiterer Grund für die verzögerte Heilung sein, da vor allem in der Gewebetiefe an der Grenzfläche zwischen Muskel und Knochen (Eindringtiefe von 6 mm) ein erhöhter Blutfluss messbar war. Darüber hinaus kann nicht aus den Blutflussunterschieden in der superfascialen und den tiefen Muskelschichten auf eine von außen nach innen ablaufende Gewebeheilung geschlossen werden. Allerdings zeigten Fisher (Fisher et al. 1990) in einer histologischen Studie, dass bereits nach 6 Tagen 80% des verletzten Muskelgewebes wiederhergestellt war und eine schwache Heilungsrichtung von innen nach außen zeigten. Exakte räumliche Ausprägungen

des Heilungsverlaufes wurden allerdings nicht beschrieben. Eigene histologische Untersuchungen konnten ebenfalls keine Heilungsrichtung beschreiben.

Die gemessenen Blutflussveränderungen in den unterschiedlichen ossären Abschnitten erscheinen auf den ersten Blick unverständlich. Während der proximale Messpunkt am 1. Tag eine erhebliche Reduktion des Blutflusses von mehr als 50% zeigt, ist die kortikale Perfusion mittig der Tibia nach Trauma mit 32% vermindert. Im Gegensatz dazu konnte im distalen Messpunkt nach 24 Stunden keinerlei Reduktion mehr gemessen werden. Die Tatsache, dass die innere Kortikalis einerseits aus dem medullären Raum mit Blut und die äußere kortikale Schicht durch die periostale Arteriolen versorgt wird, könnte darauf eine Antwort sein. Diese nutritive Verbindung ist jedoch nur bei am Knochen anliegenden Muskelfaszien existent (Rhineland 1972). Diese Muskel-Periost-Knochen Verbindung soll für die vorliegenden Ergebnisse erklärend dienen (Richards und Schemitsch 1989, Utvag et al. 1998). Hierbei ist die Perfusion in der proximalen Kortikalis im Vergleich zu den übrigen Messpunkten am meisten von der periostalen Blutversorgung aufgrund des massiven existierenden Muskelmantels abhängig. Da der proximale Messpunkt unterhalb der Epiphysenfuge lag und den tibialen Zugang der Arteria nutritia nicht berührte, kann eine eventuelle Ergebnisbeeinflussung dieser Gefäßstruktur ausgeschlossen werden (Macnab und de Haas 1974). Die Auswirkungen einer reflektorischen Minderblutung des Verletzungsgebietes aufgrund des umfassenden Traumas ist zu vernachlässigen, da eine solche Maßnahme generell in einem kürzeren Zeitfenster als 24 Stunden eingeleitet wird (Menger und Messmer 1993). Dagegen könnten die geringer ausfallende Blutflussreduktion im mittleren Abschnitt (-32%) und die unbeeinflusste Durchblutung (0-5%) der distalen Tibia mit der Quantität des Knochen umgebenden Weichteilgewebes stehen. Ob die im Muskelgewebe ablaufenden Reparations- und Remodellingprozesse ebenfalls einen Einfluss auf die kortikale Durchblutungssituation haben, kann nicht abschließend geklärt werden. Warum in diesem Fall die kortikalen Strukturen im proximalen Segment der Diaphyse einer verminderten Perfusion unterliegen, ist möglicherweise auf lokale Umverteilungen des zirkulierenden Blutes zugunsten der regenerativen Prozesse im distal gelegenen traumatisierten Muskelgewebe zurückzuführen. Hinweise auf einen derartigen Zusammenhang sind bisher in der Literatur nicht beschrieben.

## *Gefäßvisualisierung und -quantifizierung*

Mit der präsentierten Realisierung der 3D-Gefäßdarstellung konnte auch am Tiermodell die örtliche Vaskularität aus allen Richtungen dargestellt werden. Diese qualitative Beschreibung reichte jedoch nicht aus, um die Angiogenese nach Fraktur objektiv zu bestimmen.

Unsere Ergebnisse der Gefäßquantifizierung lassen keinen unmittelbaren Rückschluss auf die Angiogenese zu. Auch kann keine Orientierung der Angiogenese im Frakturkallus und den umgebenden Gebieten nachgewiesen werden. Bemerkenswert sind jedoch die Ergebnisse des 3. und 7. Tages. Sie deuten daraufhin, dass trotz des schweren Traumas die Menge an mit Micropaque gefüllten Gefäßvolumen dem der normalen Situation entspricht. Als Erklärung dafür könnte neben der Bildung von kollateralen Gefäßen möglicherweise auch eine Vasodilatation der intakten Gefäße sein. Am Tag 14 scheinen Gefäßneubildungen, die Wiederherstellung der zerstörten Gefäßstrukturen und eine starke systemische Stimulation der Heilungsprozesse für den hohen quantitativen Gefäßwert verantwortlich zu sein. Dieser Sachverhalt wird durch die Ergebnisse der flowmetrischen Untersuchung bestätigt.

Bisherige Studien konnten ebenfalls keine validen Quantitäten für eine Angiogenese nach einer Fraktur bestimmen. Neben den Pionierarbeiten zur Darstellung der Gefäßneubildungen nach einem Frakturereignis (Macnab und de Haas 1974, Rhinelander et al. 1968, Rhinelander 1972, Rhinelander 1974, Trueta 1974, Zucman 1960) konnte mittels CT-Datensätze eine medulläre Gefäßeinsprossung mit Frakturspaltausrichtung ohne eine Quantifizierung vorzunehmen bestimmt werden (Inoue et al. 2001). Klug (Klug 1986) berichtete über einen semiquantitativen Hinweis auf die Vaskularisation im Kallusgebiet. Er wies nach Barium-Sulfat Injektion durch Gefäßauszählungen an Röntgenbilder nach, dass die Quantität von Gefäßeinsprossungen in der Heilung auf einer 2 cm<sup>2</sup> großen Kallusfläche von 0 (Tag 1) auf 14 Gefäße (Tag 21) anstieg und eine Ausrichtung parallel zur Knochenachse im zeitlichen Fortlauf der Heilung erkennbar war. Mit der am 28. Tag beginnenden Gefäßanastomose nahm die Anzahl der Gefäße ab, dafür aber die Gefäßverbindungen in Richtung des medullären Kanals und der Querschnitt der Gefäße zu. Angaben auf veränderte Gefäßvolumina wurden nicht beschrieben.

Auch in histologischen Studien wurde versucht, die Angiogenese im Heilungsverlauf nach Fraktur zu bestimmen. Dabei konnten Claes et al. (Claes et al. 2002, Claes et al. 2003) eine unterschiedliche Gefäßverteilung innerhalb des Frakturkallus nachgewiesen, ohne dabei die veränderte Gefäßvolumina bestimmen.

Quantitative Aussagen über die Angiogenese mittels Kontrastmitteluntersuchungen zu treffen, ist in der vorliegenden Methodenstudie durch unzureichende Problemlösungen bei der Auswertungsmethode und mit der minimalen Anzahl von einem Versuchstier nur schwer möglich. Vor allem die möglichen Unterschiede bezüglich des Frakturausmaßes und die Höhe der Perfundierung durch die Mikropaque-Lösung tragen zu dieser Beurteilungsproblematik bei und erlauben keine Vergleiche weder innerhalb einer Versuchsgruppe noch zwischen den Versuchsgruppen.

Aus diesem Grund konnte keine Korrelation zwischen dem Gefäßvolumen und den Daten der Blutflussmessung bestimmt werden. Einen Einfluss auf den Zusammenhang kann ferner der Untersuchungszeitpunkt haben, lag doch ein Zeitfenster von 75 ( $\pm 7$ ) Minuten zwischen der Blutflussmessung und der endgültigen Mikropaquefixierung durch das Formalin.

## *Einfluss eines Weichteilschadens auf die Frakturheilung*

### **Generelle Überlegungen**

Die Ergebnisse des biomechanischen Tests konnten keinen signifikanten Unterschied im Heilungsprozess zwischen den Gruppen „isolierte Fraktur“ und „Fraktur mit Weichteilschaden“ nach einem Heilungszeitraum von vier Wochen nachweisen. Eine Untersuchung mit vergleichbarem Studiendesign kam zu gleichen Ergebnissen und konnte ferner bei der untersuchten Kallusfläche ebenfalls keine Unterschiede finden (Utvag et al. 2003). Allerdings deuten klinische Erfahrungen und Studien auf ein Korrelat zwischen der Schwere eines Weichteilschadens und einer verzögerten Frakturheilung hin (Kuznetsova et al. 1998, Oestern und Tschernke 1983, Rommens et al. 1992).

Das Outcome einer Fraktur ist von zahlreichen temporären, parallel und seriell ablaufenden Regenerationsprozessen geprägt. Neben den mechanischen Umgebungsbedingungen ist eine suffiziente Blutversorgung für einen erfolgreichen Heilungsverlauf essentiell (Einhorn 1992, Einhorn 1995, Glowacki 1998, Hulth 1989,

McKibbin 1978). Es gilt als gesichert, dass eine gegenseitige Abhängigkeit von Mechanik und Blutversorgung besteht (Brinker und Bailey 1997, Chidgey et al. 1986, Claes et al. 2002, Claes et al. 2003, Grundnes et al. 1992, Hankemeier et al. 2001, Hausman et al. 2001, Wallace et al. 1994). Im Falle der mit einem Weichteilschaden assoziierten Tibiafraktur ist vor allem die Erkenntnis über die Wege der posttraumatischen Blutversorgung und deren Quantitäten interessant. Bei Frakturen ohne Weichteilschaden erfolgt die nutritive Versorgung insbesondere in der initialen Heilungsphase über die Muskel-Periost Verbindungen, auch als „periostale oder extraossäre Blutversorgung“ bezeichnet (Rhineland 1974, Trueta 1974). Bei einer Fraktur mit Schädigung des umliegenden Weichteilgewebes einschließlich des Periosts ist davon auszugehen, dass die periostale Versorgung des Frakturkallus gestört ist. Tatsächlich tritt eine signifikante Heilungsverzögerung durch das Sezieren der Grenzfläche von Periost und Muskulatur auf (Whiteside et al. 1978). Eine neuere Untersuchung zeigte nach einer separaten Durchtrennung der sub- und extraperiostalen Grenzflächen keinen heilungsverzögerten Einfluss, während bei einer eingebrachten Folie als künstliche Barriere zwischen Periost und Muskel die Heilung ausblieb (Utvag et al. 1998). Vor allem scheint für den Heilungsprozess eine intakte Muskel-Periost Verbindung gerade im Initialstadium eine herausragende Bedeutung zu besitzen (Utvag et al. 1999). Alleiniges Entfernen des Periosts führt zu einer signifikanten Reduktion des Blutflusses im Kallusgebiet, welches mit einer schlechteren Heilung einhergeht (Grundnes und Reikeras 1993, Utvag et al. 1996). Eine traumatische Kopplung der nutritiven Hauptversorgungszugänge, ein Ablösen des Periosts mit gleichzeitiger medullärer Aufbohrung, induziert eine signifikante Minderung der nutritiven Versorgung in der Epiphyse. Dagegen konnten im metaphysären und diaphysären Bereich keine Veränderungen beobachtet werden (Whiteside et al. 1977). Die vorliegenden Erkenntnisse weisen daraufhin, dass bei der hergestellten Fraktur mit Weichteilschaden die Knochen-Periost Verbindung der medialen wie auch das Muskel-Periost-Knochen Konstrukt auf der lateralen Seite trotz der applizierten Traumaschwere aufgrund des guten Heilungserfolges intakt waren. Die am Tag 1 gemessene moderate Blutflussreduktion der Gruppe Fraktur mit Weichteilschaden im distalen Abschnitt könnte eine Reaktion auf die Ischämie nach direktem Trauma der medialen Seite sein. Eine vorübergehende ischämische Situation ruft insbesondere in der initialen Heilungsphase eine deutliche Hypertrophie und Hyperplasie der periostalen Zellen mit einer osteogenen Differenzierung hervor.

Notwendige Grundlage für solche Prozesse ist die rasche Wiederherstellung des lokalen Blutflusses (Svindland et al. 1995). Ferner konnte eine direkte Kausalität zwischen einem Verschluss der nutritiven Arterie und der kortikalen Gewebsperfusion aufgezeigt werden (Swiontkowski et al. 1992). Der Grund für die verbesserte Durchblutungssituation im Frakturspalt in der Frakturgruppe kann ursächlich mit einer stärkeren periostalen Antwort aufgrund des assoziierten Weichteiltraumas zusammenhängen. So beobachtete Landry (Landry et al. 2000) eine massive Zellproliferation im Kambium und in der fibrösen Schicht des Periosts, die zwar nur am ersten Tag auftrat, doch als Initiierung für eine umfangreiche Revaskularisierung der Frakturzone nach einer isolierten Fraktur angesehen werden kann.

Frakturen rufen generell eine Koagulation des Blutes im Frakturspalt hervor, die sich als Hämatom manifestiert. Nebst dem Periosteum hat das osteogene Potential des Hämatoms wesentliche Bedeutung für die periostale Kallusbildung und die initiale Osteo- und Chondrogenese, die über die Differenzierung von mesenchymalen Zellen generiert wird (Hulth 1989, Mizuno et al. 1990, Ozaki et al. 2000, Tenenbaum et al. 1986). Ergebnisse von Grundnes (Grundnes und Reikeras 1993) zeigten deutlich, dass ohne Hämatom die Biegesteifigkeit und die Kallusfläche des heilenden Knochens signifikant erniedrigt waren. Ist das Vorkommen hämatoiden Gewebes zum frühen postoperativen Zeitpunkt für den Heilungsprozess scheinbar irrelevant, beeinflusst dessen Entfernung nach dem 2. postoperativen Tag den Heilungsprozess nachhaltig negativ (Grundnes et al. 1993). Zudem ist die für die Angiogeneese wichtige VEGF-Expression im Hämatom im Vergleich zur Plasmakonzentration signifikant erhöht (Street et al. 2000). Demnach deuten die Ergebnisse neben der osteogenen Bedeutung auch auf eine herausragende angiogene Potenz des Hämatoms hin. Dass eine sukzessiv applizierte Mehrfachtraumatisierung die mitotische Aktivität im Frakturspalt außergewöhnlich negativ beeinflusst (Johnell und Hulth 1979), wurde in der vorliegenden Studie weder mittels Blutflussmessung noch durch die parallel durchgeführte histologische Untersuchung nachgewiesen (Maurer-Klein 2003).

Die durch Gefäßzerstörungen induzierte Hypoxie ist vermutlich ein wichtiger Stimulus für die VEGF-Expression (Steinbrech et al. 1999) und für die Anregung ruhender pluripotenter Zellen, sich zu Osteoblasten und Chondroblasten zu differenzieren (Bouletreau et al. 2002). Im interfragmentären Raum kommt es je nach vorherrschendem Gewebetypus zu unterschiedlichen Sauerstoffkonzentrationen

(Brighton und Krebs 1972, Turgut et al. 1999), die eine adäquate Blutversorgung erfordern (Glowacki 1998, McKibbin 1978). Gegenüber der transienten Hypoxie führt eine lang andauernden zu einer verzögerten Heilung oder Pseudarthrose (Heppenstall et al. 1976). Über eine Summation von hypoxischen Ereignissen innerhalb eines Knochensegments wie z. B. die Verletzung Fraktur mit Weichteilschaden ist bisher in der Literatur nicht diskutiert worden.

In der präsentierten Studie wurde zur Frakturstabilisierung ein intramedullärer Kraftträger verwendet. Zur Gewährleistung der Rotationsstabilität wurde ein zweiter wesentlich kürzerer Nagel eingebracht. Noch immer wird kontrovers diskutiert, ob die intramedulläre Nagelung signifikante Auswirkungen auf die kortikale Durchblutung hat (Indrekvam et al. 1992, Kessler et al. 1986, Schemitsch et al. 1994, Smith et al. 1993) oder der Blutfluss unbeeinflusst bleibt (Grundnes et al. 1993, Reichert et al. 1995). Ein erhöhter periostaler Blutfluss nach intramedullärer Stabilisierung konnte in einer Untersuchung am Schafsmodell nachgewiesen werden (Reichert et al. 1995). Aufgrund des eigenen gewählten Studiendesigns kann keine endgültige Aussage zur geschilderten Problematik getroffen werden. Das Einbringen eines K-Drahts mit intramedullärer Aufbohrung und Verletzung des Endosts führt zu einer signifikanten Blutflussminderung (Grundnes und Reikeras 1993), wobei das Ausmaß einer endostalen Traumaschwere auf die Blutflussquantität ohne Auswirkung bleibt (Grundnes et al. 1994, Utvag et al. 1998). Beiden Erkenntnissen musste in dieser Studie nicht Rechnung getragen werden, da die Frakturstabilisierung ohne Markraum-aufbohrung durchgeführt wurde. Das durchgeführte geschlossene Osteosyntheseverfahren entsprach dem ‚golden standard‘ und ist im initialen Heilungserfolg der aufgebohrten Marknagelung überlegen (Grundnes et al. 1992, Kokubu et al. 2003). Dass die intramedulläre Nagelung nicht nur die Blutzirkulation im Knochen beeinflusst, sondern auch im umliegenden Weichteilgewebe die Perfusion signifikant erhöht, konnte am Frakturmodell des Kaninchens gezeigt werden (Hupel et al. 1998). Aufgrund der in der Studie verwendeten 3-Punkt Messanordnung konnte nachgewiesen werden, dass im gesamten Muskel der Blutfluss im präoperativen Zeitraum wie auch nach 5 und 11 Wochen signifikant erhöht war. Demzufolge kann aufgrund unserer LDF-Daten vermutet werden, dass die gemessenen Blutflussveränderungen eher im direkten Zusammenhang mit der Fraktur stehen als auf die intramedulläre Marknagelung zurück zu führen sind. So ist der Rückgang in den ersten 24 Stunden im Wesentlichen im Zusammenhang mit der

vasokonstriktorischen Reaktion auf das Frakturtrauma zu sehen. Die postoperative Hypervaskularität im Weichteilgewebe zwischen Tag 3 und Tag 7 könnte als Zeichen der zunehmenden periostalen Blutversorgung nach Fraktur gewertet werden und die Normalisierung der Muskelperfusion ab dem 14. Tag als Konsequenz der sukzessiv wiederhergestellten medullären Blutversorgung. Diese Ergebnisse und Erkenntnisse aus anderen Studien (Reichert et al. 1995, Strachan et al. 1990) stützen die Beobachtungen von Trueta (Trueta 1974), der als erster von der Umkehrung der Blutflussrichtung (von zentrifugal zu zentripedal) nach Fraktur berichtete.

Mit der Entwicklung von Pseudarthrosemodellen wird versucht, Erklärungen zu Fragen der Heilungsverzögerung zu erhalten (Harrison et al. 2003). Brownlow (Brownlow et al. 2002) beobachteten, dass nach der ersten postfraktären Woche die Gefäßkonzentration unter normalen Heilungsbedingungen signifikant höher war als im Pseudarthrosemodell, aber nach 8 und 16 Wochen kein Unterschied nachzuweisen war. Bei den untersuchten ESAF-Konzentrationen (endothelial cell-stimulating factor), die als Maß für die Gefäßkonzentration benutzt wurden, fanden sich zu keinem Zeitpunkt Unterschiede zwischen beiden Gruppen. Ein anderes Modell bewies den Zusammenhang zwischen Gefäßanzahl und Heilungsverzögerung. So war die Quantität der Gefäße im Pseudarthrosemodell vergleichbar mit der Frakturgruppe, nur dass sich die Gefäßanzahl mit einer fünföchigen Verzögerung einstellte. Entsprechend der verschlechterten Vaskularität kam es zu einer mangelhaften Gewebsausdifferenzierung, die keine Frakturkonsolidierung zuließ (Reed et al. 2003). Um die Bedeutung eines periostalen Effekts zu untersuchen, entwickelten Kokubu (Kokubu et al. 2003) ein Pseudarthrosemodell an Ratten. Sie berichten, dass es nach einer Periostentfernung 2 mm distal und proximal der Frakturlinie zu keiner substantiellen Kallusüberbrückung kam. Damit konnten die Autoren einerseits die Bedeutung eines intakten Periosteums für die Frakturheilung belegen und andererseits ein valides Pseudarthrosemodell vorstellen, mit dem unter standardisierten Bedingungen der Einfluss des Periosteums auf eine Frakturkonsolidierung evaluiert werden kann ohne dass Infektionen die Heilung beeinflussten.

### **Proximale und distale Frakturregion**

Das Wissen um die Durchblutungssituation in der proximal und distal der Fraktur gelegenen Region ist interessant, da mit mikroradiographische Aufnahmen

demonstriert werden konnte, dass es periostalen Gefäßsprossungen und einwandernde Gefäße aus dem distalen und proximalen Raum der Frakturlinie gibt (Rhineland 1968, Rhineland 1974, Trueta 1974). Bis auf diese qualitativen Ergebnisse sind Erkenntnisse über die ösäre Blutflusssituation im zeitlichen Verlauf nach Fraktur in diesen Abschnitten so gut wie nicht vorhanden. Generell ist zu vermuten, dass die Veränderungen der Gewebepfusion in diesen Regionen nur als eine Zulieferfunktion für die nutritive Versorgung der Fraktur anzusehen sind. Die Vermutung, dass mit der Fraktur assoziierten Gefäßzerreißungen insbesondere der A. nutria die Blutversorgung im distalen Fragment zusammenbricht (Rhineland 1974, Trueta 1974), ist aufgrund der präsentierten Daten zu widerlegen. Zum postoperativen Zeitpunkt war die Durchblutungssituation in der Fraktur- und in der Frakturgruppe mit Weichteilschaden stark herabgesetzt, die sich jedoch bereits nach 24 Stunden in der Gruppe Fraktur mit Weichteilschaden normalisierte. Dieses ist überraschend, könnte aber mit einer – begründet durch die Traumaschwere - starken kollateralen Gefäßbildung erklärt werden (Helisch und Schaper 2003). Ferner verbleiben Gefäßstrukturen im teilweise unversehrten Periosteum als Blutquelle erhalten. Die Hyperperfusion im distalen Abschnitt am 14. postoperativen Tag in der Frakturgruppe ist möglicherweise mit der vollständig einsetzenden medullären Durchblutung in Verbindung zu bringen, die teilweise die kortikale Perfusion vor allem im ersten inneren Drittel über die deszendierenden Äste der Arteria nutria und anderen medullärer Gefäße günstig beeinflusst (Rhineland 1979, Trueta 1963). Allerdings können aufgrund der relativ dünnen distalen Kortikalis die medullären Perfusionsänderungen mit in diese Blutflussdaten eingeflossen sein. Proximal des Frakturspalts verhalten sich die Perfusionsänderungen bis zum Ende der ersten Woche ähnlich wie in der distalen Region. Diese Befunde verweisen auf die regenerativen Prozesse im Frakturspalt, die vermutlich von einer suffizienten Blutzufuhr aus dem proximalen Abschnitt abhängig sind.

Beim Vergleich beider Versuchsgruppen zeigt sich, dass unter Bedingungen einer Fraktur mit Weichteilschaden der Blutfluss im proximalen Abschnitt im gesamten Untersuchungszeitraum im Durchschnitt um ungefähr 30% unter dem Ausgangswert liegt. Die distalen Ergebnisse demonstrieren vor allem im initialen Heilungszeitraum eine bessere Vaskularität als bei einer einfachen Fraktur. Vor dem Hintergrund gleicher Heilungsergebnisse beider Gruppen lassen die gemessenen Unterschiede die Vermutung zu, dass eine schnelle Wiederherstellung des Blutflusses im distalen

Fragment möglicherweise wichtiger ist als im proximalen Fragment. In wie weit die distale Blutflusswiederherstellung insbesondere am ersten Tag Anteil am Heilungserfolg besitzt, kann nicht ausreichend bewertet werden. Jedoch sei auf die allgemein akzeptierte Meinung, dass sich vaskularisiertes Gewebe besonders in der frühen Frakturheilung günstig auf den späteren Heilungserfolg auswirkt, hingewiesen (Glowacki 1998, Hulth 1989, McKibbin 1978). Bemerkenswert ist die Hypoperfusion in allen Versuchstieren nach 4 Wochen. Ein möglicher Grund könnte in der vollständigen Wiederherstellung des medullären Gefäßsystems liegen (Brighton und Krebs 1972), so dass das einsetzende Remodelling durch erhöhten lokalen und periostalen Blutfluss im Bereich des Frakturkallus ausreichend versorgt werden kann. Die nachgewiesene Hyperperfusion im Frakturspalt am 28. postoperativen Tag unterstützt diese Vermutung. Ein direkter Effekt des Weichteilschadens auf den proximalen Blutfluss kann ausgeschlossen werden, da sich das gesetzte Trauma unterhalb der Messregion befand und daher die Unversehrtheit von Muskel und periostalen Strukturen gewährleistet war (Whiteside et al. 1978).

### **Frakturregion**

Die Gegenüberstellung der Blutflussveränderungen der Versuchsgruppen Fraktur und Fraktur mit Weichteilschaden belegt einen fast analogen Verlauf über den gesamten Untersuchungszeitraum. Abweichungen zeigten sich in den ersten 24 Stunden nach Fraktur und am Tag 14.

Der Blutflusseinbruch in den ersten 24 Stunden ist als Folge der massiven Gefäßzerreisungen im Bereich der aufgetretenen ossären Diskontinuität anzusehen. Die stärkere Ausprägung der Blutflussreduktion nach Fraktur mit Weichteilschaden lässt sich möglicherweise auf den Weichteilschaden als Quelle der äußeren 2/3 der Kortikalis, oder auf das erhebliche periostale Trauma auf der medialen Seite zurückführen. Innerhalb des ersten Tages sind in der medullären Frakturzone keine neu gebildeten Gefäße und differenziertes osteogenes Gewebe weder in der dem Hämatom anliegenden kompakten Region zellulärer Dichte noch im entfernten Gewebe mit niedriger zellulärer Dichte zu erwarten (Brighton und Hunt 1991). Dagegen konnte im Periosteum eine Vielzahl von Blutzellen und heterophilen Granulozyten, die vor allem nahe dem Frakturspalt eine hohe Konzentration aufwiesen, nachgewiesen werden. Bereits nach 48 Stunden begann die Ausbildung vaskulärer Strukturen in allen periostalen Schichten (Brighton und Hunt 1997).

Im Zeitabschnitt des 3. bis 7. Tages ließen sich in dieser Untersuchung keine unterschiedlichen Blutquantitäten zwischen beiden Versuchsgruppen erkennen. Jedoch kann der ansteigende Blutfluss als Ausdruck der einsetzenden Frakturkonsolidierung gewertet werden. Mit der beginnenden periostalen Kallusformation am dritten Tag und der Chondrogenese zwischen Tag 4 und 5 steigt der Sauerstoffbedarf an, der eine adäquate Durchblutung erfordert. Zu diesen Zeitpunkten zeigen sich zahlreiche Blutgefäße im medullären Gebiet mit niedriger Zelldichte während in der Region der hohen zellulären Dichte keine Blutgefäße erkennbar waren (Brighton und Krebs 1972, Brighton und Hunt 1991).

Mit Beendigung des periostalen Kalluswachstums zwischen dem 10.-14.Tag beginnt die Vaskularisierung des fibrösen Gewebes, die die enchondrale Ossifikation einleitet (Brighton und Krebs 1972, Hulth 1989). Der am Tag 14 im Vergleich zur isolierten Fraktur erhöhte Blutfluss der Versuchsgruppe Fraktur mit Weichteilschaden ist möglicherweise auf eine verzögerte nun erst einsetzende Gewebsdifferenzierung zurückzuführen, die aus einer mangelhaften Revaskularisierung des Muskels zwischen dem 3. und 7. Tag hervorgegangen sein könnte. Ergebnisse einer parallel histologischen Untersuchung deuten auf diese verzögerte Gewebsdifferenzierung hin (Maurer-Klein 2003). Bei der Betrachtung der Blutflussveränderungen im Weichteilgewebe zeigt sich eine deutliche Verminderung nach Fraktur mit Weichteilschaden gegenüber der Frakturgruppe nach postoperativem Tag 1. Dieses scheint unmittelbar mit der Verletzungsschwere als Folge der Kombinationsverletzung zusammenzuhängen, so dass von einer zentrifugalen nutritiven Interaktion zwischen Muskelmantel und ossärer Strukturen ausgegangen werden kann. Überraschend ist der Nachweis der nur minimalen Hyperperfusion im Zeitraum von Tag 3-7 für die Gruppe Fraktur mit Weichteilschaden. Damit ist der wissenschaftliche Konsens über die existentielle Bedeutung der muskulo-periostalen Blutversorgung unter der Bedingung Fraktur mit Weichteilgewebe zu hinterfragen. Darauf deuten unsere Ergebnisse der mechanischen Testung hin. Diese Vermutung steht mit neueren tierexperimentellen Forschungsergebnissen im Einklang. So verglichen Utvag (Utvag et al. 2003) die Frakturheilung nach Muskelkontusion mit der Heilung nach exzidiertem Muskelgewebe und einer isolierten Fraktur. Während zwischen den Versuchsgruppen Fraktur und Fraktur mit Weichteilschaden keine signifikanten Heilungsunterschiede gefunden werden konnten, war nach operativer Entfernung des Muskelgewebes eine verschlechterte Integrität des heilenden

Knochens zu verzeichnen. Resultate anderer tierexperimenteller Studien deuten daraufhin, dass eine signifikante Heilungsverzögerung nach Entfernung des umliegenden Weichteilgewebes auftritt während weder eine Ablösung von Muskelgewebe noch ein autogenes Transplantat die Frakturheilung negativ beeinflussten (Utvag et al. 2002). Dass devaskularisierte Knochensegmente nach einer Muskeldeckung eine verbesserte Heilung aufwiesen (Richards et al. 1989), erhärtet die Annahme des positiven Einflusses von Weichteilgewebe auf die Frakturheilung ausgelöst durch eine verbesserte Durchblutung, doch ließ sie Fragen bezüglich ihrer Wertigkeit für die Frakturheilung offen. Zudem demonstrierten experimentelle Untersuchungen zum osteogenen Potential von periostalen Autografts einen signifikant positiven Einfluss auf die Frakturkonsolidierung (Reynders et al. 1998). Auch die letztgenannte Studie war ausschließlich auf Fragestellung der Revaskularisierung fokussiert. Die Relevanz dieser Erkenntnisse muss für die in vivo Bedingungen kritisch hinterfragt werden. Überraschend ist die Erkenntnis, dass die gesteigerte Hypoperfusion nach Weichteilschaden in der initialen Heilungsphase (<24 Stunden) gegenüber der isolierten Fraktur keinerlei nachteiligen Effekt auf den Ausgang der Frakturheilung zu haben scheint. Andere Studien konnten dagegen zeigen, dass eine schlechte Durchblutungssituation hierbei besonders die Unterbrechung der Muskel-Periost Verbindung in der sehr frühen Heilungsphase mit einem schlechteren Heilungsergebnis assoziiert ist (Ozaki et al. 2000, Utvag et al. 1999). In unserer Studie könnte zwar nebst dem Weichteiltrauma möglicherweise auch eine Störung der periostalen Blutversorgung vorliegen, doch scheint die Verletzung nicht schwer genug zu sein, die Regenerationsprozesse der ablaufenden Heilung negativ zu beeinflussen.

### **Klinische Relevanz**

Mit den vorliegenden Ergebnissen konnte festgestellt werden, dass eine Fraktur mit geschlossenem Weichteilschaden zwar die Durchblutung im Frakturspalt in den ersten 24 Stunden postoperativ deutlich verschlechtert ist, aber diese im Gegensatz zur isolierten Fraktur stärkere Hypoperfusion keinen negativen Einfluss auf die Güte der Frakturkonsolidierung nach einem Heilungszeitraum von 28 Tagen hatte.

Ungeachtet dessen zeichnen klinischen Erfahrungen, prospektive und retrospektive Studien ein von den tierexperimentellen Ergebnissen abweichendes Bild. Die von Rommens (Rommens et al. 1994) präsentierten Resultate indizieren einen

signifikanten Zusammenhang zwischen Weichteilschaden und Heilungsergebnis. Es zeigte sich, dass je schwerer der Weichteilschaden war, desto schlechter waren das objektive Heilungsergebnis und die Patientenzufriedenheit. Frühere Studienergebnisse der gleichen Arbeitsgruppe hoben nach Behandlung eines Monofixateurs die Bedeutung eines unversehrten Weichteilgewebes für eine erfolgreiche Heilung hervor. So verlängerte sich die Dauer des stationären Aufenthaltes, die Frequenz der Reosteosynthese und die Dauer der Frakturheilung mit der Schwere des Weichteilschadens. Ferner konnte ein Korrelat zwischen dem Heilungszeitfenster und dem Heilungsergebnis nachgewiesen werden (Rommens et al. 1992). Ähnliche Folgerungen aus ihren Ergebnissen schlossen Brinker (Brinker und Bailey 1997), Edwards (Edwards et al. 1988), Gustilo (Gustilo et al. 1987) und Krettek (Krettek et al. 1989). Dagegen fand Claes (Claes et al. 2002) keine signifikante Korrelation zwischen dem Schweregrad des Weichteilschadens und dem Heilungserfolg nach Fraktur.

Die Differenzen zwischen den experimentellen und den klinischen Ergebnissen können einerseits von der Frakturlokalisierung, der Frakturschwere und vom Osteosyntheseverfahren abhängig sein, andererseits auf Grund der Wertigkeit des Weichteilschadens entstanden sein. Entgegen der hohen Standardisierbarkeit im Tierexperiment ist in der klinischen Situation die subjektive Einschätzung der Verletzung die Grundlage der therapeutischen Intervention. Auch wenn Verfahrensweisen klassifiziert (Oestern/Tscherne-Klassifikation, AO-Klassifikation) sind, obliegt die situative therapeutische Entscheidung dem Operateur. Ist im Experiment ein intramedullärer Nagel verwendet worden, sind im klinischen Alltag in Abhängigkeit von der Frakturkomplexität Monofixateure (Rommens et al. 1992), verriegelte Marknägel (Krettek et al. 1995), die Ilizarov-Methode (Schultz et al. 1992), die Osteosyntheseplatten und der Fixateur externe (Rommens et al. 1994) im Einsatz, die aufgrund ihrer unterschiedlichen Applikation mannigfaltige Wirkungen auf die mechanische Stabilität der Fraktur und die Vaskularität haben können. Bei der Beurteilung einer möglichen Weichteilinsuffizienz muss zwischen einem scheinbaren Gewebedefekt, einem Kompartmentsyndrom und einem wirklichen Gewebeverlust in der Diagnostik differenziert werden (Schultz et al. 1992). Vor allem der schon beschriebene Verlust der Weichteil-Periost-Knochen Verbindung beeinflusst im Wesentlichen den Heilungsprozess. Während im Tiermodell eine Weichteilschädigung ohne die Zerstörung dieses Konstruktes reproduzierbar

generiert werden konnte, treten im klinischen Alltag polymorphe Verletzungsmuster der einzelnen Gewebestrukturen auf. Desgleichen könnten zusätzlich auftretende Wundheilungsstörungen und Infektionen vor allem nach offenen Frakturen ursächlich mit schlechteren Heilungserfolgen zusammenhängen.

## Schlussfolgerungen und Ausblick

In der vorliegenden Arbeit wurde die Durchblutungssituation als ein Faktor für eine erfolgreiche Frakturheilung in einer tierexperimentellen Studie untersucht. Für die Evaluation von Perfusionsänderungen wurde das allgemein akzeptierte Verfahren der Laser Doppler Flowmetrie verwendet. Die nicht invasive Messung erfolgte an vier ausgewählten Messregionen, die eine umfangreiche Blutflussbeurteilung im Frakturspaltgewebe und dessen Umgebung erlaubten. Einschränkend ist auf die teils großen Standardabweichungen als Ausdruck einer systemimmanenten Messvariabilität hingewiesen, die eine statistische Analyse mit niedriger Fallzahl erschwert.

Einblick in die Gefäßstrukturen am Rattenhinterlauf gewährte die modifizierte Methode der Mikroangiographie nach Rhinelander. Diese qualitative Bestimmung sollte durch eine computergestützte Quantifizierung der Angiogenese objektiviert werden. Die Realisierung des Vorhabens scheiterte an der Variabilität bei der Applikation des Kontrastmittels. Die verwendeten Auswertalgorithmen waren nicht in der Lage, diese Variabilität rechnerisch zu kompensieren.

Mit der mechanischen Testung konnte die Steifigkeit und Festigkeit des heilenden Knochens eruiert werden. Die Ergebnisse zeigten keinen verzögernden Effekt eines Weichteilschadens auf die Frakturheilung. Weder Biegesteifigkeit noch Bruchkraft waren beeinflusst. Der Vergleich der LDF-Daten im Frakturspalt bestätigt die mechanischen Ergebnisse, obgleich der Weichteilschaden für einen zusätzlichen Blutflussrückgang bis Tag 1 sorgt. Der verminderte extraossäre Blutfluss im Zeitfenster 3.-7. Tag scheint keinen Einfluss auf das Heilungsergebnis gehabt zu haben. Während proximal des Frakturspaltes der Blutfluss latent unterhalb der Norm liegt, ist im distalen Bereich am 3. Tag ein deutlich besserer Blutfluss nach einem Weichteilschaden zu erkennen. Direkte Rückschlüsse auf ein eventuelles

Zusammenwirken der unterschiedlichen Regionen zur Gewährleistung eines erfolgreichen Heilungsprozesses können nicht gezogen werden.

Eine direkte Übertragung der vorliegenden Ergebnisse auf die klinische Anwendung vor allem bei der Interpretation der Blutflussveränderungen kann sicher nicht erfolgen. Jedoch ist die prinzipielle Aussage, dass ein Weichteilschaden, wie in unserem Experiment gezeigt wurde, die Frakturheilung in ihrem mechanischen Ergebnis nicht negativ beeinflusst, zulässig. Weiterhin legen unsere Ergebnisse legen den Schluss nahe, dass mäßige Weichteilschädigungen durch Trauma oder während der operativen Versorgung durch Stichinzisionen, der Applikation von Verriegelungsnägeln oder das Anbringen eines Fixateur externe auf den Heilungsausgang keinen ausgeprägt negativen Einfluss auf das Behandlungsergebnis haben.

## Zusammenfassung

Das Ziel der Studie war es, den Einfluss eines geschlossenen Weichteilschadens auf die Frakturheilung zu untersuchen. 67 WISTAR Ratten (385g, 77 Tage alt) wurden in die Gruppen Fraktur (A), Weichteilschaden ohne Fraktur (B), Fraktur mit Weichteilschaden (C) unterteilt. Da neben der Frakturstabilität die Wiederherstellung der Durchblutung eine wesentliche Determinante der erfolgreichen Frakturheilung ist, wurde der Schwerpunkt dieser Studie auf die Bestimmung von Durchblutungsparametern mittels der Laser Doppler Flowmetrie als nicht invasives Verfahren prä- und postoperativ, nach dem 1., 3., 7., 14. und 28. Tag im Frakturspalt, distal und proximal der Fraktur und Weichteilgewebe gelegt. Während für die Gruppe Weichteilschaden nur Blutflussmessungen bis zum Tag 14 durchgeführt wurden, erfolgte nach 28 Tagen für beiden Frakturgruppen (A+C) durch 3-Punkt-Biegung die Bestimmung der mechanischen Eigenschaften der geheilten Tibien. Mittels einer modifizierten Methode nach Rhinelander wurden Gefäßstrukturen mit Mikropaque angefärbt und mit einem computergestützten Auswertemodus quantifiziert. Der mechanische Test konnte keine signifikanten Unterschiede zwischen Fraktur und Fraktur mit Weichteilschaden nachweisen. Der Blutfluss im Frakturspalt ist nur am Tag 1 vom Weichteilschaden negativ beeinflusst. Während sich die Perfusion nach Weichteilschädigung in der proximalen Region über den gesamten Untersuchungszeitraum nicht normalisiert, beginnt die Revaskularisierung im distalen Abschnitt bereits am 1. Tag anstatt am 3. Tag nach Fraktur. Ein isolierter Weichteilschaden beeinflusst die Blutzirkulation im intakten Knochen nachhaltig. Die regionalen Blutflussveränderungen scheinen mit der Dimension des umgebenden Weichteilmantels in engem Verhältnis zu stehen. Erstmals konnte mit der Angiographie dreidimensionale Darstellung generiert werden. Eine valide Quantifizierung dieser Strukturen konnte allerdings nicht erzielt werden.

Der Nachweis, dass ein geschlossener Weichteilschaden die Frakturheilung nicht beeinflusst, ist für den klinischen Alltag bedeutsam. Vermutlich ist trotz eines lokal begrenzten Weichteilschadens die generelle Integrität des Muskels und die intakte Muskel-Periost-Knochen Verbindung für das immanente osteogene Potential dieser Strukturen bedeutsam.

## Summary

The purpose of the study was to investigate the influence of an extensive muscle injury on fracture healing. In addition to adequate mechanical stability, the restoration of blood flow is an essential determinant for a successful healing process. 67 Wistar rats (385g, 77 days old) were divided into a fracture group (A), a group with an intact bone with soft tissue injury (B), and a fracture group with a soft tissue injury (C). Fracture and soft tissue injury were created with a guillotine apparatus. Laser Doppler measurements of blood flow were taken pre- and postoperatively and after 1, 3, 7, 14, 28 days. The healed bones of the group A+C were mechanically tested after 28 days. A three-dimensional visualisation of the hindlimb vessel structure was taken from micro CT images and the vasculature volume was calculated.

Mechanical testing showed no significant differences between the groups A and C in failure load and in flexural rigidity. Blood flow in the fracture gap was adversely influenced by a soft tissue crush at day 1. In general the vascularity in the proximal region in group C was lower than the prefracture level during the investigation period. However, the restoration of vascularity in group C began in the distal part at day 1 while the microcirculation in group A was decreased up to day 3. Group B demonstrated that an isolated muscle injury affected the tissue perfusion in intact bone. This suggests that the local blood flow changes might be related to the extent of the covering soft tissue. For the first time a 3-D vessel structure around a fracture was visualised with micro CT images. However, a valid quantification of the vessel formation could not be obtained due to the numerous factors which influence the present results.

In conclusion, the present results suggest that a soft tissue crush did not result in a delayed fracture healing or non-union. In contrast to a total loss of soft tissue, only limited local soft tissue injury may maintain the integrity of the bone-soft tissue interface, thereby preserving the osteogenic potential of the periosteum and the soft tissue. Further on our data indicate that additional injuries caused by operation procedures such as moderate incisions to soft tissue surrounding fracture, site seem to have no implications on the fracture healing process.

## Kapitel 5: Literaturverzeichnis

1. Allgower M: [Soft tissue problems and the risk of infection in osteosynthesis]. *Langenbecks Arch Chir* 329: 1127-1136 (1971)
2. Amprino R, Moratti G: A topographic quantitative study of bone formation and reconstruction. Presented at the Proceedings of the first European Bone and Tooth Symposium., Oxford, 1964.
3. Augat P: Biomechanik und Morphometrie des Kallusgewebes bei der sekundären Frakturheilung. Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der Humanbiologie. Universität Ulm (1995)
4. Augat P, Margevicius K, Simon J, Wolf S, Suger G, Claes L: Local Tissue Properties in Bone Healing: Influence of Size and Stability of the Osteotomy Gap. *Journal of Orthopaedic Research* 16: 475-481 (1998)
5. Augat P, Burger J, Schorlemmer S, Henke T, Claes L: Shear movements at the fracture site delays the healing of long bone fractures. *J Orthop Trauma* 17: 153-154 (2003)
6. Bachmann G, Pfeifer T, Spies H, Katthagen BD: [3D-CT and angiography of cast preparations of pelvic vessels: demonstration of arterial blood supply of the acetabulum]. *Rofo Fortschr Geb Rontgenstr Neuen Bildgeb Verfahr* 158: 214-220 (1993)
7. Barlow Y, Willoughby J: Pathophysiology of soft tissue repair. *Br Med Bull* 48: 698-711 (1992)
8. Bassaglia Y, Gautron J: Fast and slow rat muscles degenerate and regenerate differently after whole crush injury. *J Muscle Res Cell Motil* 16: 420-429 (1995)
9. Beck A, Augat P, Krischak GD, Gebhard F, Kinzl L, Claes L: A stable significantly improves the healing of tibial fractures fixed by intramedullary nails. Presented at the 7th Meeting of the International Society for Fracture Repair, Hong Kong, 2000.
10. Bhatt R, Lauder I, Finlay DB, Allen MJ, Belton IP: Correlation of bone scintigraphy and histological findings in medial tibial syndrome. *Br J Sports Med* 34: 49-53 (2000)

11. Biberthaler P, Langer S, Luchting B, Khandoga A, Messmer K: In vivo assessment of colon microcirculation: comparison of the new OPS imaging technique with intravital microscopy. *Eur J Med Res* 6: 525-534 (2001)
12. Biberthaler P, Wiedemann E, Nerlich A, Kettler M, Mussack T, Deckelmann S, Mutschler W: Microcirculation associated with degenerative rotator cuff lesions. In vivo assessment with orthogonal polarization spectral imaging during arthroscopy of the shoulder. *J Bone Joint Surg Am* 85-A: 475-480 (2003)
13. Bonnarens F, Einhorn TA: Production of a standard closed fracture in laboratory animal bone. *J Orthop Res* 2: 97-101 (1984)
14. Bornmyr S, Svensson H, Lilja B, Sundkvist G: Skin temperature changes and changes in skin blood flow monitored with laser Doppler flowmetry and imaging: a methodological study in normal humans. *Clin Physiol* 17: 71-81 (1997)
15. Bouletreau PJ, Warren SM, Spector JA, Steinbrech DS, Mehrara BJ, Longaker MT: Factors in the fracture microenvironment induce primary osteoblast angiogenic cytokine production. *Plast Reconstr Surg* 110: 139-148 (2002)
16. Branemark PT: Vital microscopy of bone marrow in the rabbit. *Scand J Clin Lab Invest* 11: (1959)
17. Braun W, Ruter A: Fracture healing. Morphologic and physiologic aspects. *Unfallchirurg* 99: 59-67 (1996)
18. Bridgeman G, Brookes M: Blood supply to the human femoral diaphysis in youth and senescence. *J Anat* 188 ( Pt 3): 611-621 (1996)
19. Brighton CT, Krebs AG: Oxygen tension of healing fractures in the rabbit. *J Bone Joint Surg Am* 54: 323-332 (1972)
20. Brighton CT, Hunt RM: Early histological and ultrastructural changes in medullary fracture callus. *J Bone Joint Surg Am* 73: 832-847 (1991)
21. Brighton CT, Hunt RM: Early histologic and ultrastructural changes in microvessels of periosteal callus. *J Orthop Trauma* 11: 244-253 (1997)
22. Brinker MR, Bailey DE, Jr.: Fracture healing in tibia fractures with an associated vascular injury. *J Trauma* 42: 11-19 (1997)
23. Brookes M: Red cell volumes and vascular patterns in long bones. *Acta Anat* 35-52 (1965)
24. Brookes M: The blood supply of bone: an approach to bone biology. Butterworth, London, S. (1971)

25. Brookes M, Revell WJ: Blood supply of bone - scientific aspects. Springer, Berlin, S. 172 (1997)
26. Brownlow HC, Reed A, Simpson AH: The vascularity of atrophic non-unions. *Injury* 33: 145-150 (2002)
27. Buckwalter JA, Einhorn TA, Bolander MA, Cruess RL: Healing of the Musculoskeletal Tissues. In: Rockwood CA, Green DP, Bucholz RW, Heckman JD (Hrsg) *Fractures in Adults*. Vol. 1, Aufl, Lippincott-Raven, Philadelphia, S. 261-296 (1996)
28. Bumann M, Henke T, Yoshida I, Augat P, Claes L: Die Mikroangiographie der hinteren Extremität der Ratte und die dreidimensionale Darstellung der vaskulären Situation? Eine modifizierte Methode nach Rhinelander. *Hefte zu der Unfallchirurg*, 66. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Unfallchirurgie e. V., 2002.
29. Buttaro M, Mocetti E, Alfie V, Paniago G, Pineiro L: Fat embolism and related effects during reamed and unreamed intramedullary nailing in a pig model. *J Orthop Trauma* 16: 239-244 (2002)
30. Carlson BM: The regeneration of skeletal muscle: a review. *Am J Anat* 137: 119-150 (1983)
31. Carlson BM, Faulkner: The regeneration of skeletal muscle fibres following injury: a review. *Med Sci Sports Exerc* 15: 187-198 (1983)
32. Cavadias AX, Trueta J: An Experimental Study of the Vascular Contribution to the Callus of Fracture. *Surg Gynecol Obstet* 120: 731-747 (1965)
33. Chan RC, Forrester K, McDougall JJ, Bray RC, Zernicke RF: Dynamic measurement of bone blood perfusion with modified laser Doppler imaging. *J Orthop Res* 17: 578-581 (1999)
34. Chao EYS, Aro HT: Biomechanics of fracture repair and fracture fixation. 3rd Conference of the ISFR, Brussels/Belgium (1992)
35. Chidgey L, Chakkalakal D, Blotcky A, Connolly JF: Vascular reorganization and return of rigidity in fracture healing. *J Orthop Res* 4: 173-179 (1986)
36. Chung S, Hazen A, Levine JP, Baux G, Olivier WA, Yee HT, Margiotta MS, Karp NS, Gurtner GC: Vascularized acellular dermal matrix island flaps for the repair of abdominal muscle defects. *Plast Reconstr Surg* 111: 225-232 (2003)
37. Claes L: The mechanical and morphological properties of bone beneath internal fixation plates of differing rigidity. *J Orthop Res* 7: 170-177 (1989)

38. Claes L, Augat P, Suger G, Wilke HJ: Influence of size and stability of the osteotomy gap on the success of fracture healing. *J Orthop Res* 15: 577-584 (1997)
39. Claes L, Eckert-Hubner K, Augat P: The effect of mechanical stability on local vascularization and tissue differentiation in callus healing. *J Orthop Res* 20: 1099-1105 (2002)
40. Claes L, Grass R, Schmickal T, Kisse B, Eggers C, Gerngross H, Mutschler W, Arand M, Wintermeyer T, Wentzensen A: Monitoring and healing analysis of 100 tibial shaft fractures. *Langenbecks Arch Surg* 387: 146-152 (2002)
41. Claes L, Eckert-Hubner K, Augat P: The fracture gap size influences the local vascularization and tissue differentiation in callus healing. *Langenbecks Arch Surg* 388: 316-322 (2003)
42. Couffinhal T, Silver M, Zheng LP, Kearney M, Witzembichler B, Isner JM: Mouse model of angiogenesis. *Am J Pathol* 152: 1667-1679 (1998)
43. Crisco JJ, Jokl P, Heinen GT, Connell MD, Panjabi MM: A muscle contusion injury model. Biomechanics, physiology, and histology. *Am J Sports Med* 22: 702-710 (1994)
44. Dankwardt-Lillieström G: Reaming of the medullary cavity and its effect on diaphyseal bone. *Acta Orthop Scand Suppl* 128 (1969)
45. De Backer D: OPS techniques. *Minerva Anesthesiol* 69: 388-391 (2003)
46. Edwards CC, Simmons SC, Browner BD, Weigel MC: Severe open tibial fractures. Results treating 202 injuries with external fixation. *Clin Orthop* 98-115 (1988)
47. Einhorn TA: Biology of fracture healing. Presented at the 3rd Conference of the ISFR, Brussels, Belgium, 1992.
48. Einhorn TA: Enhancement of fracture-healing. *J Bone Joint Surg Am* 77: 940-956 (1995)
49. Erol OO, Spira M, Levy B: Microangiography: a detailed technique of perfusion. *J Surg Res* 29: 406-413 (1980)
50. Fisher BD, Baracos VE, Shnitka TK, Mendryk SW, Reid DC: Ultrastructural events following acute muscle trauma. *Med Sci Sports Exerc* 22: 185-193 (1990)
51. Forth W, Rummel W, Henschler D, Starke K, Förstermann U: Allgemeine und Spezielle Pharmakologie und Toxikologie. Urban & Fischer Verlag, München, S. (2001)

52. Frayn KN: Hormonal control of metabolism in trauma and sepsis. *Clin Endocrinol (Oxf)* 24: 577-599 (1986)
53. Frost HM: The biology of fracture healing. An overview for clinicians. Part I. *Clin Orthop* 283-293 (1989)
54. Glowacki J: Angiogenesis in fracture repair. *Clinical Orthopaedics and related research* 355S: S82-S89 (1998)
55. Grundnes O, Reikeras O: Closed versus open medullary nailing of femoral fractures. Blood flow and healing studied in rats. *Acta Orthop Scand* 63: 492-496 (1992)
56. Grundnes O, Reikeras O: Blood flow and mechanical properties of healing bone. Femoral osteotomies studied in rats. *Acta Orthop Scand* 63: 487-491 (1992)
57. Grundnes O, Reikeras O: Acute effects of intramedullary reaming on bone blood flow in rats. *Acta Orthop Scand* 64: 203-206 (1993)
58. Grundnes O, Reikeras O: The role of hematoma and periosteal sealing for fracture healing in rats. *Acta Orthop Scand* 64: 47-49 (1993)
59. Grundnes O, Reikeras O: The importance of the hematoma for fracture healing in rats. *Acta Orthop Scand* 64: 340-342 (1993)
60. Grundnes O, Utvag SE, Reikeras O: Effects of graded reaming on fracture healing. Blood flow and healing studied in rat femurs. *Acta Orthop Scand* 65: 32-36 (1994)
61. Gustilo RB, Anderson JT: Prevention of infection in the treatment of one thousand and twenty-five open fractures of long bones: retrospective and prospective analyses. *J Bone Joint Surg Am* 58: 453-458 (1976)
62. Gustilo RB, Mendoza RM, Williams DN: Problems in the management of type III (severe) open fractures: a new classification of type III open fractures. *J Trauma* 24: 742-746 (1984)
63. Gustilo RB, Gruninger RP, Davis T: Classification of type III (severe) open fractures relative to treatment and results. *Orthopedics* 10: 1781-1788 (1987)
64. Hankemeier S, Grassel S, Plenz G, Spiegel HU, Bruckner P, Probst A: Alteration of fracture stability influences chondrogenesis, osteogenesis and immigration of macrophages. *J Orthop Res* 19: 531-538 (2001)
65. Harrison LJ, Cunningham JL, Stromberg L, Goodship AE: Controlled induction of a pseudarthrosis: a study using a rodent model. *J Orthop Trauma* 17: 11-21 (2003)

66. Hausman MR, Schaffler MB, Majeska RJ: Prevention of fracture healing in rats by an inhibitor of angiogenesis. *Bone* 29: 560-564 (2001)
67. Helisch A, Schaper W: Arteriogenesis: the development and growth of collateral arteries. *Microcirculation* 10: 83-97 (2003)
68. Heppenstall RB, Goodwin CW, Brighton CT: Fracture healing in the presence of chronic hypoxia. *J Bone Joint Surg Am* 58: 1153-1156 (1976)
69. Heppenstall RB, Scott R, Sapega A, Park YS, Chance B: A comparative study of the tolerance of skeletal muscle to ischemia. Tourniquet application compared with acute compartment syndrome. *J Bone Joint Surg Am* 68: 820-828 (1986)
70. Heppenstall RB: Compartment syndrome: pathophysiology, diagnosis and treatment. *Tech Orthop* 92-108 (1997)
71. Herman GT: Quantification Using 3D Imaging. In: Udupa JK, Herman GT (Hrsg) *3D Imaging in medicine*, 2nd. Aufl, CRC Press, London, S. 147-166 (2000)
72. Howard CS, Blakeney DC, Medige J, Moy OJ, Peimer CA: Functional assessment in the rat by ground reaction forces. *J Biomech* 33: 751-757 (2000)
73. Hulth A: Current concepts of fracture healing. *Clin Orthop* 265-284 (1989)
74. Hupel TM, Aksenov SA, Schemitsch EH: Cortical bone blood flow in loose and tight fitting locked unreamed intramedullary nailing: a canine segmental tibia fracture model. *J Orthop Trauma* 12: 127-135 (1998)
75. Indrekvam K, Lekven J, Engesaeter LB, Langeland N: Effects of intramedullary reaming and nailing on blood flow in rat femora. *Acta Orthop Scand* 63: 61-65 (1992)
76. Inoue N, Rafiee B, Toda I, Tamada Y, Suwa F, H.T. A, Chao EYS: Vascular and trabecular microstructures in the early stage of cortical defect repair. *Journal of Biomechanics* 34, Supplement 1: S81 (2001)
77. Janssen GH, Tangelder GJ, oude Egbrink MG, Reneman RS: Different effects of anesthetics on spontaneous leukocyte rolling in rat skin. *Int J Microcirc Clin Exp* 17: 305-313 (1997)
78. Jarvinen M, Sorvari T: Healing of a crush injury in rat striated muscle. 1. Description and testing of a new method of inducing a standard injury to the calf muscles. *Acta Pathol Microbiol Scand [A]* 83: 259-265 (1975)
79. Jarvinen M: Healing of crush injuries in rat striated muscle. *Acta Path Microbiol Scand (Section A)* 84: 85-94 (1976)

80. Jarvinen M, Aho AJ, Lehto M, Toivonen H: Age dependent repair of muscle rupture. A histological and microangiographical study in rats. *Acta Orthop Scand* 54: 64-74 (1983)
81. Johnell O, Hulth A: The mitotic activity of bone marrow and thymus after combined antigenic challenge and trauma. *Acta Orthop Scand* 50: 713-715 (1979)
82. Johnson JM, Taylor WF, Shepherd AP, Park MK: Laser-Doppler measurement of skin blood flow: comparison with plethysmography. *J Appl Physiol* 56: 798-803 (1984)
83. Jurvelin J, Lahtinen T, Kiviranta I, Arnala I, Lappalainen R, Tammi M, Helminen HJ: Blood flow, histomorphology and elemental composition of the canine femur after physical training or immobilization. *Acta Physiol Scand* 132: 385-389 (1988)
84. Kalender WA, Prokop M: 3D CT Angiography. In: Udupa JK, Herman GT (Hrsg) *3D Imaging in medicine*, 2nd. Aufl, CRC Press, London, S. 265-283 (2000)
85. Katthagen BD, Spies H, Bachmann G: [Arterial vascularization of the bony acetabulum]. *Z Orthop Ihre Grenzgeb* 133: 7-13 (1995)
86. Kelly PJ: Comparison of marrow and cortical bone blood by 125 I-labeled 4-iodoantipyrine (I-Ap) washout. *J Lab Clin Med* 81: 497-505 (1973)
87. Kelly PJ, Bassingthwaite JB: Studies on bone ion exchanges using multiple-tracer indicator-dilution techniques. *Fed Proc* 36: 2634-2639 (1977)
88. Kenwright J, Goodship AE: Controlled mechanical stimulation in the treatment of tibial fractures. *Clin Orthop* 36-47 (1989)
89. Kessler SB, Hallfeldt KK, Perren SM, Schweiberer L: The effects of reaming and intramedullary nailing on fracture healing. *Clin Orthop* 18-25 (1986)
90. Klug W: [Angiographic demonstration of the medullary space and callus vessels during secondary bone fracture healing; animal experiments]. *Z Exp Chir Transplant Kunstliche Organe* 19: 50-56 (1986)
91. Kokubu T, Hak DJ, Hazelwood SJ, Reddi AH: Development of an atrophic nonunion model and comparison to a closed healing fracture in rat femur. *J Orthop Res* 21: 503-510 (2003)
92. Krettek C, Haas NP, Tschernke H: Results of external fixation of 202 tibial shaft fractures. *Unfallchirurg* 92: 440-452 (1989)

93. Krettek C, Schandelmaier P, Tscherne H: Nonreamed interlocking nailing of closed tibial fractures with severe soft tissue injury. *Clin Orthop* 34-47 (1995)
94. Krettek C: [Fracture and soft tissue damage]. *Chirurg* 69: 684-700 (1998)
95. Krettek C: [Principles of intramedullary fracture stabilization. 2. Surgical technique]. *Unfallchirurg* 104: 749-769; quiz 770-741 (2001)
96. Kunze KG, Hofstetter H, Posalaky I, Winkler B: Changes in blood-flow in the bones after osteotomy and osteosynthesis. *Unfallchirurgie* 7: 169-180 (1981)
97. Kuznetsova LV, Tomasek N, Sigurdsson GH, Banic A, Erni D, Wheatley AM: Dissociation between volume blood flow and laser-Doppler signal from rat muscle during changes in vascular tone. *Am J Physiol* 274: H1248-1254 (1998)
98. Kvist M, Jarvinen M: Clinical, histochemical and biomechanical features in repair of muscle and tendon injuries. *Int J Sports Med* 3 Suppl 1: 12-14 (1982)
99. Landry PS, Marino AA, Sadasivan KK, Albright JA: Effect of soft-tissue trauma on the early periosteal response of bone to injury. *J Trauma* 48: 479-483 (2000)
100. Lang F: Bindegewebe - Physiologie und allgemeine Pathophysiologie. In: Lang F (Hrsg) *Pathophysiologie, Pathobiochemie*, Bd 3. Auflage, Aufl, Enke-Verlag, Stuttgart, S. 475 (1987)
101. Langer S, Born F, Hatz R, Biberthaler P, Messmer K: Orthogonal polarization spectral imaging versus intravital fluorescent microscopy for microvascular studies in wounds. *Ann Plast Surg* 48: 646-653 (2002)
102. Lausten GS, Kiaer T, Dahl B: Laser Doppler flowmetry for estimation of bone blood flow: studies of reproducibility and correlation with microsphere technique. *J Orthop Res* 11: 573-580 (1993)
103. Lewallen DG, Chao EY, Kasman RA, Kelly PJ: Comparison of the effects of compression plates and external fixators on early bone-healing. *J Bone Joint Surg Am* 66: 1084-1091 (1984)
104. Linden M, Sirsjö A, Lindbom L, Nilsson G, Gidlöf A: Laser-Doppler perfusion imaging of microvascular blood flow in rabbit tenuissimus muscle. *Am J Physiol*. H1496-4500 (1995)
105. Lippuner K, Vogel R, Tepic S, Rahn BA, Cordey J, Perren SM: Effect of animal species and age on plate-induced vascular damage in cortical bone. *Arch Orthop Trauma Surg* 111: 78-84 (1992)
106. Macnab I, De Haas WG: The role of periosteal blood supply in the healing of fractures of the tibia. *Clin Orthop* 105: 27-33 (1974)

107. Martin RB, Burr DB: Mechanical adaptation. In: Martin RB, Burr DB (Hrsg) Structure, function and adaptation of compact bone, Aufl, Raven Press, New York, S. 143-185 (1989)
108. Matsen FA, 3rd, Winquist RA, Krugmire RB, Jr.: Diagnosis and management of compartmental syndromes. J Bone Joint Surg Am 62: 286-291 (1980)
109. Maurer-Klein N: Einfluss eines Weichteilschadens auf die Frakturheilung und die Zusammenhänge zwischen Schockgeschehen und Weichteilkonsolidierung am Rattenmodell. Med. Dissertation, Universität Ulm 2004
110. McCarthy ID, Hughes SP: The role of skeletal blood flow in determining the uptake of <sup>99m</sup>Tc-methylene diphosphonate. Calcif Tissue Int 35: 508-511 (1983)
111. McKibbin B: The biology of fracture healing in long bones. J Bone Joint Surg Br 60-B: 150-162 (1978)
112. Menetrey J, Kasemkijwattana C, Day CS, Bosch P, Vogt M, Fu FH, Moreland MS, Huard J: Growth factors improve muscle healing in vivo. J Bone Joint Surg Br 82: 131-137 (2000)
113. Menger MD, Pelikan S, Steiner D, Messmer K: Microvascular ischemia/reperfusion injury in striated muscle: significance of 'reflow-paradox'. Am J Physiol 263: H1901-H1906 (1992)
114. Menger MD, Steiner D, Messmer K: Microvascular ischemia/reperfusion injury in striated muscle: significance of 'no-reflow'. Am J Physiol 263: (1992)
115. Menger MD, Messmer K: [Microcirculation of skeletal muscle after ischemia and reperfusion]. Wien Med Wochenschr 143: 148-158 (1993)
116. Menth-Chiari WA, Curl WW, Paterson-Smith B, Smith TL: [Microcirculation of striated muscle in closed soft tissue injury: effect on tissue perfusion, inflammatory cellular response and mechanisms of cryotherapy. A study in rat by means of laser Doppler flow-measurements and intravital microscopy]. Unfallchirurg 102: 691-699 (1999)
117. Mittlmeier T, Vollmar B, Menger MD, Schewior L, Raschke M, Schaser KD: Small volume hypertonic hydroxyethyl starch reduces acute microvascular dysfunction after closed soft-tissue trauma. J Bone Joint Surg Br 85: 126-132 (2003)

118. Mizuno K, Mineo K, Tachibana T, Sumi M, Matsubara T, Hirohata K: The osteogenetic potential of fracture haematoma. Subperiosteal and intramuscular transplantation of the haematoma. *J Bone Joint Surg Br* 72: 822-829 (1990)
119. Molster A, Gjerdet NR, Raugstad TS, Hvidsten K, Alho A, Bang G: Effect of instability of experimental fracture healing. *Acta Orthop Scand* 53: 521-526 (1982)
120. Molster AO: Effects of rotational instability on healing of femoral osteotomies in the rat. *Acta Orthop Scand* 55: 632-636 (1984)
121. Montiero AA, Svensson H, Bornmyr S, Arborelius M, Kopp S: Comparison of Xe (133) clearance and laser doppler flowmetrie in assessment of blood flow changes in human masseter muscle induced by isometric contraction. *Archs oral Biol* 34: 779-786 (1989)
122. Morisaki H, Suematsu M, Wakabayashi Y, Moro-oka S, Fukushima K, Ishimura Y, Takeda J: Leukocyte-endothelium interaction in the rat mesenteric microcirculation during halothane or sevoflurane anesthesia. *Anesthesiology* 87: 591-598 (1997)
123. Muir GD, Whishaw IQ: Complete locomotor recovery following corticospinal tract lesions: measurement of ground reaction forces during overground locomotion in rats. *Behav Brain Res* 103: 45-53 (1999)
124. Muller ME, Perren SM: [Callus and primary bone healing]. *Monatsschr Unfallheilkd Versicher Versorg Verkehrsmed* 75: 442-454 (1972)
125. Nilsson GE, Tenland T, Oberg PA: Evaluation of a laser Doppler flowmeter for measurement of tissue blood flow. *IEEE Trans Biomed Eng* 27: 597-604 (1980)
126. Nishina K, Akamatsu H, Mikawa K, Shiga M, Maekawa N, Obara H, Niwa Y: The inhibitory effects of thiopental, midazolam, and ketamine on human neutrophil functions. *Anesth Analg* 86: 159-165 (1998)
127. Nolte D, Lehr HA, Messmer K: Adonesine inhibits postischemic leucozyte-endothelium interaction in postcapillary venules of the hamster. *Am J Physiol* 261: H651-655 (1991)
128. Notzli HP, Swiontkowski MF, Thaxter ST, Carpenter GK, 3rd, Wyatt R: Laser Doppler flowmetry for bone blood flow measurements: helium-neon laser

- light attenuation and depth of perfusion assessment. *J Orthop Res* 7: 413-424 (1989)
129. Nunamaker DM: Experimental models of fracture repair. *Clin Orthop* S56-65 (1998)
130. O'Sullivan ME, Chao EY, Kelly PJ: The effects of fixation on fracture-healing. *J Bone Joint Surg Am* 71: 306-310 (1989)
131. Oestern HJ, Tscherne H: [Pathophysiology and classification of soft tissue damage in fractures]. *Orthopade* 12: 2-8 (1983)
132. Ozaki A, Tsunoda M, Kinoshita S, Saura R: Role of fracture hematoma and periosteum during fracture healing in rats: interaction of fracture hematoma and the periosteum in the initial step of the healing process. *J Orthop Sci* 5: 64-70 (2000)
133. Pauwels F: [Short survey of mechanical stress of bone and its importance for the functional adaptation (author's transl)]. *Z Orthop Ihre Grenzgeb* 111: 681-705 (1973)
134. Perren SM: Physical and biological aspects of fracture healing with special reference to internal fixation. *Clin Orthop* 175-196 (1979)
135. Petersen WJ, Lankes JM, Paulsen F, Hassenpflug J: The arterial supply of the lesser metatarsal heads: a vascular injection study in human cadavers. *Foot Ankle Int* 23: 491-495 (2002)
136. Puhl G, Schaser KD, Vollmar B, Menger MD, Settmacher U: Noninvasive in vivo analysis of the human hepatic microcirculation using orthogonal polarization spectral imaging. *Transplantation* 75: 756-761 (2003)
137. Redaelli A, Rizzo G, Arrigoni S, Di Martino E, Origgi D, Fazio F, Montevecchi F: An assisted automated procedure for vessel geometry reconstruction and hemodynamic simulations from clinical imaging. *Comput Med Imaging Graph* 26: 143-152 (2002)
138. Reed AA, Joyner CJ, Isefuku S, Brownlow HC, Simpson AH: Vascularity in a new model of atrophic nonunion. *J Bone Joint Surg Br* 85: 604-610 (2003)
139. Reeve J, Arlot M, Wootton R, Edouard C, Tellez M, Hesp R, Green JR, Meunier PJ: Skeletal blood flow, iliac histomorphometry, and strontium kinetics in osteoporosis: a relationship between blood flow and corrected apposition rate. *J Clin Endocrinol Metab* 66: 1124-1131 (1988)

140. Reichert IL, McCarthy ID, Hughes SP: The acute vascular response to intramedullary reaming. Microsphere estimation of blood flow in the intact ovine tibia. *J Bone Joint Surg Br* 77: 490-493 (1995)
141. Reynders P, Becker J, Broos P: The osteogenic potential of free periosteal autografts in tibial fractures with severe soft tissue damage: an experimental study. *Acta Orthopaedica Belgica* 64: 184-192 (1998)
142. Rhinelander FW: The normal microcirculation of diaphyseal cortex and its response to fracture. *J Bone Joint Surg Am* 50: 784-800. (1968)
143. Rhinelander FW, Phillips RS, Steel WM, Beer JC: Microangiography in bone healing. II. Displaced closed fractures. *J Bone Joint Surg Am* 50: 643-662 passim (1968)
144. Rhinelander FW: Circulation in Bone. In: Burne (Hrsg) *The Biochemistry and Physiology of Bone*, Bd II, Aufl, Academic Press, New and London, S. Chap. 1 (1972)
145. Rhinelander FW: Tibial blood supply in relation to fracture healing. *Clin Orthop* 105: 34-81. (1974)
146. Rhinelander FW: Vascular proliferation and blood supply during fracture healing. in: Brooker, A.F./Edwards, C.C. - *External Fixation: The Current State of the Art*, The Williams and Wilkins Co (Baltimore) 9-14 (1979)
147. Rhinelander FW, Wilson JW: Blood supply to developing, mature, and healing bone. In: Sumner-Smith G (Hrsg) *Bone in clinical orthopaedics.*, Aufl, W.B. Saunders Co., Philadelphia, S. 81-158 (1982)
148. Richards RR, Schemitsch EH: Effect of muscle flap coverage on bone blood flow following devascularization of a segment of tibia: an experimental investigation in the dog. *J Orthop Res* 7: 550-558 (1989)
149. Rommens PM, Broos PL: The significance of soft tissue trauma for fracture healing. A prospective study on 70 tibial shaft fractures following primary treatment with the Monofixateur. *Unfallchirurg* 95: 133-141 (1992)
150. Rommens PM, Claes P, De Boodt P, Stappaerts KH, Broos PL: [Therapeutic procedure and long-term results in tibial pilon fracture in relation to primary soft tissue damage]. *Unfallchirurg* 97: 39-46 (1994)
151. Rose S, Marzi i: Pathophysiologie des Polytraumas. *Zentralblatt für Chirurgie* 121: 896-913 (1996)

152. Rucker M, Vollmar B, Roesken F, Spitzer WJ, Menger MD: Microvascular transfer-related abrogation of capillary flow motion in critically reperfused composite flaps. *Br J Plast Surg* 55: 129-135 (2002)
153. Rushton JL, Davies I, Horan MA, Mahon M, Williams R: Production of consistent crush lesions of murine skeletal muscle in vivo using an electromechanical device. *J Anat* 190 ( Pt 3): 417-422 (1997)
154. Schaser KD, Vollmar B, Menger MD, Schewior L, Kroppenstedt SN, Raschke M, Lubbe AS, Haas NP, Mittlmeier T: In vivo analysis of microcirculation following closed soft-tissue injury. *J Orthop Res* 17: 678-685 (1999)
155. Schebitz H, Brass W, Wintzer HJ: Allgemeine Chirurgie für Tierärzte und Studierende. S. 160-191 (1993)
156. Schemitsch EH, Kowalski MJ, Swiontkowski MF: Evaluation of a laser Doppler flowmetry implantable fiber system for determination of threshold thickness for flow detection in bone. *Calcif Tissue Int* 55: 216-222 (1994)
157. Schenk R: Histophysiology of bone remodelling and bone repair. In: Lin O.C. CEYS (Hrsg) *Perspectives on Biomaterials*, Aufl, Elsevier, Amsterdam, S. (1986)
158. Schenk RK, Perren SM: [Biology and biomechanics of fracture healing in long bones as a basis for osteosynthesis]. *Hefte Unfallheilkd* 29-41 (1977)
159. Schultz JH, Wolter D, Ortel G, Fink B: [Fracture treatment in the area of the tibia]. *Unfallchirurg* 95: 537-540 (1992)
160. Smith SR, Bronk JT, Kelly PJ: Effect of fixation on fracture blood flow. *Orthop Trans* 294-295 (1987)
161. Smith TL, Curl WW, Smith BP, Holden MB, Wise T, Marr A, Koman LA: New skeletal muscle model for the longitudinal study of alterations in microcirculation following contusion and cryotherapy. *Microsurgery* 14: 487-493 (1993)
162. Steinbrech DS, Mehrara BJ, Saadeh PB, Chin G, Dudziak ME, Gerrets RP, Gittes GK, Longaker MT: Hypoxia regulates VEGF expression and cellular proliferation by osteoblasts in vitro. *Plast Reconstr Surg* 104: 738-747 (1999)
163. Stoner HB: Metabolism after trauma and in sepsis. *Circ Shock* 19: 75-87 (1986)

164. Strachan RK, McCarthy I, Fleming R, Hughes SP: The role of the tibial nutrient artery. Microsphere estimation of blood flow in the osteotomised canine tibia. *J Bone Joint Surg Br* 72: 391-394. (1990)
165. Street J, Winter D, Wang JH, Wakai A, McGuinness A, Redmond HP: Is human fracture hematoma inherently angiogenic? *Clin Orthop* 224-237 (2000)
166. Stürmer KM, Schuchardt W: Neue Aspekte der gedeckten Marknagelung und des Aufbohrens der Markhöhle im Tierexperiment. I. Die Schafstibia als Tiermodell für die Marknagelung. *Unfallheilkunde* 83: (1980)
167. Stürmer KM: Histologie und Biomechanik der Frakturheilung unter den Bedingungen des Fixateur externe. *Hefte Unfallheilkunde* 200: 233-243 (1988)
168. Svindland AD, Nordsletten L, Reikeras O, Skjeldal S: Periosteal response to transient ischemia. Histological studies on the rat tibia. *Acta Orthop Scand* 66: 468-472 (1995)
169. Swiontkowski MF, Tepic S, Perren SM, Moor R, Ganz R, Rahn BA: Laser Doppler flowmetry for bone blood flow measurement: correlation with microsphere estimates and evaluation of the effect of intracapsular pressure on femoral head blood flow. *J Orthop Res* 4: 362-371 (1986)
170. Swiontkowski MF, Schlehr F, Collins JC, Sanders R, Pou A: Comparison of two laser Doppler flowmetry systems for bone blood flow analysis. *Calcif Tissue Int* 43: 103-107 (1988)
171. Swiontkowski MF, Senft D: Cortical Bone Microperfusion: Response to Ischemia and Changes in Major Arterial Blood Flow. *Journal of Orthopaedic Research* 337-343 (1992)
172. Szczesny G, Nolte D, Veihelmann A, Messmer K: A new chamber technique for intravital microscopic observations in the different soft tissue layers of mouse hindleg. *J Trauma* 49: 1108-1115 (2000)
173. Szczesny G, Veihelmann A, Nolte D, Messmer K: Changes in the local blood and lymph microcirculation in response to direct mechanical trauma applied to leg: in vivo study in an animal model. *J Trauma* 51: 508-517 (2001)
174. Takahashi H, Yamamuro T, Okumura H, Kasai R, Tada K: Bone blood flow after spinal paralysis in the rat. *J Orthop Res* 8: 393-400 (1990)
175. Tenenbaum HC, Heersche JN: Differentiation of osteoid-producing cells in vitro: possible evidence for the requirement of a microenvironment. *Calcif Tissue Int* 38: 262-267 (1986)

176. Thakral KK, Goodson WH, 3rd, Hunt TK: Stimulation of wound blood vessel growth by wound macrophages. *J Surg Res* 26: 430-436 (1979)
177. Thews G, Vaupel P: *Vegetative Physiologie*. Springer, Berlin, S. (1997)
178. Thomale UW, Kroppenstedt SN, Beyer TF, Schaser KD, Unterberg AW, Stover JF: Temporal profile of cortical perfusion and microcirculation after controlled cortical impact injury in rats. *J Neurotrauma* 19: 403-413 (2002)
179. Tischler ME, Fagan JM: Response to trauma of protein, amino acid, and carbohydrate metabolism in injured and uninjured rat skeletal muscles. *Metabolism* 32: 853-868 (1983)
180. Tothill P, Hooper G: Invalidity of single-passage measurements of the extraction of bone-seeking tracers in rats and rabbits. *J Orthop Res* 2: 75-79 (1984)
181. Trueta J: The role of vessels in osteogenesis. *Journal of Bone and Joint Surgery* 45-B: 402 (1963)
182. Trueta J: Blood supply and the rate of healing of tibial fractures. *Clin Orthop* 105: 11-26 (1974)
183. Turgut A, Gokturk E, Kose N, Kacmaz M, Ozturk HS, Seber S, Acar S: Oxidant status increased during fracture healing in rats. *Acta Orthop Scand* 70: 487-490 (1999)
184. Utvag SE, Grundnes O, Reikeraos O: Effects of periosteal stripping on healing of segmental fractures in rats. *J Orthop Trauma* 10: 279-284 (1996)
185. Utvag SE, Grundnes O, Reikeras O: Effects of lesion between bone, periosteum and muscle on fracture healing in rats. *Acta Orthop Scand* 69: 177-180 (1998)
186. Utvag SE, Grundnes O, Reikeras O: Effects of degrees of reaming on healing of segmental fractures in rats. *J Orthop Trauma* 12: 192-199 (1998)
187. Utvag SE, Grundnes O, Reikeras O: Early muscle-periosteal lesion inhibits fracture healing in rats. *Acta Orthop Scand* 70: 62-66 (1999)
188. Utvag SE, Iversen KB, Grundnes O, Reikeras O: Poor muscle coverage delays fracture healing in rats. *Acta Orthop Scand* 73: 471-474 (2002)
189. Utvag SE, Grundnes O, Rindal DB, Reikeras O: Influence of extensive muscle injury on fracture healing in rat tibia. *J Orthop Trauma* 17: 430-435 (2003)

190. Vollmar B, Menger MD, Glasz J, Leiderer R, Messmer K: Impact of leukocyte-endothelial cell interaction in hepatic ischemia-reperfusion injury. *Am J Physiol* 267: G786-793 (1994)
191. Wallace AL, Draper ER, Strachan RK, McCarthy ID, Hughes SP: The vascular response to fracture micromovement. *Clin Orthop* 281-290 (1994)
192. Whiteside LA, Lesker PA, Simmons DJ: Measurement of regional bone and bone marrow flow in rabbit using the hydrogen washout technique. *Clin Orthop Rel Res* 340-346 (1977)
193. Whiteside LA, Lesker PA: The effects of extraperiosteal and subperiosteal dissection. II. On fracture healing. *J Bone Joint Surg Am* 60: 26-30 (1978)
194. Whiteside LA, Lesker PA: The effects of extraperiosteal and subperiosteal dissection. I. On blood flow in muscle. *J Bone Joint Surg Am* 60: 23-26 (1978)
195. Willans SM: Modelling in the analysis of ion exchange between blood and bone. PhD thesis, University of Edinburgh (1987)
196. Willans SM, McCarthy ID: Heterogeneity of blood flow in tibial cortical bone: an experimental investigation using microspheres. *J Orthop Res* 9: 168-173 (1991)
197. Willenegger H, Perren SM, Schenk R: [Primary and secondary healing of bone fractures]. *Chirurg* 42: 241-252 (1971)
198. Wissing H, Stürmer M: Untersuchungen zur Knochenregeneration nach Unterbrechung der medullären oder periostalen Strombahn bei verschiedenen Versuchstier-Species. *Hefte zur Unfallheilkunde* 181: 225-228 (1986)
199. Wolf S, Janousek A, Pfeil J, Veith W, Haas F, Duda G, Claes L: The effects of external mechanical stimulation on the healing of diaphyseal osteotomies fixed by flexible external fixation. *Clin Biomech (Bristol, Avon)* 13: 359-364. (1998)
200. Yamaguchi K, Sweet FA, Bindra R, Morrey BF, Gelberman RH: The extraosseous and intraosseous arterial anatomy of the adult elbow. *J Bone Joint Surg Am* 79: 1653-1662 (1997)
201. Yuan Y, A. MR, Chilian WM, Zawieja DC, Granger HJ: Interaction of neutrophils and endothelium in isolated coronary venules and arterioles. *Am J Physiol* 268: H490-498 (1995)

- 
202. Yuehuei HA, Friedman RJ: Animal Selections in Orthopaedic Research. In: Yuehuei HA, Friedman RJ (Hrsg) Animal Models in Orthopaedic Research, Aufl, CRC Press LLC, Boca Raton, S. 39-50 (1999)
203. Zhang L, Bail H, Mittlmeier T, Haas NP, Schaser KD: Immediate microcirculatory derangements in skeletal muscle and periosteum after closed tibial fracture. J Trauma 54: 979-985 (2003)
204. Zucman J: Studies on the vascular connexions between periosteum, bone, and muscle. Br J Surg 48: 324-328 (1960)

# Danksagung

Mein herzlichster Dank gilt Herrn Prof. Dr. Lutz Claes für die Überlassung des Themas und für die Möglichkeit, an diesem außergewöhnlichen Institut promovieren zu können. Sein stetiges Interesse am experimentellen Fortlauf der Dinge, die durch seine kritischen Nachfragen ausgelösten Denkanstöße und das motivierende Nachfragen zum Stand der Doktorarbeit haben den zügigen Fortlauf der Arbeit unterstützt.

Herrn PD Dr. Peter Augat möchte ich für die schnelle Durchsicht und Korrektur der Arbeit und für die Tätigkeit als Gutachter Dank sagen. Meinem Zimmerkollegen Peter Augat will ich für das freundschaftliche Miteinander, das Verraten von kleinen Tips und Tricks und für sein Engagement, das mir in arbeitsintensiven Zeiten den Rücken freihielt, ganz besonders danken.

Herzlichen Dank den Unfallchirurgen des Bundeswehrkrankenhauses Ulm: Herrn Prof. Dr. Heinz Gerngross für die Begutachtung der Arbeit und Dr. Thomas Henke für das freundliche Miteinander bei den Operationen. Bei Dr. Benedikt Friemert möchte ich mich für seine große Nachsicht und Geduld für die Zeiten bedanken, in denen ich nicht zur Verfügung stehen konnte.

Vergessen werden darf natürlich nicht der Tausendsassa der Instituts Herbert Schmitt. Ohne seine Auffassungsgabe und die schnelle Umsetzung manch laienhafter Ideen wäre so einiges sehr viel mühsamer gewesen. Danke Genius Technicus!

Herzlichen Dank an Sandra Shefelbine und Andreas Gold für die Unterstützung am Mikro-CT und an der Zwick.

Ferner möchte ich allen Mitarbeitern für die angenehme Arbeitsatmosphäre danken.

# Lebenslauf

Name, Vorname: Bumann-Melnyk, Mark verheiratet mit Anika Melnyk  
Geburtsdatum: 30.11.1971  
Geburtsort: Northeim, Deutschland  
Staatsbürgerschaft: deutsch  
Schule: Allg. Hochschulreife 1992  
Wehrdienst: Juli 1992-Juni 1993

Studium: WS 93/94-SS 1996 Lehramt Gymnasium Deutsch/Sport,  
Universität Göttingen  
WS 96/97-SS 2000  
Magisterstudiengang Sportwissenschaften/Physiologie/  
Pädagogik an der Universität Göttingen  
WS 97/98  
Studium der Sportwissenschaften an der Universität  
Urbino/Italien  
November 99-April 2000  
Magisterarbeit (Otto Bock Orthopädische Industrie)  
Juni 2000  
Abschluss des Studiums als Sportwissenschaftler, M.A.

Beruf: April-Juni 2001  
Leiter der Sportrehabilitation der Ambulanten Tagesklinik  
S.P.O.R.T. in Regensburg  
Juli 2001-  
Wissenschaftlicher Mitarbeiter am Institut für  
Unfallchirurgische Forschung und Biomechanik der  
Universität Ulm  
April 2004 Abschluss der Promotion „Der Einfluss eines  
Weichteilschadens auf die Frakturheilung – eine  
biomechanische und angiographische Untersuchung“